

Neutrofilné extracelulárne pasce a ich vplyv v patogenéze vybraných ochorení

Neutrophil Extracellular Traps and their Influence in the Pathogenesis of Selected Diseases

Ivana Thurzová^{1,2}, Vanesa Bajuszová², Jaromír Tupý^{1,3}¹Ústav klinickej biochémie, imunológie a alergológie, Ústredná vojenská nemocnica SNP Ružomberok – FN²Fakulta zdravotníctva, Katolícka univerzita v Ružomberku³Klinika hematológie a transfúziológie, Ústredná vojenská nemocnica SNP Ružomberok – FN<https://doi.org/10.54937/zs.2024.16.1.39-44>

Abstrakt

Neutrofilné extracelulárne pasce (NETs) sú extracelulárne štruktúry vytlačané aktivovanými neutrofilmi podobné sieti, schopné zachytiť mnohé patogény, vrátane grampozitívnych a gram-negatívnych baktérií, húb, prvokov a vírusov. NETs sú zložené z DNA vlákien, histónov a antimikrobiálnych proteínov pochádzajúcimi z granúl a jadra neutrofilov. Patogény sú v nich imobilizované a vystavené lokálnej, vysokej a letálnej koncentrácii efektorových proteínov. Nadmerné uvoľňovanie NETs alebo porušenie mechanizmov ich eliminácie je spojené s viacerými chorobnými stavmi. Toxické produkty NETs (históny, proteíny z granúl) indukujú bunkovú apoptózu, podporujú poškodenie tkaniva a zápal. Súčasťou NETs môžu slúžiť ako autoantigény a iniciovať reakcie dôležité v patogenéze viacerých autoimunitných ochorení. Prítomnosť zvýšeného množstva cirkulujúcich NETs môže ovplyvniť progresiu rakovinového ochorenia, tvorbu metastáz a zlyhanie liečby. NETs hrajú tiež dôležitú úlohu pri koagulácii a tvorbe krvných zrazenín.

Kľúčové slová: Neutrofil. Neutrofilné extracelulárne pasce. Autoimunita. Nádorové ochorenia. Koagulácia.

Abstract

Neutrophil extracellular traps (NETs) are net-like extracellular structures extruded by activated neutrophils capable of trapping many pathogens, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, protozoa, and viruses. NETs are composed of DNA strands, histones, and antimicrobial proteins derived from neutrophil granules and nuclei. Pathogens are immobilized in them and exposed to a local, high and lethal concentration of effector proteins. Excessive release of NETs or violation of their elimination mechanisms is associated with several disease states. Toxic products of NETs (histones, granule proteins) induce cell apoptosis, promote tissue damage and inflammation. Components of NETs can serve as autoantigens and initiate reactions important in the pathogenesis of several autoimmune diseases. The presence of an increased amount of circulating NETs can influence the progression of cancer disease, the formation of metastases and the failure of treatment. NETs also play an important role in coagulation and blood clot formation.

Key words: Neutrophil. Neutrophil extracellular traps. Autoimmunity. Tumor diseases. Coagulation.

Úvod

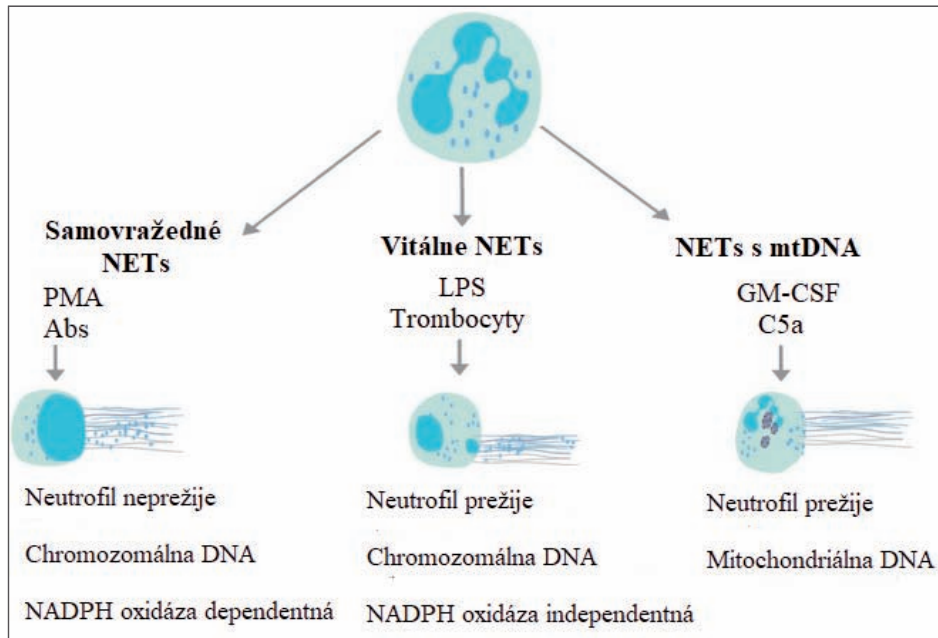
Neutrofilné extracelulárne pasce (NETs), objavené Volkerom Brinkmannom so spolupracovníkmi v roku 2004, sú extracelulárne štruktúry podobné sieti, ktoré sú schopné zachytiť baktérie, huby, prvoky a vírusy [1]. Sú vytlačované aktivovanými neutrofilmi, zložené z DNA vlákien, histónov a antimikrobiálnych proteínov. Patogény sú v nich imobilizované a vystavené lokálnej, vysokej a letálnej koncentrácii efektorových proteínov [2]. Existujú tri rôzne typy neutrofilných pascí. Základnou štruktúrou prvého typu NETs je extracelulárna DNA spojená s antimikrobiálnymi proteínmi pochádzajúcimi z granúl a jadra neutrofilov. Predstavuje hlavnú formu tvorby NETs, nazývanú aj samovražedná NETóza, pretože vedie k smrti neutrofilov [3]. Je závislá od NADPH-oxidázy a od zvýšenia koncentrácie Ca²⁺ v cytoplazme [4]. NETóza začína aktiváciou povrchových receptorov rôznymi prozápalovými stimulmi, vrátane PAMP (Pathogen associated molecular patterns - Molekulárne vzory asociované s patogénom) molekúl odvodených od mikroorganizmov, cytokínov, imunitných komplexov, DAMP (Damage-associated molecular patterns - molekulárne vzory asociované s poškodením) molekúl uvoľnených zo „stresovaných“ alebo umierajúcich buniek [5]. Stimuly spúšťajú program, ktorý je dokončený v priebehu niekoľkých hodín a pozostáva zo niekoľkých kritických úloh:

