

Agata Poniewierska-Baran<sup>1</sup>, Beata Tokarz-Deptuła<sup>1\*</sup>, Wiesław Deptuła<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Faculty of Biology, University of Szczecin

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Szczecin

Received in May 2018 r., accepted in August 2018 r.

**Abstract:** The immune system (IS) of mammals has developed many mechanisms to effectively ravage foreign factors, including pathogens. In 1994, Polly Matzinger published a theory of danger, a new view in immunology, describing the response of the immune system to danger, caused by trauma and/or presence of pathogens. This theory brings a different view on the current theory, that the IS distinguishes between own (self) and foreign (non-self) structures and reacts only to non-self factors. According to the danger theory, the IS has the ability to verify “safe” and “dangerous” factors, thus explaining immune reactions caused by tissue damage, referred to as “sterile inflammation”, but also occurring during the infection. It is believed that the fundamental elements in danger theory are dangerous molecules-damage-associated molecular pattern (DAMP), which are released from damaged or dead tissue and cells, but they are also present in physiological conditions and give analogous immune response to this induced by self/ non-self factors.

1. Introduction. 2. The danger theory. 3. Damage-associated molecular pattern (DAMP). 3.1. Characteristics of selected damage-associated molecular pattern (DAMP). 4. Summary

#### TEORIA ZAGROŻENIA ORAZ CZĄSTECZKI NIEBEZPIECZEŃSTWA

**Streszczenie:** Układ odpornościowy ssaków rozwinął wiele mechanizmów pozwalających na skuteczną walkę z czynnikami obcymi, w tym patogenami. W 1994 roku Polly Matzinger ogłosiła teorię zagrożenia, nowy pogląd w immunologii, opisujący w jaki sposób układ odpornościowy reaguje na zagrożenie organizmu, spowodowane uszkodzeniem, ale także i obecnością patogenów. Teoria ta wnosi odmienne spojrzenie na obowiązujący dotychczas pogląd, według której układ odpornościowy rozróżnia struktury własne od obcych i reaguje wyłącznie na czynniki obce. Według teorii zagrożenia, układ odpornościowy posiada zdolność weryfikacji czynników bezpiecznych i niebezpiecznych, a więc teoria ta tłumaczy reakcje immunologiczne powstające m.in. na skutek uszkodzenia tkanek, określane „sterylnym zapaleniem”, ale także powstające w czasie zakażenia. Podstawowym i fundamentalnym elementem w tej teorii są cząsteczki sygnalizujące niebezpieczeństwo lub uszkodzenie – cząsteczki DAMP (Damage/ Danger-Associated Molecular Patterns), uwalniane z uszkodzonych lub martwych tkanek, choć są one także obecne w stanach fizjologicznych, które warunkują analogiczną odpowiedź immunologiczną do tej, która zgodna jest z założeniami self/non-self.

1. Wstęp. 2. Teoria zagrożenia. 3. Wzory cząsteczkowe związane z uszkodzeniem. 4. Charakterystyka wybranych cząsteczek zagrożenia – niebezpieczeństwa. 5. Podsumowanie

**Key words:** danger theory, danger factors, DAMP

**Słowa kluczowe:** teoria zagrożenia, cząsteczki zagrożenia, DAMP

## 1. Introduction

The immune system (IS) of mammals, including humans, is the most important line of defence against foreign factors, including microbes. According to the theory presented so far in immunology, the basic and specific function of IS is to distinguish between its own (self) and foreign (non-self), which is connected with the necessity to commence reactions to foreign substances – including pathogens. The key role in the functioning of mammalian IS is played by the mechanisms of innate response, often identified with a non-specific response, which provides a quick but non-specific response, in contrast to the acquired response, which is specific but emerges later. In 1994, Polly Matzinger published a work entitled “Tolerance, danger, and the extended family” [63], in which she presented

a new view on the functioning of the IS, called the theory of danger, different from the current assumptions in immunology (self/non-self). The basic elements in the announced theory are Danger (Danger-Associated Molecular Patterns), also known as danger signals or alarmins. Their presence causes the initiation of the IS reaction, despite the fact that these are often their own – endogenous elements of the macroorganism (Table I). Diagnosis of DAMP factors as well as pathogen-associated molecular patterns – PAMP, found on bacteria, viruses, fungi and protozoa, is possible thanks to PRR (Pattern Recognition Receptors) receptors present on IS cells [55], which leads to the activation of the immune system. A classic example of PRR receptors are, among others toll-like receptors – TLR, constituting a link between specific and nonspecific immunity. This group also includes C-CLR type recep-

\* Corresponding author: Beata Tokarz-Deptuła, prof. US, Department of Immunology, Faculty of Biology, University of Szczecin, ul. Felczaka 3C, 71-412 Szczecin; phone: 91 444 1605; e-mail: beata.tokarz-deptula@usz.edu.pl

tors (C-Type Lectin Receptors), RIG-I-like receptors – RLRs, cytosolic DNA receptors – CDS and NOD-like receptors – NLR [54].

## 2. The danger theory

In 1960, Burnet and Medawar received the Nobel Prize in the field of physiology and medicine, for describing the phenomenon of immunological tolerance, according to which the fundamental principle of operation of IS, is the ability to distinguish self-antigens from non-self ones [13]. This hypothesis was formulated a few years earlier by Burnet and Fenner [14], assuming that if during the embryonic development, cells from a genetically distinct animal breed are implanted, then the response and production of antibodies against foreign molecules should not develop. Unfortunately, these authors were unable to prove their hypothesis experimentally and it was not until 1953 that it was confirmed by examining mouse splenocytes implanted into the embryos of mice belonging to “genetically distant” breeds [7]. Such individuals acquired the characteristics of donor mice, for example, adults (recipient mice) accepted grafts of skin and other tissues, but only from the species of the donor mouse. Meanwhile, the theory of danger [63] assumes that for IS, the identification of dangerous factors (DAMP) and their presentation is more important than recognizing foreign factors for the organism. According to this theory, an antigen can be ignored by IS, if it is not considered dangerous for the body and in such a case the immune response leading to its elimination will not develop. Thus, in the process of recognizing an antigen, a danger signal (DAMP) should appear, which will allow for proper interpretation of the situation and undertaking appropriate actions. These signals are elements of the body’s own cells and tissues, secreted, e.g. during their damage, injury or infection (Table I). The danger theory, although controversial, is accepted by many researchers, because it explains, among others, the phenomenon of triggering an immune response as a result of the interaction of one’s own, endogenous elements of the body, emerging, e.g., during tissue damage [63, 107]. It is known that with severe injury or surgery under sterile conditions, the so-called “sterile inflammation” may result, which, although formed only as a result of tissue damage, is characterized by the typical symptoms of inflammation which occur during infection, such as redness, elevated temperature, swelling and pain [66]. During this condition, there occurs cell death, which causes the build-up of effector elements of innate immunity, including PMN cells (Polymorphonuclear Cells), which by eliminating it, begin “physiological healing” of damaged tissues [50]. Due to the huge

arsenal of compounds found in PMN cells, causing, among others, hydrolysis and oxidation, considerable destruction of the surrounding tissues may follow [90]. This explains the occurrence of pathological changes in response to “sterile inflammation”, which is found, inter alia, in injuries, ischemia and infarctions, autoaggression and even liver damage caused by drugs [50, 60, 97]. Hence, an important fact for the understanding of the role of innate immunological elements in these conditions is their participation in the response to tissue damage and “sterile inflammation”, which can lead to systemic inflammatory response syndrome – SIRS, which is a condition clinically resembling the reaction occurring, among others, in hematosepsis [23]. In addition, it has been proved that prolonged “sterile inflammation” in the organism can become the cause of disease conditions, seemingly unrelated to each other, starting from Alzheimer’s disease [5], through steatohepatitis [43], to atherosclerosis [38] or gout [16]. It is known that during “sterile inflammation”, there appear DAMP factors, which intensify immunological system reactions by activating antigen presenting cells – APC, which capture DAMP molecules from the surrounding environment and after passing to lymph nodes, they transmit them to the virgin T-lymphocytes. As only APCs can stimulate virgin T lymphocyte, and consequently initiate a primary response, this is why APCs need to recognize the danger-threat signal (DAMP). If the threat signal is received by the APCs (the first signal), then the molecules of the second signal, activating Th-lymphocytes, are expressed, which leads consequently to the development of the immune response. The particles of the second signal, i.e. the so called costimulation signal are present on the cell presenting the antigen. By combination with appropriate molecules on the T-lymphocyte, they enhance the effect of T-cell presentation and stimulation. This effect refers particularly to the CD28 molecule on the T-lymphocyte, binding to CD80 and CD86 molecules on the APC, as well as semaphoresins which bind to CD72 and plexins, as well as TIM-1 and -3 molecules. In order to activate the T-lymphocyte, also signals transmitted by cytokines are needed, e.g. IFN type I, IL-1, -12, -18. The impact of these additional interactions on the activation of T-lymphocytes is called “signal II”. If, however, the DAMP signal is not received by APC cells and there is no expression of the molecules of the second signal with participation of Th-lymphocytes, it leads to clonal anergy and/or apoptosis of the Th-lymphocytes. In addition to the diagnosis and presentation of DAMP factors by APCs, an important aspect in the hazard theory is also the way in which the IS determines the effector character of the response to these factors. This is related to the type of cellular or humoral response of the organism and the class of antibodies produced [78].

Also, the response of IS to DAMP depends on the type of tissue in which it occurs, for example in the eye or gastrointestinal tract, local inhibition of the response by specific mediators may occur, e.g. The transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ) [65]. It is also an important factor in the theory of danger, which distinguishes it from the prevailing view in immunology, whereby the nature of the effector phase of the immune response depends only on the factor that triggers this response [1].

### 3. Damage-associated molecular pattern (DAMP)

Molecules associated with danger (DAMP) (Table I), are basically proprietary – endogenous factors initiating the immune response [6], which come from damaged and/or dead cells, as well as from the cells being in a state of biological stress – infection, which always equals threat and danger for the host [6]. The studies presented by Matzinger's team [30] indicate that DAMP molecules are in fact stress signals for IS cells. This leads to the release of endogenous substances and signals that activate cells recognizing an antigen. It has also been demonstrated that danger signals (DAMP) can also directly activate dendritic cells – DC, macrophages, neutrophils, NK cells and T-cells with the  $\gamma\delta$  receptor [30]. DAMP molecules may also affect the maturation of DC and neutrophil cells, as well as support the opsonization and absorption of dying cancer cells [35]. Among DAMP factors also such have been described that do not exhibit activating effect on IS elements, remain neutral or even effect inhibition [34, 61]. It has been shown that DAMP molecules such as, for example, annexin 1 (ANXA1), phosphatidylserine (PtdSer), death domain (DD1 $\alpha$ ), prostaglandin E2 (PGE2), potassium ions (K<sup>+</sup>) and some molecules present in the extracellular matrix, e.g. hyaluronan, fibronectin A or fibrinogen – responsible for maintaining tissue homeostasis, may even lead to avoiding the immune response and exert immunosuppressive influence [61]. It has also been described that some DAMP molecules, e.g. the high electrophoretic mobility protein – HMGB1 (High Mobility Group Box 1), undergo post-translational modification – oxidation or citrullination, which can inactivate, enhance or alter its immunogenic properties [87]. Most alarmins, however, have immunity-stimulating effect on IS elements through, among others, binding to specific PRRs, such as TLRs [6, 72], purinergic P2 receptors, proteins associated with the low density lipoprotein receptor (LRP1), formyl receptors (FPR1) or advanced endoprotein glycation (RAGE) receptors [34].

It is known that stress factors – potential DAMP factors, can be physical (mechanical and thermal), chemical (toxins) and biological (infection) and may lead to

cell death each time, including necrosis and apoptosis [33, 24], during which DAMP molecules are released (Table I) [33, 61]. It should be added that necrosis arising as a result of injury, damage or caused by the presence of germs and toxins, is a process characterized by the loss of membrane integrity. Apoptosis, on the other hand, is a process which can also occur as a physiological phenomenon [61,80], hence the response – the host's response to these two forms of cell death is different [50]. Necrosis causes an inflammatory response [61], which is not observed during apoptosis, because it proceeds with the preservation of the continuity of membranes, and the intracellular contents of the cell is not released [46]. Notwithstanding the fact that the process of the cells subjected to these two types of death is different, the elements released as a result of these processes are quickly “taken over” by IS cells, in the process of phagocytosis – in the course of necrosis, among others by PMN cells residing there and through the macrophage efferocytosis process – in the case of apoptosis [27]. During these two processes, IS cells release many DAMP factors (Table I) which have modulating influence on IS elements through the production of inflammation mediators, and also on substances such as IL-10 and TGF- $\beta$  which inhibit inflammation [46]. It has been demonstrated that the DAMP molecules released during necrosis and apoptosis are characterised by such a degree of harmonious and coordinated action that it can result in inflammation, affecting various systems and organs, consequently forming the so-called inflammation network [94, 95].

