

IL-17 И НЕУТРОФИЛИ В ПАТОЛОГИЯТА НА РЕВМАТОИДНИЯ АРТРИТ

В. Миланова¹, А. Тончева², Н. Ивановска¹ и П. Димитрова¹

¹Отдел „Имунология“, Институт по микробиология – София

²Клиника по вътрешни болести, Национална многопрофилна транспортна болница „Цар Борис III“ – София

Резюме. Ревматоидният артрит (РА) е хронично системно възпалително заболяване с неизяснена етиология, което води до постепенно разрушаване на ставите и на периставните структури. Всички основни участници на имунния отговор играят роля при иницирането, развитието и поддържането на аутоимунния процес при РА. Синхронизирането на клетъчния отговор и продукцията на цитокини при деструкция на костта е доста сложно. В обзора се обсъждат новите данни относно ролята на неутрофилите в патогенезата на ревматоидния артрит. Те могат да експресират мембранно свързан рецептор активатор на ядрения фактор κВ лиганд (RANKL), рецептор активатор на ядрения фактор κВ (RANK) и остеопротегерин (OPG), което ги прави важни фактори за остеокластогенезата. Неутрофилите могат да участват в уникален регулаторен кръг за синтез и освобождаване на възпалителния цитокин IL-17. При РА са открити някои отклонения при продукцията и регулацията на интерлевкин-17 (IL-17).

Ключови думи: неутрофили, интерлевкин-17 (IL-17), ревматоиден артрит, RANKL, остеокластогенеза

V. Milanova, A. Toncheva, N. Ivanovska and P. Dimitrova. IL-17 AND NEUTROPHILS IN THE PATHOLOGY OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Summary. Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease with unknown etiology which results in the destruction of cartilage and bone. All main immunological components play a fundamental role in the initiation, dissemination and perpetuation of autoimmune process in RA. The precise control of cellular and immunological events leading to bone destruction is complex. In the present review, new evidences about the role of neutrophils in the pathogenesis of RA will be discussed. Neutrophils can express membrane-bound RANKL, RANK and OPG that determines them as important factors in osteoclastogenesis. They also can participate in the unique regulatory loop for synthesis and release of pro-inflammatory IL-17. Disturbance of the production and regulation of IL-17 has been observed in RA.

Key words: neutrophils, IL-17, rheumatoid arthritis, RANKL, osteoclastogenesis

Увод

Заболяването ревматоиден артрит започва с възпалителни процеси на синовиалната мембрана, които се дължат на навлизането и/или на локалната активация на Т- и В-клетки, плазмочити, макрофаги, неутрофили, мастоцити и дендритни клетки. Лимфоидните инфилтрати в периваскуларното пространство формират структури, подобни на фоликулите в лимфните възли, където се осигурява оптимален контакт между антиген-представящите клетки (В-клетки и дендритни клетки) и Т-клетките, като експресията на костимулаторни молекули (CD80, CD86, CD40) и секрецията на цитокините IL-12, IL-1, IL-15, IL-18, IL-23, TGF-β са от съществено значение. Синовиалната мембрана се хиперактивира и се трансформира в панусна тъкан, която участва в разрушаването на костта, медирано от остеокластите.

Не е ясно доколко тези събития са свързани, но в различна степен аутоимунният отговор зависи от всички участници във възпалителния процес, които предизвикват ставните и периставните изменения и водят до хронифициране на заболяването.

ИНТЕРЛЕВКИН 17

Интерлевкин 17 – възпалителен цитокин

IL-17, първоначално наречен CTLA8, е клониран за първи път през 1993 г. от активиран миши Т-клетъчен хибридом [54]. Четири години по-късно е открит и характеризирани неговият рецептор [68]. Човешкият IL-17 притежава 25% хомология с аминокиселинната секвенция на мишия цитокин. Семействата на IL-17 и рецептора за IL-17 (IL-17R) съдържат 6 цитокина (IL-17A, B, C, D, E – IL-25, и F) и 5 рецептора. Членовете на IL-17 семейството се експресират по различен начин и в различни клетъчни популации, което определя и различната им биологична роля. IL-17A и IL-17F имат най-голяма хомоложност (63%) и сходна структура, която наподобява семейството на нервните растежни фактори. Двата цитокина проявяват сходни биологични функции и са най-добре проучените членове от семейството на IL-17 цитокините. IL-17A и IL-17F се продуцират и секретират основно от паметови CD4 Т-клетки или γδ TCR⁺CD4⁺CD8⁻ тимоцити в N-гликозилирана или негликозилирана форма (28 kDa и 33 kDa) [17]. Повечето от секретираните цитокини са хомодимери, но съ-

що така могат да се формират и хетеродимери между IL-17A и IL-17F. IL-17A и IL-17F се откриват в CD8 Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки, NKT клетки и неутрофили [15-60]. Продукцията на IL-17A от NKT клетките е бърза и не зависи от IL-6 и ROR γ t, медира се посредством TCR и рецептора за IL-23 [51]. IL-17F се експресира в моноцити/макрофаги [63], докато IL-17D се продуцира от почиващи CD4 Т-клетки и в по-ниска степен от В-клетки [62]. Оказва се, че IL-17B и IL-17C не се секретират от лимфоцити, но могат да бъдат индуцирани индиректно от двата сходни цитокина – IL-17A и IL-17F. IL-17E (IL-25) участва при хелперен тип 2 (Th2) имунен отговор и се произвежда от Th2 клетъчни клонове *in vitro* [16].