- Dekondenzácia chromatinu
 - Stimuly spúšťajú signálne dráhy aktivovaných proteínkináz (MAPK), ktoré potom indukujú tvorbu ROS v mitochondriách. Následne migruje peptidyl-arginín-deimináza typu 4 (PAD4), neutrofilná elastáza (NE) a myeloperoxidáza (MPO) do jadra, kde PAD4 sprostredkováva citrulinizáciu histónov, MPO a NE ich enzymatickú degradáciu. To vedie k destabilizácii štruktúry chromatinu.
- Prasknutie jadrovej membrány a rozklad cytoskeletu, pôsobením serínových proteáz.
- Permeabilizácia a prasknutie bunkovej membrány.
- Zostavenia antimikrobiálnych proteínov na chromatinový skelet.
 - Ide predovšetkým o jadrové históny, vysokú hladinu proteínov granúl ako sú NE, katepsín G, PR3, MPO, cytosolové proteíny – S100 [4].

Proces sa končí únikom NETs do extracelulárneho priestoru [6]. V poslednom kroku NETózy fungujú NETs ako imunitný signál na nábor ďalších imunitných buniek na zosilnenie imunitnej odpovede v mieste infekcie.

Na rozdiel od tohto mechanizmu vedúceho k smrti neutrofilov bola opísaná aj vitálna NETóza, počas ktorej neutrofil zostáva živý a reaguje okamžitou bunkovou odpoveďou na vonkajší stimul. Pri vitálnej NETóze, ktorá je od NADPH-oxidázy nezávislá sa z dekonzenzovaného jadra vytvárajú vezikuly obsahujúce jadrovú DNA, transportujú sa k bunkovej membráne a následne sa s ňou spájajú. Pasce sa vypudzuju von z bunky bez toho aby došlo k jej porušeniu. Z neutrofilov sa potom stávajú anukleárne cytoplasy, ktoré sú stále pohyblivé a môžu vnímať chemotaktické stimuly [5].

Tretí typ NETs je zložený z mitochondriálnej DNA a proteínov pochádzajúcich z granúl. Tento typ takisto nesprievádza smrť neutrofilného leukocyta [4]. V priebehu rokov sa ukázalo, že iba zlomok neutrofilov môže vytvárať NETs, čo poukazuje na heterogenitu populácie neutrofilov, najmä počas sterilného zápalu [7]. Hoci zloženie NETs je pomerne stabilné relatívny počet základných bielkovín a tiež ich zloženie sa môže líšiť v závislosti od vyvolávajúceho stimulu. Neutrofilným pasciam pochádzajúcim z mitochondrií chýbajú históny [6]. Na základe analýzy pomocou hmotnostnej spektrometrie sa zistilo, že existuje najmenej 24 neutrofilných proteínov spojených s tvorbou NETs [8].



Obrázok 1 Tri typy NETs. Upravené podľa Stoimenou a kol., 2022 [4].

I keď boli extracelulárne pasce prvýkrát opísané v neutrofiloch a myslelo sa, že fungujú ako „pasca“ slúžiaca na zabíjanie invazívnych mikroorganizmov, najnovšie vedecké práce preukázali, že aj iné typy granulocytov, teda eozinofily i bazofily môžu vytvárať pasce. Eozinofilné extracelulárne pasce sa podieľajú na obrane pred parazitmi, plnia úlohu pri alergickej reakcii a bazofily môžu takisto uvoľňovať chromatin a zabíjať baktérie pri deficite fagocytárnej aktivity. Ďalšími bunkami schopnými tvoriť pasce sú žirne bunky, monocyty i makrofágy [5].

1 Vplyv NETs v patogenéze vybraných ochorení

Tvorba NETs, mimoriadne účinná súčasť antimikrobiálnej obrany, je dvojsečnou zbraňou. Vznikajúce NETs musia byť včas odstránené, pretože v opačnom prípade aktivujú ďalšie neutrofilové a imunokompetentné bunky prispievajúce k zápalu, ktorý potom generuje ešte viac NETs. To vytvára začarovaný kruh, ktorý je kľúčovou zložkou v patogenéze tak rôznorodých chorôb akými sú preeklampsia, sepsa, autoimunitné ochorenia alebo v iných neinfekčných patologických procesoch, ako sú poruchy zrážanlivosti krvi, trombóza, diabetes, ateroskleróza a rakovina [2,9]. Údaje naznačujú, že NETs sú dôležité aj pre COVID-19 [9].

