JUSTYNA STARZYK, ANNA SUCH, DOMINIKA DRAB, ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA

*Pracownia Hematologii Eksperymentalnej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
E-mail: ela.kolaczowska@uj.edu.pl*

SARS-CoV-2 A NEUTROFILE: W SIECI NEUTROFILOWYCH PUŁAPEK ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH NET

WSTĘP

Wirus SARS-CoV-2 stanowi poważne zagrożenie dla funkcjonowania płuc, a także innych narządów, w tym nerek, wątroby i serca, oraz śródbłonnów naczyń krwionośnych, prowadząc nawet do śmierci zakażonego pacjenta. U osób, u których rozwija się choroba COVID-19 (ang. coronavirus disease 2019), dochodzi do rozregulowania zarówno wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej oraz balansu pomiędzy nimi. Choć ciągle poznajemy mechanizmy tej choroby, wiadomo już, że jedną z najważniejszych przyczyn procesów patofizjologicznych zachodzących u chorych jest hiper-aktywacja neutrofilów, prowadząca do nadmiernego wyrzutu neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (NET), które nie są prawidłowo usuwane. Rolą NET jest wylapywanie patogenów takich jak wirusy czy bakterie, ale mogą one stanowić miecz obosieczny, prowadząc także do uszkodzeń tkanek własnych. Wynika to z faktu, że proteazy wchodzące w skład NET, takie jak elastaza neutrofilowa, mogą ułatwiać wnikanie wirusa do komórek (ułatwiają remodelling białek powierzchniowych wirusa), sprzyjają tworzeniu zakrzepów, a także aktywacji układu dopełniacza. Na początku 2021 r. grupa 47 naukowców zajmujących się badaniami NET, w tym współautorka obecnego opracowania (EK), zebrali i przeanalizowali wszystkie doniesienia na temat powiązań pomiędzy pułapkami neutrofilowymi a przebiegiem infekcji SARS-CoV-2, wykazując ścisłą zależność po-

między nimi (ACKERMANN i współaut. 2021). W obecnej pracy charakteryzujemy NET oraz opisujemy ich rolę w rozwoju i przebiegu infekcji COVID-19. Przedstawiamy także testowane i potencjalne terapie anty-NET, mogące poprawić stan chorych i/lub ochronić przed śmiercią pacjentów.

NEUTROFILE

Neutrofile to komórki układu odpornościowego, biorące udział w odpowiedzi wrodzonej, nazywane inaczej granulocytami obojętnochłonnymi lub leukocytami polimorfonuklearnymi (ang. polymorphonuclear leukocytes, PMN), które stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami (KOŁACZKOWSKA i KUBES 2013). W krwiobiegu człowieka neutrofile stanowią większość wszystkich leukocytów (50-70%), a w zdrowym organizmie, w ciągu doby, powstaje ich ok. 10^{11} (BORREGAARD 2010). Wartości referencyjne prawidłowej liczebności neutrofilów wahają się między 1800-8000/ μ l krwi zdrowego, dorosłego człowieka. Dojrzałe granulocyty obojętnochłonne krążące w krwiobiegu mają średnicę 10-15 μ m, jądro podzielone na segmenty oraz unikatowe ziarnistości i pęcherzyki wydzielnicze obecne w cytoplazmie (BORREGAARD 2010). Obecnie uważa się, że długość życia neutrofilu we krwi obwodowej człowieka to ok. 24 godziny, ale w tkankach, podczas zapalenia, czas ten może ulec wydłużeniu (KOŁACZKOWSKA i KUBES 2013).

Słowa kluczowe: dopełniacz, neutrofile, neutrofilowe pułapki zewnątrzkomórkowe, SARS-CoV-2, zakrzepica

*Praca współfinansowana z Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu 2018/29/B/NZ6/00713 (Opus 15).

Proces powstawania granulocytów, w tym neutrofilów, nazywamy granulocytopoezą. Zaczyna się on w szpiku kostnym, gdzie neutrofile różnicują się z komórek macierzystych krwi tworzenia (BORREGAARD 2010). Kolejne stadia dojrzewających neutrofilów to mieloblast, promielocyt, mielocyt, metamielocyt, neutrofil pałeczkowaty i neutrofil polimorfojądrowy (GOLAB i współaut. 2017). Granulocyty obojętnochłonne uwalniane są ze szpiku do krwi, i choć zasadniczo w stanie homeostazy neutrofile występują wyłącznie w krwiobiegu, to jednak pewną ich pulę można odnaleźć w szpiku kostnym, śledzionie, wątrobie i płucach (SUMMERS i współaut. 2010). W narządach tych spełniają one rolę komórek patrolujących, monitorując obecność patogenów lub uszkodzeń tkanek (KOLACZKOWSKA i KUBES 2013). Dodatkowo, w krwiobiegu, oprócz krążących neutrofilów, istnieje też tzw. pula marginalna; są to neutrofile, które pozostają w kontakcie z śródbłonkiem żyłek pozawłosowatych (GOLAB i współaut. 2017). Komórki te zostają zrekrutowane (wracają do puli krążącej we krwi) dopiero pod wpływem bodźców zapalnych (KOLACZKOWSKA i KUBES 2013).

UNIKATOWE CECHY NEUTROFILI

Morfologicznie neutrofile posiadają dwie charakterystyczne cechy: segmentowane jądro komórkowe i liczne, zróżnicowane ziarnistości (Ryc. 1).

Płotowate, segmentowane jądro neutrofila w dojrzałej komórce składa się z 3 do 5 płatów, a ich liczba zwiększa się w miarę dojrzewania neutrofila. Jednak spotykane są przypadki, w których jądro neutrofila posiada więcej płatów i takie zjawisko zwane jest hipersegmentacją (MANLEY i współaut. 2018). Jest to stan patologiczny, najczęściej spowodowany niedoborem składników odżywczych, takich jak witamina B₁₂, kwas foliowy czy żelazo (GOLAB i współaut. 2017). Mimo swoich dużych rozmiarów, jądro nie jest elementem statycznym. Dzięki swojemu położeniu w sąsiedztwie centrum organizującego mikrotubule (ang. microtubule organizing centre, MTOC) może ułatwiać przemieszczanie się komórki. MTOC odpowiada za skupienie mikrotubul, które rozgałęziają się wewnątrz komórki, otaczając także jądro komórkowe (MANLEY i współaut. 2018). W MTOC generowane są siły zdolne popchnąć jądro neutrofila do przodu, co skutkuje ruchem całej komórki. Z kolei dzięki swojemu unikatowemu składowi, jądro może dynamicznie zmieniać kształt, kiedy komórka przeciska się pomiędzy komórkami śródbłonka opuszczając naczynie (MANLEY i współaut. 2018). Zatem odkształcalność jądra może

Ryc. 1. Schematyczna budowa neutrofila: unikatowe jądro i typy ziarnistości.

Na rycinie przedstawiono schematyczną budowę neutrofila z uwzględnieniem segmentowanej struktury jądra komórkowego oraz licznych ziarnistości czterech typów. Dla każdego typu ziarnistości wymieniono najważniejsze unikatowe białka, specyficzne tylko dla danego typu ziarnistości, a także pozostałe białka w nich występujące. Na schemacie zaznaczono także obecność mitochondriów, które choć nieliczne w neutrofilach, mają znaczenie w procesach przedstawionych na Ryc. 3. Dla porównania, schemat neutrofila zestawiono ze zdjęciem ludzkiego neutrofila, obecnego w rozmazie ludzkiej krwi pełnej (barwienie May-Grunwald Giemsa; skala 5 µm, autorka: dr Małgorzata Opydo-Chanek). Na zdjęciu widoczne są także fragmenty erytrocytów. MMP - metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej.

narzucać szybkość migracji neutrofilów, będąc kluczowym elementem determinującym efektywność tego zjawiska.

Kolejną unikatową cechą neutrofilów są ich ziarnistości występujące w czterech typach: ziarnistości pierwszorzędowe (azurofilne), drugorzędowe (swoiste, wtórne), trzeciorzędowe (żelatynowe) i pęcherzyki wydzielnicze, a każdy z nich różni się składem białek przeciwbakteryjnych i enzymatycznych, wykorzystywanych do walki z patogenami (GOLAB i współaut. 2017) (Ryc. 1). Przykładowo, w ziarnistościach azurofilnych przechowywane są m.in. mieloperoksydaza (MPO) czy elastaza neutrofilowa (GOLAB i współaut. 2017).

JAK FUNKCJONUJĄ NEUTROFILE?

Neutrofile, jak i inne leukocyty odpowiadają wrodzonej, rozpoznają patogeny (ich

unikatowe struktury) poprzez receptory rozpoznające wzorce (ang. pattern recognition receptors, PRR), które mogą występować zarówno na powierzchni, jak i w strukturach wewnątrzkomórkowych leukocytów (GOLAB i współaut. 2017). Przykładem takich struktur są receptory Toll-podobne (ang. Toll-like receptors, TLR) występujące w licznych podtypach, np. TLR2 czy TLR4, zlokalizowane na powierzchni leukocytów. Receptory PRR rozpoznają wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen associated molecular patterns, PAMP), struktury niezbędne dla patogenów do ich przeżycia lub namnażania, i jednocześnie nieobecne na/w komórkach kręgowców. Do PAMP należy m.in. lipopolisacharyd (LPS), peptydoglikany, kwas teichojowy i mannany (GOLAB i współaut. 2017). Poszczególne PRR rozpoznają dane PAMP, np. TLR4 rozpozna-

je LPS, a TLR2 kwasy teichojowe. Istnieją także podtypy receptorów TLR zlokalizowane wewnątrzkomórkowo, np. TLR7 i TLR9, odpowiedzialne za rozpoznanie określonego typu kwasów nukleinowych, odpowiednio ssRNA (ang. single stranded RNA) i DNA wirusów (GOLAB i współaut. 2017). Rozpoznanie patogenu prowadzi do aktywacji neutrofilów, które mogą eliminować je na trzy główne sposoby: poprzez fagocytozę, degranulację i zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (BORREGAARD 2010) (Ryc. 2).

