

A thrombotikus és gyulladásos események modulátorai

A neutrophil granulocyták és thrombocyták hálózata

DR. SZEDERJESI ATTILA

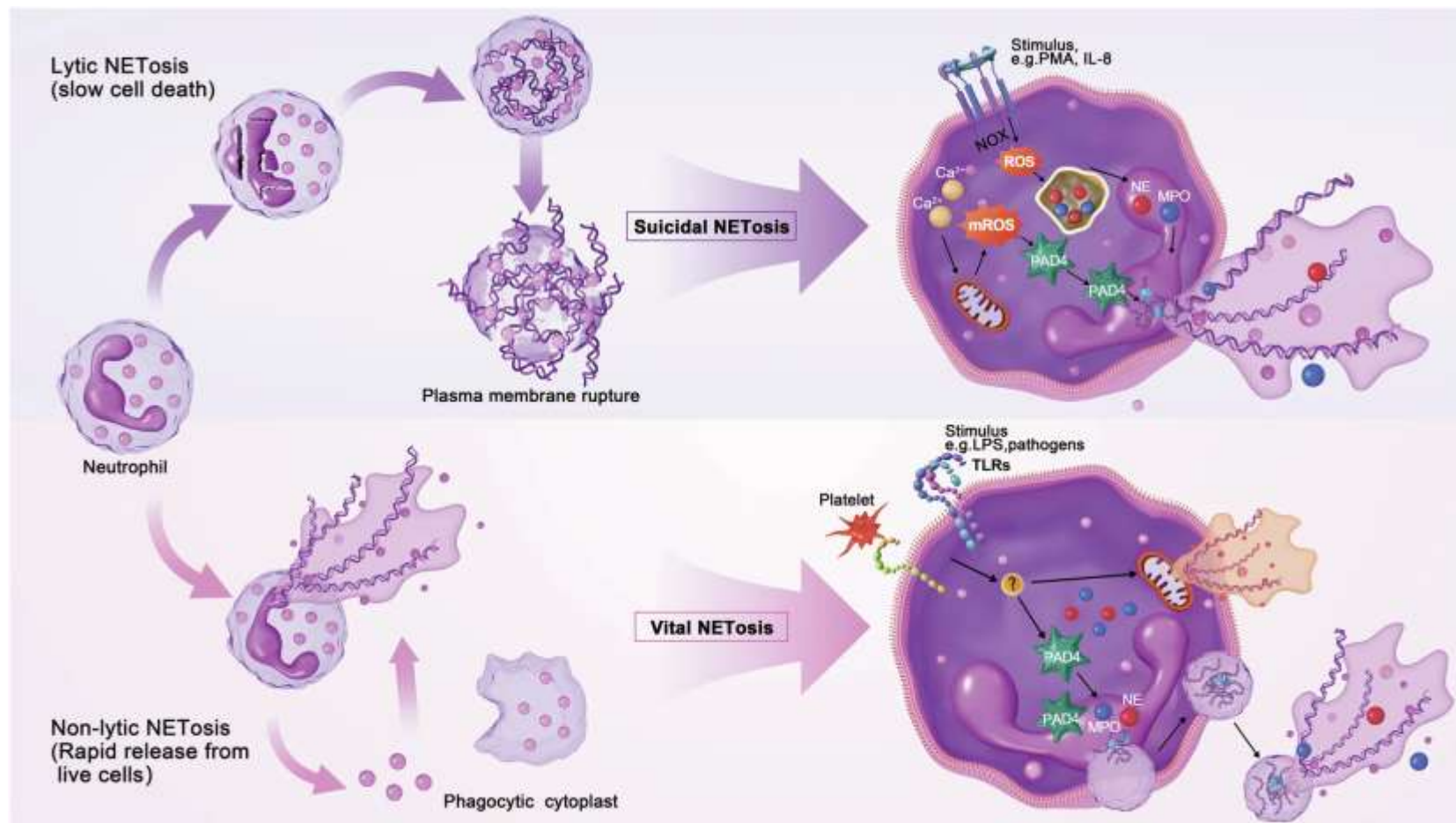
SEMMELWEIS EGYETEM, LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET



SEMMELWEIS
EGYETEM 1769

Tartalom

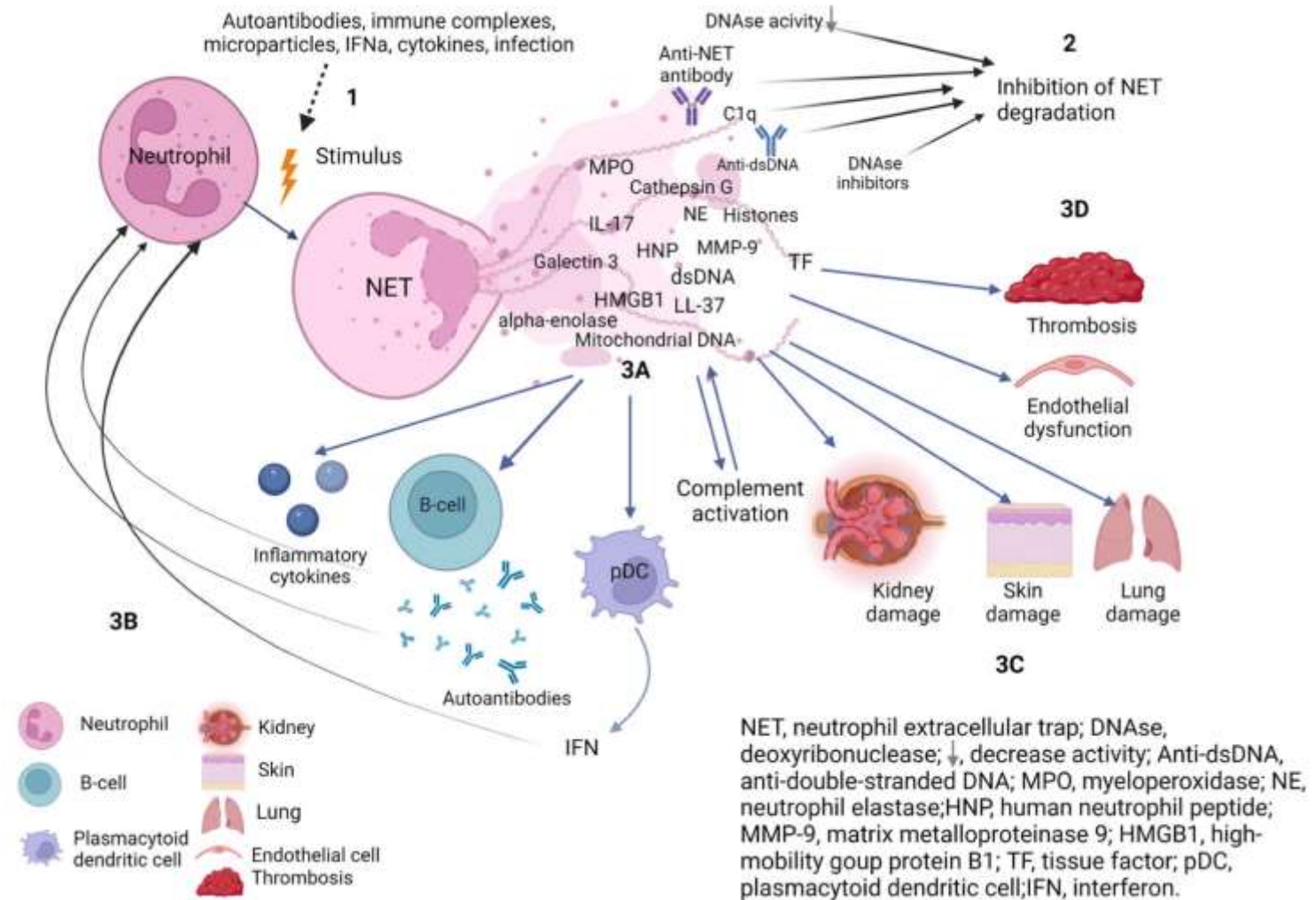
- NET - NETosis
- NET + PLT
- NET + PLT + VWF
- NET + PLT + VWF + ADAMTS13



Wang, H., Kim, S.J., Lei, Y. et al. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. Sig Transduct Target Ther 9, 235 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01933-x>

