



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΙΚΩΝ
ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΠΑΓΙΔΩΝ (NETs)
ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗ
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ»**

υπό

ΕΛΕΝΑΣ Γ. ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ

Ειδικού Καρδιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση
του Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Θρόμβωση και Αντιθρομβωτική Αγωγή»

Λάρισα, 2023

Στη Ρίτα

αέναο πρότυπο έμπνευσης και ηρωίδα ζωής

Στο Χρήστο για όσα η ζωή του στέρησε...

Επιβλέπων:

Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Αλέξανδρος Τσελέπης
2. Σταυρούλα Τσιάρα
3. Παρασκευή Κώτση

Αναπληρωματικό μέλος:

Καλλιρρόη Καλαντζή

Τίτλος εργασίας στα αγγλικά:

The role of neutrophil extracellular traps (NETs) in platelet activation and thrombosis

Ευχαριστίες

Η περαίωση μιας διατριβής αποτελεί καρπό προσωπικού αγώνα αλλά και τελεσφόρας συνεισφοράς ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω βαθιά ευγνωμοσύνη.

Χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση των καθηγητών μου δεν θα ήταν εφικτή η υλοποίηση της παρούσης διατριβής. Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον υπεύθυνο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών « Θρόμβωση και Αντιθρομβωτική Αγωγή», καθηγητή κ. Ματσάγκα Μιλτιάδη που μου εμπιστεύτηκε την εκπόνησή της και με την επιστημονική του κατάρτιση στάθηκε αρωγός στο ερευνητικό μου έργο.

Στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Τσελέπη Αλέξανδρο, θα ήθελα να εκφράσω εν τω βάθει ευγνωμοσύνη και ειλικρινείς ευχαριστίες για την καθοδήγηση και τη μεταλαμπάδευση γνώσεων καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης του πονήματος. Οι συμβουλές του υπήρξαν πολύτιμες για τη βέλτιστη δομή της διατριβής και με κατηύθυναν στην υιοθέτηση επαγωγικού τρόπου σκέψης αποτελώντας σημαντικό εφόδιο για την μελλοντική ακαδημαϊκή μου πορεία.

Ιδιαίτερη μνεία αξίζουν οι γραμματείς του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών κ.κ Κλέτσου Ελένη και Σπηλιώτη Βασιλική όχι μόνο για τη γόνιμη ανταλλαγή απόψεων επί διοικητικών θεμάτων αλλά και για την άμεση και ουσιαστική ανταπόκριση σε όλα τα αιτήματά μου. Τις ευχαριστώ θερμώς.

Ως μια πράξη δια βίου ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αέναη στήριξη, τους γονείς μου που μου δίδαξαν το «ευ αγωνίζεσθαι» και τον υιό μου Φοίβο-Κωνσταντίνο που με πυροδοτεί για τη συνεχή αναζήτηση της γνώσης, προτυπώνοντας την άδολη ματιά της καινούργιας γενιάς.

Περίληψη

Τα ουδετερόφιλα είναι πρωταρχικά κύτταρα-ενεργοποιητές της έμφυτης ανοσίας και απελευθερώνουν ουδετεροφιλικές εξωκυτταρικές παγίδες (NETs) ως απόκριση σε ποικίλα ερεθίσματα. Τα NETs είναι συμπλέγματα που μοιάζουν με δίχτυ και αποτελούνται από DNA, ιστόνες και πρωτεΐνες ουδετερόφιλων κοκκίων. Εκτός από τον μηχανισμό σύλληψης και την εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών, τα NETs σχετίζονται επίσης με παθοφυσιολογικές διεργασίες διαφόρων ασθενειών. Στο παρόν πόνημα επιχειρείται διερεύνηση των μηχανισμών με τους οποίους τα NETs ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και ενεργοποιούνται από αυτά σε μια ανάστροφη στιχομυθία. Οι εξωκυττάρειες παγίδες των ουδετεροφίλων δεν είναι μόνο παρούσες σε διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις, αλλά διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, στην αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση, καθώς και στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των ανευρυσμάτων της κοιλιακής αορτής. Στην διαμορφούμενη ανάγκη για έρευνα σχετικά με την ισορροπία μεταξύ επαγωγής, αναστολής και αποικοδόμησης των NETs προκειμένου να στοχευθούν φαρμακολογικά είναι απαραίτητο να προσεγγίσουμε το βασικό ερευνητικό πλαίσιο και ακολούθως να αναζητήσουμε την αντίστοιχη κλινική τεκμηρίωση.

