

Ουδετερόφιλα και θρόμβωση Από τον ιστικό παράγοντα στα ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης (NETs)

Κ. Καμπάς,¹ Δ. Στάκος²

¹Εργαστήριο Μοριακής Αιματολογίας,
²Καρδιολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο
Αλεξανδρούπολης, Αλεξανδρούπολη

Neutrophils and thrombosis From tissue factor to neutrophil extracellular traps (NETs)

K. Kambas,¹ D. Stakos²

¹Laboratory of Molecular Hematology,
²Department of Cardiology, University Hospital
of Alexandroupolis, Alexandroupoli, Greece

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα ουδετερόφιλα είναι ικανά να παράγουν ιστικό παράγοντα κάτω από συγκεκριμένες φλεγμονώδεις συνθήκες. Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι ο προερχόμενος από τα ουδετερόφιλα ιστικός παράγοντας συνεισφέρει σημαντικά στις θρομβωτικές διαδικασίες. Ωστόσο ο μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιείται ο ιστικός παράγοντας των ουδετεροφίλων δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Η απελευθέρωση των ουδετεροφιλικών δικτύων χρωματίνης (NET) αποτελεί έναν μηχανισμό με τον οποίο τα ουδετερόφιλα μπορούν να σκοτώνουν παθογόνα χωρίς φαγοκυττάρωση. Τα NET αποτελούνται από ινίδια χρωματίνης σχηματίζοντας ένα δίκτυο από DNA, ιστόνες και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες των ουδετεροφίλων οι οποίες έχουν αντιβακτηριακή δράση. Έχει προταθεί ότι τα ουδετερόφιλα μπορούν κάτω από ορισμένες συνθήκες να απελευθερώνουν NET τα οποία εκφράζουν επάνω τους λειτουργικό ιστικό παράγοντα. Επιπλέον, τα NET εγκλωβίζουν αιμοπετάλια τα οποία ενεργοποιούν και τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν την απελευθέρωση επιπλέον NET από άλλα ουδετερόφιλα. Το σύνολο των φαινομένων αυτών φαίνεται ότι αποτελεί έναν μηχανισμό με τον οποίο τα ουδετερόφιλα συνεισφέρουν σε θρομβωτικές διαδικασίες. Στο άρθρο αυτό θα αναφέρουμε τα νεότερα δεδομένα που αφορούν στη σχέση μεταξύ ουδετεροφίλων και θρόμβωσης μέσω της απελευθέρωσης των NET.

ABSTRACT: The production of tissue factor (TF) from neutrophils (PMNs) and their role in thrombotic process is a matter of scientific debate. Experimental studies show that PMNs are able to produce TF under specific inflammatory stimuli. Recent studies demonstrated that PMNs are crucial for thrombus formation and PMN-derived TF may significantly contribute in this process. However, the mechanism that underlies the activation of PMN-derived TF is not fully understood, since PMN TF is mainly located intracellularly. It is important to note that the expression of TF in the surface of the cells is imperative for its functionality. The release of neutrophil extracellular traps represents a mechanism.

Λέξεις ευρετηρίου: Θρόμβωση, ιστικός παράγοντας, φλεγμονή, ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, δίκτυα χρωματίνης.

Key words: Thrombosis, tissue factor, inflammation, neutrophils, neutrophil extracellular traps.

Δημήτριος Στάκος

Καρδιολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο
Αλεξανδρούπολης, Δραγάνα, 681 00 Αλεξανδρούπολη
Τηλ: 6944-996 194, Fax: 25510-762 45
e-mail: dstakos@med.duth.gr

Dimitrios Stakos

Department of Cardiology, University Hospital of Alexandrou-
poli, Dragana, GR-681 00 Alexandroupoli, Greece
Tel: (+30) 6944-996 194, Fax: (+30) 25510-762 45
e-mail: dstakos@med.duth.gr

1. Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι η θρόμβωση αποτελεί μια από τις εκφάνσεις της φλεγμονής. Ο ρόλος των ουδετεροφίλων (PMN) στην αλληλεπίδραση μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης παραμένει ένα ζήτημα υπό συζήτηση. Αν και υπάρχει πληθώρα δεδομένων που προτείνουν έναν βασικό ρόλο για τα PMN στη θρόμβωση,¹ η δυνατότητά τους να προάγουν θρομβωτικές διαδικασίες αμφισβητήθηκε μέχρι πρόσφατα. Και αυτό γιατί η ικανότητα των PMN να παράγουν και να εκκρίνουν ιστικό παράγοντα (TF), τον κύριο ενορχηστρωτή της *in vivo* θρομβογένεσης, αμφισβητείται. Την τελευταία δεκαετία, πειραματικά δεδομένα έδειχναν ότι τα PMN προσλαμβάνουν παρά παράγουν TF.² Έτσι ο ρόλος τους στη θρόμβωση θεωρήθηκε μη σημαντικός και τα PMN δεν συμπεριλήφθηκαν στα ερευνητικά πειραματικά μοντέλα θρόμβωσης.