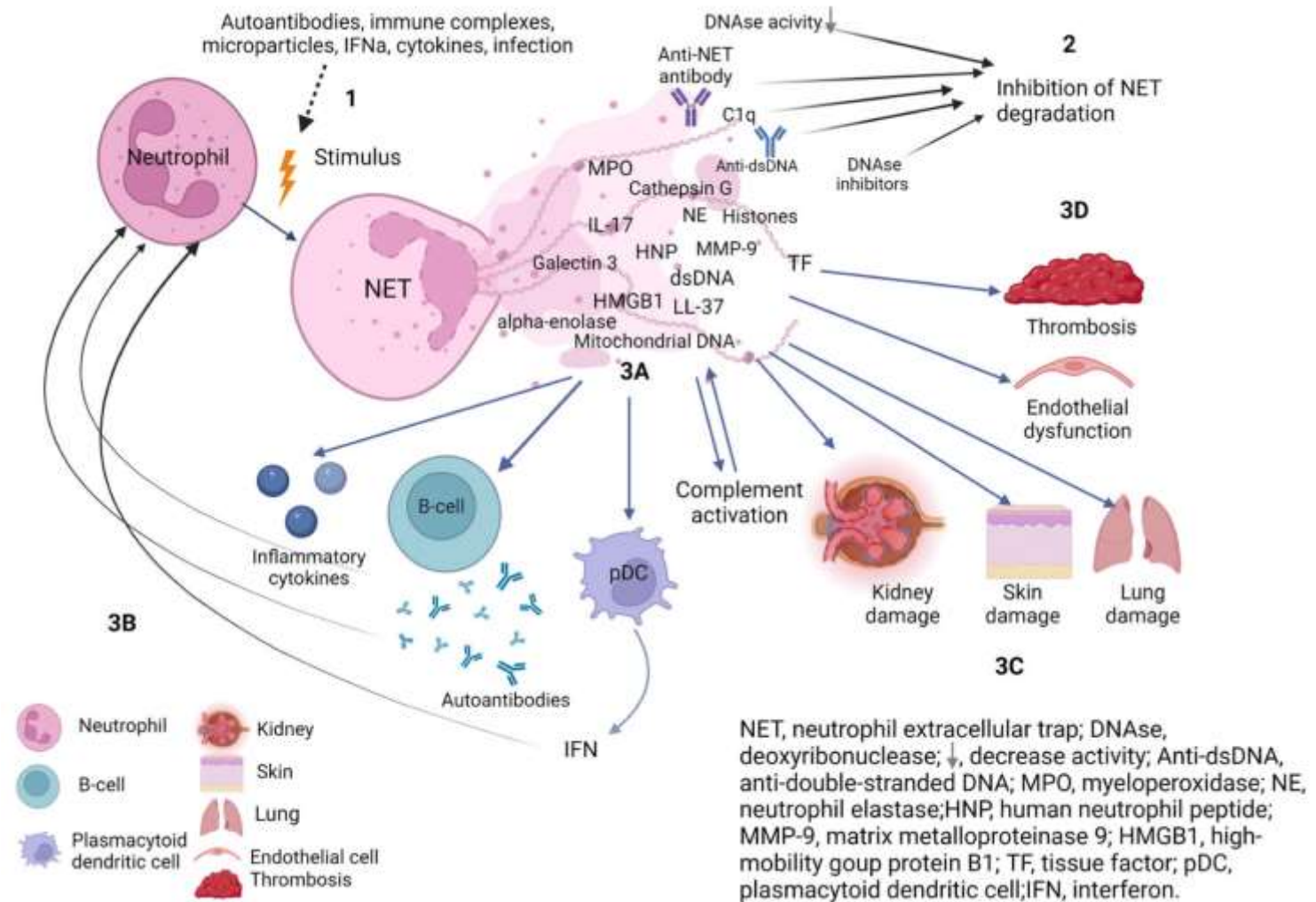
NET

- Neutrophil Extracellular Trap
- Alapvető fontosságúak az immunvédekezési mechanizmusokban
- Kórokozók eltávolítása, immunszabályozásban és betegség-patogenezisben betöltött szerep
- Túlzott felhalmozódása érelzáródáshoz, szövetkárosodáshoz és hosszan tartó gyulladásos válaszokhoz vezethet
- Autoantigénként működhetnek
- Gyulladásos mediátorként funkcionálhatnak
- Szerepe van a SLE, RA, diabétesz, atherosclerosis, vasculitis, thrombosis, daganat kialakulásban/romlás

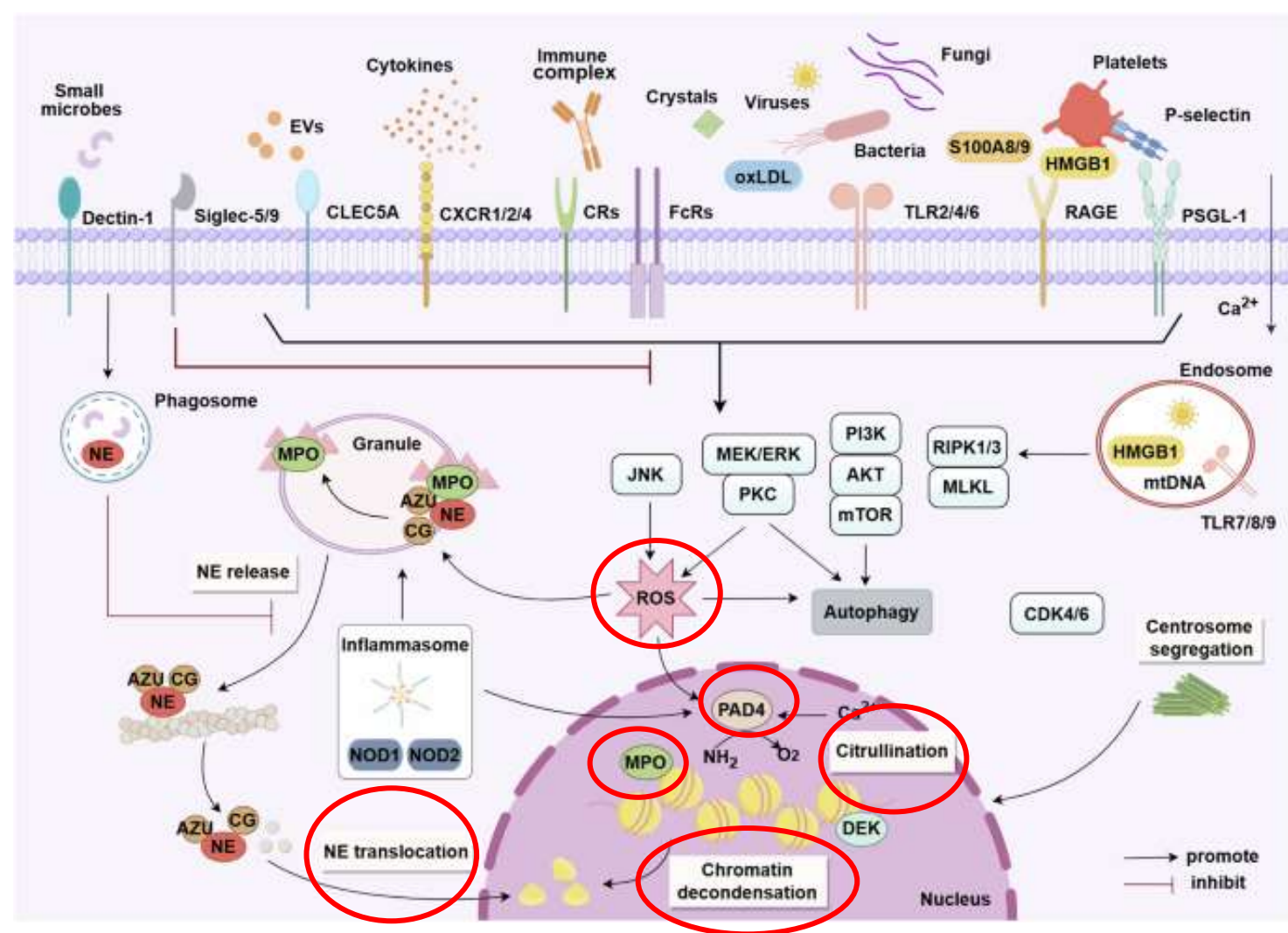


Reshetnyak, T.; Nurbaeva, K. The Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus and Antiphospholipid Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13581. <https://doi.org/10.3390/ijms241713581>

- **DNS és hiszton: dekonzenzált kromatin**
- **Proteinek:**
 - **Neutrophil elasztáz (NE):** antimikrobiális és inflammatorikus hatás
 - **Myeloperoxidáz (MPO):** oxidatív hatás
 - **Cathepsin G:** szerin proteáz - azurofil granulumokban - erős baktericid - EM lebontása - PLT aktiválás
 - **Gelatinase:** proteáz - extracellular matrix lebontás
- **Fonalak vastagsága: 15-25 nm, együttesen 50 nm**
- **Hossza akár 150 µm**



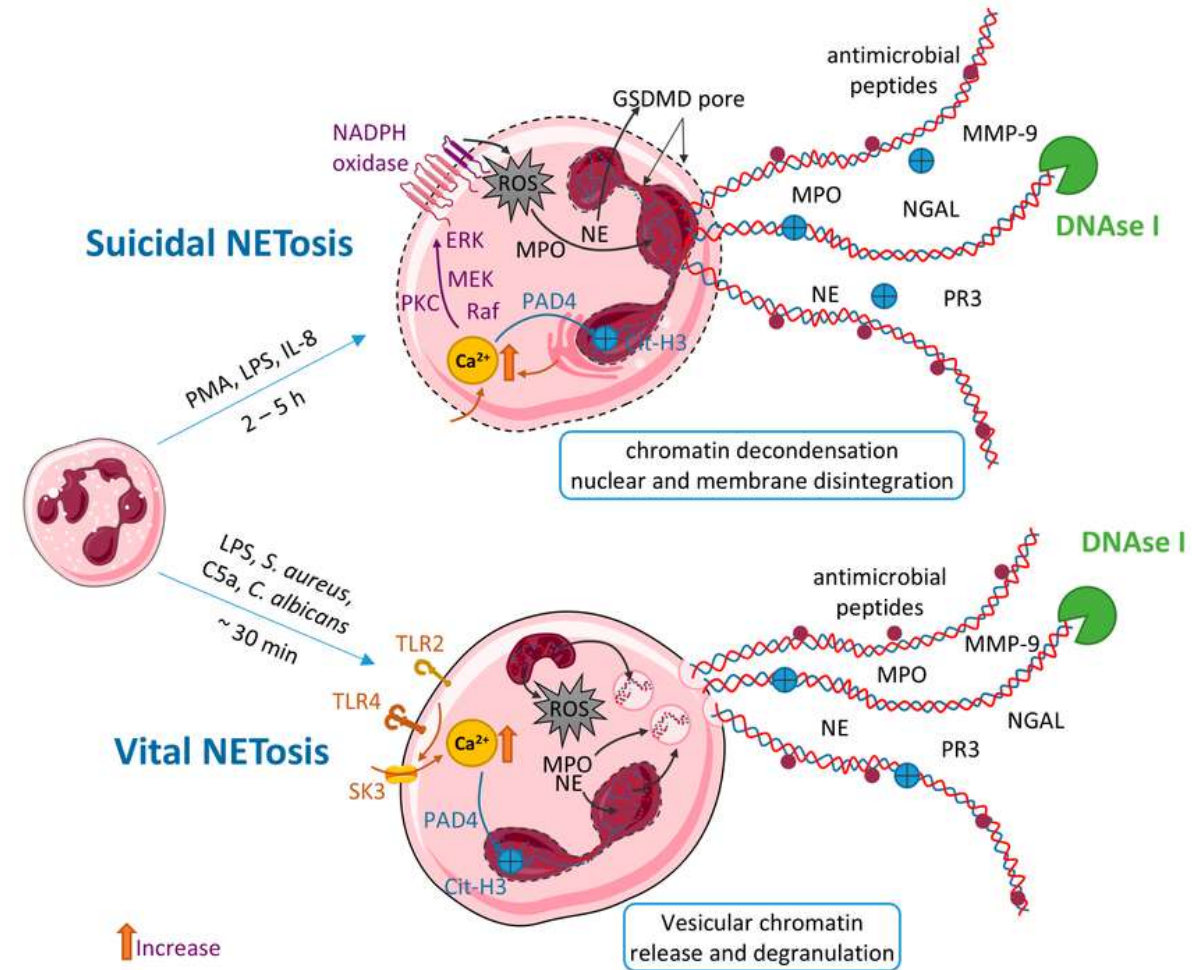
- Aktiválás
 - Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP)
 - Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP)
 - mintázatfelismerő receptorok TLR - MAPK-kaszád (mitogen-activated protein kinase) és a PKC (protein kinase C)
 - PAD4 (peptidylarginin deimináz 4) Ca^{2+} függő - hiszton citrullináció (arginin - citrullin), töltés semlegesítés - Neutrofil Elasztáz (NE) és a Mieloperoxidáz (MPO), transzlokálódnak a sejtmagba, ahol tovább segítik a hisztonok hasítását és a kromatin feldolgozását. A maghártya szétesik
 - NOX (NADPH oxidáz) - ROS (oxidatív gyök) - MPO - NE
 - ***RA/SLE:** a citrullinált fehérjék ellen termelődő antitestek (ACPA - Anti-Citrullinated Protein Antibody)