Λέξεις - Κλειδιά:

NETs, Εξωκυττάρειες ουδετεροφιλικές παγίδες, Αιμοπετάλια, Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, Αρτηριακή θρόμβωση, Έμφραγμα μυοκαρδίου, Φλεβική Θρόμβωση, Φλεβική θρομβοεμβολική νόσος, Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, Πνευμονική Εμβολή.

Abstract

Neutrophils are primary activator cells of innate immunity and release neutrophil extracellular traps (NETs) in response to a variety of stimuli. NETs are net-like complexes composed of DNA, histones and neutrophil granule proteins. In addition to the mechanism of capture and elimination of pathogenic microorganisms, NETs are also associated with pathophysiological processes of various diseases. In this paper we attempt to investigate the mechanisms by which NETs activate platelets and are activated by them in a reverse cross-talk. Neutrophil extracellular traps are not only present in various cardiovascular diseases, but play an essential role in atherosclerotic plaque formation, arterial and venous thrombosis, as well as in the development and progression of abdominal aortic aneurysms. In the urgent need for research on the balance between induction, inhibition and degradation of NETs in order to target them pharmacologically, it is necessary to approach the basic research framework and subsequently seek the emerging clinical evidence.

Key words

NETs, Neutrophil extracellular traps, Platelets, Platelet Activation, Thrombosis, Arterial Thrombosis, Myocardial Infarction, Venous Thrombosis, Venous Thromboembolism, Deep Vein Thrombosis, Pulmonary Embolism.

Συντομογραφίες

NETs	Neutrophil Extracellular Traps
VT	Venous thrombosis, φλεβική θρόμβωση
DVT	Deep Venous Thromboembolism; εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση
VTE	Venous Thromboembolism
PE	Pulmonary Embolism; Πνευμονική Εμβολή
STEMI	ST Myocardial Elevation, Οξύ Έμφραγμα Μυοκαρδίου με ανάσπαση ST
CVD	Cardiovascular diseases; Καρδιαγγειακά νοσήματα
ROS	Reactive Oxygen Species; Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου
CXC	Chemokines: Χημειοκίνες
CXCR	Chemokines Receptors: Υποδοχείς Χημειοκινών
CXCL	Chemokines Ligands: Συνδέτες (Υποδοχέων) Χημειοκινών
ECM	Extracellular Matrix: Εξωκυττάρια Θεμέλια Ουσία
LDL	Low-Density Lipoprotein; Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
MPO	Myeloperoxidase; Μυελοϋπεροξειδάση
NE	Neutrophil Elastase; Ουδετερόφιλη Ελαστάση
PMA	Phorbol Myristate Acetate; Μυριστικός Οξικός Εστέρας της Φορβόλης
C (PCK)	Protein Kinase C; C πρωτεϊνική κινάση
LPS	Lipopolysaccharides, Λιποπολυσακχαρίτης
IL	Interleukin, Ιντερλευκίνη
TF	Tissue Factor, Ιστικός Παράγων
PAD 4	Peptidyl Arginine Deiminase Type 4: Πεπτιδυλο-αργινινο της δεαμινάσης 4

NADPH oxidase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; νικοτιναμινο-αδενο δινουκλεοτίδιο
H3 (H3Cit)	Citrullinated Histone 3, Κιτρουλινοποιημένη Ιστόνη
ADP	Adenosine Diphosphate; Διφωσφορική Αδενοσίνη
ATP	Adenosine Triphosphate; Τριφωσφορική Αδενοσίνη
PAR	Protease Activated Receptors : Υποδοχείς των πρωτεασών των αιμοπεταλίων
GPIba	Glykoprotein Iba, Γλυκοπρωτεΐνη Iba
TLRs	Toll-like Receptors, Ανάλογοι των Toll υποδοχείς
MCP 1	Monocyte Chemoattractant Protein 1, μονοκυτταρική χημειοελκυστική πρωτεΐνη 1
VCAM	Vascular cell Adhesion Molecule: Πρωτεΐνη προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων
PRISMA	Preferred reporting Items for Systematic Reviews and Meta- Analysis