1.1 NETs a autoimunita

Kumulované dôkazy z *in vitro*, *in vivo* a klinickej diagnostiky naznačujú, že NETs môžu hrať kľúčovú úlohu pri rôznych autoimunitných ochoreniach ako je reumatoidná artritída, systémový lupus erythematosus alebo s ANCA protilátkami asociovaná vaskulitída. Pri autoimunitných stavoch populácia tzv. neutrofilov s nízkou hustotou (LDN) uvoľňuje NETs spontánne, čo sa dokázalo napr. pri SLE a RA. NETs s najväčšou pravdepodobnosťou prispievajú k prelomeniu autotolerancie niekoľkými spôsobmi. Môžu narušiť autotoleranciu tým, že sú zdrojom autoantigénov pre autoprotilátky vyskytujúce sa pri autoimunitných ochoreniach ako sú protilátky proti citrulínovému proteínu (ACPA) pri RA, anti-dsDNA pri SLE a anti-MPO a anti-PR3 pri vaskulitídach. Okrem toho zložky NETs by mohli urýchliť zápalovú reakciu sprostredkovaním aktivácie komplementu, pričom pôsobia napríklad ako DAMP a aktivátory zápalu. NETs tiež môžu aktivovať iné imunitné bunky ako sú B a T lymfocyty alebo bunky prezentujúce antigén. Navyše zhoršený klírens NETs pri autoimunitných ochoreniach predlžuje prítomnosť aktívnych NETs a ich zložiek, a tým podporuje imunitné reakcie. NETs sa nielen podieľajú na vzniku zápalu, no sú tiež spojené s jeho ukončením. Preto môžu byť NETs centrálnymi regulátormi zápalu a autoimunity a slúžiť ako biomarkery ako aj sľubné ciele pre budúcu terapiu autoimunitných ochorení [7].

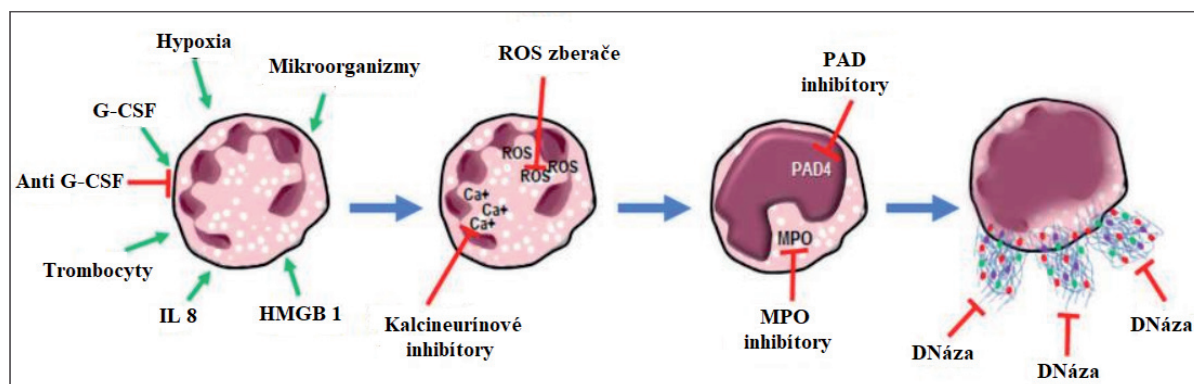
Reumatoidná artritída (RA) je chronické systémové ochorenie charakterizované zápalom kĺbov a ich deštrukciou. Typickým rysom RA je prítomnosť špecifických autoprotílátok proti post-translačne modifikovaným proteínom vo vzorkách séra a synoviálnej tekutine napr. ako sú protílátky proti citrulinovaným (ACPA), karbamylovaným a acetylovaným proteínom. Prítomnosť autoprotílátok je spojená s patogenézou a progresiou ochorenia [7]. Dysregulovaná aktivácia neutrofilov prispieva k patogenéze reumatoidnej artritídy, ale i ďalších autoimunitných ochorení. ROS odvodené od neutrofilov a proteázy neutrofilných granúl sa podieľajú na poškodení a deštrukcii chrupavky pri RA. Oneskorená apoptóza neutrofilov v kĺboch prispieva k chronickému zápalu, náboru synoviálnej bunky a predĺženému zabezpečeniu proteolytických reakcií [10]. *In vitro* neutrofilny pacientov s RA vykazujú zvýšený spontánny sklon k tvorbe NETs v porovnaní so zdravými kontrolnými neutrofilmi. NETs vytlačujú nové autoantigény ako sú citrulinované históny, ktoré môžu podporovať autoimunitnú odpoveď pri RA. V synoviálnej tekutine, koži a reumatoidných uzlinách pacientov s RA sa zistil zvýšený výskyt NETs proteínu – MPO, čo naznačuje, že NETs sú prítomné v týchto zápalom postihnutých oblastiach (kĺb/synovium). V sére pacientov s RA sa detegujú zvýšené komplexy MPO–DNA a hladiny bezbunkových nukleozómov, ktoré korelujú s klinickými parametrami ako je C reaktívny proteín, pozitívny reumatoidný faktor a ACPA. NETs a produkty odvodené od NETs by teda mohli slúžiť ako biomarker pre aktivitu ochorenia a môžu byť tiež sľubnými terapeutickými cieľmi pre zápalovú RA [7].