Wang, H., Kim, S.J., Lei, Y. et al. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. Sig Transduct Target Ther 9, 235 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01933-x>

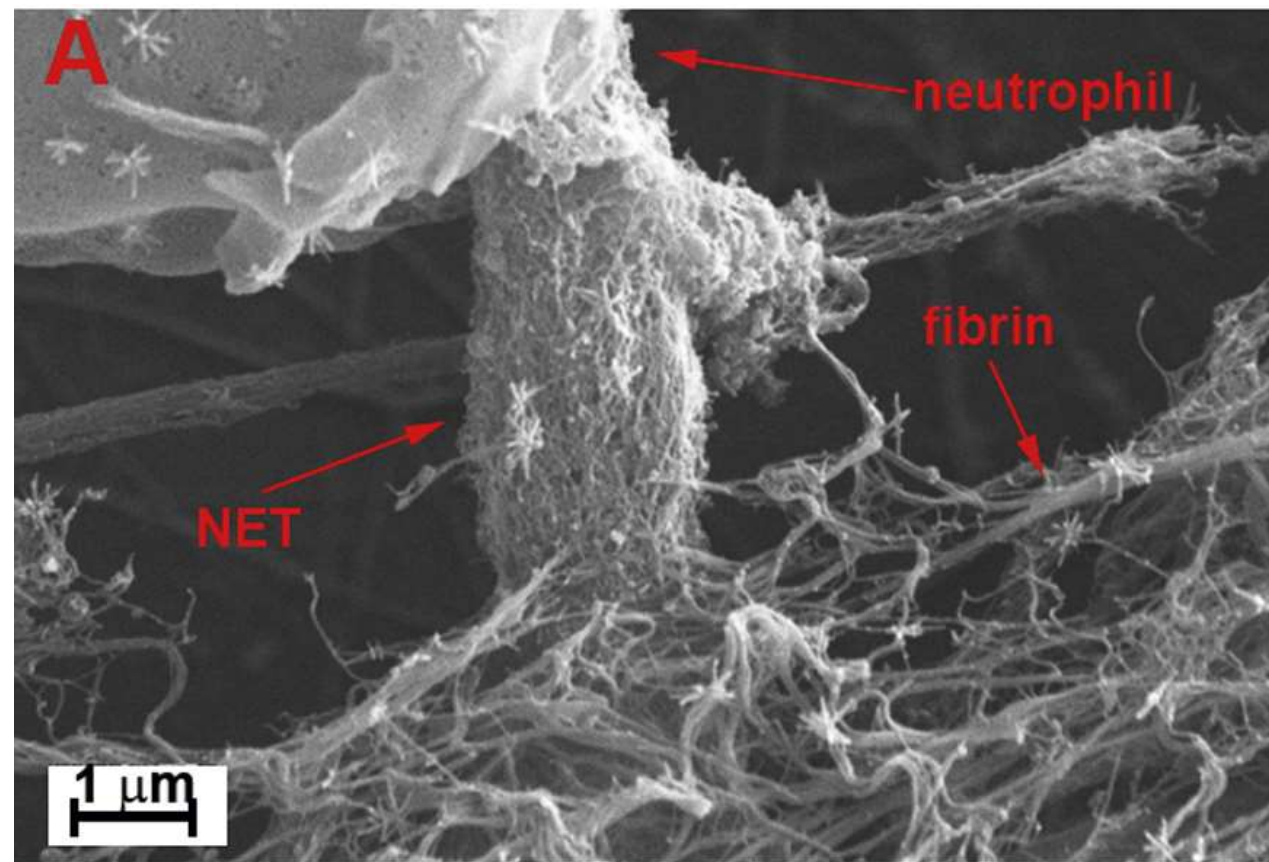
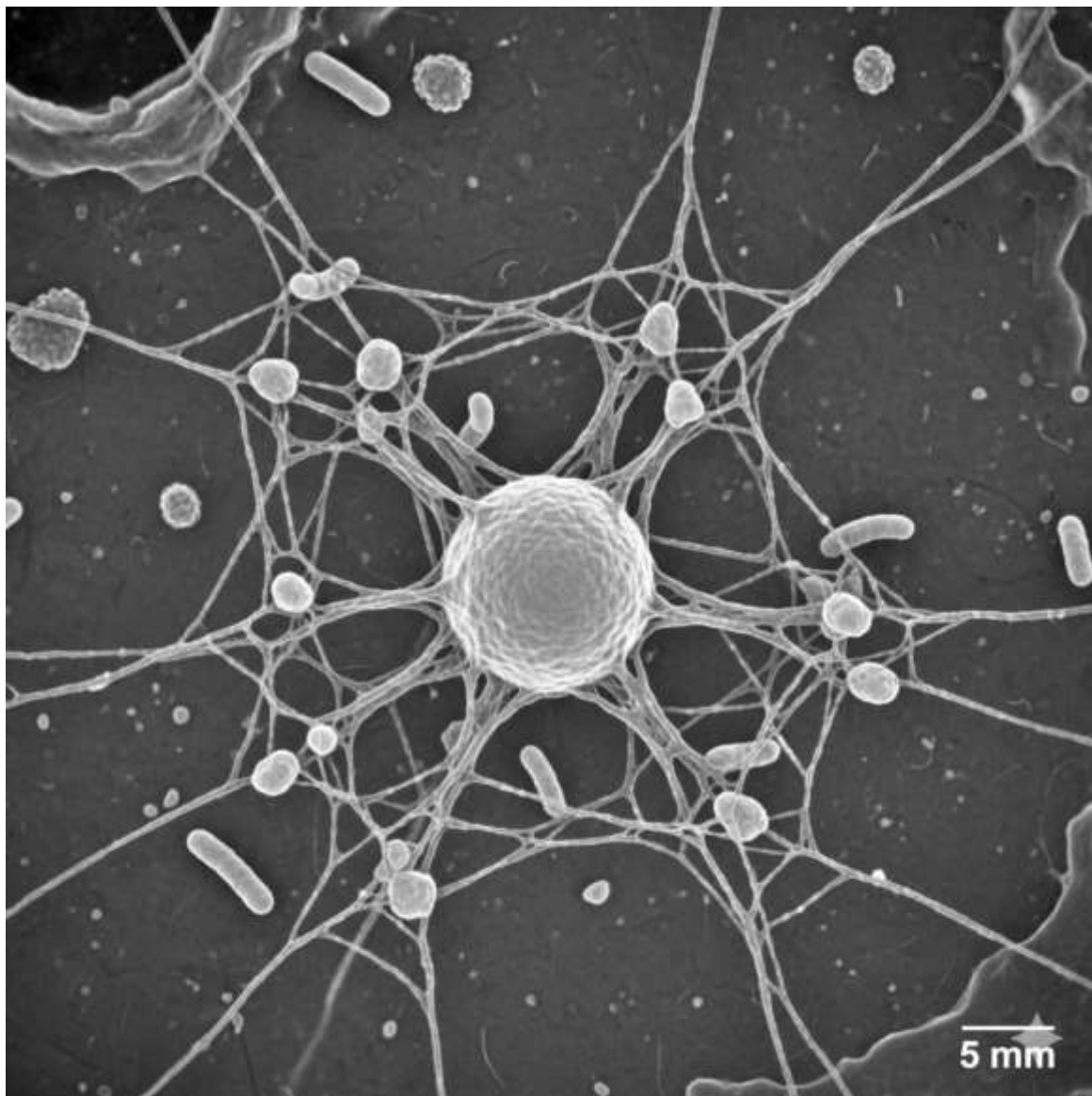
NET

Jellemző	Suicide NETosis (Lytic/Classical)	Vital NETosis (Non-Lytic/Vital)
Kiváltó ok (Inducer)	bizonyos magas dózisú baktériumok (pl. <i>Staphylococcus aureus</i>).	Alacsony dózisú baktériumok, gomba , plazmodiumok, aktivált vérlemezkék.
Idő	Hosszú (3-4 óra).	Gyors (5-60 perc).
Végeredmény	Neutrofil sejthalál (egy fajta sejthalál, mely különbözik az apoptózistól).	Sejt életben marad (túlélés és további funkciók megtartása).
Mag Dinamikája	Kromatin dekonzenzáció és a maghártya destrukciója (PAD4 -függő hiszton-citrullináció szükséges).	A mag integritása nagyrészt megmarad ; a kromatin dekonzenzációja lehet korlátozottabb.
ROS (NOX) Függőség	NOX-függő	Lehet NOX-független útvonal is, vagy az alacsonyabb ROS szint elégséges.
Mechanizmus	A sejt lízise (membrán szétesése) révén történő kilökődés. A NET-ek kiterjedtek.	Vezikulákon keresztüli exocitózis vagy membrán-kiöblösődés (budding). A NET-ek lehetnek lokalizáltabbak.
Genetikai Anyag	DNS, hisztonok, neutrofil elasztáz (NE) , mieloperoxidáz (MPO).	Főként mitokondriális DNS és granuláris proteinek is felszabadulhatnak.



