

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Katarzyna Wawrzycka-Adamczyk

ROLA MARKERÓW ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ TH17 I TREG
W OCENIE AKTYWNOŚCI
ZIARNINIAKOWATOŚCI Z ZAPALENIEM NACZYŃ (GPA)

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Jacek Musiał

Promotor pomocniczy: Dr Bogdan Jakiela

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych im. Prof. A. Szczeklika

Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Jacek Musiał

Kraków, 2017

*Promotorom
Panu Profesorowi Jackowi Musiałowi oraz Doktorowi Bogdanowi Jakiele
dziękuję za cenne rady, pomoc i wielką życzliwość
przy wykonywaniu tej pracy*

Autorka

Mojej córeczce Jagodzie
Per aspera ad astra

Spis treści	
Wykaz stosowanych skrótów	5
1. Wstęp	11
1.1 Epidemiologia i obraz kliniczny ziarniniakowości z zapaleniem naczyń	11
1.2 Podstawowe mechanizmy w etiopatogenezie ziarniniakowości z zapaleniem naczyń	16
1.3 Udział limfocytów T w etiopatogenezie ziarniniakowości z zapaleniem naczyń	19
1.4 Rola limfocytów Th17 oraz limfocytów T regulatorowych (Treg) w patogenezie ziarniniakowości z zapaleniem naczyń i innych chorób autoimmunologicznych	23
2. Założenia i cele pracy	32
3. Materiały i metody	34
3.1 Grupa badana	34
3.2 Plan badania	35
3.3 Oznaczenia laboratoryjne:	39
3.3.1 Cytometryczna ocena obrazu odsetkowego subpopulacji i fenotypu limfocytów na podstawie ekspresji antygenów różnicowania powierzchniowego i receptorów chemokinowych	39
3.3.2 Izolacja oraz zabezpieczenie komórek jednojądrzastych krwi (PBMC)	42
3.3.3 Cytometryczna ocena produkcji cytokin przez limfocyty T CD ⁺ aktywowane <i>in vitro</i>	42
3.3.4 Ocena ekspresji izoform czynnika transkrypcyjnego FoxP3	43
3.4 Etyka	44
3.5 Analiza statystyczna:	44
4. Wyniki	45
4.1 Charakterystyka badanych grup	45
4.2 Wyniki oznaczeń laboratoryjnych	49
5. Dyskusja	63
Wnioski	69
Streszczenie	70
Summary	73
Piśmiennictwo:	76

Wykaz stosowanych skrótów

AAV	zapalenia naczyń związane z przeciwciałami przeciw cytoplazmie neutrofilów (<i>ANCA-associated vasculitis</i>),
AlAT	aminotransferaza alaninowa
APTT	czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (<i>activated partial thromboplastin time</i>)
AspAT	aminotransferaza asparaginowa
ANCA	przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów (<i>anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>)
anty-PR3	przeciwciała przeciw proteinazie 3
AZA	azatiopryna
BVAS	skala aktywności zapalenia naczyń Birmingham (<i>Birmingham Vasculitis Activity Score</i>)
CCR3	chemokinowy (z motywem C-C) receptor typu 3 (<i>chemokine (C-C motif) receptor 3</i>)
CCR4	chemokinowy (z motywem C-C) receptor typu 4 (<i>chemokine (C-C motif) receptor 4</i>)
CCR5	chemokinowy (z motywem C-C) receptor typu 5 (<i>chemokine (C-C motif) receptor 5</i>)
CCR6	chemokinowy (z motywem C-C) receptor typu 6 (<i>chemokine (C-C motif) receptor 6</i>)
CCR7	chemokinowy (z motywem C-C) receptor typu 7 (<i>chemokine (C-C motif) receptor 7</i>)
CCR10	chemokinowy (z motywem C-C) receptor typu 10 (<i>chemokine (C-C motif) receptor 10</i>)
CCL2	chemokinowy (z motywem C-C) ligand typu 2 (<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>)
CCL20	chemokinowy (z motywem C-C) ligand typu 20 (<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>)
CD3	antygen różnicowania komórkowego typu 3 (<i>cluster of differentiation 3</i>)

CD4	antygen różnicowania komórkowego typu 4 (<i>cluster of differentiation 4</i>)
CD8	antygen różnicowania komórkowego typu 8 (<i>cluster of differentiation 8</i>)
CD18	antygen różnicowania komórkowego typu 18 (<i>cluster of differentiation 18</i>)
CD20	antygen różnicowania komórkowego typu 20 (<i>cluster of differentiation 20</i>)
CD25	antygen różnicowania komórkowego typu 25 (<i>cluster of differentiation 25</i>)
CD26	antygen różnicowania komórkowego typu 26 (<i>cluster of differentiation 26</i>)
CD28	antygen różnicowania komórkowego typu 28 (<i>cluster of differentiation 28</i>)
CD29	antygen różnicowania komórkowego typu 29 (<i>cluster of differentiation 29</i>)
CD30	antygen różnicowania komórkowego typu 30 (<i>cluster of differentiation 30</i>)
CD38	antygen różnicowania komórkowego typu 38 (<i>cluster of differentiation 38</i>)
CD45R0	izoforma R0 antygeny różnicowania komórkowego typu 45 (<i>cluster of differentiation 45</i>)
CD57	antygen różnicowania komórkowego typu 57 (<i>cluster of differentiation 57</i>)
CD69	antygen różnicowania komórkowego typu 69 (<i>cluster of differentiation 69</i>)
CD80	antygen różnicowania komórkowego typu 80 (<i>cluster of differentiation 80</i>)
CD86	antygen różnicowania komórkowego typu 86 (<i>cluster of differentiation 86</i>)
CD116	antygen różnicowania komórkowego typu 116 (<i>cluster of differentiation 116</i>)
CD127	antygen różnicowania komórkowego typu 127 (<i>cluster of differentiation 127</i>)
CD152	antygen różnicowania komórkowego typu 127 (<i>cluster of differentiation 127</i>)
CMV	cytomegalowirus (<i>cytomegalovirus</i>)
CTLA-4	antygen cytotoksycznych komórek T typu 4 (<i>cytotoxic T cell antigen 4</i>)
CTX	cyklofosfamid (<i>cyclophosphamide</i>)
CXCL1	chemokinowy (z motywem C-X-C) ligand typu 1 (<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>)
CXCL8	chemokinowy (z motywem C-X-C) ligand typu 8 (<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i>)
CXCR3	chemokinowy (z motywem C-X-C) receptor typu 3 (<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 1</i>)
DMARDS	leki modyfikujące przebieg choroby (<i>disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
eGFR	szacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej (<i>estimated glomerular filtration rate</i>)
EDTA	kwas wersenowy (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)

EULAR	Europejska Liga Przeciw Reumatyzmowi (<i>The European League Against Rheumatism</i>)
Fab	fragment przeciwciała wiążący antygen (<i>antigen-binding fragment of antibody</i>)
Fc	fragment c przeciwciała (krystalizujący, <i>crystallizable fragment of antibody</i>)
FCS	surowica płodowa cielęca (<i>fetal calf serum</i>)
FFS	skala Five Factor Score
FixPerm	bufor stabilizująco-permeabilizujący (<i>Fixation/Permeabilization solution</i>)
Fox	czynn timeranskrypcyjny z rodziny „forkhead box”
FoxP3	czynn timeranskrypcyjny z rodziny „forkhead box” typu P3/skurfina (<i>forkhead box P3</i>)
GARP	predominanta powtórzeń glikoproteiny A (<i>Glycoprotein A Repetitions Predominant</i>)
GITR	gen związany z rodziną receptora indukowanego glikokortykosteroidami czynn timerawrtwicy guza (<i>glucocorticoid-induced TNFR family related gene</i>)
GKS	glikokortykosteroidy
GPA	ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (<i>granulomatosis with polyangiitis</i>)
GM-CSF	czynn timerstimulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HLA-DPB1	ludzki antygen leukocytny regionu DP, łańcuch beta typu 1 (<i>human leukocyte antigene, DP beta 1</i>)
HLA-DR	ludzki antygen leukocytny regionu DR (<i>human leukocyte antigene, DR</i>)
IgG1	immunoglobulina podklasy G1
IgG4	immunoglobulina podklasy G4
IL-1 β	interleukina 1 β
IL-2	interleukina 2
IL-3	interleukina 3
IL-4	interleukina 4
IL-5	interleukina 5
IL-6	interleukina 6
IL-8	interleukina 8
IL-9	interleukina 9
IL-10	interleukina 10
IL-12	interleukina 12

IL-13	interleukina 13
IL-15	interleukina 15
IL-17	interleukina 17
IL-17A	interleukina 17A
IL-17B	interleukina 17B
IL-17C	interleukina 17C
IL-17D	interleukina 17D
IL-17E	interleukina 17E
IL-17F	interleukina 17F
IL-17RA	receptor dla interleukiny 17 typu A
IL-17RB	receptor dla interleukiny 17 typu B
IL-17RC	receptor dla interleukiny 17 typu C
IL-17RD	receptor dla interleukiny 17 typu D
IL-17RE	receptor dla interleukiny 17 typu E
IL-21	interleukina 21
IL-22	interleukina 22
IL-23	interleukina 23
IL-25	interleukina 25
IL-26	interleukina 26
IL-35	interleukina 35
INF γ	interferon γ
INR	wystandaryzowany współczynnik czasu protrombinowego (<i>International Normalized Ratio</i>)
IPEX	sprzężony z chromosomem X zespół immunodysregulacji, poliendokrynipatii i enteropatii (<i>Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome</i>)
JAK	kinaza janusowa (<i>Janus kinase</i>)
Kom.	komórki
LDH	dehydrogenaza mleczanowa (<i>Lactate Dehydrogenase</i>)
Li T _{CM}	limfocyty centralne pamięci (<i>central memory lymphocytes</i>)
Li T _{EM}	limfocyty efektorowe pamięci (<i>effector memory lymphocytes</i>)
Li T naïve	limfocyty dziewicze
Li T _{EMRA}	limfocyty końcowozróżnicowane
l.p.	liczba porządkowa

MAP	kinaza proteinowa aktywowana mitogenami (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
mg	miligramy
min	minuty
μl	mikrolitry
ms	milisekundy
MTX	metotreksat (<i>methotrexate</i>)
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NK	komórki NK (<i>natural killers</i>)
NF-κB	jądrowy czynnik „kappa-light-chain-enhancer” aktywowanych limfocytów B (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NKG2D	receptor G2D komórek NK (<i>NK receptor group 2, member D</i>)
PAN	Polska Akademia Nauk
PBMC	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBMC/PLT	kożuszek jednojądrzastych komórek krwi obwodowej oraz płytek krwi
PBS	zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PermWash	bufor permeabilizująco-płuczący
PHA	fitohemaglutynina (<i>phytohemagglutinin</i>)
PLT	płytki krwi
PMA	ester forbolu (<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PR3	proteinaza 3 (<i>proteinase-3</i>)
Przysp.	przyspieszenie
PTA	przewlekła aktywacja limfocytów T (<i>persistent T-cells activation</i>)
PTPN22	fosfataza tyrozynowa białek typu 22 (<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>)
RORγ2	sierocy receptor związany z RAR typu γ2 (<i>RAR-related orphan receptor gamma 2</i>)
RPMI	medium hodowlane Roswell Park Memorial Institute (<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
RTX	rytuksymab (<i>rituximab</i>)
SF-36	kwestionariusz oceny jakości życia Short Form-36
SF-36 MCS	składowa zdrowia psychicznego kwestionariusza Short Form-36 (<i>Short Form-36 mental component summary</i>)

SF-36 PCS	składowa zdrowia fizycznego kwestionariusza Short Form-36 (<i>Short Form-36 physical component summary</i>)
SLE	toczeń rumieniowaty układowy (<i>systemic lupus erythematosus</i>)
STAT3	przełącznik sygnału i aktywator transkrypcji typu 3 (<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
T-bet	czynn timeranskrypcyjny T-bet
T $\alpha\beta$	limfocyty T posiadające receptor TCR składający się z łańcuchów $\alpha\beta$
TCR	receptor limfocytów T (<i>T cells receptor</i>)
TGF β	transformujący czynnik wzrostu β (<i>transforming growth factor β</i>)
TGF β 1	transformujący czynnik wzrostu β 1 (<i>transforming growth factor β1</i>)
TGF β /GARP	kompleks TGF β i predomnany powtórzeń glikoproteiny A (<i>Glycoprotein A Repetitions Predominant</i>)
T $\gamma\delta$	limfocyty T posiadające receptor TCR składający się z łańcuchów $\gamma\delta$
Th1	limfocyty pomocnicze typu 1 (<i>T-helper cells type 1</i>)
Th2	limfocyty pomocnicze typu 2 (<i>T-helper cells type 2</i>)
Th3	limfocyty pomocnicze typu 3 (<i>T-helper cells type 3</i>)
Th17	limfocyty pomocnicze typu 17 (<i>T-helper cells type 17</i>)
Th22	limfocyty pomocnicze typu 22 (<i>T-helper cells type 22</i>)
TNF α	czynnik martwicy guza α (<i>tumor necrosis factor</i>)
Tpok	temperatura pokojowa
Treg	limfocyty T regulatorowe
Tr1	limfocyty T regulatorowe typu 1
VDI	skala uszkodzenia narządowego w zapaleniach naczyń (<i>Vasculitis Damage Index</i>)
X-VIVO	medium komórkowe X-VIVO
X-VIVO-5%ABS	medium komórkowe X-VIVO wzbogacone 5% roztworem surowicy AB

1. Wstęp

1.1 Epidemiologia i obraz kliniczny ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń

Ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (GPA – *granulomatosis with polyangiitis*) należy do pierwotnych zapaleń naczyń, związanych z produkcją przeciwciał ANCA (AAV-*ANCA-associated vasculitis*). Zapadalność na nią w Europie północnej i środkowej wynosi między 6 a 14 przypadków/milion/rok (6-12 w populacji niemieckiej, 8 w populacji norweskiej, 14,3 w brytyjskiej) i jest najwyższa spośród chorób tej grupy [1, 2, 3]. GPA dotyczy głównie osób między 45 a 60 rokiem życia bez istotnych różnic między zapadalnością w grupie mężczyzn i kobiet [4]. Częstość zachorowań na pierwotne zapalenia naczyń rośnie wraz z wiekiem, co w starzejącej się populacji europejskiej, w połączeniu z dostępem do szybkich ścieżek diagnostycznych, skutkuje wzrostem chorobowości w ostatnich dwóch dekadach [5].

GPA charakteryzuje się zapaleniem naczyń krwionośnych małego i średniego kalibru. Najczęściej proces zapalny umiejscowiony jest w narządach o gęstej sieci naczyń włosowatych, takich jak nerki i układ oddechowy, jednak dotknąć może dowolnego organu. Obecnie wyróżnia się trzy postaci kliniczne GPA. European Vasculitis Study Group definiuje postać ograniczoną, jako zajęcie wyłącznie górnych i/lub dolnych dróg oddechowych, postać wczesną uogólnioną, jako zajęcie również innego narządu, poza nerkami, a postać uogólnioną, jako obecność zapalenia naczyń również w nerkach [6].

Klinicznie ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń przebiega w postaci zaostrzeń i remisji. Dotychczas udowodniono korelację częstości nawrotów choroby z nadkażeniami, zarówno bakteryjnymi jak i wirusowymi [7].

Ocena aktywności zapaleń naczyń stanowi jedno z największych wyzwań w opiece nad chorymi z GPA. Objawy zaostrzenia niejednokrotnie postępują gwałtownie i wymagają podjęcia szybkich decyzji klinicznych. Typowy obraz zapalenia naczyń (zwłaszcza w postaci ograniczonej) w aktywnej fazie GPA może jednak do złudzenia przypominać zakażenie bakteryjne. Wtedy także podwyższeniu ulegają standardowe markery stanu zapalnego, takie jak białko C-reaktywne czy fibrynogen, stąd nie mają one znaczenia różnicującego [8, 9]. Prokalcytonina, uważana za najbardziej swoisty dla posocznicy bakteryjnej marker zapalenia, zdaje się mieć natomiast niską czułość w zakażeniach dróg oddechowych [10]. Stanowi to problem kliniczny, zarówno w grupie chorych

rozpoczynających ścieżkę diagnostyczną, jak i wśród tych, którzy posiadając już rozpoznanie, doświadczają nawrotu objawów. Rozpoznanie zaostrzenia zapalenia naczyń wymaga intensyfikacji leczenia immunosupresyjnego, a zakażenie bakteryjne pociąga za sobą włączenie antybiotykoterapii i ewentualną redukcję dawek immunosupresantów. Wybór ten bywa niekiedy trudny, a odpowiedź na pytanie, z jakim typem zapalenia mamy do czynienia – kluczowe.

Do klinicznych wskaźników oceny aktywności zapaleń drobnych naczyń, rekomendowanych do stosowania w praktyce klinicznej oraz w badaniach naukowych należy skala Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS), a do oceny utrwalonych uszkodzeń narządowych Vasculitis Damage Index (VDI) [11]. Obydwe stanowią wystandaryzowane narzędzia do oceny ciężkości choroby w formie kwestionariusza.

Skala BVAS to kwestionariusz zawierający objawy podzielone na 10 grup w zależności od układu, jakiego dotyczą. Każdemu objawowi przyporządkowana jest wartość punktowa. Dla części objawów wartość ta zmienia się w zależności od czasu wystąpienia (wersja pierwsza – gdy od pojawienia się lub nasilenia minął mniej niż miesiąc lub wersja druga – dla tzw. „przetrwałych” objawów, które trwają od 1 do 3 miesięcy). Objawy, które są obserwowane dłużej niż trzy miesiące, uznawane są za przewlekłe i nie są brane pod uwagę w skali BVAS. Wyjątek stanowi ocena chorego, u którego stawiana jest po raz pierwszy diagnoza zapalenia naczyń, choć pierwsze objawy pojawiły się już ponad trzy miesiące wcześniej. W obrębie każdego z układów ustalona jest maksymalna liczba punktów, jaką można uzyskać. Objaw musi wiązać się z zapaleniem naczyń i samodzielnie stanowić cel intensyfikacji leczenia (tzw. „intention to treat”), a w miarę możliwości być poparty badaniami obrazowymi/dodatkowymi lub konsultacją specjalistyczną [12, 13] (Rycina 1).

SKALA AKTYWNOŚCI ZAPALENIA NACZYŃ (Birmingham Vasculitis Activity Score, BVAS) v3

wraz z punktacją (objaw poniżej miesiąca/objaw przetrwały)

1. Objawy ogólne

- ☐ żadne (0)
- ☐ bóle mięśni (1/1)
- ☐ bóle stawów/zapalenie stawów (1/1)
- ☐ temperatura ciała powyżej 38°C (2/2)
- ☐ spadek masy ciała ≥ 2 kg (2/2)

2. Objawy skórne

- ☐ żadne (0)
- ☐ małe zmiany martwicz lub objaw drzazgi (2/1)
- ☐ plamica (2/1)
- ☐ owrzodzenie (4/1)
- ☐ rozległa martwica (6/2)
- ☐ inne objawy zapalenia naczyń skóry (2/1)

3. Błony śluzowe/oczy

- ☐ żadne (0)
- ☐ owrzodzenia jamy ustnej (2/1)
- ☐ owrzodzenia narządów rodnych (1/1)
- ☐ zapalenie gruczołów ślinowych lub łzowych (4/2)
- ☐ wytrzeszcz (4/2)
- ☐ zapalenie twardówki/ nadtwardówki (2/1)
- ☐ zapalenie spojówki/rogówki/powieki (1/1)
- ☐ zaburzenia ostrości widzenia (3/2)
- ☐ nagła utrata wzroku (6/brak opcji przetrwały)
- ☐ zapalenie błony naczyniowej (6/2)
- ☐ zmiany w siatkówce (zapalenie małych naczyń, zakrzepica, wysięk, krwotok) (6/2)

4. Uszy, nos, gardło

- ☐ żadne (0)
- ☐ krwista wydzielina z nosa/tworzenie się strupów / owrzodzenia/ziarnina (4/2)
- ☐ zajęcie zatok obocznych nosa (2/1)
- ☐ podgłośnieowe zwężenie krtani (6/3)
- ☐ niedosłuch przewodzeniowy (3/1)
- ☐ niedosłuch odbiorczy (6/2)

5. Klatka piersiowa

- ☐ żadne (0)
- ☐ świsty oddechowe (w badaniu fizykalnym) (2/1)
- ☐ guzki lub jamy w płucach (3/brak opcji przetrwały)
- ☐ wysięk opłucnowy/ból opłucnowy (4/2)
- ☐ naciek w płucu (4/2)
- ☐ zajęcie oskrzeli (4/2)
- ☐ masywne krwiopłucie/krwawienie do pęcherzyków płucnych (6/3)
- ☐ niewydolność oddechowa wymagająca sztucznej wentylacji (6/3)

6. Układ krążenia

- ☐ żadne (0)
- ☐ zanik tętna obwodowego (4/1)
- ☐ wada zastawkowa (4/2)
- ☐ zapalenia osierdzia (3/1)
- ☐ ból niedokrwienny serca (4/2)
- ☐ kardiomiopatia (6/3)
- ☐ objawy zastoinowej niewydolności serca (6/3)

7. Układ pokarmowy

- ☐ żadne
- ☐ objawy otrzewnowe (9/3)
- ☐ krwista biegunka (9/3)
- ☐ angina brzuszna (6/2)

8. Nerki

- ☐ żadne
 - ☐ nadciśnienie tętnicze (4/1)
 - ☐ białkomocz $> 1+$ lub >0.2 g/24h (4/2)
 - ☐ krwinkomocz ≥ 10 erytrocytów wpw (6/3)
 - ☐ kreatynina 125-249 $\mu\text{mol/l}$ (4/brak opcji przetrwały na pierwszej wizycie)
 - ☐ kreatynina 250-499 $\mu\text{mol/l}$ (6/brak opcji przetrwały na pierwszej wizycie)
 - ☐ kreatynina $\geq 500 \mu\text{mol/l}$ (8/brak opcji przetrwały na pierwszej wizycie)
 - ☐ wzrost kreatyniny $> 30\%$ lub spadek klirensu kreatyniny $> 25\%$ (6/brak opcji przetrwały na na pierwszej wizycie)
- (UWAGA: stężenie kreatyniny podlega ocenie jedynie podczas pierwszej wizyty)

9. Układ nerwowy

- ☐ żadne (0)
- ☐ ból głowy (1/1)
- ☐ zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (3/1)
- ☐ zaburzenia orientacji, pamięci lub innych funkcji poznawczych (3/1)
- ☐ Drgawki (9/3)
- ☐ udar mózgu (9/3)
- ☐ uszkodzenie rdzenia kręgowego (9/3)
- ☐ porażenie nerwu czaszkowego (6/3)
- ☐ polineuropatia czuciowa (6/3)
- ☐ wieloogniskowa mononeuropatia ruchowa (9/3)

Rycina 1. Skala aktywności zapalenia naczyń BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score) w wersji 3.0 wraz z punktacją (objaw nowy/przetrwały)

Skala BVAS znajduje zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej oraz w badaniach naukowych. Jako narzędzie klinicysty służy do podejmowania decyzji o intensyfikacji lub redukcji immunosupresji i monitorowania skuteczności tych działań, a w projektach badawczych, dzięki walidacji, pozwala na precyzyjny dobór chorych do grup w zależności od aktywności choroby [14]. Stosowanie jednolitej definicji zaostrzenia i remisji zapalenia naczyń umożliwia porównywanie wyników badań różnych ośrodków [11]. Dodatkowo wynik w skali BVAS koreluje z ciężkością przebiegu choroby i ma znaczenie prognostyczne [14, 15, 16]. W ostatnim czasie mówi się również o możliwym zastosowaniu skali, – jako narzędzia różnicującego – w diagnostyce chorych zgłaszających się z objawami sugerującymi zapalenie naczyń [17].

Skala VDI stanowi natomiast narzędzie do oceny przewlekłego uszkodzenia narządowego w układowych zapaleniach naczyń oraz ocenia efektywność leczenia. Posiada ona również wartość prognostyczną (wynik w skali $VDI \geq 5$ wiąże się z wyższym ryzykiem zgonu) [18]. Monitorowanie zmian w punktacji skali VDI jest również istotne w badaniach klinicznych. Stanowi to uzupełnienie charakterystyki klinicznej o dodatkowy wskaźnik ciężkości zapalenia naczyń, tłumaczący kliniczne różnice między chorymi, których nie uwzględnia skala BVAS (jak np. przewlekła niewydolność nerek czy przewlekła niewydolność oddechowa) oraz wskazujący tych chorych, którzy *a priori* posiadają wyższe ryzyko zgonu. VDI składa się z 64 punktów podzielonych na 11 sekcji (10 odnosi się do specyficznego uszkodzenia narządowego oraz jedna, opisana jako „inne”, zawiera głównie działania niepożądane leczenia). Objawy zawarte w kwestionariuszu mogą być zaznaczone pod warunkiem, że wystąpiły po rozpoznaniu zapalenia naczyń i utrzymują się dłużej niż 3 miesiące – każdy z nich zwiększa końcowy wynik o 1 [19, 20, 21]. Kolejną skalą stosowaną w AAV jest Five Factor Score (FFS) posiadająca głównie zastosowanie prognostyczne. Obecność takich czynników, jak wiek powyżej 65 lat, zajęcie centralnego systemu nerwowego, serca oraz nerek, dodaje po jednym punkcie do wyniku ogólnego, co wiąże się ze wzrastającym ryzykiem zgonu. Manifestacja ze strony zatok obocznych nosa odejmuje jeden punkt od wyniku końcowego [22].

Skalą znajdującą również zastosowanie w charakterystyce klinicznej chorych z zapaleniem naczyń jest kwestionariusz SF-36. Jest to składające się z 36 pytań uniwersalne narzędzie do oceny jakości życia w różnych jednostkach chorobowych. Wynik przedstawiany jest w postaci składowej zdrowia fizycznego (funkcjonowanie codzienne, dolegliwości bólowe i ogólny stan zdrowia) oraz psychicznego (jakość funkcjonowania w społeczeństwie, stan emocjonalny oraz psychiczny) [23, 24].

Pierwszymi, niecharakterystycznymi dolegliwościami zgłaszanymi przez pacjentów z GPA często są objawy ogólne. Gorączka, spadek masy ciała, bóle stawów i mięśni, bez cech ich zapalenia oraz spadek apetytu często wyprzedzają inne objawy chorobowe oraz zwiastują nawrót choroby.

Objawy ze strony zatok obocznych nosa, ucha i gardła dotyczą 70–100% pacjentów z GPA. Najczęściej są to objawy nieżytowe nosa, obejmujące uczucie jego zatkania, wynikające z obrzęku błony śluzowej nosa z jej owrzodzeniami oraz ropny lub krwisty przewlekły wyciek z przewodów nosowych oraz objawy towarzyszące, wynikające z zapalenia zatok obocznych nosa, takie jak ból głowy czy uczucie ucisku okolicy czołowej lub jarzmowej. Towarzyszyć im mogą również symptomy przewlekłego zapalenia ucha środkowego z ropnym wyciekami z przewodów słuchowych i niedosłuchem o typie przewodzeniowym. W łagodniejszych postaciach inne objawy chorobowe mogą nie występować, jednak w ciężkich przypadkach toczący się w obrębie twarzoczaszki proces zapalny prowadzi do destrukcji jej struktur kostnych z wytworzeniem tzw. nosa siodełkowatego lub przetoki ustno-nosowej [25].

Objawy zajęcia dolnych dróg oddechowych obserwuje się u 50–90% chorych. Cechy przewlekłego stanu zapalnego znaleźć można zarówno u chorych zgłaszających kaszel, duszność, odpływanie ropnej i/lub krwistej treści lub ból o charakterze opłucnowym, ale również u pacjentów niezgłaszających objawów, u których podstawowa diagnostyka układu oddechowego wykonywana jest rutynowo. W wyniku trwającego procesu zapalnego w drogach oddechowych może dojść do trwałych uszkodzeń, takich jak podgłośniowe zwężenie krtani czy perforacja drzewa oskrzelowego. W samych płucach GPA przyjmuje często postać zmian litych, od drobnych, rozsianych guzków śródmiąższowych aż do masywnych guzów zapalnych z rozpadem. Zmianom pęcherzykowym towarzyszyć może zagrażające życiu krwawienie śród-pęcherzykowe [26, 27].