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες ανέδειξαν τον σημαντικό ρόλο των PMN στη θρόμβωση.³⁻⁵ Για παράδειγμα, η εξουδετέρωση των ουδετεροφίλων από πειραματόζωα με ειδικά αντισώματα ήταν ικανή να αναστείλει τη θρόμβωση τονίζοντας έτσι τη σημασία αυτού του πληθυσμού στη δημιουργία του θρόμβου.⁵ Παράλληλα, πολλές μελέτες έδειξαν την ικανότητα των PMN να παράγουν TF τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*.^{6,7}

Η περιγραφή των ουδετεροφιλικών δικτύων χρωματίνης (NET) το 2004 ανέδειξε έναν νέο φλεγμονώδη ρόλο για τα PMN.^{8,9} Η ικανότητα των PMN να εκφράζουν TF επάνω στα NET και η σύνδεση μεταξύ PMN-θρόμβωσης προτείνει πλέον ένα νέο είδος αλληλεπίδρασης μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης. Η έκφραση του –παραγόμενου από τα PMN–TF πάνω στα NET αποτέλεσε ενδιαφέρον σενάριο για την παθογένεση των θρομβωτικών επεισοδίων σε νοσήματα όπως η σήψη,¹⁰ η ANCA-αγγειίτιδα¹¹ και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου.¹²

Οι φλεβικές θρομβώσεις αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της παθολογίας ασθενών που πάσχουν από λοιμώδη νοσήματα και μη λοιμώδεις φλεγμονώδεις νόσους. Για παράδειγμα, η φλεβική θρομβοεμβολή αποτελεί σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας σε νόσους όπως η σήψη, ο ερυθματώδης λύκος, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και αγγειίτιδες.^{13,14} Πειραματικά δεδομένα συνδέουν την προθρομβωτική κατάσταση στα νοσήματα αυτά με την ενεργοποίηση του εξωγενούς συστήματος της πήξης από τον TF. Έτσι η αυξημένη έκφραση TF στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα του περιφερικού

αίματος φαίνεται ότι χαρακτηρίζει την παθοφυσιολογία των αρτηριακών και φλεβικών θρομβώσεων.¹⁵ Από την άλλη πλευρά η θρόμβωση δημιουργεί τις προϋποθέσεις για πρόκληση ενός φλεγμονώδους περιβάλλοντος. Ο άξονας TF-θρομβίνης ενισχύει τη φλεγμονώδη απάντηση σε πολλά κλινικά μοντέλα όπως η αρθρίτιδα,¹⁶ το αντιφωσφολιπιδαιμικό σύνδρομο,^{7,17} η βλάβη από ισχαιμία/επαισιμάτωση¹⁸ και η σήψη.^{19,20}

2. Ο ιστικός παράγοντας ως εκκινήτης της πήξης

Ο TF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη και θεωρείται ως ο κύριος πυροδότης της πήξης *in vivo*. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο TF δεν εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα²¹ αλλά μόνο στις υπενδοθηλιακές στιβάδες οι οποίες δημιουργούν ένα προστατευτικό περίβλημα μεταξύ του αίματος και του αγγείου.²² Ωστόσο, κάτω από συγκεκριμένες φλεγμονώδεις συνθήκες ο TF εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε λευκά αιμοσφαίρια της μυελικής σειράς.^{6,7} Υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη κυκλοφορούντος (blood-borne) TF με τρεις πιθανές πηγές παραγωγής. Τα κύτταρα του περιφερικού αίματος,^{7,22} τα μικροσωματίδια (MPs)²³ και η διαλυτή μορφή του TF.²⁴ Αν και έχει αναφερθεί ότι τα μονοκύτταρα είναι τα μόνα από τα λευκά αιμοσφαίρια που εκφράζουν TF, πρόσφατα έχει φανεί ότι και άλλοι πληθυσμοί λευκοκυττάρων μπορούν να εκφράσουν TF. Όμως η απλή έκφραση του TF στην επιφάνεια των κυττάρων δεν αρκεί για να προσδώσει λειτουργικότητα στον TF.²⁵ Τα PMN δεν εκφράζουν TF στην επιφάνειά τους και ο παράγοντας αυτός απαιτεί ενεργοποίηση (decryption) για τον σχηματισμό του σύμπλοκου TF/FVIIa. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί στη συνέχεια να ενεργοποιήσει τον παράγοντα X και τη θρομβίνη (II), με τελικό αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του θρόμβου.²⁶ Οι πιθανοί μηχανισμοί πίσω από την ενεργοποίηση του TF που εκφράζουν τα λευκοκύτταρα δεν είναι απόλυτα γνωστοί και η μελέτη τους ενδέχεται να αποφέρει σημαντικές πληροφορίες για τον ρόλο του –παραγόμενου από τα λευκοκύτταρα–TF στη θρόμβωση.