Fagocytoza to proces, który polega na endocytozie (aktywnym pochłanianiu) mikroorganizmów, a następnie ich wewnątrzkomórkowym zabijaniu (GOLAB i współaut. 2017). W procesie niezależnym od tlenu wykorzystywane są enzymy (np. lizozym), białka bakteriobójcze (np. laktoferyna) i kationowe peptydy (np. defensyny), które znajdują się w ziarnistościach neutrofilów (GOLAB i współaut. 2017). Po połączeniu ziarnistości i fagosomu, do wnętrza powstałego pęcherzyka dostają się wysokie stężenia powyższych substancji, które są toksyczne dla patogenów (WITKO-SARSAT i DESCAMPS-LATSCHA 1994). Należy zaznaczyć, że składniki ziarnistości, działając synergistycznie, dają znacznie silniejszy efekt, niż działając pojedynczo (GOLAB i współaut. 2017). Z kolei proces zależny od tlenu wymaga użycia reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) i jest nazywany wybuchem tlenowym (KOLACZKOWSKA i współaut. 2007). Do produkcji ROS niezbędna jest oksydaza NADPH (ang. NADPH oxidase, Nox). Jest to wieloskładnikowy kompleks enzymatyczny, który umiejscowiony jest w błonie fagosomu (BORREGAARD 2010). ROS są związkami wysoce toksycznymi, działającymi na bakterie, grzyby, pasożyty i komórki zmienione nowotworowo (GOLAB i współaut. 2017). Aby zabezpieczyć zdrowe komórki organizmu i same neutrofile przed szkodliwym działaniem ROS, reaktywne formy tlenu są poddawane unieczynnieniu przez enzymy takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza oraz reduktaza i peroksydaza glutationowa (GOLAB i współaut. 2017).

Ziarna neutrofilów w całości lub tylko ich zawartość, mogą być również wydzielane na zewnątrz komórek, a proces ten nazywamy degranulacją. Dzięki temu enzymy i białka wypełniające ziarnistości mogą działać na patogeny zlokalizowane w płynach ustrojowych i tkankach (BORREGAARD 2010).

Ostatni mechanizm eliminacji patogenów to tworzenie NET omówione w osobnym, kolejnym rozdziale, a proces ten także wykorzystuje białka zmagazynowane w ziarnistościach neutrofilów.

Ryc. 2. Mechanizmy eliminacji patogenów przez neutrofile.

W procesie fagocytozy mikroorganizmy są pochłaniane do wnętrza komórki na zasadzie endocytozy, a następnie trawione przez enzymy i białka znajdujące się we wnętrzu ziarnistości lub z wykorzystaniem reaktywnych form tlenu o silnej toksyczności dla patogenów (wybuch tlenowy). Degranulacja polega na uwolnieniu ziarnistości lub ich zawartości do przestrzeni międzykomórkowej, a wydzielone białka neutralizują patogeny w otoczeniu komórki. Wyrzut zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET) następuje w wyniku m.in. aktywności białek pochodzących z ziarnistości, a liczne z tych białek są także przyłączone do sieci. To właśnie one uczestniczą w eliminacji patogenów złapanych w NET. NET – zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (wg KOLACZKOWSKA i KUBES 2013, zmodyfikowana).

Ryc. 3. Schematyczna budowa NET.

Neutrofilowe pułapki zewnątrzkomórkowe składają się ze zdekondensowanego DNA wyrzuczonego na zewnątrz komórki w postaci włókien chromatyny, do którego przyłączone są białka jądrowe - cytrulinowane histony (citH3/4) i białka obecne w ziarnistościach neutrofila, takie jak elastaza neutrofilowa (NE), mieloperoksydaza (MPO), katępsyna G, żelatynaza B (MMP-9) czy proteinaza 3. Neutrofile (A) wyrzucają NET pod wpływem silnej aktywacji, ale ich szkielet (DNA) może pochodzić albo z jądra (B) albo z mitochondriów (C). (D) Zdjęcie pokazuje rzeczywisty wygląd NET, z DNA pochodzenia jądrowego, wyrzuconych przez neutrofile myszy laboratoryjnych pod wpływem lipopolisacharydu (mikroskopia konfokalna, skala 50 µm). Wybarwiono dwie składowe NET: citH3 (kolor czerwony) i extDNA (kolor zielony). Miejsca kolokalizacji (nakładania się) tych dwóch sygnałów (kolor żółty) ostatecznie potwierdzają obecność NET (autorka zdjęcia: mgr Iwona Cichoń). extDNA - zewnątrzkomórkowe DNA.

NET: NEUTROFILOWE SIECI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE

Neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe (ang. neutrophil extracellular traps, NET) to nieoblone struktury zbudowane m.in. z DNA, które ma postać włókien o średnicy 15-17 nm oraz domen globularnych o średnicy 25 nm (BRINKMANN i współaut. 2004). Składowe te łączą się, tworząc nici DNA o średnicy do 50 nm. DNA stanowi szkielet NET, do którego przyłączone są białka pochodzące z ziarnistości pierwszorzędowych (np. elastaza neutrofilowa, mieloperoksydaza, katępsyna G), drugorzędowych (np. laktoferyna) i trzeciorzędowych (np. żelatynaza B)

neutrofilii, oraz wszystkie typy histonów: H1, H2A, H2B, H3 i H4 (BRINKMANN i współaut. 2004) (Ryc. 3). DNA, posiadające ujemny ładunek elektryczny, wiąże pozostałe naładowane dodatnio elementy NET (KOLACZKOWSKA i współaut. 2015).

Spośród znanych mechanizmów powstawania NET, poniżej opisano dwa główne, które będą istotne w kontekście infekcji SARS-CoV-2. Pierwszy z nich wiąże się z aktywnością elastazy neutrofilowej (NE), proteazy serynowej (rozkładającej wiązania peptydowe w białkach; zawierającej w centrum aktywnym aminokwas serynę), która zatem jest nie tylko elementem składowym NET, ale także uczestniczy w ich tworzeniu. Wykazano, że po aktywacji neutrofila, NE przemieszcza się z ziarnistości azurofilnych do jądra komórkowego, gdzie enzymatycznie degraduje (rozkłada) histony typu 1 (H1), które utrzymują zwartą strukturę chromatyny (PAPAYANNOPOULOS i współaut. 2010). W ten sposób zapoczątkowana jest dekondensacja chromatyny, a w proces ten zaangażowane jest także inne białko z ziarnistości neutrofilii - MPO, choć nie znamy szczegółów jego działania. MPO jest jednym z enzymów zaangażowanych w produkcję ROS zależną od oksydazy NADPH i choć w trakcie tworzenia NET mieloperoksydaza działa w sposób niezależny od swojej aktywności enzymatycznej [tylko brak białka (myszy nokaut), a nie samo zahamowanie aktywności MPO, hamuje powstanie NET], to wykazano, że ROS mogą pomagać NE wydostać się z ziarnistości (PAPAYANNOPOULOS i współaut. 2010). Drugim procesem wspomagającym dekondensację chromatyny jest cytrulinacja histonów, będąca konsekwencją aktywacji deiminazy peptydyloargininy 4 (ang. peptidylarginine deiminase 4, PAD4). Enzym ten jest zlokalizowany w jądrze komórkowym, m.in. leukocytów, a jego aktywacja jest zależna od dostępności jonów wapnia Ca^{2+} . (VOSSENAAR i współaut. 2003). Poziom tych ostatnich wzrasta po aktywacji neutrofilii i jest także niezbędny dla wyrzutu NET (GUPTA i współaut. 2014). PAD4 odpowiada za zastąpienie w resztach histonów H2A, H3 i H4 aminokwasu argininy przez cytrulinę, co powoduje zmianę ładunku pozytywnie naładowanej argininy na neutralną cytrulinę (WANG i współaut. 2009). Wykazano to m.in. stosując inhibitory PAD4, takie jak Cl-amidine. Należy zaznaczyć, że zarówno NE, PAD4, a zwłaszcza ROS nie zawsze są zaangażowane w tworzenie NET.

Nie wiemy dokładnie z czego to wynika, ale postuluje się, że może to zależeć m.in. od stymulanta, czynnika indukującego powstanie NET (BOELTZ i współaut. 2019). NET mogą się też różnić między sobą w

kontekście pochodzenia DNA oraz przeżywalności neutrofilu po ich uwolnieniu. Choć głównie opisuje się NET z DNA pochodzenia jądrowego, wykazano także, że może ono pochodzić z mitochondriów (ludzkie mitochondrium zawiera 4-10 kolistych cząsteczek DNA kodujących część białek łańcucha oddechowego) (YOUSEFI i współaut. 2009) (Ryc. 3). Kiedy komórka zostaje pozbawiona materiału genetycznego, zwłaszcza jądrowego, intuicyjnie wydaje się, że ginie. Jednak wykazano, że neutrofile mogą przeżyć wyrzut NET, przemieszczać się i w ten sposób wylapywać więcej patogenów oraz je fagocytować (YIPP i KUBES 2013). Znamy przykłady innych ludzkich komórek (erytrocyty) oraz elementów morfotycznych krwi (płytki), które całe swoje dojrzałe życie funkcjonują bez jądra komórkowego, a zatem nie jest ono niezbędne. Jednak funkcjonowanie takiej komórki zależy od tego, jakie białka zostały w niej wyprodukowane i zmagazynowane zanim utraciła jądro, czy to w czasie rozwoju (erytrocyt, megakariocyt/płytki) czy po wyrzucie NET. Jeszcze nie wiemy czy w organizmie (badania prowadzi się głównie na izolowanych neutrofilach) większość neutrofilu przeżywa wyrzut NET czy umiera, ale fakt pozostania przy życiu wydaje się zwiększać skuteczność działania neutrofilu i ich NET. Te i inne mechanizmy tworzenia NET zostały opisane w artykule, który ukazał się w Kosmosie (SANTOCKI i KOŁACZKOWSKA 2017).

Neutrofile mogą uwalniać NET pod wpływem różnych bodźców. Mogą to być całe patogeny lub tylko ich fragmenty, które rozpoznawane są jako PAMP, oraz struktury endogenne (własne). Dotychczas potwierdzono produkcję NET w odpowiedzi na bakterie, grzyby, pierwotniaki i wirusy (KAPLAN i RADIC 2012). Dodatkowo, w czasie procesów zapalnych tocących się w organizmie dochodzi do uszkodzenia/obumierania własnych komórek, z których wydostają się organelle komórkowe/DNA/elementy cytoszkieletu, które nazywamy strukturami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem (ang. danger/damage associated molecular patterns, DAMP), poprzez analogię do PAMP. Ponieważ w prawidłowych warunkach (stan homeostazy) znajdują się one we wnętrzu komórek, ich eksternalizacja powoduje aktywację leukocytów, w tym neutrofilu i m.in. wyrzut NET, alarmując organizm o zagrożeniu. Tworzenie NET może być także zainicjowane przez mediatory zapalne i elementy odpowiedzi immunologicznej. Do tych pierwszych należą cytokiny i chemokiny, takie jak: czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor α , TNF- α), interleukina 1 β (IL-1 β), IL-8 czy interferon γ (IFN- γ), a do tych drugich: składnik układu dopełniacza C5a (Glo-

sarium 1), przeciwciała, tlenek azotu (ang. nitric oxide, NO), produkowane w czasie reakcji zapalnej (KAPLAN i RADIC 2012).