Systémový lupus erytematódus (SLE) je autoimunitné ochorenie spojivového tkaniva charakterizované tvorbou viacerých autoprotílátok (antinukleárne protílátky - ANA, protílátky proti dvojvláknovej DNA – dsDNA, protílátky (anti Sm/RNP, anti-Ro/La) a spotrebou komplementu. Ochorenie má schopnosť poškodiť všetky dôležité orgány. SLE postihuje prevažne mladé ženy a ide o stav so širokým spektrom závažnosti, od mierneho postihnutia kĺbov až po život ohrozujúce stavy. Ochorenie je nevyliciteľné a napriek modernej liečbe je stále spojené so zvýšeným rizikom úmrtnosti a skrátenej doby života. Dôkazy za posledných niekoľko rokov potvrdili úlohu neutrofilov v patogenéze SLE. Fenotypové charakteristiky neutrofilov pri SLE zahŕňajú zvýšenú apoptózu, sekundárnu nekrózu a zhoršené fagocytárne schopnosti. Neutrofilny pri SLE majú tiež zvýšenú tvorbu NETs a zhoršenú degradáciu NETs. Zvýšený počet apoptotických neutrofilov pri SLE súvisí s aktivitou ochorenia

a sérovými hladinami protílátok proti dvojvláknovej DNA. Jadrové komponenty obsiahnuté v NETs, najmä DNA vytvárajú silný zdroj autoantigénov. Apoptotické neutrofilny môžu byť tiež zdrojom autoantigénov u pacientov so SLE. Autoantigény ako dsDNA a katelicidín u pacientov so SLE vykazujú zvýšenú hladinu v periférnej krvi a korelujú s aktivitou ochorenia. Výraznou subpopuláciou neutrofilov pri SLE sú granulocyty s nízkou hustotou (LDG), ktoré v posledných rokoch pritiahli veľkú pozornosť. Z LDG sa uvoľňujú NETs, ktoré vykazujú vysoké hladiny autoantigénov a imunostimulačných molekúl, vrátane MM-P, α - a β -defenzínov a LL-37 [8]. Najvýraznejšia charakteristika LDG je podobnosť povrchových markerov s fenotypom zrelých neutrofilov (napr. CD10). LDG vylučujú vysoké hladiny prozápalových cytokínov vrátane TNF- α , IL-6, IL-8 a IFN typu I a II, ktoré sa podieľajú na vyvolaní zápalu pri lupuse. Midgley a Beresford (2016) v štúdiu pozorovali zvýšenú expresiu LDG u pacientov s juvenilným SLE, ktorá koreluje s koncentraciou protílátok proti dsDNA a aktivitou ochorenia [11]. Predpokladá sa, že odlišné skupiny neutrofilov prispievajú k vaskulárnemu poškodeniu a nestabilnému koronárnemu plaku pri SLE [12].

1.2 NETs a nádorové ochorenia

NETs sa ukázali ako dôležití hráči, ktorí prispievajú k rastu nádoru, tvorbe metastáz a zlyhaniu liečby [13]. NETs majú schopnosť modulovať únikové kapacity nádorových buniek, a tým prispievať k patogenéze rakoviny niekoľkými spôsobmi. Prebúdajú spiacie rakovinové bunky, podporujú extravazáciu rakovinových buniek, zvyšujú proliferáciu a migráciu rakoviny a regulujú mikroprostredie nádoru degradáciou extracelulárnej matrice prostredníctvom sekrécie proteáz, čo poskytuje miesto pre metastatický nádor. Okrem toho NETs iniciujú mezenchymálny prechod epitelových buniek a zosilňujú migračné a invazívne schopnosti rakovinových buniek. Cirkulujúce nádorové bunky, keď sú zachytené vláknami NETs, môžu byť sekvestrované a privedené do vzdialených orgánov tvoriacich lymfatické alebo hematogénne metastázy. Spomedzi tumorigénnych aktivít NETs priamo ovplyvňujú charakteristiky nádorových buniek prostredníctvom aktivačných signálov, čím sa zvyšuje invazívnosť rakovinových buniek [4]. Okrem toho, obklopujú primárny nádor a vytvárajú bariéru blokujúcu prístup cytotoxických T buniek a prirodzených zabíjačských buniek, čím uľahčujú imunitný únik z imunitného dozoru [13].



Obrázok 2 NETs ako cieľ terapie. Upravné podľa Masucci a kol., 2020 [2].

Stimulácia neutrofilov (zelené šípky) vedie k NETóze a uvoľneniu NETs (modré šípky). Počas týchto procesov sa stanovili cieľe terapie a interferujúce lieky (červené šípky) sa použili v klinickej praxi alebo sa skúmajú *in vivo*.

Hladiny NETs v obehu korelujú so zvýšenými hladinami markerov hyperkoagulácie - podporujú trombózu asociovanú s rakovinou. Krvné zrazeniny teda môžu fungovať ako prvý indikátor nádorového ochorenia - môžu byť spojené so zlou prognózou nádorového ochorenia. Zdá sa, že protrombotický stav indukovaný NETs je závislý od DNA.