Εξάλλου εκτός από τον ρόλο του TF στην ενεργοποίηση του εξωγενούς συστήματος της πήξης, ο άξονας TF-θρομβίνης εμπλέκεται και σε άλλες μη θρομβωτικές διαδικασίες όπως αγγειογένεση, ανάπτυξη όγκων και μετάσταση, φλεγμονή και ίνωση μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων της θρομβίνης PARs.²⁷

3. Η παραγωγή TF από τα ουδετερόφιλα

Η έκφραση TF σε PMN έχει αναφερθεί για πρώτη φορά πριν από 40 έτη,²⁸ αν και αυτές οι αρχικές μελέτες δεν έδιναν αποδείξεις για την ικανότητα των PMN να παράγουν TF. Ωστόσο, πριν από 10 έτη δημοσιεύθηκαν τα πρώτα στοιχεία που έδειχναν την ικανότητα των PMN να παράγουν TF. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι στα PMN, όπως και στα μονοκύτταρα, υπάρχει ο εκκινητής του γονιδίου του TF, ο οποίος ενεργοποιείται με μεθυλίωση επιτρέποντας την έναρξη της μεταγραφής.

Μελέτες από τον Osterud το 2004 και το 2012 όμως, έδειχναν ότι μεμονωμένα PMN δεν μπορούσαν να παράγουν TF όταν διεγείρονταν με LPS, PMA ή TNFα.^{29,30} Η δράση του TF στα υπερκείμενα από καλλιέργειες PMN αποδόθηκε σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από εναπομείναντα μονοκύτταρα. Σε μια μελέτη φάνηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος από TF-θετικά κύτταρα που ανευρίσκονταν σε σπλήνες σε πειραματικά μοντέλα σήψης ήταν PMN, αν και δεν ανιχνευόταν TF mRNA στα κύτταρα αυτά. Έτσι οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα PMN προσλαμβάνουν μάλλον παρά παράγουν τα ίδια τον TF.³¹ Το εύρημα αυτό υποστηρίχθηκε και από άλλους ερευνητές που έδειξαν την ικανότητα των PMN να προσλαμβάνουν τον TF που παράγουν τα μονοκύτταρα.² Όμως στις εργασίες αυτές οι ερευνητές χρησιμοποίησαν περιορισμένα μέσα ενεργοποίησης για τα PMN.

Από την άλλη πλευρά, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα PMN μπορούν να παράγουν λειτουργικό TF μετά από διέγερση με P-σελεκτίνη ή fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine). Ωστόσο, τα PMN εξέφρασαν TF ενδοκυττάρια και μετά από τις συγκεκριμένες διεγέρσεις μέρος του TF μεταφερόταν προς την επιφάνεια των κυττάρων.⁶ Την ίδια εποχή φάνηκε και η δυνατότητα των PMN να παράγουν TF *ex vivo* σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδαιμικό σύνδρομο.⁷ Στις καταστάσεις αυτές η IgG σφαιρίνη των ασθενών διεγείρει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (C5a), και αυτό με τη σειρά του ήταν ικανό να προαγάγει τη μεταγραφή του γονιδίου του TF και την παραγωγή ενεργού TF από τα ουδετερόφιλα.³² Ακόμη, άλλη μελέτη έδειξε την παραγωγή TF από ουδετερόφιλα που απομονώθηκαν από ασθενείς με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS).³³ Η παραγωγή TF στους ασθενείς αυτούς αποδόθηκε στη συνδυασμένη διέγερση με C5a και TNFα, φαινόμενο που, όπως δείξαμε, παρατηρήθηκε ακόμη σε ασθενείς με εξωσωματική κυκλοφορία και σε ασθενείς με τελικό στάδιο νεφρικής ανεπάρκειας.³⁴ Βέβαια, αν και όλες αυτές οι μελέτες αποδεικνύουν την ικανότητα των PMN

να παράγουν ενδοκυττάρια TF, δεν απαντούν στην ερώτηση πώς τα κύτταρα αυτά εξωκυτταρώνουν και ενεργοποιούν τον TF για να μετατραπεί σε μόριο ικανό να αντιδρά με τις πρωτεάσες του συστήματος πήξης που κυκλοφορούν στο αίμα. Η ανακάλυψη των NET φαίνεται πως προσφέρει νέα δεδομένα και πιθανές απαντήσεις στο αμφιλεγόμενο αυτό ζήτημα.