Ortega-Zapero, M.; Gomez-Bris, R.; Pascual-Laguna, I.; Saez, A.; Gonzalez-Granado, J.M. Neutrophils and NETs in Pathophysiology and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 7098. <https://doi.org/10.3390/ijms26157098>

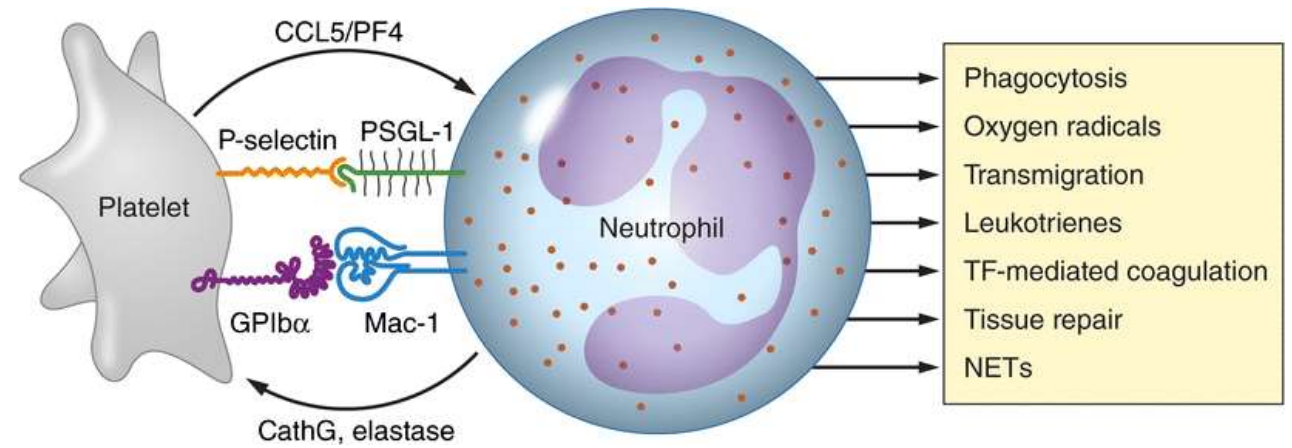
NET Component (Protein IDs)	Stimulus	Cellular Localization	Related Diseases or Pathogens			Reference		
DNA	neutrophil elastase (P08246)	PMA, LPS, A23187	<i>Shinella or Yersinia</i>			Weinrauch et al., 2002 Weinrauch, Drügan, Shanin, Weiss, and Zychlinsky [42]		
Neutrophil defensin (P59665)			PMA	extracellular	<i>S. aureus</i>	Schlievert et al., 2023 Schlievert, Kilgore, Beck, Yoshida, Klingelutz, and Leung [50]		
					SLE	Lande et al., 2011 Lande, Ganguly, Facchinetti, Frasca, Conrad, Gregorio, Meller, Chamilos, Sebasigari, Riccieri, Bassett, Amuro, Fukuhara, Ito, Liu, and Gillet [40]		
					IAV	Tripathi et al., 2014 Tripathi, Verma, Kim, White, and Hartshorn [41]		
Histone H2A (Q99878)	Myeloperoxidase (P05164-2)	Spontaneous, PMA, LPS, A23187	HIV-1			Saitoh et al., 2012 Saitoh, Komano, Saitoh, Misawa, Takahama, Kozaki, Uehata, Iwasaki, Omori, Yamaoka, Yamamoto, and Akira [11]		
Histones H2B (Q16778)			Heat shock protein 72 (P08107)	Spontaneous, PMA, LPS, A23187	nucleus, cytoplasm, extracellular	<i>M. tuberculosis</i>	Braian et al., 2013, Braian, Hoge and Stendahl [51]	
Histone H4 (P62805)			Interstitial collagenase (P03956)	-	extracellular	fungi	Rocha et al., 2015 Rocha, Nascimento, Decote-Ricardo, Côrte-Real, Morrot, Heise, Nunes, Previato, Mendonça-Previato, DosReis, Saraiva, and Freire-de-Lima [52]	
			Lactotransferrin (P02788)	Spontaneous, PMA, LPS, A23187	cytoplasm, extracellular	<i>Candida species'</i>	Nikawa et al., 1993 Nikawa, Samaranayake, Tenovuo, Pang, and Hamada [53]	
	Azurocidin (P20160)	Spontaneous, PMA, LPS, A23187	Calprotectin S100A8(P05109) S100A9(P06702)	Spontaneous, PMA, LPS, A23187	membrane, cytoplasm, extracellular	<i>C. albicans</i>	Urban et al., 2006 Urban, Reichard, Brinkmann, and Zychlinsky [10]	
						<i>A. fumigatus</i>	Gazendam et al., 2016 Gazendam, van Hamme, Tool, Hoogenboezem, van den Berg, Prins, Vitkov, van de Veerdonk, van den Berg, Roos, and Kuijpers [54]	
Histone H4 (P62805)	Cathepsin G (P08311)	Spontaneous, PMA, LPS, A23187	matrix metalloproteinase 9 (P14780)	LPS	extracellular	cancer	Albregues et al., 2018 Albregues, Shields, Ng, Park, Ambrico, Poindexter, Upadhyay, Uyeminami, Pommier, Küttner, Bružas, Maiorino, Bautista, Carmona, Gimotty, Fearon, Chang, Lyons, Pinkerton, Trotman, Goldberg, Yeh, and Egeblad [55]	
	LL-37 (J3KNB4)	Myeloblastin (PR3) (P24158)	PMA, LPS, A23187	α-enolase (P06733)	Spontaneous, PMA, LPS	cytoplasm	SLE	Bruschi et al., 2019 Bruschi, Petretto, Santucci, Vaglio, Pratesi, Migliorini, Bertelli, Lavarello, Bartolucci, Candiano, Prunotto, and Ghiggeri [56]
				Annexin A1 (P04083)	Spontaneous, PMA, LPS, A23187	cytoplasm	SLE	Bruschi et al., 2019 Bruschi, Petretto, Santucci, Vaglio, Pratesi, Migliorini, Bertelli, Lavarello, Bartolucci, Candiano, Prunotto, and Ghiggeri [56]
				High-mobility group box 1 (P09429)	Spontaneous, PMA, LPS, A23187	nucleus, cytoplasm	SLE	Whittall-Garcia et al., 2019 Whittall-García, Torres-Ruiz, Zentella-Dehesa, Tapia-Rodríguez, Alcocer-Varela, Mendez-Huerta, and Gómez-Martín [57]



Networks that stop the flow: A fresh look at fibrin and neutrophil extracellular traps
Imre Varjú, Krasimir Kolev, Thrombosis Research Volume 182, October 2019, Pages 1-11

NET+PLT

- Thrombocyta aktiváció: P-szelektint + neutrofil felszínén található PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) = thrombocyta-neutrofil aggregátum
- Rögzíti a neutrofilt az aktivált thrombocythoz
- Extravasatio növelése - horgony szerep
- Aktiválódáskor a thrombocyta számos kemokint pl a CXCL4/PF4, CXCL8/IL-8 - további thrombocyta aktiváció és NETosis



Platelet-neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease
 Ton Lisman Cell Tissue Res (2018) 371:567-576 <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2727-4>

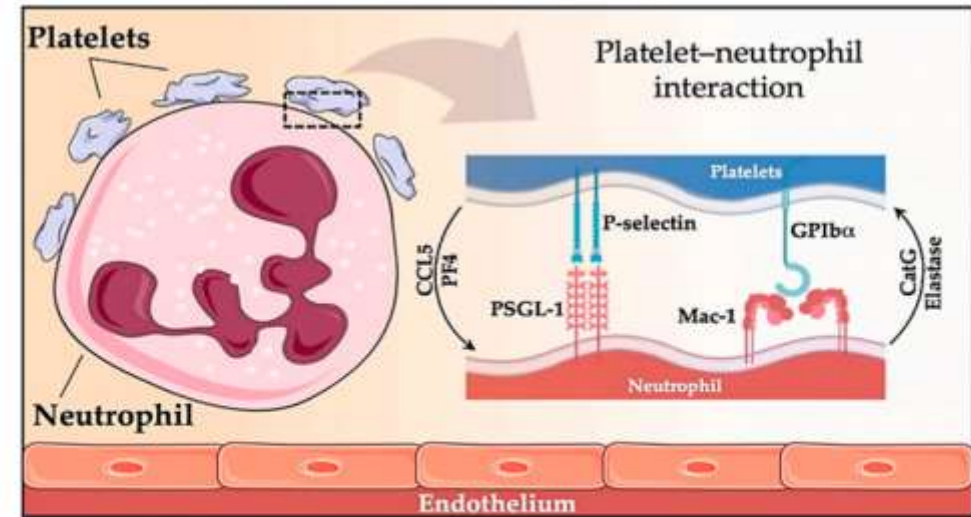
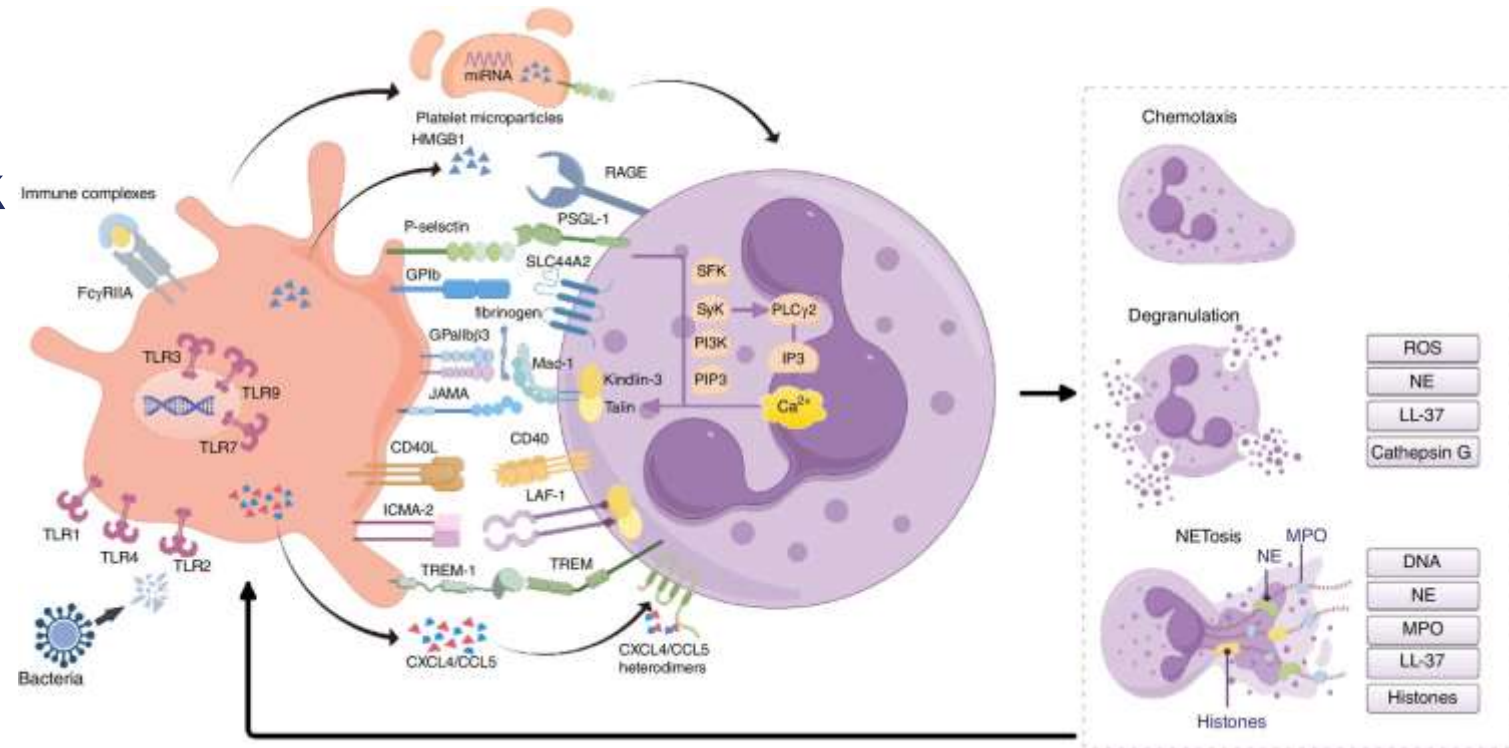