Najczęstszą postacią zajęcia nerek w przebiegu GPA jest gwałtownie postępujące martwicze kłębuszkowe zapalenie nerek z nielicznymi złogami immunologicznymi i proliferacją mezangium [28]. Dotyka ono około 70% pacjentów z tym rozpoznaniem [29, 30]. Zmiany te, manifestujące się klinicznie białkomoczem, z czasem doprowadzają do postępującego upośledzenia filtracji kłębuszkowej, aż do krańcowej niewydolności nerek [31]. Do pozanerkowych, zdecydowanie rzadszych (<1% chorych), postaci GPA w obrębie układu moczowo-płciowego należą m.in. zapalenie cewki moczowej, prostaty, jąder, najądrza, przydatków oraz owrzodzenia narządów rodnych [15, 32, 33].

Objawy ze strony układu nerwowego prezentuje 20–50% chorych z GPA [34]. Do

najczęstszych należą obwodowe wieloogniskowe mononeuropatie, polineuropatie i neuropatie nerwów czaszkowych [35]. Zajęcie centralnego systemu nerwowego, obserwowane znacznie rzadziej (7–11%), objawiać się może zapaleniem opon mózgowych, zdarzeniami naczyniowymi czy drgawkami [36].

Do rzadszych prezentacji GPA należą zmiany skórne, takie jak plamica, zmiany guzkowe czy owrzodzenia, zajęcie serca, przewodu pokarmowego czy gruczołów dokrewnych [37].

1.2 Podstawowe mechanizmy w etiopatogenezie ziarniniakowości z zapaleniem naczyń

Od 1936 roku, kiedy Friedrich Wegener opublikował pracę dotyczącą nowej jednostki chorobowej, na której obraz składa się zapalenie ziarniniakowe i zajęcie naczyń krwionośnych, wiedza na temat etiopatogenezy tego schorzenia uległa znacznemu poszerzeniu [38]. Nadal jednak część mechanizmów odpowiadających za powstawanie zapalenia naczyń pozostaje niejasne, a niektóre teorie dotyczące immunopatologii GPA oczekują jednoznacznego potwierdzenia.

Do czynników genetycznych, oprócz opisanego w kolejnym podrozdziale polimorfizmu genu CTLA-4, wskazywanych jako tło dla nieprawidłowości w układzie immunologicznym chorych z GPA należą m.in. geny związane z regulacją apoptozy i białka przekaźnikowe. Wskazano m.in. sześć alleli genów związanych z apoptozą neutrofilów. Najsilniejszą korelację wskazano wobec genu HLA-DPB1 [39]. Ze wzrostem ryzyka zachorowania wiążą się również m.in.: gen PTPN22 kodujący fosfatazę tyrozynową regulującą odpowiedź limfocytów T i B [40], gen FCGR3B kodujący fragment Fc IgG [41], gen kodujący receptor dla leptyny [42] czy gen samej proteinazy 3 [43].

Jednym z najszerzej badanych elementów patofizjologicznych w GPA jest obecność przeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilów (ANCA – *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*), odkrytych w latach osiemdziesiątych podczas analizy surowicy pacjentów z martwiczym zapaleniem kłębuszków nerkowych [44].

Do głównych teorii tłumaczących powstawanie ANCA należą teoria dysfunkcji apoptozy neutrofilów oraz teoria mimikry molekularnej. Związek infekcji bakteryjnej z GPA potwierdza również zaobserwowana zależność między przewlekłym nosicielstwem *Staphylococcus aureus* a częstością zaostrzeń procesu autoimmunologicznego [45].

W zależności od wzorca wychwytu znakowanych fluoresceiną przeciwciał na powierzchni neutrofilów ANCA dzielimy na: cytoplazmatyczne „cANCA” (fluorescencja całej cytoplazmy), okołojądrowe „pANCA” oraz atypowe „aANCA” (fluorescencja niespecyficzna). Już pierwsze doniesienia naukowe, w których ANCA wykrywano jedynie za pomocą immunofluorescencji, sugerowały wysoką czułość i specyficzność w diagnostyce AAV oraz korelację stężenia z aktywnością choroby [46, 47]. Przeciwciała ANCA stwierdza się u 92-96% chorych z uogólnioną postacią GPA oraz 60–83% z postacią ograniczoną [48, 49]. W ok. 65–80% są to przeciwciała o typie świecenia cytoplazmatycznym, a w ok. 10–15% o typie okołojądrowym. W związku z dużą swoistością, ich stwierdzenie w surowicy pacjenta z podejrzeniem GPA ma znaczenie diagnostyczne [50]. Monitorowanie ich miana w ostatnich latach zyskało również znaczenie prognostyczne [51]. W ostatnich latach na znaczeniu zyskały inne, niż immunofluorescencja, metody oznaczania konkretnych przeciwciał ANCA, takie jak *western blot* lub antygenowo-specyficzne oznaczenia z użyciem testu immunoenzymatycznego (ELISA), jednak nie udowodniono dotychczas korelacji ich stężenia z aktywnością choroby [52].

ANCA w GPA najczęściej należą do podklas IgG1 i IgG4 [53]. Główny antygen będący ich celem zidentyfikowano jako proteinazę 3 (PR3) [54]. Enzym ten, należący do proteaz serynowych, uczestniczy w odpowiedzi neutrofilów na obecność patogenów. U pacjentów z GPA stwierdzono jego zwiększoną ekspresję na powierzchni leukocytów obojętnochłonnych, zarówno spoczynkowych, jak i aktywowanych [55]. Proteinaza 3 sama ma zdolność do aktywacji komórek śródbłonna naczyń do produkcji IL-8 rekrutując tym samym kolejne neutrofile [56].

Udział przeciwciał ANCA w wielu mechanizmach immunologicznych u pacjentów z GPA wydaje się prawdopodobny. Patogeny charakter samych ANCA pozostaje jednak dyskusyjny. Udowodniono potencjał przeciwciał przeciw mieloperoksydazie do wywoływania zapalenia naczyń w modelu zwierzęcym [57]. Uzyskanie takiej reakcji z udziałem przeciwciał przeciw proteinazie-3 udało się dotychczas jedynie w humanizowanych modelach mysich, co może wynikać z różnego udziału ANCA w patomechanizmie zapalenia naczyń w modelach zwierzęcych [58, 59].

Z punktu widzenia immunopatologii GPA najważniejszą z właściwości przeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilów jest ich zdolność do aktywacji obojętnochłonnych neutrofilów oraz monocytów w obecności TNF- α oraz zwiększenia ich zdolności adhezyjnych [60, 61, 62]. Dodatkowo aktywacja neutrofilów wywołana wiązaniem przeciwciał ANCA wpływa na zmianę struktury ich cytoszkieletu, zmniejszając zdolność

komórki do odkształcania i sprzyjając sekwestracji w kapilarach, co może tłumaczyć predylekcję AAV do małych naczyń krwionośnych [63]. Przy udziale fragmentu Fab oraz Fc przeciwciała ANCA aktywują oksydazę NADH neutrofilów powodując wybuch tlenowy i degranulację. Uwolnione zostają liczne mediatory stanu zapalnego, w tym: cytokiny prozapalne (np. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α), chemoatraktanty (np. CCL2 i leukotrien B4), cytokiny z rodziny TGF- β oraz wolne rodniki tlenowe [64, 65]. Cząsteczki te rekrutują kolejne typy komórek zapalnych oraz powodują uszkodzenie śródbłonna [66]. Do komórek, aktywowanych w obecności ANCA należą również m.in. monocyty (IL-6, neopteryna) oraz śródbłonek (IL-6, selektyna E) [67, 68].

Proteinaza 3 uwolniona z neutrofilów bezpośrednio wpływa także na dojrzewanie komórek dendrytycznych i toruje im drogę do indukcji odpowiedzi immunologicznej typu Th1, przeważającej w procesie tworzenia ziarniniaków [69].

Formowanie ziarniniaków w układzie oddechowym, według wczesnych badaczy choroby, stanowiło pierwszą fazę patogenezy GPA [70]. Fizjologicznie struktury te tworzą się na drodze odpowiedzi leukocytów na patogeny wewnątrzkomórkowe trudne do eliminacji na drodze strawienia. Stąd teoria, że w drogach oddechowych chorych z GPA ziarniniaki powstawały jako odpowiedź na nieznaną czynnik infekcyjny, a następnie reakcja zapalna w sposób niekontrolowany uogólniała się.

Późniejsze analizy również sugerowały istnienie wstępnej fazy GPA, w której zapalenie ziarniniakowe występuje jeszcze bez zajęcia naczyń krwionośnych [71]. Według niektórych badaczy etap ten można utożsamiać z ograniczoną postacią GPA, w której ziarnina jest podstawową zmianą w wycinkach zmienionej chorobowo błony śluzowej górnych dróg oddechowych [72], choć do tworzenia ziarniniaków prawdopodobnie dochodzi również w późniejszych etapach choroby, co potwierdzają badania histopatologiczne bioptatów nerki pacjentów z postacią uogólnioną GPA [73, 74]. W obrębie struktur ziarniniakowych w GPA znaleźć można nacieki złożone z neutrofilów, makrofagów i limfocytów (zarówno B jak i T), ale w części przypadków również z eozynofilów, monocytów czy komórek olbrzymich [75, 76].

Uogólnianie się stanu zapalnego w GPA jest procesem złożonym, w którym rolę odgrywają zarówno obecność ANCA, jak i rekrutacja kolejnych populacji leukocytów w miejscu pierwotnie zajęтым procesem chorobowym. W obrębie ziarniniaków zaobserwowano struktury podobne do ośrodków rozmnażania w grudkach chłonnych pierwotnych tkanek limfatycznych, jak również w trzeciorzędowych tkankach limfatycznych powstających podczas infekcji. Tworzą je neutrofile i monocyty (wykazujące

ekspresję PR3) otoczone komórkami prezentującymi antygen (m.in. komórki dendrytyczne) oraz efektorowymi limfocytami T [77]. Struktury te wskazują na aktywację swoistych antygenowo limfocytów B i T oraz procesy dojrzewania odpowiedzi immunologicznej. Promowane w ten sposób powstawanie przeciwciał ANCA sprzyja progresji układowego zapalenia naczyń [78, 79].

1.3 Udział limfocytów T w etiopatogenezie ziarniniakowości z zapaleniem naczyń

Na istotną rolę limfocytów T w etiopatogenezie GPA wskazuje już skład komórkowy struktur ziarniniakowych w górnych drogach oddechowych pacjentów z aktywnym zapaleniem naczyń, w których stwierdza się znaczną liczbę granulocytów. Komórki CD3⁺ okazują się być również dominujące w nacieku zapalnym obecnym w biopsatach nerek pacjentów z ANCA-dodatnim kłębuszkowym zapaleniem nerek [80, 81]. Ponadto analiza podklas przeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilów wskazuje na mechanizm ich powstawania zależny od limfocytów T [53].

Jedną z ważniejszych obserwacji dotyczących limfocytów u chorych z ziarniniakowością z zapaleniem naczyń jest obniżenie ich całkowitej liczby. Limfopenia często ma związek z zastosowanym leczeniem, ale nierzadko występuje u chorych ze świeżym rozpoznaniem zapalenia naczyń, nawet postaci ograniczonej, i pozostaje bez związku z aktywnością choroby [82]. Ponadto u chorych z AAV stwierdza się spadek stosunku limfocytów CD4⁺ do CD8⁺ we krwi obwodowej, co może wynikać z udziału limfocytów CD4⁺ w formowaniu ziarniny zapalnej [83, 84]. Obserwuje się również zwiększenie odsetka komórek NK [85].

U chorych z AAV obserwuje się zwiększoną, w porównaniu ze zdrową kontrolą, aktywację limfocytów T i zmianę proporcji poszczególnych podklas tych komórek pod wpływem proteinazy 3 [86, 87, 88]. Efektu takiego nie osiągnięto stymulując limfocyty przy użyciu innych peptydów, co ponownie podkreśla rolę autoantygenów w różnicowaniu leukocytów chorych z GPA [89].

U chorych z GPA obserwowano zwiększenie odsetka aktywowanych limfocytów B (ekspresja m.in. CD38) oraz limfocytów T (ekspresja m.in. CD25, CD29 i HLA-DR dla komórek CD4⁺ i CD11b, CD29 i CD57 dla komórek CD8⁺), który nie ulega normalizacji nawet w remisji choroby. Fakt ten sugeruje zarówno nieprawidłową gotowość limfocytów do proliferacji, jak i niekontrolowaną reakcję zapalną bez uchwytnego bodźca [83, 90, 91].

Zaangażowanie limfocytów w procesie zapalnym chorych z AAV zmienia proporcje komórek o różnym potencjale do migracji do krwi obwodowej lub pozostawania w narządach limfatycznych. Dochodzi do zmniejszenia odsetka limfocytów T pomocniczych dziewiczych (CD4+CD45RO-CCR7+) na korzyść frakcji limfocytów efektorowych pamięci (CD4+CD45RO+CCR7-). Tendencja ta postępuje wraz z czasem trwania choroby i jest szczególnie wyraźna w stabilnej remisji choroby. Zmiana proporcji limfocytów dziewiczych i efektorowych w aktywnej fazie zapalenia naczyń względem zdrowej populacji pozostaje jednak dyskusyjna [92, 93]. Zwiększenie liczby limfocytów efektorowych pamięci zaobserwowano w moczu pacjentów z aktywnym kłębuszkowym zapaleniem nerek w przebiegu zapalenia naczyń, co może tłumaczyć ich rekrutacja do narządów zajętych chorobowo [94]. Poza utratą receptora chemokinowego CCR7, predysponującego do powrotu do pierwotnych narządów limfatycznych, komórki efektorowe pamięci we krwi obwodowej i w zmianach ziarniakowych u chorych z GPA cechuje również wysoka ekspresja markerów aktywacji (np. HLA-DR), cząsteczek adhezyjnych (np. CD18) oraz receptorów związanych z odpowiedzią Th1 (np. CCR5) [95].

Wiele limfocytów o typie efektorowych pamięci należy do komórek CD28-. Utrata tej cząsteczki kostymulującej może dotyczyć populacji limfocytów zarówno CD4+ jak i CD8+ oraz stanowi jeden z wyznaczników „starzenia się” lub „wyczerpania” długo aktywowanych limfocytów pamięci. Frakcja tych komórek zwiększa się między innymi u osób starszych lub pacjentów z przewlekłymi stanami zapalnymi, będąc markerem przedłużającej się oraz powtarzanej antygenowej stymulacji układu immunologicznego. [96]. Sytuację taką zaobserwowano także u pacjentów z GPA. Na powierzchni limfocytów CD28- stwierdzono również zwiększoną ekspresję receptora CTLA-4 (CD152). Ligandem dla tego receptora są te same cząsteczki, które wchodząc w interakcje z CD28 (CD80 i CD86) uczestniczą w procesie aktywacji limfocyta T, jednak efekt takiej stymulacji jest dla komórki odwrotny. Dzięki aktywacji CTLA-4 w limfocytach może dochodzić do zmniejszenia ekspresji cytokin Th2. Zjawisko to obserwowano w ziarninie zapalnej chorych z GPA. W związku z tym wysunięto teorię, że jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój zapalenia naczyń w GPA jest zaburzona proporcja CTLA4/CD28 na powierzchni limfocytów (zwłaszcza CD4+ i CD4-CD8-) i w efekcie nieprawidłowa regulacja funkcji komórek limfocytów [97, 98]. Nieprawidłowości w obrębie genu kodującego CTLA zostały stwierdzone w licznych chorobach z autoagresji, przebiegających z nadreaktywnością limfocytów T, np. w nuzliwości mięśni, nieswoistych zapaleniach jelit i toczniu rumieniowatym układowym [99, 99, 101]. Ostatnie wyniki badań na grupie chorych z GPA

również sugerują silny związek polimorfizmu genu CTLA z wystąpieniem choroby [102, 103, 104].

Anomalią w obrazie odsetkowym limfocytów T CD4+, o której warto wspomnieć jest również wyższy, niż u zdrowej populacji, odsetek limfocytów NK o wysokiej ekspresji receptora dla IL-15 [105]. Ponieważ wzrost procentowego udziału tych limfocytów jest wysoce swoisty dla postaci uogólnionej choroby, wysunięto teorię, że komórki te odgrywają rolę w naciekaniu ściany naczyń krwionośnych, a co za tym idzie, rozprzestrzenianiu się choroby do innych tkanek.

W GPA, analogicznie do innych schorzeń z autoagresji, wysunięto teorię o dysproporcji pomiędzy poszczególnymi populacjami limfocytów pomocniczych. Do 2005 roku, kiedy pierwszy raz opisano limfocyty Th17, paradygmat równowagi między komórkami Th1 i Th2 stanowił główną oś badań nad udziałem mechanizmów komórkowych w patogenezie AAV.

Podział na główne grupy limfocytów pomocniczych opiera się na profilu wydzielanych przez nie cytokin oraz ich funkcji [106]. Cechą charakterystyczną limfocytów Th1 jest produkcja głównie IFN γ , IL-2, IL-3, i GM-CSF i wysoka ekspresja receptorów chemokinowych CCR5 i CXCR3 przy braku ekspresji CCR4. Głównym bodźcem do różnicowania w kierunku limfocytów Th1 jest IL-12, której źródłem są przede komórki prezentujące antygen. Komórki te w dużej mierze wspierają odpowiedź komórkową [107]. Z kolei subpopulacja Th2 odgrywa większą rolę w mechanizmach humoralnych, angażuje przy tym również eozynofile i wykazuje ekspresję przede wszystkim IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 i CCR4. Do różnicowania komórek Th2 dochodzi głównie pod wpływem IL-2 i IL-4, a cytokiny przez nie produkowane hamują proliferację subpopulacji Th1 [108].

Zaburzoną proporcję pomiędzy grupami limfocytów pomocniczych, zwłaszcza w nacieku zapalnym w zajętych chorobowo tkankach zaobserwowano w licznych schorzeniach autoimmunologicznych. Silną polaryzację w kierunku odpowiedzi Th1 opisano między innymi w idiopatycznych zapaleniach jelit, z kolei przesunięcie w stronę Th2 potwierdzono w przypadku schorzeń przebiegających z eozynofilią (m.in. eozynofilowej ziarniniakowości z zapaleniem naczyń) [109, 110].

Dotychczasowe wyniki badań dotyczących równowagi między limfocytami Th1 a Th2 w GPA nie są w pełni spójne. W strukturach ziarniniakowych w postaci zlokalizowanej GPA, utożsamianej z wczesną fazą choroby, obserwowano zwiększoną liczbę limfocytów CD26+ (opcjonalny marker Th1) wydzielających IFN γ oraz wykazujących ekspresję CCR5. Nie wykazano jednak zwiększonej ekspresji markerów Th2 w nacieku zapalnym ani

zwiększonego stężenia cytokin typu Th2 we krwi obwodowej w tej grupie chorych [76, 111]. Obraz ten sugeruje zdecydowaną polaryzację limfocytów w stronę odpowiedzi Th1 w postaci ograniczonej GPA. Na fakt ten może wpływać preferowana na drodze stymulacji antygenowej odpowiedź Th1 oraz znaczny udział limfocytów CD28⁻. Mediowana przez CD28 stymulacja limfocytów prowadzi do różnicowania komórek Th2. Zatem wzrost odsetkowego udziału komórek nie posiadających CD28 może prowadzić do dalszego przesunięcia równowagi między limfocytami pomocniczymi w kierunku Th1 [111].

Uogólnienie procesu autoimmunologicznego w aspekcie równowagi Th1/Th2 pozostaje niejasne. Część badań wskazuje na utrzymującą się przewagę komórek o funkcji Th1 zarówno w nacieku ziarniniakowym, jak i w obrębie PBMC [113]. Istnieją nawet doniesienia na temat jednoznacznej dominacji tej subpopulacji bez względu na stopień aktywności choroby, profil zajęcia narządowego, jak i pochodzenia analizowanych komórek (drogi oddechowe *versus* krew obwodowa) [114]. Część badaczy wskazuje jednak na zmniejszanie się odsetka limfocytów produkujących IFN γ , zwłaszcza w obrębie nacieku zapalnego w drogach oddechowych oraz wzrost stężenia wskaźników odpowiedzi Th2 we krwi obwodowej w miarę ekspansji procesu chorobowego [67, 111, 115]. Zespół Balding i wsp. wykazał nawet przewagę limfocytów CD3⁺ o wysokiej ekspresji IL-4 i receptora chemokinowego CCR3 w nacieku zapalnym błony śluzowej nosa chorych z uogólnioną, aktywną postacią GPA [116]. Na wzrost udziału odpowiedzi Th2 wskazuje również obserwowane w uogólnionej postaci GPA wyższe stężenie rozpuszczalnego receptora CD30 [117].

Wysunięto zatem teorię dotyczącą stopniowego przesunięcia równowagi między limfocytami Th1/Th2 w kierunku drugiej grupy w miarę postępu choroby [116, 118]. Teza ta wymagałaby jednak jednoznacznego potwierdzenia, a szczególnie cenna byłaby dalsza analiza rekrutacji poszczególnych subpopulacji limfocytów CD4⁺ do zajętych tkanek i zmiany ich proporcji we krwi obwodowej.

1.4 Rola limfocytów Th17 oraz limfocytów T regulatorowych (Treg) w patogenezie ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń i innych chorób autoimmunologicznych

Grupami komórek, które w ostatnich latach zyskały szczególną uwagę badaczy w aspekcie patogenezy GPA są limfocyty Th17 oraz limfocyty T regulatorowe (Treg). Analizowane jeszcze przed tym odkryciem modele zwierzęce autoimmunologicznego zapalenia mózgu sugerowały inny od Th1 i Th2 czynnik, kluczowy dla rozpoczęcia reakcji autoimmunologicznej. W rozwoju tej choroby wykazano wówczas udział odrębnej subpopulacji limfocytów CD4+ produkujących IL-17 [119, 120, 121, 122].

Od czasu pierwszych opisów (2003-2005) komórek typu 17, nie tylko rzuciły one nowe światło na kwestię równowagi między limfocytami pomocniczymi, ale również wskazały na ich szeroki udział w nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zjawisk autoimmunizacji i pierwotnych niedoborach odporności [122].

Do głównych cech limfocytów Th17 należy produkcja cytokin: IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, i CXCL8. Na ich powierzchni stwierdza się stałą obecność receptorów chemokinowych CCR4 i CCR6 przy braku CXCR3. Na różnicowanie linii Th17 ujemnie wpływa obecność IL-2, IL-4 i IFN γ . [123, 124, 125, 126].

Limfocyty Th17 różnicują się pod wpływem współdziałania IL-6, IL-21, IL-23, i IL-1 β . Istotną rolę odgrywają też czynniki kostymulujące, takie jak CD28 i ICOS. W procesie proliferacji Th17 podkreśla się również udział TGF- β , jako czynnika hamującego rozwój pozostałych linii komórek pomocniczych. W kontroli różnicowania Th17 najważniejszą rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne STAT3 (aktywowany kinazami JAK lub MAP) oraz ROR γ 2. [127, 128, 129, 130].

Poprzez profil wydzielanych przez siebie cytokin oraz inne właściwości komórkowe limfocyty Th17 wpływają na różnicowanie innych limfocytów, wykazują się niewielką cytotoksycznością i charakteryzują się stosunkowo niską podatnością na regulację z udziałem komórek Treg. Komórki te posiadają również zdolność różnicowania w inne linie pomocnicze w zależności od środowiska cytokinowego, w jakim się znajdują. Przejściu limfocytów o profilu Th17 w komórki Th1 towarzyszy zmiana regulacji czynników transkrypcyjnych ROR γ 2 i T-bet oraz utrata CCR6. Dochodzi do wzrostu produkcji IFN γ przy zmniejszeniu produkcji IL-17A. Istnieją również grupy limfocytów T posiadających

zarówno cechy komórek pomocniczych typu 1 jak i 17 (zdolność do produkcji IL-17 i IFN γ) [131, 132].

Rodzina interleukin 17 składa się z sześciu przedstawicieli: IL-17A, B, C, D, IL-17E (nazywana również IL-25) oraz IL-17F. Od czasu odkrycia pierwszego z nich (IL-17A) w 1995 roku, są one obiektem ciągłych badań pod kątem udziału w procesach autoimmunologicznych [133].

Interleukiny z tej rodziny produkują nie tylko limfocyty Th17. IL17A w różnych sytuacjach można spotkać również w limfocytach CD8+, komórkach $\gamma\delta$, eozynofilach i neutrofilach [134, 135, 136, 137]. Interleukiny 17 wiążą się z receptorami z rodziny IL-17R. Znajdują one się na powierzchni zarówno limfocytów pomocniczych, jak i na komórkach krwiotwórczych, fibroblastach oraz na komórkach śródbłonna [138]. Najwcześniej poznany i najlepiej zbadany z tej rodziny jest receptor IL-17RA. Kolejne to IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD oraz IL-17RE. Występują one najczęściej w postaci heterodimerów i tak na przykład kompleks receptorów IL-17RA i IL-17RC rozpoznaje IL17A i IL-17F, a z kolei kompleks IL-17RA i IL-17RB wiąże IL-25 [139, 140]. IL-17A oraz IL-17F wykazują znaczne podobieństwo w budowie i funkcjach. Wydzielane przez komórki Th17 cytokiny w głównej mierze wpływają na neutrofile i makrofagi. Związanie kompleksu receptora z interleukiną 17A lub 17F powoduje ekspresję cytokin (głównie IL-6, IL-1 β i TNF- α , GM-CSF), PGE2 oraz chemokin (CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL20, CXCL6, CXCL1, CCL2), co stymuluje dalszą proliferację neutrofilów, ale również wpływa na inne linie komórkowe, w tym różnicowanie limfocytów B i aktywację innych limfocytów T. W AAV proces ten prowadzi zarówno do zwiększonej produkcji ANCA, ale również do stopniowego naciekania ściany naczyń krwionośnych przez aktywowane komórki. [141, 142, 143, 144, 145, 146].

Odmierna rola IL-17E została dostrzeżona w procesach związanych z nadwrażliwością oraz reakcją przeciwpasożytniczą. Interleukina ta prowadzi do uwolnienia mediatorów odpowiedzi Th2 takich jak IL-4, IL-5, IL13. [147, 148, 149].

Komórki Th17 w warunkach fizjologicznych pełnią istotną rolę przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. Udowodniono, że myszy pozbawione osi IL17/IL23 pozostają podatne na ciężkie zakażenia takimi patogenami jak *Klebsiella pneumoniae* czy grzybami z rodziny *Candida* [150, 151].

Rola limfocytów produkujących IL-17 została szeroko opisana w innych schorzeniach z autoagresji. Analizując ekspresję markerów prozapalnych w wykwitach skórnych w przebiegu łuszczycy, oprócz cytokin typowych dla limfocytów Th1,

stwierdzono również zwiększoną liczbę komórek wykazujących ekspresję IL-1 β , IL-23, ROR γ 2, CCL20 (ligand dla CCR6). Fakt ten sugeruje, że w rozwoju procesu autoimmunologicznego udział biorą zarówno limfocyty pomocnicze typu 1, jak i 17 [152].

W grupie pacjentów z aktywnym reumatoidalnym zapaleniem stawów wykazano produkcję IL-17 i obecność jej mRNA w wycinkach maziówki pobranej ze stawów objętych procesem chorobowym. Inkubacja wycinków z cytokinami typowymi dla odpowiedzi Th2 (IL-4 i IL-13) doprowadziła do zmniejszenia produkcji IL-17 w badanych próbkach wskazując na antagonizm względem odpowiedzi typu 2 [153].

Kolejną chorobą, w której sugeruje się istotny udział limfocytów Th17 jest toczeń rumieniowaty układowy. We krwi obwodowej chorych wykazano m.in. zwiększony odsetek komórek produkujących IL-17 [154, 155]. Obserwacje te potwierdzają również analizy osoczowych markerów aktywności poszczególnych grup limfocytów pomocniczych. U pacjentów z SLE stwierdzono podwyższone stężenie IL-17A, IL-6, IL-10 i IL-12 przy porównywalnych ze zdrową grupą kontrolną poziomach IL-23 i IL-4. Ponadto stężenie pierwszych trzech z wymienionych cytokin koreluje u chorych z SLE z aktywnością choroby. Stwierdzono również obniżone stężenie TGF- β . Na podstawie takiego profilu cytokin zasugerowano, iż jednym z mechanizmów autoimmunizacji w przebiegu SLE jest zaburzenie proporcji pomiędzy populacjami konwencjonalnych limfocytów efektorowych i limfocytów Treg z dominującą rolą komórek Th17 [156].