4. Ουδετερόφιλα και θρόμβωση

Ανεξάρτητα από το αν τα PMN είναι ή δεν είναι ικανά να παράγουν και να ενεργοποιούν TF, πολλά δεδομένα δείχνουν ότι παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη θρόμβωση όσο και σε φλεγμονώδεις νόσους με θρομβωτικές επιπλοκές. Σε πειραματικά μοντέλα οξείας πνευμονικής βλάβης όπως μετά από εισπνοή οξέων,³⁵ ισχαιμίας-επαναιμάτωσης³⁶ και πνευμονικής βλάβης από μετάγγιση (TRALI),³⁷ η αφαίρεση/εξουδετέρωση των ουδετεροφίλων μετρίασε τις βλάβες από θρομβωτικές επιπλοκές. Ακόμη, η συμβολή των ουδετεροφίλων στη θρόμβωση μπορεί να οφείλεται στην αποδόμηση του αναστολέα του TF (TFPI) με έκκριση ελαστάσης³⁸ ή στην παραγωγή PDI μιας πρωτεΐνης που ενεργοποιεί τον TF.^{5,39}

Πρόσφατα, μια μελέτη έδειξε ότι η προσκόλληση PMN είναι ένα αρχικό και κριτικό στάδιο για τη δημιουργία θρόμβωσης μετά από βλάβη του ενδοθηλίου (LASER) σε αρτηριόλια.⁴ Μάλιστα, φάνηκε ότι τα PMN είναι η κύρια πηγή TF που απαιτούνταν για τη δημιουργία του θρόμβου. Ακόμη, η έλλειψη του παράγοντα XII στα πειραματόζωα αυτά δεν ανέστειλε τη δημιουργία του θρόμβου. Σε μια άλλη εργασία, σε ζωικά μοντέλα εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης (με απόφραξη της κάτω κοίλης φλέβας, η εξουδετέρωση των PMN ανέστειλε τη δημιουργία του θρόμβου.⁵ Με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων ποντικών και μεταμόσχευση μυελού των οστών, στην εργασία αυτή φάνηκε επίσης ότι ο TF που προερχόταν από PMN και όχι από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν υπεύθυνος για την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης. Αυτές οι καλά σχεδιασμένες μελέτες προσέφεραν πολλά και σημαντικά στοιχεία για τη σημασία των PMN και του προερχόμενου από τα PMN TF στη θρόμβωση.

5. Ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης και θρόμβωση

Τα PMN αποτελούν μέρος της φυσικής ανοσίας και η κύρια λειτουργία τους είναι η εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω φαγοκυττάρωσης. Πρόσφατα ένας νέος μηχανισμός έχει περιγραφεί με