Рецепторът за IL-17 притежава единичен трансмембранен домен и има дълга цитоплазмена опашка [68]. Експресира се от почти всички типове клетки освен от наивни миши Т-клетки [19]. IL-17R се открива по повърхността на фибробласти и остеобласти, което ги прави особено чувствителни към действието на IL-17. След ангажиране на рецептора за IL-17 се активират ERK, JNK/SAPK, и p38 MAP киназните пътища [41-59]. Това води до активиране на NF- κ B и до повишена експресия на гените за стромелизин, IL-6 и IL-1 β , свързани с процесите на възпаление.

IL-17 се определя като възпалителен цитокин [19-31]. Той директно индуцира експресия на NO синтаза и продукция на IL-1, IL-6, TNF- α , матриксни металопроотеинази (MMPs), химиокини от фибробласти, синовиоцити, макрофаги и ендотелни клетки [42]. IL-17 предизвиква Т-клетъчна пролиферация. В присъствие на IL-17 фибробластите повлияват пролиферацията на CD34⁺ хемопоетични предшественици и насочват тяхното зреење до неутрофили *in vitro*. IL-17 стимулира синтеза на гранулоцит-колонии стимулиращ фактор (G-CSF) и простагландин E2 (PGE2), като регулира диференциацията на миелоидни прекурсори до дендритни клетки и неутрофили. Той индуцира и продукцията на химиокините, отговорни за привличане на автоактивни Т-клетки, макрофаги и неутрофили към местата на възпаление [49]. Често биологичната активност на IL-17 се осъществява в синергизъм с някои други възпалителни цитокини (IL-1, TNF- α , IFN- γ), като в резултат се повишава генната експресия на химиокини/цитокени [38]. IL-17 стабилизира иРНК за някои химиокини, намесва се в общи сигнални пътища и повишава експресията на важни костимулаторни молекули, като CD40L [55-64].

Th17 клетки

Th17 клетките, наречени още IL-17-секретиращи Т-клетки, IL-17 позитивни Т-клетки помощници, T17 клетки, Th IL-17 клетки, възпалителни Т-хелперни клетки (съкр. THi), са идентифицирани като уникален набор от Т-клетки и като част от групата на клетките, регулиращи функцията на неутрофилите (Tn, неутрофил-регулаторни Т-клетки). Th17 са CD4 популация, която продуцира и секретира IL-17. Те произхождат от наивни Т-клетки предшественици и се диференцират по начин, различен от този на останалите популации Т-клетки помощници, Th1 и Th2. Предложени са няколко механизма на Th17 клетъчна диференциация. Един от тях предполага участието на IL-23 и е независим от STAT1, T-bet, STAT4, и STAT6. IL-6 повишава експресията на иРНК за IL-23 рецептора и действа в комбинация с IL-23 [43]. Двата цитокина индуцират Th17 диференциацията, а TGF- β 1 допълнително усилва активиращите сигнали към Th17 клетките. Сам по себе си TGF- β 1 не може да предизвика Th17 диференциация от наивни предшественици и доказателство за това е, че IL-6 повишава експресията на иРНК за TGF- β 1 [33]. Другият механизъм за генериране на Th17 ефектори от наивни Т-клетки протича в отсъствие на IL-23 и в присъствие на TGF- β 1 и IL-6. Ефектът на двата цитокина се повишава от други провъзпалителни цитокини, като IL-1 α и TNF- α [6]. Въпреки че в тази моделна система IL-23 отсъства в началото на Th17 диференциацията, той е необходим за тяхното оцеляване и експанзия [32]. Генерирането на Th17 клетки се регулира от ключови за Th1 и Th2 клетките ефекторни молекули като IFN- γ и IL-4. Освен това сигналите за продукцията на IL-17 се контролират от негативния регулатор на цитокиновата продукция, SOCS3. SOCS3 "knock-out" мишки проявяват дефекти в трансдукцията на сигнала през рецептора за IL-23 и фосфорилирането на STAT3, който директно се свързва с нуклеотидни последователности от промотора на гените за IL-17A и IL-17F [11]. Продукцията на IL-17 се авторегулира чрез експресията на функционалния рецептор за IL-13 върху Th17 ефектори. Този рецептор доставя инхибиращи сигнали към IL-17 промотора [47].

Човешките дендритни клетки ефективно индуцират Th17 клетки *in vitro*, включително антиген-специфични Th17 клетки [13]. Докато повечето свежо изолирани циркулиращи човешки Th17 клетки секретират само IL-17 или IL-2, Th17 клетките, индуцирани от дендритните клетки, са полифункционални, продуцират освен

IL-17 и IFN- γ и са наречени Th17-1 клетки. *In vivo* зрелите дендритни клетки повлияват експанзията на автоложни Th17. При миелома наличието на инфилтрати от дендритни клетки води до експанзия на Th17 в костния мозък [13]. Подобен механизъм е установен и при възпаление на централната нервна система, където струпането на Th17 е предизвикано от специфична популация дендритни клетки [30].