Rolą zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych jest wylapywanie i unieruchamianie patogenów, w tym wirusów, które przedostały się do organizmu, a dzięki wysokiemu miejscowemu stężeniu enzymów i białek przeciwbakteryjnych przyłączonych do NET, także zabijanie złapanych mikroorganizmów. Patogeny uwięzione w NET niejednokrotnie zostają zabite jeszcze zanim zacznie się proces fagocytozy, a ich możliwości rozprzestrzeniania się są znacznie ograniczone (BRINKMANN i współaut. 2004). Dodatkowo, neutrofile mogą przemieszczać się z przymocowanymi do nich NET, zwiększając zasięg ich działania i potęgując efekt hamowania infekcji (KOŁACZKOWSKA i KUBES 2013).

W celu wykrycia produkcji NET przez neutrofile człowieka można wykonać kilka typów analiz: można oznaczać je na skrawkach pobranych z biopsji (zarówno pacjentów, jak i pośmiertnie) albo oznaczać tzw. markery NET we krwi. Markerami tymi są najczęściej zewnątrzkomórkowe DNA lub proteazy, ale najważniejszym jest wykrywanie ich kompleksów (np. DNA-MPO, DNA-NE itd.), gdyż występując pojedynczo mogą być pomyłone, odpowiednio, z nekrozą komórek (umierające komórki rozpadają się i dochodzi do uwolnienia DNA) lub degranulacją neutrofilu, kiedy to uwalniają one proteazy i inne białka ze swoich ziarnistości (BOELTZ i współaut. 2019). Jako pojedynczy marker, przydatne mogą być natomiast pomiary cytrulinowanych histonów (np. cytrulinowanego histonu H3, citH3), które obecnie uważa się za charakterystyczne dla NET.

Po spełnieniu swojej funkcji, NET są najprawdopodobniej fagocytowane przez makrofagi, choć dotychczas takich obserwacji dokonano tylko w warunkach *in vitro* (SANTOCKI i KOŁACZKOWSKA 2017, 2020). Proces ten ułatwia działanie DNazy I (deoksyrybonukleazy), enzymu tnącego nici DNA na fragmenty, które są w stanie pochłoniąć komórki żerne (FARRERA i FADEEL 2013). Udział w degradowaniu neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych ma również składnik układu dopełniacza C1q (Glosarium 1), który przyłączając się do DNA i histonów, opsonizuje NET, wyznaczając je jako cel do zniszczenia przez makrofagi (FARRERA i FADEEL 2013).

CIEMNA STRONA NET: AKTYWNOŚĆ PROTEAZ I ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO DNA

NET pełnią swoje funkcje w walce z patogenami, jednak mechanizmy ich po-

Glosarium 1 | Mechanizmy aktywacji układu dopełniacza w powiązaniu z SARS-CoV-2 i NET

Układ dopełniacza jest kluczowym mediatorem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej - pełni rolę ochronną przed czynnikami zakaźnymi aktywując kaskadę reakcji o charakterze prozapalnym, uzupełniając tym samym funkcję efektorową przeciwciał w niszczeniu drobnoustrojów. W skład układu dopełniacza wchodzi około 40 białek (obecnych w osoczu i płynach ustrojowych; wiele z nich oznaczonych jest symbolem C, od *complement*, i cyframi odpowiadającymi kolejności ich odkrycia). Białka te, aktywowane kaskadowo, uczestniczą m.in. w procesie opsonizacji (opłaszczania) patogenów, ich fagocytozie i/lub lizie, chemotaksji (ukierunkowanym napływie) do miejsca pojawienia się patogenu, czy też eliminacji uszkodzonych komórek własnych gospodarza. W zależności od rodzaju czynnika aktywującego, początkowe etapy tego procesu mogą przebiegać trzema różnymi drogami (alternatywną, lektynową oraz klasyczną). Na czerwono: symbolem * zaznaczono składowe aktywowane w czasie infekcji SARS-CoV-2, a symbolem strzałki, te których poziom wzrasta. Δ oznaczono te dodatkowo powiązane z obecnością NET u chorych na COVID-19. R – receptor, MAC – kompleks atakujący błonę (powodujący lizę komórek), pozostałe skróty wyjaśnione w głównym tekście.

wstawiania i degradacji nie są niezawodne i całkowicie bezpieczne dla organizmu, niejednokrotnie prowadząc do pojawienia się niepożądanych skutków ubocznych (SANTOCKI i KOŁACZKOWSKA 2017, 2020). Negatywny wpływ NET potwierdzono dotychczas w stanach patologicznych/jednostkach chorobowych takich jak: sepsa, choroby autoimmunizacyjne (np. łuszczyca skóry czy toczeń rumieniowaty układowy), zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. acute respiratory distress syndrome, ARDS) oraz w licznych zaburzeniach krzepnięcia krwi, takich jak: zakrzepica żył głębokich (ang. deep vein thrombosis, DVT) czy układowe zapalenie małych naczyń (ang. small-vessel vasculitis, SVV) (ACKERMANN i współaut. 2021). Układ krzepnięcia to bardzo ważny zespół wzajemnie aktywujących i dezaktywujących się białek, który ma na celu stworzenie skrzepu i zahamowanie krwawienia, kiedy dojdzie do przerwania naczyń krwionośnych (potocznie: do krwawienia) (Glosarium 2). Jednak kiedy układ ten nie działa prawidłowo, albo jest nadmiernie aktywowany, mogą powstawać lokalne skrzepy hamujące przepływ krwi i/lub niszczące tkanki własne (SORVILLO i współaut. 2019).

Zależność między NET a procesami nadmiernej koagulacji i tworzenia zakrzepów została rozpoznana wkrótce po ich odkryciu. Najpierw wykryto, że w niektórych przypadkach płytki krwi (trombocyty) są wręcz niezbędne do zaktywowania neutrofilów, stanowiąc niejako pomost pomiędzy bakteriami czy ich produktami a neutrofilami. W badaniach tych wykazano, że LPS bakteryjny może być w pierwszej kolejności rozpoznawany przez receptor TLR4, ale zlokalizowany na płytkach krwi, które następnie aktywują neutrofile w nieznanym jeszcze sposób (YIPP i KUBES 2013). Dzieje się tak, mimo że neutrofile również posiadają receptory TLR4.

Ponadto, gdy NET zalegają w naczyniach krwionośnych, mogą przyłączyć się do nich płytki krwi i krwinki czerwone, a produkt takiego połączenia to tzw. „czerwony skrzep”. Dodatkowo, z powstałą strukturą może związać się czynnik von Willebranda (ang. von Willebrand factor, VWF) oraz fibronektyna i fibrynogen, które zwiększają stabilność skrzepu (FUCHS i współaut. 2010) (Glosarium 2). Jeśli w układzie sercowo-naczyniowym znajdzie się wiele agregatów NET ze składnikami osocza, tzw. mikrozakrzepów, przepływ krwi będzie utrudniony, co może doprowadzić do niedokrwienia tkanki lub narządu (BRINKMANN i ZYCHLINSKY 2012).

Jak konkretnie NET wpływają na aktywację układu krzepnięcia? Wykazano, że zwłaszcza NE i histony będące ważnymi elementami NET mogą inicjować ten proces

(FUCHS i współaut. 2010). NE rozkłada inhibitor czynnika tkankowego TF (ang. tissue factor pathway inhibitor, TFPI), co prowadzi do uwolnienia związanego z nim czynnika Xa, prowadząc do aktywacji kolejnych czynników (Glosarium 2) (SORVILLO i współaut. 2019). Z kolei histony, zwłaszcza H3 i H4, są rozpoznawane przez TLR2 i TLR4 na płytkach krwi aktywując je. Histon 4 może także uczestniczyć w aktywacji trombiny. Także inne elementy NET mogą aktywować kaskadę krzepnięcia. Wykazano, że zewnątrzkomórkowy DNA krążący we krwi aktywuje czynniki XII i XI kaskady krzepnięcia oraz wpływa na przebieg fibrynolizy (przeciwstawnego procesu mającego na celu usunięcie zakrzepu gdy nie jest on już potrzebny).

Także ze względu na fakt, że DNA objętościowo jest największą częścią NET, jest też jednym z głównych składników skrzepu zainicjowanego przez pułapkę neutrofilową, oprócz VWF i fibryny (SORVILLO i współaut. 2019). Potwierdzają to także badania, w których dodanie DNazy rozkładającej DNA częściowo ogranicza tworzenie skrzepu (FUCHS i współaut. 2010). Do NET przyłączają się też płytki krwi, tworzą agregaty i stanowią platformę do powstania kolejnych mikrozakrzepów (MCDONALD i współaut. 2017). Ale składniki NET mogą również powodować uszkodzenia tkanek własnych niezależnie od procesu krzepnięcia. Ponownie, odpowiedzialne są za to te same składniki NET, NE oraz H3 i H4, które mogą być bezpośrednio cytotoksyczne dla komórek śródbłoka naczyniowego (KOŁACZKOWSKA i współaut. 2015).