#### 3.1. Characteristics of selected damage-associated molecular pattern (DAMP)

Amongst the danger molecules – DAMP (Table I), one of the best-described ones is the Heat Shock Protein – HSP group [12, 17, 64, 65, 75, 81, 100]. These proteins, despite their name, are not produced only in response to burns or overheating of the organism, but their synthesis occurs also as a result of damaging factors impacting the cell [100]. The presence of HSP was established during necrosis caused by unfavourable conditions for cell functioning or caused by the presence of pathogens. These proteins also appear as a result of the activity of other DAMP molecules, such as, for example, fibronectin – element of the extracellular matrix, released from damaged tissues, which by activating the TLR4 receptor leads to the diagnosis and presentation of HSP [17]. It has been demonstrated that the HSP protein – being a DAMP molecule, allows the macroorganism to detect threats, even when the pathogen causing this condition has not yet been detected by the IS [17]. Thus, these proteins constitute an unusual DAMP molecule, which in principle does

Table I  
Damage-associated molecular pattern (DAMP)

Origin	Name of DAMP	Receptors	References
DAMPs released during cell necrosis	Heat shock proteins (HSP70, HSP90, HSP60, HSP72, HSP90B1)	CD91, TLR2, TLR4, SREC-1 I FEEL-1	[12]
	Adenosine triphosphate (ATP)	P2Y2, P2X7	[35]
	Mitochondrial DNA (MtDNA)	TLR9	[31]
	High mobility group box 1 protein (HMGB1)	TLR2, TLR4, RAGE, TIM3	[40]
	IL-1 $\alpha$	IL-1R	[20]
	IL-33	ST2	[41]
	Cathelicidin /LL-37	FPRL1, TLR7,8,9, P2X7, EGFR, MRGX2, CXCR2	[111]
	Defensins ( $\alpha$ , $\beta$ )	CCR2, CCR6, TLR4	[111]
	High mobility group nucleosome binding domain 1 (HMGN1)	TLR4	[103]
	Protein S100	RAGE	[36]
	Interferons (IFNs)	TLR3	[6]
	Reactive oxygen species (ROS)	no data	[77]
	Prostaglandin E2 (PGE <sub>2</sub> )	EP1-4	[39]
	Potassium ions (K <sup>+</sup> )	-	[25]
	Calreticulin (CARL)	LRP1	[73]
	Granulysin	TLR4	[56]
	Eosinophil-derived neurotoxin (EDN)	TLR2	[111]
	Nucleic acids, dsRNA, dsDNA	TLR3, TLR7/8, TLR9	[32]
	Cyclophilin A	CD147	[53]
	Cytochrome C	LPG	[79]
	F-actin	DNGR-1/ CLEC <sub>9</sub> A	[3]
	Galectin	TLR2	[48]
	Thioredoxin	NLRP3	[119]
Uric acid	purinergic	[92]	
Peptide-based nanofiber (NFP)	FPR1	[18]	
Histones	TLR9	[45]	
Programmed death-ligand 1 (PD-L1)	PD-1	[118]	
Peroxiredoxin (Prx1)	TLR4	[85]	
DAMPs released during cell apoptosis	Heat shock proteins (HSP70, HSP90, HSP60, HSP72, HSP90B1)	CD91, TLR2, TLR4, SREC-1 I FEEL-1	[12]
	Adenosine triphosphate (ATP)	P2Y2, P2X7	[35]
	Defensins ( $\alpha$ , $\beta$ )	CCR2, CCR6, TLR4	[111]
	Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	no data	[77]
	Annexin 1(ANXA1)	FPR-1	[105]
	Phosphatidylserine (PtdSer)	TIM-1/-3/-4, BAI1, Stabilin-2, MFG-E8, C1q	[46]
	Cardiolipin	no data	[93]
	Sphingosine-1-phosphate (S1P) and ceramide 1-phosphate (C1P)	no data	[51]
	Lysophosphatidylcholine (LPC)	G2A	[58]
	Calreticulin (CARL)	CD91	[73]
	Death domain (DD1 $\alpha$ )	DD1 $\alpha$	[116]
	Thrombospondin 1 (THBS1)	$\alpha_v\beta_3$	[52]
	Nucleic acids, dsRNA, dsDNA	TLR3, TLR7/8, TLR9	[32]
	Programmed death-ligand 1 (PD-L1)	PD-1	[118]
	Peroxiredoxin (Prx1)	TLR4	[85]

Table I. Continued

Origin	Name of DAMP	Receptors	References
DAMPs released during extracellular matrix proteolysis	Hyaluronan	TLR2, TLR4	[89]
	Fibronectin	TLR4	[89]
	Fibrinogen	TLR4	[89]
	Biglycan	TLR2, TLR4, P2X4, P2X7	[89]
	Heparan sulfate	TLR4	[89]
	Tenascin C	TLR4	[37]
	Versikan	TLR2, TLR6, CD14	[89]

not occur outside the cellular matrix under normal-physiological conditions [17]. Regardless of the reasons for the appearance of HSP outside the cell, these proteins activate APC cells, which is a signal to start an immune response, although Hasps may also act as chaperones in the field of an adaptive immunity [75]. It has been shown that the increased level of the HSP70 protein, occurring, among others, as a result of severe traumatic brain injury, causes pro-inflammatory reactions by increasing the amount of adhesion molecules and secretion of cytokines and chemokines by IS cells [22, 81]. An increase in the HSP protein level occurs also during extensive surgical procedures and injuries, which results in an increased level of serum procalcitonin [67], an increased level of glucose and increased number of white blood cells [88, 115]. A high level of HSP proteins may be associated with infection, hence it is assumed that understanding the kinetics of HSP release is the way to use them as helpful biomarkers in monitoring, diagnosing and even treating various pathological conditions [84].

ATP is an important molecule of DAMP as well, being a basic energy unit used in cellular metabolism. Cells damaged due to, among others, physical, chemical or biological stress (infection) – secrete ATP, which becomes a DAMP molecule, warning IS cells about impending threat and mobilizing rapid inflammatory response [35]. As has been shown, an acute inflammatory reaction to plaque bacteria in humans leads to periodontal diseases [76], and the resultant inflammation causes tissue damage resulting in intracellular release of ATP into extracellular space. This extracellular ATP is an example of a DAMP molecule in multicellular organisms, secreted each time during injuries in order to trigger inflammatory reactions, but also during the beginning of the healing process through the stimulation of purinergic receptors [15]. It has been demonstrated that extracellular ATP, by signalization of the P2X7 receptor, is one of the best-performing activators of Nlrp3 inflammasome, which mediates in production of inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  [47, 50, 96]. The research by McDonald et al. [66], demonstrated that mice which had been given antibodies to the recombi-

nant IL-1 receptor antagonist – (IL-1R) which blocked IL-1 $\beta$ ), had increased adhesion and decreased neutrophil migration ability, so neutrophils did not proceed to inflammatory sites [66].

Another highly significant danger molecule (DAMP) is the mitochondrial DNA (MtDNA), which activates IS mainly due to its evolutionary origin and striking similarities between mitochondria and bacteria. According to the endosymbiotic theory, bacteria capable of conducting gas exchange were incorporated into eukaryotic cells as a result of endocytosis [99]. Due to the similarity of the activation of molecular pathways, both in bacterial infection and in the case of macroorganism injury, danger molecules (DAMP) may occur, as well as the formation of immune response and even the occurrence of systemic inflammatory syndrome – SIRS [28, 59, 114]. Although no direct correlation has been established between the development of SIRS and the release of mitochondrial components during cell damage and injury, it has been demonstrated that MtDNA levels are significantly higher in injured patients. It has been proved that DAMP molecules of mitochondrial origin play a role in heart diseases, arthritis, liver diseases, trauma and in the above-mentioned SIRS reaction in humans [57, 74, 98]. Studies on mice have also shown that MtDNA injected into animals causes SIRS and lung damage. Therefore, it has been assumed that the release of MtDNA may be the missing element of the connection between tissue damage and the so-called sterile inflammation, and even SIRS [82]. As an example, it has been demonstrated that the condition associated with brain stroke, or a condition occurring during extensive fractures, during which MtDNA is often released into blood circulation, often leads to the development of acute lung injury. It has been established that in patients with trauma and with SIRS, the production of ATP molecules in mitochondria decreases, which in turn causes exhaustion of its resources and cell death [80]. It has been proved that during an injury, inflammation and SIRS, mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS), which can regulate the level of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B in immune cells, is also higher, and thus can trigger an inflammatory

response [80]. This mitochondrial DNA secreted in the course of injury, can also directly activate neutrophils by binding to their TLR9 receptor, which results in the activation of the intracellular signalling pathway p38 MAPK [104, 117]. Moreover, the presence of MtDNA causes MN (Mononuclear Cells) cells to secrete pro-inflammatory cytokines, although the MtDNA molecules are also direct mediators in inducing apoptosis during injuries or SIRS [80]. It has been demonstrated that during SIRS, not only the RIPK protein kinase pathway [23] is activated, but also the “signalling complex” leading to necrosis [23, 108]. In experimental studies, it was shown that the deletion of RIPK3 kinase in mice protects them from death during the course of sterile inflammation and SIRS [23]. In animals with RIPK3 deficiency, plasma levels of MtDNA have been found to be low, which suggests a relationship between the lack of RIPK3 and lesser tissues damage [23]. Therefore, mitochondria, in addition to the function of ATP generation and involvement in apoptosis, play an important role in activating innate immunity, because they contain components of their bacterial antigens which are potentially immunogenic [10].

The next important DAMP molecule is the pro-inflammatory protein HMGB1 [101], known mainly as a transcription factor or nuclear DNA-binding protein [69]. This protein is commonly found in all types of nucleated cells, and its secretion from monocytes can be stimulated by PAMP, cytokines and the factor activating the complement component – C5a [86]. The HMGB1 protein is also released from necrotic cells, which results in the stimulation of innate immunity [69]. It has been proved that after primary nuclear retention in apoptotic cells, due to increased cellular permeability and nucleosome degradation, HMGB1 is released during later stages of apoptosis [40]. This protein, in inflammatory conditions, shows pleiotropic effects in organs, because, among others, it affects the activation of phagocytic cells and endothelial cells, but also conditions the loss of epithelial barrier functions, what leads to typical symptoms of inflammation and pathological state [102]. HMGB1, through activation of UTO cell chemotaxis, vascular angiogenesis, dendritic cell maturation, as well as recruitment and proliferation of stem cells, promotes processes of defence, repair and regeneration of tissues [49]. This protein strengthens inflammatory response by binding endogenous and exogenous inflammatory mediators, such as cytokines and LPS (Lipopolysaccharide) [2, 91], although inflammation promoted by this protein is mediated by the redox receptor associated with the HMGB1 molecule [40]. The HMGB1 protein has been shown to influence cells involved in the initiation of a rapid and long-lasting inflammatory response via TLR and RAGE receptors. In the process of necrosis of cells, including cancer cells, the HMGB1 protein

can be secreted in passive way [26, 83] and then it is a typical DAMP molecule [101]. It should be added that dying cancer cells secreting DAMP molecules in the form of the HMGB1 protein, and also HSP, ATP, or the calcium binding protein S100, “program” the nature of the remaining cells’ death [50].

Whether the death of these cells will be of immunogenic character – activation of the IS response directed against cancer cells, or non-immunogenic – incapable of such response, depends to a large extent on the activity of DAMP molecules. It has been established, that the avoidance of the immune response by cancer cells is a result of blocking DAMP signals released from dying and dead cells. It has been shown that during immunological death of mice cancer cell lines, DAMP molecules, such as HSP70 and HSP90 [29] and calreticulins (CARL) are secreted [73]. However, in the process of cancer cell death induced by chemotherapeutics (Doxorubicin, Mitoxantrone, Oxaliplatin or Bortezomib), the HMGB1 protein [4], Annexin A1 (ANXA1) [106] and ATP [68] are secreted.