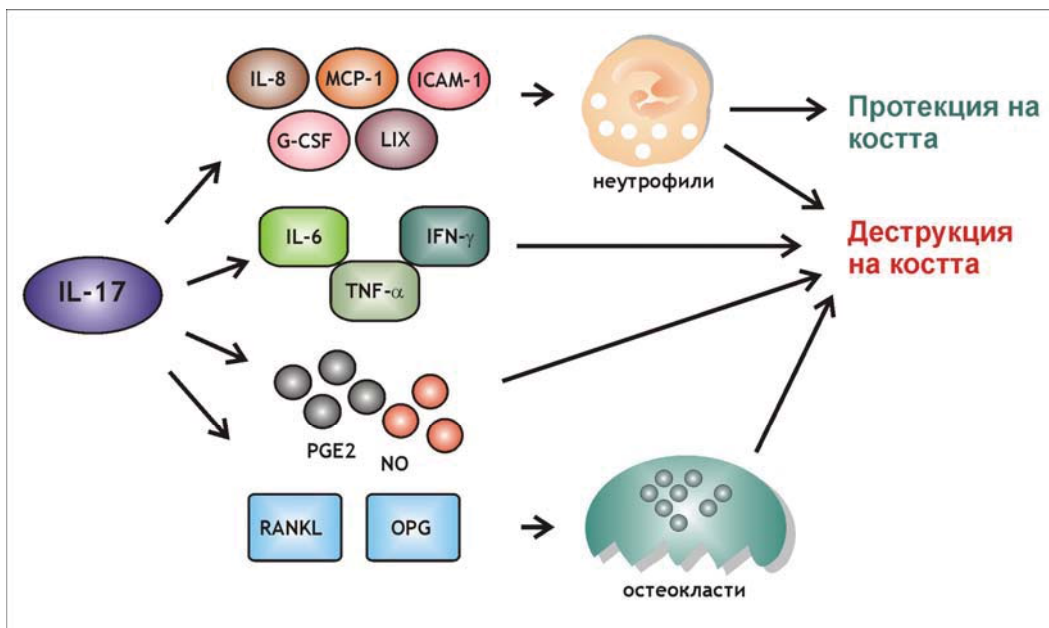
Биологичните свойства на IL-17, свързани с Th17 диференциацията на наивни Т-клетки и активирането на неутрофили и моноцити, определят неговата ключова роля в патогенезата на РА.

Ревматоиден артрит и IL-17

In vitro IL-17 се продуцира спонтанно от синовиоцити, изолирани от пациенти с РА. Нивото на цитокина в синовиална течност на пациенти с РА е значително повишено [8]. При пациенти с ранен ревматоиден артрит са установени високи сывумни концентрации на IL-17A, които при пациенти с дългогодишен РА намаляват до нивото в здрави индивиди [32]. При хората, CD4 Т-клетъчни клонове, получени от Th1/Th0 клетките от синовиум, продуцират IL-17. При мишки IL-17 се синтезира от Т-клетки, експресиращи TNF- α , но не и от Th1 или Th2 клетки. IL-17 стимулира транскрипционната активност на NF- κ B, активира продукция на IL-8 и IL-6 в синовиални фибробласти и ендотелни клетки и индуцира Т-клетъчна пролиферация. Той предизвиква синтеза на гранулоцит/макрофаг-колонии стимулиращ фактор

(GM-CSF) и PGE₂ от човешки синовиоцити. IL-17 повишава IL-1-медираната продукция на IL-6 от синовиални фибробласти и TNF- α -зависимия синтез на IL-1, IL-6 и IL-8 (фиг. 1 [19]).

При различни експериментални модели наличието на IL-17 е свързано с развитието на артрит. Счита се, че IL-17 участва в деструктивните ставни процеси чрез индукция на MMP-3 продукция и понижаване на синтеза на протеогликани от артикуларните синовиоцити и хондроцити [19-33, 34]. IL-17E и IL-17F също имат деструктивен потенциал *in vitro*. IL-17 действа синергично с IL-1, ключов цитокин в костната резорбция. *In vitro* IL-17 супресира продукцията на MMPs в хондроцити, като повишава синтеза на NO чрез механизъм, независим от IL-1. Трансдукционният сигнал през двата цитокинови рецептора за IL-17 и IL-1 се различава, както и степента на активиране на транскрипционния фактор AP-1. Въпреки това е налице силно биологично взаимодействие между двата цитокина. IL-17 в комбинация с TNF- α активира остеокластите *in vitro*, а сам по себе си регулира остеокластогенезата. Той повишава експресията на RANKL и променя съотношението между RANKL и "decoy" рецептора OPG [39]. При колаген-индуциран артрит (КИА) генната терапия с IL-4 регулира нивата на IL-17 и RANKL и повлиява костната ерозия. Повишената IL-17 експресия, получена от директното му инжектиране в ставите на наивни мишки, предизвиква TNF- α медирано остро възпаление и загуба на хрущялния протеогликан.



Фиг. 1. IL-17 в патогенезата на РА

При артрит, индуциран чрез трансфер на автоантитела при К/ВхN мишки и стрептококов артрит, IL-17 предизвиква силно обостряне на артрит, което е независимо от TNF- α . Появата и силата на КИА са значително намалени при IL-17 дефицитни мишки [46]. Блокирането на IL-17 с неутрализиращо антитяло при мишки с КИА редуцира симптомите на възпаление и разрушаването на костта. Трябва да се отбележи, че мишки с дефицит на Т-клетъчната костимулаторна молекула ICOS също са напълно резистентни към КИА и показват значително понижена продукция на IL-17 [48]. IL-17 е отговорен за активирането на колаген-специфичните Т-клетки и за продукцията на колаген-специфични IgG2a антитела. Негови антагонисти могат напълно да инактивират IL-17 *in vivo*. Ранната неутрализация на IL-17 с имуноглобулин G1 (IgG1) Fc протеин, закачен за IL-17 рецептора, потиска появата на заболяването. Неутрализирането на ендогенен IL-17 с анти-IL-17 серум след появата на първите симптоми на артрит намалява силата на болестта. Системната и локалната продукция на IL-17 е значително увеличена при инжектиране на аденовирусен вектор, свръхекспресиращ IL-17. Наскоро се появили и данни за ефикасността на моноклонално анти-IL-17 антитяло, което спомага за същественото и бързо намаляване на кожните лезии при друго аутоимунно заболяване – псориазис [26]. Макар клиничните изпитания при ревматоидния артрит да са в начален стадий, резултатите от тази анти-IL-17 терапия ще повишат разбирането за ролята на този цитокин в ставното възпаление.