NETs môžu byť sľubnými terapeutickými cieľmi pri liečbe rakoviny, čo potvrdzujú štúdie na zvieracích modeloch (ošetrenie DNAázou zabraňuje trombóze) - obrázok 2. Ak by sa brala do úvahy úloha NETs pri zvyšovaní metastatického potenciálu rakovinových buniek, mohlo by byť vhodné inhibovať ich tvorbu a aktivitu v nádoroch. Avšak doposiaľ prebiehajúce štúdie ešte neodhalili najlepší spôsob na zacielenie NETs. Kombinácia stratégií imunoterapie, liekov interferujúcich s chemoatraktantami neutrofilov a extrúziou NETs bola navrhnutá ako v budúcnosti možná liečba rakoviny [2].

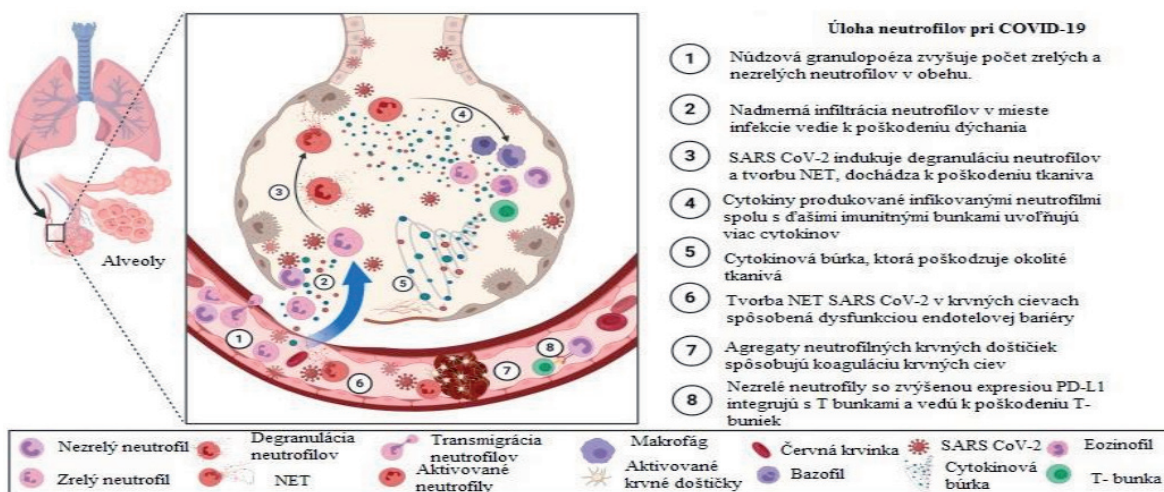
1.3 NETs a ich úloha pri koagulácii a trombóze

NETs hrajú dôležitú úlohu pri koagulácii, aktivácii koagulačnej dráhy a tvorbe krvných zrazenín – trombóze. DNA a históny, ktoré tvoria skelet NETs môžu zachytávať krvné doštičky, erytrocyty, fibrinogén, von Willebrandov faktor (vWF) a adhézne faktory krvných doštičiek. NETs môžu tiež aktivovať krvné doštičky prostredníctvom interakcií s fibronektínom a vWF, čo vedie k ich agregácii a tvorbe krvných zrazenín. Pri zachovaní týchto mechanizmov štúdie naznačujú, že aktivované krvné doštičky podporujú uvoľňovanie NETs, čím sa vytvára recipročný vzťah medzi NETózou a trombózou. Spolu to spôsobuje dysreguláciu prokoagulačných a antikoagulačných faktorov, čo vedie k protrombotickému stavu. Históny uvoľňované z NETs interferujú s fibrinolýzou, procesom rozkladu krvných zrazenín. Extracelulárne históny sprostredkovávajú zmeny na fibrín, ktorý je odolný voči fibrinolýze. Príliv NETs môže poškodiť vaskulárny endotel a navodiť expresiu tkanivového faktora, ktorý spustí koagulačnú kaskádu [14].

1.4 NETs ako faktor závažnosti ochorenia COVID-19

COVID-19 je ochorenie spôsobené novoobjaveným vírusom SARS-CoV-2. U pacientov so závažnými príznakmi sa nakoniec rozvinie syndróm akútnej respiračnej tiesne (ARDS), septický šok alebo multiorgánové zlyhanie. Hyperaktivovaná, imunitnetrombotická reakcia spustená SARS-CoV-2 sa