Other DAMP molecules, the presence of which indicates the initiation of an immune response, are interleukins, e.g. IL-1 $\alpha$  and IL-33, which have a dual function, being extracellular mediators of inflammation and additionally intracellular transcription factors [41]. In addition, IL-33 is one of the first DAMP molecules which “alert” IS cells of pathogenic intrusion into the defensive barrier of the intestinal epithelial [11, 42, 62], although this interleukin also participates in the process of the polarisation of Th2-cells [62]. When in danger, caused e.g. by the penetration of a pathogen into the macroorganism, IL-33 activates cells of the innate immune response to start type 2 responses – involving Th2-cells, and activates synthesising IL-4, -5, -9 and -13, which are important, for example, in rebuilding a barrier compromised by pathogens [21]. IL-33 is therefore a unique cytokine, because it acts as a traditional extracellular cytokine and a nuclear transcription factor.

It should be added that many danger molecules, such as cathelicidins/LL-37, defensins, HMGN1 (High Mobility Group Nucleosome Binding Domain 1), S100 protein and the previously characterized HMGB1 protein, have direct anti-microbial activity, eliminating pathogens and influencing the microflora of the macroorganism, which regulates the immune response [36, 109, 111]. It has been demonstrated that cathelicidin – a peptide belonging to natural AMP proteins, stimulates TLR7, 8, 9, or P2X7 receptors [19] found on neutrophils, macrophages, DC cells and fibroblasts leading to the production of inflammatory mediators such as TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$  (Interferon) or PGE2, and also activates the migration of neutrophils, monocytes and T-lymphocytes [111, 113] – which determine the early response of the organism to the threat. It has been recorded that patients with atopic

dermatitis, a typical inflammatory disease encompassing Th-2 cells, do not produce catelicidin/LL-37 due to high levels of IL-4 and IL-13, what significantly reduces their antiviral resistance [44]. Also defensins, as DAMP molecules belonging to natural antibiotics, protect the skin, mucous membranes of the gastrointestinal tract, genitourinary system and respiratory system, acting in an antibacterial, anti-inflammatory, but also antifungal and antiparasitic way [70]. These peptides activate DC cells through TLR4 or TLR7 / 8/9 receptors for the purpose of the production of TNF $\alpha$ , IL-6 or IFN [8], thereby enhancing immunity. It has been discovered that  $\beta$ -defensins in humans, rabbits and guinea pigs activate degranulation of mast cells, which leads to releasing histamine and prostaglandin D2 (PGD2) – inflammation mediators [71].  $\beta$ -defensin of mice has also been shown to stimulate immature DC cells and their maturation, and human  $\alpha$ -defensin introduced into the culture of mouse macrophages increases the capacity of these cells for phagocytosis. Also, the HMGN1 protein is dependent in its direct activity as a DAMP molecule on the response associated mainly with Tc [109] and Th1 [110] lymphocytes – although it also increases anti-cancer immunity [9, 103, 112], which is evidenced by the occurrence of thymoma and other malignant tumors in mice with a deficiency of this protein. Also, the S100 protein, similarly to HMGN1, enhances anti-cancer immunity by activating DC cells and macrophages [33, 36]. It has been demonstrated that the S100 protein, by inhibiting the activity of these cells, causes hyperplasia of tumour lines [109].

#### 4. Summary

The theory of danger and the threat-danger molecules (DAMP) associated therewith, explain certain phenomena in pathophysiology which are difficult to explain basing on the prevailing self/non-self theory, for example tissue damage due to injury, the phenomenon of “sterile inflammation” or understanding the course of cell destruction as a result of physical, chemical or biological stress. Elements of this theory – DAMP molecules, have their role and share in supplementing knowledge about maintaining an organism’s immunological homeostasis and the development of the response of IS in, for example, injuries, infections and also in the process of malignant tumour development.

#### Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659 / P-DUN / 2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

#### References

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.: Cellular and molecular immunology, Red. 4., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000
2. Abraham E.: Unraveling the role of high mobility group box protein 1 in severe trauma. *Critical Care*, **13**, 1004 (2009)
3. Ahrens S., Schulz O. *et al.*: F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity*, **36**, 635–645 (2012)
4. Apetoh L., Zitvogel L. *et al.*: The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol. Rev.* **220**, 47–59 (2007)
5. Banjara M., Ghosh C.: Sterile Neuroinflammation and Strategies for Therapeutic Intervention. *Int. J. Inflamm.* **2017**, 8385961 (2017)
6. Bianchi M.E.: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leuk. Biol.* **81**, 1–5 (2007)
7. Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B.: Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, **172**, 603–606 (1953)
8. Biragyn A., Kwak L.W. *et al.*: Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, **298**, 1025–1029 (2002)
9. Birger Y., Catez F., Furusawa T., Lim J.H., Prymakowska-Bosak M., West K.L., Postnikov Y.V., Haines D.C., Bustin M.: Increased tumorigenicity and sensitivity to ionizing radiation upon loss of chromosomal protein HMGN1. *Cancer Res.* **65**, 6711–6718 (2005)
10. Bonawitz N.D., Clayton D.A., Shadel G.S.: Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell.* **24**, 813–825 (2006)
11. Bonilla W.V., Pinschewer D.D. *et al.*: The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8 T cell responses. *Science*, **335**, 984–989 (2012)
12. Borges T.J., Lang B.J., Lopes R.L., Bonorino C.: Modulation of alloimmunity by heat shock proteins. *Front. Immunol.* **7**, 303 (2016)
13. Burnet F.M.: Immunological recognition of self. Nobel Lecture, (1960)
14. Burnet F.M., Fenner F.: The production of antibodies, wyd. 2., Macmillan, Melbourne, 1949
15. Burnstock G., Fredholm B.B., North R.A., Verkhatsky A.: The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol.* **199**, 93–147 (2010)
16. Busso N., So A.: Mechanisms of inflammation in gout. *Arthritis Res. Ther.* **12**, 206 (2010)
17. Calderwood S.K., Stevenson M.A., Murshid A.: Heat shock proteins, autoimmunity and cancer treatment. *Autoimmune Dis.* **2012**, 486069 (2012)
18. Carp H.: Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemottractants for neutrophils. *J. Exp. Med.* **155**, 264–275 (1982)
19. Chotjumlong P., Bolscher J.G., Nazmi K., Reutrakul V., Supancharat C., Buranaphatthana W., Krisanaprakornkit S.: Involvement of the P2X7 purinergic receptor and c-Jun N-terminal and extracellular signal-regulated kinases in cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 induction by LL-37. *J. Innate Immun.* **5**, 72–83 (2013)
20. Cohen I., Rider P., Carmi Y., Braiman A., Dotan S., White M.R., Voronov E., Martin M.U., Dinarello C.A., Apte R.N.: Differential release of chromatin-bound IL-1 $\alpha$  discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 2574–2579 (2010)
21. Cohen E.S., Mustelin T. *et al.*: Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat. Commun.* **6**, 8327 (2015)

22. Da Rocha A.B., Regner A. *et al.*: Serum Hsp70 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. *J. Neurotrauma*, **22**, 966–977 (2005)
23. Duprez L., Takahashi N., van Hauwermeiren F., Vandendriessche B., Goossens V.: RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity*, **35**, 908–918 (2011)
24. Działo J., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Excitotoxicity and Wallerian degeneration as a processes related to cell death in nervous system. *Arch. Ital. Biol.* **151**, 67–75 (2013)
25. Eil R., Restifo N.P. *et al.*: Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature*, **537**, 539–543 (2016)
26. Ellerman J.E., Brown C.K., de Vera M., Zeh H.J., Billiar T., Rubartelli A., Lotze M.T.: Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2836–2848 (2007)
27. Elliott M.R., Koster K.M., Murphy P.S.: Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.* **198**, 1387–1394 (2017)
28. Faist E., Wichmann M.W.: Immunology in the severely injured. *Der Chirurg*, **68**, 1066–1070 (1997)
29. Fucikova J., Spisek R. *et al.*: Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP-associated processes in cancer. *Front. Immunol.* **6**, 402 (2015)
30. Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P.: Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* **5**, 1249–1255 (1999)
31. Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G.: Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 780–788 (2012)
32. Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S., Facchinetti V., Homey B., Barrat F.J., Zal T., Gilliet M.: Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* **206**, 1983–1994 (2009)
33. Garg A.D., Agostinis P.: Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. *Immunol. Rev.* **280**, 126–148 (2017)
34. Garg A.D., Agostinis P. *et al.*: Molecular and translational classifications of DAMPs in immunogenic cell death. *Front. Immunol.* **6**, 588 (2015)
35. Garg A.D., Agostinis P. *et al.*: A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J.* **31**, 1062–1079 (2012)
36. Ghavami S., Kerkhoff C., Los M., Hashemi M., Sorg C., Karami-Tehrani F.: Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 169–175 (2004)
37. Goh F.G., Piccinini A.M., Krausgruber T., Udalova I.A., Midwood K.S.: Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J. Immunol.* **184**, 2655–2662 (2010)
38. Grasset E.K., Duhlin A., Agardh H.E., Ovchinnikova O., Hägglöf T., Forsell M.N., Paulsson-Berne G., Hansson G.K., Ketelhuth D.F., Karlsson M.C.: Sterile inflammation in the spleen during atherosclerosis provides oxidation-specific epitopes that induce a protective B-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 2030–2038 (2015)
39. Hangai S., Ao T., Kimura Y., Matsuki K., Kawamura T., Negishi H., Nishio J., Kodama T., Taniguchi T., Yanai H.: PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3844–3849 (2016)
40. Harris H.E., Andersson U., Pisetsky D.S.: HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 195–202 (2012)
41. Hirsiger S., Simmen H.P., Werner C.M., Wanner G.A., Rittirsch D.: Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm.* **2012**, 315941 (2012)
42. Hodzic Z., Schill E.M., Bolock A.M., Good M.: IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. *Cytokine*, **100**, 1–10 (2017)
43. Hoque R., Farooq A., Mehal W.Z.: Sterile inflammation in the liver and pancreas. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 61–67 (2013)
44. Howell M.D., Gallo R.L., Boguniewicz M., Jones J.F., Wong C., Streib J.E., Leung D.Y.: Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity*, **24**, 341–348 (2006)
45. Huang H., Tsung A. *et al.*: Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*, **54**, 999–1008 (2011)
46. Huynh M.L., Fadok V.A., Henson P.M.: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* **109**, 41–50 (2002)
47. Iyer S.S., Sutterwala F.S. *et al.*: Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20388 (2009)
48. Jouault T., El Abed-El Behi M., Martínez-Esparza M., Breuill L., Trinel P.A., Chamaillard M., Trottein F., Poulain D.: Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J. Immunol.* **177**, 4679–4687 (2006)
49. Klune J.R., Dhupar R., Cardinal J., Billiar T.R., Tsung A.: HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.* **14**, 476–484 (2008)
50. Kono H., Rock K.L.: How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 279 (2008)
51. Korbelik M., Banáth J., Sun J., Canals D., Hannun Y.A., Separovic D.: Ceramide and sphingosine-1-phosphate act as photodynamic therapy-elicited damage-associated molecular patterns: cell surface exposure. *Int. Immunopharmacol.* **20**, 359–365 (2014)
52. Krispin A., Bledi Y., Atallah M., Trahtemberg U., Verbovet-ski I., Nahari E., Zelig O., Linial M., Mevorach D.: Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states. *Blood*, **108**, 3580–3589 (2006)
53. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P.: Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 860–875 (2012)
54. Kumar H., Bot A.: In this tissue: Innate immunity and infectious diseases-an update. *Int. Rev. Immunol.* **36**, 55–56 (2017)
55. Kumar H., Kawai T., Akira S.: Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* **30**, 16–34 (2011)
56. Kumar J., Okada S., Clayberger C., Krensky A.M.: Granulysin: a novel antimicrobial. *Expert Opin Investig Drugs*, **10**, 321–329 (2001)
57. Lam N.Y., Rainer T.H., Chiu R.W., Joynt G.M., Lo Y.M.: Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma. *Clin. Chem.* **50**, 213–216 (2004)
58. Lauber K., Wesselborg S. *et al.*: Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, **113**, 717–730 (2003)
59. Lenz A., Franklin G.A., Cheadle W.G.: Systemic inflammation after trauma. *Injury*, **38**, 1336–1345 (2007)
60. Liu Z.X., Han D., Gunawan B., Kaplowitz N.: Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, **43**, 1220 (2006)
61. Majno G., Joris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3–15 (1995)