НЕУТРОФИЛИ

Характеристика и биологични функции

Неутрофилите преминават през три етапа на развитие: 1. етап на развитие в костния мозък; 2. етап на развитие в циркулацията; 3. етап на развитие в тъканите [58]. Неутрофилите произлизат от миелоидни прекурсори в костния мозък чрез процес, наречен гранулопоеза (етап 1). Диференциацията на неутрофилите се осъществява в няколко фази: миелобласт, миелоцит, метамиелоцит, неутрофилна пръчкоядрена и сегментоядрена клетка. Процесът на съзряване на неутрофилите и диференциацията им в костния мозък трае 14 дни, като броят им варира от 1×10^8 до 1×10^9 и зависи от наличието на хемопоетични растежни фактори, като G-CSF и GM-CSF [36].

Диференцираните в костния мозък неутрофили навлизат в циркулацията (етап 2), където

остават от 6-9 часа. В кръвта 50% от всички циркулиращи левкоцити и 90% от всички циркулиращи фагоцитиращи клетки са неутрофили. Циркулиращите неутрофили могат да навлязат в малките капилляри, кръвоснабдяващи тъканите, да се задържат и натрупат там, формирайки т.нар. маргинативен пул (етап 3). Най-голям е броят на маргинативните неутрофили в белите дробове, тъй като в тях се намират множество малки капилляри. Въпреки краткия живот на неутрофилите, техният брой е относително стабилен – 3000-4000 неутрофила/ mm^3 .

Неутрофилите преминават от посткапилярните венули в екстраваскуларното пространство (ексудат). Първоначално се наблюдава т.нар. *маргинация*, или придвижване на неутрофилите от централния поток на кръвта към периферията на кръвоносния съд [14]. Забавеното движение на неутрофилите дава възможност за възникване на слабо афинитетни взаимодействия с ендотелните клетки. Така неутрофилите се приплъзват по посткапилярните венули, осъществявайки rolling [61]. Основна роля в този процес играят селектините и техните лиганди.

Увеличената експресия на CD11b/CD18 върху неутрофилите се дължи на стимулиране с разнообразни цитокини, включително FMLP, GM-CSF, C5a, TNF- α . Повишената адхезия към ендотелните клетки се свързва с конформационни промени в CD11b/CD18 протеиновия комплекс, експресиран във висока плътност [7]. От друга страна, ICAM-1 експресията върху ендотелни клетки също нараства в отговор на цитокини и химиокини и така се преминава от селектин-медиран rolling към интегрин-свързана адхезия и диапедеза.

Химиоатрактантите опосредстват активно трансмиграцията на неутрофилите. Това са разтворими молекули, които директно повлияват движението на неутрофилите. Клетките мигрират в посока към повишени нива химиоатрактанти – процес, наречен *химиотаксис*. Химиоатрактантите се класифицират като:

- класически химиоатрактанти – привличат разнообразни левкоцитни популации;
- химиокини – привличат специфична популация клетки.

Химиокини, свързани с неутрофилите, са IL-8, GSP, NAP-2, GRO- α, β , MIP-1a, 2b. Специфичността на химиотаксиса се определя от експресията на химиокинови рецептори. Тези рецептори съставят суперсемейството на G-свързани протеинови рецептори със 7 трансмембранни региона. Миграцията на неутрофилите зависи от експресията на IL-8RA, а антителата срещу IL-8RA потискат до 78%

химиотаксиса на клетките [22]. Експресията на химиокинови рецептори зависи от функционалното състояние на неутрофилите.

Основната функция на неутрофилите е фагоцитозата. Опсонините, включващи компоненти на комплемента, циркулиращи IgG антитела при свързване за неутрофилните рецептори, могат да отключат този процес. Човешките неутрофили експресират постоянно FcγRIIa (CD32) и FcγRIIIb (CD16), които споделят общ сигнално-трансдукционен път. Промяна в експресията на тези рецептори променя и способността на клетките да отговарят на стимулация с опсонини. Макар неутрофилите да са позитивни за двата нискоафинитетни FcγR, възпалителните цитокини индуцират експресията на високоафинитетния рецептор FcγRI (CD64) [52] върху неутрофили.

Апоптоза на неутрофилите

Апоптозата е форма на клетъчна смърт, строго контролирана от генетични фактори. При този процес се отстраняват клетки без индуциране на възпалителни реакции.

Неутрофилите се характеризират с много кратка продължителност на живота. При липса на активиращи стимули, неутрофилите престояват в кръвообращението от 6 до 18 h, преди да преминат към конститутивна апоптоза [1]. Това е критичен процес за възобновяването на неутрофилния пул, а също и за спиране на възпалението. Апоптозните неутрофили се разпознават и поглъщат от макрофагите, което води до продуциране на антивъзпалителни медиатори. Ако има забавяне на неутрофилния клирънс, апоптозните неутрофили претърпяват вторична некроза. Апоптозните неутрофили екзоцитират фосфатидилсерин и експресират CD35 и CD63 на клетъчната си повърхност, като улесняват разпознаването им от макрофагите [4-21]. Поглъщането и смилането на клетъчните остатъци от макрофагите индуцира продукцията на възпалителни цитокини. Цитокините IL-1, IL-6, IL-17 и TNF-α от своя страна повишават нивото на G-CSF. G-CSF забавя апоптозата на неутрофилите, като запазва нивото на антиапоптозния Mcl-1 и инхибира проапоптозните Bid и Bax фактори [40].