τον οποίο τα PMN μπορούν να εξουδετερώνουν παθογόνα μέσω απελευθέρωσης δικτύων χρωματίνης των NETs. Τα NET αποτελούνται από ινίδια χρωματίνης που σχηματίζουν ένα δίκτυο από DNA, ιστόνες, και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες των PMN οι οποίες έχουν αντιβακτηριακή ή ανοσοτροποποιητική δράση.^{40,41} Τα NET απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα PMN σε οξείες καταστάσεις φλεγμονής σαν ένα τελευταίο μέσο άμυνας, αφού μετά από την απελευθέρωση των NET τα PMN καταστρέφονται.⁴² Νεότερες μελέτες δείχνουν έναν σημαντικό ρόλο των NET σε πειραματικά μοντέλα θρόμβωσης. Μάλιστα, χρησιμοποιώντας ένα ζωικό μοντέλο ενδοτοξιναιμίας, μια μελέτη έδειξε ότι τα NET μέσα στα αγγεία μπορούν να παγιδεύσουν κυκλοφορούντα αιμοπετάλια.⁹ Η παγίδευση των αιμοπεταλίων στα NET προκαλεί την ενεργοποίησή τους και ενδοθηλιακή βλάβη, με αποτέλεσμα θρόμβωση. Μερικά χρόνια αργότερα δημοσιεύθηκε και η συνεισφορά των NET στην εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση σε πρωτεύοντα.⁴³ Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα NET παγιδεύουν αιμοπετάλια και ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ τα NET χρησιμεύουν και σαν βάση για εναπόθεση ινικής που προάγει τη σταθεροποίηση του θρόμβου. Ακόμη φάνηκε πως οι ιστόνες που βρίσκονται στα NET μπορούν να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια που παγιδεύονται εκεί. Από την άλλη πλευρά, τα αιμοπετάλια φάνηκε πως μπορούν να ενεργοποιήσουν τα PMN προς απελευθέρωση NET.⁴⁴ Μάλιστα, η αναστολή ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ελάττωσε τη δημιουργία NET και τις ιστικές βλάβες σε πειραματικά μοντέλα πνευμονικής βλάβης από μετάγγιση (TRALI). Επιπροσθέτως, η θεραπεία είτε με αναστολέα ιστονών είτε με DNάση I ελάττωσε επίσης την ιστική βλάβη σε TRALI. Αντίστοιχα η θεραπεία με DNάση I προκάλεσε μικρότερους θρόμβους σε πειραματικά μοντέλα εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης.⁵ Τέλος, NET παρατηρήθηκαν επίσης σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία αλλά και σε συμπαγείς όγκους, και σχετίστηκαν με την προθρομβωτική κατάσταση που συνοδεύει τα νοσήματα αυτά.⁴⁵

6. Εξωκυττάρια απελευθέρωση του ιστικού παράγοντα των PMN μέσω NET

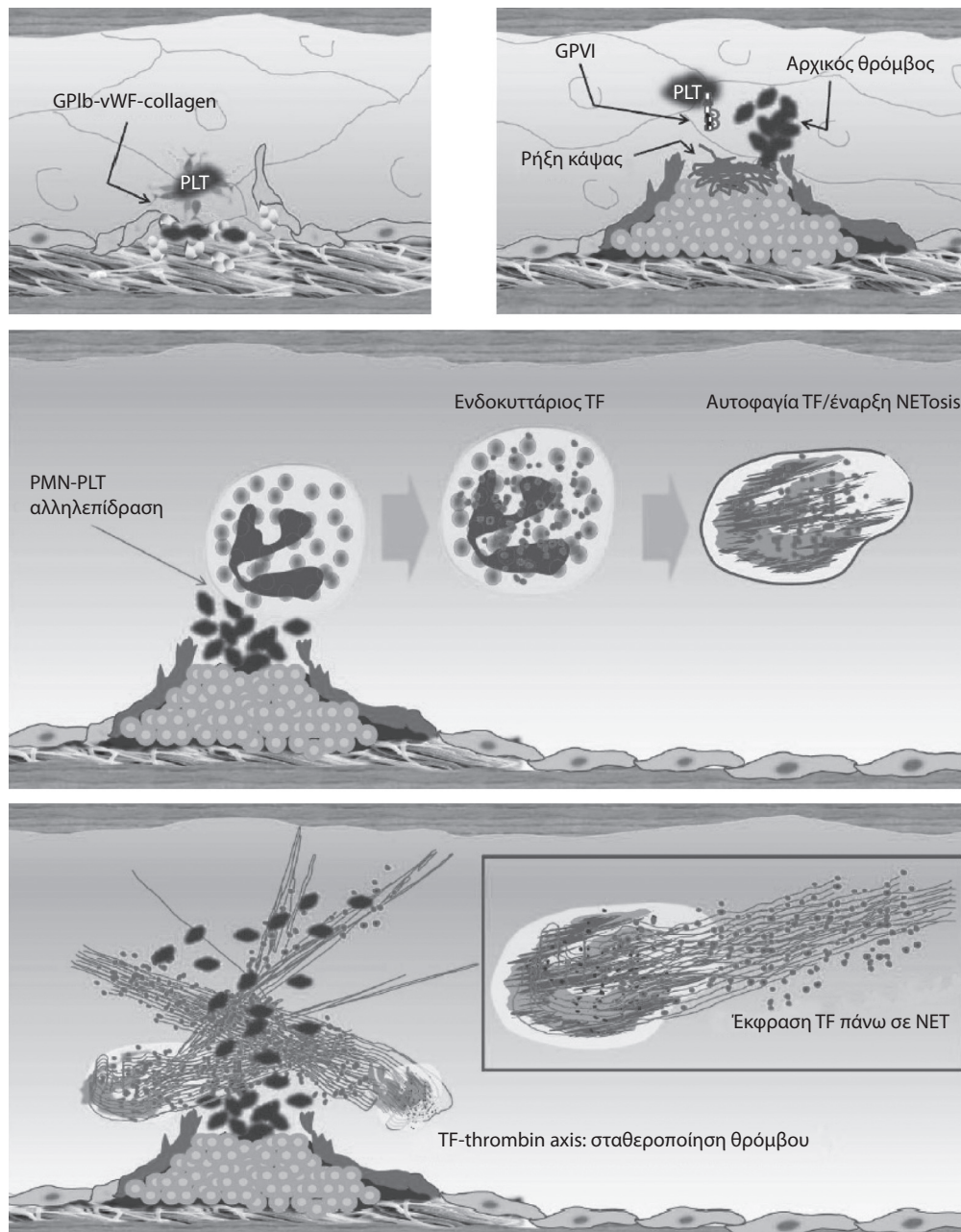
Η συμμετοχή των PMN στη θρόμβωση αμφισβητήθηκε κυρίως λόγω της διαμάχης που υπήρχε στο αν τα κύτταρα αυτά παράγουν ή όχι λειτουργικό ιστικό παράγοντα. Επίσης η ενδοκυττάρια ανεύρεση του TF στα PMN γεννούσε αμφιβολίες σχετικά με τη δυνατότητά του να ενεργοποιεί το σύστημα της πήξης, αφού μόνο ελάχιστες ποσότητες ιστικού παράγοντα ανευρί-