62. Martin N.T., Martin M.U.: Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin *Nat. Immunol.* **17**, 122–131 (2016)
63. Matzinger P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994)
64. Matzinger P.: An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* **10**, 399–415 (1998)
65. Matzinger P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science*, **296**, 301–305 (2002)
66. McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S.A., Slaba I., Waterhouse C.C., Beck P.L., Muruve D.A., Kubers P.: Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, **330**, 362–366 (2010)
67. Meisner M., Tschakowsky K., Hutzler A., Schick C., Schüttler J.: Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med.* **24**, 680–684 (1998)
68. Michaud M., Kroemer G. *et al.*: Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, **334**, 1573–1577 (2011)
69. Muller S., Scaffidi P., Degryse B., Bonaldi T., Ronfani L.: New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* **20**, 4337–4340 (2001)
70. Niedźwiedzka-Rystwek P., Deptuła W.: Defensins: An important innate element of the immune system in mammals. *Post. Hig. Med. Dosw.* **62**, 524–529 (2008)
71. Niyonsaba E., Someya A., Hirata M., Ogawa H., Nagaoka I.: Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta--defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1066–1075 (2001)
72. Nishiyama T., DeFranco A.L.: Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 19008–19017 (2004)
73. Obeid M., Kroemer G. *et al.*: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007)
74. Oka T., Otsu K. *et al.*: Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*, **485**, 251–255 (2012)
75. Osterloh A., Breloer M.: Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**, 1–8 (2008)
76. Page R.C., Engel L.D., Narayanan A.S., Clagett J.A.: Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. *JAMA*, **240**, 545–550 (1978)
77. Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P. *et al.*: Long-distance apoptotic killing of cells is mediated by hydrogen peroxide in a mitochondrial ROS-dependent fashion. *Cell Death Differ.* **12**, 1442–1444 (2005)
78. Ptak W., Ptak M., Płytycz B.: Co rozpoznaje układ immunologiczny? Na drodze do nowego paradygmatu. *Kosmos*, **2–3**, 149–156 (2003)
79. Pullerits R., Bokarewa M., Jonsson I.M., Verdrengh M., Tarkowski A.: Extracellular cytochrome c, a mitochondrial apoptosis-related protein, induces arthritis. *Rheumatology*, **44**, 32–39 (2005)
80. Power C., Fanning N., Redmond H.P.: Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock*, **18**, 197–211 (2002)
81. Prohászka Z., Singh M., Nagy K., Kiss E., Lakos G., Duba J., Füst G.: Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 17–22 (2002)
82. Raoof M., Zhang Q., Itagaki K., Hauser C.J.: Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1. *J. Trauma*, **68**, 1328–1332 (2010)
83. Raucchi A., Palumbo R., Bianchi M.E.: HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity*, **40**, 285–289 (2007)
84. Ren B., Zou G., Huang Y., Xu G., Xu F., He J., Zhu H., Yu P.: Serum levels of HSP70 and other DAMP proteins can aid in patient diagnosis after traumatic injury. *Cell Stress Chaperones*, **21**, 677–686 (2016)
85. Riddell J.R., Wang X.Y., Minderman H., Gollnick S.O.: Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *J. Immunol.* **184**, 1022–1030 (2010)
86. Rittirsch D., Ward P.A. *et al.*: Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med.* **14**, 551–557 (2008)
87. Rondas D., Mathieu C. *et al.*: Citrullinated glucose-regulated protein 78 is an autoantigen in type 1 diabetes. *Diabetes*, **64**, 573–586 (2015)
88. Rovlias A., Kotsou S.: The blood leukocyte count and its prognostic significance in severe head injury. *Surg. Neurol.* **55**, 190–196 (2001)
89. Schaefer L.: Extracellular matrix molecules: endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 185–190 (2010)
90. Segal A.W.: How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 197–223 (2005)
91. Sha Y., Zmijewski J., Xu Z., Abraham E.: HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J. Immunol.* **180**, 2531–2537 (2008)
92. Shi Y., Evans J.E., Rock K.L.: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, **425**, 516–521 (2003)
93. Sorice M., Circeia A., Cristea I.M., Garofalo T., Di Renzo L., Alessandri C., Valesini G., Esposti M.D.: Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* **11**, 1133–1145 (2004)
94. Tesniere A., Apetoh L., Ghiringhelli F., Joza N., Panaretakis T., Kepp O., Schlemmer F., Zitvogel L., Kroemer G.: Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 504–511 (2008)
95. Tesniere A., Panaretakis T., Kepp O., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G.: Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 3–12 (2008)
96. Tschopp J., Schroder K.: NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 210 (2010)
97. Tsung A., Sahai R., Tanaka H., Nakao A., Fink M.P., Lotze M.T., Yang H., Li J., Tracey K.J., Geller D.A., Billiar T.R.: The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* **201**, 1135–1143 (2005)
98. Walko T.D. III, Bola R.A., Hong J.D., Au A.K., Bell M.J., Kochanek P.M., Clark R.S., Aneja R.K.: Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA: a novel DAMP in pediatric traumatic brain injury. *Shock*, **41**, 499–503 (2014)
99. Wallin I.E.: A note on the morphology of bacteria symbiotic in the tissues of higher organisms. *J. Bacteriol.* **7**, 471–474 (1922)
100. Wallin R.P., Lundqvist A., Moré S.H., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H.G.: Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* **23**, 130–135 (2002)
101. Wang H., Tracey K.J. *et al.*: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, **285**, 248–251 (1999)
102. Wang H., Yang H., Tracey K.J.: Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J. Intern. Med.* **255**, 320–331 (2004)
103. Wei F., Yang D., Tewary P., Li Y., Li S., Chen X., Howard O.M., Bustin M., Oppenheim J.J.: The alarmin HMGN1 contributes to antitumor immunity and is a potent immunoadjuvant. *Can. Res.* **74**, 5989–5998 (2014)
104. West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S.: Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 409–437 (2006)
105. Weyd H., Abeler-Dörner L., Linke B., Mahr A., Jahndel V., Pfrang S., Schnölzer M., Falk C.S., Krammer P.H.: Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8+ T cell immunity. *Plos One*, **8**, e62449 (2013)

106. Vacchelli E., Kroemer G. *et al.*: Chemotherapy-induced anti-tumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science*, **350**, 972–978 (2015)
107. Vance R.E.: A Copernican revolution? Doubts about the danger theory. *J. Immunol.* **165**, 1725–1728 (2010)
108. Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer G.: Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010)
109. Yang D., Han Z., Oppenheim J.J.: Alarmins and immunity. *Immunol. Rev.* **280**, 41–56 (2017)
110. Yang D., Oppenheim J.J. *et al.*: High-mobility group nucleosome-binding protein 1 acts as an alarmin and is critical for lipopolysaccharide-induced immune responses. *J. Exp. Med.* **209**, 157–171 (2012)
111. Yang D., Biragyn A., Hoover D.M., Lubkowski J., Oppenheim J.J.: Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 181–315 (2004)
112. Yang D., Bustin M., Oppenheim J.J.: Harnessing the alarmin HMGN1 for anticancer therapy. *Immunotherapy*, **7**, 1129–1131 (2015)
113. Yang D., Chen Q., Schmidt A.P., Anderson G.M., Wang J.M., Wooters J., Oppenheim J.J., Chertov O.: LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1069–1074 (2000)
114. Yao Y.M., Redl H., Bahrani S., Schlag G.: The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm. Res.* **47**, 201–210 (1998)
115. Yendamuri S., Fulda G.J., Tinkoff G.H.: Admission hyperglycemia as a prognostic indicator in trauma. *J. Trauma*, **55**, 33–38 (2003)
116. Yoon K.W., Lee S.W. *et al.*: Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science*, **349**, 1261669 (2015)
117. Zhang Q., Itagaki K., Hauser C.J.: Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via P38 map kinase. *Shock*, **34**, 55–59 (2010)
118. Zhou J., Hodi F.S. *et al.*: Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma and checkpoint blockade. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 480–492 (2017)
119. Zhou R., Tardivel A., Thorens B., Choi I., Tschopp J.: Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammatory activation. *Nat. Immunol.* **11**, 136–140 (2010)

Agata Poniewierska-Baran<sup>1</sup>, Beata Tokarz-Deptuła<sup>1\*</sup>, Wiesław Deptuła<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w sierpniu 2018 r.

**Streszczenie:** Układ odpornościowy ssaków rozwinął wiele mechanizmów pozwalających na skuteczną walkę z czynnikami obcymi, w tym patogenami. W 1994 roku Polly Matzinger ogłosiła teorię zagrożenia, nowy pogląd w immunologii, opisujący w jaki sposób układ odpornościowy reaguje na zagrożenie organizmu, spowodowane uszkodzeniem, ale także i obecnością patogenów. Teoria ta wnosi odmienne spojrzenie na obowiązujący dotychczas pogląd, według którego układ odpornościowy rozróżnia struktury własne od obcych i reaguje wyłącznie na czynniki obce. Według teorii zagrożenia, układ odpornościowy posiada zdolność weryfikacji czynników bezpiecznych i niebezpiecznych, a więc teoria ta tłumaczy reakcje immunologiczne powstające m.in. na skutek uszkodzenia tkanek, określane „sterylnym zapaleniem”, ale także powstające w czasie zakażenia. Podstawowym i fundamentalnym elementem w tej teorii są cząsteczki sygnalizujące niebezpieczeństwo lub uszkodzenie – cząsteczki DAMP (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns), uwalniane z uszkodzonych lub martwych tkanek, choć są one także obecne w stanach fizjologicznych, które warunkują analogiczną odpowiedź immunologiczną do tej, która zgodna jest z założeniami self/non-self.

1. Wstęp. 2. Teoria zagrożenia. 3. Cząsteczki zagrożenia-niebezpieczeństwa. 4. Charakterystyka wybranych cząsteczek zagrożenia – niebezpieczeństwa. 5. Podsumowanie

#### DANGER THEORY AND DAMAGE-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS

**Abstract:** The immune system of mammals has developed many mechanisms to effectively defend itself against foreign factors, including pathogens. In 1994, Polly Matzinger published a theory of danger, a new view in immunology, describing the response of the immune system to danger, caused by trauma and/or presence of pathogens. This theory sheds a different view on the current belief, that the immune system distinguishes between own (self) and foreign (non-self) structures and reacts only to non-self factors. According to the danger theory, the immune system has the ability to verify “safe” and “dangerous” factors, thus explaining immune reactions caused by tissue damage, referred to as “sterile inflammation”, but also occurring during the infection. It is believed that the fundamental elements in danger theory are dangerous molecules i.e. – damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are released from damaged or dead tissue and cells. They are also present in physiological conditions and give analogous immune response to these induced by self/ non-self factors.

1. Introduction. 2. Danger theory. 3. Damage-associated molecular patterns. 4. Characteristics of selected damage-associated molecular patterns. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** teoria zagrożenia, cząsteczki zagrożenia, DAMP

**Key words:** danger theory, danger factors, DAMP

### 1. Wprowadzenie

Układ odpornościowy (UO) ssaków, w tym człowieka, stanowi najważniejszą linię obrony przed czynnikami obcymi, w tym drobnoustrojami. Według dotychczas głoszonej teorii w immunologii, podstawową i swoistą funkcją UO jest rozróżnianie cząsteczek swoich/własnych (self) od obcych (non-self), co wiąże się z koniecznością rozpoczęcia reakcji wobec substancji obcych – w tym patogenów. Kluczową rolę w funkcjonowaniu UO ssaków, pełnią mechanizmy odpowiedzi wrodzonej, często utożsamiane z odpowiedzią nieswoistą, która zapewnia szybką, ale niespecyficzną reakcję, w przeciwieństwie do odpowiedzi nabytej, która jest specyficzna, ale powstaje później. W 1994 roku Polly Matzinger, opublikowała pracę pt. „Tolerance, danger, and the extended family” [63], w której przedstawiła

nowy pogląd dotyczący funkcjonowania UO, zwany teorią zagrożenia, odmienną od dotychczasowych założeń w immunologii (self/non-self). Podstawowymi elementami w ogłoszonej teorii są cząsteczki zagrożenia – niebezpieczeństwa – DAMP (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns), nazywane także sygnałami niebezpieczeństwa (danger signals) lub alarmami (alarmins). Ich obecność powoduje rozpoczęcie reakcji UO, pomimo, iż są to często własne – endogenne elementy makroorganizmu (Tabela I). Rozpoznanie przez UO czynników DAMP, a także molekularnych wzorców związanych z patogenami – PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), występujących na bakteriach, wirusach, grzybach i pierwotniakach, możliwe jest dzięki receptorom PRR (Pattern Recognition Receptors) obecnym na komórkach UO [55], co prowadzi do aktywacji układu odpornościowego. Klasycznym

\* Autor korespondencyjny: Dr hab. Beata Tokarz-Deptuła, prof. US, Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3C, 71-412 Szczecin; tel. 91 444 1605; e-mail: beata.tokarz-deptula@usz.edu.pl

przykładem receptorów PRR są m.in. receptory toll-podobne – TLR (Toll-Like Receptors), stanowiące ogniwo łączące odporność swoistą z nieswoistą. Do tej grupy należą także receptory lektynowe typu C – CLR (C-Type Lectin Receptors), receptory RIG-I-podobne – RLR (RIG-I-Like Receptors), cytozolowe receptory DNA – CDS (Cytosolic DNA Receptors) oraz receptory NOD-podobne – NLR (NOD-Like Receptors) [54].