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract	6
Συνοτομογραφίες	7
 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	 11
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	 12
1.1 Συντελεστές της Ανοσοθρόμβωσης-Ορισμοί	13
1.1.α.Ουδετερόφιλα:ο πρώτος συντελεστής της ανοσοθρόμβωσης	13
1.1.β.Δημιουργία εξωκυτταρικών παγίδων ουδετεροφίλων (NETs)	14
1.2. Μοντέλα NETωσης	16
1.3. Αιμοπετάλια : ο δεύτερος συντελεστής της ανοσοθρόμβωσης	17
1.3.α.Περιγραφή των αιμοπεταλίων	17
1.3.β.Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων	18
1.4. Στιχομυθία NETs-αιμοπεταλίων	20
1.4.α.Αλληλεπίδραση ουδετεροφίλων - αιμοπεταλίων που οδηγεί στο σχηματισμό NETs	20
1.4.β.Τα NETs ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και προάγουν την πήξη.....	21
1.5. Το ενδοθήλιο	22
1.5.α.Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου ως ενορχηστρωτής της στεφανιαίας νόσου	22
1.5.β.Βιοχημικές διαδικασίες που συνδέονται με το ενδοθήλιο και εμπλέκονται στη στεφανιαία νόσο	23
1.5.γ. Φλεγμονώδης διαδικασία στη στεφανιαία νόσο	25
1.5.δ.Θρομβογένεση στη στεφανιαία νόσο	26
1.6. Φλεβική θρομβοεμβολική νόσος (Φλεβοθρόμβωση). Αναψηλάφηση της τριάδας του Virchow	29
1.6.α.Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στη φλεβοθρόμβωση	29
1.6.β.Στάση του αίματος	30
1.6.γ. Υπερπηκτικότητα	30

1.6.δ. Η επιπρόσθετη συνεισφορά των ουδετεροφίλων στην τριάδα του Virchow	31
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	33
2.1. Στόχος της ανασκόπησης.....	33
2.2. Κριτήρια εισόδου / Κριτήρια Αποκλεισμού μελετών	33
2.3. Στρατηγική Αναζήτησης.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
3.1. Ασθένειες που σχετίζονται με τα NETs	36
3.1.α. Τα NETs ως επαγωγείς της αθηροσκλήρωσης.....	37
3.1.β. Διαμεσολαβούμενη από τα NETs θρόμβωση	39
3.2. Ο ρόλος των NETs στην αρτηριακή θρόμβωση.....	41
3.2.α. Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου	41
3.2.β. Οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο	42
3.2.γ. Ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής	43
3.3. Ο ρόλος των NETs στη φλεβική θρόμβωση	43
3.4. NETs και αιμοπετάλια: Παιχνίδια εξουσίας στην επαγωγή ανοσοθρόμβωσης στην Covid-19.....	45
3.5. Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	46
3.6. Σύνθεση αποτελεσμάτων	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι καρδιακές παθήσεις είναι η κύρια αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες και επιπλέον το 50% όλων των θανάτων που σχετίζονται με κακοήγη νεοπλάσματα, δεύτερη σημαντική αιτία θνησιμότητας, οφείλονται σε θρομβωτικά συμβάντα. Οι φυσιολογικοί αιμοστατικοί μηχανισμοί διαταράσσονται οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη θρόμβωση με σχηματισμό θρόμβων και απόφραξη των αγγείων είτε στο αρτηριακό είτε στις φλεβικό δίκτυο. Η αρτηριακή θρόμβωση είναι η αιτία του εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI) και των εγκεφαλικών επεισοδίων ενώ η φλεβική θρόμβωση (VT) οδηγεί σε φλεβική θρομβοεμβολική νόσο (VTE) που συλλήβδην περιλαμβάνει την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT) και την πνευμονική εμβολή (PE). Δομικά, υπάρχει σαφής διαφοροποίηση της αρτηριακής από τη φλεβική θρόμβωση. Οι αρτηριακοί θρόμβοι είναι πλούσιοι σε αιμοπετάλια και σχηματίζονται στη θέση ρήξης της αθηρωματικής πλάκας. Οι φλεβικοί θρόμβοι είναι πλούσιοι σε ινική και σε ερυθρά αιμοσφαίρια και μπορεί να εμφανιστούν σε υγιές και άθικτο ενδοθηλιακό τοίχωμα. Τέλος, η αρτηριακή θρόμβωση εμφανίζεται σε σημεία υψηλής διατμητικής ροής, ενώ η φλεβική εμφανίζεται σε συνθήκες αργής διατμητικής ροής.