σκονται στην κυτταρική μεμβράνη. Είναι γνωστό ότι ο TF που βρίσκεται ενδοκυττάρια δεν είναι λειτουργικός. Μια εξήγηση για την εξωκυττάρια έκφραση του TF των PMN είναι η ανεύρεσή του επάνω στο δίκτυο των NET. Η πρώτη παρατήρηση TF επάνω σε NET έγινε το 2012. Πρόσφατα η ομάδα μας περιέγραψε την παρουσία TF επάνω σε δίκτυο NET σε ασθενείς με σήψη.⁴⁶ Ο TF των NET ήταν ικανός να παράγει θρομβίνη και να προκαλεί ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Η πλήρης απομάκρυνση των μικροσωματιδίων (MPs) από το πλάσμα των ασθενών δεν άλλαξε τα αποτελέσματα δείχνοντας ότι τα PMN παράγουν TF και δεν τον προσλαμβάνουν από τα MPs. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου του TF μπορεί να προκληθεί από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες μετά από φαγοκυττάρωση σε καταστάσεις βακτηριακής λοίμωξης. Σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε ότι ο TF, προτού απελευθερωθεί εξωκυττάρια, στην επιφάνεια των NETs περικλείεται σε αυτοφαγώματα (LC3 positive χρώση), προτείνοντας έτσι την αυτοφαγία σαν ενδιάμεσο απαραίτητο μηχανισμό για την έκφραση επιτόπων στα δίκτυα χρωματίνης, τα NETs. Η αυτοφαγία αποτελεί τον βασικό μηχανισμό για την «αυτοκάθαρση» των κυττάρων από ανεπιθύμητα υλικά και οργανίδια. Τα υλικά αυτά ενσωματώνονται σε κυστίδια (αυτοφαγώματα) που περιέχουν ένζυμα καταβολισμού, όπου διασπώνται και ενδεχομένως ανακυκλώνονται. Εκτός από την ανακύκλωση κυτταρικών υλικών, ιδιαίτερα σε περιόδους κυτταρικής αστίας, η αυτοφαγία φαίνεται να συμμετέχει σε πολλές φλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές δράσεις των ουδετεροφίλων.⁴⁷

Βάσει όλων των ανωτέρω δεδομένων, τα NET ενδέχεται να αποτελούν έναν μηχανισμό εξωκυττάρωσης αλλά και ενεργοποίησης του TF των PMN, κατά αντίστοιχο τρόπο που τα κύτταρα αυτά εξωκυττάρωνουν μέσω NET αντιβακτηριακά ένζυμα επάνω στο δίκτυα των NET. Σε καταστάσεις άσηπτης φλεγμονής, όπως π.χ. ρήξη αθηρωματικής πλάκας ή ενδοθηλιακή βλάβη, η απελευθέρωση των NET που φέρουν λειτουργικό TF ενεργοποιεί το σύστημα πήξης και διεγείρει αιμοπετάλια τα οποία παγιδεύονται στα NET. Παράλληλα τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προκαλούν την απελευθέρωση επιπλέον NET μετά από αλληλεπίδραση με PMN, δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο ενεργοποίησης της απελευθέρωσης NET και θρόμβωσης (εικόνα 1).