## 2. Teoria zagrożenia

W 1960 roku Burnet i Medawar otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, za opisanie zjawiska tolerancji immunologicznej, według której fundamentalną zasadą działania UO, jest zdolność odróżniania antygenów własnych (self) od obcych (non-self) [13]. Hipotezę tą sformułowali kilka lat wcześniej Burnet i Fenner [14], zakładając, że jeżeli w trakcie rozwoju embrionalnego, wszczepione zostaną komórki, pochodzące od genetycznie odrębnej rasy zwierząt, to nie powinna rozwijać się odpowiedź i produkcja przeciwciał przeciwko obcym cząsteczkom. Niestety, autorzy ci nie byli w stanie udowodnić swojej hipotezy eksperymentalnie i dopiero w 1953 roku potwierdzono ją, badając mysie splenocyty wszczepione do zarodków myszy „odległych” od siebie genetycznie ras [7]. Osobniki takie nabywały cech myszy-dawców, przykładowo osobniki dorosłe (myszy-biorcy) akceptowały przeszczep skóry i innych tkanek, ale tylko od gatunku myszy-dawcy. Tymczasem teoria zagrożenia [63] zakłada, że dla UO ważniejsze od rozpoznania czynników obcych dla organizmu, jest rozpoznanie czynników niebezpiecznych (DAMP) i ich prezentacja. Według tej teorii, antygen może być zignorowany przez UO, jeśli nie zostanie uznany za niebezpieczny dla organizmu i w takim wypadku nie rozwinię się odpowiedź immunologiczna doprowadzająca do jego eliminacji. Tak więc, w procesie rozpoznawania antygeny, powinien pojawić się sygnał zagrożenia-niebezpieczeństwa (DAMP), który pozwoli na prawidłową interpretację zaistniałej sytuacji i podjęcie odpowiednich czynności. Tymi sygnałami są elementy własnych komórek i tkanek organizmu, wydzielane m.in. w trakcie ich uszkodzenia, urazu lub w czasie infekcji (Tabela I). Teoria zagrożenia, mimo iż kontrowersyjna, to przez wielu badaczy jest akceptowana, bo wyjaśnia m.in. zjawisko uruchomienia odpowiedzi immunologicznej w wyniku oddziaływania własnych, endogennych elementów organizmu, powstałych np. w trakcie uszkodzenia tkanek [63, 107]. Wiadomo, że przy ciężkim urazie, czy zabiegu operacyjnym przeprowadzonym w warunkach jałowych, może dojść do tzw. „sterylnego zapalenia”, które mimo, że powstaje wyłącznie w wyniku uszkodzenia tkanek, charakteryzuje się typowymi objawami

zapalenia powstającymi w czasie infekcji, takimi jak zaczerwienienie, podwyższenie temperatury, obrzęk i ból [66]. W trakcie tego stanu, dochodzi do obumierania komórek, co powoduje gromadzenie się efektorowych elementów odporności wrodzonej, m.in. komórek PMN (Polymorphonuclear Cells), które likwidując go, rozpoczynają „fizjologiczne gojenie” uszkodzonych tkanek [50]. Ze względu na olbrzymi arsenał występujących w komórkach PMN związków, powodujących m.in. hydrolizę i utlenianie, może również dojść do dużego zniszczenia otaczających tkanek [90]. Tłumaczy to występowanie zmian patologicznych w odpowiedzi na „sterylnie zapalenie”, które stwierdzone jest m.in. w urazach, niedokrwieniach i zawałach, autoagresji, a nawet uszkodzeniach wątroby wywołanych przez leki [50, 60, 97]. Stąd ważnym faktem w zrozumieniu roli wrodzonych elementów odpornościowych w tych stanach, jest ich udział w reakcji na uszkodzenia tkanek i „sterylnie zapalenie”, co prowadzić może do zespołu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej – SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), który to stan klinicznie przypomina reakcję m.in. podczas posocznicy [23]. Dodatkowo dowiedziono że przedłużające się „sterylnie zapalenie” w organizmie, może stać się przyczyną stanów chorobowych, pozornie ze sobą niepowiązanych, począwszy od choroby Alzheimera [5], przez stłuszczenie wątroby [43], aż po miażdżycę [38], czy dnę moczanową [16]. Wiadomo, że w czasie „sterylnego zapalenia” pojawiające się czynniki DAMP, wzmagają reakcje układu odpornościowego, poprzez aktywację komórek prezentujących antygen – APC (Antigen-Presenting Cell), które wylapują cząsteczki DAMP z otaczającego środowiska i po przejściu do węzłów chłonnych, przekazują go dziewiczym limfocytom T. Ponieważ tylko komórki APC, mogą pobudzać limfocyty T dziewicze, a co za tym idzie, zapoczątkować odpowiedź pierwotną, dlatego właśnie komórki APC muszą rozpoznać sygnał zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP). Jeśli sygnał zagrożenia zostanie odebrany przez komórki APC (sygnał pierwszy), wówczas dochodzi do ekspresji cząsteczek drugiego sygnału aktywujących limfocyty Th, co prowadzi w konsekwencji do rozwoju reakcji odpornościowej. Cząsteczki drugiego sygnału, czyli tzw. sygnału kostymulacji, obecne są na komórce prezentującej antygen. Łącząc się z odpowiednimi cząsteczkami na limfocycie T, wzmagają efekt prezentacji i stymulacji komórek T. Szczególnie efekt ten dotyczy cząsteczki CD28 na limfocycie T, łączącej się z cząsteczkami CD80 i CD86 na komórce APC, a także semaforiny łączące się z CD72 i z pleksynami, jak również cząsteczkami TIM-1 i -3. Do aktywacji limfocyty T potrzebne są także sygnały przekazywane przez cytokiny, np. IFN typu I, IL-1, -12, -18. Wpływ tych dodatkowych oddziaływań na aktywację limfocytów T nazywany jest „sygnałem II”. Jeśli natomiast sygnał DAMP

Tabela I  
Czynniki zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP)

Źródło	*Nazwa DAMP	Receptory	Piśmien- nictwo
Czynniki DAMP uwalniane w trakcie nekrozy komórek	Białka szoku cieplnego (HSP70, HSP90, HSP60, HSP72, HSP90B1)	CD91, TLR2, TLR4, SREC-1 i FEEL-1	[12]
	Adenozyno-trifosforan (ATP)	P2Y2, P2X7	[35]
	Mitochondrialne DNA (MtDNA)	TLR9	[31]
	Białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (HMGB1)	TLR2, TLR4, RAGE, TIM3	[40]
	IL-1 $\alpha$	IL-1R	[20]
	IL-33	ST2	[41]
	Katelicyny/LL-37	FPRL1, TLR7,8,9, P2X7, EGFR, MRGX2, CXCR2	[111]
	Defensyny ( $\alpha$ , $\beta$ )	CCR2, CCR6, TLR4	[111]
	Białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (HMGN1)	TLR4	[103]
	Białko S100	RAGE	[36]
	Interferon (IFN)	TLR3	[6]
	Reaktywne formy tlenu (ROS)	brak danych	[77]
	Prostaglandyna E2 (PGE <sub>2</sub> )	EP1-4	[39]
	Jony potasu (K <sup>+</sup> )	-	[25]
	Kalretikulina (CARL)	LRP1	[73]
	Granulizyna	TLR4	[56]
	Neurotoksyna pochodząca z eozynofików (EDN)	TLR2	[111]
	Kwasy nukleinowe, dsRNA, dsDNA	TLR3, TLR7/8, TLR9	[32]
	Cyklofolina A	CD147	[53]
	Cytochrom C	LPG	[79]
	F-aktyna	DNGR-1/ CLEC <sub>6</sub> A	[3]
	Galektyny	TLR2	[48]
	Tioredoksyna	NLRP3	[119]
	Kwas moczowy	purynergiczne	[92]
	Peptydy N-formylowane (NFP)	FPR1	[18]
	Histony	TLR9	[45]
Ligand prog. śmierci (PD-L1)	PD-1	[118]	
Peroksyredoksyna -1 (Prx1)	TLR4	[85]	
Czynniki DAMP uwalniane w trakcie apoptozy komórek	Białka szoku cieplnego (HSP70, HSP90, HSP60, HSP72, HSP90B1)	CD91, TLR2, TLR4, SREC-1 i FEEL-1	[12]
	Adenozyno-trifosforan (ATP)	P2Y2, P2X7	[35]
	Defensyny ( $\alpha$ , $\beta$ )	CCR2, CCR6, TLR4	[111]
	Nadtlenek wodoru (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	brak danych	[77]
	Aneksyna 1 (ANXA1)	FPR-1	[105]
	Fosfatydyloseryna (PtdSer)	TIM-1/-3/-4, BAI1, Stabilin-2, MFG-E8, C1q	[46]
	Kardiolipina	brak danych	[93]
	Sfingozyno-1-fosforan (S1P) i ceramido-1-fosforan (C1P)	brak danych	[51]
	Lizofosfatydylocholina (LPC)	G2A	[58]
	Kalretikulina (CARL)	CD91	[73]
	Domena śmierci (DD1 $\alpha$ )	DD1 $\alpha$	[116]
	Trombospondyna 1 (THBS1)	$\alpha_v\beta_3$	[52]
	Kwasy nukleinowe, dsRNA, dsDNA	TLR3, TLR7/8, TLR9	[32]
	Ligand programowanej śmierci (PD-L1)	PD-1	[118]
	Peroksyredoksyna -1 (Prx1)	TLR4	[85]

Tabela I. C.d.

Źródło	*Nazwa DAMP	Receptory	Piśmiennictwo
Czynniki DAMP proteolizy macierzy zewnątrz-komórkowej	Hialuronian	TLR2, TLR4	[89]
	Fibronektyna	TLR4	[89]
	Fibrynogen	TLR4	[89]
	Biglycan	TLR2, TLR4, P2X4, P2X7	[89]
	Siarczan heparanu	TLR4	[89]
	Tenascin C	TLR4	[37]
	Wersykan	TLR2, TLR6, CD14	[89]

\* Kolejność DAMP – wg ilości faktów i danych w cytowanym piśmiennictwie.

nie zostanie odebrany przez komórki APC i nie dojdzie do ekspresji cząsteczek drugiego sygnału z udziałem limfocytów Th, co prowadzi do anergii klonalnej i/lub apoptozy limfocytów Th. Oprócz rozpoznania i prezentacji przez komórki APC czynników DAMP, ważnym aspektem w teorii zagrożenia jest także sposób w jaki UO decyduje o efektorowym charakterze odpowiedzi na te czynniki. Związane jest to z rodzajem odpowiedzi typu komórkowego lub humoralnego organizmu, oraz klasy wytwarzanych przeciwciał [78]. Również odpowiedź UO na DAMP, zależy od rodzaju tkanki w której zachodzi, bo np. w oku, czy przewodzie pokarmowym, może dochodzić do lokalnego hamowania odpowiedzi przez specyficzne mediatory, np. transformujący czynnik wzrostu TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ 1) [65]. Jest to także ważny fakt w teorii zagrożenia, który odróżnia ją od obowiązującego poglądu w immunologii, z którego wynika, że charakter fazy efektorowej odpowiedzi immunologicznej, zależy wyłącznie od czynnika wywołującego tę odpowiedź [1].