Τα αιμοπετάλια, μαζί με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τις σχετιζόμενες με την πήξη κυκλοφορούσες πρωτεΐνες διαμεσολαβούν δραστικά την αγγειακή αιμόσταση και τη θρόμβωση. Τα ουδετερόφιλα είναι πρωταρχικά κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και προάγουν σημαντικά την ενδοθηλιακή βλάβη και την αθηροσκλήρωση. Επιπρόσθετα, μια σημαντική αλλαγή στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της θρόμβωσης συνέβη μετά την ανακάλυψη των εξωκυτταρικών παγίδων (NETs) που εξαπολύονται από τα ουδετερόφιλα και των προθρομβωτικών ιδιοτήτων τους. Ως αποτέλεσμα της αποσυμπίεσης της χρωματίνης των ανοσοποιητικών κυττάρων και τη διαμόρφωση της σε εξωκυτταρικές ίνες, τα NETs προάγουν το σχηματισμό θρόμβων δρώντας ως ικρίωμα που ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια και τα συγκολλά. Σε αντίθεση με τις τον προστατευτικό τους ρόλο κατά την πορεία των λοιμώξεων όπου παρέχουν την δομική πλατφόρμα για δέσμευση και καταστροφή των λοιμογόνων παραγόντων, τα NETs εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία των καρδιαγγειακών νόσων (CVD). Η συμμετοχή των NETs στη θρόμβωση έχει αναφερθεί σε όλο το φάσμα των θρομβωτικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων των πνευμονικών εμβολών, της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης (DVT), της οξείας μυοκαρ-

διακής ισχαιμίας, του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και των ανευρυσμάτων της κοιλιακής αορτής.

Στην παρούσα ανασκόπηση συμπεριλαμβάνονται μελέτες που χαρτογραφούν την ύπαρξη NETs σε φλεβικούς ή αρτηριακούς θρόμβους και αναδιφούν τη σύνδεση μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης παρέχοντας το παθοφυσιολογικό υπόστρωμα της ανοσο-θρόμβωσης. Επιπλέον, αναζητούνται πιθανές νέες θεραπευτικές προκλήσεις που σχετίζονται με την λύση της θρόμβωσης κατόπιν στόχευσης των NETs.

1.1. Συντελεστές της Ανοσοθρόμβωσης -Ορισμοί

1.1.α. Ουδετερόφιλα: ο πρώτος συντελεστής της ανοσοθρόμβωσης

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα αποτελούν το 60% του συνόλου των λευκών αιμοσφαιρίων. Τα ουδετερόφιλα έχουν σχετικά βραχεία διάρκεια ζωής και απελευθερώνονται από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία¹ Είναι από τα βασικότερα στοιχεία στο οπλοστάσιο του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς είναι ο πρώτος κυτταρικός στρατός που καταφθάνει σε περιοχές φλεγμονής και τραυματισμού²

Τα ουδετερόφιλα είναι οι βασικοί ρυθμιστές που συνδέουν την έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση. Προέρχονται αποκλειστικά από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα της χημειοκίνης C-X-C (CXCR)4, ο οποίος εκφράζεται στα ώριμα ουδετερόφιλα, και του συνδέτη της χημειοκίνης C-X-C (CXCL)12, ο οποίος εκκρίνεται από τα στρωματικά κύτταρα, συγκρατούν τα ουδετερόφιλα στο μυελό των οστών. Η διακοπή της σηματοδότησης CXCR4/CXCL12 οδηγεί σε κινητοποίηση ουδετερόφιλων από το μυελό των οστών στο αίμα. Στα γηράσκοντα ουδετερόφιλα, η έκφραση του CXCR4 αυξάνεται για να ενισχύσει την επιστροφή των κυττάρων στο μυελό των οστών και την κάθαρση τους από τα μακροφάγα. Καθώς αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των λευκών αιμοσφαιρίων, τα ουδετερόφιλα διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της απελευθέρωσης προσχηματισμένων κοκκίων, της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου, τη φαγοκυττάρωση και το σχηματισμό εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων (NETs) για την απομάκρυνση των παθογόνων. Κατά τη φαγοκυττάρωση παθογόνων μικροοργανισμών, τα ουδετερόφιλα συγχωνεύουν τα κοκκία τους με φαγολυσοσώματα, με αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση των παθογόνων. Εναλλακτικά, τα