Podobnych obserwacji dotyczących istotnej roli komórek wydzielających IL-17 dokonano również z pierwotnych zapaleń naczyń, jak na przykład w aktywnej fazie choroby Kawasaki oraz eozynofilowej ziarniniakowości z zapaleniem naczyń [157, 158].

Komórki o właściwościach immunosupresyjnych odgrywają istotną rolę w homeostazie układu immunologicznego. Mogą one należeć do różnych subpopulacji limfocytów, w tym do komórek T $\alpha\beta$ i T $\gamma\delta$ oraz wykazywać się obecnością zarówno CD4 jak i CD8. Wyznaczenie jednego, specyficznego markera przynależności do tej grupy nie jest łatwe z uwagi na jej niejednorodność. Łączy je jednak supresorowy wpływ na komórki prozapalne w mechanizmie zależnym bądź niezależnym od antygeny. Najważniejszym typem komórek o właściwościach immunosupresyjnych są limfocyty Treg. Do komórek, których funkcje ulegają zahamowaniu pod ich wpływem należą m.in. inne limfocyty T CD4+, limfocyty B oraz komórki cytotoksyczne [159, 160, 161]. Tym samym udział limfocytów Treg potwierdzono m.in. w zapobieganiu reakcji nadwrażliwości, immunosupresji w ciąży czy reakcjach przyjęcia/odrzućcia przeszczepu [162, 163, 164].

Do najważniejszych cytokin komórek Treg należą IL-9, IL-10, IL-35 i TGFβ oraz aktywność cytotoksyczna (poprzez produkcję granzymu B i perforyny) [165, 166, 167, 168, 169].

Wyróżniono dwa główne typy Treg. Tak zwane naturalne limfocyty regulatorowe (tTreg - thymus-derived regulatory T-cell) dojrzewają w grasicy jako jedna z subpopulacji limfocytów T CD4+. tTreg rozpoznają własne (*self*) antygeny, a ich cechą charakterystyczną jest konstytutywna ekspresja antygeny CD25 (podjednostka α receptora dla IL-2 o wysokim powinowactwie). Limfocyty Treg obwodowe (pTreg – *peripherally derived regulatory T-cell*) powstają w tkankach obwodowych w odpowiedzi na stan zapalny [170]. Jest to heterogenna grupa komórek różniących się mechanizmami supresji. W ich obrębie można wyróżnić tzw. limfocyty T regulatorowe typu 1 (Tr1) i limfocyty pomocnicze typu 3 (Th3). Subpopulacja Tr1 charakteryzuje się przede wszystkim silną ekspresją IL-10 oraz TGFβ. Komórki Th3, również związane z produkcją TGFβ, odgrywają istotną rolę w tolerancji immunologicznej śluzówek jamy ustnej [171].

Do innych markerów wspólnych dla dużej grupy komórek Treg należą: CTLA-4 [172], niska ekspresja CD127 [173] oraz gen związany z rodziną receptora indukowanego glikokortykosteroidami czynnika martwicy guza (GITR) [174].

Właściwości immunosupresyjne komórek regulatorowych w dużej mierze uwarunkowane są czynnikiem transkrypcyjnym FoxP3 [175, 176]. Ekspresja FoxP3 jest stała w tTreg i dotyczy większości z komórek indukowanych obwodowo. Mechanizm działania FoxP3 polega na tworzeniu kompleksów wiążących DNA z pozostałymi białkami rodziny Fox i współpracy z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak m.in. STAT3 czy NF-κB [177, 178]. Do najlepiej poznanych tego typu struktur należy kompleks FoxP3 oraz NFAT (jądrowy czynnik aktywowanych limfocytów T) regulujący proliferację limfocytów T na drodze hamowania ekspresji IL2 i indukcji ekspresji CTLA-4 i CD25. [179, 180]. Dotychczas zidentyfikowano około 700 genów pozostających pod jego kontrolą. [181] Czynnik FoxP3 może występować w kilku izoformach będących wynikiem alternatywnego splicingu. Wykazano m.in. że zwiększona ekspresja izoform FoxP3 pozbawionych fragmentów cząsteczki kodowanych przez egzony 2 lub 7 charakteryzuje się zmniejszonymi zdolnościami hamowania funkcji limfocytów T efektorowych. [182]

Komórki Treg identyfikuje się zatem przez obecność antygenów CD4 i CD25 oraz czynnika transkrypcyjnego FoxP3 przy braku antygeny CD127.

Różnicowanie komórek dziewiczych CD4+ w limfocyty pTreg odbywa się głównie pod wpływem TGFβ. [183] Jest on wiązany na powierzchni aktywowanych limfocytów

Treg przez tzw. białko GARP (*Glycoprotein A Repetitions Predominant*). Do prawidłowego sygnału z kompleksu TGFβ/GARP wymagana jest również stymulacja TCR. Obecność IL-2 wzmacnia ekspresję GARP na powierzchni Treg, a czynnikiem w dużej mierze ją redukującym jest obecność samego TGFβ [184].

Ostatnie badania szczególną uwagę poświęcają plastyczności tej linii komórkowej. Dowiedziono, iż mogą one zmieniać profil produkowanych mediatorów w typowy dla linii pomocniczych (np. Th17), pod wpływem środowiska cytokinowego [185, 186]. Przykładowo, pochodzące z grasicy komórki FoxP3+ w obecności IL-6 zmniejszają produkcję TGFβ na korzyść produkcji IL-17 [187]. Zdaje się zatem, że szlaki różnicowania tych dwóch linii komórkowych w dużej mierze pokrywają się. Równowaga pomiędzy nimi może tym samym być jednym ze wskaźników nieprawidłowości w układzie immunologicznym prowadzącym do rozwoju autoimmunizacji [188].

Udział komórek Treg w rozwoju chorób z autoagresji został potwierdzony w modelach zwierzęcych i na przykładzie chorób, których powstanie warunkuje mutacja w genach związanych z Treg [189]. Myszy pozbawione limfocytów FoxP3+ (fenotyp *scurfy*) rozwijają spektrum zaburzeń autoimmunologicznych. Z kolei mutacja w obrębie FoxP3 u ludzi związana jest z wystąpieniem zespołu IPEX, na którego obraz składają się m.in. cukrzyca typu I, niespecyficzne zapalenia jelit oraz endokrynopatie [190].

Badania na temat zaburzeń w obrębie funkcji komórek T-regulatorowych w ziarniniakowości z zapaleniem naczyń również wskazują na ich istotną rolę w patogenezie choroby.

Dotychczasowe badania sugerowały, że w remisji GPA zaobserwować można zwiększoną liczbę komórek o fenotypie CD4+CD25^{high}FoxP3+. Posiadały one jednak, udowodnioną w teście supresji, znacznie upośledzoną zdolność do hamowania proliferacji innych limfocytów pomocniczych [191].

W pracy z 2011 roku zaobserwowano z kolei, że odsetek komórek CD4+CD25+CD127^{low} pozostawał nieznacznie obniżony w grupie chorych z rozpoznaniem zapalenia naczyń ANCA+, bez względu na aktywność choroby. W grupie chorych z zaostrzeniem objawów zdolności supresorowe limfocytów Treg były jednak wyraźnie obniżone względem chorych w remisji i kontroli [192].

Teorię o zaburzeniach ilościowych i jakościowych Treg rozwinięto w badaniach na większej grupie chorych z AAV. Zespół Free i wsp. zaobserwował zwiększony, względem osób z grupy kontrolnej, odsetek limfocytów Treg w aktywnej fazie AAV. U wszystkich chorych na AAV komórki regulatorowe charakteryzowały się obniżoną zdolnością do

supresji proliferacji pobudzonych limfocytów CD4+, zaburzenia te były bardziej nasilone u chorych w zaostrzeniu i korelowały z wyższym odsetkiem Treg charakteryzujących się brakiem egzonu 2 w czynniku transkrypcyjnym FoxP3 [193].

Odkrycie udziału limfocytów Th17 w chorobach z autoagresji doprowadziło do badań dotyczących tej subpopulacji w AAV.

Ważnym sygnałem w tych badaniach było zahamowanie procesu zapalnego w doświadczalnym mysim modelu kłębuszkowego zapalenia nerek wywołanego przeciwciałami anti-MPO. Dzięki knock-outowi genu kodującego IL-17A myszy immunizowane mieloperoksydazą i antiGBM nie rozwinęły objawów zapalenia naczyń [194].

W pierwszym większym badaniu na temat udziału limfocytów Th17 w GPA porównano skład odsetkowy limfocytów po stymulacji antygenowej (PR3, enterotoksyną gronkowcową oraz toksyną tężcową) pobranych od pacjentów w remisji ziarniniakowości z zapaleniem naczyń oraz zdrowej kontroli. W grupie pacjentów z GPA zaobserwowano niższy niż w grupie kontrolnej odsetek limfocytów T posiadających marker wczesnej aktywacji CD69. Spośród aktywowanych komórek wyższy procent u chorych stanowiły limfocyty produkujące IL-17 oraz te produkujące IL-4. Różnice te nie zależały od obecności przeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilów. Nie stwierdzono różnic między grupami pod względem udziału komórek o funkcji Th1 [195].

Wyniki te częściowo potwierdza badanie *Fagin i wsp* [196]. Po stymulacji PBMC proteinazą-3 w grupie pacjentów w ostrej fazie AAV uzyskano wyższy niż w grupie kontrolnej odsetek limfocytów Th17 oraz limfocytów o mieszanym fenotypie (Th1/17 oraz Th2/17).

Na podstawie powyższych wyników wysunięto podejrzenie, że IL-17A może odgrywać rolę w rozwoju zapalenia naczyń zarówno u chorych ANCA+, jak i ANCA-. Przeprowadzono badania bezpośrednio na PBMC z krwi obwodowej [197, 198]. Analiza cytometryczna limfocytów pobranych od grupy pacjentów z rozpoznaniem zapalenia naczyń w porównaniu z grupą kontrolną wskazywała na ekspansję komórek Th17. Odsetek tych komórek we krwi obwodowej pozostawał istotnie podwyższony nawet pomimo uzyskania przez chorego remisji klinicznej. Nie zauważono różnic pomiędzy proporcjami limfocytów Th1 i Th2 w opisanych grupach. Wartości odsetkowe limfocytów produkujących IL-17A nie zależały od rodzaju zastosowanego leczenia immunosupresyjnego i obecności przeciwciał ANCA. Zauważono jednak ujemną korelację limfocytów IL-17A+ z dawką stosowanych

glikokortykosteroidów. Odsetek limfocytów T regulatorowych ($CD4+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$) był podwyższony tak w grupach z aktywną fazą choroby, jak i w remisji względem grupy kontrolnej. Sumarycznie wzrost liczby komórek regulatorowych nie zrównoważył podwyższonego odsetka limfocytów linii Th17, co spowodowało wzrost proporcji tych komórek w grupie chorych względem grupy kontrolnej [198]. Powyższe wyniki wskazują na niezależną od aktywności choroby ekspansję limfocytów Th17 w GPA.

W późniejszych badaniach Zespół Rani i wsp. [199] badał w grupie chorych na GPA odsetki poszczególnych podklas limfocytów pomocniczych identyfikowanych na podstawie ich zdolności do produkcji cytokin po stymulacji PR3 i PHA. Do badania włączono chorych w zaostrzeniu GPA (21 osób) oraz grupę kontrolną. Oznaczenia powtórzono po 6-miesięcznej obserwacji (14 chorych osiągnęło po tym czasie remisję choroby). Po stymulacji limfocytów proteinazą-3 w całej grupie GPA stwierdzono porównywalnie podwyższony odsetek komórek IL-17+. Chorzy w zaostrzeniu GPA charakteryzowali się niższym odsetkiem komórek IL-6+ i $TNF\alpha$ + oraz wyższym stężeniem IL-17 w surowicy krwi. Natomiast odsetek komórek Treg pozostawał taki sam we wszystkich badanych grupach.

Hipotezę o przewlekłej, podwyższonej proliferacji komórek Th17 u chorych z GPA sugerowały już badania dotyczące pomiaru stężenia cytokin typowych dla poszczególnych linii limfocytów pomocniczych w surowicy. Analiza surowicy chorych z aktywnym zapaleniem naczyń oraz grupy z chorobą w fazie remisji wykazała, że u pacjentów w zaostrzeniu stężenie IL-17A, IL-23 oraz IL-6 pozostaje podwyższone względem grupy kontrolnej. Wyższe od spotykanego w zdrowej populacji stężenie cytokin osi IL-23/IL-17A stwierdzono u 36 chorych z objawami zapalenia naczyń i 34 osób w remisji. Ponadto stężenie IL-23 korelowało z aktywnością choroby wyrażoną w skali BVAS. Większość komórek wydzielających IL-17A zidentyfikowano jako autoantygenowo-specyficzne. Zwrócono również uwagę, że pomimo stosowania leczenia immunosupresyjnego i wejścia w fazę remisji klinicznej u części pacjentów stężenie IL-17A i IL23 nadal pozostawało podwyższone. Obserwację profilu cytokin przeprowadzono przez kilka miesięcy u pięciorga chorych pierwotnie zakwalifikowanych do grupy zaostrzonej. Normalizację ich poziomu stwierdzono jedynie u trojga z nich. U pozostałych dwóch pacjentów zaobserwowano nawrót choroby w okresie obserwacji. Stężenie $IFN\gamma$ oraz IL-1 β we wszystkich badanych grupach było jednak porównywalne [200].

W literaturze rola linii komórek Th17 w GPA została w ostatnim czasie podkreślona również poprzez wskazanie ekspansji limfocytów CD161+ (cząsteczka związana z

produkcją IL-17A [201]) w tej grupie chorych [202].

Przeprowadzone dotychczas badania osi IL-17A/IL-23 pokazują zatem, że to komórki typu Th17 mogą odgrywać istotniejszą rolę w rozwoju ziarniniakowości z zapaleniem naczyń, niż podnoszony wcześniej paradygmat Th1/Th2. Zdaje się jednak, że ekspansja limfocytów IL-17A⁺ nie zależy od aktywności choroby. Udział poszczególnych mechanizmów komórkowych w różnych fazach zapalenia naczyń może być zatem bardziej złożony. Ważnym elementem tej obserwacji byłoby badanie prospektywne analizujące zmiany proporcji limfocytów pomocniczych w miarę wchodzenia w fazę remisji.

Możliwość wdrożenia leków biologicznych u chorych z GPA stanowi obiekt intensywnych badań w ostatnich latach. Doświadczenia te stanowią nie tylko ważny element w opracowywaniu efektywnych metod terapeutycznych, ale również pogłębiają naszą wiedzę w zakresie patogenezy choroby. O ile zastosowanie przeciwciała monoklonalnego przeciw komórkom CD20⁺ stanowi obecnie standard w indukcji remisji w AAV, wykazując skuteczność porównywalną z cytostatykami [203], o tyle leczenie skierowane na mechanizmy komórkowe, chociaż wypróbowane dotychczas na nielicznych grupach chorych, również przynosi obiecujące efekty. Przy jego użyciu potwierdzono udział m.in. TNFalfa oraz limfocytów T w patomechanizmie choroby [204, 205, 206]. Zadowalające efekty przyniosło również zastosowanie przeciwciał przeciw IL-17A (sekukinumab, iksekizumab) w chorobach o udowodnionej patogenetycznej roli limfocytów Th17, takich jak łuszczyca czy reumatoidalne zapalenie stawów [207]. Otwiera to również pole do zastosowania podobnych leków w terapii AAV, po poszerzeniu wiedzy na temat udziału Th17 w ich patogenezie.

Wiele danych wskazuje, iż patogeneza GPA ma charakter złożony. Predyspozycja genetyczna, wpływająca na zaburzone funkcjonowanie leukocytów, w tym dominującą odpowiedź komórkową typu Th1, przy jednoczasowym wystąpieniu czynników wyzwalających (takich jak infekcje, np. gronkowcem złocistym czy CMV) może prowadzić do rozwoju zapalenia ziarniniakowego, a w dalszym etapie zapalenia naczyń [208]. Wiele pytań dotyczących roli poszczególnych komórek układu odpornościowego w patogenezie choroby pozostaje jednak otwartych i wymaga dalszych badań. Szczególnie cenne wydaje się poszukiwanie specyficznych dla zapalenia naczyń markerów aktywności choroby wśród tych elementów układu immunologicznego, których udział w rozwoju GPA został wskazany

w dotychczasowych badaniach. Wraz ze skalami aktywności choroby mogłyby one stać się cennym narzędziem do podejmowania decyzji klinicznych.

2. Założenia i cele pracy

Zaburzenia proporcji pomiędzy subpopulacjami efektorowych limfocytów pomocniczych a limfocytami Treg wykazano nie tylko w licznych chorobach z autoagresji, ale również w pierwszych badaniach chorych z aktywnym AAV. Można zatem przypuszczać, że zmiany w obrazie odsetkowym limfocytów T mogłyby być markerem aktywności GPA.

Hipoteza

Pacjenci z ziarniniakowatością z zapaleniem naczyń w aktywnej fazie cechują się niższym odsetkiem limfocytów T regulatorowych, niż chorzy w remisji choroby, a odsetek limfocytów Th17 pozostaje stale podwyższony w całej grupie chorych względem zdrowej populacji.

Cele szczegółowe

1. Cytometryczna ocena odsetka subpopulacji limfocytów T (limfocyty T pomocnicze, limfocyty T cytotoksyczne) identyfikowanych na podstawie ekspresji antygenów różnicowania CD4 i CD8,
2. Cytometryczna ocena odsetk limfocytów T pomocniczych (Th1, Th2, Th17, Th22) identyfikowanych na podstawie produkcji cytokin IL-17A, IL-22, IFN γ , IL-4 po 4,5-5-godzinnej stymulacji estrem forbolu,
3. Cytometryczna ocena odsetka subpopulacji limfocytów efektorowych CD4+ (Th1-like, Th2-like, Th17-like, Th22-like) identyfikowanych na podstawie ekspresji receptorów chemokinowych CXCR3+CCR4-CCR6-CCR10-,
4. Cytometryczna ocena odsetka limfocytów Treg identyfikowanych na podstawie ekspresji antygenów CD25, CD127 i czynnika transkrypcyjnego FoxP3 oraz odsetka tych komórek z wariantem FoxP3 bez egzonu 2.

Badania prowadzone będą u chorych z aktywną postacią GPA, po 6 miesiącach indukującego remisję leczenia immunosupresyjnego, w remisji choroby oraz u osób zdrowych (grupa kontrolna).

Skrócony opis planu badania

Do badania kwalifikowano chorych z aktywną postacią ziarniniakowości z zapaleniem naczyń (zaostrenie lub świeże rozpoznanie), chorych z GPA w fazie remisji oraz zdrowych ochotników grupy kontrolnej. Dodatkowo, chorzy z zaostreniem GPA byli obserwowani przez kolejne 6 miesięcy, w czasie prowadzenia leczenia indukującego remisję.

3. Materiały i metody

3.1 Grupa badana

Badanie przeprowadzono w latach 2013-2016 w Klinice Alergii i Immunologii II Katedry Chorób Wewnętrznych UJCM w Krakowie. Chorych rekrutowano spośród pacjentów oddziału klinicznego oraz poradni przyklinicznej Szpitala Uniwersyteckiego na podstawie wyznaczonych kryteriów:

1. Kryteria włączenia:

- Rozpoznanie ziarniniakowości z zapaleniem naczyń,
- Dodatni wynik oznaczenia ANCA.

2. Kryteria wyłączenia:

- współistnienie innych chorób autoimmunologicznych,
- współistnienie ostrych i przewlekłych zakażeń,
- niewydolność nerek wymagająca leczenia nerkozastępczego,
- współistnienie choroby nowotworowej,
- brak zgody na udział w badaniu.

Do badania zostało zrekrutowanych 58 osób: 47 chorych z GPA i 26 dobranych pod względem płci i wieku zdrowych ochotników (grupa kontrolna).

W okresie rekrutacji spośród chorych: 22 zgłaszało kliniczne cechy zaostrzenia zapalenia naczyń, a 25 nie obserwowało u siebie objawów choroby przynajmniej od 12 miesięcy.

Rozpoznanie GPA każdorazowo potwierdzone było zgodnie z kryteriami American College of Rheumatology [209]. Aktywność choroby definiowana była jako obecność nowych lub pojawiających się ponownie objawów klinicznych związanych z zapaleniem naczyń, wymagających intensyfikacji leczenia immunosupresyjnego [11]. Jako głównego narzędzia używano Birmingham Vasculitis Activity Score w wersji 3.0 (BVAS 3.0). Badacz dokonujący oceny posiadał *BVAS University of Oxford certificate of competence*. Dodatkowo do oceny aktywności zapalenia naczyń stosowano również skalę Five Factor Score, skalę oceny jakości życia SF-36 oraz wskaźnik przewlekłego uszkodzenia

narządowego Vasculitis Damage Index.

W ramach rutynowego postępowania w ocenie aktywności choroby z użyciem skali BVAS u każdego zrekrutowanego chorego, poza zebraniem wywiadu lekarskiego i przeprowadzeniem badania fizykalnego, wykonano szeroki panel badań laboratoryjnych oraz, w wybranych przypadkach, badania obrazowe i konsultacje specjalistyczne.

Jako wyraz aktywności choroby przyjęto wynik w skali BVAS wyższy od 2. Remisja zapalenia naczyń definiowana była jako BVAS równy 0 przynajmniej przez rok przed rekrutacją.

Trzej chorzy, którzy na podstawie badań dodatkowych uzyskali wynik BVAS 2 jako wyraz “tłącej się” choroby, zostali wykluczeni z dalszych analiz z uwagi na brak możliwości jednoznacznej kwalifikacji do grupy zaostrzenia lub remisji. Dwóch chorych zostało wyłączonych z badania z powodu stwierdzonych w badaniach laboratoryjnych cech infekcji. Pięciu zostało wykluczonych z uwagi na brak możliwości wykonania wszystkich oznaczeń laboratoryjnych.

Do grupy chorych z nowym rozpoznaniem lub zaostrzeniem ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń zakwalifikowano ostatecznie 19 chorych, a do grupy w stabilnej remisji - 18.

3.2 Plan badania

Krew do oznaczeń laboratoryjnych była pobierana podczas pierwszej wizyty. Chorzy w aktywnej fazie choroby po pobraniu krwi niezwłocznie rozpoczynali leczenie indukujące remisję według obowiązujących standardów [210]. W leczeniu stosowano schemat: cyklofosfamid w dawce 15mg/kg mc (redukcja dawki w przypadku niższych wartości eGFR) w pulsach podawanych przez pierwszy miesiąc co dwa tygodnie, a następnie co trzy tygodnie, lub rytuksymab w 4 dawkach po 375mg/m². Dawki leków i schemat ich podawania były indywidualnie modyfikowane u niektórych pacjentów z uwagi na działania niepożądane, infekcje oraz dostępność leków [Tabela 3]. Ocena aktywności zapalenia naczyń dokonywana była następnie podczas comiesięcznych wizyt kontrolnych. Po sześciu miesiącach leczenia immunosupresyjnego wykonywano wszystkie procedury analogiczne do wizyty pierwszej. Lista procedur wykonywanych podczas poszczególnych wizyt obejmowała:

I. Pierwsza oraz siódma wizyta:

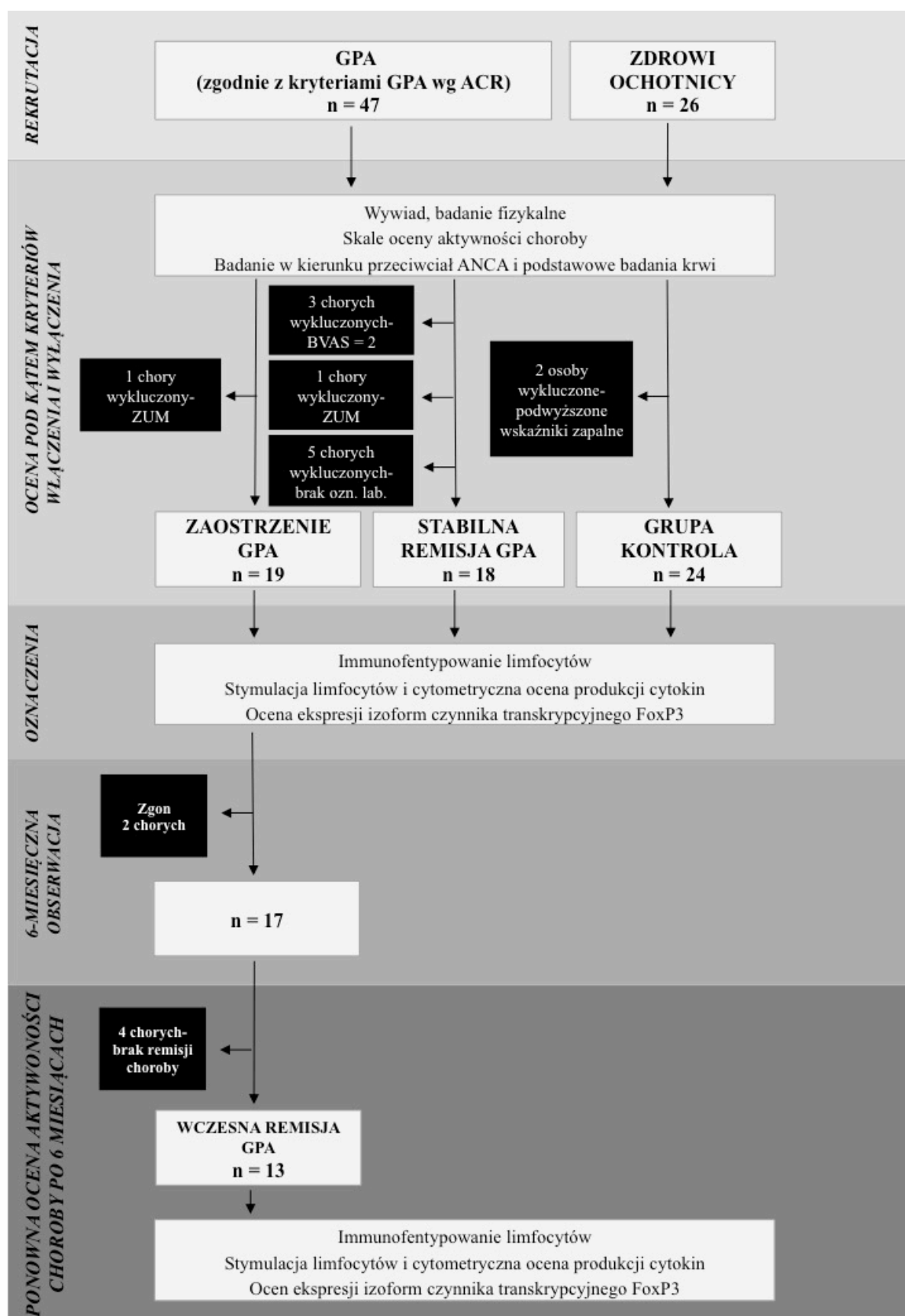
1. Zebranie podstawowych danych medycznych – ankieta osobowa, wywiad lekarski, badanie fizykalne, pomiar podstawowych parametrów życiowych, analiza dotychczasowego przebiegu choroby na podstawie dokumentacji medycznej,
2. Rutynowe badania laboratoryjne:
 - Pomiar parametrów stanu zapalnego we krwi obwodowej: stężenia białka C-reaktywnego w surowicy krwi metodą nefelometryczną oraz stężenia prokalcytoniny w surowicy krwi zautomatyzowaną metodą ELISA,
 - Morfologia krwi pełnej przy użyciu automatycznego analizatora hematologicznego Sysmex K-1000 (ICN, Japonia),
 - Stężenie sodu, potasu, glukozy, aminotransferazy alaninowej (AlAT), aminotransferazy asparaginianowej (AspAT), bilirubiny całkowitej, fosfatazy alkalicznej, dehydrogenazy mleczanowej (LDH), mocznika, kreatyniny przy użyciu analizatora Vitros 350 (Johnson & Johnson, USA); wyliczenie wskaźnika filtracji kłębuszkowej (eGFR) na podstawie oznaczenia stężenia kreatyniny z użyciem wzoru MDRD,
 - Oznaczenie wskaźników krzepnięcia (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), czas protrombinowy i wskaźnik INR (international normalized ratio) oraz stężenia fibrynogenu metodą nefelometryczną,
 - Badanie ogólne moczu z oceną osadu; obliczenie dobowej utraty białka z moczem na podstawie oznaczenia stężeń białka i kreatyniny w pojedynczej próbce moczu,
3. Badania obrazowe:
 - W przypadku zajęcia zatok obocznych nosa tomografia komputerowa zatok, oczodołów, piramid kości skroniowych i struktur ucha środkowego,
4. Badania immunologiczne:
 - Pomiar stężenia przeciwciał przeciw proteinazie 3 metodą ELISA,
 - Cytometryczna ocena subpopulacji limfocytów krwi obwodowej (opis procedury poniżej),
5. Izolacja oraz krioprezerwacja komórek PBMC.