7. Συμπεράσματα και μελλοντικές προεκτάσεις

Παρά τη γνωστή από χρόνια σχέση μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης στην κλινική πράξη, ο ρόλος των PMN στη θρόμβωση είχε αμφισβητηθεί μέχρι



Εικόνα 1. *Επάνω:* η διαφορά μεταξύ αιμόστασης (έναρξη διαδικασία από ρήξη του υγιούς ενδοθηλίου και αποκάλυψη υπενδοθηλιακών στιβάδων του αγγειακού τοιχώματος) και θρόμβωσης (έναρξη διαδικασία από ρήξη αθηρωματικής πλάκας και αποκάλυψη του λιπώδους και ρυπαρού πυρήνα της) στην αναρκτήρια πυροδότησή τους. *Μέσον:* Η συμμετοχή κυττάρων φυσικής ανοσίας είναι μια ακόμη διαφορά μεταξύ αιμόστασης και θρόμβωσης. *Αριστερά:* τα ουδετερόφιλα (PMN) προσελκύνονται στην περιοχή της ρήξης/φλεγμονής και αλληλεπιδρούν με ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Παρατηρείται αύξηση του ενδοκυττάρια ιστικού παράγοντα (TF) στα PMN και έναρξη διαδικασία NETosis (αφού αρχικά ο TF μεταφερθεί σε αυτοφαγοσώματα, μέσον). Η πυρηνική μεμβράνη κατακερματίζεται και οι μεμβράνες των κυτταρικών οργανιδίων διαλύονται. Γίνεται ανάμιξη του πυρηνικού υλικού (ιστόνες, DNA) με τα αυτοφαγοσώματα, και το κύτταρο αρχίζει να συσπάται για να εξωκυτταρώσει το μίγμα πυρηνικού υλικού και TF σε μορφή NETs (δεξιά). *Κάτω:* Εξωκυττάρια απελευθέρωση NETs που φέρουν TF στην περιοχή σχηματισμού του θρόμβου. Ο TF που εκφράζεται στα NETs είναι λειτουργικός και προάγει την παραγωγή θρομβίνης, με τη δράση της οποίας σταθεροποιείται ο αρχικός θρόμβος (ινική). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι φαρμακευτικές ουσίες που στοχεύουν στις διαφορές μεταξύ αιμόστασης και θρόμβωσης (αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-PMNs, αναστολή αυτοφαγίας/NETosis ή αποσταθεροποίηση της δομής των NET, π.χ. DNάση) ενδέχεται να αποτελούν αποτελεσματικές συμπληρωματικές θεραπείες στα χρησιμοποιούμενα σήμερα αντιθρομβωτικά, χωρίς να έχουν σημαντικές αιμορραγικές επιπλοκές (αφού δεν θα επηρεάζουν τους μηχανισμούς της αιμόστασης).

πρόσφατα. Νεότερα δεδομένα όμως υποστηρίζουν τη σημαντική συνεισφορά των PMN στη δημιουργία τόσο φλεβικής όσο και αρτηριακής θρόμβωσης. Η συγκέντρωση των PMN παρατηρείται ευθύς αμέσως από ενδοθηλιακή βλάβη, και θεωρείται πως αποτελεί αρχικό βήμα για τη δημιουργία του θρόμβου. Η τοπική έκφραση μεγάλων συγκεντρώσεων TF που εκφράζονται επάνω στα NET μπορεί να είναι σημαντική για την έναρξη, την ανάπτυξη και τη σταθεροποίηση του θρόμβου. Επιπροσθέτως, ο TF –μέσω ενεργοποίησης των PAR υποδοχέων– όχι μόνο διεγείρει τα αιμοπετάλια αλλά ενδέχεται να έχει και άλλες μη θρομβωτικές δράσεις, όπως διατήρηση της φλεγμονής, ίνωση μέσω ενεργοποίησης των ινοβλαστών, αλλά και άλλες δράσεις που εμπλέκονται στην παθολογία των καρκινικών όγκων. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της θεραπείας με DNAάση που δείχνουν ότι αποσταθεροποιεί τον θρόμβο (χωρίς φυσικά να αυξάνει τις αιμορραγικές επιπλοκές) ενδέχεται να δώσουν ώθηση για τη μελέτη νέων θεραπευτικών στόχων σε ασθενείς με θρομβωτικές καταστάσεις.