ουδετερόφιλα μπορούν να απελευθερώσουν το κοκκώδες περιεχόμενό τους στον εξωκυττάριο χώρο³

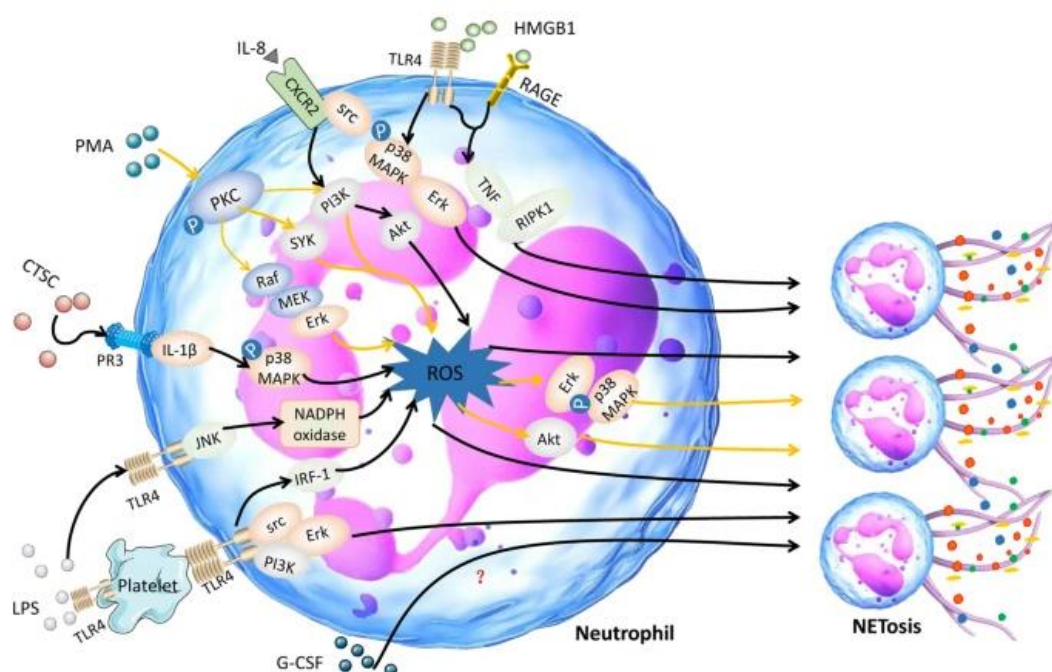
Εκτός όμως από την ανοσολογική άμυνα, τα ουδετερόφιλα εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD). Ως βασική αιτία της καρδιαγγειακής νόσου, η αθηροσκλήρωση ξεκινά από τη βλάβη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ουδετερόφιλα αποτελούν την πρώτη γραμμή φλεγμονωδών κυττάρων που ενεργοποιούνται και στρατολογούνται από τα κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μετά την προσέλευση στο σημείο της βλάβης, παράγουν ROS και εκκρίνουν καθεψίνη G και πρωτεάσες για την αποδόμηση των εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) που επιδεινώνει περαιτέρω την ενδοθηλιακή βλάβη. Η διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα ενισχύει την ενσωμάτωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα παράγουν μυελοϋπεροξειδάση (MPO) για να επιτείνουν την οξείδωση της LDL και τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, καθώς και NETs, τα οποία διεγείρουν την ενισχυμένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα και τα πλασματοκυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα. Τα τοξικά συστατικά των NETs είναι επιζήμια για την επιβίωση των λείων μυϊκών κυττάρων. Ο θάνατος των λείων μυϊκών κυττάρων και των αφρωδών κυττάρων, σε συνδυασμό με την αποδόμηση της ECM, έχει ως αποτέλεσμα λέπτυνση του ινώδους καλύμματος και το σχηματισμό ευάλωτων πλακών που είναι επιρρεπείς σε ρήξη.