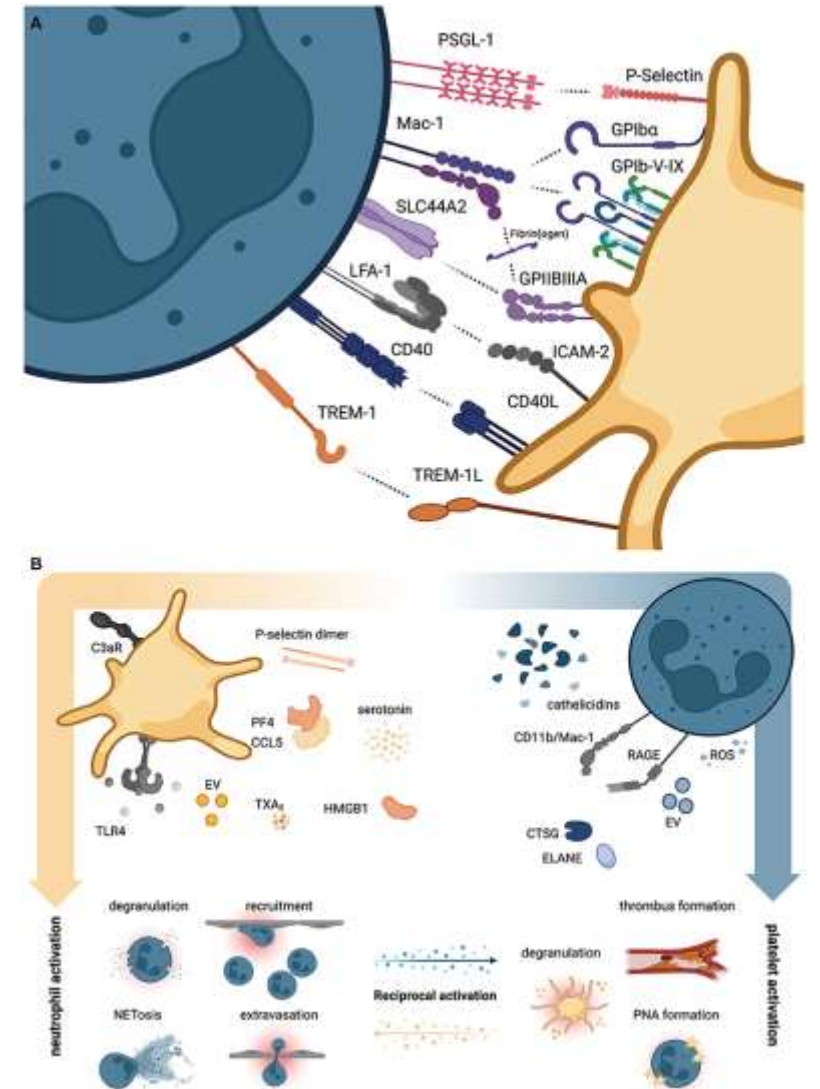
Figure 1. Platelet-neutrophil interaction. Representation of the two major receptor-ligand interactions in platelet-neutrophil communication, involving the P-selectin-PSGL1 and GPIIb/IIIa-Mac-1 pairs; as well as the pathways by which platelets enhance leukocyte activation (by release of CCL5 and PF4) and vice versa (platelets are activated by release of elastase and cathepsin G from neutrophils).

- Az aktivált trombociták ATP-t, ADP-t és trombocita faktor 4-et (PF4) szekretálnak - stimulálják a neutrofilek NET-képzését.
- A NET-ek által exponált DNS és hisztonok direkt módon aktiválják a vérlemezkéket a TLR9 (Toll-like receptor 9) és a P2Y12 receptorok jelátviteli útjain keresztül



The Role of Platelet-Neutrophil Interactions in Driving Autoimmune Diseases, Immunology, 2025; 175:1-15 Qinyao Liu <https://doi.org/10.1111/imm.13901>

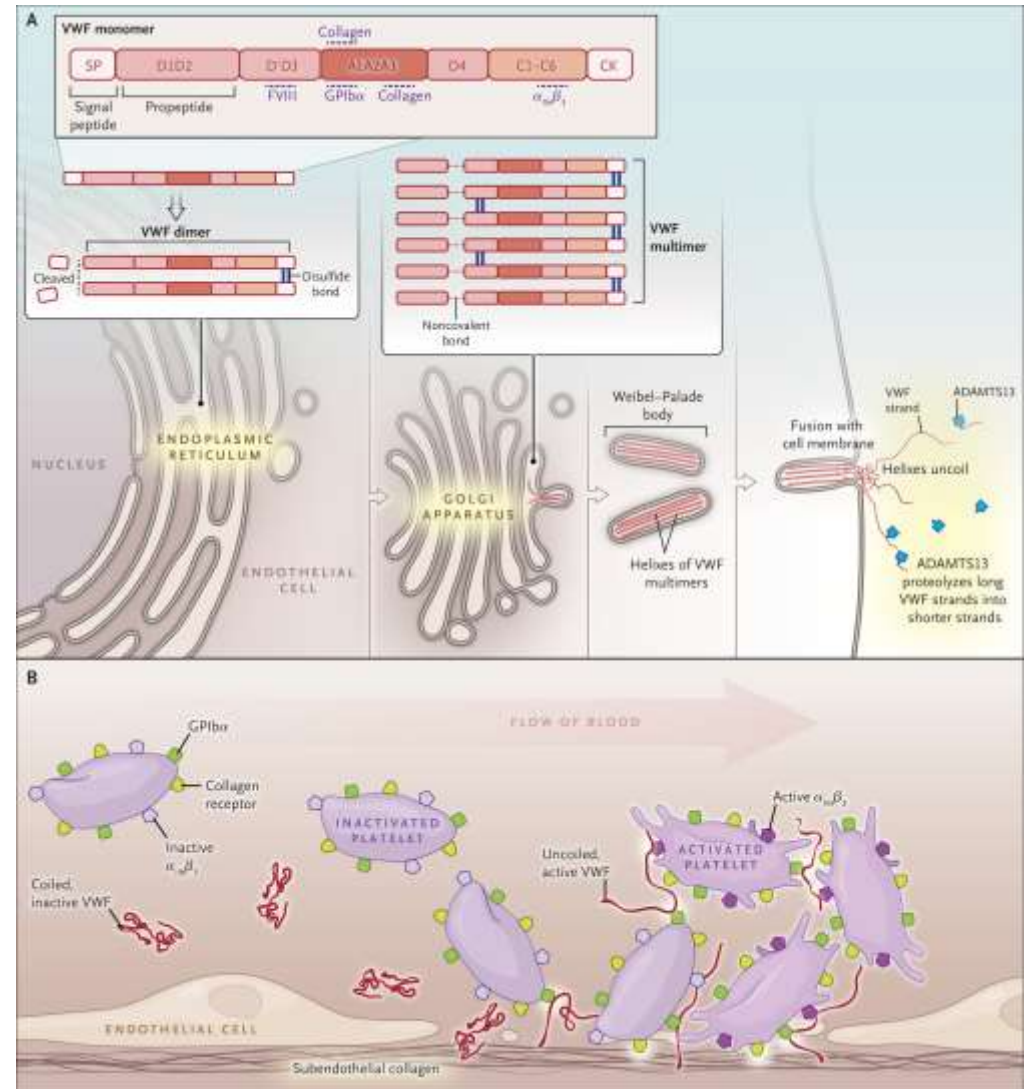
- Fenotípusos változások: CD11b és CD177 konformációja
- CD62L (L-szelektin) molekulák lehasadnak
- Funkcionális erősödés: Növekszik a fagocitikus kapacitás és a bakteriális clearance, valamint a ROS szekréciója
- Immuntrombocyta szerepe: a fertőzés lokális kontrollja (fizikailag és Anti Mikrobiális Peptid - Thrombocidin)
- *A thrombocytopenia: a neutrofil aktiváció csökkenésével és a bakteriális clearance romlásával jár.



Front. Cardiovasc. Med., 31 January 2022
 Sec. Atherosclerosis and Vascular Medicine
 Volume 8 - 2021 | <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.824112>