Βιβλιογραφία

- Lerne RG, Goldstein R, Cummings G et al. Stimulation of human leukocyte thromboplastic activity by endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971, 138:145–148
- Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO et al. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood* 2008, 111:1208–1216
- Looney MR, Su X, VanZiffle JA et al. Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2006, 116:1615–1623
- Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injure endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012, 120:2133–2143
- vonBrühl ML, Stark K, Steinhart A et al. Monocytes, neutrophils and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo*. *J Exp Med* 2012, 209:819–835
- Maugeri N, Brambilla M, Camera M et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost* 2006, 4:1323–1330
- Ritis K, Doumas M, Mastellos D et al. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol* 2006, 177:4794–4802
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004, 303:1532–1535
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007, 13:463–469
- Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004, 103:4545–4553
- Tomasson G, Monach PA, Merkel PA. Thromboembolic disease in vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2009, 21:41–46
- Miehler W, Reinisch W, Valic E et al. Is inflammatory bowel disease an independent and disease specific risk factor for thromboembolism? *Gut* 2004, 53:542–548
- Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K et al. Autoimmune diseases and venous thromboembolism: are view of the literature. *Am J Cardiovasc Dis* 2012, 2:171–183
- Santos MJ, Carmona-Fernandes D, Canhão H et al. Early vascular alterations in SLE and RA patients - a step towards understanding the associated cardiovascular risk. *PLoS ONE* 2012, 7:e44668
- Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* 2009, 7(Suppl 1):136–139
- Busso N, Morard C, Salvi R et al. Role of the tissue factor pathway in synovial inflammation. *Arthritis Rheum* 2003, 48:651–659
- Redecha P, Tilley R, Tencati M et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood* 2007, 110:2423–2431
- Loubele ST, Spek CA, Leenders P et al. Active site inhibited factor VIIa attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Thromb Haemost* 2009, 7:290–298
- Osterud B, Bjorklid E. The tissue factor pathway in disseminate intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001, 27:605–617
- Wang JG, Manly D, Kirchhofer D et al. Levels of microparticle tissue factor activity correlate with coagulation activation in endotoxemic mice. *J Thromb Haemost* 2009, 7:1092–1098
- Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM et al. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:2839–2843
- Drake TA, Morrissey JH Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989, 134:1087–1097
- Mallat Z, Benamer H, Hugel B et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000, 101:841–843
- Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J et al. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003, 9:458–462
- Rao V, Kothari H, Pendurthi UR. Tissue factor encryption and decryption: facts and controversies. *Thromb Res* 2012, 129(Suppl 2):13–17
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22:1381–1389
- Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005, 3:1800–1814
- Lerner RG, Goldstein R, Cummings G et al. Stimulation of human leukocyte thromboplastic activity by endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971, 138:145–148
- Osterud B. Tissue factor in neutrophils: No. *J Thromb Haemost* 2004, 2:218–220
- Osterud B. Tissue factor/TFPI and blood cells. *Thromb Res* 2012, 129:274–278
- deWaard V, Hansen HR, Spronk H et al. Differential expression of tissue factor mRNA and protein expression in murine sepsis. The role of the granulocyte revisited. *Thromb Haemost* 2006, 95:348–353

32. Redecha P, Tilley R, Tencati M et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood* 2007, 110:2423–2431
33. Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA et al. C5a and TNF-alpha upregulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 2008, 180:7368–7375
34. Kourtzelis I, Markiewski MM, Doumas M et al. Complement anaphylatoxin C5a contributes to hemodialysis-associated thrombosis. *Blood* 2010, 116:631–639
35. Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA et al. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1995, 96:107–116
36. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF et al. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 1997, 150:1773–1784
37. Looney MR, Su X, VanZiffle JA et al. Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2006, 116:1615–1623
38. Massberg S, Grahl L, vonBruehl ML et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010, 16:887–896
39. Reinhardt C, vonBrühl ML, Manukyan D et al. Protein disulfide isomerise acts as an injury signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 2008, 118:1110–1122
40. Jaillon S, Peri G, Delneste Y et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* 2007, 204:793–804
41. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil anti-gens to myeloid dendritic cells towards ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012, 120:3007–3018
42. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007, 5:577–582
43. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:15880–15885
44. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2012, 122:2661–2671
45. Demers M, Krause DS, Schatzberg D et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109:13076–13081
46. Kambas K, Mitroulis I, Apostolidou E et al. Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis. *PLoS ONE* 2012, 7:e45427
47. Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K et al. Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur J Immunol* 2010, 40:1461–1472

Ημερομηνία Υποβολής 29/8/2014

Ημερομηνία Έγκρισης 22/9/2014