### 3. Cząsteczki zagrożenia-niebezpieczeństwa

Cząsteczki związane z zagrożeniem-niebezpieczeństwem (DAMP) (Tabela I), to w zasadzie własne – endogenne czynniki inicjujące odpowiedź immunologiczną [6], które pochodzą z uszkodzonych i/ lub martwych komórek, jak również z komórek będących w stanie stresu biologicznego – zakażenia, co za każdym razem oznacza zagrożenie i niebezpieczeństwo dla gospodarza [6]. Badania przedstawione przez zespół Matzinger [30], wskazują, że cząsteczki DAMP w rzeczywistości są sygnałami stresu dla komórek UO. Prowadzi to do uwalniania endogennych substancji i sygnałów, które aktywują komórki rozpoznające antygen. Wykazano także, że sygnały niebezpieczeństwa – zagrożenia (DAMP) mogą także bezpośrednio aktywować komórki dendrytyczne – DC, makrofagi, neutrofile, komórki NK oraz komórki T z receptorem  $\gamma\delta$  [30]. Cząsteczki DAMP mogą także wpływać na dojrzewanie

komórek DC i neutrofile, jak również wspomagać opsonizację i pochłanianie umierających komórek nowotworowych [35]. Opisano wśród czynników DAMP i takie, które nie wykazują działania aktywującego na elementy UO, pozostają neutralne lub nawet działają hamująco [34, 61]. Wykazano, że cząsteczki DAMP takie jak np. aneksyna 1 (ANXA1), fosfatydyloseryna (PtdSer), domena śmierci (DD1 $\alpha$ ), prostanglandyna E2 (PGE2), jony potasu (K<sup>+</sup>) oraz niektóre cząsteczki obecne w macierzy zewnątrzkomórkowej, np. hialuronian, fibronektyna A, czy fibrynogen – odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy tkankowej, mogą prowadzić nawet do unikania odpowiedzi immunologicznej i działać immunosupresyjnie [61]. Opisano również, że niektóre cząsteczki DAMP, np. białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej – HMGB1 (High Mobility Group Box 1), ulega specyficznym potranslacyjnym modyfikacjom – utlenianiu lub cytrulinacji, które mogą dezaktywować, wzmacniać lub zmieniać jego właściwości immunogenne [87]. Większość alarmin działa jednak immunostymulująco na elementy UO, m.in. wiążąc się do swoistych receptorów PRR, takich jak receptory TLR [6, 72], purynergiczne receptory P2, białka związane z receptorem lipoproteiny o niskiej gęstości (LRP1), formylowe receptory (FPR1) lub receptory zaawansowanej glikacji endoproteinowej (RAGE) [34].

Wiadomo, że czynniki stresu – potencjalne czynniki DAMP, mogą mieć charakter fizyczny (mechaniczny i termiczny), chemiczny (toksyny) oraz biologiczny (zakażenie) i każdorazowo mogą prowadzić do śmierci komórki, w tym martwicy i apoptozy [33, 24], w trakcie których uwalniają się cząsteczki DAMP (Tabela I) [33, 61]. Dodać należy, że nekroza powstająca w wyniku urazu, uszkodzenia lub wywołana obecnością zarazków i toksyn, jest procesem charakteryzującym się utratą integralności błony. Apoptoza natomiast, jest procesem, który może wystąpić także jako zjawisko fizjologiczne [61, 80], stąd odpowiedź – reakcja gospodarza na te dwie formy śmierci komórki jest odmienna [50]. Nekroza powoduje odpowiedź zapalną [61], czego nie obserwuje się podczas apoptozy, gdyż przebiega ona

z zachowaniem ciągłości błon, a wewnątrzkomórkowa zawartość komórki nie jest uwalniana [46]. Niezależnie, że proces komórek podlegających tym dwóm typom śmierci jest odmienny, to elementy uwalniane w wyniku tych procesów są szybko „przejmowane” przez komórki UO, w procesie fagocytozy – w przebiegu nekrozy, m.in. przez rezydujące tam komórki PMN oraz poprzez proces eferocytozy makrofagów – w przypadku apoptozy [27]. W trakcie tych dwóch procesów, komórki UO uwalniają wiele czynników DAMP (Tabela I), które działają modulująco na elementy UO poprzez wytwarzanie mediatorów zapalenia, choć także i takich substancji jak IL-10 i TGF- $\beta$ , które hamują stan zapalny [46]. Wykazano, że uwolnione w czasie nekrozy i apoptozy cząsteczki DAMP, cechują się na tyle harmonijnym i skoordynowanym działaniem, że może prowadzić to do powstania stanu zapalnego, obejmującego różne układy i narządy, tworząc w konsekwencji tzw. sieć zapalenia [94, 95].

#### 4. Charakterystyka wybranych cząsteczek zagrożenia – niebezpieczeństwa

Wśród cząsteczek zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP) (Tabela I), jednymi z lepiej opisanych są białka wstrząsu cieplnego – HSP (Heat Shock Proteins) [12, 17, 64, 65, 75, 81, 100]. Białka te wbrew nazwie, nie są wytwarzane jedynie w odpowiedzi na oparzenie czy przegrzanie organizmu, ale ich synteza następuje także w wyniku zadziałania na komórkę czynników uszkadzających [100]. Obecność HSP stwierdzono podczas nekrozy, wywołanej przez niesprzyjające warunki dla funkcjonowania komórki lub wywołanej obecnością patogenów. Białka te, pojawiają się także w wyniku działania innych cząsteczek DAMP, jak np. fibronektyny – elementu macierzy zewnątrzkomórkowej, uwalnianej z uszkodzonych tkanek, która aktywując receptor TLR4, prowadzi do rozpoznania i zaprezentowania HSP [17]. Wykazano, że białko HSP – jako cząsteczka DAMP, pozwala na wykrycie przez makroorganizm zagrożenia, nawet wtedy, gdy patogen, powodujący ten stan, nie został jeszcze wykryty przez UO [17]. Zatem białka te, stanowią niezwykle cząsteczkę DAMP, która w zasadzie nie występuje poza macierz komórek w prawidłowych – fizjologicznych warunkach [17]. Niezależnie jednak od przyczyn pojawienia się HSP poza komórką, białka te aktywują komórki APC, co jest sygnałem do rozpoczęcia odpowiedzi immunologicznej, choć HSP mogą działać również jako chaperony w zakresie odporności adaptacyjnej [75]. Wykazano, że podwyższony poziom białka HSP70, występujący m.in. w wyniku ciężkiego, traumatycznego uszkodzenia mózgu, powoduje reakcje prozapalne, poprzez zwiększenie ilości cząsteczek adhezyjnych oraz wydzielanie przez komórki UO cyto-

kin i chemokin [22, 81]. Wzrost poziomu białek HSP występuje także przy rozległych zabiegach chirurgicznych i urazach, co powoduje zwiększenie poziomu prokalcytoniny w surowicy [67], wzrost stężenia glukozy oraz liczby białych krwinek [88, 115]. Wysoki poziom białek HSP może towarzyszyć infekcji, stąd przyjmuje się, że poznanie kinetyki uwalniania HSP, to droga prowadząca do wykorzystania ich, jako biomarkerów pomocnych w monitorowaniu, diagnozowaniu, a nawet leczeniu różnych stanów patologicznych [84].

Ważną cząsteczką DAMP jest również ATP, podstawowa jednostka energii wykorzystywana w metabolizmie komórkowym. Uszkodzone komórki, m.in. w wyniku stresu fizycznego, chemicznego, czy biologicznego (zakażenia), wydzielają ATP, który staje się cząsteczką DAMP, ostrzegając komórki UO o nadchodzącym zagrożeniu i mobilizując szybką reakcję zapalną [35]. Jak wykazano, zaostrzona reakcja zapalna u ludzi na bakterie płytek nazębnych, prowadzi do chorób przyzębia [76], a powstający stan zapalny powoduje uszkodzenia tkanek, czego konsekwencją jest uwalnianie wewnątrzkomórkowego ATP do przestrzeni pozakomórkowej. To pozakomórkowe ATP, jest przykładem cząsteczki DAMP u organizmów wielokomórkowych, wydzielany jest każdorazowo podczas uszkodzeń, w celu wywołania reakcji zapalnych, choć także w czasie rozpoczęcia procesu gojenia, poprzez stymulację receptorów purynergicznych [15]. Dowiedziono, że pozakomórkowy ATP, poprzez sygnalizację receptora P2X7, jest jednym z najlepiej działających aktywatorów inflammasomu Nlrp3, który pośredniczy w wytwarzaniu cytokin zapalnych, takich jak IL-1 $\beta$  [47, 50, 96]. Badania McDonald i wsp. [66], wykazały, że myszy, którym podano przeciwciała rekombinowanego antagonisty receptora IL-1 (IL-1R), który blokował IL-1 $\beta$ , posiadały zwiększoną adhezję oraz zmniejszoną zdolność migracji neutrofilów, przez co neutrofile nie podążały do miejsc zapalnych [66].

Inną bardzo istotną cząsteczką zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP) jest mitochondrialne DNA (MtDNA), które aktywuje UO głównie ze względu na pochodzenie ewolucyjne i uderzające podobieństwa między mitochondriami i bakteriami. Według teorii endosymbiotycznej, bakterie zdolne do prowadzenia wymiany gazowej, włączone zostały do komórek eukariotycznych w wyniku endocytozy [99]. Ze względu na podobieństwo aktywacji szlaków molekularnych, zarówno w zakażeniu bakteryjnym, jak i przy urazie makroorganizmu, może dojść do pojawienia się cząsteczek zagrożenia (DAMP), powstania odpowiedzi immunologicznej, a nawet wystąpienia zespołu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej – SIRS [28, 59, 114]. Mimo, że nie udało się ustalić bezpośredniego związku pomiędzy rozwojem SIRS, a uwalnianiem składników mitochondrialnych podczas uszkodzenia komórek

i urazu, to wykazano, że poziom MtDNA jest znacząco podwyższony u rannych pacjentów. Dowiedziono, że cząsteczki DAMP pochodzenia mitochondrialnego, odgrywają rolę w chorobach serca, zapaleniu stawów, chorobach wątroby, urazach, a także wspomnianej reakcji SIRS u ludzi [57, 74, 98]. W badaniach prowadzonych na myszach wykazano również, że MtDNA podawane zwierzętom powoduje SIRS i uszkodzenie płuc. W związku z tym przyjęto hipotezę, że uwolnienie MtDNA, może być brakującym elementem związku między uszkodzeniami tkanki, a tzw. sterylnym zapaleniem, a nawet SIRS [82]. Jako przykład, wykazano, że stan związany z udarem mózgu, czy stan występujący podczas rozległych złamań, w czasie którego dochodzi do uwalniania MtDNA do krążenia, często prowadzi do rozwoju ostrego uszkodzenia płuc. Stwierdzono, że u pacjentów z urazem i SIRS, w mitochondriach zmniejsza się produkcja cząsteczek ATP, co w konsekwencji powoduje wyczerpanie jego zasobów i śmierć komórki [80]. Udowodniono, że podczas urazu, reakcji zapalnej i SIRS, zwiększa się również mitochondrialna produkcja reaktywnych form tlenu – ROS, które mogą regulować poziom jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w komórkach odpornościowych i w ten sposób wywoływać reakcję zapalną [80]. To mitochondrialne DNA uwalniane w trakcie urazu, może także w sposób bezpośredni aktywować neutrofile, poprzez wiązanie się z ich receptorem TLR9, powodując aktywację wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego p38 MAPK [104, 117]. Nadto obecność MtDNA powoduje, że komórki MN (Mononuclear Cells) wydzielają cytokiny prozapalne, choć cząsteczki MtDNA są również bezpośrednimi mediatorami indukcji apoptozy podczas urazów czy SIRS [80]. Wykazano, że podczas SIRS dochodzi nie tylko do aktywacji szlaku kinazy białkowej RIPK [23], ale także „kompleksu sygnalizacyjnego” prowadzącego do martwicy [23, 108]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że delecja kinazy RIPK3 u myszy, chroni je przed śmiercią w przebiegu sterylnych zapaleń i SIRS [23]. U zwierząt z niedoborem RIPK3, stwierdzono, że poziom MtDNA w osoczu jest niski, co sugeruje związek między brakiem RIPK3, a mniejszym uszkodzeniem tkanek [23]. Mitochondria zatem, oprócz funkcji generowania ATP i udziału w apoptozie, odgrywają ważną rolę w aktywowaniu wrodzonej odporności, ponieważ zawierają składniki ich przodków bakteryjnych, które są potencjalnie immunogenne [10].