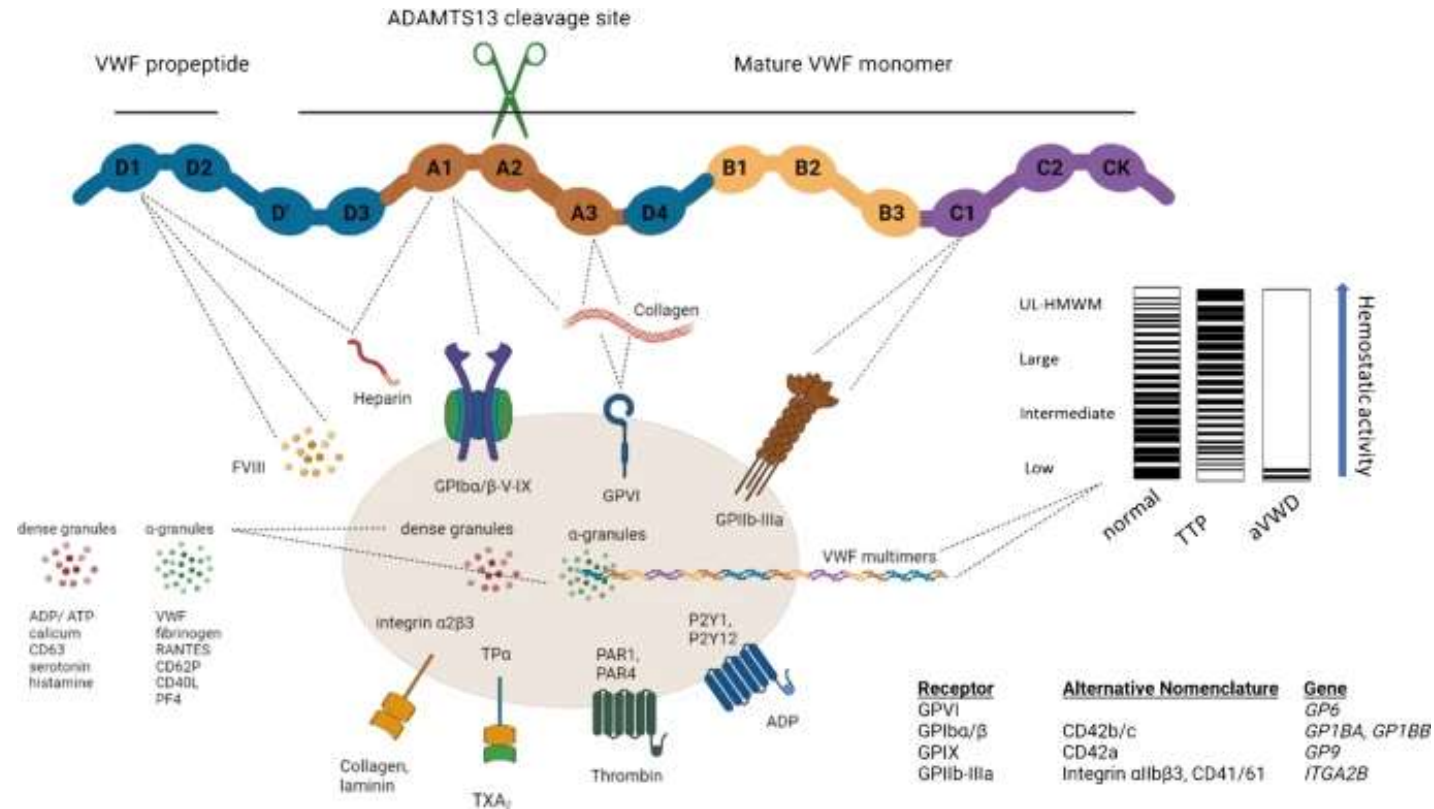
VWF

- VWF gén a 12. kromoszómán
- Szintézis során pro-VWF prekursor keletkezik Golgi-apparátusban dimerekké, majd diszulfidkötésekkel multimerekké alakul. Az ultra-nagyméretű (UL-VWF) multimerek a legnagyobb affinitásúak
- Az endothel sejtek tárolják a VWF-et az Weibel-Palade testekben (WPB), valamint a PLT alpha-granulumokban
- A VWF felszabadulása a WPB-ből exocitózissal történik, melyet Ca^{2+} -függő jelátviteli útvonalak, pl. trombin és hisztamin is indukálhatnak.
- Az UL-VWF multimerek potenciálisan trombogének. A fiziológiás aktivitást az ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with a ThromboSpondin type 1 motif, member 13) metalloproteináz szabályozza. Ez az enzim specifikusan hasítja a VWF A2 doménjében lévő Tyr1605-Met1606 peptidkötést, ezzel szabályozva a multimer méretét és csökkentve a vérlemezke-affinitást.



N Engl J Med 2016;375:2067-80. DOI: 10.1056/NEJMra1601561 Von Willebrand's Disease Frank W.G.

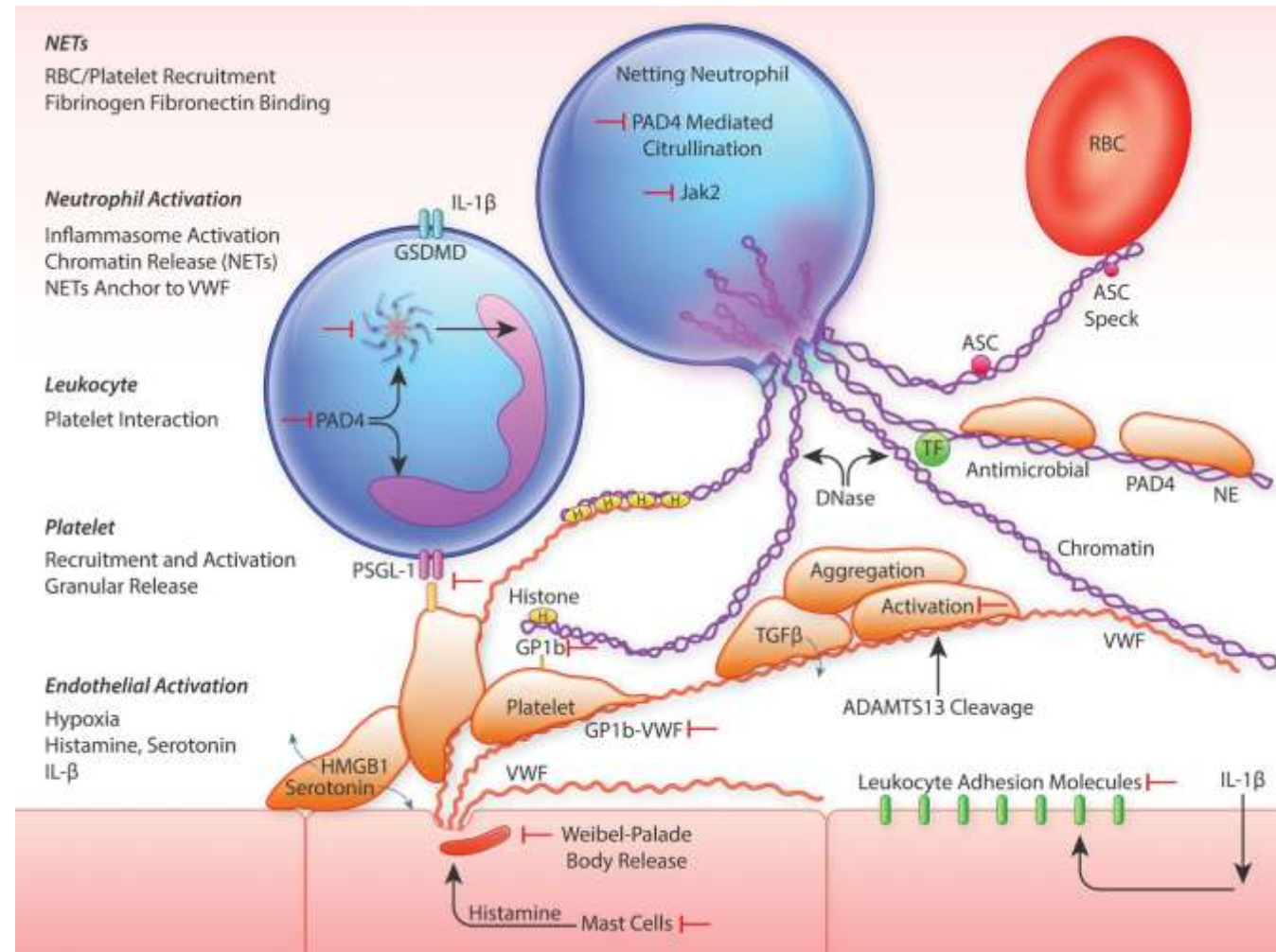
- Az A3 domén a subendotheliális kollagén (főleg I. és III. típusú) megkötéséért felelős. Az A1 domén a vérlemezkék felszínén lévő glikoprotein Ib-IX-V (GPIb-IX-V) receptorhoz kötődik nyíróerő hatására bekövetkező konformációváltozás után
- A VWF a VIII-as alvadási faktor (FVIII) inaktív formájának fő hordozófehérjéje a plazmában, az D' és D3 doméneken keresztül kötődik hozzá. Ez a komplex védelmet nyújt a FVIII-nak a proteolitikus inaktivációval szemben.



Ashworth, K.J., Thomas, K.A. & Shea, S.M. Von Willebrand Factor and Platelet Aggregation: from Bench to Clinical Practice. *Curr Anesthesiol Rep* 12, 329-341 (2022). <https://doi.org/10.1007/s40140-022-00521-5>

NET+VWF

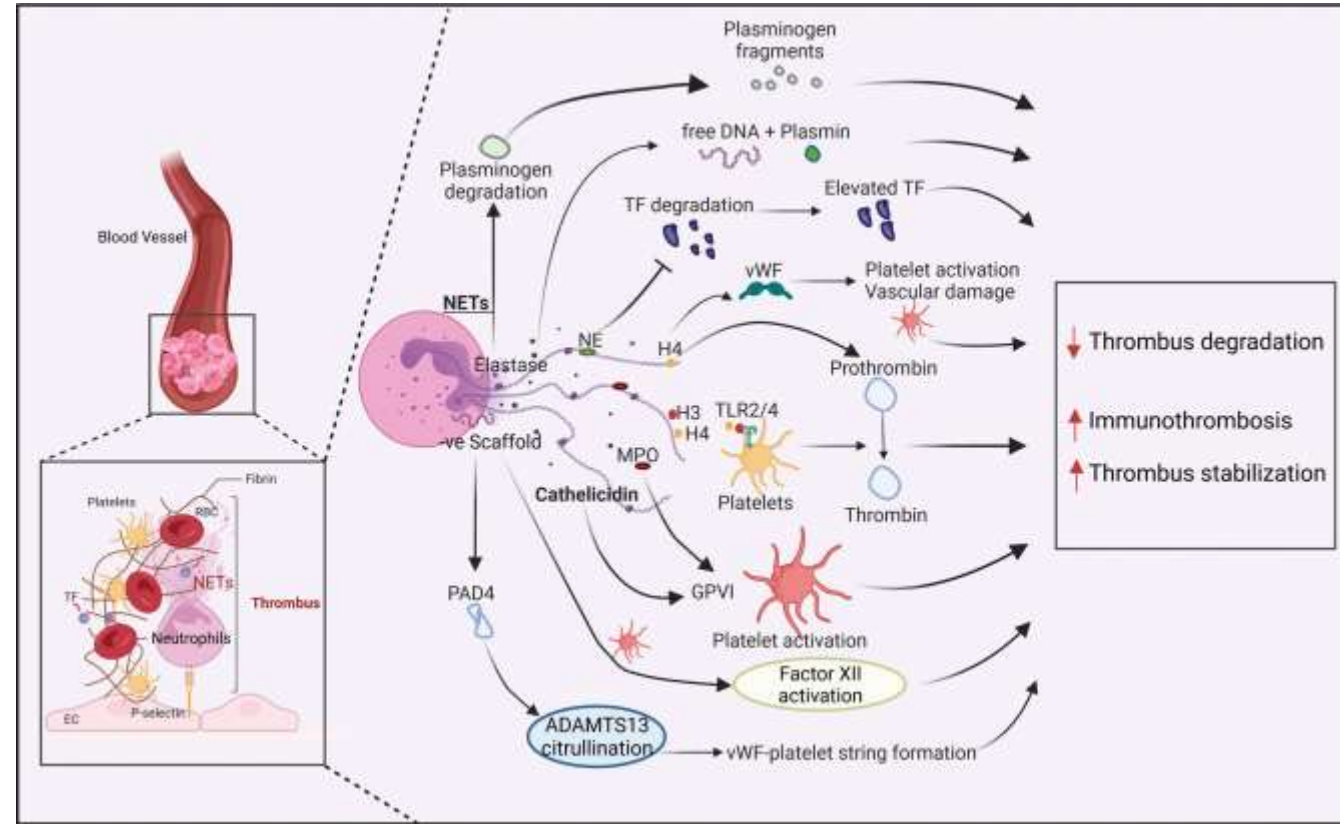
- A VWF nagy multimerek formájában, a P-szelektinnel és IL-8-al együtt tárolódik az endothelsejtekben lévő Weibel-Palade testekben (WPB).
- Gyulladásos stimulusok (pl. thrombin, hisztamin, gyulladásos citokinek, hypoxia) gyorsan kiváltják a WPB tartalmának exocitózist.
- A plazma VWF-szintjének emelkedése (főleg a nagy multimerek aránya) az endothel károsodás és aktiváció érzékeny, kvantitatív biomarkere