považuje za príčinu ťažkého priebehu ochorenia a v mnohých prípadoch dokonca i smrti. V súčasnosti sú k dispozícii početné správy, podporujúce skutočnosť, že neutrofilmi sprostredkované dysregulované reakcie sú jedným z kritických faktorov závažnosti ochorenia COVID-19. Pomer neutrofilov k lymfocytom sa považuje za prediktor závažnosti ochorenia COVID-19. Pitevné štúdie ťažko infikovaných pacientov, ktorí podľahli ochoreniu, uvádzajú dôkazy o infiltrácii orgánov nadmerným počtom neutrofilov. Zvýšený počet neutrofilov a makrofágov v pľúcach prispieva k prozápalovej cytokínovej búrke vedúcej k smrteľným následkom. Dôkazom je zvýšená hladina plazmatických mediátorov ako sú interleukíny (2, 5, 6, 8, 7, 10), TNF- α , chemokíny ako CCL2 a CCL3, G-CSF u pacientov hospitalizovaných na JIS [15]. Hladiny IL-6, IL-8, sú hlavnými chemotaktickými faktormi, ktoré priťahujú neutrofile do pľúc a priamo korelovali so závažnosťou ochorenia [16]. Zvýšený počet nezrelých neutrofilov v prípade ťažkej formy COVID-19, indikoval núdzovú granulopoezu v kostnej dreni, čo môže byť spôsobené zvýšenou hladinou G-CSF a GM-CSF u pacientov s ťažkým priebehom ochorenia [14]. Vzorky sér pacientov s ťažkým COVID-19 vykazovali zvýšenú hladinu voľnej dsDNA, MPO a citrulinovaného histónu H3, čo svedčí o uvoľnení NETs. Vyšetrenie imunofluorescenčne zafarbených posmrtných vzoriek pľúc pacientov s COVID-19 odhalilo, že dsDNA, MPO a citrulinovaný histón H3 boli prítomné aj v dýchacích cestách, intersticiálnych a vaskulárnych priestoroch pacientov s ARDS. Zistilo sa, že tieto NETs sú spojené s fibrínom, ktorý úplne uzavrel niektoré alveoly alebo bronchioly [17]. Veľmi výrazná tvorba NETs bola zistená u ťažko chorých pacientov vo vnútri mikrociev. Intravaskulárna agregácia NETs spôsobuje uzavretie postihnutých ciev, čo vedie k poškodeniu orgánov. Zvýšenú tvorbu NETs v pľúcach môže zapríčiniť ich interakcia s aktivovanými krvnými doštičkami. Agregáty neutrofilov a krvných doštičiek korelujú so zápalom a závažnosťou ochorenia. Krvné doštičky napomáhajú pri nábore neutrofilov do pľúc priamou interakciou s P-selektínom a nepriamo uvoľnením prozápalových mediátorov. Táto interakcia vedie k zvýšenej tvorbe NETs v pľúcach a prispieva k zápalovým mikrovaskulárnym trombam obsahujúcich NETs. Pri závažnom ochorení COVID-19 neutrofilné granulocyty vykazujú fenotyp s nízkou hustotou (LDG), ktorý je náchylný na spontánnu tvorbu NETs [15, 17].



Obrázok 3 Zapojenie neutrofilov do patogenézy SARS-CoV-2. Upravené podľa Rawat a kol., 2021 [15].

1.5 NET pri ischemickej cievnej mozgovej príhode

Všeobecne sa uznáva, že NET môžu prispievať k patogénemu mechanizmu rôznych ochorení postihujúcich centrálny nervový systém, ako je ischemická mozgová príhoda alebo systémová skleróza, ako v súčasnosti opisujú Manda-Handzlik a Demkow [18]. Ischemická cievna mozgová príhoda je zvyčajne spôsobená lokálnou trombózou v mozgovom obehú alebo migráciou periférnej zrazeniny zodpovednej za vaskulárnu oklúziu blokujúcu zásobovanie mozgu kyslíkom. NET ďalej podporujú sekundárnu trombózu a predlžujú obdobie ischémie. Predpokladá sa tiež, že fenomén no-reflow, ktorý zhoršuje trombolýzu indukovanú t-PA, možno pripísať konglomerátom NET, ktoré zachytávajú krvné doštičky a aktivujú vnútornú koagulačnú dráhu v mozgových kapilárach [19].

2 Vývin stratégií na kontrolu škodlivých účinkov neutrofilov

Neutrofilly majú dôležitú úlohu pri zápale, preto je potrebné hľadať terapeutické prístupy, ktoré kontrolujú neutrofilly vykonávajúce poškodenie tkaniva a uľahčujú ich odstraňovanie zo zapáleného miesta po splnení ich funkcie. Cieľom výskumu je tlmenie zápalu tak, aby sa uprednostnili reparačné procesy bez toho, aby bola postihnutá antimikrobiálna obrana hostiteľa. Vyvinulo sa niekoľko stratégií, ktoré dosiahli v predklinických modeloch pozitívne výsledky. Medzi ne patria molekuly, ktoré môžu inhibovať, obnovovať alebo zvyšovať funkcie neutrofilov.

Chemokínové receptory CXCR1/2 na neutrofiloch sú dôležité pri mnohých zápalových ochoreniach. Preto ich terapeutická inhibícia alebo inhibícia ich ligandov (ako je CXCL8) môže znížiť nábor neutrofilov pri poruchách s nežiaducim náborom týchto buniek najmä pri zápalových ochoreniach čreva, ateroskleróze, reumatoidnej artritíde a iných. Nedávne zistenia naznačujú kritickú úlohu neutrofilov aj vo vývoji a progresii rakoviny a zdôrazňujú potenciálne terapeutické využitie inhibítorov osi CXCR1/2/CXCL8, najmä pri malignitách gastrointestinálneho traktu vrátane pankreasu a hrubého čreva, ale aj iných orgánov ako je napr. koža (melanóm) a obličky [20].

