

Zespół antyfosfolipidowy (antiphospholipid syndrome – APS) jest chorobą autoimmunologiczną, w której obecność przeciwciał antyfosfolipidowych prowadzi do powikłań zakrzepowych włośniczkowych zarówno włośniczkowym jak i tętniczym oraz włośniczkowych powikłań tętniczych. APS może występować jako jedyna choroba, tzw. pierwotny (primary APS – PAPS) lub towarzyszy innym schorzeniom autoimmunologicznym, najczęściej układowemu toczniowi trzewnemu (systemic lupus erythematosus – SLE). Mówimy wówczas o tzw. wtórnym APS (secondary APS – SAPS). Powikłania zakrzepowe wysuwają się na pierwszy plan manifestacji APS i jak dotychczas przewlekłe leczenie przeciwzakrzepowe pozostaje jedyną uznaną terapią tego schorzenia. Pojawia się jednak coraz więcej doniesień o niezakrzepowych manifestacjach APS, u podłoża których byłoby proces zapalny. Ich etiopatogeneza jest, jak dotychczas słabo poznana. Stwierdza się obecność nacieków komórkowych w naczyńkach oraz włóknienie błony wewnętrznej i środkowej tych naczyń. Początkowo zmiany te obserwowano u chorych z APS i nefropatią, ale mogą one również występować w tętnicach wieńcowych, szyjnych i kręzkowych. U ich podłoża może być nadmierna aktywacja kompleksu kinazy mTOR (mammalian target of rapamycin complex). Kinaza ta łączy wiele szlaków sygnałowych odpowiedzialnych między innymi za wzrost, proliferację i przeżycie komórek.

Ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (granulomatosis with polyangiitis – GPA), dawniej nazywana ziarniniakowatością Wegenera, jest układowym martwiczym zapaleniem naczyń z manifestacją kliniczną przede wszystkim ze strony układu oddechowego i nerek. Znakiem rozpoznawczym tej jednostki chorobowej jest obecność przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrofilii (antineutrophil cytoplasmic antibodies – ANCA) wykazujących aktywność przeciwko proteinazie (PR3). W obecności tych przeciwciał toczy się ziarniniakowe zapalenie w układzie oddechowym, może występować rozlane martwicze zapalenie naczyń i kłębuszkowe zapalenie nerek. Dane epidemiologiczne wskazują, że na rozwój choroby mają wpływ zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe, jednak etiopatogeneza GPA nadal pozostaje nieznana. Główną rolę patogenetyczną przypisuje się przeciwciałom ANCA, limfocytom T i B, zewnątrzkomórkowym pułapkami neutrofilowymi (neutrophils extracellular traps – NETs), fibroblastom, komórkom różniokształtnej naczyńkowej oraz markerom zapalenia. Ryzyko powikłań zakrzepowych w zapaleniach naczyń związanych z przeciwciałami ANCA (GPA i mikroskopowym zapaleniu naczyń [microscopic polyangiitis – MPA]) w aktywnej fazie choroby jest bardzo wysokie – około 7 na 100 osobolat. Pozostaje również podwyższone w okresie remisji.

Najważniejszymi celami naszego projektu będą:

1. Określenie etiopatogenetycznej roli zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs) w rozwoju powikłań zakrzepowych i narządowych w APS i GPA
2. Określenie ewentualnej roli aktywacji kompleksu kinazy mTOR w rozwoju niezakrzepowych powikłań naczyniowych obu schorzeń
3. Globalna ocena aktywacji procesów hemostazy w obu schorzeniach poprzez pomiar generacji trombiny *in vitro*, oraz jej ewentualny retrospektywny związek z ryzykiem zakrzepowym.

Do drugorzędowych/odległych celów projektu zaliczymy:

1. Określenie elementów patogenezы niezakrzepowych powikłań naczyniowych w APS w kontekście przyszłej możliwości ich profilaktyki
2. Usprawnienie oceny ryzyka zakrzepowego w APS i stworzenie możliwości takiej oceny w GPA
3. Znaleźnię ewentualnych wspólnych cech patogenetycznych i ich względny udział w etiopatogenezie obu schorzeń autoimmunologicznych.

Do badania planujemy włączyć w sumie około 270 pacjentów w ciągu 3 lat trwania projektu: 60 osób z GPA z dodatnimi przeciwciałami antyPR3, 60 osób z APS, 50 osób z APS i towarzyszącym układowym toczniem trzewnym (systemic lupus erythematosus – SLE) oraz 50 osób z SLE. Wszyscy pacjenci są i będą pod stałą opieką Poradni Chorób Immunologicznych i Oddziału Alergii i Immunologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Grupą kontrolną będzie stanowił 50 zdrowych osób dobranych pod względem płci i wieku.

Neutrofile stanowią podstawę wrodzonej komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Wytworzyły one różnorodne mechanizmy obronne, między innymi tworzenie neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych (NETs), składających się z histonów i białek o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [mieloperoksydaz (MPO), elastaz i PR3]. Dane dotyczące roli NETs w rozwoju powikłań APS są bardzo ograniczone; ukazała się zaledwie 1 publikacja na ten temat. Nieco lepiej poznano rolę NETs w etiopatogenezie SLE i GPA. W ramach projektu planujemy oznaczenie tworzenia się NETs dwoma metodami: bezpośrednio w wyizolowanych i poddanych stymulacji neutrofilach i pośrednio poprzez określenie poziomu krążących w surowicy kompleksów DNA-MPO lub wolnego mitochondrialnego i genomowego DNA.

W naszych dotychczasowych badaniach zajmowali się niedocenianą dotychczas rolę zapalenia w rozwoju zakrzepowych i niezakrzepowych powikłań APS. Chcąc kontynuować tematykę zamierzamy zbadać aktywację kompleksu kinazy mTOR u pacjentów z APS jako potencjalnego patomechanizmu rozwoju niezakrzepowych powikłań naczyniowych. Badania te planujemy również wykonać u chorych z GPA, co będzie miało charakter nowatorski, ponieważ jak dotychczas nikt nie badał tej problematyki. Zarówno w APS jak i w GPA proces chorobowy dotyczy przede wszystkim naczyń krwionośnych. W APS na pierwszy plan wysuwają się powikłania zakrzepowe, w GPA dominuje zapalenie naczyń, jednak ryzyko zakrzepowe jest również zwiększone. Pacjenci z SLE bez współistnienia tego APS również narażeni są na występowanie powikłań zakrzepowych, związanych zarówno z przewlekłym stanem zapalnym jak i leczeniem immunosupresyjnym. W celu lepszej oceny tego ryzyka i byłoby określenie wskazań do profilaktyki przeciwzakrzepowej planujemy u wszystkich chorych badać generację trombiny *in vitro*. Jest to użyteczny, powtarzalny test, który pozwala określić kinetykę powstawania trombiny. W naszych dotychczasowych badaniach potwierdzili my zwiększoną generację trombiny w APS i SLE oraz eozynofilowej ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis – EGPA) [Mastalerz i wsp. – dane nie publikowane].

Mamy nadzieję, że wyniki naszych badań pozwolą na lepsze zrozumienie etiopatogenezy APS i GPA co byłoby bardzo miało w przyszłości przełożyć się na nowe metody terapeutyczne obu schorzeń.