Reflections on Targeting Neutrophil Extracellular Traps in Deep Vein Thrombosis
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Volume 44, Number 8
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.124.320148>

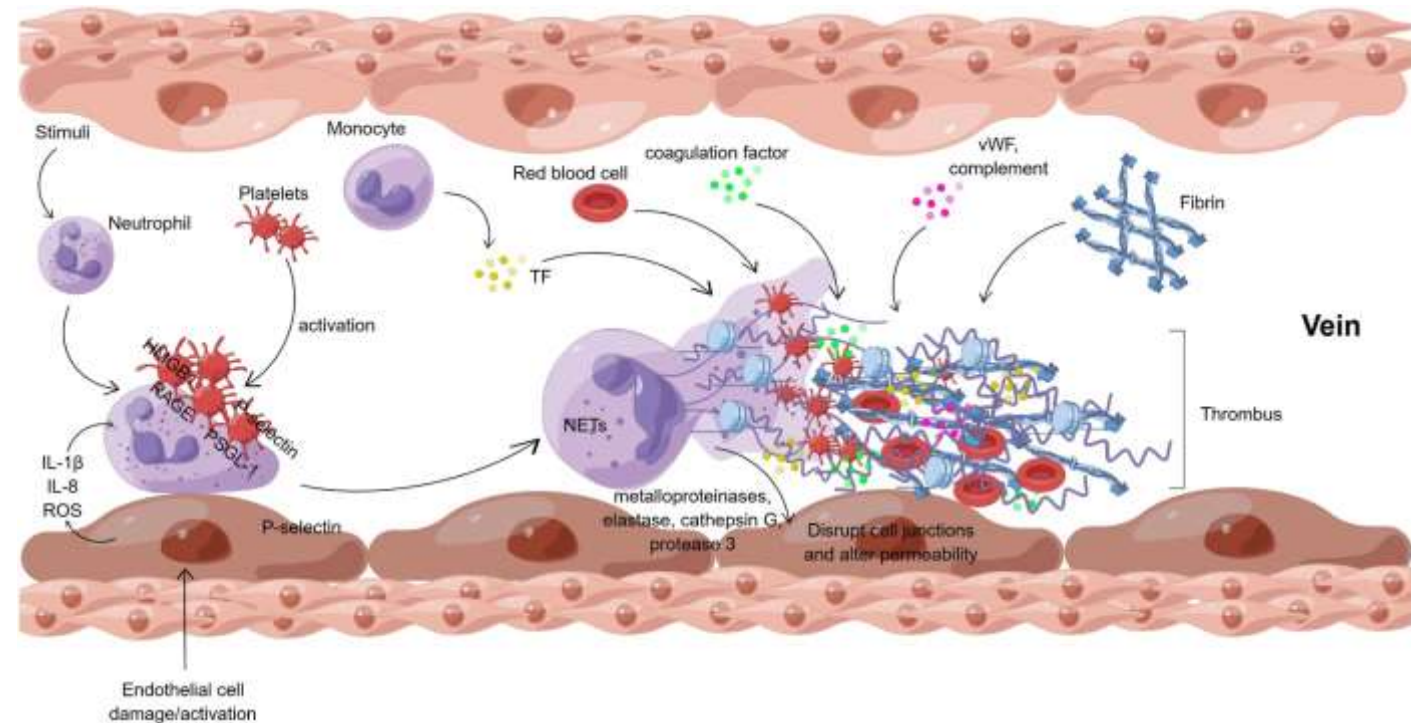
NET+VWF

- A gyulladásos mediátorok és a citokinek aktiválják az endotélsejteket. Ez a stimuláció az endotélsejtekben tárolt VWF nagyméretű multimerjeinek azonnali felszabadulását váltja ki a Weibel-Palade testekből.
- Hisztón Hatás: A NET-ekből felszabaduló hisztonok (különösen a H3/H4 tetramerek) súlyos toxikus hatással vannak az endotélsejtekre, tovább fokozva a VWF szekréciót. VWF Kötődés: A NET-ekben lévő DNS és hisztonok pro-koaguláns felületként működnek, és képesek a VWF molekulákat is megkötni
- NET-Trombus Mag: A VWF az immun-trombusok alapvető részévé válik. A NET-ek adják a trombus magját (scaffold), míg a VWF biztosítja a trombociták kötődését és a trombus stabilizálását, összekapcsolva ezzel a neutrofil-függő gyulladást a véralvadással.
- A VWF és az IL-8 egyidejű és gyors felszabadulása lehetővé teszi, hogy az azonnali thrombózist (a VWF-en keresztül) és a gyulladásos sejt kialakulását (az IL-8-on keresztül). Az IL-8 felszabadítása a WPB-ből sokkal gyorsabb, mint ha az IL-8 fehérjét de novo kellene szintetizálni a gyulladásos válasz során.

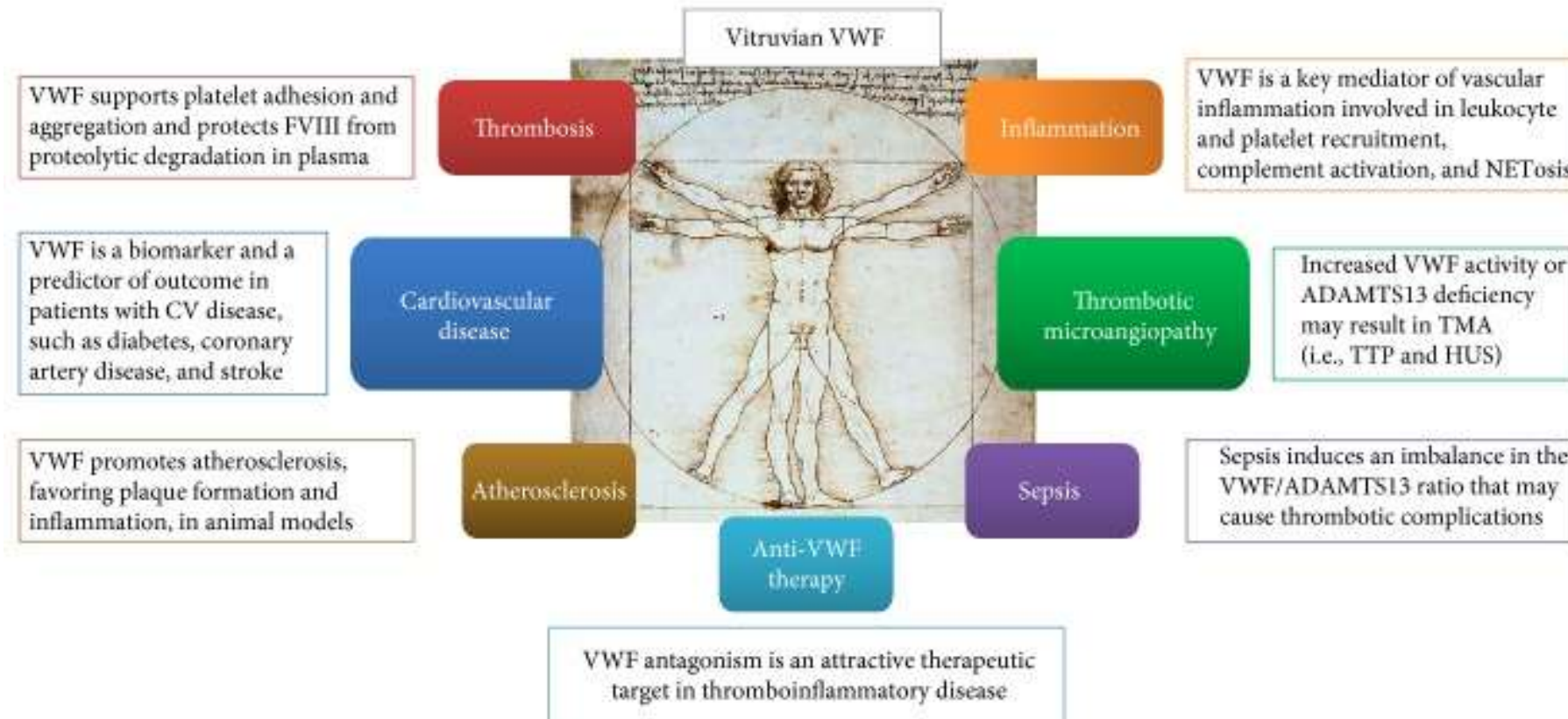


NETs-Induced Thrombosis Impacts on Cardiovascular and Chronic Kidney Disease
Manovriti Thakur Circulation Research Volume 132, Number 8
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321750>

- Thrombocyt-Leukocita Aggregátumok: A VWF a GPIIb receptorán keresztül aktiválja és megköti a trombocitákat. Az aktivált trombocyt felszínén lévő P-szelektin és GPIIb/IIIa receptorok stabilizálják a trombocyt-leukocita aggregátumokat
- Inflammaszóma Aktiváció: Ezek az aggregátumok, különösen a neutrofilekhez kötődőek, a leukocita aktiváció és a pro-inflammatorikus citokin (pl. IL-1, IL-6, TNF- α) termelés helyi forrásává válnak, felerősítve a gyulladásos választ.
- NETózis Kiváltása: A VWF, különösen a nagy, thrombogén multimerek, közvetlenül vagy közvetve részt vesz a NETózis képződésében
- VWF-DNS Kölcsönhatás: Kimutatták, hogy a NET-ek felszabadulása stabilizálhatja a VWF multimereket az ADAMTS13 hasítással szemben, és a VWF kötődik a NET-ek DNS-vázához, ami tovább súlyosbítja a microvasculáris elzáródást és a gyulladást.