Patologie związane z NET mogą wynikać także z faktu, że zawierają one w swojej strukturze DAMP (DNA, proteazy, histony itd.), przeciwko którym inicjowana jest reakcja zapalna, jako element odpowiedzi wrodzonej, ale także nabytej, z zaangażowaniem limfocytów, w tym limfocytów B produkujących autoprzeciwciała skierowane przeciwko DAMP w NET (SANTOCKI i KOŁACZKOWSKA 2017, 2020). Rozróżniamy kilka grup takich przeciwciał. Pierwsza grupa jest skierowana przeciwko białkom obcym na powierzchni NET (ang. anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA), które charakteryzują się wysokim powinowactwem do MPO i proteinazy 3 (FOUSERT i współaut. 2020). Immunoglobuliny te uważa się za jeden z czynników prowadzących do rozwinięcia się u pacjenta SVV. ANCA mogą pobudzać neutrofile do produkcji ROS i proteaz, co doprowadza do powstania stanów zapalnych w obrębie naczyń krwionośnych. Ponadto, ANCA mogą stymulować neutrofile do wyrzutu NET zgodnie z mechanizmem stężenia zwrotnego dodatniego – duża ilość NET doprowadza do

Glosarium 2 | Kaskady układu krzepnięcia w powiązaniu z infekcją SARS-CoV-2 i NET

Wyróżniamy dwie kaskady krzepnięcia, (i) wewnątrzpochodną zainicjowaną przez czynnik XII oraz (ii) zewnątrzpochodną, w której inicjacji uczestniczy czynnik tkankowy (TF). (i) TF wydzielany jest przez komórki uszkodzonych tkanek, a następnie tworzy kompleks z czynnikiem VII aktywując czynnik IX, od tego miejsca oba szlaki się łączą. W wyniku następującej potem kaskady przemian dochodzi do aktywacji trombiny i powstania fibryny (włókna), która tworzy rusztowanie skrzepu. (ii) szlak wewnątrzpochodny rozpoczyna się autokatalitycznej aktywacji czynnika XII, która jest zainicjowana przez kontakt, np. z odsłoniętym po uszkodzeniu naczynia kolagenem.

Obecność sieci NET w obrębie skrzepu powoduje aktywację czynnika XII (aktywowany bezpośrednio przez kontakt) i TF. Aktywowane są również trombina i fibrynogen, wiążące się do sieci NET. Z kolei aktywna elastaza neutrofilowa (NE) obecna w NET, powoduje inaktywację inhibitora szlaku zależnego od czynnika tkankowego (TFPI) aktywując szlak zewnątrzpochodny. Ponadto sieci NET wiążą się z czynnikiem von Willebranda (VWF), który łączy się z czynnikiem VIII, chroniąc go przed degradacją. W ten sposób sieci NET przyczyniają się także do adhezji płytek krwi i tworzenia skrzepu.

Na schemacie na czerwono zaznaczono poszczególne elementy zaangażowane w kaskady krzepnięcia, a ulegające aktywacji w obecności sieci NET i ich składowych. Dodatkowo, symbolem *, zaznaczono składowe aktywowane w czasie infekcji SARS-CoV-2, a symbolem ^, te dodatkowo powiązane z obecnością NET u chorych na COVID-19.

Ryc. 4. Budowa SARS-CoV-2 i mechanizm infekcji komórki w powiązaniu z aktywnością proteaz obecnych w neutrofilowych sieciach zewnątrzkomórkowych (NET).

(A) schematyczna budowa wirusa z naciskiem na białko fuzyjne S i obecność jego dwóch podjednostek, S1 i S2, połączonych kowalencyjnie. Proteolityczna aktywność enzymów powoduje, że choć pozostają połączone niekowalencyjnie, mają większą elastyczność, co umożliwia wirusowi fuzję z błoną komórki (na podstawie HUANG i współaut. 2020). ACE2 – konwertaza angiotensyny typu 2, TMPRSS2 – transbłonowa proteaza serynowa typu 2, NE – elastaza neutrofilowa.

pojawienia się wysokiego miana ANCA, które wywołują większą produkcję NET (SKOPELJA-GARDNER i współaut. 2018). Druga grupa to przeciwciała przeciwnuklearne (ang. anti-nuclear antibodies, ANA) wiążące struktury znajdujące się w obrębie jądra komórkowego. Należą do nich DNA, histony czy centromer (KUMAR i współaut. 2009). ANA przyczyniają się do wystąpienia patologii w przebiegu wielu chorób autoimmunologicznych, m.in. w trakcie toczenia rumieniowatego układu (KUMAR i współaut. 2009).

Ważnym komponentem sieci neutrofilowych są histony poddane procesowi cytrulinacji, które również mogą być celem auto-przeciwciał (ang. anti-citrullinated protein antibodies, ACPA). Obecność ACPA charakterystyczna jest dla pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. ACPA również stymulują neutrofile do produkcji NET, które będąc w przestrzeni maziowej stawów, pobudzają komórki błony stawowej do wydzielania czynników prozapalnych (KHANDPUR i współaut. 2013).

KONSEKWENCJE TWORZENIA NET W CZASIE INFЕКCJI SARS-CoV-2

NET POWSTAJĄ W CZASIE COVID-19 I KORELUJĄ Z ZAAWANSOWANIEM CHOROBY

Dotychczas przedstawiliśmy najważniejsze informacje o budowie i funkcjach NET,

o najważniejszych mechanizmach ich tworzenia oraz o tym, jak mogą uszkadzać nasze własne komórki i narządy. Informacje te były niezbędne, aby móc przedstawić skutki tworzenia NET w czasie infekcji SARS-CoV-2. Budowa i replikacja wirusa oraz przebieg i objawy wywoływanej przez niego choroby koronawirusowej COVID-19 zostały opisane w artykułach SANAKA oraz WIKOWSKIEGO i BRYL, w tym zeszycie KOSMOSU.

W tym miejscu chciałbyśmy przypomnieć tylko trzy fakty dotyczące SARS-CoV-2: (1) wirus posiada na swojej powierzchni białko błonowe S (Spike), które tworzy jego „koronę”, zawartą w nazwie tej grupy wirusów. Za pomocą białka S, wirus wiąże się z (2) ACE2 na komórkach człowieka, a do zajścia tego procesu (3) niezbędna jest transbłonowa proteaza serynowa typu 2 (ang. transmembrane serine protease 2, TMPRSS2), także obecna na komórkach człowieka, oraz inne proteazy (Ryc. 4). Konwertaza angiotensyny typu 2 (ang. angiotensin converting enzyme 2, ACE2) występuje na powierzchni komórek człowieka, zwłaszcza zlokalizowanych w płucach, jelitach, sercu i nerkach (GUO i współaut. 2020). ACE2 jest enzymem katalizującym rozkład angiotensyny II, która jest jednym z czynników w układzie renina-angiotensyna-aldosteron, odpowiedzialnym m.in. za regulację ciśnienia krwi (LI i współaut. 2020). Wniknięcie SARS-CoV-2 do komórki żywiciela

wymaga działalności TMPRSS2 (HOFFMANN i współaut. 2020). Białko S występuje w formie trimerów, z których każdy składa się z podjednostek S1 i S2 (Ryc. 4) – pierwsza jest odpowiedzialna za związanie się wirusa z ACE2, a druga za fuzję z komórką człowieka (HOFFMANN i współaut. 2020, HUANG i współaut. 2020). TMPRSS2 jest odpowiedzialny za enzymatyczne cięcie pomiędzy S1 a S2, co umożliwia tej drugiej połączenie się z błoną komórki gospodarza i uwolnienie materiału genetycznego SARS-CoV-2 do cytoplazmy, gdzie RNA ulega translacji (GUO i współaut. 2020). Dodatkowo, elastaza neutrofilowa (NE), proteinaza 3 i katepsyna G, w tym te przyłączone do NET, również mogą modyfikować białko S na podobnej zasadzie (HU i współaut. 2020). A zatem NET mogą także bezpośrednio zwiększać intensywność infekcji komórek człowieka.

Neutrofile i NET zidentyfikowano we fragmentach płuc pacjentów z COVID-19 pobranych w czasie autopsji *post mortem* (MIDDLETON i współaut. 2020). Także w próbkach surowicy osób zainfekowanych SARS-CoV-2 odnotowano wyższy poziom wolnego pozakomórkowego DNA, kompleksów MPO-DNA i citH3, w porównaniu do kontroli (ZUO i współaut. 2020). Określono również zależności tych markerów względem standardowych badań laboratoryjnych wykonywanych w szpitalach, takich jak liczba neutrofilów i płytek krwi, poziom białka C-reaktywnego (CRP), D-dimerów i dehydrogenazy mleczanowej. CRP jest białkiem produkowanym w wątrobie, którego poziom może wzrosnąć nawet 1000-krotnie w czasie reakcji zapalnej, podczas gdy obecność dehydrogenazy mleczanowej oznacza uszkodzenie komórek (enzym powinien znajdować się wewnątrzkomórkowo, gdzie uczestniczy w procesach metabolicznych) (GOLAB i współaut. 2017). Natomiast obecność D-dimerów (fragmentów fibryny powstających w procesie jej degradacji przez plazminę) jest wskaźnikiem zajścia procesu krzepnięcia. Wykazano dodatnią korelację między poziomem wolnego pozakomórkowego DNA i wszystkimi wymienionymi powyżej testami klinicznymi (za wyjątkiem liczby płytek krwi) oraz między liczbą kompleksów MPO-DNA i liczbą neutrofilów, a także między poziomem cytrulinowanego histonu H3 i liczbą płytek krwi (ZUO i współaut. 2020). Ponadto dokonano porównania między pacjentami przechodzącymi COVID-19 w postaci lekkiej i ciężkiej. Chorzy wymagający wentylacji mechanicznej (respirator) charakteryzowali się wyższymi poziomami wolnego pozakomórkowego DNA i kompleksów MPO-DNA, ale nie odnotowano istotnej różnicy między obiema grupami w poziomie cytrulinowanego histonu H3 i liczbie neu-

trofilów (ZUO i współaut. 2020). W naczyniach krwionośnych płuc chorych zaobserwowano jednocześnie występowanie neutrofilów z citH3 i płytek krwi. Dodatkowo, we krwi pacjentów z COVID-19 wykryto wysokie poziomy agregatów neutrofilów i płytek krwi, płytkowych czynników stymulujących proces tworzenia NET oraz cytokin IL-6 i IL-8 (MIDDLETON i współaut. 2020).