Експресията на TNFR1 прави неутрофилите чувствителни към действието на TNF-α, който увеличава апоптозата на периферни неутрофили от здрави индивиди. В резултат се активират 2 независими пътя: NF-κB сигналният път и каспазният път. NF-κB регулира експресията на разнообразни гени за цитокини, химиокини и адхезионни молекули. Този фактор е важен за преживяемостта на гранулоцитите при зрееенето

им в костния мозък. NF-κB потиска TNF-α-индуцираната апоптоза посредством негативна обратна връзка. Засега е установено, че свежо изолирани човешки неутрофили не експресират антиапоптозните протеини Bcl-2 или Bcl-XL [27-44]. Макар Bcl-2 да се експресира в промиелоидни клетки, той се губи при диференциацията им в неутрофили [56].

Роля на неутрофилите в патогенезата на РА

T-клетките, B-клетките и макрофагите се инфилтрират в синовиума и формират лимфоидни агрегати, понякога и герминативни центрове, като активно участват във формирането на панус. Синовиоцитите от тип А и В се акумулират в интимата, причинявайки хиперплазия на мембраната. Неутрофилите се откриват на границата между панус и хиперплазираната мембрана в малки количества и основно в синовиалната течност, където освобождават цитотоксични медиатори, като кислородни и азотни радикали. Така неутрофилите директно водят до увреждане на синовиалната мембрана, до образуване на фисури в нея, насърчават процесите на костна ерозия и индуцират загуба на протеогликан в хрущяла. Синовиалните неутрофили са чувствителни към наличието на имунни комплекси и цитокини в синовиума. При активирането си те отделят MMP-3,8,9 и еластаза. Докато еластазата деградира колагена и директно уврежда хрущяла, MMP-9 генерира антигенни пептиди, като позволява персистенция на имунния отговор. Неутрофилите мигрират в синовиума поради наличието на хемоатрактанти като C5a и IL-8. Привлечените неутрофили могат да адхерират върху хрущяла, а активирането им се улеснява от отложените имунни комплекси, от генерираните опсонини, от експресия на C5aR. Доказателство за това е, че при третиране на мишките с анти тяло, отстраняващо неутрофилите преди и след трансфер на K/BxN серум, се установява резистентност на мишките към развитието на заболяването [65]. Генетичното отстраняване на C5aR е много ефективно за превенция на възпалението при анти тяло-индуциран колагенов артрит [20] и анти-G6PI зависим артрит [28]. Смята се, че миграцията на неутрофилите се регулира генетично, а не от фактори в синовиалната течност. Тази генетична регулация е идентифицирана в артрит-чувствителни DA плъхове с КИА, но не и в артрит-резистентни АСI плъхове.

Зрелите неутрофили са определени като крайно диференцирани клетки с ниско ниво на *de novo* синтез на протеини. Оказва се, че неутрофилите синтезират голямо разнообразие от цитокини и химиокини при възпалителни състояния. Неутрофилите произвеждат IL-1, IL-12, IL-17, TNF- α . Възможно е част от неутрофилите да са *primed* в периферията и затова РА неутрофилите са с повишено ниво на mRNA за TNF и увеличена NF- κ B активност [67]. Въпреки че неутрофилите продуцират по-малки количества цитокини в сравнение с други клетки, големият им брой в периферията ги прави важен източник. Цитокините и химиокините са решаващи за усилване на възпалението чрез привличане на повече неутрофили и други имунни клетки и модулират тяхното активирано състояние. Например GM-CSF се продуцира от синовиалните клетки при РА, води до експресия и секреция на онкостатин М от активирани кръвни неутрофили [12]. Онкостатин М е член на IL-6 цитокиновото семейство, който повишава химиотаксиса на неутрофилите и Т-клетките.

В-лимфоцитният стимулатор (BLyS) е друг имунен медиатор, произхождащ от неутрофилите, който е повишен в серума на пациенти с РА и в синовиалната течност [10]. Смята се, че това е резултат от комбинирана стимулация на неутрофилите с G-CSF и с други възпалителни медиатори (имунни комплекси, CXCL8, IL-8, C5a, TNF и LTB4) [57].

Синовиалните неутрофили експресират PAD14, който е отговорен за цитрулинирането на аргинина. Антителата срещу цитрулинирани пептиди се откриват в ранната фаза на РА. Затова неутрофилите, като източник на PAD1 ензими, могат да допринесат за генерирането на антицитрулинови антитела [2].

Изненадващо, някои активирани неутрофили показват експресия на CD14, CD83 и MHC клас II антигени, които нормално се експресират от антиген-представящите клетки, но не и от почиващите неутрофили [24]. Промените в неутрофилите при специфични условия загатват за модифициране на техните собствени функции, приемайки фенотипа на антиген-представящите клетки [25]. Възможно е този феномен да се дължи на продуцирани от активирани Т-клетки цитокини. MHC клас II позитивни неутрофили могат да представят суперантигени или антигени за Т-клетките съответно по MHC клас II зависим или независим начин [25]. Така неутрофилите могат да модулират

функциите на други клетки, например Т-клетки, чрез директен контакт.

При елиминиране на възпалителния стимул се явява спешна нужда от поправяне на уврежданията и възвръщане на имунната хомеостаза. Това се проявява с повишаване на активизиращите сигнали и апоптиране на активирани неутрофили. Тези неутрофили се отстраняват чрез фагоцитоза от синовиалните макрофаги. Същевременно активизиращи сигнали, като липоксините, произлизащи от макрофаги, спират притока на неутрофили и активират макрофагите за фагоцитоза на мъртвите клетки, като така се спира възпалението [3].