Na podstawie wyżej wymienionych danych dokonywano oceny aktywności zapalenia naczyń z użyciem skali BVAS, SF-36, VDI, i FFS

II. Wizyty kontrolne:

1. Zebranie podstawowych danych medycznych – ankieta osobowa, wywiad lekarski, badanie fizykalne, pomiar podstawowych parametrów życiowych,
2. Ocena aktywności zapalenia naczyń z użyciem skali BVAS, SF-36, VDI,
3. Pomiar parametrów stanu zapalnego we krwi obwodowej:
 - Stężenie białka C-reaktywnego w surowicy krwi metodą nefelometryczną,
 - Stężenie prokalcytoniny w surowicy krwi zautomatyzowaną metodą ELISA.

Schemat badania oraz liczebność grup na poszczególnych jego etapach przedstawia Rycina 2.



Rycina 2. Schemat badania oraz liczebność grup na poszczególnych jego etapach

3.3 Oznaczenia laboratoryjne:

3.3.1 Cytometryczna ocena obrazu odsetkowego subpopulacji i fenotypu limfocytów na podstawie ekspresji antygenów różnicowania powierzchniowego i receptorów chemokinowych

Celem oznaczeń cytometrycznych było określenie odsetka i liczby subpopulacji limfocytów krwi (np. limfocytów T CD4+) oraz zróżnicowania fenotypowego limfocytów T CD4+.

Próbka 100ul krwi żyłnej pobranej do probówek z EDTA (BD Vacutainer, USA) była inkubowana w ciemności, w temperaturze 2-8°C przez 30 minut z przeciwciałami monoklonalnymi w zoptymalizowanej ilości i następujących układach (jeżeli nie zaznaczono inaczej wymienione odczynniki pochodziły z BD Biosciences, USA):

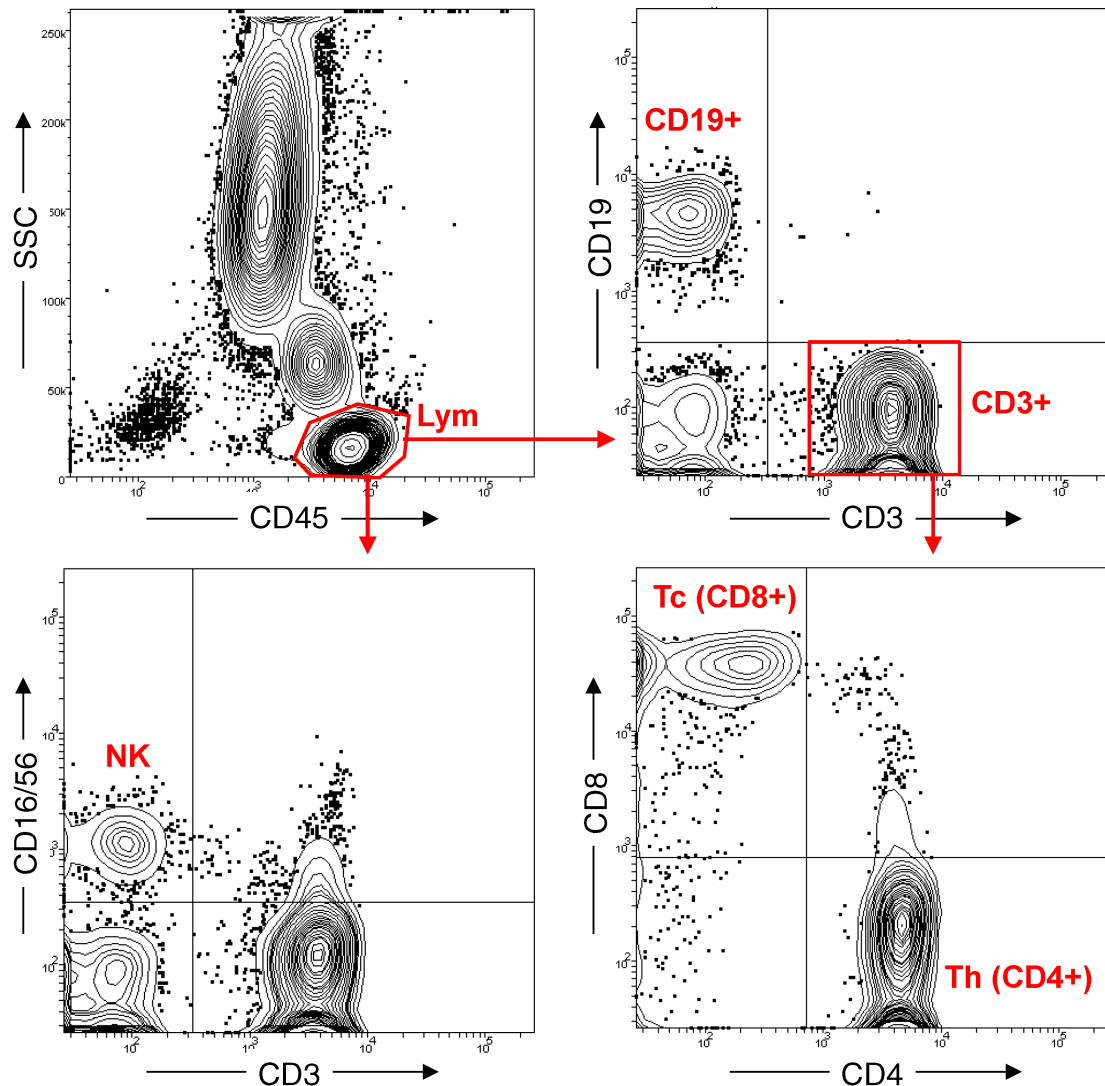
- 1) podstawowy fenotyp limfocytów: CD45-V450, CD3-FITC, CD16/56-PE, CD19-APC, CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-PE/Cy7
- 2) limfocyty T pamięci: CD3-V450, CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-PE/Cy7, CD45RA-FITC, CD45RO-PE, CCR7-AF647.
- 3) Ekspresja receptorów chemokinowych: CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-APC/Cy7 (Biolegend, USA), CD45RA-FITC, CXCR3-PE/Cy7, CCR4-AF647, CCR6-V450, CCR10-PE (R&D, USA). Po zakończeniu znakowania próbki poddano lizie erytrocytów i utrwalono 10 min za pomocą 1 mL odczynnika FLS (FACS Lysing Solution, BD Biosciences), następnie przepłukano w buforze fosforanowym (PBS – phosphate buffered saline) i zanalizowano w cytometrze przepływowym FACS Canto II przy ustalonych parametrach akwizycji. W trakcie analizy cytometrycznej rejestrowano ok. 20–30 tys. zdarzeń w regionie obejmującym limfocyty, a dalsza strategia bramkowania zależała od rodzaju wyznakowanych markerów błonowych. W pierwszej próbce zliczano limfocyty T CD3+ (z rozdziałem na CD4+ i CD8+), limfocyty B i komórki NK. Drugi układ pozwalał na identyfikację limfocytów T CD4+ i T CD8+ o fenotypie dziewiczym, T_{EM} (*effector memory*) i T_{CM} (*central memory*) i T_{EMRA}. W ostatniej próbce identyfikowano limfocyty pamięci T CD4+ o różnej ekspresji receptorów chemokinowych CXCR3, CCR4, CCR6, CCR10.

Identyfikacja komórek:

Limfocyty T CD3+

Limfocyty T pomocnicze (Li Th) CD4+

Limfocyty T cytotoksyczne (Li Tc) CD8+



Rycina 3. Identyfikacja podstawowych subpopulacji limfocytów krwi za pomocą cytometrii przepływowej. Próbkę krwi została zabarwiona znakowanymi przeciwciałami (V450-CD45, FITC-CD3, PE-CD16/CD56, APC-CD19, PerCP/Cy5.5-CD4 i PE/Cy.7-CD8) pozwalającymi na wyodrębnienie limfocytów T (CD3+), T(h)-pomocniczych (CD3+CD4+), T(c)-cytotoksycznych (CD3+CD8+), limfocytów B (CD19+) i komórek NK (CD3-CD16/56+).

Limfocyty dziewicze (naïve, Li naïve) CD45RA+CCR7+

Limfocyty centralne pamięci (central memory, Li CM) CD45RA-CCR7+

Limfocyty efektorowe pamięci (effector, Li T EM) CD45RA-CCR7-

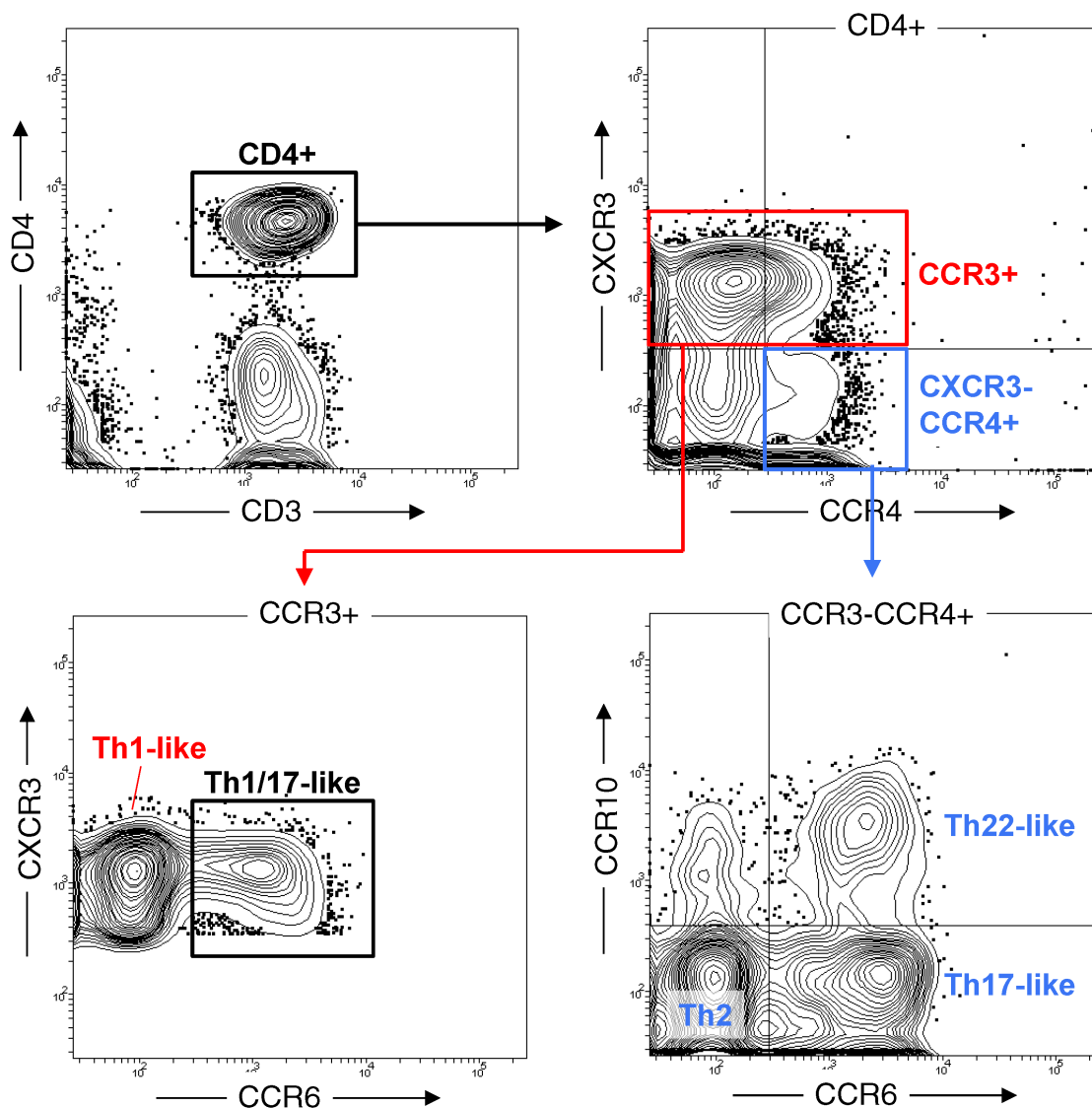
Limfocyty efektorowe pamięci RA (effector memory RA, T EMRA) CD45RA+CCR7-

Limfocyty Th1-like CXCR3+CCR4-CCR6-CCR10-

Limfocyty Th2-like CXCR3-CCR4+CCR6-CCR10-

Limfocyty Th22-like CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10+

Limfocyty Th17-like CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10- [211]



Rycina 4. Wykresy z cytometru przedstawiające metodykę analizy subpopulacji limfocytów pamięci T CD4+. Próbkę krwi została zabarwiona przeciwciałami wykrywającymi receptory CXCR3 (PE/Cy7-CXCR3), CCR4 (AlexaFluor647-CCR4), CCR6 (BV421-CCR6), CCR10 (PE-CCR10) i CD45RA (FITC-CD45RA [nie przedstawiono na wykresach]) pozwalającymi na identyfikację czynnościowych subpopulacji limfocytów pamięci (wszystkie CD45RA-) o określonym profilu ekspresji receptorów chemokinowych: typu-Th1 (Th1-like; CXCR3+CCR4-CCR6-), typu-Th1/17 (CXCR3+CCR4-CCR6+),

typu-Th2 (CXCR3-CCR4+CCR6-), typu-Th17 (CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10-) i typu-Th22 (CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10+).

3.3.2 Izolacja oraz zabezpieczenie komórek jednojądrzastych krwi (PBMC)

Komórki jednojądrzaste izolowano z krwi żyłnej heparynizowanej (Vacutainer) metodą wirowania w gradiencie gęstości. W tym celu próbki krwi (36 ml krwi rozcieńczonej w proporcji 2:1 buforem PBS) nawarstwiano na odczynnik Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, USA) w stosunku 2:1, a następnie odwirowano 30 min. (400g/T pok.) w celu oddzielenia 'kożuszka' PBMC (ang. *buffy coat*). Komórki PBMC przenoszono do nowej probówki 50 ml i przepłukano dwukrotnie w buforze PBS (wirowano 400g/10 min., następnie 200g/12 min.) w celu odpłukania płytek krwi. Komórki policzono w komorze Burkera, a następnie zawieszono w płynie do krioprezerwacji zawierającym pożywkę RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA), 30% surowicę płodową cielęcą (FCS – fetal calf serum, PAN-Biotech, Niemcy) i 10% DMSO (dimetylosulfotlenek, Sigma-Aldrich). Porcje komórek PBMC (po 10 mln) zamrożono i przechowywano w oparach ciekłego azotu (ok. -190°C) do dalszych analiz.

3.3.3 Cytometryczna ocena produkcji cytokin przez limfocyty T CD⁺ aktywowane *in vitro*

Komórki PBMC rozmrożono w 37°C i przepłukano w pożywce RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) z dodatkiem deoksyrybonukleazy I (50 µg/ml, Sigma-Aldrich). Komórki PBMC rozporcjowano po 2 mln do dwóch próbek polistyrenowych (kontrola i aktywacja), a następnie odpłukano w buforze PBS i zawieszono w pożywce kontrolnej (RPMI-1640, 10% FCS) lub w pożywce z dodatkiem z aktywatorów, tj.: estru mirystynianu forbolu (PMA, 50 ng/ml, Sigma-Aldrich, USA) i jonomycyny (0,7 µg/ml, Sigma-Aldrich, USA), z dodatkiem brefeldyny A (10 µg/ml, inhibitor transportu błonowego, Sigma-Aldrich). Komórki inkubowano 4,5 godziny w temperaturze 37°C, w celu uzyskania optymalnej produkcji cytokin. Po zakończonej stymulacji komórki odwirowano (500 g / 6 min), a następnie zabarwiono znakowanymi przeciwciałami wykrywającymi markery błonowe (CD4) i wewnątrzkomórkowe cytokiny. W pierwszym etapie PBMC znakowano

15 min za pomocą przeciwciał CD8-APC/Cy7 (BD Biosciences), CD4-PerCP/Cy5.5 i CD14-BV421 (BioLegend), następnie dodano 0,5 ml roztworu barwnika FVS450 (Fixable Viability Stain, BD Biosciences) w celu odróżnienia komórek żywych od apoptotycznych. Po 10 minutach barwienie zablokowano dodając do próbek 2 mL buforu PBS z surowicą (5% FCS) i odwirowano (500g/ 6 min.). W dalszym etapie próbki inkubowano przez 20 minut w odczynniku utrwalającym i permeabilizującym (FixPerm, BD Biosciences), a następnie przepłukano dwukrotnie w buforze permeabilizacyjnym (PermWash, BD Biosciences). Komórki zawieszono w niewielkiej ilości buforu i inkubowano przez 30 minut z przeciwciałami wykrywającymi cytokiny: IFN γ -FITC (BioLegend), IL-17A-PE (eBioscience, USA), IL-22-PE-Cy7 (eBioscience) i IL-4-AF467 (BioLegend). Zabarwione komórki podplukano w 2,5 ml buforu PermWash (500g / 6 min), zawieszono w 500 μ l PBS i zanalizowano w cytometrze.

Identyfikacja komórek:

Limfocyty Th1 IL-17A- IL-22- IFN γ + IL-4-

Limfocyty Th2 IL-17A- IL-22- IFN γ - IL-4+

Limfocyty Th22 IL-17A- IL-22+ IFN γ - IL-4-

Limfocyty Th17 IL-17A+ IL-22- IFN γ - IL-4-

3.3.4 Ocena ekspresji izoform czynnika transkrypcyjnego FoxP3

PBMC użyte do oznaczenia izoform FoxP3 przygotowywane były analogicznie do wcześniejszej procedury (rozrożenie i odplukanie komórek w pożywce z DNAzą, a później w buforze PBS), a następnie ~1 milion komórek zawieszono w niewielkiej ilości buforu zawierającego mieszaninę przeciwciał wykrywających antygeny powierzchniowe komórek T-regulatorowych: CD4-PerCP/Cy5.5 (BD Biosciences), CD127-PE/Cy7 (BioLegend, USA) i CD25-APC/Cy7 (BioLegend). Po 20 minutach barwienia do komórek dodano 0,5 ml roztworu barwnika żywotności (FVS450, BD Biosciences) i inkubowano kolejne 10 min. w ciemności. Barwienie blokowano dodając 2 ml buforu PBS z surowicą (5% FCS). Komórki odwirowano, utrwalono 10 min. w odczynniku FLS (BD Biosciences) i dodatkowo 10 min. w roztworze permeabilizacyjnym zawierającym 0,2% saponiny (Sigma-Aldrich). Po dwukrotnym przepłukaniu (w buforze PermWash) komórki zabarwiono przez 30 min dwoma dodatkowymi przeciwciałami wykrywającymi różne antygeny czynnika

transkrypcyjnego FoxP3: FITC- FoxP3 (klon PCh101, wykrywający domenę E1, eBioscience) i PE-FoxP3 (klon 150D wykrywający domenę E2, BioLegend). Próbki przepłukano w 2 ml buforu PermWash, zawieszono w 500 μ l PBS i zanalizowano w cytometrze przepływowym. Równoczesne barwienie domen E1 i E2 pozwala na identyfikację Komórek Treg z wyższą ekspresją izoformy Δ e2-FoxP3 z delecją domeny E2 (wysoki sygnał fluorescencji FITC dla E1, niski sygnał PE dla E2) [193].

Identyfikacja komórek:

Limfocyty T regulatorowe (Treg) CD25^{hi}CD127^{low} oraz CD4+FoxP3+

Limfocyty Treg z izoformą 2 czynnika transkrypcyjnego FoxP3 Δ E2-FoxP3+

3.4 Etyka

Projekt uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego: KBET/284/B/2012 z dnia 27.09.2012. Wszystkie osoby biorące w nim udział wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu.

3.5 Analiza statystyczna:

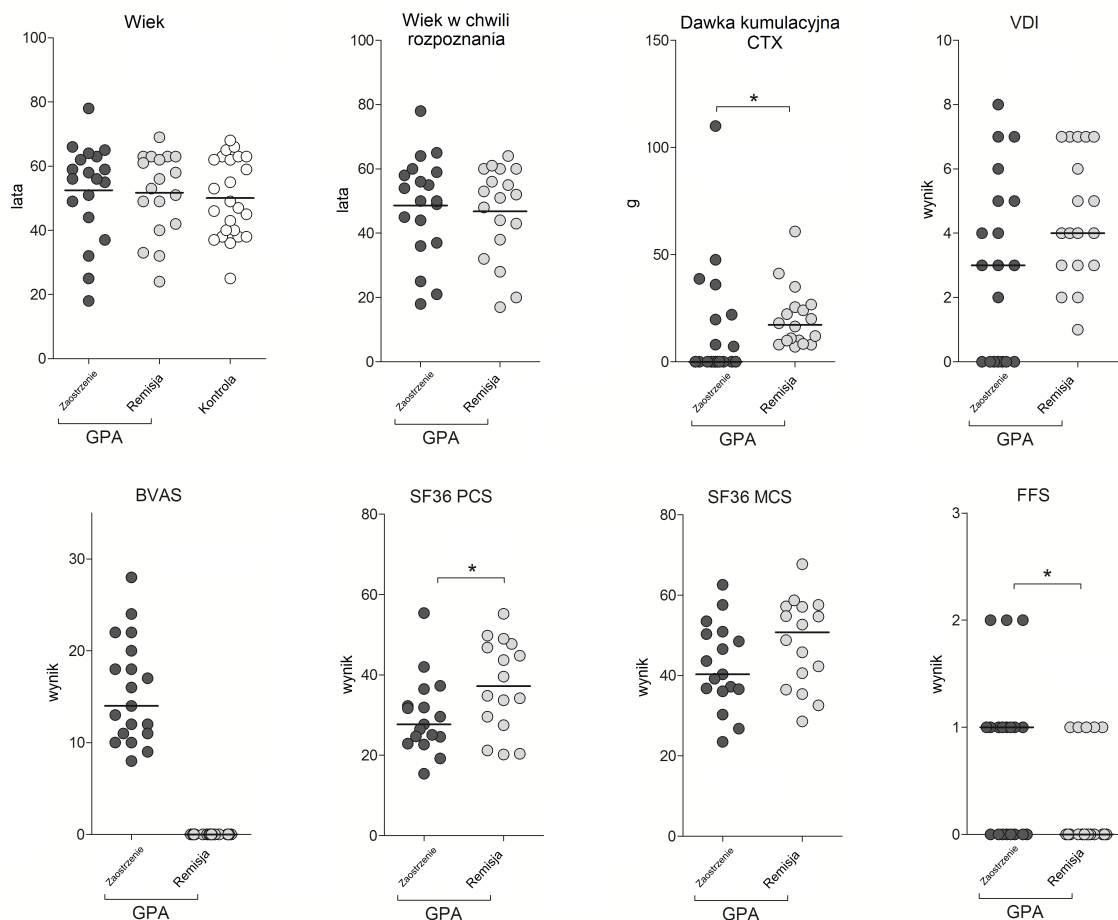
Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica™ 7.0 firmy StatSoft Inc, a wykresy wykonano w programie GraphPad Prism 5.0. Wyniki w tekście i tabelach były wyrażane w postaci mediany w przypadku zmiennych o rozkładzie innym niż normalny lub w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego w przypadku zmiennych o rozkładzie normalnym (wyznaczono za pomocą testu Shapiro-Wilka). Porównanie grup niezależnych dokonywane było z użyciem testu t-studenta i U-Manna Whitney'a dla zmiennych ciągłych oraz testu Fishera dla zmiennych nominalnych. Dla pomiarów powiązanych (grupa w zaostrzeniu oraz po wejściu w remisję) stosowano test Wilcoxa. Wpływ zmiennych na badane parametry analizowano z użyciem testu Pearsona oraz korelacji rang Spearmana, dobieranych w zależności od rozkładu zmiennych. Różnice między grupami przyjęto za statystycznie istotne przy $\alpha < 0,05$.

4. Wyniki

4.1 Charakterystyka badanych grup

Do badania zrekrutowano chorych posiadających udokumentowaną obecność przeciwciał ANCA w wywiadzie lub w chwili włączenia do badania.

Porównanie chorych z zaostrzeniem GPA i w trwałej remisji nie wykazało istotnych różnic pod względem wieku, czasu trwania choroby oraz wieku, w jakim rozpoznano GPA, proporcji kobiet i mężczyzn, stopnia uszkodzenia narządowego mierzonego w skali VDI oraz psychicznej składowej skali SF-36. Natomiast chorzy w trwałej remisji GPA różnili się od chorych w zaostrzeniu choroby pod względem dawki kumulacyjnej cyklofosfamid (wyższa) oraz większej wartości składowej fizycznej skali SF-36. (Ryc. 3, Tab. 1). Chorzy w zaostrzeniu z definicji manifestowali wyższą aktywność choroby mierzoną w skali BVAS i FFS (Ryc. 3, Tab. 1).



Rycina 3. Parametry kliniczne charakteryzujące poszczególne badane grupy

Wiek [lata] w grupach zaostrzenia i remisji GPA oraz grupie kontrolnej; wiek w chwili rozpoznania [lata], dawka kumulacyjna CTX [g], wynik w skali VDI, wynik w skali BVAS, wynik składowej fizycznej skali SF-36, wynik składowej psychicznej skali SF-36, wynik w skali FFS w grupach zaostrzenia i remisji GPA. Poziome linie reprezentują medianę. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ [test U Manna-Whitneya].

Skróty: CTX- cyklofosfamid, VDI- skala Vasculitis Damage Index, BVAS – skala Birmingham Vasculitis Activity Score, SF36 PCS- składowa fizyczna kwestionariusza SF36, SF36 MCS- składowa psychiczna kwestionariusza skali SF36, FFS – skala Five Factor Score, g- gramy, GPA – ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń.

Ocena zajęcia narządowego wykazała u chorych na GPA (n=37) objawy ze strony następujących układów i narządów: płuca (n=25, 68%), nerki (n=19, 51%), ucho/nos/gardło (n=23, 62%), stawy (n=23 62%), skóra/błony śluzowe (n=11, 30%) i układ nerwowy (n=10, 27%).

Spośród chorych zakwalifikowanych do grupy w aktywnej fazie zapalenia naczyń, u 10 (53%) GPA rozpoznano po raz pierwszy (pierwsze zaostrzenie), natomiast u pozostałych (n=9, 47%) było to kolejne zaostrzenie wcześniej rozpoznanej choroby. Mediana wartości BVAS w grupie z aktywnym GPA wynosiła 14 (IQR 11-19). U wszystkich chorych w tej grupie stwierdzono we krwi obecność przeciwciał przeciw proteinazie 3. Ich stężenie wykazywało dodatnią korelację z aktywnością choroby, mierzoną skalą BVAS (współczynnik korelacji Spearmana $\rho=0,48$; $p=0,037$).

U chorych w zaostrzeniu GPA materiał do badań laboratoryjnych pobrano przed rozpoczęciem leczenia indukującego remisję, a dawki stosowanych wówczas glikokortykosteroidów nie przekraczały 40mg prednizonu na dobę. U czterech chorych (21%) stosowano dodatkowe leki podtrzymujące remisję; trzech otrzymywało azatioprynę (50 lub 100 mg/d), jeden, metotreksat (20 mg/tydzień).

W grupie z nieaktywnym GPA 17/18 (94%) chorych otrzymywało leczenie podtrzymujące remisję, w tym 14/18 (78%) przyjmowało doustne glikokortykosteroidy w dawce nieprzekraczającej 10 mg (mediana 5 mg [IQR 3,175-5mg]), a 7/18 (39%) przyjmowało leki modyfikujące przebieg choroby (w dwóch przypadkach był to mykofenolan mofetylu, pięciu stosowało azatioprynę). Wszyscy chorzy w grupie stabilnej remisji GPA byli w przeszłości leczeni cyklofosfamidem.

Kliniczna i demograficzna charakterystyka badanych grup przedstawiona jest w tabeli 1, a profil zajęcia narządowego i schemat leczenia indukującego remisję chorych z zaostrzeniem zapalenia naczyń zaprezentowano w tabeli 2.