1.1.β. Δημιουργία εξωκυτταρικών παγίδων ουδετεροφίλων (NETs)

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των ουδετεροφίλων περιεγράφη σχετικά πρόσφατα αν και οι πρώτες ενδείξεις είχαν ήδη εμφανιστεί το 1996 όταν διεπιστώθη ότι ο μυριστικός οξικός εστέρας της φορβόλης - phorbol myristate acetate (PMA) προκαλούσε ταχέως τον κυτταρικό θάνατο των ουδετεροφίλων. Τοιουτοτρόπως, τα ουδετερόφιλα υφίστανται σημαντικές μορφολογικές αλλαγές διαφορετικές από την απόπτωση ή τον θάνατο, συμπεριλαμβανομένων ενδείξεων πυρηνικής αποσυμπύκνωσης. Κατ'επέκτασιν, απεδείχθη ότι όχι μόνο το PMA, αλλά και ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και η ιντερλευκίνη IL-8 προκαλούσαν την εμφάνιση εξωκυτταρικών δομών που περιγράφονται ως εύθραυστες ίνες αποσυμπιεσμένου DNA που καλύπτονται από ιστόνες και κοκκώδεις πρωτεΐνες, χαρακτηρισθείσες ως εξωκυττάρια παγίδες ουδετεροφίλων (NETs). Τα θετικά και τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια παγιδεύονται από

αυτά τα NETs και η παρουσία ουδετερόφιλης ελαστάσης (NE) ή μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) προκαλεί την αποικοδόμηση σημαντικών βακτηριακών συστατικών.⁴

Χρησιμοποιώντας την απεικόνιση ζωντανών κυττάρων, διεπιστώθη ότι ο σχηματισμός NETs είναι μια δυναμική διαδικασία, διαφορετική από την απόπτωση και τη νέκρωση. Μετά από διέγερση, τα ουδετερόφιλα αρχικά αποπλάτυνονται, σχηματίζοντας κενोटόπια, διαδικασία που ακολουθείται από την απώλεια του λοβοτού τους πυρήνα. Σε αυτό το στάδιο, τα ουδετερόφιλα είναι ακόμη βιώσιμα και περιέχουν τη ζωτική χρωστική καλσεΐνη, αλλά δεν είναι θετικά για την αννεξίνη V, κατάσταση που είναι αναστρέψιμη μέχρι την τελική ρήξη της πλασματικής μεμβράνης. Επιπλέον και σε αντίθεση με την απόπτωση, η χρωματίνη αποσυμπιέζεται. Ακολουθεί κατακερματισμός των ενδοκυττάρων μεμβρανών που οδηγεί στην ανάμειξη των πυρηνικών, κοκκωδών και κυτταροπλασματικών συστατικών, κάτι που δεν αποτελεί χαρακτηριστικό της νέκρωσης (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματισμός εξωκυτταρικών παγίδων ουδετεροφίλων (NETs)