При РА механизмите за апоптоза на неутрофилите са повредени. При пациенти с ранен РА синовиалните неутрофили са със значително пониски нива на апоптоза в сравнение с пациенти с друга персистираща форма на артрит [3]. Този ефект може да бъде свързан с високите нива на провъзпалителни цитокини, като IL-2, IL-4, IL-15, GM-CSF и G-CSF, открити в ставите на пациенти с ранен РА. Не е изненадващо, че повишеното ниво на G-CSF в серума и синовиалната течност на пациенти с активен РА и неговата концентрация съответстват на тежестта на заболяването [53]. *In vitro* синовиални неутрофили от пациенти с РА апоптозират по-бързо от периферните неутрофили [97]. Неутрофилите експресират Fas, а моноцит-макрофагите от синовиалната течност в голямо количество експресират неговия лиганд (FasL). Секреторен FasL е установен в синовиума [23] и неговото добавяне към неутрофили от периферна кръв ускорява апоптозата им [5]. Хипоксията в ставите също забавя апоптозата чрез задвижване на транскрипцията на антиапоптозни гени като Mcl-1 [12]. Наскоро е открит и друг модулатор на неутрофилната апоптоза. Лактоферинът, желязо-свързващ протеин, присъстващ в значителни нива в синовиалната течност при РА, е способен да забави спонтанната апоптоза на периферни и синовиални неутрофили. Тъй като нивата на лактоферин при пациенти с ранен артрит са по-ниски в сравнение с тези при пациенти с установен РА, се предполага наличието на различни механизми на неутрофилна апоптоза през ранната и късната фаза на болестта [66]. Дефензините (*b*-дефензини) удължават живота на неутрофилите чрез понижаване експресията на Bid (tBid) и повишаване експресията на Bcl-xL [45]. А LPS и LTA могат да забавят конститутивната апоптоза чрез ангажиране на TLR 4 и 2 [37].

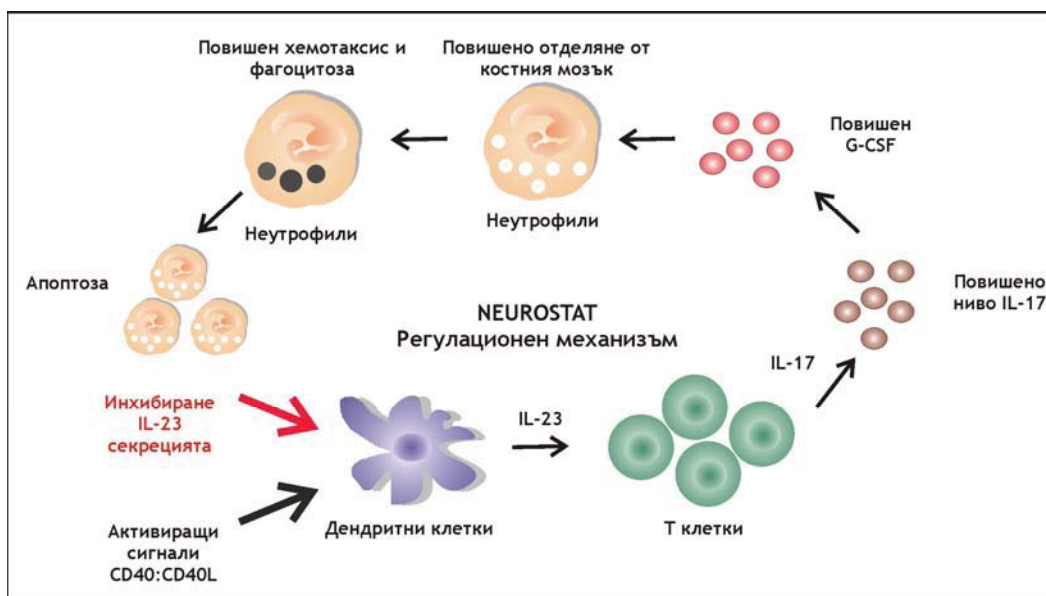
Експресия на RANKL при неутрофили

Резорбирането на костта от остеокластите се регулира от RANKL. Тази молекула, както и разтворимият и decoy рецептор OPG, са повишени при РА и се възвръщат към нормалните си нива след анти-TNF-α терапия [69]. При RANKL-knockout мишки има понижена костна ерозия. Неутрофили от синовиум на пациенти с РА експресират RANKL, OPG, TRAF6 и RANK, докато периферни неутрофили от здрави индивиди експресират RANKL и TRAF6, но не и OPG и RANK. Предполага се, че неутрофилите биха могли да бъдат въввлечени в ремоделирането на костта чрез техния мембранно свързан RANKL [50]. Разположението им на границата между панус и синовиална мембрана би могло да насърчи диференциацията на моноцити до остеокласти, които от своя страна могат да причинят резорбиране на костта. Установено е, че активирани неутрофили имат потенциал да се диференцират, придобивайки характеристики на клетки, резорбиращи костта, например имащи експресия на αvβ3 интегрин, карбонат анхидраза II, вакуоларна ATP-ase и катепсин [50]. LPS стимулира експресията на RANKL върху периферни неутрофили, а култивирането им с остеокластни прекурсори насърчава остеоκластогенезата. Активирането на мембранно свързания RANKL върху неутрофили се свързва с фосфорилиране на Src хомоложния домен, съдържащ фосфатаза 1 [9].