	Wszyscy GPA	Zaostrzenie GPA	Stabilna remisja GPA	Kontrola
Liczba chorych [n]	37	19	18	24
Wiek [lata]	52 ± 14	52 ± 15	52 ± 17	50 ± 12
Płeć [K:M]	22:15	13:6	9:9	13:11
Dzienna dawka GKS [mg]*	5 [0-10]	5 [0-20]	5 [3,175-5]	0
BVAS	8 [0-14]	14 [11-19]	0 [0-0]	n.d.
FFS	0 [0-1]	1 [0-1]	0 [0-0,75]	n.d.
SF36 PCS	31,9 [24.7-42]	27,7 [24.6-32,3]	37,4 [29.1-32.7]	n.d.
SF36 MCS	45.8 [36.6-54.7]	40.3 [36.6-50.3]	48.8 [39.6-41.9]	n.d.
VDI	4 [2-6]	3 [0-5]	4 [3-6,75]	n.d.
Wiek w chwili diagnozy [lata]	48 ± 15	49 ± 16	47 ± 14	n.d.
Postać choroby [uogólniona:ograniczona]	31:6	15:4	16:2	n.d.
Obecność ANCA [% chorych]	100	100	100	0
Czas trwania choroby [mies.]	36 [9-84]	9 [0-96]	48 [36-69]	n.d.
Liczba dotychczasowych zaostrzeń**	1 [0-2]	0 [0-1]	1 [1-2]	n.d.
CYC dawka kumulacyjna***	10 [0-24]	29 [17-39]	17 [10-25]	0

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna i kliniczna badanych grup

* w przeliczeniu na prednizon

** w grupie z aktywnym GPA zaostrzenia były wcześniej obserwowane u 9 chorych - w tej grupie mediana liczby zaostrzeń wynosiła 2 [1-3]; w grupie w stabilnej remisji GPA zaostrzenia były wcześniej obserwowane u 15 chorych – w tej grupie mediana liczby zaostrzeń wynosiła 1 [1-2]

** podana wartość dotyczy jedynie chorych otrzymujących wcześniej lek: w grupie z aktywnym GPA było to 8 chorych, w grupie stabilnej remisji wszyscy chorzy otrzymywali w przeszłości cyklofosfamid. Dla całej grupy w zaostrzeniu dawka kumulacyjna CYC wynosiła 0 [0-20,2] i była istotnie niższa niż wartość dla grupy w stabilnej remisji GPA.

L.p.	Manifestacja choroby						Aktywność choroby i leczenie w chwili włączenia do pobrania				Schemat leczenia**	Remisja po 6 msc.
	S	S/B	U/ N/ G	P	N	U N	anti-PR3 ELISA [RU/ml] (N<2RU/ ml)	BVAS	GKS dawka [mg/d]*	DMARD		
1	+	+	+	-	+	-	53.1	18	20	Brak	CTX	tak
2	-	-	-	+	+	+	200	22	0	Brak	CTX	tak
3	-	-	+	+	-	-	2.2	12	20	AZA 100mg/d	RTX	tak
4	+	+	+	+	-	-	73.2	14	0	Brak	CTX + RTX	tak
5	+	-	+	-	-	-	24.2	8	10	Brak	RTX	tak
6	+	+	-	-	+	+	82.4	12	0	AZA 100mg/d	CTX	tak
7	+	-	+	+	+	-	200	24	30	Brak	CTX+ RTX	tak
8	+	-	+	+	-	-	66	10	20	Brak	CTX	tak
9	+	+	-	+	+	-	>200	17	0	Brak	CTX	tak
10	-	-	-	+	+	-	>200	18	0	Brak	CTX	tak
11	-	-	+	-	+	-	9.3	9	3,75	Brak	RTX	tak
12	+	-	-	+	+	-	156	22	0	Brak	CTX	tak
13	+	-	+	-	-	-	63	16	20	Brak	MTX	tak
14	-	-	+	+	-	-	192.2	20	15	Brak	CTX+ RTX	Zgon
15	+	+	-	-	+	-	>200	10	5	AZA 50mg/d	CTX	nie
16	-	-	+	-	-	+	31.4	11	25	MTX 20mg/tyd z	RTX	nie
17	-	-	+	+	-	-	120	11	0	Brak	CTX	nie
18	+	+	+	+	-	-	53.8	13	0	Brak	CTX	nie
19	+	-	+	+	+	-	64	28	15	Brak	CTX	Zgon

Tabela 2. Charakterystyka kliniczna chorych z grupy w zaostrzeniu GPA

* w przeliczeniu na prednizon

** schemat leczenia indukującego remisję, w połączeniu z glikokortykosteroidami: 3 dożylne pulsy metyloprednizolonu a następnie prednizon w dawce 1mg/kg z następową redukcją

Skóty: L.p.- liczba porządkowa, S- stawy, S/B- skóra i błony śluzowe, U/N/G – ucho, nos, gardło, P – płuca, N – nerki, UN – układ nerwowy, anti-PR3 ELISA – przeciwciała przeciw proteinazie 3 oznaczane metodą ELISA, BVAS – skala Birmingham Vasculitis Activity Score, GKS – glikokortykosteroidy, mg – miligram, d – doba, DMARDS – leki modyfikujące przebieg choroby, msc. – miesiące, AZA – azatiopryna, MTX – metotreksat, CTX – cyklofosamid, RTX – rytuksymab.

4.2 Wyniki oznaczeń laboratoryjnych

W pierwszej kolejności porównywano wyniki oznaczeń cytometrycznych pomiędzy grupami w zaostrzeniu, w stabilnej remisji choroby, a grupą kontrolną. W drugim etapie analizowano zmiany tych parametrów w grupie chorych z aktywnym GPA porównując stan przed włączeniem leczenia immunosupresyjnego w stosunku do stanu po osiągnięciu remisji klinicznej.

A. Porównanie immunofenotypu limfocytów w grupie z zaostrzeniem GPA, w grupie stabilnej remisji i w grupie kontrolnej

Porównanie wartości odsetkowych limfocytów, limfocytów T, limfocytów T pomocniczych i limfocytów T cytotoksycznych

Analizę rozpoczęto od porównania między grupami liczebności leukocytów, limfocytów oraz podstawowych populacji komórek CD3+.

Ze wszystkich analizowanych grup, leukocytozę stwierdzono jedynie u chorych z aktywnym zapaleniem naczyń (średnia $10,8 \pm 4,08$ tys./ μ l). Bezwzględna liczba leukocytów pozostawała w normie dla grup w remisji oraz dla grupy kontrolnej, choć dla wszystkich chorych z GPA była ona istotnie wyższa (średnio w remisji 7,4 tys./ μ l, średnio dla kontroli 5,9 tys./ μ l, $p < 0,05$).

Nieznaczne obniżenie liczby limfocytów stwierdzono u chorych w stabilnej remisji GPA ($1235 \pm 660/\mu$ l). Wartość ta była znamienne niższa, aniżeli w grupie z zaostrzeniem ($1832 \pm 889/\mu$ l, $p=0,027$) i w grupie kontrolnej (1558 ± 324 , $p = 0,046$) (Ryc. 4A). W efekcie odsetek limfocytów był obniżony w całej grupie z GPA ($17,55 \pm 7,92\%$) w porównaniu do kontroli ($27,63 \pm 5,81\%$, $p < 0,01$) (Ryc. 4B).

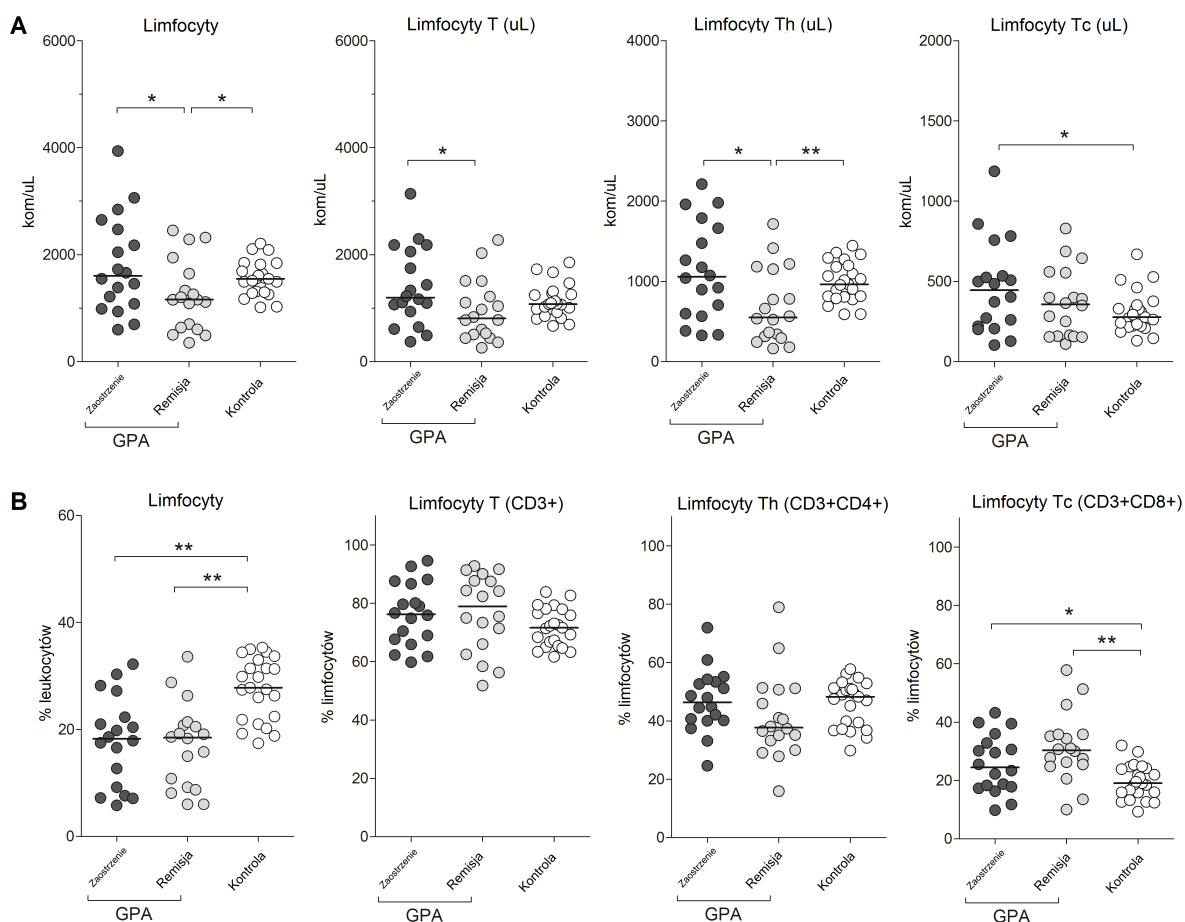
U chorych w stabilnej remisji GPA obserwowano obniżenie liczby limfocytów T (komórki CD3+, $954 \pm 572/\mu$ l) względem chorych w zaostrzeniu choroby ($1393 \pm 738/\mu$ l, $p < 0,05$) oraz liczby limfocytów Th (komórki CD3+CD4+, $690 \pm 464/\mu$ l) względem pozostałych grup (chorzy w zaostrzeniu $1131 \pm 603/\mu$ l, $p = 0,02$; grupa kontrolna $995 \pm$

247/ μ l, $p=0,01$). Wartości te nie przekładały się na różnice pomiędzy grupami w odsetku, jaki wśród wszystkich limfocytów stanowiły limfocyty T i komórki pomocnicze (Ryc. 4A).

Zarówno u chorych z zaostrzeniem GPA, jak i w trwałej remisji stwierdzono podwyższony odsetek limfocytów CD8+ ($25,7\pm 10\%$, $p=0,02$ i $31,3\pm 11,9\%$, $p<0,01$) względem grupy kontrolnej ($19,6\pm 5,8\%$), najwyższy stwierdzony był jednak u chorych pozostających w długotrwałej remisji (Ryc. 4B).

Stosunek komórek CD4+ do CD8+ nie różnił się pomiędzy chorymi w zaostrzeniu GPA i w trwałej remisji, ($2,26 \pm 1,4$ i $1,72 \pm 1,7$, $p = 0,37$), choć pozostawał obniżony w grupie bez cech aktywności choroby względem grupy kontrolnej ($2,62 \pm 1,1$, $p = 0,04$).

Wyniki te wskazują na brak istotnych zaburzeń w liczbie limfocytów, komórek T i T pomocniczych w ostrej fazie GPA. Tendencja do limfopenii oraz obniżania liczby limfocytów pomocniczych pojawia się dopiero wraz z wchodzeniem w fazę stabilnej remisji. Warto jednak zauważyć, że wobec obecnej często u chorych z GPA leukocytozy, odsetek limfocytów wśród wszystkich białych krwinek jest obniżony u wszystkich chorych z zapaleniem naczyń. Zatem supresja linii limfocytarnej nie jest jedynie wynikiem stosowanego leczenia immunosupresyjnego.



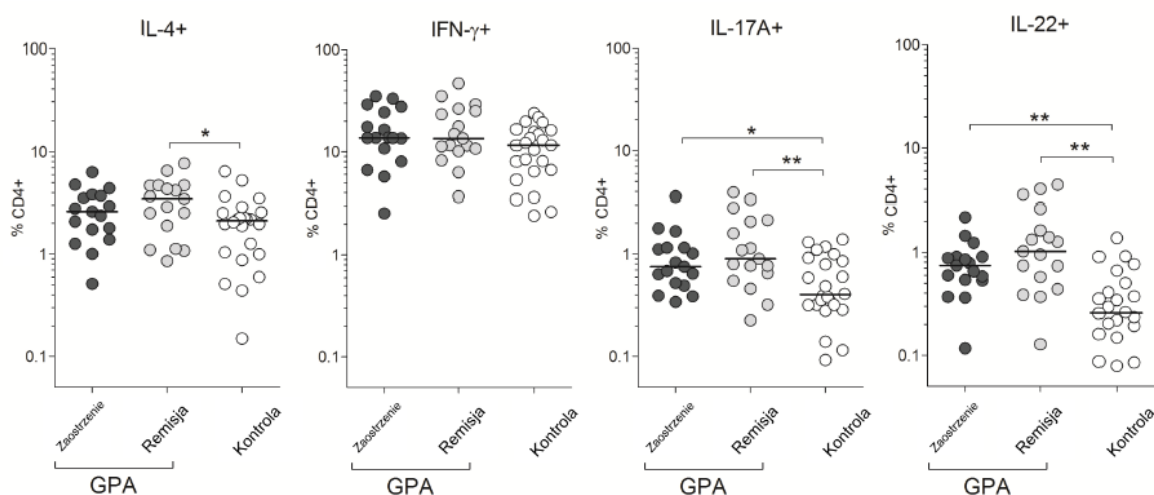
Rycina 4. Zmiany liczby i wartości odsetkowych limfocytów u chorych z GPA i w grupie kontrolnej.

Wartości bezwzględne (liczba komórek/ μ L) (A) oraz odsetek (B) limfocytów, limfocytów T, limfocytów pomocniczych (Th) i limfocytów cytotoksycznych (Tc) w badanych grupach. Poziome linie reprezentują średnią. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ (test t Studenta).

Porównanie wartości odsetkowych limfocytów produkujących poszczególne interleukiny oraz limfocytów pomocniczych (Th1, Th2, Th17, Th22)

W dalszej części porównano obraz odsetkowy limfocytów produkujących: $\text{IFN}\gamma$, IL-4, IL-22 i IL-17. Odsetek komórek $\text{IFN}\gamma^+$ nie różnił się pomiędzy chorymi w zaostrzeniu GPA, w stabilnej remisji i w grupie kontrolnej. Grupa w stabilnej remisji zapalenia naczyń różniła się jednak od grupy kontrolnej podwyższonym odsetkiem komórek produkujących IL-4 (mediana 3,41% [1,89-4,49%], $p = 0,024$) Wyższy odsetek komórek produkujących IL-17A względem grupy kontrolnej (mediana 0,58% [0,39-0,87%]) obserwowano zarówno w zaostrzeniu GPA (mediana 0,75% [0,52-1,15%], $p=0,03$), jak i w stabilnej remisji (mediana 0,90% [0,65-2,07%]). Wzrost względem grupy kontrolnej (mediana 0,26% [0,16-

0,43%]) obserwowano również w odsetku komórek IL-22+ w zaostrzeniu (mediana 0,74% [0,54-0,90%]) oraz remisji zapalenia naczyń (mediana 1,01% [0,57-1,62%]). Nie zaobserwowano jednak różnicy w odsetku komórek IL-17A+ i IL-22+ między chorymi w zaostrzeniu i stabilnej remisji choroby ($p = 0,26$, $p = 0,05$) (Ryc. 5).



Rycina 5. Limfocyty pomocnicze produkujące poszczególne interleukiny w grupach chorych GPA oraz grupie kontrolnej.

Odsetek limfocytów T CD4+ produkujących IL-4, IFN-γ, IL-17A i IL-22 w grupach: z zaostrzeniem GPA, w stabilnej remisji GPA oraz w grupie kontrolnej. Wartości na osi pionowej wyrażone są na skali logarytmicznej. Poziome linie reprezentują medianę. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ [test U Manna-Whitneya].

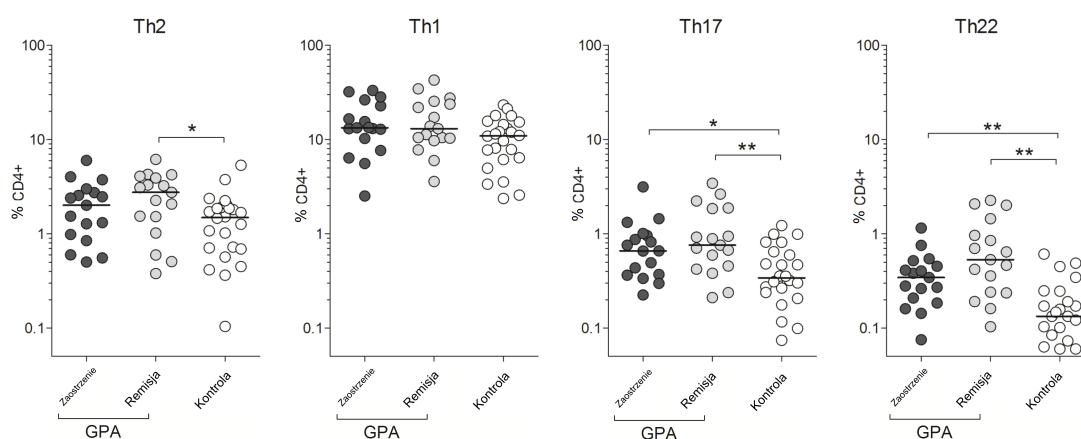
Na podstawie produkcji cytokin dokonano następnie identyfikacji subpopulacji limfocytów pomocniczych (podział czynnościowy). Procent jaki wśród wszystkich komórek CD4+ stanowiły poszczególne subpopulacje porównano między grupami chorych.

Pomiędzy chorymi w zaostrzeniu GPA i w stabilnej remisji choroby nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetkach: limfocytów Th1 (komórki IL-17A- IL-22- IFNγ+ IL-4-), Th2 (IL-17A- IL-22- IFNγ- IL-4+), Th22 (IL-17A- IL-22+ IFNγ- IL-4-) i Th17 (IL-17A+ IL-22- IFNγ- IL-4-). (Ryc. 6)

Najwyższy odsetek limfocytów Th17 stwierdzono w grupie chorych w stabilnej remisji GPA (mediana 0,76% [0,45-1,85%]), a dalej w kolejności w zaostrzeniu choroby (mediana 0,66% [0,37-0,96%]) względem grupy kontrolnej (mediana 0,45% [0,31-0,61%]). Analogicznie, zarówno w zaostrzeniu GPA, jak i w remisji obserwowano wyższy niż w

grupie kontrolnej odsetek limfocytów Th22 (mediana odpowiednio: 0,34% [0,21-0,45%], $p < 0,01$; 0,53% [0,24-0,96%], $p < 0,01$; w stosunku do 0,18% [0,15-0,20%]) i pozostawał on najwyższy w grupie z nieaktywnym GPA (Ryc. 6).

Grupa chorych w stabilnej remisji wyróżniała się wyższym niż grupa kontrolna odsetkiem komórek Th2 (mediana odpowiednio 2,75% [1,52-3,91 %] i 1,54% [1,15-1,87]). Odsetek komórek o funkcji Th1 nie różnił się pomiędzy grupami (Ryc. 6).

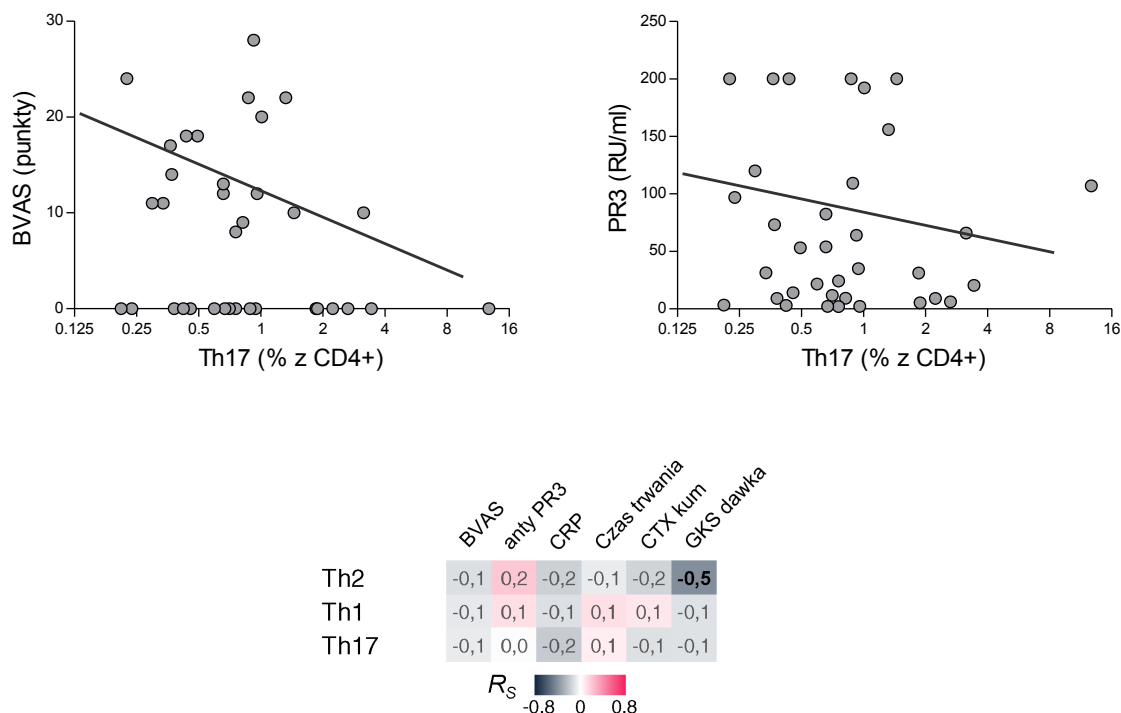


Rycina 6. Podklasy limfocytów pomocniczych w grupach chorych GPA oraz grupie kontrolnej.

Odsetek limfocytów T CD4+ identyfikowanych na podstawie produkcji cytokin (IL-4, IFN- γ , IL-17A i IL-22) w grupach: z zaostrzeniem GPA, w stabilnej remisji GPA oraz w grupie kontrolnej. Wartości na osi pionowej wyrażone są na skali logarytmicznej. Poziome linie reprezentują medianę. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ [test U Manna-Whitneya].

Nie zaobserwowano znamiennych różnic w wartościach odsetkowych komórek Th1, Th2, Th17 i Th22 pomiędzy grupami chorych z ograniczoną i uogólnioną postacią zapalenia naczyń.

Nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy parametrami klinicznymi, takimi jak stopień aktywności choroby (BVAS), stężenie CRP, stężenie przeciwciał przeciw proteinazie 3, czy czas trwania choroby, a odsetkami poszczególnych podklas limfocytów pomocniczych (Ryc. 7).



Rycina 7. Wykresy zależności odsetka limfocytów Th17 (% komórek CD4+) od wyniku w skali BVAS i stężenia przeciwciał anti-PR3 (RU/ml) oraz współczynniki korelacji Spearmana (R_s) między parametrami klinicznymi a odsetkiem poszczególnych podklas limfocytów pomocniczych (klasyfikacja na podstawie produkcji cytokin). Wartości na osiach poziomych są wyrażone na skali logarytmicznej.

Celem potwierdzenia wyników oznaczeń cytometrycznych na podstawie produkcji cytokin przeprowadzono analizę fenotypu limfocytów na podstawie ekspresji receptorów chemokinowych. Receptory te warunkują zdolność migracji komórek do tkanek obwodowych. Limfocyty o określonej ekspresji tych cząsteczek odpowiadają poszczególnym typom czynnościowym komórek pomocniczych w testach *in vitro*.

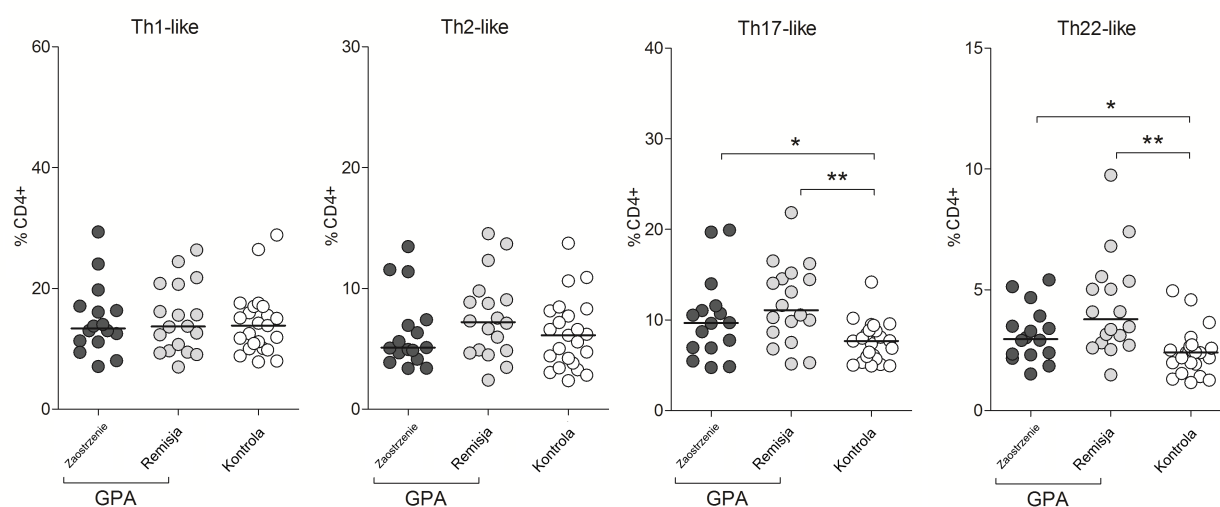
Komórki o profilu CXCR3+CCR4-CCR6-CCR10- odpowiadają limfocytom Th1 (stąd nazwa Th1-like).

Komórki o profilu CXCR3-CCR4+CCR6-CCR10- odpowiadają limfocytom Th2 (Th2-like).

Komórki o profilu CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10+ odpowiadają Th22 (Th22-like).

Komórki o profilu CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10- odpowiadają Th17 (Th17-like).

Nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami w odsetku komórek Th1-like oraz Th2-like. Potwierdzono wyższy odsetek komórki Th17-like i Th22-like pozostawały podwyższone w całej grupie GPA (bez różnicy pomiędzy chorymi w aktywnej i w nieaktywnej fazie choroby) osiągając najwyższy odsetek w grupie stabilnej remisji (odsetek komórek Th17-like $11,75\% \pm 4,38\%$; $p < 0,01$ względem grupy kontrolnej, odsetek komórek Th22-like w grupie remisji $4,35\% \pm 2,06\%$, $p < 0,01$ względem grupy kontrolnej) (Ryc. 8).



Rycina 8. Analiza ekspresji receptorów chemokinowych na powierzchni limfocytów pomocniczych.

Odsetek limfocytów T CD4+ o typie: Th1-like (CXCR3+CCR4-CCR6-CCR10-), Th2-like (CXCR3-CCR4+CCR6-CCR10-), Th17-like (CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10-) i Th22-like (CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10+) w grupach chorych z GPA oraz w grupie kontrolnej. Poziome linie reprezentują średnią. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ [test t-studenta].