1.2. Μοντέλα NETωσης

Έχει περιγραφεί ότι το μοντέλο της αυτοκτονικής NETωσης εξαρτάται από τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C (PCK) ως βασικού ρυθμιστή αυτής της οδού, η οποία εξαρτάται επίσης από την οξειδάση 2 του NADPH (Nox 2)⁵. Το μονοπάτι αυτό ξεκινά με την αναγνώριση οποιουδήποτε ερεθίσματος που ενεργοποιεί υποδοχείς, το οποίο επάγει την ενεργοποίηση των σχετιζόμενων με τη σηματοδοτική οδό κινασών, όπως οι PKC, p38, PI3K, Src, Raf/MERK/Erk, Akt και Ark. Όλες αυτές είναι γνωστές και ως σημαντικές κινάσες για τον Nox2-εξαρτώμενο σχηματισμό NETs^{6,7}. Στα ακολουθούντα μεταβολικά βήματα, το πολυμερές σύμπλοκο της NADPH οξειδάσης συναρμολογείται και παράγει ROS. Με τη δημιουργία ROS, το κυττασολικό ασβέστιο αυξάνεται, δρώντας ως συμπαράγοντας για την πεπτιδυλ-αργινάση της δεαμινάσης 4 (PAD4). Η PAD4 είναι ένα ένζυμο που προκαλεί την απαμίνωση των ιστονών και, ως εκ τούτου, ευνοεί την αποσυμπίεση της χρωματίνης⁸. Ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι φυσιολογικά ερεθίσματα επάγουν PAD4-εξαρτώμενη από ROS-ανεξάρτητη NETωση. Ταυτόχρονα, ενώ η ουδετερόφιλη ελαστάση (NE) και η μυελοπεροξειδάση (MPO) μετατοπίζονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα^{9, 10}, η MPO συνδέεται με τη χρωματίνη και συνεργεί με τη NE αποσυμπυκνώνοντας τη χρωματίνη⁹. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο Nox2 παράγει ROS που λειτουργούν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι, προωθώντας την αποσύνθεση της πυρηνικής μεμβράνης. Αυτή η οξειδωτική ενεργοποίηση είναι σημαντική επειδή η NE συνδέεται με τα νημάτια F- ακτίνης στο κυτταρόπλασμα και πρέπει να τα αποικοδομήσει προκειμένου να εισέλθει στον πυρήνα¹⁰. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την ανάμειξη του πυρηνικού περιεχομένου στο κυτταρόπλασμα, που χάνοντας τελικά την πλασματική μεμβράνη, αποβάλλει το περιεχόμενο των ουδετεροφίλων ως εξωκυτταρικές παγίδες^{11,12}. Είναι ενδιαφέρον ότι η φαρμακολογική αναστολή της οξειδάσης NADPH ή οι εκκαθαριστές ROS εμποδίζουν τον σχηματισμό NETs με ορισμένα ερεθίσματα.

Η έμβια NETωση, σε αντίθεση με την αυτοκτονική NETωση, είναι μια διαδικασία που αφορά στην απελευθέρωση NETs από ζώντα κύτταρα. Τα ουδετερόφιλα μπορούν να απελευθερώσουν μέρος ή ολόκληρο τον πυρήνα ενώ διατηρούν ανέπαφη την κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα απυρηνικό κυτταρόπλασμα που εξακολουθεί να είναι ικανό να κινείται και να φαγοκυτταρώνει

βακτήρια¹³. Έτσι, σε αυτόν τον τύπο NETωσης, τα ουδετερόφιλα διατηρούν ορισμένες από τις λειτουργίες τους.

Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται διάφορα ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων των MPO και NE. Το PAD4 είναι ένα πυρηνικό ένζυμο που εκτελεί την κιτρουλλινοποίηση των ιστονών μέσω της αντικατάστασης της αργινίνης από κιτρουλλίνη, καθιστώντας το συνολικό φορτίο των ιστονών λιγότερο θετικό, ιδιαίτερα στην ιστόνη H3 (H3Cit)¹⁴. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερη συγγένεια για το αρνητικά φορτισμένο DNA, διεγείροντας έτσι την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και τελικά την απελευθέρωση των NETs¹⁵. Αν και έχει περιγραφεί ότι η ενεργοποίηση της PAD4 καταλήγει σε αποσυμπύκνωση του DNA, η NE είναι επαρκής για την αποσυμπύκνωση των πυρήνων *in vitro*. Ωστόσο, ο μηχανισμός που αποσυναρμολογεί τον πυρηνικό φάκελο στα ουδετερόφιλα είναι ακόμη άγνωστος.

1.3 Αιμοπετάλια : ο δεύτερος συντελεστής της ανοσοθρόμβωσης

1.3.α.Περιγραφή των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Bizzozzero το 1882, ο οποίος τα παρατήρησε στο μικροσκόπιο και διεπίστωσε ότι αποτελούσαν το πρώτο συστατικό του αίματος που προσκολλήθηκε σε κατεστραμμένα τοιχώματα των αγγείων *in vivo* και *in vitro*¹⁶. Από την ανακάλυψή του και τούδε, τα αιμοπετάλια έχουν παραδοσιακά συνδεθεί με την αιμόσταση και το σχηματισμό θρόμβων^{17,18}. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην αθηρογένεση, τη φλεγμονή, την αντιμικροβιακή άμυνα του ξενιστή, την προϊούσα εξέλιξη και τη μετάσταση όγκων¹⁶⁻¹⁸.