Następnie udało się wyjaśnić część mechanizmów odpowiadających za tworzenie NET w czasie infekcji SARS-CoV-2, analizując neutrofile wyizolowane z krwi ludzkiej. Wykazano, że do ich powstania wymagana jest interakcja wirusa SARS-CoV-2 z ACE2 i TMPRSS2, które znajdują się na powierzchni tych komórek (VERAS i współaut. 2020). Pokazano to w doświadczeniu, w którym do neutrofilów dodano SARS-CoV-2, a równocześnie podano przeciwciała neutralizujące/blokujące ACE2 (powodują one, że z ACE2 nie może się już związać białko S wirusa) oraz inhibitor TMPRSS2 (kamostat; inhibitor deaktywujący proteazę), co zahamowało wyrzut NET w odpowiedzi na wirusa. Eksperyment ten udowadnia znaczenie tych struktur w procesie infekcji. Ponadto, wyrzut NET pod wpływem SARS-CoV-2 można także zahamować używając inhibitora enzymu PAD-4, tj. Cl-amidyny, co pokazuje, że również w tym przypadku wymagana jest cytrulinacja histonów (VERAS i współaut. 2020). Stymulacja do wyrzutu NET przez SARS-CoV-2 jest przeprowadzana także w trakcie procesu jego replikacji wewnątrz komórki. Wykazano bowiem, że inhibitor polimerazy RNA (fumarany dizoproksylu tenofowiru), wykorzystywanej w trakcie wirusowej replikacji, hamuje uwalnianie NET przez neutrofile w obecności SARS-CoV-2 (VERAS i współaut. 2020).

Wiemy już, że infekcja wirusem SARS-CoV-2 doprowadza do niekontrolowanego wyrzutu NET przez neutrofile. Najczęstsze powikłania przy COVID-19 (ARDS, sepsa i niewydolność wielonarządowa) są wynikiem rozregulowanej odpowiedzi immunologicznej, obecności wysokich stężeń cytokin prozapalnych i mikrozakrzepów, za które mogą być odpowiedzialne właśnie NET (MIDDLETON i współaut. 2020). Co więcej, parametrami wskazującymi na możliwość rozwinięcia się ciężkiej postaci COVID-19 jest podwyższona liczba neutrofilów i obecność NET we krwi (MIDDLETON i współaut. 2020, ZUO i współaut. 2020). Z kolei dowodem na rozregulowanie balansu pomiędzy odpowiedzią wrodzoną i nabytą jest wysoki stosunek neutrofilów (odpowiedź wrodzona) do limfocytów (odpowiedź nabyta) (ang. neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR). Jest to ważne, gdyż jeśli organizm nie zdoła wytworzyć odpowiedzi nabytej (=zaangażować limfocyty) wystar-

czająco szybko, walką z patogenem zostaje obciążona odpowiedź wrodzona, która może nie być wystarczająca do zwalczania wirusa. Jednak walcząc z infekcją ulega ona bardzo silnej aktywacji, w wyniku czego może dochodzić do niekontrolowanej sekrecji cytokin prozapalnych i NET (TANG i współaut. 2020).

NET A SZTORM CYTOKINOWY W CZASIE COVID-19

W czasie COVID-19 może rozwinąć się bardzo niebezpieczne zjawisko, jakim jest sztorm cytokinowy. Jest to stan, kiedy w organizmie dochodzi do nadmiernej produkcji cytokin prozapalnych, które wykazują się różnym zakresem aktywności biologicznej i pochodzeniem (SONG i współaut. 2020). Najważniejsze cytokiny zaangażowane w sztorm cytokinowy to: interleukiny (np. IL-2, IL-7, IL-10), chemokiny (np. białkowy chemoatraktant monocytów MCP-1, białko zapalne makrofagów MIP-1 α), TNF- α , interferony, czynniki stymulujące tworzenie kolonii (ang. colony-stimulating factor, CSF) i czynniki wzrostu, które można podzielić na czynniki o działaniu prozapalnym i przeciwzapalnym (SONG i współaut. 2020). Większość tych cytokin i czynników silnie stymuluje neutrofile do syntezy NET (MEHER i współaut. 2018). Ponadto, niektóre rekrutują kolejne leukocyty, przez co poziom zapalenia w organizmie rośnie i tworzy się sprzężenie zwrotne dodatnie (TANG i współaut. 2020). W przypadku sztormu cytokinowego, drogi odpowiedzi immunologicznej, w których wykorzystywane są cytokiny, nakładają się na siebie, a efekt końcowy determinowany jest przez specyficzne interakcje receptorów TLR i ich ligandów (SONG i współaut. 2020). W przypadku COVID-19, jako główny mechanizm powstawania sztormu cytokinowego podejrzewa się m.in. mechanizm związany z nadmierną aktywacją odporności wrodzonej (TANG i współaut. 2020). Przykładowo, wydzielana przez makrofagi IL-1 β silnie stymuluje neutrofile do syntezy NET (MEHER i współaut. 2018), przez co w organizmie może utworzyć się sprzężenie zwrotne dodatnie: NET $\rightarrow$ IL-1 β $\rightarrow$ więcej NET $\rightarrow$ więcej IL-1 β , itd. (JANIUK i współaut. 2021) (Ryc. 5). Wykazano, że zjawisko to może skutkować rozległymi uszkodzeniami pęcherzyków płucnych i śródbłonna naczyń płuc u chorych z ciężką postacią COVID-19 (JANIUK i współaut. 2021). Zniszczenie tych ostatnich struktur skutkuje uwolnieniem czynnika von Willebranda (VWF), który odpowiada za aktywację płytek krwi i neutrofilii.

Wskutek sztormu cytokinowego w organizmie mogą pojawić się liczne uszkodzenia tkanek i narządów. W przypadku łagodnego przebiegu choroby objawami są m.in.:

gorączka, zmęczenie, bóle mięśni i stawów, bóle głowy i wysypka. Natomiast w ciężkich przypadkach pojawiają się m.in.: wysoka gorączka, ostre uszkodzenie płuc, ARDS, zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (ang. disseminated intravascular coagulation, DIC), zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (ang. systemic inflammatory response syndrome, SIRS), sepsa i niewydolność wielonarządowa, a nawet śmierć (TANG i współaut. 2020).

NET A ZABURZONA KOAGULACJA/ZAKRZEPICA W PRZEBIEGU COVID-19

Powikłania zakrzepowe są ważną komplikacją w przebiegu COVID-19, a ich nasilenie jest współdecydujące o przebiegu tej choroby. Wykazano, że wśród pacjentów z COVID-19, koagulopatie, czyli stany nadkrzepliwości, stanowią manifestację kliniczną tej choroby i powodują nieodwracalne uszkodzenia wielonarządowe (ACKERMANN i współaut. 2021). Skutki nadmiernej zakrzepicy związane są przede wszystkim z zablokowaniem dopływu krwi do narządów w organizmie, powodując ich niewydolność, niedotlenienie oraz utratę napięcia naczyniowego.

Ryc. 5. Patologiczne efekty nadmiernego tworzenia NET w przebiegu infekcji SARS-CoV-2 w trakcie COVID-19.

Na schemacie przedstawiono szkodliwy udział sieci NET oraz ich składowych w przebiegu COVID-19 (kolor granatowy), a także wymieniono potencjalne terapie jakie stosuje się, testuje lub rozpatruje, w celu zniwelowania skutków tworzenia NET w czasie COVID-19 (kolor jasno niebieski). NET – zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe, PAD4 – deiminaza peptydyloargininy 4, ANCA – przeciwciała skierowane przeciwko cytoplazmie własnych granulocytów obojętnochłonnych.

niowego, uniemożliwiając prawidłowy skurcz naczyń krwionośnych.

W przypadku niekontrolowanego rozwoju zakrzepicy może dojść do wystąpienia wstrząsu czy nawet sepsy, gdyż w przebiegu COVID-19 dochodzi także do zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych m. in.: IL-6, IFN- γ i IL-2, które zwiększają produkcję i aktywność płytek krwi oraz ekspresję czynnika tkankowego (ang. tissue factor, TF) na komórkach śródbłonna (ACKERMANN i współaut. 2021). Co więcej, poziom IL-8 jest zwiększony w chorobie COVID-19, a chemokina ta odpowiada za przyciąganie neutrofili do miejsca zapalenia i predysponuje te komórki do tworzenia NET (MIDDLETON i współaut. 2020) (Ryc. 5). We wcześniejszych badaniach wykazano także, że ilość powstających sieci NET jest istotnie związana z uszkodzeniem wielonarządowym i niezależnie prognozuje rozwój rozsianego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego (DIC), a nawet śmiertelność. Zakrzepica u pacjentów z COVID-19 obejmuje zarówno tętniczy, jak i żylny układ krążenia, prowadząc do takich stanów patologicznych i chorób jak: ostry zespół wieńcowy (ang. acute coronary syndrome, ACS), udar mózgu, zakrzepica żył głębokich (DVT), zatorowość płucna czy zakrzepica mikronaczyniowa (ACKERMANN i współaut. 2021). Ponadto, ilość tworzących się agregatów neutrofili i płytek krwi jest zwiększona w przebiegu COVID-19. Płytki krwi akumulują się na powierzchni neutrofili i pobudzają neutrofile do wyrzutu NET, a one z kolei powodują aktywację płytek krwi, ich agregację i aktywację trombiny (Glosarium 2). Dodatkowo, już powstałe NET stają się miejscem gromadzenia się erytrocytów, płytek krwi i fibryny, co prowadzi do powstania skrzepów (JANIUK i współaut. 2021). Wszystkie powyższe zjawiska nasilają krzepnięcie wewnątrznaczyniowe i objawy immunozakrzepicy.

Co ważne, w NET wykryto także obecność czynnika tkankowego TF, będącego induktorem kaskady krzepnięcia (Glosarium 2) oraz wykazano, że aktywny TF występujący w sieciach sprzyja formowaniu się skrzepu (SKENDROS i współaut. 2020). NET mogą także występować w naczyniach krwionośnych w dużych grupach, tworząc agregaty sieci NET (ang. aggregated NETs, agNETs). Zalegające w takiej formie w naczyniach NET prowadzą do ich zaczopowania, co może skutkować śmiercią, szczególnie w przypadku niedrożności mniejszych naczyń i mikronaczyń (ACKERMANN i współaut. 2021).

Wykazano także, że poziom VWF jest podwyższony w czasie COVID-19, a stężenie czynników regulujących jego poziom, proteazy ADAMTS13 (ang. a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type

1 motif, member 13) i HDL (ang. high density lipoprotein, lipoproteina wysokiej gęstości, tzw. „dobry cholesterol”), jest obniżony (Glosarium 2). W tym kontekście należy wspomnieć o powiązaniu tego zjawiska z grupami krwi i możliwością, że mogą one determinować przebieg COVID-19: wstępne badania wskazują, że osoby z grupą krwi 0, które mają fizjologicznie niższy poziom czynnika von Willebranda, charakteryzuje mniejsze ryzyko infekcji i ciężkiego przebiegu tej choroby (MEI i współaut. 2021). Wiele innych czynników regulujących kaskadę krzepnięcia jest rozregulowanych w przebiegu infekcji SARS-CoV-2 i choć w niektórych przypadkach zwiększone są poziomy czynników hamujących ten proces, np. TFPI, to należy pamiętać, że ich efekty mogą być niwelowane przez inne zintensyfikowane procesy. W przypadku TFPI, czynnik ten jest rozkładany przez NE zawartą w NET, a przecież produkcja sieci jest bardzo silna w czasie COVID-19.