IL-17 – МОЩЕН АКТИВАТОР НА НЕУТРОФИЛИТЕ

IL-17 е мощен активатор на неутрофилите. При IL-17-дефицитни мишки се наблюдава понижена инфилтрация на неутрофили в мястото на възпаление. Намалено навлизане на неутрофили и IL-1β позитивни клетки се наблюдава в синовиума на мишки с КИА, третирани с анти-IL-17 анти-тяло. IL-17 регулира функциите на неутрофилите чрез G-CSF и експресията на неговия рецептор чрез така наречения NEUROSTAT регулационен механизъм (фиг. 2 [35]).

G-CSF подпомага зреенето на неутрофилите и повишава експресията на химиокинови рецептори [66]. Затова при стимулиране с CXCL1 и Groα в мишки и IL-8 в човека се повишава натрупването на неутрофили. На свой ред привлечените неутрофили изпълняват фагоцитните си функции и след това стават апоптозни. Фагоцитозата на тези апоптозни неутрофили намалява продукцията на IL-23 от дендритни клетки и макрофаги, като понижава IL-17 продукцията в Т-клетките. Така се осигурява уникален регулаторен кръг за синтез и освобождаване на IL-17 [18, 19]. Наскоро беше наблюдавано, че неутрофилите могат да експресират RANKL и директно да участват в остеоκластогенезата. Все още обаче липсват достатъчно изследвания в тази насока. Под въпрос е и защитната функция на неутрофилите за резорбирането на костта, установена при някои периодонтални изследвания, и ролята на IL-17 в деструктивния процес [29].



Фиг. 2. Взаимодействие между неутрофилите и IL-17

В заключение, неутрофилите са важни регулатори на процесите, свързани с костната резорбция и костното формиране при артритните заболявания. От една страна, през ранната фаза на РА те могат да насърчат остеокластогенезата, като вероятно осигуряват два сигнала за остеокластните прекурсори: през RANKL и през IL-17. От друга страна, през по-късната фаза на артритта, когато нивото на IL-17 в синовиума намалява, неутрофилите, експресиращи RANK, свързват разтворимия RANKL, секретират инхибиторния за остеокластогенезата OPG и потискат остеокластогенезата.

Публикацията е осъществена по проект КТ-Х-1707 на Фонд „Научни изследвания“, България.

Библиография

1. Akgul, C. et S. W. Edwards. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. – Cell Mol. Life Sci., 60, 2003, № 11, 2402-2408.
2. Anzilotti, C. et al. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. – Autoimmun. Rev., 9, 2010, № 3, 158-160.
3. Ashcroft, G.S. et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. – Nat. Med., 6, 2000, № 10, 1147-1153.
4. Beinert, T. et al. Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. – J. Leukoc. Biol., 67, 2000, № 3, 369-373.
5. Bell, A. L. et al. Human blood and synovial fluid neutrophils cultured in vitro undergo programmed cell death which is promoted by the addition of synovial fluid. – Ann. Rheum. Dis., 54, 1995, № 11, 910-915.
6. Bettelli, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. – Nature, 441, 2006, № 7090, 235-238.
7. Carlos, T. et J. Harlan. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. – Immunol. Rev., 114, 1990, № 5 – 28.
8. Chabaud, M. et al. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. – Arthritis Res., 3, 2001, № 3, 168-177.
9. Chakravarti, A. et al. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. – Blood, 114, 2009, № 8, 1633-1644.
10. Cheema, G. S. et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. – Arthritis Rheum., 44, 2001, № 6, 1313-1319.
11. Chen, J. F. et Z. X. Yao. The progresses of research on SOCS family in the central nervous system. – Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 37, 2006, № 2, 108-112.
12. Cross, A. et al. Secretion of oncostatin M by neutrophils in rheumatoid arthritis. – Arthritis Rheum., 50, 2004, № 5, 1430-1436.
13. Dhodapkar, K. M. et al. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. – Blood, 112, 2008, № 7, 2878-2885.
14. Downey, G. et al. Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum. – Am. Rev. Respir. Dis., 147, 1993, № 168 – 176.
15. Ferretti, S. et al. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. – J. Immunol., 170, 2003, № 4, 2106-2112.
16. Fort, M. M. et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. – Immunity, 15, 2001, № 6, 985-995.
17. Fossiez, F. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. – J. Exp. Med., 183, 1996, № 6, 2593-2603.
18. Gaffen, S. L. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17 – a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. – Arthritis Res. Ther., 6, 2004, № 6, 240-247.
19. Gaffen, S. L. An overview of IL-17 function and signaling. – Cytokine, 43, 2008, № 3, 402-407.
20. Grant, E. P. et al. Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. – J. Exp. Med., 196, 2002, № 11, 1461-1471.
21. Hall, S. E. et al. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. – J. Immunol., 153, 1994, № 7, 3218-3227.
22. Hammond, M. et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. – J. Immunol., 155, 1995, № 1428-1433.
23. Hasunuma, T. et al. Accumulation of soluble fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. – Arthritis Rheum., 40, 1997, № 1, 80-86.
24. Iking-Konert, C. et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. – Ann. Rheum. Dis., 64, 2005, № 10, 1436-1442.
25. Iking-Konert, C. et al. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. – Clin. Exp. Immunol., 130, 2002, № 3, 501-508.
26. Ivanov, S. et A. Linden. Interleukin-17 as a drug target in human disease. – Trends Pharmacol. Sci., 30, 2009, № 2, 95-103.
27. Iwai, K. et al. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. – Blood, 84, 1994, № 1201-1208.
28. Ji, H. et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. – Immunity, 16, 2002, № 2, 157-168.