Ďalšou taktikou, ktorá preukázala účinnosť v predklinických modeloch je priama inhibícia G-CSF a následne zníženie množstva neutrofilov. Látky proti tomuto cieľu sú v súčasnosti v ranom štádiu klinického vývoja pri rakovine. Nie je však celkom jasné, či inhibícia G-CSF a následná redukcia neutrofilov nemôže mať negatívny vplyv na obranyschopnosť pacientov najmä tých, ktorí sú liečení chemoterapiou [21]. Leukotriény odvodené od neutrofilov pomáhajú šíriť podskupiny rakovinových buniek, ktoré si zachovávajú vysoký tumorigénny potenciál. Genetická alebo farmakologická inhibícia enzýmu arachidonát-5-lipoxigenázy generujúceho leukotrién (Alox5) ruší prometastatickú aktivitu neutrofilov a následne môže obmedziť metastatickú progresiu nádoru [22].

Ďalším možným terapeutickým prístupom je blokovanie degranulácie neutrofilov alebo účinkov granulárnych enzýmov. Boli vyvinuté inhibítory exocytózy špecifické pre neutrofilly nazývané Nexinhibs (neutrofilné inhibítory exocytózy), ktoré selektívne inhibujú uvoľňovanie obsahu azurofilných granúl bez ovplyvnenia fagocytózy a Netózy a na myšom modeli systémového zápalu znižovali akumuláciu neutrofilov v obličkách a pečeni. V ďalšej štúdií sa ukázalo sa, že intrapulmonálna aplikácia nanočastíc s obsahom Nexinhibs, ktoré ich uvoľňujú

po štiepení neutrofilnou elastázou, tlmí nábor a degranuláciu neutrofilov v dolných dýchacích cestách [23].

Keďže sa nadmerná alebo abnormálna tvorba NETs podieľa na patogeneze mnohých patológií, inhibícia uvoľňovania NETs alebo zvýšenie klirensu NETs otvára sľubné cesty úspešnej terapie. Predklinické štúdie ukázali, že vychytávače ROS ako je n-acetylcystein, inhibítory myeloperoxidázy a inhibítory PAD4 môžu brzdíť uvoľňovanie NETs a tlmíť tak poškodenie tkaniva v experimentálnych modeloch artritídy, aterosklerózy a autoimunitných ochorení [23]. Podpora degradácie NETs pomocou DNázy znížila poškodenie tkaniva a zvýšila prežitie u myších modelov so závažnou bakteriálnou pneumóniou, znížila poškodenie pľúc spojeného s transplantáciou, obnovila perfúziu v obličkách a srdci u myši s nádorom a pri modeli lupusu liečba znížila proteinúriu a poškodenie obličiek. Okrem toho v súčasnosti prebieha randomizovaná multicentrická, dvojito zaslepená klinická štúdia porovnávajúca inhalačnú dornázu α (rekombinantná ľudská DNáza I) a jej placebo na zníženie výskytu stredne ťažkého až ťažkého ARDS u pacientov s ventilovanou traumou na jednotke intenzívnej starostlivosti [23, 24]. β 2-integríny sú ďalší potenciálny terapeutický cieľ. V mnohých modeloch účinne redukujú neutrofilmi riadený zápal. Regulácia funkcie neutrofilov, selektívnym zacielením glykánových epitopov prítomných na integríne CD11b/CD18 rastlinnými lektínmi znižuje adhéziu neutrofilov a ich transepiteliálnu migráciu, pričom sa zvyšuje fagocytóza a apoptóza neutrofilov [21]. Chrupavka sa normálne považuje za nepreniknuteľnú pre bunky. Neutrofilly sú schopné uvoľniť mikrovezikuly, ktoré ľahko vstupujú do tkaniva a zabraňujú poškodeniu spôsobenému chorobou prostredníctvom zložitého mechanizmu, ktorý zahŕňa proteín anexín A1 a jeho receptor. Mikrovezikuly naplnené anexínom A1 možno využiť ako terapeutickú stratégiu, zabraňujú strate proteoglykánov aby zachovali integritu chrupavky [23]. Predpokladá sa, že mikrovezikuly buď priamo alebo naplnené terapeutikami môžu byť využité ako jedinečná terapeutická stratégia na ochranu pri ochoreniach spojených s degeneráciou chrupavky [25].

Záver

Neutrofilly sú prvými imunitnými bunkami, ktoré reagujú na zápalové alebo infekčné etiológie a sú kľúčovými účastníkmi správneho fungovania vrodenej aj adaptívnych imunitných reakcií. Neutrofilné extracelulárne pasce sú extracelulárne štruktúry vytláčané aktivovanými neutrofilmi podobné sieti, schopné zachytiť mnohé patogény, vrátane grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií, húb, prvokov a vírusov. Sú zložené z DNA vlákien, histónov a antimikrobiálnych proteínov pochádzajúcimi z granúl a jadra neutrofilov. Patogény sú v nich imobilizované a vystavené lokálnej, vysokej a letálnej koncentrácii efektorových proteínov.