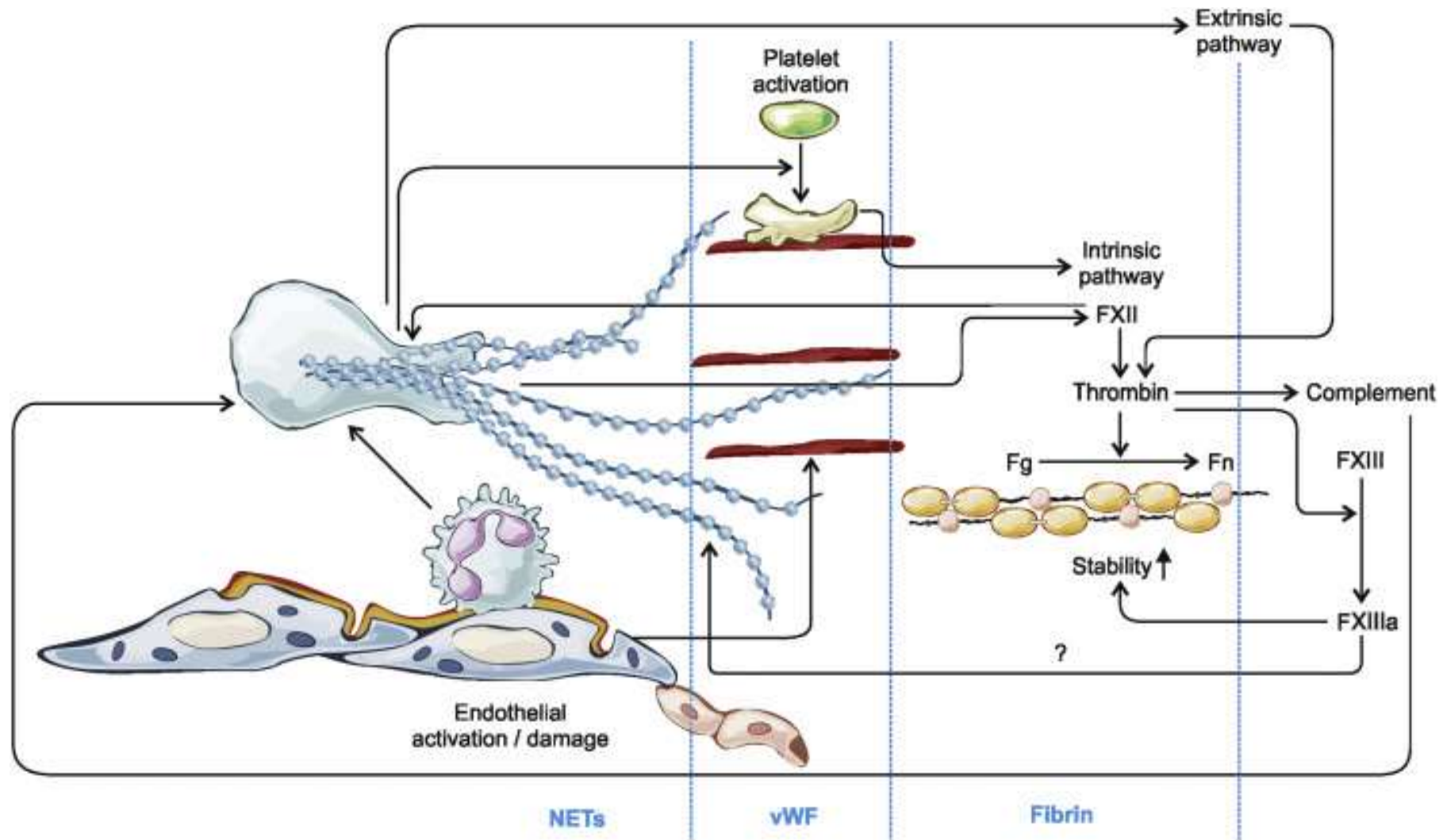


Front. Immunol., 23 August 2023. Sec. Molecular Innate Immunity, Volume 14 - 2023 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1198952> Neutrophil extracellular traps mediate deep vein thrombosis: from mechanism to therapy Mengting Yao



Gragnano F, The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:5620314. doi: 10.1155/2017/5620314. Epub 2017 May 28. PMID: 28634421; PMCID: PMC5467347.

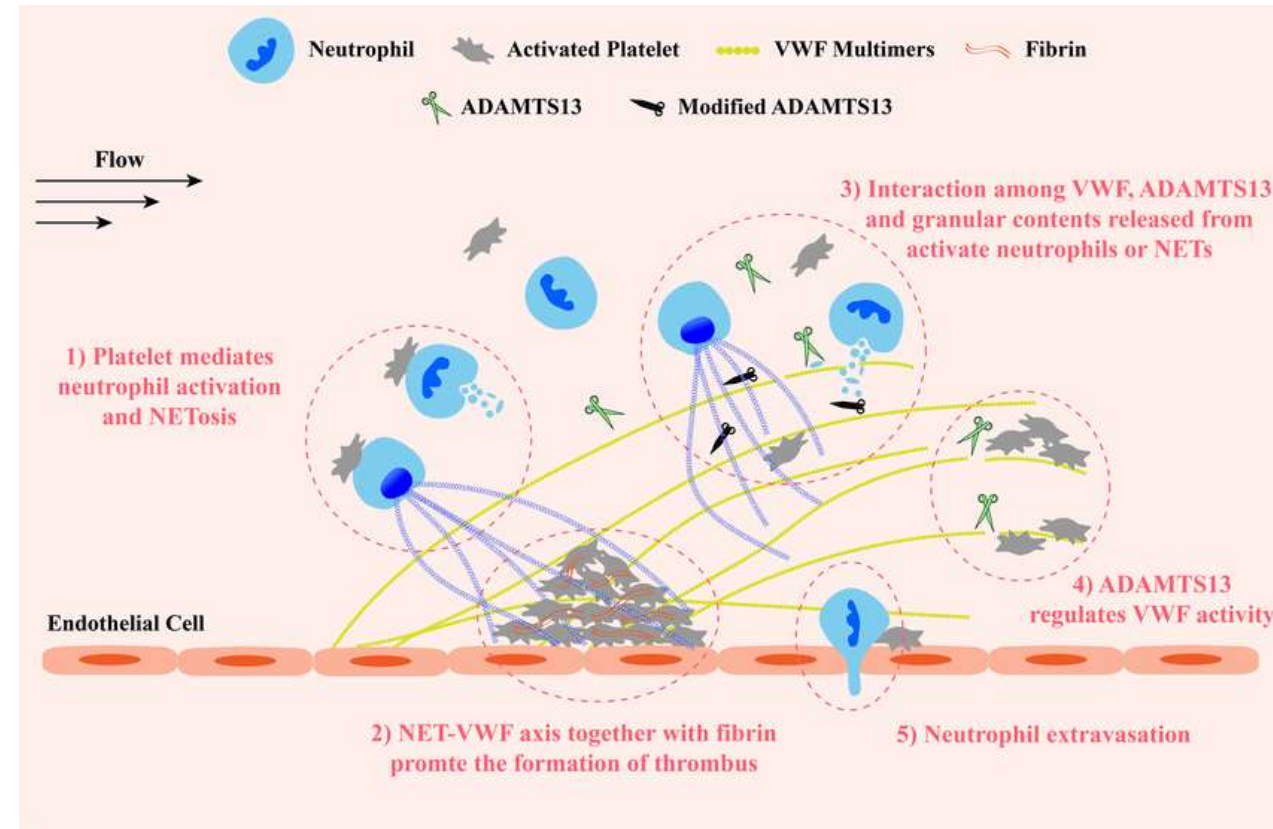
Vitruvianus a tudomány, művészet és filozófia egységének egyik ikonikus szimbóluma



Networks that stop the flow: A fresh look at fibrin and neutrophil extracellular traps
Imre Varjú, Krasimir Kolev, Thrombosis Research Volume 182, October 2019, Pages 1-11

ADAMTS13

- A NET-ek gátolják az ADAMTS13 Működését:
 - Az aktivált neutrofilekből felszabaduló proteázok és egyéb anyagok (pl. hisztonok) közvetve vagy közvetlenül csökkentik az ADAMTS13 enzim aktivitását. Ez a gátlás elősegíti az ultra-nagy VWF multimerek felhalmozódását, ami fokozza a thrombogén hatást, további NET fokozódás



Yang J, (2020) Insights Into Immunothrombosis: The Interplay Among Neutrophil Extracellular Trap, von Willebrand Factor, and ADAMTS13. Front. Immunol. 11:610696. doi: 10.3389/fimmu.2020.610696

NET klinikai megjelenése

- Szepszis
- SLE
 - a DNS és nukleáris fehérjék perzisztenciáját okozza, ami autoantitest-termelést (pl. anti-DNS, anti-hisztin) és krónikus gyulladást vált ki.
- VTE/DVT
- RA
 - Autoantigén citrullináció: A NET-ekben lévő enzimek (PAD) citrullinálják a fehérjéket pl. fibrinogént, amik így a jellegzetes anti-citrullinált fehérje antitestek (ACPA) célpontjává válnak. Ez az autoimmun folyamat fenntartja az ízületi gyulladást és a destrukciót.
- Atherosclerosis és akut koronária szindróma
 - A NET-ekben lévő enzimek és hisztinok plakk eróziót és endotélkárosodást okoznak, ami miokardiális infarktust eredményezhet.
- Vaskulitiszek (ANCA-asszociált)
 - Az Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) megkötik a neutrofilek membránjára transzlokálódott autoantigéneket (pl. PR3, MPO), ami NETózist indukál. A felszabaduló NET-ek és a rajtuk lévő MPO és PR3 tartalom fenntartja az érgyulladást és az érfal károsodását.
- Daganatos betegségek:
 - a NET-ek (elsősorban máj metasztázis esetén) olyan niche-t hozhatnak létre, amely elősegíti a tumorsejtek megtelepedését és növekedését, ezzel rontva a prognózist.
- Köszvény:
 - A húgysavkristályok közvetlenül képesek netózist indukálni. A NET-ek csapdába ejtik a kristályokat, de a folyamat során felszabaduló gyulladásos anyagok tovább fokozzák az akut ízületi gyulladást.

Összefoglalás

- A NET egy extrém bonyolult, egymásra épülő kaszkádok sorozata
 - Amennyire véd, annyira árthat is
- A VWF nem csupán egy passzív hemosztatikus fehérje
- Aktív jelzőmolekula is, amely integrálja az érrendszeri sérülést, a véralvadást és az immunválaszt, ezáltal központi szerepet játszik az olyan thrombo-inflammatorikus betegségek patogenezisében

Köszönöm a figyelmet!



SEMMELWEIS
EGYETEM 1769