29. Kantarci, A., K. Oyaizu et T. E. Van Dyke. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. – *J. Periodontol.*, 74, 2003, № 1, 66-75.
30. Keibir, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. – *Nat. Med.*, 13, 2007, № 10, 1173-1175.
31. Kolls, J. K. et A. Linden. Interleukin-17 family members and inflammation. – *Immunity*, 21, 2004, № 4, 467-476.
32. Langrish, C.L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. – *J. Exp. Med.*, 201, 2005, № 2, 233-240.
33. Leipe, J. et al. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. – *Arthritis Rheum.*, 62, 2010, № 10, 2876-2885.
34. Leipe, J. et al. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. – *Arthritis Res. Ther.*, 7, 2005, № 3, 93.
35. Ley, K., E. Smith et M. A. Stark. IL-17A-producing neutrophil-regulatory T lymphocytes. – *Immunol. Res.*, 34, 2006, № 3, 229-242.
36. Lieschke, G. et A. Burgess. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1). – *N. Engl. J. Med.*, 327, 1992, № 28 – 35.
37. Lotz, S. et al. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. – *J. Leukoc. Biol.*, 75, 2004, № 3, 467-477.
38. Lubberts, E., M. I. Koenders et W. B. van den Berg. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. – *Arthritis Res. Ther.*, 7, 2005, № 1, 29-37.
39. Lubberts, E. et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. – *J. Immunol.*, 170, 2003, № 5, 2655-2662.
40. Luc, H. et al. Mcl-1 correlates with reduced apoptosis in neutrophils from patients with sepsis. – *J. Am. Coll. Surg.*, 197, 2003, № 6, 964-973.
41. Martel-Pelletier, J. et al. Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B together regulate interleukin-17 – induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: Possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). – *Arthritis Rheum.*, 42, 1999, № 11, 2399-2409.
42. Miossec, P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. – *Arthritis Rheum.*, 48, 2003, № 3, 594-601.
43. Morishima, N. et al. TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 386, 2009, № 1, 105-110.
44. Moulding, D. A. et al. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. – *Blood*, 92, 1998, № 7, 2495-2502.
45. Nagaoaka, I. et al. Evaluation of the effect of human beta-defensins on neutrophil apoptosis. – *Int. Immunol.*, 20, 2008, № 4, 543-553.
46. Nakae, S. et al. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2003, № 10, 5986-5990.
47. Newcomb, D. C. et al. A functional IL-13 receptor is expressed on polarized murine CD4+ Th17 cells and IL-13 signaling attenuates Th17 cytokine production. – *J. Immunol.*, 182, 2009, № 9, 5317-5321.
48. Nurieva, R. I. et al. Inducible costimulator is essential for collagen-induced arthritis. – *J. Clin. Invest.*, 111, 2003, № 5, 701-706.
49. Park, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. – *Nat. Immunol.*, 6, 2005, № 11, 1133-1141.
50. Poubelle, P. et al. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. – *Arthritis Res. Ther.*, 9, 2007, № 2, R25.
51. Rachitskaya, A. V. et al. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgamma and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. – *J. Immunol.*, 180, 2008, № 8, 5167-5171.
52. Repp, R. et al. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. – *Blood*, 78, 1991, № 885 – 889.
53. Rouse, B. T. Regulatory T cells in health and disease. – *J. Intern. Med.*, 262, 2007, № 1, 78-95.
54. Rouvier, E. et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. – *J. Immunol.*, 150, 1993, № 12, 5445-5456.
55. Ruddy, M. J. et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. – *J. Biol. Chem.*, 279, 2004, № 4, 2559-2567.
56. Santos-Beneit, A. et F. Mollinedo. Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. – *J. Leukoc. Biol.*, 67, 2000, № 5, 712-724.
57. Scapini, P. et al. Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. – *Blood*, 105, 2005, № 2, 830-837.
58. Seely, A., J. Pascual et N. Christou. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. – *Crit. Care*, 7, 2003, № 4, 291-307.
59. Shalom-Barak, T., J. Quach et M. Lotz. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kB. – *J. Biol. Chem.*, 273, 1998, № 42, 27467-27473.
60. Shin, H. C. et al. Regulation of IL-17, IFN-gamma and IL-10 in human CD8(+) T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. – *Cytokine*, 10, 1998, № 11, 841-850.
61. Springer, T. Traffic Signals for Lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. – *Cell*, 76, 1994, № 301 – 314.

62. Starnes, T. et al. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. – J. Immunol., 169, 2002, № 2, 642-646.
63. Starnes, T. et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. – J. Immunol., 167, 2001, № 8, 4137-4140.
64. Такава, Н. et al. Interleukin-17 stimulates chemokine (interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1) secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. – Scand. J. Gastroenterol., 37, 2002, № 2, 239-245.
65. Wipke, B. T. et P. M. Allen. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. – J. Immunol., 167, 2001, № 3, 1601-1608.
66. Wong, S. H. et al. Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid. – Rheumatology (Oxford), 48, 2009, № 1, 39-44.
67. Wright, H. L. et al. Changes in expression of membrane TNF, NF- κ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. – Ann. Rheum. Dis., 2010.
68. Yao, Z. et al. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. – Cytokine, 9, 1997, № 11, 794-800.
69. Ziolkowska, M. et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor α treatment. – Arthritis Rheum., 46, 2002, № 7, 1744-1753.

Постъпил за печат на 21 март 2011 г.

✉ Адрес за кореспонденция:

Маг. фарм. Петя Димитрова
Отдел „Имунология“
Институт по микробиология
1113 София

☎ 979 31 31

факс: 870 01 09

e-mail: petya_dimitrova@web.de

✉ Address for correspondence:

Petya Dimitrova, Ph. D.
Department of Immunology
Institute of Microbiology
Bg – 1113 Sofia

☎ +359 2 979 31 31

fax: +359 2 870 01 09

e-mail: petya_dimitrova@web.de