Następną ważną cząsteczką DAMP jest prozapalne białko HMGB1 [101], znane głównie jako czynnik transkrypcyjny lub białko jądrowe wiążące DNA [69]. Białko to występuje powszechnie we wszystkich typach komórek jądrowych, a jego wydzielanie z monocytów może być stymulowane przez PAMP, cytokiny i czynnik aktywujący składnik dopełniacza – C5a [86]. Białko

HMGB1 uwalniane jest również z komórek nekrotycznych, przez co dochodzi do pobudzenia odporności wrodzonej [69]. Wykazano, że po pierwotnej retencji jądrowej w komórkach apoptotycznych, ze względu na zwiększoną przepuszczalność komórkową i degradację nukleosomów, HMGB1 jest uwalniane podczas późniejszych faz apoptozy [40]. Białko to, w stanach zapalnych, wykazuje plejotropowe działanie w narządach, bo m.in. wpływa na aktywację komórek fagocytujących oraz komórek śródbłonna, ale także warunkuje utratę funkcji barierowych nabłonka, co prowadzi do typowych objawów zapalenia i wystąpienia stanu patologicznego [102]. HMGB1, poprzez aktywację chemotaksji komórek UO, angiogenezę naczyń, dojrzewania komórek dendrytycznych, a także rekrutację i proliferację komórek macierzystych, promuje procesy obrony, naprawy i regeneracji tkanek [49]. Białko to, wzmacnia odpowiedź zapalną poprzez wiązanie endogennych i egzogennych mediatorów zapalenia, takich jak cytokiny oraz LPS (Lipopolysaccharide) [2, 91], choć stan zapalny promowany przez to białko, zachodzi z udziałem receptora stanu redoks, towarzyszącego cząsteczce HMGB1 [40]. Wykazano, że białko HMGB1 oddziałuje poprzez receptory TLR i RAGE na komórki uczestniczące w inicjowaniu szybkiej i długotrwałej reakcji zapalnej. W procesie nekrozy komórek, w tym komórek nowotworowych, białko HMGB1 może być wydzielane w sposób bierny [26, 83] i jest to wówczas typowa cząsteczka DAMP [101]. Dodać należy, że ginące komórki nowotworowe wydzielając cząsteczki DAMP w postaci białka HMGB1, choć także HSP, ATP, czy białka S100 wiążącego wapń, „programują” charakter śmierci pozostałych komórek [50].

To, czy śmierć tych komórek będzie miała charakter immunogenny – aktywacja odpowiedzi UO skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym, czy nieimmunogenny – niezdolny do takiej odpowiedzi, zależy w dużym stopniu od aktywności cząsteczek DAMP. Stwierdzono, że unikanie odpowiedzi immunologicznej przez komórki nowotworowe jest wynikiem blokowania sygnałów DAMP, uwalnianych z umiarkowanych i martwych komórek. Wykazano, że w trakcie immunologicznej śmierci mysich linii komórek nowotworowych, dochodzi do uwalniania takich cząsteczek DAMP, jak HSP70 i HSP90 [29] oraz kalretikuliny (CARL) [73]. Natomiast w procesie śmierci komórek nowotworowych, wywołanych przez chemioterapeutyki (Doksorubicynę, Mitoksantron, Oksaliplatynę czy Bortezomib), dochodzi do uwalniania białka HMGB1 [4], aneksyny A1 (ANXA1) [106] oraz ATP [68].

Innymi cząsteczkami DAMP, których obecność świadczy o rozpoczęciu odpowiedzi odpornościowej, są interleukiny, np. IL-1 $\alpha$  i IL-33, które mają podwójną funkcję, gdyż są one pozakomórkowymi mediatorami zapalenia oraz dodatkowo wewnątrzkomórkowymi



czynnikami transkrypcyjnymi [41]. Ponadto IL-33 jest jedną z pierwszych cząsteczek DAMP, które „alarmują” komórki UO o naruszeniu przez patogeny bariery obronnej nabłonka jelitowego [11, 42, 62], choć również interleukina ta uczestniczy w procesie polaryzacji komórek Th2 [62]. W momencie zagrożenia, spowodowanego np. wniknięciem patogenu do makroorganizmu, IL-33 aktywuje komórki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej do rozpoczęcia odpowiedzi typu 2 – z udziałem komórek Th2, a także aktywuje syntezę IL-4, -5, -9 i -13, które są istotne, np. przy odbudowaniu bariery naruszonej poprzez patogeny [21]. IL-33 jest zatem wyjątkową cytokiną, gdyż działa jako tradycyjna cytokina zewnątrzkomórkowa oraz jądrowy czynnik transkrypcyjny.

Dodać należy, że wiele cząsteczek zagrożenia, takich jak np. katelicydyny/LL-37, defensyny, HMGN1 (High Mobility Group Nucleosome Binding Domain 1), białko S100 oraz charakteryzowane wcześniej białko HMGB1, wykazują bezpośrednie działanie przeciw-drobnoustrojowe, eliminując patogeny i wpływając na kształtowanie mikroflory makroorganizmu, która reguluje odpowiedź immunologiczną [36, 109, 111]. Wykazano, że katelicydyna – peptyd należący do naturalnych białek AMP, pobudza receptory TLR7, 8, 9 [39] lub P2X7 [19] występujące na neutrofilach, makrofach, komórkach DC i fibroblastach, prowadząc do produkcji mediatorów zapalenia, takich jak TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$  (Interferon) czy PGE2, a nadto aktywuje migrację neutrofilii, monocytów oraz limfocytów T [111, 113], przez co warunkują wczesną odpowiedź organizmu na zagrożenie. Zarejestrowano, że pacjenci z atopowym zapaleniem skóry, typowym zapalnym schorzeniem obejmującym komórki Th-2, nie produkują katelicydyny/LL-37 z powodu wysokiego poziomu IL-4 i IL-13, co powoduje znaczne zmniejszenie u nich odporności przeciwwirusowej [44]. Także defensyny, jako cząsteczki DAMP należące do naturalnych antybiotyków, chronią skórę, błony śluzowe przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego i układu oddechowego, działając przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, ale także przeciwgrzybiczo i przeciw pasożytniczo [70]. Peptydy te aktywują komórki DC poprzez receptory TLR4 lub TLR7/8/9 do produkcji TNF $\alpha$ , IL-6 czy IFN [8], przez co wzmagają odporność. Wykazano, że  $\beta$ -defensyny aktywują u człowieka, królika i świnki morskiej, degranulację komórek tucznych, co prowadzi do uwolnienia histaminy i prostaglandyny D2 (PGD2) – mediatorów stanu zapalnego [71]. Wykazano także, że mysia  $\beta$ -defensyna stymuluje niedojrzałe komórki DC i ich dojrzewanie, a ludzka  $\alpha$ -defensyna wprowadzona do hodowli mysich makrofagów zwiększa zdolność tych komórek do fagocytozy. Także białko HMGN1, swoje bezpośrednie działanie jako cząsteczka DAMP, wiąże z odpowiedzią związaną

głównie z limfocytami Tc [109] i Th1 [110], choć także wzmagają odporność przeciwnowotworową [9, 103, 112], czego dowodem jest występowanie grasiczaka i innych złośliwych guzów u myszy z niedoborem tego białka. Również białko S100, podobnie jak HMGN1, wzmagają odporność przeciwnowotworową, aktywując komórki DC i makrofagi [33, 36]. Wykazano, że białko S100 hamując aktywność tych komórek, powoduje rozrost linii nowotworowych [109].

## 5. Podsumowanie

Teoria zagrożenia i związane z nią cząsteczki zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP), wyjaśniają pewne zjawiska w patofizjologii, trudne do wytłumaczenia w oparciu o obowiązującą teorię self/non-self, chociażby uszkodzenie tkanek wskutek urazu, zjawisko „sterylnego zapalenia”, czy też zrozumienie przebiegu niszczenia komórek w wyniku stresu fizycznego, chemicznego, czy biologicznego. Elementy tej teorii – cząsteczki DAMP, mają swoją rolę i udział w uzupełnieniu wiedzy dotyczącej utrzymania homeostazy immunologicznej organizmu oraz rozwoju odpowiedzi UO, m.in. w uszkodzeniach, infekcjach, a także w procesie nowotworzenia.

## Piśmiennictwo

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.: Cellular and molecular immunology, wyd. 4., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000
2. Abraham E.: Unraveling the role of high mobility group box protein 1 in severe trauma. *Critical Care*, **13**, 1004 (2009)
3. Ahrens S., Schulz O. i wsp.: F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity*, **36**, 635–645 (2012)
4. Apetoh L., Zitvogel L. i wsp.: The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol. Rev.* **220**, 47–59 (2007)
5. Banjara M., Ghosh C.: Sterile Neuroinflammation and Strategies for Therapeutic Intervention. *Int. J. Inflamm.* **2017**, 8385961 (2017)
6. Bianchi M.E.: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leuk. Biol.* **81**, 1–5 (2007)
7. Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B.: Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, **172**, 603–606 (1953)
8. Biragyn A., Kwak L.W. i wsp.: Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, **298**, 1025–1029 (2002)
9. Birger Y., Catez F., Furusawa T., Lim J.H., Prymakowska-Bosak M., West K.L., Postnikov Y.V., Haines D.C., Bustin M.: Increased tumorigenicity and sensitivity to ionizing radiation upon loss of chromosomal protein HMGN1. *Cancer Res.* **65**, 6711–6718 (2005)
10. Bonawitz N.D., Clayton D.A., Shadel G.S.: Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell.* **24**, 813–825 (2006)

11. Bonilla W.V., Pinschewer D.D. i wsp.: The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Science*, **335**, 984–989 (2012)
12. Borges T.J., Lang B.J., Lopes R.L., Bonorino C.: Modulation of alloimmunity by heat shock proteins. *Front. Immunol.* **7**, 303 (2016)
13. Burnet F.M.: Immunological recognition of self. Nobel Lecture, (1960)
14. Burnet F.M., Fenner F.: The production of antibodies, wyd. 2, Macmillan, Melbourne, 1949
15. Burnstock G., Fredholm B.B., North R.A., Verkhratsky A.: The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol.* **199**, 93–147 (2010)
16. Busso N., So A.: Mechanisms of inflammation in gout. *Arthritis Res. Ther.* **12**, 206 (2010)
17. Calderwood S.K., Stevenson M.A., Murshid A.: Heat shock proteins, autoimmunity and cancer treatment. *Autoimmune Dis.* **2012**, 486069 (2012)
18. Carp H.: Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med.* **155**, 264–275 (1982)
19. Chotjumlong P., Bolscher J.G., Nazmi K., Reutrakul V., Supanchart C., Buranaphatthana W., Krisanaprakornkit S.: Involvement of the P2X7 purinergic receptor and c-Jun N-terminal and extracellular signal-regulated kinases in cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 induction by LL-37. *J. Innate Immun.* **5**, 72–83 (2013)
20. Cohen I., Rider P., Carmi Y., Braiman A., Dotan S., White M.R., Voronov E., Martin M.U., Dinarello C.A., Apte R.N.: Differential release of chromatin-bound IL-1 $\alpha$  discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2574–2579 (2010)
21. Cohen E.S., Mustelin T. i wsp.: Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat. Commun.* **6**, 8327 (2015)
22. Da Rocha A.B., Regner A. i wsp.: Serum Hsp70 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. *J. Neurotrauma*, **22**, 966–977 (2005)
23. Duprez L., Takahashi N., van Hauwermeiren F., Vandendriessche B., Goossens V.: RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity*, **35**, 908–918 (2011)
24. Działo J., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Excitotoxicity and Wallerian degeneration as a processes related to cell death in nervous system. *Arch. Ital. Biol.* **151**, 67–75 (2013)
25. Eil R., Restifo N.P. i wsp.: Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature*, **537**, 539–543 (2016)
26. Ellerman J.E., Brown C.K., de Vera M., Zeh H.J., Billiar T., Rubartelli A., Lotze M.T.: Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2836–2848 (2007)
27. Elliott M.R., Koster K.M., Murphy P.S.: Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.* **198**, 1387–1394 (2017)
28. Faist E., Wichmann M.W.: Immunology in the severely injured. *Der Chirurg*, **68**, 1066–1070 (1997)
29. Fucikova J., Spisek R. i wsp.: Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP – associated processes in cancer. *Front. Immunol.* **6**, 402 (2015)
30. Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P.: Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* **5**, 1249–1255 (1999)
31. Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G.: Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 780–788 (2012)
32. Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S., Facchinetti V., Homey B., Barrat F.J., Zal T., Gilliet M.: Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* **206**, 1983–1994 (2009)
33. Garg A.D., Agostinis P.: Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. *Immunol. Rev.* **280**, 126–148 (2017)
34. Garg A.D., Agostinis P. i wsp.: Molecular and translational classifications of DAMPs in immunogenic cell death. *Front. Immunol.* **6**, 588 (2015)
35. Garg A.D., Agostinis P. i wsp.: A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J.* **31**, 1062–1079 (2012)
36. Ghavami S., Kerkhoff C., Los M., Hashemi M., Sorg C., Karami-Tehrani F.: Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 169–175 (2004)
37. Goh F.G., Piccinini A.M., Krausgruber T., Udalova I.A., Midwood K.S.: Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J. Immunol.* **184**, 2655–2662 (2010)
38. Grasset E.K., Duhlin A., Agardh H.E., Ovchinnikova O., Hägglöf T., Forsell M.N., Paulsson-Berne G., Hansson G.K., Ketelhuth D.F., Karlsson M.C.: Sterile inflammation in the spleen during atherosclerosis provides oxidation-specific epitopes that induce a protective B-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2030–2038 (2015)
39. Hangai S., Ao T., Kimura Y., Matsuki K., Kawamura T., Negishi H., Nishio J., Kodama T., Taniguchi T., Yanai H.: PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3844–3849 (2016)
40. Harris H.E., Andersson U., Pisetsky D.S.: HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 195–202 (2012)
41. Hirsiger S., Simmen H.P., Werner C.M., Wanner G.A., Rittirsch D.: Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm.* **2012**, 315941 (2012)
42. Hodzic Z., Schill E.M., Bolock A.M., Good M.: IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. *Cytokine*, **100**, 1–10 (2017)
43. Hoque R., Farooq A., Mehal W.Z.: Sterile inflammation in the liver and pancreas. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 61–67 (2013)
44. Howell M.D., Gallo R.L., Boguniewicz M., Jones J.F., Wong C., Streib J.E., Leung D.Y.: Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity*, **24**, 341–348 (2006)
45. Huang H., Tsung A. i wsp.: Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*, **54**, 999–1008 (2011)
46. Huynh M.L., Fadok V.A., Henson P.M.: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- $\beta$ 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* **109**, 41–50 (2002)
47. Iyer S.S., Sutterwala F.S. i wsp.: Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20388 (2009)
48. Jouault T., El Abed-El Behi M., Martínez-Esparza M., Breuilh L., Trinel P.A., Chamaillard M., Trottein F., Poulain D.: Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J. Immunol.* **177**, 4679–4687 (2006)
49. Klune J.R., Dhupar R., Cardinal J., Billiar T.R., Tsung A.: HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.* **14**, 476–484 (2008)
50. Kono H., Rock K.L.: How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 279 (2008)