Chociaż COVID-19 wiąże się z ciężkim stanem zapalnym, nie wykazano trombocytozy, czyli nadpłytkowości (zwiększonej liczby płytek we krwi) u pacjentów z tą chorobą. Wręcz przeciwnie, badania pokazały, że liczba płytek krwi może być zmniejszona u pacjentów z COVID-19. Trombocytopenia, czyli małopłytkowość jest wykrywana u 5-41,7% pacjentów zainfekowanych SARS-CoV-2, ale aż w 58-95% ciężkich przypadków COVID-19 (LEVI i współaut. 2020). Przyczyny małopłytkowości mogą być różnorodne, ale jedną z nich jest akumulacja płytek w miejscach mikrozakrzepów, które są charakterystyczne dla COVID-19 (ACKERMANN i współaut. 2021). Należy podkreślić, że powstanie NET nie jest jedyną przyczyną nadkrzepliwości/powstawania skrzepin i zatorów w trakcie COVID-19. SARS-CoV-2 infekuje także bezpośrednio komórki śródbłonna, powodując odsłonięcie warstw podśródbłonkowych inicjujących proces powstawania skrzepów (MARCINKIEWICZ i współaut. 2021).

POWIĄZANIE AKTYWACJI UKŁADU DOPEŁNIACZA Z TWORZENIEM NET W CZASIE INFEKCJI SARS-CoV-2

Obecne dane wskazują na powiązanie nadmiernej aktywacji układu dopełniacza przez cząsteczki wirusa SARS-CoV-2 z patogenezą i wysoką śmiertelnością pacjentów zapadających na COVID-19 (JAVA i współaut. 2020). Wśród aktywowanych białek wyróżnia się cząsteczkę C3 (wraz z produktami jej aktywacji m.in. C3a, C3b, C3c) (Glosarium 1), proteazę serynową MASP-2 (ang. mannan-binding lectin-associated serine protease 2) oraz kompleks atakujący błonę (ang. membrane attack complex, MAC),

co potwierdza fakt, że inicjacja aktywacji układu dopełniacza w czasie infekcji następuje przez większość dostępnych szlaków (CUGNO i współaut. 2020). Ponadto, w osoczu pacjentów z COVID-19 stwierdzono podwyższony poziom białek C5a i C5b-9, które zwiększają aktywność neutrofilii, a w konsekwencji powodują postępujący stan zapalny i uszkodzenia śródbłonna, przyczyniając się do wielonarządowych zmian chorobowych (JAVA i współaut. 2020). W kontekście powiązania układu dopełniacza z tworzeniem NET w czasie infekcji SARS-CoV-2, stwierdzono silny wpływ aktywacji układu dopełniacza (z dodatkowym udziałem płytek krwi) na wzmożoną chemotaksję neutrofilii do płuc, wyrzut NET oraz wystąpienie mikrozakrzepów i objawów immunozakrzepicy (SKENDROS i współaut. 2020). Poza obecnością markerów swoistych dla NET (MPO, citH3), w surowicy pacjentów z COVID-19 obserwowano zwiększony poziom białka C3, czynnika B i P (properdyny), czyli składników niezbędnych do generowania i stabilizacji konwertazy C3, wzmacniając w ten sposób kaskadową aktywację układu dopełniacza. Ponadto, aktywacja dopełniacza powiązana ze zwiększonym wyrzutem NET indukuje tworzenie anafilotoksyn (białek C3a, C4a, C5a wywołujących degranulację komórek tucznych), które dodatkowo wywołują napływ i aktywację neutrofilii, monocytów i eozynofili do zainfekowanej tkanki, a także produkcję cytokin prozapalnych. Zatem, pomimo iż sieci NET są korzystne w obronie gospodarza przed patogenami, ich nasilone tworzenie przez zaktywowane komórki w przebiegu COVID-19, może wywołać kaskadę reakcji zapalnych, które uszkadzają i niszczą otaczające tkanki własne gospodarza (JAVA i współaut. 2020).

POTENCJALNE TERAPIE PRZECIWKO WIRUSOWI SARS-CoV-2 SKONCENTROWANE NA NET

Ponieważ wirus SARS-CoV-2 bezpośrednio wywołuje wyrzut NET przez neutrofile w sposób zależny od dawki, dlatego znalezienie sposobu na efektywne zahamowanie tworzenia NET może okazać się dobrą metodą w leczeniu COVID-19. Jeden z mechanizmów wyrzutu NET w trakcie COVID-19 polega na aktywności enzymu PAD4, zatem skutecznym podejściem w terapii tej choroby mogłoby być podanie inhibitorów PAD4. Ich pozytywny efekt odnotowano w czasie leczenia letalnej endotoksemii płuc (LIANG i współaut. 2018) i uszkodzeń komórek spowodowanych niedotlenieniem (LANGE i współaut. 2014), chorób w których NET przyczyniają się do rozwoju patologii (ACKERMANN i współaut.

2021). Ponadto wiadomo już, że w czasie infekcji wirusem SARS-CoV-2 płytki krwi mogą ulec aktywacji (HOTTZ i współaut. 2020), a ich interakcja z neutrofilami może doprowadzić do wyrzutu NET, jednak jak dotąd nie udało się ustalić precyzyjnego mechanizmu tego procesu, dlatego w tym przypadku nie wskazano jeszcze możliwych środków leczniczych (MCDONALD i współaut. 2017, ACKERMANN i współaut. 2021).

Skutki tworzenia NET w COVID-19 obserwuje się na poziomie komórek i narządów w kilku aspektach. Jednym z enzymów proteolitycznych stanowiących część NET jest elastaza neutrofilowa, która, oprócz uszkodzeń tkanek własnych organizmu, może sprzyjać infekcji komórek gospodarza przez wirusa, jak opisano to powyżej (ACKERMANN i współaut. 2021). Naturalnym podejściem byłoby zatem wykorzystanie inhibitora elastazy neutrofilowej, np. endogennej alfa1-antytrypsyny (AAT), jednak endogenna elastaza pochodząca z NET opiera się działaniu wymienionego inhibitora, co stwarza problem w leczeniu COVID-19 (LEPPKES i współaut. 2020). Wykazano bowiem, że w surowicy pacjentów z COVID-19 aktywność NE jest bardzo wysoka mimo obecności alfa1-antytrypsyny. Co jednak ciekawe, kiedy surowicę pacjentów z COVID-19, zawierającą AAT, dodano do egzogennej NE (nie pochodzącej z organizmu pacjentów), doszło do zahamowania jej aktywności. A zatem wyniki te sugerują, że obecna u chorych NE jest, przynajmniej częściowo, oporna na ten inhibitor. Jedną z możliwych przyczyn jest fakt, że NE pacjentów jest związana z DNA (jako część NET), co powoduje zablokowanie miejsca wiązania inhibitora (LEPPKES i współaut. 2020).

NET i produkty ich degradacji są również odpowiedzialne za uszkodzenia komórek naczyń krwionośnych, czego efektem może być wytworzenie w organizmie autoprzeciwciał, których obecność prowadzi do pojawienia się autoimmunologicznego zapalenia naczyń (ACKERMANN i współaut. 2021). Możemy zaobserwować tu analogię do SVV, gdzie przeciwko białkom występującym na powierzchni NET wytwarzane są autoprzeciwciała ANCA, które wykazują wysokie powinowactwo w stosunku do MPO i proteinazy 3 (YOSHIDA i współaut. 2013). ANCA pobudzają neutrofile do wyrzutu NET zgodnie z mechanizmem sprzężenia zwrotnego dodatniego oraz pośrednio promują powstanie stanów zapalnych w obrębie naczyń krwionośnych (CHEN i KALLENBERG 2009). Ponadto, interakcja NET i śródbłonna naczyniowego skutkuje aktywacją i apoptozą komórek wchodzących w jego skład, co w rezultacie doprowadza do zniszczenia jego integralności i utracenia

zdolności do pełnienia funkcji w organizmie. Uszkodzenie śródbłónka naczyniowego, wywołanego przez NET lub bezpośrednio, wskazuje się jako główną przyczynę niewydolności płuc i nerek w COVID-19 (ACKERMANN i współaut. 2021). Dodatkowo, zainfekowane komórki śródbłónka wydzielają różnorodne związki o działaniu parakrynnym (miejscowym), które wpływają na funkcjonowanie samego endotelium, jak i pobliskich komórek, takich jak pneumocyty i neutrofile, oraz mogą przyczynić się do rekrutacji limfocytów T w miejsce infekcji (ACKERMANN i współaut. 2021). NET wyrzucane przez neutrofile zrekrutowane do płuc mogą uczestniczyć w wystąpieniu immunozakrzepicy i ARDS, które odpowiadają za uszkodzenia tego organu w czasie ciężkiego przebiegu COVID-19 (ACKERMANN i współaut. 2021). Przy ciężkim zakażeniu wirusem SARS-CoV-2 często, choć nie zawsze, obserwowane są uszkodzenia wątroby lub nawet jej martwica, która może wystąpić na skutek aktywności samego wirusa i/lub zniszczeń wynikających z obecności w organizmie nadmiernej ilości cytokin i NET (ACKERMANN i współaut. 2021). W tym procesie zaobserwować można podobieństwa do przebiegu sepsy, kiedy neutrofile gromadzą się m.in. w wątrobie, a następnie wyrzucają duże ilości NET (KOLACZKOWSKA i współaut. 2015), które wspomagają komórki Browicza-Kupffera (makrofagi wątroby) w wychwytywaniu bakterii obecnych we krwi (MCDONALD i współaut. 2012). Same neutrofile i wyrzuczone przez nie struktury pozostają jednak w naczyniach wątroby na długo po wyeliminowaniu przyczyny infekcji, przyczyniając się do degradacji śródbłónka naczyniowego i hepatocytów (KOLACZKOWSKA i współaut. 2015). Przyczyny zaburzeń w usuwaniu NET nie są dotychczas poznane, ale wiadomo, że zaburzone mechanizmy tego procesu przyczyniają się do rozwoju i/lub patologii licznych chorób autoimmunizacyjnych, nowotworowych czy sepsy (SANTOCKI i KOLACZKOWSKA 2020).