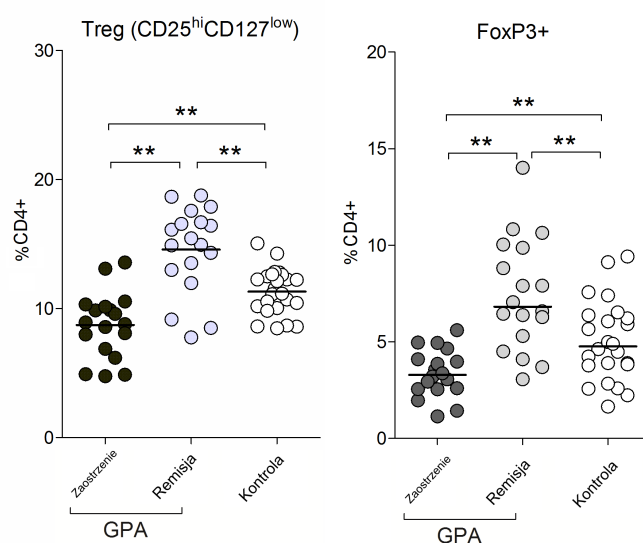
Porównanie odsetków limfocytów T regulatorowych

Limfocyty T regulatorowe identyfikowane były jako komórki o wysokiej ekspresji cząsteczki CD25 i niskiej CD127. Odsetek jaki wśród wszystkich limfocytów CD4+ stanowią komórki o tym fenotypie porównano między grupami w zaostrzeniu GPA, w stabilnej remisji choroby oraz grupie kontrolnej. W drugim etapie przeprowadzono

dodatkową analizę, porównując między tymi grupami odsetek komórek wykazujących ekspresję czynnika transkrypcyjnego FOXP3.

Najwyższy odsetek komórek $CD25^{hi}CD127^{low}$ obserwowano w stabilnej remisji GPA ($14,57\% \pm 3,36\%$) i był on istotnie podwyższony względem grup z zaostrzeniem GPA ($8,73\% \pm 1,54\%$, $p < 0,01$) i grupy kontrolnej ($11,32\% \pm 1,77\%$, $p < 0,01$). Pomędzy grupami w zaostrzeniu zapalenia naczyń, a grupą kontrolną również stwierdzono istotną różnicę w odsetku limfocytów Treg ($p < 0,01$).

Analogiczne różnice pomiędzy badanymi grupami zaobserwowano w odsetku komórek wykazujących ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Najniższy odsetek tych komórek obserwowano w zaostrzeniu GPA ($3,41\% \pm 1,25\%$) i różnił się istotnie od wyników w grupie kontrolnej ($5,03\% \pm 2,07\%$). Z kolei najwyższy odsetek limfocytów FOXP3+ stwierdzono w stabilnej remisji GPA ($7,41\% \pm 2,89\%$, $p < 0,01$ względem grupy kontrolnej) (Ryc.9).

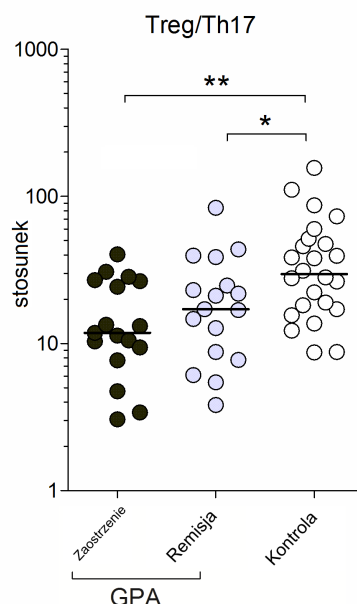


Rycina 9. Odsetek komórek Treg oraz komórek FoxP3+ u chorych na GPA.

(A) Odsetek komórek CD4⁺ posiadających markery powierzchniowe komórek regulatorowych ($CD25^{hi}CD127^{low}$) oraz (B) Odsetek limfocytów CD4⁺ wykazujących ekspresję FoxP3+
Poziome linie reprezentują średnią. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ [test t-studenta].

Proporcja liczby limfocytów T regulatorowych do liczby limfocytów Th17 była w efekcie obniżona w obydwóch grupach GPA (grupa w zaostrzeniu mediana 11,81 [9,41-

26,54], grupa w remisji mediana 17,09 [8,75-24,81]) względem grupy kontrolnej (mediana 29,65 [17,94-48,46], $p < 0,01$ względem grupy w zaostrzeniu GPA, $p = 0,026$ względem grupy w remisji GPA), bez różnic między chorymi w zaostrzeniu i stabilnej remisji choroby (Ryc. 10).

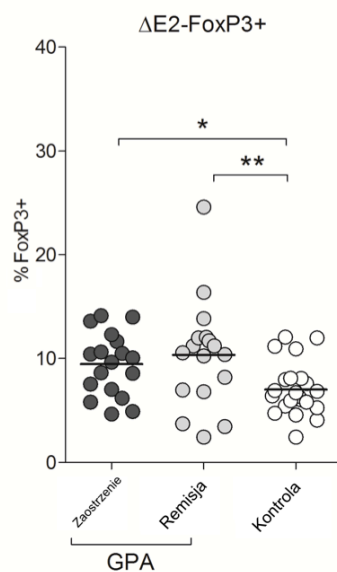


Rycina 10. Stosunek liczby limfocytów Treg do limfocytów Th17 u chorych na GPA.

Poziome linie reprezentują medianę. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ [test U Manna Whitneya]

Celem oceny potencjału supresyjnego limfocytów T-regulatorowych dokonano analizy odsetka komórek posiadających izoformę czynnika transkrypcyjnego FoxP3 pozbawioną egzonu 2 (komórki $\Delta e2$ -FoxP3+).

Wyższy odsetek komórek $\Delta e2$ -FoxP3+ względem zdrowej kontroli obserwowany był w całej grupie GPA (grupa w zaostrzeniu GPA średnia $9,51 \pm 3,1\%$ komórek Treg; grupa w stabilnej remisji GPA $10,34 \pm 5,26\%$ komórek Treg; zdrowa kontrola $7,02 \pm 2,50\%$ komórek Treg). Nie stwierdzono różnicy między grupami w zaostrzeniu i remisji choroby (Ryc. 11).

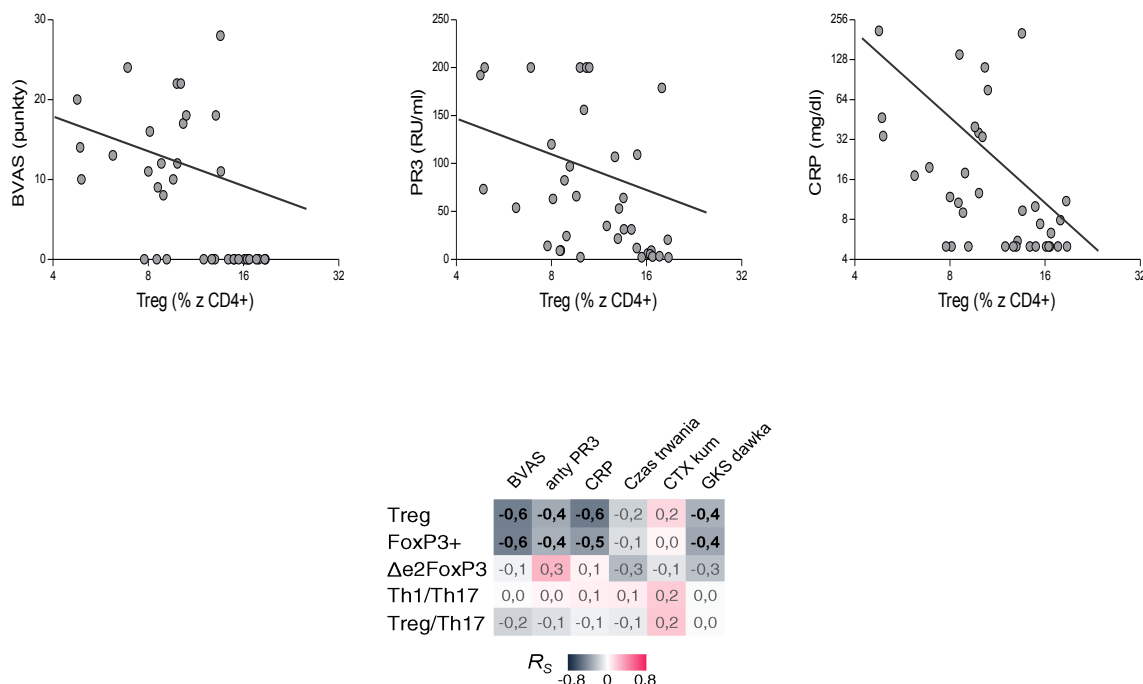


Rycina 11. Odsetek komórek FoxP3+ z izoformą ΔE2 czynnika transkrypcyjnego FoxP3 (ΔE2-FoxP3+) u chorych na GPA.

Poziome linie reprezentują średnie. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (test t-studenta).

Wykazano silną ujemną korelację pomiędzy odsetkiem komórek identyfikowanych jako Treg (zarówno $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low}$, jak i $CD4^+ FoxP3^+$), a wynikiem w skali BVAS oraz stężeniem CRP. Nie stwierdzono zależności pomiędzy odsetkiem komórek z defektywnym wariantem czynnika FoxP3, ani proporcją limfocytów Treg i Th17, a parametrami klinicznymi (Ryc. 12).

Wyniki te wskazują nie tylko na udział limfocytów Treg w patomechanizmie GPA, ale również na fakt, iż zmiana odsetka tych komórek (na korzyść m.in. limfocytów Th17) towarzyszy zmianie aktywności choroby (której wykładnikiem jest skala BVAS czy stężenie białka C-reaktywnego).



Rycina 12. Wykresy zależności odsetka komórek Treg (% CD4+) od wyniku w skali BVAS, stężeniem przeciwciał przeciw proteinazie 3 i stężeniem CRP oraz współczynniki korelacji Spearmana (R_s) pomiędzy parametrami klinicznymi a odsetkiem limfocytów T regulatorowych (identyfikowanych jako CD25^{hi}CD127^{low}), odsetkiem komórek FoxP3+, odsetkiem komórek z wariantem 2 czynnika FoxP3 oraz proporcją komórek Treg do Th17. Wartości na osi pionowej wykresu zależności odsetka komórek Treg od stężenia CRP są wyrażone na skali logarytmicznej.

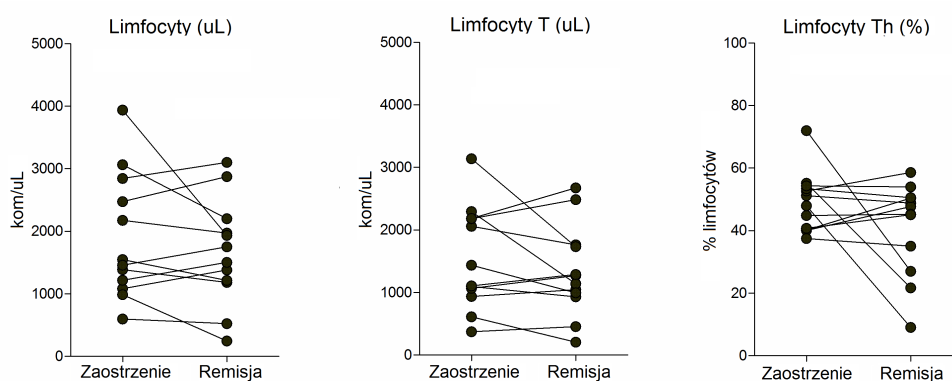
B. Porównanie immunofenotypu limfocytów w grupie z zaostrzeniem GPA przed i po leczeniu immunosupresyjnym (wczesna remisja)

Celem oceny zmian proporcji poszczególnych komórek w okresie wchodzenia we wczesną remisję, ponownej analizy cytometrycznej (parametry analogiczne do przedstawionych powyżej) dokonano u chorych, którzy zostali zrekrutowani do badania w fazie zaostrzenia, po 6 miesiącach leczenia immunosupresyjnego. Istnieje bowiem podejrzenie, że osiągnięcie remisji klinicznej (w postaci BVAS 0) nie równa się osiągnięciu „równowagi” w układzie immunologicznym, a stabilizacja taka jest możliwa dopiero wiele miesięcy po zakończeniu leczenia indukującego.

U 14 chorych zakwalifikowanych do grupy w zaostrzeniu GPA celem indukcji remisji zastosowano cyklofosamid, u czterech chorych rytuksymab, u jednego, z uwagi na ograniczoną postać choroby, możliwe było zastosowanie metotreksatu. U trzech chorych

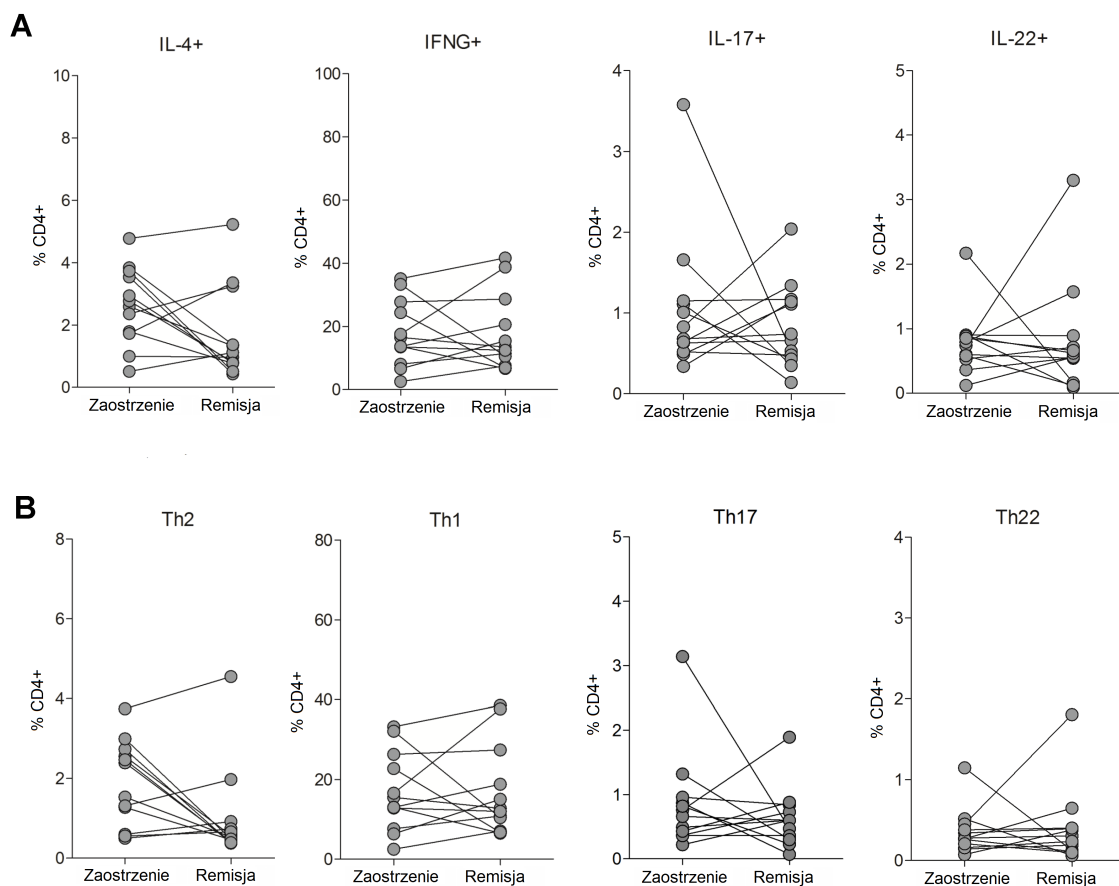
otrzymujących cyklofosfamid konieczna była zmiana leku na rytuksymab w związku z utrzymywaniem się cech aktywności choroby, pomimo wstępnego leczenia immunosupresyjnego. Podczas sześciomiesięcznej obserwacji zmarło dwóch chorych – jeden z powodu zatorowości płucnej, drugi w wyniku powikłań septycznych. Poza tym nie stwierdzono istotnych zdarzeń niepożądanych. Po pół roku u chorych dokonywano ponownie oceny klinicznej. U trzymaściorga chorych stwierdzono remisję zapalenia naczyń (BVAS=0), u czterech obecne były cechy niewielkiej aktywności choroby (BVAS 2-4). Zaobserwowany względem pierwszej wizyty wzrost mediany wskaźnika VDI z 3 [0-6] do 4 [2-6], mediany składowej fizycznej - z 31,7 [25,5-34,4] do 42 [37,5-50,1] oraz składowej psychicznej kwestionariusza SF-36 z 37,2 [33,4-52,2] do 47 [37,1-55,3] nie był istotny statystycznie. Doszło natomiast do istotnego spadku poziomu przeciwciał przeciw proteinazie 3 (z 66 [38,6-119,2] RU/ml do 29,9 [6,5-13,2] RU/ml).

Po 6 miesiącach leczenia indukującego remisję u chorych nie zmieniła się liczba limfocytów, odsetek limfocytów T ani T pomocniczych (Ryc. 13).



Rycina 13. Liczba limfocytów, limfocytów T i odsetek (% komórek CD4+) limfocytów T pomocniczych u chorych na GPA przed i w 6 mies. po leczeniu indukującym remisję.

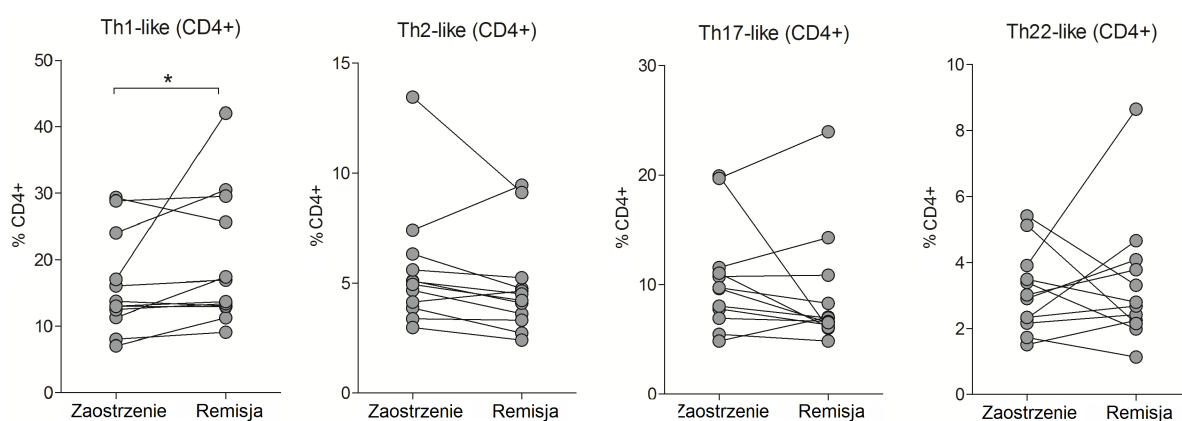
Odsetek komórek produkujących IL-4, IFN γ , IL-17A i IL-22 oraz limfocytów identyfikowanych jako Th1, Th2, Th17 i Th22 na podstawie profilu wydzielanych cytokin również nie uległ zmianie (Ryc. 14).



Rycina 14. Obraz odsetkowy limfocytów u chorych na GPA przed i w 6 mies. po leczeniu indukującym remisję

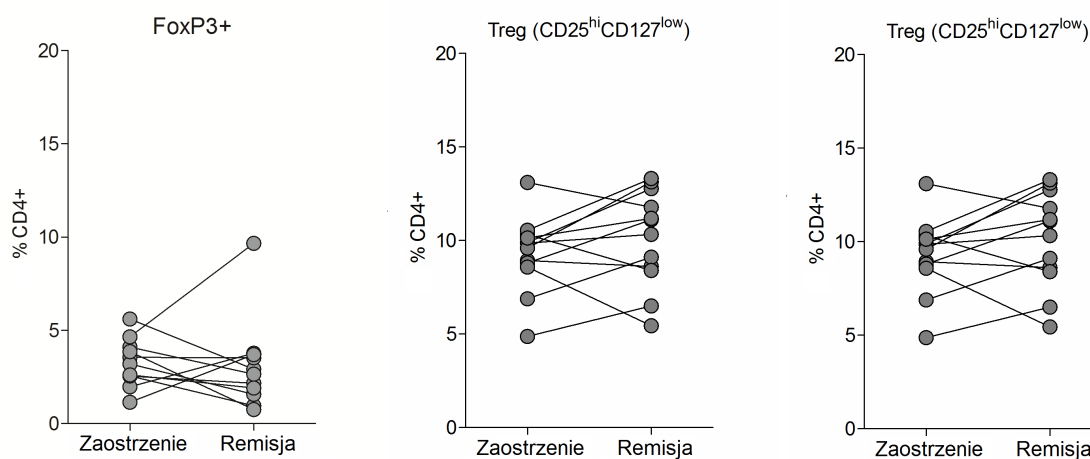
(A) odsetek (% komórek CD4+) produkujących IL-4, IFN- γ , IL-17A i IL-22 (B) odsetek (% komórek CD4+) identyfikowanych na podstawie produkcji cytokin jako Th2, Th1, Th17 i Th22.

Wczesna remisja GPA nie wiązała się także ze zmianą odsetka komórek Th1-like, Th2-like, Th17-like i Th22-like identyfikowanych na podstawie ekspresji receptorów chemokinowych względem zaostrzenia zapalenia naczyń (Ryc. 15).



Rycina 15. Odsetek limfocytów pamięci identyfikowanych jako Th1-like, Th2-like, Th17-like i Th22-like na podstawie ekspresji receptorów chemokinowych u chorych na GPA przed i po 6 mies. leczenia indukującego remisję.

Podobnie nie było różnic w odsetku limfocytów T regulatorowych ($CD25^{hi}CD127^{low}$), komórek FoxP3+ ani stosunku limfocytów T regulatorowych do limfocytów Th17 (Ryc. 16).



Rycina 16. Odsetek (% komórek CD4+) komórek wykazujących ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3, odsetek (% komórek CD4+) limfocytów Treg identyfikowanych jako $CD25^{hi}CD127^{low}$, stosunek limfocytów Treg do Th17 u chorych na GPA przed i po 6 mies. leczenia indukującego remisję

Dyskusja

Zasadniczym celem badania była ocena profilu immunofenotypowego limfocytów krwi obwodowej chorych z ziarniniakowatością z zapaleniem naczyń. Jednym z wielu problemów klinicznych, dotyczących tej rzadkiej choroby i stanów jej pokrewnych jest poszukiwanie markerów aktywności zapalenia naczyń i oceny skutków leczenia, a w perspektywie opracowania optymalnych metod leczenia, zapobiegających uszkodzeniom narządowym i w efekcie poprawiających rokowanie. Aktualnie dostępne oznaczenia laboratoryjne, zarówno biochemiczne (jak np. stężenie CRP czy prokalcytoniny) jak i immunologiczne (stężenie przeciwciał anti-PR3) ze względu na brak swoistości nie mogą stanowić podstawy do szybkiego podjęcia decyzji terapeutycznych w sytuacji wątpliwości co do przyczyn nasilenia objawów chorobowych. Wobec licznych doniesień sugerujących udział mechanizmów komórkowych w rozwoju AAV [212], podjęto próbę wskazania wśród poszczególnych subpopulacji limfocytów CD4+ takich zmian, które mogłyby być stosowane w praktyce klinicznej jako markery zaostrzenia GPA. W tym celu porównano immunofenotyp limfocytów krwi obwodowej u chorych w zaostrzeniu GPA, jego remisji oraz osób zdrowych. Obserwowano także chorych z aktywnym GPA w ciągu pierwszych sześciu miesięcy leczenia indukującego remisję (wczesna remisja).

Analizowane grupy nie różniły się istotnie pod względem parametrów demograficznych. Grupy pozostawały spójne również pod względem oceny uszkodzenia narządowego, co pozwala na wykluczenie jego wpływu na kliniczną ocenę aktywności choroby. Ciekawe, że grupy w zaostrzeniu GPA i stabilnej remisji nie różniły się pod względem psychicznej komponenty skali SF-36. Zatem narzędzie to nie odzwierciedla aktywności zapalenia naczyń. Kwestionariusz ten – o ogólnym z założenia charakterze - nie jest zapewne dla zapalenia naczyń wystarczająco czuły. Potwierdza to również brak korelacji zarówno MCS-SF36, jak i PCS-SF36 z aktywnością choroby ocenianą skalą BVAS. Skala SF-36 ma zatem u chorych z GPA jedynie wartość pomocniczą.

Podstawą oceny aktywności klinicznej GPA był wynik skali BVAS. Ciekawą obserwacją w powyższym badaniu była stosunkowo wysoka korelacja wyniku oznaczenia stężenia przeciwciał przeciw proteinazie 3 oraz wyniku w skali BVAS ($\rho = 0,48$). Wpisuje się ona w toczącą się obecnie dyskusję o roli wzrostu poziomu przeciwciał przeciwko PR3, jako możliwego markera w przewidywaniu klinicznego nawrotu, a więc zwiększenia aktywności choroby.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają istotną rolę odpowiedzi T-komórkowej w etiopatogenezie GPA [213]. Wskazuje na nią m.in. liczebność całej populacji limfocytów. Limfopenia (względna, ale i bezwzględna) obserwowana w całej grupie GPA, należy do typowych zjawisk w chorobach z autoagresji. Ich patogeneza jest złożona. Może się wiązać m.in. z rekrutacją limfocytów do zajętych chorobowo tkanek oraz być skutkiem leczenia immunosupresyjnego [71, 214]. Drugą z hipotez wspiera fakt, że znaczącą bezwzględną limfopenię obserwowano w stabilnej remisji GPA, cechującej się zarówno wyższą kumulacyjną dawką cyklofosfamidu, jak i stosowaniem innych leków immunosupresyjnych. W kontekście podwyższonego ryzyka infekcji warto zwrócić również uwagę, że u 33% chorych w tej grupie liczba limfocytów nie przekraczała 800 kom/μl, a u 17% chorych mieściła się w przedziale 300-500 kom/μl.

Obraz obsetkowy podstawowych populacji limfocytów również różnił się od tego obserwowanego w grupie kontrolnej. W spójności z dotychczasowymi doniesieniami obserwowaliśmy tendencję do przesunięcia równowagi pomiędzy limfocytami pomocniczymi i cytotoksycznymi wraz z czasem trwania choroby [72]. Obniżona liczba komórek CD4⁺ występowała przede wszystkim w fazie długotrwałej remisji, co skutkowało obniżeniem stosunku CD4/CD8. Jednak w odróżnieniu od innych doniesień nie obserwowaliśmy tego zjawiska u osób z zaostrzeniem GPA [74]. Nie obserwowaliśmy także obniżenia odsetka wszystkich limfocytów pomocniczych, bez względu na aktywność choroby [71]. Porównywanie wyników dotychczasowych badań dotyczących liczebności podstawowych grup limfocytów z wynikami niniejszych badań jest utrudnione ze względu na znaczne różnice badanych przez różnych autorów grup chorych. Na tę niejednorodność składała się przede wszystkim sumaryczna analiza chorych z pokrewnymi rozpoznaniem (MPA oraz GPA) [71, 73], analiza chorych z różną obecnością przeciwciał, tj. również bez obecności przeciwciał ANCA [71], czy wreszcie brak jasnych kryteriów zaostrzenia i remisji choroby, lub ich ujmowanie łącznie [72, 74].

Wbrew dotychczasowym doniesieniom [113, 114], nie obserwowano także różnicy w odsetkach limfocytów produkujących IFN γ , ani w odsetku komórek Th1 między grupami GPA a grupą kontrolną, ocenianych zarówno funkcjonalnie, pod względem produkcji cytokin, jak i na podstawie ekspresji receptorów chemokinowych na powierzchni komórek pamięci. Także stosunek liczby komórek Th1 do Th2 u chorych na GPA pozostawał niezmieniony. W grupie stabilnej remisji GPA obserwowano jedynie wyższy, niż w pozostałych grupach, odsetek komórek Th2. Wobec braku różnic w odsetkach limfocytów produkujących IL-4 i IFN γ , IL-17A i IL-22 można przypuszczać, że aktywność komórek

Th2 w fazie remisji prawdopodobnie w większym stopniu wiązała się z brakiem ich wrażliwości na leczenie immunosupresyjne, niż z istotnym udziałem ich aktywacji w reakcji zapalnej w przebiegu GPA. Wniosek taki można wysnuć w oparciu o brak zmian w fazie zaostrzenia choroby GPA.