51. Korbek M., Banáth J., Sun J., Canals D., Hannun Y.A., Separovic D.: Ceramide and sphingosine-1-phosphate act as photodynamic therapy-elicited damage-associated molecular patterns: cell surface exposure. *Int. Immunopharmacol.* **20**, 359–365 (2014)
52. Krispin A., Bledi Y., Atallah M., Trahtemberg U., Verbovet-ski I., Nahari E., Zelig O., Linial M., Mevorach D.: Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states. *Blood*, **108**, 3580–3589 (2006)
53. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P.: Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **12**, 860–875 (2012)
54. Kumar H., Bot A.: In this tissue: Innate immunity and infectious diseases-an update. *Int. Rev. Immunol.* **36**, 55–56 (2017)
55. Kumar H., Kawai T., Akira S.: Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* **30**, 16–34 (2011)
56. Kumar J., Okada S., Clayberger C., Krensky A.M.: Granulysin: a novel antimicrobial. *Expert Opin Investig Drugs*, **10**, 321–329 (2001)
57. Lam N.Y., Rainer T.H., Chiu R.W., Joynt G.M., Lo Y.M.: Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma. *Clin. Chem.* **50**, 213–216 (2004)
58. Lauber K., Wesselborg S. i wsp.: Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, **113**, 717–730 (2003)
59. Lenz A., Franklin G.A., Cheadle W.G.: Systemic inflammation after trauma. *Injury*, **38**, 1336–1345 (2007)
60. Liu Z.X., Han D., Gunawan B., Kaplowitz N.: Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, **43**, 1220 (2006)
61. Majno G., Joris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3–15 (1995)
62. Martin N.T., Martin M.U.: Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat. Immunol.* **17**, 122–131 (2016)
63. Matzinger P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994)
64. Matzinger P.: An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* **10**, 399–415 (1998)
65. Matzinger P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science*, **296**, 301–305 (2002)
66. McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S.A., Slaba I., Waterhouse C.C., Beck P.L., Muruve D.A., Kubes P.: Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, **330**, 362–366 (2010)
67. Meisner M., Tschakowsky K., Hutzler A., Schick C., Schüttler J.: Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med.* **24**, 680–684 (1998)
68. Michaud M., Kroemer G. i wsp.: Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, **334**, 1573–1577 (2011)
69. Muller S., Scaffidi P., Degryse B., Bonaldi T., Ronfani L.: New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* **20**, 4337–4340 (2001)
70. Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W.: Defensins: An important innate element of the immune system in mammals. *Post. Hig. Med. Dosw.* **62**, 524–529 (2008)
71. Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H., Nagaoka I.: Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1066–1075 (2001)
72. Nishiya T., DeFranco A.L.: Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 19008–19017 (2004)
73. Obeid M., Kroemer G. i wsp.: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007)
74. Oka T., Otsu K. i wsp.: Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*, **485**, 251–255 (2012)
75. Osterloh A., Breloer M.: Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**, 1–8 (2008)
76. Page R.C., Engel L.D., Narayanan A.S., Clagett J.A.: Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. *JAMA*, **240**, 545–550 (1978)
77. Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P. i wsp.: Long-distance apoptotic killing of cells is mediated by hydrogen peroxide in a mitochondrial ROS-dependent fashion. *Cell Death Differ.* **12**, 1442–1444 (2005)
78. Ptak W., Ptak M., Płytycz B.: Co rozpoznaje układ immunologiczny? Na drodze do nowego paradygmatu. *Kosmos*, **2–3**, 149–156 (2003)
79. Pullerits R., Bokarewa M., Jonsson I.M., Verdrengh M., Tarkowski A.: Extracellular cytochrome c, a mitochondrial apoptosis-related protein, induces arthritis. *Rheumatology*, **44**, 32–39 (2005)
80. Power C., Fanning N., Redmond H.P.: Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock*, **18**, 197–211 (2002)
81. Prohászka Z., Singh M., Nagy K., Kiss E., Lakos G., Duba J., Füst G.: Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 17–22 (2002)
82. Raoof M., Zhang Q., Itagaki K., Hauser C.J.: Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1. *J. Trauma*, **68**, 1328–1332 (2010)
83. Raucci A., Palumbo R., Bianchi M.E.: HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity*, **40**, 285–289 (2007)
84. Ren B., Zou G., Huang Y., Xu G., Xu F., He J., Zhu H., Yu P.: Serum levels of HSP70 and other DAMP proteins can aid in patient diagnosis after traumatic injury. *Cell Stress Chaperones*, **21**, 677–686 (2016)
85. Riddell J.R., Wang X.Y., Minderman H., Gollnick S.O.: Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *J. Immunol.* **184**, 1022–1030 (2010)
86. Rittirsch D., Ward P.A. i wsp.: Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med.* **14**, 551–557 (2008)
87. Rondas D., Mathieu C. i wsp.: Citrullinated glucose-regulated protein 78 is an autoantigen in type 1 diabetes. *Diabetes*, **64**, 573–586 (2015)
88. Rovlias A., Kotsou S.: The blood leukocyte count and its prognostic significance in severe head injury. *Surg. Neurol.* **55**, 190–196 (2001)
89. Schaefer L.: Extracellular matrix molecules: endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 185–190 (2010)
90. Segal A.W.: How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 197–223 (2005)
91. Sha Y., Zmijewski J., Xu Z., Abraham E.: HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J. Immunol.* **180**, 2531–2537 (2008)
92. Shi Y., Evans J.E., Rock K.L.: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, **425**, 516–521 (2003)
93. Sorice M., Circella A., Cristea I.M., Garofalo T., Di Renzo L., Alessandri C., Valesini G., Esposti M.D.: Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* **11**, 1133–1145 (2004)
94. Tesniere A., Apetoh L., Ghiringhelli F., Joza N., Panaretakis T., Kepp O., Schlemmer F., Zitvogel L., Kroemer G.: Immunogenic

- cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 504–511 (2008)
95. Tesniere A., Panaretakis T., Kepp O., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G.: Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 3–12 (2008)
  96. Tschopp J., Schroder K.: NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 210 (2010)
  97. Tsung A., Sahai R., Tanaka H., Nakao A., Fink M.P., Lotze M.T., Yang H., Li J., Tracey K.J., Geller D.A., Billiar T.R.: The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* **201**, 1135–1143 (2005)
  98. Walko T.D. III, Bola R.A., Hong J.D., Au A.K., Bell M.J., Kochanek P.M., Clark R.S., Aneja R.K.: Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA: a novel DAMP in pediatric traumatic brain injury. *Shock*, **41**, 499–503 (2014)
  99. Wallin I.E.: A note on the morphology of bacteria symbiotic in the tissues of higher organisms. *J. Bacteriol.* **7**, 471–474 (1922)
  100. Wallin R.P., Lundqvist A., Moré S.H., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H.G.: Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* **23**, 130–135 (2002)
  101. Wang H., Tracey K.J. i wsp.: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, **285**, 248–251 (1999)
  102. Wang H., Yang H., Tracey K.J.: Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J. Intern. Med.* **255**, 320–331 (2004)
  103. Wei F., Yang D., Tewary P., Li Y., Li S., Chen X., Howard O.M., Bustin M., Oppenheim J.J.: The alarmin HMGN1 contributes to antitumor immunity and is a potent immunoadjuvant. *Can. Res.* **74**, 5989–5998 (2014)
  104. West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S.: Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 409–437 (2006)
  105. Weyd H., Abeler-Dörner L., Linke B., Mahr A., Jahndel V., Pfrang S., Schnölzer M., Falk C.S., Krammer P.H.: Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8+ T cell immunity. *Plos One*, **8**, e62449 (2013)
  106. Vacchelli E., Kroemer G. i wsp.: Chemotherapy-induced anti-tumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science*, **350**, 972–978 (2015)
  107. Vance R.E.: A Copernican revolution? Doubts about the danger theory. *J. Immunol.* **165**, 1725–1728 (2010)
  108. Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer G.: Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010)
  109. Yang D., Han Z., Oppenheim J.J.: Alarmins and immunity. *Immunol. Rev.* **280**, 41–56 (2017)
  110. Yang D., Oppenheim J.J. i wsp.: High-mobility group nucleosome-binding protein 1 acts as an alarmin and is critical for lipopolysaccharide-induced immune responses. *J. Exp. Med.* **209**, 157–171 (2012)
  111. Yang D., Biragyn A., Hoover D.M., Lubkowski J., Oppenheim J.J.: Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 181–315 (2004)
  112. Yang D., Bustin M., Oppenheim J.J.: Harnessing the alarmin HMGN1 for anticancer therapy. *Immunotherapy*, **7**, 1129–1131 (2015)
  113. Yang D., Chen Q., Schmidt A.P., Anderson G.M., Wang J.M., Wooters J., Oppenheim J.J., Chertov O.: LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1069–1074 (2000)
  114. Yao Y.M., Redl H., Bahrami S., Schlag G.: The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm. Res.* **47**, 201–210 (1998)
  115. Yendamuri S., Fulda G.J., Tinkoff G.H.: Admission hyperglycemia as a prognostic indicator in trauma. *J. Trauma*, **55**, 33–38 (2003)
  116. Yoon K.W., Lee S.W. i wsp.: Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science*, **349**, 1261669 (2015)
  117. Zhang Q., Itagaki K., Hauser C.J.: Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via P38 map kinase. *Shock*, **34**, 55–59 (2010)
  118. Zhou J., Hodi F.S. i wsp.: Soluble PD- L1 as a biomarker in malignant melanoma and checkpoint blockade. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 480–492 (2017)
  119. Zhou R., Tardivel A., Thorens B., Choi I., Tschopp J.: Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* **11**, 136–140 (2010)