Tvorba NETs, mimoriadne účinná súčasť antimikrobiálnej obrany, je však dvojsečnou zbraňou, pretože nadmerné uvoľňovanie NETs alebo porušenie mechanizmov ich eliminácie vytvára začarovaný kruh, charakterizovaný aktiváciou ďalších neutrofilov a imunokompetentných buniek prispievajúcich k zápalu a generácii NETs. Tento stav je kľúčovou zložkou v patogeneze tak rôznorodých chorôb, akými sú preeklampsia, sepsa, autoimunitné ochorenia alebo v iných neinfekčných patologických procesoch, ako sú poruchy zrážanlivosti krvi, trombóza, diabetes, ateroskleróza a rakovina

Spôsoby tvorby NETs sa neustále intenzívne študujú, mnohé otázky však zostávajú stále otvorené. Dôležité je najmä lepšie porozumieť rôznym signálnym dráham, ktoré sa zúčastňujú na tvorbe NETs a mechanizmu ich účinku pri rôznych patologických stavoch. Detailné poznanie molekúl, ktoré navodzujú tvorbu NETs ako aj mechanizmov ich degradácie môže úspešne modifikovať patogénny, ale i pozitívny potenciál NETs, keďže NETs môžu byť sľubnými terapeutickými cieľmi pri prevencii a liečbe viacerých klinických modalít.

Literatúra

- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663): 1532-1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
- Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S, et al. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Frontiers in immunology*. 2020; 11: 1749. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01749>
- Rada B, Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol Biol*. 2019; 1982: 517- 528. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_31
- Stoimenou M, et al. Methods for the Assessment of NET Formation: From Neutrophil Biology to Translational Research. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23(24): 15823. <https://doi.org/10.3390/ijms232415823>
- Krivošíková K, a kol. Úloha neutrofilov a neutrofilných extracelulárných pascí pri renálnych ochoreniach bakteriálneho pôvodu. *Ces-slov Pediat*. 2023; 78(4): 231 – 237. <https://doi.org/10.55095/CSPediatric2023/040>
- Hidalgo A, et al. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. *Cardiovascular research*. 2022; 118(13): 2737- 2753. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab329>
- Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. *Cells*. 2020; 9(4): 915. <https://doi.org/10.3390/cells9040915>
- Yang P, Li Y, Xie Y, et al. Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function. *Journal of immunology research*. 2019; 8016254. <https://doi.org/10.1155/2019/8016254>
- Pastorek M, Dúbrava M, Celec P. On the Origin of Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *Front Immunol*. 2022; 13: 821007. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.821007>
- Fresneda Alarcom M, McLaren Z, Wright HL. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. *Front Immunol*. 2021; 12: 649693. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.649693>
- Midgley A, Beresford MW. Increased expression of low density granulocytes in juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients correlates with disease activity. *Lupus*. 2016; 4: 407- 411. <https://doi.org/10.1177/0961203315608959>
- Carlucci PM, Purmalek MM, Dek, AK, et al. Neutrophil subsets and their gene signature associate with vascular inflammation and coronary atherosclerosis in lupus. *JCI Insight*. 2018; 3(8): e99276. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99276>.
- Demkow, U. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Invasion, Evasion and Metastasis. *Cancers* 2021; 13: 4495 <https://doi.org/10.3390/cancers13174495>
- Zhou Y, Xu Z, Liu Z, Impact of Neutrophil Extracellular Traps on Trombosis Formatio: New Findings and Future Perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 910908. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.910908>
- Rawat S, Vrati S, Banerjee A. Neutrophils at the crossroads of acute viral infections and severity. *Molecular aspects of medicine*. 2021; 81: 100996. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100996>
- Ma C, Hunt JB, Selenica MB, et al. Arginase 1 Insufficiency Precipitates Amyloid- β Deposition and Hastens Behavioral Impairment in a Mouse Model of Amyloidosis. *Frontiers in immunology*. 2021; 11: 582998. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.582998>
- Radermecker C, Detrembleur N, Guiot J, et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate pulmonary airways, interstitial and vascular compartments in severe COVID-19. In: *J. Exp. Med.* [online]. 2020; 217(12): 20201012. <https://doi.org/10.1084/jem.20201012>
- Manda-Handzlik, A.; Demkow, U. The Brain Entangled: The Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to the Diseases of the Central Nervous System. *Cells* 2019; 8: 1477. <https://doi.org/10.3390/cells8121477>
- Demkow, U. Molecular Mechanisms of Neutrophil Extracellular Trap (NETs) Degradation. *Int. J. Mol. Sci*. 2023; 24: 4896. <https://doi.org/10.3390/ijms24054896>
- Sitaru S, Budke A, Bertini R, et al. Therapeutic inhibition of CXCR1/2: where do we stand? *Internal and emergency medicine*. 2023; 18(6): 1647 - 1664. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03309-5>
- Ocana A, Nieto-Jiméz C, Pandiella A, et al. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. *Mol Cancer*. 2017; 16: 137. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0707-7>
- Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*. 2015; 528 (7582): 413- 417. <https://doi.org/10.1038/nature16140>
- Filep JG. Targeting Neutrophils for Promoting the Resolution of Inflammation. *Frontiers in immunology*. 2022; 13: 866747. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.866747>
- Pottecher J, Noli E, Borel M, et al. Protocol for TRAUMADORNASE: a prospective, randomized, multicentre, double-blinded, placebocontrolled clinical trial of aerosolized dornase alfa to reduce the incidence of moderate-to-severe hypoxaemia in ventilated trauma patients. *Clinical Trials*. 2022; 21(1): 274. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-4141-6>
- Headland SE, Jones HR, Norling LV, et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Science translational medicine*. 2015; 7(315): 315ra 190. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5608>

Kontakt:

RNDr. Ivana THURZOVÁ
Ústav klinickej biochémie, imunológie a alergológie
ÚVN SNP Ružomberok - FN
ul.gen. M. Vesela 21
034 26 Ružomberok
e-mail: thurzovai@uvn.sk