Dotychczas przeprowadzone w tym zakresie badania znacznie różniły się od siebie zarówno pod względem metodyki, jak i doboru grup chorych. Porównywano między innymi liczbę i wzajemne interakcje limfocytów Th1 i Th2 u chorych z ograniczoną i uogólnioną postacią zapalenia naczyń [58, 111]. W niniejszej pracy takiej analizy nie można było przeprowadzić ze względu na niewielką liczbę chorych ze zlokalizowaną postacią GPA. Inną przyczyną różnic może być materiał, w którym oceniano poszczególne frakcje limfocytów. Podczas gdy w przedstawionej pracy analiza dotyczyła komórek krwi obwodowej, w części doniesień o przesunięciu proporcji między komórkami produkującymi mediatory odpowiedzi Th1 i Th2 bazowała na materiale uzyskanym z biopsji narządów zajętych chorobowo [76, 111]. Z kolei trudność interpretacyjna w porównywaniu wyników badań używających komórek pochodzących z krwi obwodowej, a wskazujące na dominację wyłącznie odpowiedzi typu Th1, wynika z włączania do badań chorych z różnymi postaciami AAV (najczęściej łącznie GPA i MPA) [71] lub w ogóle z ujemnym wynikiem badań w kierunku ANCA [113], lub już w trakcie leczenia wysokimi dawkami leków immunosupresyjnych [111].

W naszym badaniu zdecydowano się na analizę PBMC ze względu na możliwość oceny fenotypu wszystkich krążących we krwi limfocytów oraz poszukiwanie takich markerów aktywności choroby, które byłyby dostępne szybko i, w miarę możliwości, z użyciem metod najmniej nieinwazyjnych (bez konieczności wykonywania biopsji). Analiza immunofenotypu nacieku limfocytarnego w tkankach zajętych chorobowo byłaby jednak cennym uzupełnieniem badań wykonywanych z krwi obwodowej, przede wszystkim w odniesieniu do ich roli w patogenezie przewlekłego odczynu zapalnego.

Jednym z najważniejszych celów badania było wskazanie roli limfocytów Th17 w patogenezie różnych faz GPA (zaostrzenie, remisja). Zwiększona liczba tych komórek i ich mediatorów oraz ich korelacja z aktywnością choroby została wykazana w innych chorobach z autoagresji (np. w toczeniu rumieniowatym układowym), a pierwsze doniesienia dotyczące komórek produkujących IL-17A sugerowały ich istotną rolę w rozwoju GPA. Przypuszczenia takie wspiera fakt, że komórki Th17 torują odpowiedź mediowaną przez neutrofile i makrofagi oraz aktywację limfocytów T; wszystkie zjawiska obserwowane w AAV.

Nasze wyniki dotyczące limfocytów Th17 i typowych dla nich cytokin pokrywają się z dotychczasowymi doniesieniami [195, 196, 197, 198, 199]. Zwiększony odsetek limfocytów Th17 stwierdzono we wszystkich badanych fazach GPA, w zaostrzeniu, we wczesnej remisji (po sześciu miesiącach leczenia indukującego remisję), jak i w remisji utrwalonej. Nie zaobserwowano także różnic pomiędzy badanymi grupami. Stąd odsetek limfocytów Th17-like nie korelował istotnie z żadnymi klinicznymi markerami aktywności choroby (CRP, BVAS, anty-PR3). Na różnice w odsetku komórek IL17+ nie wpływał również fakt stosowanego w chwili pobrania leczenia immunosupresyjnego, dawka glikokortykosterydu czy dawka kumulacyjna cyklofosfamid. Potwierdzono tym samym zbliżone metodologicznie badania zespołów Wilde *et al.*, oraz Rani *i wsp.* sugerujące utrzymującą się przewlekle u chorych z GPA ekspansję komórek Th17 [199, 200].

Odsetek limfocytów Th17 u chorych z GPA, pomimo niemal dwukrotnego wzrostu względem grupy kontrolnej, nadal nie przekraczał 1% komórek CD4+. Jednak ich rola w rozwoju GPA wydaje się być niezmiernie istotna. Produkowana przez nie IL-17 aktywuje bowiem komórki rezydualne w tkankach do produkcji chemokin rekrutujących zarówno neutrofile, jak i makrofagi i limfocyty B [215]. Ich odpowiedź, skutkująca m.in. dalszą produkcją autoprzeciwciał może wzmacniać reakcję zapalną. Na uwagę zasługuje również fakt braku supresji komórek Th17 w toku leczenia immunosupresyjnego. Sugeruje on, że większość z tej populacji limfocytów to komórki pamięci, najpewniej o potencjale autoreaktywnym. Komórki takie, w chwili ponownego kontaktu z antygenem mogą dodatkowo amplifikować odpowiedź immunologiczną. Udział tej grupy komórek w etiopatogenezie GPA pozostaje zatem bardzo prawdopodobna, jednak ich rola w fazie zaostrzenia prawdopodobnie jest złożona i wymaga dalszych badań. Jednym z możliwych wyjaśnień jest wpływ spadku ilości komórek regulatorowych na działanie mediatorów związanych z odpowiedzią Th17, torująca drogę do stymulacji neutrofilów. Potencjalna terapia anty-IL17A mogłaby być zatem skuteczna w przypadkach zaostrzenia GPA przebiegających ze wzrostem stężenia cytokin związanych z Th17.

Drugą, istotną częścią projektu było wskazanie ewentualnej roli zmian w odsetku komórek regulatorowych zależnie od aktywności choroby. Istnieją znaczne rozbieżności w wynikach dotychczasowych badań dotyczących tej populacji limfocytów. Część badań sugerowała wzrost odsetka Treg w remisji GPA [191], inne wskazywały na ich obniżenie niezależne od aktywności choroby [192]. Wspólnym mianownikiem tych prac było jednak upośledzenie zdolności supresyjnych Treg, którego mechanizm nie był do końca jasny [191, 192, 193]. W celu szerszej analizy zaburzeń liczebności i funkcji tych limfocytów

zastosowano dwie metody identyfikacji komórek supresorowych (na podstawie ekspresji receptorów powierzchniowych i obecności czynnika transkrypcyjnego FoxP3). Oceniono także odsetek komórek pozbawionych egzonu 2 z genie FoxP3.

Wyniki dotyczące komórek regulatorowych w omawianej pracy pozostają spójne bez względu na zastosowany marker ($CD25^{hi}CD127^{low}$, czy czynnik transkrypcyjny FoxP3). Aktywna faza choroby była związana ze znaczną deplecją populacji limfocytów regulatorowych, a procesowi wchodzenia w stabilną remisję towarzyszył wzrost ich odsetka. Jednocześnie odsetek komórek Treg korelował ujemnie z markerami aktywności choroby. Można zatem przypuszczać, że aktywacja limfocytów T $CD4^{+}$ oraz limfocytów B (produkcja autoprzeciwciał) w ostrej fazie zapalenia naczyń wiąże się m.in. ze spadkiem mediatorów o działaniu supresorowym produkowanych przez Treg lub innych zaburzeń ich funkcji.

Spójne z dotychczasowymi doniesieniami na temat zaburzonej funkcji limfocytów Treg [191, 192, 193] zdają się być obserwacje dotyczące odsetka tych komórek ze zwiększoną ekspresją izoformy splicingowej Fox P3 pozbawionej egzonu e2 ($\Delta e2$ -FoxP3+). Był on podwyższony w całej grupie chorych z GPA. W połączeniu ze znacznym obniżeniem liczby wszystkich Treg w zaostrzeniu choroby należy przypuszczać, że właśnie u chorych w aktywnej fazie GPA funkcja komórek regulatorowych jest zaburzona w największym stopniu. Liczebnością limfocytów Treg nie można jednak w pełni wyjaśnić wyników wcześniejszych badań dotyczących testów zdolności supresorowych komórek Treg (najbardziej obniżone stwierdzono w grupie z aktywnym GPA) [191, 192]. Były one bowiem prowadzone *in vitro*, a jak wynika z omawianego badania, odsetek defektywnych komórek Treg w grupie z aktywnym i nieaktywnym zapaleniem naczyń był porównywalny. Mechanizm zaburzenia funkcji Treg w zaostrzeniu GPA musi być zatem bardziej złożony i wymaga dalszych badań.

Spośród analizowanych parametrów immunofenotypowych potencjalnie obiecującym markerem aktywności choroby zdaje się być odsetek limfocytów Treg (identyfikowanych jako $CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{low}$, lub $CD4^{+}FoxP3^{+}$). W związku z obserwowaną dynamiką zmian odsetka komórek regulatorowych (obniżenie względem kontroli w aktywnej fazie, podwyższenie w stabilnej remisji), szczególnie cenne może się okazać monitorowanie ewentualnych zmian tego parametru w czasie, mogące zwiastować nawrót choroby. Niejasny i wymagający dalszych badań pozostaje mechanizm tak znacznego spadku linii Treg w zaostrzeniu zapalenia naczyń. Ekspansja komórek Th17, ze względu na swój przewlekły charakter, nie tłumaczy tego zjawiska. Spadek odsetka Treg może mieć

charakter wtórny, np. do zmiany środowiska cytokinowego lub zapoczątkowywać nieprawidłowości immunologiczne typowe dla zaostrzenia GPA. Ustalenie kolejności pojawiania się poszczególnych nieprawidłowości zarówno komórkowych jak i humoralnych (m.in. obniżenie odsetka Treg, aktywacja limfocytów, wzrost miana przeciwciał ANCA) oraz wyjaśnienie mechanizmu supresji Treg byłoby cenne nie tylko dla samego uzupełnienia wiedzy o patomechanizmach w GPA, ale również poszukiwania możliwości terapeutycznych.

Do atutów powyższego badania należy przede podział chorych w różnych fazach choroby na osobne grupy. Użycie skali BVAS, jako międzynarodowego narzędzia wystandaryzowanego i zwalidowanego pozwoliło jednoznacznie wskazać chorych z zaostrzeniem zapalenia naczyń. Analizowane grupy chorych nie różniły się od siebie pod względem podstawowych zmiennych epidemiologicznych, co pozwala wykluczyć ich wpływ na wykazane różnice w immunofenotypach limfocytów.

Do badania włączono jedynie chorych z dodatnim wynikiem ANCA. Fakt ten uzasadniony był przede wszystkim przypuszczalnymi różnicami w patomechanizmach ANCA+ i ANCA- GPA. Rozbieżności w badaniach na temat udziału limfocytów pomocniczych i regulatorowych w tych grupach pacjentów mogą wprost wynikać z różnic w obecności i typie przeciwciał ANCA.

Należy zwrócić również uwagę na wysoki odsetek chorych, którzy w chwili pobrania krwi do badań laboratoryjnych nie otrzymywali intensywnego leczenia immunosupresyjnego (69%). Maksymalna dawka GKS na poziomie 10 mg w grupie chorych w stabilnej remisji pozwala przypuszczać, że efekt steroidoterapii nie miał istotnego wpływu na procesy aktywacji limfocytów w badaniach laboratoryjnych. W grupie chorych z zaostrzeniem GPA dobową dawkę prednizonu przekraczała 20 mg w przypadku dwóch chorych, jednak czas od intensyfikacji steroidoterapii do pobrania materiału do oznaczeń laboratoryjnych (maksymalnie dwa dni) prawdopodobnie minimalizował ich wpływ na wyniki oznaczeń.

Ograniczeniem badania z pewnością pozostaje arbitralnie przyjęta granica sześciu miesięcy obserwacji chorych po rozpoczęciu leczenia indukującego remisję. Zmniejszyło to liczbę analizowanych o te osoby, które mimo leczenia indukującego remisję, nie uzyskały jej po upływie sześciu miesięcy, co zmuszało do kontynuacji leczenia.

Obserwując zmiany obrazu odsetkowego poszczególnych linii limfocytów pomocniczych i regulatorowych można wysunąć przypuszczenie, że osiągnięcie wczesnej remisji klinicznej, wraz ze stabilizacją standardowych parametrów stanu zapalnego we krwi

obwodowej, nie pokrywa się czasowo z wejściem chorego w stan immunologiczny typowy dla długotrwałej remisji. Immunofenotyp limfocytów w grupie wczesnej remisji GPA był porównywalny do tego w fazie zaostrzenia choroby. Nie wiemy zatem w jakim czasie po osiągnięciu remisji klinicznej, mierzonej skalą BVAS, obraz immunofenotypowy osiąga stan typowy dla długotrwałej remisji. Z punktu widzenia klinicznego, szczególnie interesująca byłaby odpowiedź czy przedłużenie stosowania immunosupresji aż do stwierdzenia takiej równowagi wiązałoby się z korzyściami (mniej nawrotów), czy raczej z nasileniem niepożądanych infekcji. W związku ze stwierdzeniem istotnych różnic w obrębie liczebności populacji limfocytów Treg w zależności od aktywności choroby, przydatnym byłoby badanie regularnie monitorujące odsetek tych komórek celem określenia, czy zmiana odsetka Treg może wyprzedzać kliniczne objawy zaostrzenia choroby (predyktor nawrotu).

Wnioski

1. Chorzy z rozpoznaniem GPA i obecnością przeciwciał przeciwko proteinazie 3, bez względu na aktywność choroby, charakteryzują się: podwyższonym odsetkiem limfocytów Th17, obniżonym stosunkiem Treg/Th17, oraz wyższym odsetkiem komórek Treg z wariantem splicingowym $\Delta E2$ -FoxP3 w porównaniu z osobami zdrowymi.
2. Ustępowanie zmian charakterystycznych dla zaostrzenia GPA w obrazie odsetkowym limfocytów trwa dłużej niż 6 miesięcy, nawet jeśli po takim czasie leczenia indukującego remisję nie stwierdza się klinicznych cech aktywności zapalenia naczyń mierzonej skalą BVAS.

Streszczenie

Ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (GPA- *granulomatosis with polyangiitis*) należy do układowych zapaleń naczyń charakteryzujących się obecnością przeciwciał przeciw ziarnistościom neutrofili (ANCA). Dotyka ona przede wszystkim układu oddechowego i nerek, w których znaleźć można ziarniniaki i objęte stanem zapalnym drobne naczynia krwionośne. Etiopatogeneza choroby jest złożona; stwierdza się w niej liczne zaburzenia czynności układu odpornościowego. Wskazuje się m.in. na zaburzoną tolerancję immunologiczną (wytworzenie autoprzeciwciał), aktywację komplementu i licznych grup komórek zapalnych czy zmiany odsetka subpopulacji limfocytów. Szczególną uwagę w badaniach na ten temat w ostatnich latach poświęca się komórkom Th17 i T regulatorowym (Treg). Wśród licznych mechanizmów komórkowych zaangażowanych w patogenezę GPA poszukuje się także wskaźników aktywności choroby, wspomagających decyzje kliniczne dotyczące intensyfikacji leczenia immunosupresyjnego.

Cele pracy:

- (1) Ocena obrazu odsetkowego limfocytów pomocniczych na podstawie ekspresji powierzchniowych receptorów chemokinowych oraz produkcji cytokin po stymulacji, w grupach chorych: w aktywnej fazie GPA; po 6 miesiącach leczenia indukującego remisję; w okresie długotrwałej remisji GPA oraz wśród osób zdrowych,
- (2) Ocena ilości i potencjału komórek Treg w powyższych grupach celem określenia ich prawdopodobnej roli w okresie zaostrzenia choroby i ich ewentualnych zmian w odpowiedzi na stosowane leczenie.

Metody:

W latach 2013-2016 do badania włączono 19 chorych z zaostrzeniem GPA, 18 chorych w stabilnej (>1 roku) remisji choroby oraz 26 dobranych pod względem płci i wieku, zdrowych ochotników, jako grupę kontrolną. Wszyscy chorzy włączeni do badania byli ANCA+. Kryterium wykluczającym była obecność infekcji lub innego schorzenia autoimmunologicznego. Rozpoznanie było weryfikowane według kryteriów klasyfikacyjnych GPA ACR 1990. Głównym narzędziem oceny aktywności choroby była

skala Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS). Zaostrzenie GPA definiowano jako wynik BVAS > 2, a remisję jako BVAS 0. Chorzy z pośrednim wynikiem zostali wyłączeni z badania.

Krew do analiz laboratoryjnych była pobierana podczas pierwszej wizyty. Chorzy w zaostrzeniu GPA odbywali następnie comiesięczne wizyty kontrolne. Po pół roku leczenia immunosupresyjnego ponownie pobierano krew do analiz. Limfocyty izolowano z krwi żyłnej. Następnie oceniano obraz odsetkowy subpopulacji limfocytów T metodą cytometrii przepływowej na podstawie ekspresji receptorów chemokinowych (CXCR3, CCR4, CCR6 i CCR10) oraz produkcji cytokin IFN γ , IL-4, IL-22, IL-17A po stymulacji PMA i jonomycyną. Limfocyty Treg identyfikowane były jako komórki CD25^{hi}CD127^{low} lub na podstawie obecności czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Dodatkowo analizowano komórki Treg posiadające defektywny (wiążący się z obniżonym potencjałem supresyjnym) wariant czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Projekt uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej, a osoby biorące w nim udział wyraziły na to pisemną zgodę.

Wyniki:

Badane grupy nie różniły się między sobą podstawowymi parametrami demograficznymi. Spośród chorych w zaostrzeniu 13 osiągnęło remisję po 6 miesiącach leczenia. Z pozostałych: 2 zmarło w trakcie badania, a 4 nadal prezentowało objawy choroby pomimo leczenia.

W całej grupie chorych z GPA obserwowano: względną limfopenię, podwyższony odsetek komórek CD8⁺ oraz ekspansję limfocytów o typie Th17 (zarówno komórek IL-17⁺IFN γ -IL-4⁻ jak i komórek efektorowych CXCR3-CCR4⁺CCR6⁺CCR10⁻). Zaostrzenie choroby wiązało się przede wszystkim z obniżeniem odsetka komórek T regulatorowych. Faza stabilnej remisji choroby charakteryzowała się zmianą proporcji komórek CD4⁺ dziewiczych do efektorowych pamięci CD4⁺ na korzyść drugiej z nich oraz obniżeniem bezwzględnej liczby limfocytów T i CD4⁺. Ponadto u chorych odsetek limfocytów Treg przewyższał nie tylko wartości dla grupy w zaostrzeniu, ale również grupy kontrolnej. Związek aktywności choroby z limfocytami Treg potwierdzono również wysokim wskaźnikiem korelacji Spearmana między odsetkiem komórek CD25^{hi}CD127^{low} a wynikiem w skali BVAS oraz stężeniem CRP. Ponowna analiza immunofenotypu po 6-miesięcznym leczeniu indukującym remisję chorych z zaostrzeniem, pomimo braku objawów klinicznych (BVAS 0) nie wykazała różnic w żadnym z analizowanych parametrów komórkowych.

Wnioski:

Zaostrzenie ziarniniakowości z zapaleniem naczyń wiąże się z istotną deplecją limfocytów T regulatorowych. Wejście w stabilną remisję charakteryzuje się z kolei znacznym wzrostem tej subpopulacji limfocytów. Podobne zmiany nie są jednak kompensowane spadkiem limfocytów Th17. Ich ekspansja nie zależy od aktywności choroby; może leżeć u podstaw patomechanizmu choroby. W efekcie stosunek komórek Treg do Th17 pozostaje obniżony w całej grupie GPA, co sugeruje, że równowaga między nimi, w przeciwieństwie do innych chorób z autoagresji, może mieć bardziej złożony charakter. Wszelkie zmiany immunofenotypowe zachodzące podczas wejścia w fazę remisji obserwowane są dopiero w dłuższej niż 6 miesięcy perspektywie od ustąpienia objawów chorobowych, świadcząc o głębokim zaburzeniu odpowiedzi komórkowej w ostrej fazie GPA i dużej „bezwładności” procesu chorobowego. Można przypuszczać, że odsetek komórek T regulatorowych mógłby stanowić marker aktywności ziarniniakowości z zapaleniem naczyń.

Summary

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is a systemic vasculitis characterized by the presence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). GPA mainly affects the respiratory tract and kidneys, where both granulomas and inflamed small blood vessels can be found. The etiopathogenesis of the disease is complex and during its progression multiple dysfunctions of the immune system occur. Those include: impaired immune tolerance (autoantibodies-mediated inflammation), increased complement activation, proliferation of various cell types, as well as altered representation of lymphocyte subsets. Lately particular attention has been paid to misrepresentation of Th17 and T regulatory (Treg) cells.

Clinical characteristics of GPA patients is focused on vasculitis activity evaluation which now is based mainly on scales and non-specific laboratory markers. In recent years research efforts are focused on finding potential disease activity markers as this would support difficult clinical decisions regarding to immunosuppression intensification. We tried to look for them among percentages of different T helper and T regulatory cells.

Aims

(1) Evaluation of the T helper cell phenotype in patients in the exacerbation of GPA prior any treatment and the same patients after 6 months of the remission-induction therapy, as well as in patients with long lasting disease remission. T helper phenotype is assessed based on the surface chemokine receptors expression and the production of cytokines after stimulation with PMA.

(2) Analysis of the number of Th17 and Treg cells in the above mentioned groups in order to assess their possible role in disease exacerbation and its response to the immunosuppressive therapy.

Methods

The study was conducted between 2013 and 2016 and consisted of 19 patients with exacerbation of GPA, 18 patients in stable (> 1 year) disease remission and 26 age and sex matched healthy volunteers as controls. All patients in the study were ANCA positive. The exclusion criteria were: the presence of any infection or the existence of another

autoimmune disease. The GPA diagnosis was verified according to the GPA classification criteria by The American College of Rheumatology (1990). The main tool to assess disease activity in GPA patients was Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS). GPA exacerbation was defined as a result of BVAS > 2 and remission was considered for a score of BVAS = 0. Patients with intermediate result were excluded from the study. Blood samples from patients were collected during their first visit. The patients in exacerbation of GPA were followed up during the first months of immunosuppressive therapy on the monthly basis. After 6 months blood was collected for final analysis. Lymphocytes were isolated from venous blood. Lymphocytes immunophenotyping was performed by using fluorescence-activated cell sorting to detect the presence/absence of chemokine receptors (CXCR3, CCR4, CCR6 and CCR10) expression and by assessing cytokine production (IFN γ , IL-4, IL-22 and IL-17) after stimulation with PMA and ionomycin. Treg cells were identified as CD25^{hi}CD127^{low} and FoxP3 (transcription factor) positive. Moreover, Treg cells were analyzed for the presence of a defective variant of FoxP3, which is involved in reduced suppression potential. The project was approved by the Local Ethic Committee and all participants signed study written consent.

Results

Study groups did not differ in their basic demographic parameters (sex, age, age at disease onset, duration of illness, glucocorticoids dosage). 13 patients with exacerbation of GPA achieved remission after 6 months of immunosuppressive therapy (2 died during the study, 4 still exhibited disease symptoms despite the treatment). Findings in all GPA patients included: a relative lymphopenia, an increased percentage of CD8⁺ lymphocytes and expansion of the Th17 (both IL-17+IL-4-IFN γ - and effector memory cells CXCR3-CCR4+CCR6+CCR10-). The exacerbation of GPA was primarily associated with a reduction in the percentage of Treg cells. Interestingly, the 6 months of the immunosuppressive treatment, despite the absence of clinical symptoms in patients (BVAS 0), did not change any of the analyzed cellular parameters; Treg levels remained low. Stable remission of GPA was characterized by an overall decrease in the number of CD4⁺ T lymphocytes compared to the healthy volunteers, as well as an altered proportions of CD4⁺ effector memory and CD4⁺ naïve cells, where the population of naïve cells prevailed. Furthermore, in patients in stable remission the percentage of Treg lymphocytes were higher than in the other groups, including the healthy volunteers. Those findings were confirmed by

the high Spearman correlation coefficient between Treg cell percentage and BVAS result. There was no significant difference in the percentage of Th1 and Th2 cells between the studied groups.

Conclusions

Exacerbation of GPA is associated with a significant depletion of Treg cells and stable remission is characterized by a significant increase in the Treg percentage. These changes are not compensated by Th17 cells. Expansion of Th17 is not dependent on disease activity. As a result, the ratio of Treg to Th17 cells is lowered in the whole GPA group, suggesting that the balance between these subsets in the GPA, in contrast to other autoimmune diseases, may be more complex. Any immunophenotype changes occurring during entering the stable remission are observed after few months after the disappearance of clinical symptoms proving prominent abnormalities of cellular response in the acute phase of the GPA, as well as the big "inertia" of the inflammatory process in this disease entity. On the basis of these results can be assumed that the percentage of Treg cells may be a potential indicator of the disease activity in GPA.

Piśmiennictwo:

1. Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer R, Gross WL. Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from the German vasculitis register. *Arthritis Rheum.* 2005;53:93-9.
2. Koldingsnes W, Nossent H. Epidemiology of Wegener's granulomatosis in Northern Norway. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2481-7.
3. Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Jayne DR, Suzuki K, Scott DG i wsp. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:1916-20.
4. Comarmond C, Cacoub P. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener): clinical aspects and treatment. *Autoimmun Rev.* 2014;13(11):1121-5.
5. Herlyn K, Buckert F, Gross WL, Reinhold-Keller E. Doubled prevalence rates of ANCA-associated vasculitides and giant cell arteritis between 1994 and 2006 in northern Germany. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53:882-9.
6. Jayne D, on behalf of the European Vasculitis Study Group (E U VA S). Update on the European Vasculitis Study Group trials. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13:48-55.
7. Pinching AJ, Rees AJ, Pussell BA, Lockwood CM, Mitchison RS, Peters DK. Relapses in Wegener's granulomatosis: the role of infection. *Br Med J.* 1980;281:836-8.
8. Hind CR, Winearls CG, Pepys MB. Correlation of disease activity in systemic vasculitis with serum C-reactive protein measurement. A prospective study of thirty-eight patients. *Eur J Clin Invest.* 1985;15(2):89-94.
9. Suresh E. Diagnostic approach to patients with suspected vasculitis. *Postgraduate Medical Journal.* 2006;82(970):483-8.

10. Kofteridis DP, Samonis G, Karatzanis AD. C-Reactive Protein and Serum Procalcitonin Levels as Markers of Bacterial Upper Respiratory Tract Infections. *Am J Infect Dis.* 2009;5(4):282-7.
11. Hellmich B, Flossmann O, Gross WL, Bacon P, Willem Cohen-Tervaert J, Guillevin L i wsp. EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibodyassociated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:605-17.
12. Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, Janssen BA, Emery P, Savage C, Adu D. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM.* 1994;87:671-8
13. Mukhtyar C, Lee R, Brown D, Carruthers D, Dasgupta B, Dubey S i wsp. Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). *Ann Rheum Dis.* 2009;68(12):1827-32.
14. Luqmani R. Disease assessment in systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;Suppl 1:76-82.
15. Solans-Laqué R, Rodrigez-Carballeira M, Fralle G, on behalf on GEAS-SEMI. Long-Term Survival and Baseline Prognostic Factors in a Wide Series of Patients with AAV from Spain. Usefulness of Prognostic Scores (Revas Study). *Ann Rheum Dis.* 2015;74:524.
16. Biscetti F, Carbonella A, Parisi F, Bosello SL, Schiavon F, Padoan R i wsp. The Prognostic Significance of The Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in Patients with Systemic Vasculitis Transferred To The Intensive Care Unit (ICU). *Ann Rheum Dis.* 2016;75:1090.
17. Floris A, Goodfellow N, Sznajd J, Wawrzycka-Adamczyk K, Querin H, Craven A. Using The Birmingham Vasculitis Activity Score as A Screening Tool in Patients with Suspected Vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75:75.

18. Craven A, Robson J, Ponte C, Grayson PC, Suppiah R, Judge A i wsp. ACR/EULAR-endorsed study to develop Diagnostic and Classification Criteria for Vasculitis (DCVAS). *Clin Exp Nephrol*. 2013;17(5):619-21.
19. Exley AR, Bacon PA, Luqmani RA, Kitas GD, Gordon C, Savage CO, Adu D. Development and initial validation of the Vasculitis Damage Index for the standardized clinical assessment of damage in the systemic vasculitides. *Arthritis Rheum*. 1997;40(2):371-80.
20. Robson J, Doll H, Suppiah R, Flossman O, Harper L, Höglund P i wsp. Damage in the anca-associated vasculitides: long-term data from the European vasculitis study group (EUVAS) therapeutic trials. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(1):177-84.
21. Suppiah R, Flossman O, Mukhtyar C, Alberici F, Baslund B, Brown D i wsp. Measurement of damage in systemic vasculitis: a comparison of the Vasculitis Damage Index with the Combined Damage Assessment Index. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:80-5.
22. Guillevin L, Pagnoux C, Seror R, Mahr A, Mouthon L, Le Tourmelin P, French Vasculitis Study Group (FVSG). The Five-Factor Score revisited: assessment of prognoses of systemic necrotizing vasculitides based on the French Vasculitis Study Group (FVSG) cohort. *Medicine*. 2011;90:19-27.
23. Brazier JE, Harper R, Jones NM, O’Cathain, Thomas KJ, Usherwood T, Westlake L. Validating the SF-36 health survey questionnaire: new outcome measure for primary care. *BMJ*. 1992;305:160-4.
24. Tomasson G, Boers M, Walsh M, LaValley M, Cuthbertson D, Carette S i wsp. Assessment of health-related quality of life as an outcome measure in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Arthritis Care Res*. 2012;64(2):273-9.
25. Trimarchi M, Sinico RA, Teggi R, Bussi M, Specks U, Meroni PL. Otorhinolaryngological manifestations in granulomatosis with polyangiitis

(Wegener's). *Autoimmun Rev.* 2013;12:501-5.