Środki, którymi obecnie próbuje się hamować tworzenie NET u pacjentów z COVID-19, to najczęściej przeciwzapalny deksametazon i przeciwzakrzepowa heparyna (ACKERMANN i współaut. 2021). Deksametazon, który jest glikokortykoidem, działa poprzez zmniejszanie wydzielania mediatorów prozapalnych w organizmie chorego, w efekcie ograniczając wyrzut NET przez neutrofile (ACKERMANN i współaut. 2021). Heparyna natomiast działa neutralizująco na histony, mając do nich wysokie powinowactwo, powoduje ich odłączenie się od DNA wchodzącego w skład NET (FUCHS i współaut. 2010). Heparyna dodatkowo współdziała z enzymem DNazą I w rozkładaniu powstałych skrzepów, gdyż rozkłada „szkielet” NET (LEPPKES

i współaut. 2020). U niektórych pacjentów może pojawić się jednak oporność na heparynę, co stanowi problem w wykorzystaniu jej jako leku (ACKERMANN i współaut. 2021). Jako że cytokiny prozapalne odgrywają ogromną rolę w patologii COVID-19, obecnie testuje się kilka preparatów będących głównie przeciwciałami monoklonalnymi (ang. monoclonal antibody, mAb; neutralizują one docelowe białko), np. tocilizumab hamujący działanie IL-6 czy anakinra (rekombinowany antagonist receptoru dla IL-1, IL-1Ra) blokująca IL-1 α i IL-1 β . Oba te leki, po przejściu badań klinicznych, mogłyby być używane także w terapii anty-SARS-CoV-2 (ACKERMANN i współaut. 2021).

Jako preparaty lecznicze w przebiegu COVID-19 wdraża się również leki, których działanie opiera się na hamowaniu układu dopełniacza. Są to np. eculizumab i AMY-101, których używa się z powodzeniem w trakcie leczenia niewielkiego odsetka pacjentów bardzo ciężko przechodzących COVID-19 (LAURENCE i współaut. 2020, MASTAGLIO i współaut. 2020). Eculizumab to humanizowane mAb anty-C5, natomiast AMY-101 to mały peptyd, który wiąże składnik C3 i nie dopuszcza do jego aktywacji (MASTELLOS i współaut. 2020). Badania kliniczne dowodzą skuteczności obu środków w leczeniu ARDS spowodowanego infekcją SARS-CoV-2, z przewagą AMY-101 nad eculizumabem (MASTELLOS i współaut. 2020). Należy jednak zaznaczyć, że terapie oparte o mAb są bardzo drogie.

Jako potencjalne leki rozważa się również różne izoformy enzymu DNazy (np. COVIDornase, COVASE), hydrolizującego DNA, z którego składa się NET. Należy tu jednak podkreślić, że DNaza nie doprowadza do kompletnej degradacji NET, pozostawiając w organizmie ich małe fragmenty, które wciąż mogą promować stan zapalny (KOLACZKOWSKA i współaut. 2015). Wszystkie testowane środki, które mogłyby być potencjalnie wykorzystane w leczeniu COVID-19 będą w przyszłości porównywane w swojej skuteczności względem dotychczas stosowanych - deksametazonu i heparyny, które obecnie pełnią rolę standardu (ACKERMANN i współaut. 2021). Jednak docelowo, w przypadku NET wydaje się, że najwłaściwszym podejściem jest strategia leczenia opierająca się zarówno na hamowaniu powstawania NET, jak i wspomagająca degradację tych NET, które już powstały (ACKERMANN i współaut. 2021). Problem polega jednak na tym, że obecnie nie istnieją selektywne inhibitory tworzenia NET, a spośród tych istniejących, częściowo blokujących ścieżki inicjujące powstawanie sieci (np. Cl-amidine) żaden nie jest dopusz-

czony do stosowania u ludzi, z wyjątkiem terapii eksperymentalnych.

PODSUMOWANIE

Do roku 2020 r. pandemia była pojęciem znajdowanym w podręcznikach immunologii, a poprzednia światowa epidemia rozpoczęła się 102 lata wcześniej (była spowodowana tzw. grypą hiszpanką) i skończyła się po 3 latach. Należy mieć nadzieję, że pandemia COVID-19 będzie trwała krócej, m.in. ze względu na fakt, że rozumiemy coraz więcej z jej mechanizmów oraz już stworzyliśmy skuteczne szczepionki. Jednak z drugiej strony, skala podróżowania jest niewspółmiernie zwiększona od tamtego czasu, a wyszczepialność nie jest wystarczająca. Jedną z przyczyn zjawisk patologicznych zachodzących w czasie infekcji SARS-CoV-2 jest powstanie nadmiernej ilości nieusuwnych NET, które bezpośrednio lub wtórnie prowadzą do uszkodzeń tkanek, procesów zakrzepowych, sztormu cytokinowego i aktywacji układu dopełniacza. Nadmierna aktywacja reakcji odpornościowych jest bronią obosieczną i często właśnie to zjawisko, a nie sam czynnik infekujący, powoduje ciężki przebieg choroby lub nawet śmierć. Jednak znając mechanizmy patofizjologiczne jesteśmy w stanie stworzyć nowe terapie, których rozwój w kontekście NET omawiamy w niniejszej pracy.

Streszczenie

Choroba COVID-19 wywołana przez wirusa SARS-CoV-2 powoduje poważne uszkodzenia płuc, ale także innych narządów w organizmie człowieka. Infekcja może spowodować bardzo silną aktywację odpowiedzi immunologicznej, zwłaszcza wrodzonej, prowadząc m.in. do nadmiernej aktywacji neutrofilii. Komórki te, stanowiące licznie największą populację leukocytów we krwi człowieka, po silnej aktywacji mogą wyrzucać tzw. zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe NET. Struktury te mają na celu wyłapywanie i unieruchamianie (ograniczając infekcję) patogenów takich jak bakterie i wirusy. Jednak ze względu na fakt, że w ich skład wchodzi białka i kwasy nukleinowe silnie cytotoksyczne oraz aktywujące kaskadę krzepnięcia i układ dopełniacza, uszkodzeniu mogą ulegać także tkanki własne organizmu. W artykule przedstawiamy budowę, funkcje i efekty uboczne tworzenia NET w organizmie człowieka, a przede wszystkim opisujemy obecny stan wiedzy dotyczący wpływu NET na przebieg COVID-19. NET są silnie indukowane przez SARS-CoV-2, prowadząc do procesów patologicznych w trakcie COVID-19, w tym uszkodzeń wielonarządowych, m.in. związanych z tworzeniem zakrzepów. Przedstawiamy także testowane oraz potencjalne, terapie anty-NET mogące poprawić stan chorych i/lub ochronić przed śmiercią.

LITERATURA

ACKERMANN M., ANDERS H. J., BILYI R., BOWLIN G. L., DANIEL C., LORENZO R. DE, EGEBLAD M.

- i współaut., 2021. *Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils*. Cell Death Differ., doi.org/10.1038/s41418-021-00805-z.
- BOELTZ S., AMINI P., ANDERS H. J., ANDRADE F., BILYI R., CHATFIELD S., CICHON I. i współaut., 2019. *To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps*. Cell Death Differ. 26, 395-408.
- BORREGAARD N., 2010. *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity. 33, 657-670.
- BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A., 2012. *Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?* J. Cell Biol. 19, 8773-8783.
- BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS D. S., WEINRAUCH Y., ZYCHLINSKY A., 2004. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science 303, 1532-1535.
- CHEN M., KALLENBERG C. G. M., 2009. *New advances in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides*. Clin. Exp. Rheumatol. 27, 108-114.
- CUGNO M., MERONI P. L., GUALTIEROTTI R., GRIFFINI S., GROVETTI E., TORRI A., PANIGADA M. i współaut., 2020. *Complement activation in patients with COVID-19: A novel therapeutic target*. J. Allergy Clin. Immunol. 146, 215-217.
- FARRERA C., FADEEL B., 2013. *Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process*. J. Immunol. 191, 2647-2656.
- FOUSERT E., TOES R., DESAI J., 2020. *Neutrophil extracellular traps (NETs) take the central stage in driving autoimmune responses*. Cells 9, doi.org/10.1371/journal.pone.0097088.
- FUCHS T. A., BRILL A., DUERSCHMIED D., SCHATZBERG D., MONESTIER M., MYERS D. D., WROBLESKI S. K. i współaut., 2010. *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 15880-15885.
- GOLAB J., JAKOBISIAK M., LASEK W., STOKŁOSA T., 2017. *Immunologia*. PWN, Warszawa.
- GUO Y. R., CAO Q. D., HONG Z. S., TAN Y. Y., CHEN S. D., JIN H. J., TAN K. i współaut., 2020. *The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status*. Mil. Med. Res. 7, doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0.
- GUPTA A. K., GIAGLIS S., HASLER P., HAHN S., 2014. *Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A*. PLoS One 9, doi.org/10.1371/journal.pone.0097088.
- HOFFMANN M., KLEINE-WEBER H., SCHROEDER S., KRÜGER N., HERRLER T., ERICHSEN S., SCHIERGENS T. S. i współaut., 2020. *SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor*. Cell 181, 271-280.
- HOTTZ E. D., AZEVEDO-QUINTANILHA I. G., PALHINHA L., TEIXEIRA L., BARRETO E. A., PAO C. R. R., RIGHY C. i współaut., 2020. *Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19*. Blood 136, 1330-1341.
- HU J., HE C. L., GAO Q. Z., ZHANG G. J., CAO X. X., LONG Q. X., DENG H. J. i współaut., 2020. *D614G mutation of SARS-CoV-2 spike protein enhances viral infectivity*. bioRxiv, doi.org/10.1101/2020.06.20.161323.
- HUANG Y., YANG C., XU X.-F., XU W., LIU S.-W., 2020. *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral*

- drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* 41, 1141-1149.
- JANIUK K., JABŁOŃSKA E., GARLEY M., 2021. *Significance of NETs formation in COVID-19.* *Cells* 10, doi.org/10.3390/cells10010151.
- JAVA A., APICELLI A. J., KATHRYN LISZEWSKI M., COLER-REILLY A., ATKINSON J. P., KIM A. H. J., KULKARNI H. S., 2020. *The complement system in COVID-19: friend and foe?* *JCI Insight* 5, doi.org/10.1172/jci.insight.140711.
- KAPLAN M. J., RADIC M., 2012. *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity.* *J. Immunol.* 189, 2689-2695.
- KHANDPUR R., CARMONA-RIVERA C., VIVEKANANDAN-GIRI A., GIZINSKI A., YALAVARTHI S., KNIGHT J. S., FRIDAY S. i współaut., 2013. *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis.* *Sci. Transl. Med.* 5, doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580.
- KOLACZKOWSKA E., KUBES P., 2013. *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.* *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159-175.
- KOLACZKOWSKA E., LELITO M., KOZAKIEWICZ E., ROOIJEN N. VAN, PLYTYCZ B., ARNOLD B., 2007. *Resident peritoneal leukocytes are important sources of MMP-9 during zymosan peritonitis: superior contribution of macrophages over mast cells.* *Immunol. Lett.* 113, 99-106.
- KOLACZKOWSKA E., JENNE C. N., SUREWAARD B. G. J., THANABALASURIAR A., LEE W. Y., SANZ M. J., MOWEN K. i współaut., 2015. *Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature.* *Nat. Commun.* 6, doi.org/10.1038/ncomms7673.
- KUMAR Y., BHATIA A., MINZ R. W., 2009. *Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited.* *Diagn. Pathol.* 4, doi.org/10.1186/1746-1596-4-1.
- LANGE S., ROCHA-FERREIRA E., THEI L., MAWJEE P., BENNETT K., THOMPSON P. R., SUBRAMANIAN V. i współaut., 2014. *Peptidylarginine deiminases: novel drug targets for prevention of neuronal damage following hypoxic ischemic insult (HI) in neonates.* *J. Neurochem.* 130, 555-562.
- LAURENCE J., MULVEY J. J., SESHADRI M., RACANELLI A., HARP J., SCHENCK E. J., ZAPPETTI D. i współaut., 2020. *Anti-complement C5 therapy with eculizumab in three cases of critical COVID-19.* *Clin. Immunol.* 219, doi.org/10.1016/j.clim.2020.108555.
- LEPPKES M., KNOPF J., NASCHBERGER E., LINDEMANN A., SINGH J., HERRMANN I., STÜRZL M. i współaut., 2020. *Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19.* *EBioMedicine* 58, doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102925.
- LEVI M., THACHIL J., IBA T., LEVY J. H., 2020. *Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19.* *Lancet Haematol.* 7, doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
- LI Y., ZHOU W., YANG L., YOU R., 2020. *Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor.* *Pharmacol. Res.* 157, doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104833.
- LIANG Y., PAN B., ALAM H. B., DENG Q., WANG Y., CHEN E., LIU B. i współaut., 2018. *Inhibition of peptidylarginine deiminase alleviates LPS-induced pulmonary dysfunction and improves survival in a mouse model of lethal endotoxemia.* *Eur. J. Pharmacol.* 833, 432-440.
- MANLEY H. R., KEIGHTLEY M. C., LIESCHKE G. J., 2018. *The neutrophil nucleus: An important influence on neutrophil migration and function.* *Front. Immunol.* 9, doi.org/10.3389/fimmu.2018.02867.
- MARCINKIEWICZ J., WITKOWSKI J. M., OLSZANECKI R., 2021. *The dual role of the immune system in the course of COVID-19. the fatal impact of the aging immune system.* *Cent. Eur. J. Immunol.* 46, 1-9.
- MASTAGLIO S., RUGGERI A., RISITANO A. M., ANGEILLO P., YANCOPOULOU D., MASTELLOS D. C., HUBER-LANG M. i współaut., 2020. *The first case of COVID-19 treated with the complement C3 inhibitor AMY-101.* *Clin. Immunol.* 215, doi.org/10.1016/j.clim.2020.108450.
- MASTELLOS D. C., PIRES DA SILVA B. G. P., FONSECA B. A. L., FONSECA N. P., AUXILIADORA-MARTINS M., MASTAGLIO S., RUGGERI A. i współaut., 2020. *Complement C3 vs C5 inhibition in severe COVID-19: Early clinical findings reveal differential biological efficacy.* *Clin. Immunol.* 220, doi.org/10.1016/j.clim.2020.108598.
- MCDONALD B., URRUTIA R., YIPP B. G., JENNE C. N., KUBES P., 2012. *Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis.* *Cell Host Microbe* 12, 324-333.
- MCDONALD B., DAVIS R. P., KIM S. J., TSE M., ESMON C. T., KOLACZKOWSKA E., JENNE C. N., 2017. *Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice.* *Blood* 129, 1357-1367.
- MEHER A. K., SPINOSA M., DAVIS J. P., POPE N., LAUBACH V. E., SU G., SERBULEA V. i współaut., 2018. *Novel role of IL (Interleukin)-1 β in neutrophil extracellular trap formation and abdominal aortic aneurysms.* *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 843-853.
- MEI Z. W., WIJK X. M. R. VAN, PHAM H. P., MARIN M. J., 2021. *Role of von Willebrand factor in COVID-19 associated coagulopathy.* *J. Appl. Lab. Med.*, doi.org/10.1093/jalm/jfab042.
- MIDDLETON E. A., HE X. Y., DENORME F., CAMPBELL R. A., NG D., SALVATORE S. P., MOSTYKA M. i współaut., 2020. *Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome.* *Blood* 136, 1169-1179.
- PAPAYANNOPOULOS V., METZLER K. D., HAKKIM A., ZYCHLINSKY A., 2010. *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps.* *J. Cell Biol.* 191, 677-691.
- SANTOCKI M., KOLACZKOWSKA E., 2017. *Wyrzut zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NET) przez neutrofile i co dalej? Konsekwencje tworzenia i nieprawidłowego usuwania NET.* *Kosmos* 66, 623-634.
- SANTOCKI M., KOLACZKOWSKA E., 2020. *On neutrophil extracellular trap (NET) removal: What we know thus far and why so little.* *Cells* 9, doi.org/10.3390/cells9092079.
- SKENDROS P., MITSIOS A., CHRYSANTHOPOULOU A., MASTELLOS D. C., METALIDIS S., RAFAILIDIS P., NTINOPOULOU M. i współaut., 2020. *Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis.* *J. Clin. Invest.* 130, 6151-6157.
- SKOPELJA-GARDNER S., JONES J. D., RIGBY W. F. C., 2018. *"NETting" the host: Breaking of tolerance in chronic inflammation and chronic infection.* *J. Autoimmun.* 88, 1-10.
- SONG P., LI W., XIE J., HOU Y., YOU C., 2020. *Cytokine storm induced by SARS-CoV-2.* *Clin. Chim. Acta.* 509, 280-287.

- SORVILLO N., CHERPOKOVA D., MARTINOD K., WAGNER D. D., 2019. *Extracellular DNA NET-works with dire consequences for health*. Circ. Res. 125, 470-488.
- SUMMERS C., RANKIN S. M., CONDLIFFE A. M., SINGH N., PETERS A. M., CHILVERS E. R., 2010. *Neutrophil kinetics in health and disease*. Trends Immunol. 31, 318-324.
- TANG L., YIN Z., HU Y., MEI H., 2020. *Controlling cytokine storm is vital in COVID-19*. Front. Immunol. 11, doi.org/10.3389/fimmu.2020.570993.
- VERAS F. P., PONTELLI M. C., SILVA C. M., TOLLER-KAWAHISA J. E., LIMA M. DE, NASCIMENTO D. C., SCHNEIDER A. H. i współaut., 2020. *SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology*. J. Exp. Med. 217, doi.org/10.1084/jem.20201129.
- VOSSENAAR E. R., ZENDMAN A. J. W., VENROOIJ W. J. VAN, PRUIJN G. J. M., 2003. *PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease*. BioEssays. 25, 1106-1118.
- WANG Y., LI M., STADLER S., CORRELL S., LI P., WANG D., HAYAMA R. i współaut., 2009. *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J. Cell Biol. 184, 205-213.
- WITKO-SARSAT V., DESCAMPS-LATSCHA B., 1994. *Neutrophil-derived oxidants and proteinases as immunomodulatory mediators in inflammation*. Mediators Inflamm. 3, 257-273.
- YIPP B. G., KUBES P., 2013. *NETosis: how vital is it?* Blood 122, 2784-2794.
- YOSHIDA M., SASAKI M., SUGISAKI K., YAMAGUCHI Y., YAMADA M., 2013. *Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis*. Clin. Kidney J. 6, 308-312.
- YOUSEFI S., MIHALACHE C., KOZLOWSKI E., SCHMID I., SIMON H. U., 2009. *Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps*. Cell Death Differ. 16, 1438-1444.
- ZUO Y., YALAVARTHI S., SHI H., GOCKMAN K., ZUO M., MADISON J. A., BLAIR C. i współaut., 2020. *Neutrophil extracellular traps in COVID-19*. JCI Insight 5, doi.org/10.1172/jci.insight.138999.

KOSMOS Vol. 70, 3, 419–435, 2021

JUSTYNA STARZYK, ANNA SUCH, DOMINIKA DRAB, ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA

Pracownia Hematologii Eksperymentalnej, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Uniwersytet Jagielloński,
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

SARS-CoV-2 VERSUS NEUTROPHILS: ENTRAPPED BY NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS)

Summary

Coronavirus disease COVID-19 is induced by SARS-CoV-2 virus leading to severe lung injury, but also other vital organs can be affected in its course. The infection can induce profound activation of the immune system, especially the innate response, leading to over-activation of leukocytes, including neutrophils. The latter cells are the most abundant type of white blood cells in humans, and they can release neutrophil extracellular traps (NETs) when strongly activated. NETs capture and immobilize pathogens such as bacteria and viruses, limiting their spread throughout the body. However, as they consist of cytotoxic proteins and nucleic acids which can also activate coagulation leading to thrombosis, also bystander host cells/organs can get injured. In the article we characterize NETs in terms of their structure, functions and side effects of their formation, but foremost we focus on up-to-date findings on NET involvement in COVID-19. NETs are strongly induced upon SARS-CoV-2 infection, and they cause numerous pathologies during COVID-19 which include multi-organ damage related to thrombosis. We also describe and discuss tested and potential therapies directed against NETs that can improve the condition of patients in the course of the disease and/or prevent mortality.

Keywords: complement, neutrophils, neutrophil extracellular traps, SARS-CoV-2, thrombosis