26. Daum TE, Specks U, Colby TV, Edell ES, Brutinel MW, Prakash UB i wsp. Tracheobronchial involvement in Wegener's granulomatosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:522-6.
27. Manganelli P, Fietta P, Carotti M, Pesci A, Salaffi F. Respiratory system involvement in systemic vasculitides. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(2 Suppl 41):48-59.
28. Chang D, Wu L, Liu G, Chen M, Kallenberg CGM, Zhao M. Re-evaluation of the histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis: a study of 121 patients in a single center. *Nephrol Dial Transplant. Off Publ Eur Dial Transpl Asso. Eur Ren Assoc.* 2012;27:2343-9.
29. Holle JU, Laudien M, Gross WL. Clinical manifestations and treatment of Wegener's granulomatosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010;36(3):507-26.
30. Schilder AM. Wegener's granulomatosis vasculitis and granuloma *Autoimmun Rev.* 2010;9(7):483-7.
31. Sinico RA, Di Toma L, Radice A. Renal involvement in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody associated vasculitis. *Autoimmun Rev.* 2013;12(4):477-82.
32. Dufour JF, Le Gallou T, Cordier JF, Aumaître O, Pinède L, Aslangul E i wsp. Urogenital manifestations in Wegener granulomatosis: a study of 11 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2012;91(2):67-74.
33. Alba MA, Moreno-Palacios J, Beça S, Cid MC. Urologic and male genital manifestations of granulomatosis with polyangiitis. *Autoimmun Rev.* 2015;14(10):897-902.
34. Asakura K, Muto T. Neurological involvement in Wegener's granulomatosis. *Brain Nerve.* 2013;65(11):1311-7.

35. Nishino H, Rubino FA, DeRemee, RA, Swanson, JW, Parisi JE. Neurological involvement in Wegener's granulomatosis: An analysis of 324 consecutive patients at the Mayo Clinic. *Ann Neurol.*, 1993;33:4-9.
36. Seror R, Mahr A, Ramanoelina J, Pagnoux C, Cohen P, Guillevin L. Central nervous system involvement in Wegener granulomatosis. *Medicine (Baltimore)*. 2006;85:54-65.
37. Holle JU, Laudien M, Gross WM. Clinical Manifestations and Treatment of Wegener's Granulomatosis *Rheumatic Disease Clinics*. 2010;36(3):507-26.
38. Wegener F. Ueber generalisierte septische Gefaesserkrankungen. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1936;29:202-8.
39. Jagiello P, Gencik M, Arning L, Wiczorek S, Kunstmann E, Csernok E i wsp. New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. *Hum Genet*. 2004;114(5):468-77
40. Jagiello P, Aries P, Arning L, Wagenleiter SE, Csernok E, Hellmich B. The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(12):4039-43.
41. Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L i wsp. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet*. 2007;39:721-3.
42. Wiczorek S, Holle JU, Bremer JP, Wibisono D, Moosig F, Fricke H i wsp. Contrasting association of a non-synonymous leptin receptor gene polymorphism with Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:907-14.
43. Gencik M, Meller S, Borgmann S, Fricke H. Proteinase 3 gene polymorphisms and Wegener's granulomatosis. *Kidney Int*. 2000;58:2473-7.

44. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;285(6342):606.
45. Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, de Jong PE, Kallenberg CG. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med*. 1994;120:12-17.
46. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA i wsp. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet*. 1985;1:425-9.
47. Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS, Ambrus JL, Velosa J, Keane WF i wsp. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med*. 1989;149:2461-65.
48. Noelle B, Specks U, Luedemann J, Rohrbach M, Deremie R, Gross WL. Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *Ann Intern Med*. 1989;111:28- 40.
49. Finkielman JD, Lee AS, Hummel AM, Viss MA, Jacob GL, Homburger HA i wsp. ANCA are detectable in nearly all patients with active severe Wegener's granulomatosis. *Am J Med*. 2007;120(643):9-14.
50. Damoiseaux J, Csernok E, Rasmussen N, Moosing F, van Passen P, Baslund B i wsp. Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCAs): a multicentre European Vasculitis Study Group (EUVAS) evaluation of the value of indirect immunofluorescence (IIF) versus antigen-specific immunoassays. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:647-53.
51. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, Oost W, Hermans J, Kallenberg CG

- i wsp. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):2025-33.
52. Mahler M, Radice A, Yang W, Bentow C, Seaman A, Bianchi L, Sinico RA. Development and performance evaluation of novel chemiluminescence assays for detection of anti-PR3 and anti-MPO antibodies. *Clin Chim Acta.* 2012;413(7-8):719-26.
 53. Brouwer E, Tervaert JW, Horst G, Huitema MG, van der Giessen M, Limburg PC, Kallenberg CG. Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders. *Clin Exp Immunol.* 1991;83:379-86.
 54. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL. Wegener's autoantigen decoded. *Nature.* 1990;346(6284):520.
 55. van Rossum AP, Rarok AA, Huitema MG, Fassina G, Limburg PC, Kallenberg CG. Constitutive membrane expression of proteinase 3 (PR3) and neutrophil activation by anti-PR3 antibodies. *J Leukoc Biol.* 2004;76:1162-70.
 56. Berger SP, Seelen MA, Hiemstra PS, Gerritsma JS, Heemskerk E, van der Woude FJ, Daha MR. Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(5):694-701.
 57. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Artani Y i wsp. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest.* 2002;110:955-63.
 58. Pfister H, Ollert M, Frohlich LF, Quintanilla-Martinez L, Colby TV, Specks U, Jenne DE. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood.* 2004;104:1411-18.

59. Little MA, Al-Ani B, Ren S, Al-Nuaimi H, Leite M Jr, Alpers CE i wsp. Anti-proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies recapitulate systemic vasculitis in mice with a humanized immune system. PLoS ONE 7; 2012;7(1):e28626.
60. van Paassen P, Tervaert JW, Heeringa P. Mechanisms of vasculitis: how pauci-immune is ANCA-associated renal vasculitis? Nephron Exp Nephrol. 2007;105:10-16.
61. Ralston DR, Marsh CB, Lowe MP, Wewers MD. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase- 3, alpha1-antitrypsin, and Fcgamma receptors. J Clin Invest. 1997;100:1416-24.
62. Hattar K, Bickenbach A, Csernok E, Rosseau S, Grandel U, Seeger W. Wegener's granulomatosis: antiproteinase 3 antibodies induce monocyte cytokine and prostanoid release-role of autocrine cell activation. J Leukoc Biol. 2002;71:996-1004.
63. Tse WY, Nash GB, Hewins P, Savage CO, Adu D. ANCA-induced neutrophil F-actin polymerization: implications for microvascular inflammation. Kidney Int. 2005;67(1):130-9.
64. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jenette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:4115-9.
65. Wikman A, Fagergren A, Gunnar OJS, Lundahl J, Jacobson SH. Monocyte activation and relationship to anti-proteinase 3 in acute vasculitis. Nephrol Dial Transplant. 2003;18:1792-9.
66. Brouwer E, Huitema MG, Mulder AHL, Heeringa P, van Goor H, Cohen Tervaert JW i wsp. Neutrophil activation in vitro and in vivo in Wegener's granulomatosis. Kidney Int. 1994;45:1120-31.

67. Muller Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW. Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis.* 1999;58:237-45.
68. Muller Kobold AC, van Wijk RT, Franssen CF, Molema G, Kallenberg CG, Tervaert JW. In vitro up-regulation of E-selectin and induction of interleukin-6 in endothelial cells by autoantibodies in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Clin Exp Rheumatol.* 1999;17:433-40.
69. Csernok E, Ai M, Gross WL, Wicklein D, Petersen A, Lindner B i wsp. Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood.* 2006;107:4440-8.
70. Fienberg R. The protracted superficial phenomenon in pathergic (Wegener's) granulomatosis. *Hum Pathol.* 1981;12:458-67.
71. Fienberg R. A morphologic and immunohistologic study of the evolution of the necrotizing palisading granuloma of pathergic (Wegener's) Granulomatosis. *Semin Resp Med.* 1989;10:126-32.
72. Matsubara O, Yoshimura N, Doi Y, Tamura A, Mark EJ. Nasal biopsy in the early diagnosis of Wegener's (pathergic) granulomatosis. *Virchows Arch.* 1996;428:13-19.
73. Brouwer E, Cohen Tervaert JW, Weening JJ, Kallenberg CGM. Immunohistopathology of renal biopsies in Wegener's granulomatosis (WG): clues to its pathogenesis? *Kidney Int.* 1991;39:1055-6.
74. Bajema IM, Hagen EC, Ferrario F, Waldherr R, Noël LH, Hermans J i wsp. Renal granulomas in systemic vasculitis. EC/BCR project for ANCA-assay standardization. *Clin Nephrol.* 1998;48:16-21.
75. Walton EW. Giant-cell granuloma of the respiratory tract (Wegener's granulomatosis). *Brit Med J.* 1958;2:265-70.

76. Muller A, Trabandt A, Gloeckner-Hofmann K, Seitzer U, Csernok E, Schonermarck U i wsp. Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN γ expression. *J Pathol.* 2000;192:113-20.
77. Mueller A, Holl-Ulrich K, Lamprecht P, Gross WL. Germinal centre-like structures in Wegener's granuloma: the morphological basis for autoimmunity? *Rheumatology.* 2008;47:1111-3.
78. Voswinkel J, Muller A, Lamprecht P. Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? Granulomas as potential lymphoid tissue maintaining autoantibody production. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:12-9.
79. Voswinkel J, Mueller A, Kraemer JA, Lamprecht P, Herlyn K, Holl-Ulrich K, I WSP. B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:859-864.
80. Cunningham MA, Huang XR, Dowling JP, Tipping PG, Holdsworth SR. Prominence of cell-mediated immunity effectors in 'pauci-immune' glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:499-506.
81. Weidner S, Carl M, Riess R, Rupprecht HD. Histologic analysis of renal leukocyte infiltration in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: importance of monocyte and neutrophil infiltration in tissue damage. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3651-7.
82. Marinaki S, Neumann I, Kälsch AI, Grimminger P, Breedijk A, Birck R. Abnormalities of CD4 T cell subpopulations in ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol.* 2005;140:181-91.
83. Schlesier M, Kaspar T, Gutfleisch J, Wolff-Vorbeck G, Peter HH. Activated CD4+ and CD8+ T-cell subsets in Wegener's granulomatosis. *Rheumatol Int.* 1995;14(5):213-9.
84. Iking-Konert C, Vogl T, Prior B, Wagner C, Sander O, Bleck E i wsp. T

lymphocytes in patients with primary vasculitis: expansion of CD8+ T cells with the propensity to activate polymorphonuclear neutrophils. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(5):609-16.

85. Ikeda M, Tsuru S, Watanabe Y, Kitahara S, Inouye T. Reduced CD4-CD8 T cell ratios in patients with Wegener's granulomatosis. *J Clin Lab Immunol*. 1992;38:103-9.
86. Griffith ME, Coulthart A, Pusey CD. T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR3) in patients with systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol*. 1996;103:253-8.
87. Brouwer E, Stegeman CA, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG. T cell reactivity to proteinase 3 and myeloperoxidase in patients with Wegener's granulomatosis (WG). *Clin Exp Immunol*. 1994;98:448-53.
88. Popa ER, Franssen CF, Limburg PC, Huitema MG, Kallenberg CG, Tervaert JW. In vitro cytokine production and proliferation of T cells from patients with anti-proteinase 3- and antimyeloperoxidase-associated vasculitis, in response to proteinase 3 and myeloperoxidase. *Arthritis rheum*. 2002;46(7):1894-904.
89. Winek J, Mueller A, Csernok E, Gross WL, Lamprecht P. Frequency of proteinase 3 (PR3)-specific autoreactive T cells determined by cytokine flow cytometry in Wegener's granulomatosis. *J Autoimmun*. 2004;22:79-85.
90. Popa ER, Stegeman CA, Bos NA, Kallenberg CG, Tevaert JW. Differential B- and T-cell activation in Wegener's granulomatosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:885-94.
91. Christensson M, Pettersson E, Sundqvist KG, Christensson B. T cell activation in patients with ANCA-associated vasculitis: inefficient immune suppression by therapy. *Clin Nephrol*. 2000;54:435-42.
92. Marinaki S, Kalsch AI, Grimminger P, Breedijk A, Birck R, Schmitt WH i wsp.

Persistent T-cell activation and clinical correlations in patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:1825-32.

93. Abdulahad WH, van der Geld YM, Stegeman CA, Kallenberg CG. Persistent expansion of CD4⁺ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int*. 2006;70(5):938-47.
94. Abdulahad WH, Kallenberg CG, Limburg PC, Stageman CA. Urinary CD4⁺ effector memory T cells reflect renal disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2830-8.
95. Lamprecht P, Csernok E, Gross WL. Effector memory T cells as driving force of granuloma formation and autoimmunity in Wegener's granulomatosis. *J Intern Med*. 2006;260:187-91.
96. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev*. 2005;205:158-69.
97. Steiner K, Moosing F, Csernok E, Selleng K, Gross WL, Fleischer B, Bröker BM. Increased expression of CTLA-4 (CD152) by T and B lymphocytes in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol*. 2001;126:143–50.
98. Giscombe R, Wang XB, Kakoulidou M, Lefvert AK. Characterization of the expanded T-cell populations in patients with Wegener's granulomatosis. *J Intern Med*. 2006;260(3):224-30.
99. Huang DR, Giscombe R, Zhou YH, Pirskanen R, Lefvert AK. Dinucleotide repeat expansion in the CTLA-4 gene leads to T cell hyper-reactivity via the CD28 pathway in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2000;105:69-77.
100. Lee YH, Kim JH, Seo YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2014;75(5):414-21.

101. Shojaa M, Aghaie M, Qorbani M, Khashayar P, Amoli M, Keshtkar AA i wsp. Association of the CTLA-4 1722TC polymorphism and systemic lupus erythematosus: asystematic review and meta analysis. *Med J Islam Repub Iran*. 2014;19;28:132.
102. Huang D, Giscombe R, Zhou YH, Lefvert K. Polymorphisms in CTLA-4 but not tumor necrosis factor-alpha or interleukin 1 beta genes are associated with Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol*. 2000;27:397-401.
103. Giscombe R, Wang X, Huang D, Lefvert AK. Coding sequence 1 and promoter single nucleotide polymorphisms in the CTLA-4 gene in Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol*. 2002;29:950-3.
104. Zhou YH, Huang DR, Paris PL, Sauter CS, Prock KA, Hoffman GS. An analysis of CTLA-4 and proinflammatory cytokine genes in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:2645-50.
105. de Menthon M, Lambert M, Guiard E, Tognarelli S, Bienvenu B, Karras A i wsp. Excessive interleukin-15 transpresentation endows NKG2D+CD4+ T cells with innate-like capacity to lyse vascular endothelium in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Arthritis Rheum*. 2011;63(7):2116-26.
106. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
107. Trinchieri G, Wysocka M, D'Andrea A, Rengaraju M, Aste-Amezaga M, Kubin M. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res*. 1992;4:355-68.
108. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135.
109. Romagnani P, Annunziato F, Baccari MC, Parronchi PT. Cells and cytokines in Crohn's disease. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:793-9.

110. Jakiela B, Szczeklik W, Plutecka H, Sokolowska B, Mastalerz L, Sanak M i wsp. Increased production of IL-5 and dominant Th2-type response in airways of Churg-Strauss syndrome patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(10):1887-93.
111. Lamprecht P, Bruhl H, Erdmann A, Holl-Ulrich K, Csernok E, Seitzer U i wsp. Differences in CCR5 expression on peripheral blood CD4+CD28- T-cells and in granulomatous lesions between localized and generalized Wegener's granulomatosis. *Clin Immunol*. 2003;108:1-7.
112. Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol*. 1997;158(2):658-65.
113. Ludviksson BR, Sneller MC, Chua KS, Talar-Williams C, Langford CA, Ehrhardt RO i wsp. Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+ CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: Reversal with IL-10. *J Immunol*. 1998;160:3602-9.
114. Csernok E, Trabandt A, Muller A, Wang GCC, Moosig F, Paulsen J i wsp. Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis- Predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation. *Arthritis Rheum*. 1999;42:742-50.
115. Lamprecht P, Erdmann A, Mueller A, Csernok E, Reinhold-Keller E, Holl-Ulrich K i wsp. Heterogeneity of CD4 and CD8+ memory T cells in localized and generalized Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5:25-31.
116. Balding CE, Howie AJ, Drake-Lee AB, Savage CO. Th2 dominance in nasal mucosa in patients with Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol*. 2001;125:332-9.
117. Wang G, Hansen H, Tatsis E, Csernok E, Lemke H, Gross WL. High plasma levels of the soluble form of CD30 activation molecule reflect disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Am J Med*. 1997;102:517-23.
118. Sanders JS, Stegeman CA, Kallenberg CG. The Th1 and Th2 paradigm in ANCA-

- associated vasculitis. *Kidney Blood Press Res.* 2003;26:215-20.
119. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L i wsp. Mice with a disrupted IFN γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 1996;156:5-7.
 120. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B i wsp. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003;421:744-8.
 121. Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van den Berg W, Miossec P. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2001;3:168-77.
 122. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD i wsp. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201(2):233-40.
 123. Marwaha AK, Leung NJ, McMurchy AN, Levings MK. TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front Immunol.* 2012;3:129.
 124. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z i wsp. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 2007;26(3):371-81.
 125. Nurieva R, O Yang X, Martinez G, Zhang Y, Athanasia D, Ma L i wsp. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007;448(7152):480-3.
 126. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH i wsp. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat immunol.* 2005;6(11):1133-41.
 127. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M,

- Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006;203:2271-9.
128. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):652-7.
129. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jaeger A, Strom TB i wsp. IL-21 initiates an alternate pathway to induce proinflammatory Th17 cells. *Nature*. 2007;448(7152):484-7.
130. Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT i wsp. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol*. 2007;178(8):4901-7.
131. Burgler S, Mantel PY, Bassin C, Ouaked N, Akdis CA, Schmidt-Weber CB. RORC2 is involved in T cell polarization through interaction with the FOXP3 promoter. *J Immunol*. 2010;184(11):6161-9.
132. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B i wsp. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2006;204(8):1849-61.
133. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Homsby E, Li Y, Cua DJ i wsp. Fate mapping of interleukin 17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat immunology*. 2011;12(3):255-63.
134. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*. 1995;155:5483-6.
135. Liu SJ, Tsai JP, Shen CR, Sher YP, Hsieh CL, Yeh YC i wsp. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol*. 2007;82(2):354-60.
136. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J*

- Immunol. 2006;177(7):4662-9.
137. Dias PM, Banerjee G. The role of Th17/IL-17 on eosinophilic inflammation. *J Autoimmun.* 2013;40:9-20.
 138. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS i wsp. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2015;522(7556):345-8.
 139. Krstic J, Obradovic H, Kukolj T, Mojsilovic S, Okic-Dordevic I, Bugarski D, Santibanez JF. An Overview of Interleukin-17A and Interleukin-17 Receptor A Structure, Interaction and Signaling. *Protein Pept Lett.* 2015;22(7):570-8.
 140. Chang SH, Dong C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cell Signal.* 2011;23:1069-75.
 141. Wei J, Chen D. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect.* 2013;2(9):e60.
 142. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M i wsp. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998;160(7):3513-21.
 143. Laan, M, Cui, ZH, Hoshino, H, Lötvall J, Sjöstrand, M, Gruenert DC i wsp. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the Airways. *A.J. Immunol.* 1999;1:2:2347-52.
 144. Kawaguchi M, Kokubu F, Odaka M, Watanabe S, Suzuki S, Ieki K i wsp. Induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by a new cytokine, ML-1 (IL-17F), via Raf I–MEK–ERK pathway. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:444-50.
 145. Prause O, Laan M, Lötvall J, Lindén A. Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;462:193-8.
 146. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. NF-kappa B-inducing kinase is a

- common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 1999;162:5337-44.
147. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C i wsp. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183(6):2593-603.
 148. Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR i wsp. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2006;203:843-9.
 149. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity.* 2001;15:985-95.
 150. Saenz SA, Siracusa MC, Perrigoue JG, Spencer SP, Urban JF Jr, Tocker JE i wsp. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature.* 2010;464(7293):1362-6.
 151. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti- *Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis.* 2004;190:624-31.
 152. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P i wsp. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 2001;194:519-27.
 153. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(6):1339-50.
 154. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L i wsp. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 1999;42:963-70.
 155. Kleczynska W, Jakiela B, Plutecka H, Milewski M, Sanak M, Musiał J. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(4):646-53.

156. Shah K, Lee WW, Lee SH, Kim SH, Kang SW, Craft J, Kang I. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R53.
157. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*. 2015;72(2):146-53.
158. Sohn MH, Noh SY, Chang W, Shin KM, Kim DS. Circulating interleukin 17 is increased in the acute stage of Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol*. 2003;32:364-6.
159. Jakiela B, Sanak M, Szczeklik W, Sokolowska B, Plutecka H, Mastalerz L i wsp. Both Th2 and Th17 responses are involved in the pathogenesis of Churg-Strauss syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(1 Suppl 64):23-34.
160. Eddahri F, Oldenhove G, Denanglaire S, Urbain J, Leo O, Andris F. CD41CD251 regulatory T cells control the magnitude of Tdependent humoral immune responses to exogenous antigens. *Eur J Immunol*. 2006;36:855-63.
161. Taams LS, Boot EP, van Eden W, Wauben MH. 'Anergic' T cells modulate the T-cell activating capacity of antigenpresenting cells. *J Autoimmun*. 2000;14:335-41.
162. Mempel TR, Pittet MJ, Khazaie K, Weninger R, von Boehmer H, von Andrian UH. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity*. 2006;25:129-41.
163. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH i wsp. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2002;8:1024-32.
164. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immun*. 2004;5:266-71.
165. Beres AJ, Drobyski WR. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front Immunol*. 2013;4:16.

166. Sojka DK, Fowell DJ. Regulatory T cells inhibit acute IFN- γ synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(45):18336-41.
167. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Herminé A, Devergne O. Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol*. 2008;181(10):6898–905.
168. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med*. 2002;196(10):1335-46.
169. Loebbermann J, Thornton H, Durant L, Sparwasser T, Webster KE, Sprent J i wsp. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunology*. 2012;5(2):161-72.
170. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27(4):635-46.
171. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155:1151-64.
172. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994;265:1237-40.
173. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000;192:295-302.
174. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z Szot GL, Lee MR, Zhu S. CD127 expression inversely

- correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 + T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203:1701-11.
175. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevah EM, Collins M, Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002;16:311-23.
 176. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
 177. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.
 178. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A i wsp. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*. 2009;326:986-91.
 179. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:5138-43.
 180. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V i wsp. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. 2006;28;126(2):375-87.
 181. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD i wsp. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*. 2007;445:931-5.
 182. Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y i wsp. FOXP3 and RORγt: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(5):536-42.
 183. Joly AL, Liu S, Dahlberg CI, Mailer RK, Westerberg LS, Andersson J. Foxp3 lacking exons 2 and 7 is unable to confer suppressive ability to regulatory T cells in vivo. *J Autoimmun*. 2015;63:23-30.

- 184.Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N i wsp. Conversion of peripheral CD4+CD25– naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198:1875-86.
- 185.Zhou AX, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. GARP-TGF-β complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+ T cells in vivo. *J Immunol*. 2013;190(10):5057-64.
- 186.Zhou L, Chong MM, Litman DR. Plasticity of CD4⁺ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646-55.
- 187.Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M i wsp. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cell. *Nature*. 2006;44:235-8.
- 188.Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*. 2007;178(11):6725-9.
- 189.Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML. Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:article ID6309219.
- 190.Guo J, Zhou X. Regulatory T cells turn pathogenic. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(5):525-32.
- 191.Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z i wsp. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212:8-27.
- 192.Abdulahad WH, Stegeman CA, van der Geld YM, Doornbos-van der Meer B, Limburg PC, Kallenberg CG. Functional defect of circulating regulatory CD4+ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):2080-91.

193. Rimbart M, Hamidou M, Braudeau C, Puechal X, Teixeira L, Caillon H i wsp. Decreased numbers of blood dendritic cells and defective function of regulatory T cells in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *PLoS One*. 2011;6(4):e18734.
194. Free ME, Bunch DO, McGregor JA, Jones BE, Berg EA, Hogan SL i wsp. Patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis have defective Treg cell function exacerbated by the presence of a suppression-resistant effector cell population. *Arthritis Rheum*. 2013;65(7):1922-3
195. Gan PY, Steinmetz OM, Tan DSY, O'Sullivan K, Ooi JD, Iwakura, Y. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(6):925-31.
196. Abdulahad WH, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG. Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum*, 2008;58:2196-205.
197. Fagin U, Csernok E, Müller A, Pitann S, Fazio J, Krause K i wsp. Distinct proteinase 3-induced cytokine patterns in Wegener's granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, and healthy controls. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(1 Suppl 64):57-62.
198. Murakami M, Okuyama Y, Ogura H, Asano S, Arima Y, Tsuruoka M. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *Journal Exp Med*. 2011;208(1):103-14.
199. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, Hilhorst, vanPaassen P, Witzke O, Cohen Teraert JW. Th17 expansion in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): the role of disease activity, immune regulation and therapy. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):227.
200. Rani L, Minz RW, Sharma A, Anand S, Gupta D, Panda NK i wsp. Predominance of PR3 specific immune response and skewed TH17 vs. T-regulatory milieu in active granulomatosis with polyangiitis. *Cytokine*. 2015;71(2):261-7.
201. Nogueira E, Hamour S, Sawant D, Henderson S, Mansfield N, Chavele KM i wsp. Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in

- patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(7):2209-17.
202. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V i wsp. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med*. 2008;205(8):1903-16.
203. Kerstein A, Schöler S, Cabral-Marques O. Environmental factor and inflammation-driven alteration of the total peripheral T-cell compartment in granulomatosis with polyangiitis. *J Autoimmun*. 2017;78:79-91.
204. Ntatsaki E, Carruthers D, Chakravarty K, D'Cruz D, Harper L, Jayne D i wsp. BSR and BHPR Standards, Guidelines and Audit Working Group. BSR and BHPR guideline for the management of adults with ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(12):2306-9.
205. Lamprecht P, Voswinkel J, Lilienthal T, Nolle B, Heller M, Gross WL, Gause A. Effectiveness of TNF α blockade with infliximab in refractory Wegener's granulomatosis. *Rheumatology*. 2002;41:1303-7.
206. Schmitt WH, Hagen EC, Neumann I, Nowack R, Flores-Suarez LF, van der Woude FJ, European Vasculitis Study Group. Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with antithymocyte globulin (ATG): an open study in 15 patients. *Kidney Int*. 2004;65:1440-8.
207. Lockwood CM, Thiru S, Isaacs JD, Hale G, Waldmann H. Long-term remission of intractable systemic vasculitis with monoclonal antibody therapy. *Lancet*. 1993;341:1620-2.
208. Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, i wsp. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med*. 2010;2(52):52ra72.
209. Sneller MC. Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis. *Cleveland Clin J Med*. 2002;69(Suppl. 2):40-3.
210. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP i wsp. The

- American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 1990;33(8):1101-7.
211. Yates M, Watts RA, Bajema IM, Cid MC, Crestani B, Hauser T i wsp. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(9):1583-94.
 212. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A i wsp. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007;8(6):639-46.
 213. Kallenberg CG. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(Suppl 1):i59-63.
 214. Berden AE, Kallenberg CG, Savage CO, Yard BA, Abdulahad WH, de Heer E i wsp. Cellular immunity in Wegener's granulomatosis: characterizing T lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 2009;60(6):1578-87.
 215. Merayo-Chalico J, Rajme-López S, Barrera-Vargas A, Alcocer-Varela J, Díaz-Zamudio M, Gómez-Martín D. Lymphopenia and autoimmunity: A double-edged sword. *Hum Immunol.* 2016;77(10):921-9.
 216. Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene.* 2017;614:8-14.