Τα αιμοπετάλια έχουν μια εξαιρετική ικανότητα μορφολογικής μεταβολής και σημαντική εκκριτική ικανότητα. Ως μικρά, απύρρηνα δισκοειδή κύτταρα είναι τα μικρότερα στην κυκλοφορία του αίματος με διάμετρο 2-5μm με πάχος 0,5μm και μέσο κυτταρικό όγκο 6-10 fl. Προέρχονται από μεγάλα, εμπύρρηνα κύτταρα που ονομάζονται μεγακαρυοκύτταρα τα οποία βρίσκονται στο μυελό των οστών. Τα αιμοπετάλια έχουν μέση διάρκεια ζωής 5-7 ημέρες στην κυκλοφορία του αίματος-ενώ καθώς γερνούν, μειώνεται το μέγεθός τους. Ένας υγιής άνθρωπος έχει 150.000-400.000 αιμοπετάλια ανά κυβικό λίτρο (αιμοπετάλια/μl) και οι μεταβολές του συνολικού αριθμού αιμοπεταλίων και του μέσου όγκου αιμοπεταλίων συχνά

σχετίζονται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις και χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξείας φλεγμονής^{19,20}

Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων, φωσφολιπιδικής συστάσεως, φέρει ενσωματωμένους ποικίλους υποδοχείς για την αναγνώριση των σημείων ανάγκης επεμβάσεως των αιμοπεταλίων και καλύπτεται από γλυκοπρωτεΐνες όπως οι GPIIb-IX-V, GPVI και GPIIbIII, οι οποίες είναι απαραίτητες για την πλήρη συσσώρευση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Η μεμβράνη έχει επίσης υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάση: PAR-1, PAR-4 και τους υποδοχείς της οικογένειας P2Y που μεσολαβούν στην ενεργοποίηση και συσσώρευση ²¹. Τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης τρία διαφορετικά είδη εκκριτικών κοκκίων : α-κοκκία, πυκνά κοκκία και λυσοσωμικά κοκκία ²². Τα α-κοκκία είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά και περιέχουν μεμβρανικές και διαλυτές πρωτεΐνες που εκφράζονται στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων όταν αυτά ενεργοποιούνται. Αυτοί οι μεμβρανικοί δείκτες εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες όπως κυτταρική προσκόλληση, πήξη, φλεγμονή, κυτταρική ανάπτυξη και άμυνα του ξενιστή. Περιλαμβάνουν την P-σελεκτίνη, το ινωδογόνο, τον παράγοντα von Willenbrand, τον αγγειακό επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, τον αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από τα αιμοπετάλια, και τις πρόδρομες ουσίες C3 και C4 του συμπληρώματος.

Τα πυκνά κοκκία, από την άλλη πλευρά, ανευρίσκονται σπανιότερα μόλις τρία έως οκτώ ανά αιμοπετάλιο ²². Περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νουκλεοτιδίων αδενίνης, συγκεκριμένα ADP και ATP μαζί με σεροτονίνη και ισταμίνη, οι οποίες απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η τρίτη ομάδα κοκκίων, τα λυσοσωματικά είναι η λιγότερο συχνή με μόνο 1-2 ανά κύτταρο. Περιέχουν ένζυμα αποικοδόμησης πρωτεϊνών όπως οι καθεψίνες, οι ελαστάσες, οι κολλαγενάσες και οι γλυκοσιδάσες, καθώς και το LAMP-1, LAMP-2 και CD63.

1.3.β Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μπορεί να συμβεί μέσω της επαφής με διαφορετικούς αγωνιστές, οι επικρατέστεροι από τους οποίους είναι: η θρομβίνη, το ADP, ο παράγον von Willenbrand και το κολλαγόνο ²³. Η θρομβίνη δρα στους GPIIb-IX-V και PAR υποδοχείς. Οι υποδοχείς PAR έχουν 4 υποομάδες: Ο PAR2 δεν υπάρχει στα αιμοπετάλια και ο PAR3 λειτουργεί μόνο ως συμπαράγοντας για την ενεργοποίηση του PAR4. Ο PAR1 είναι ο πιο ισχυρός υποδοχέας για την

ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τη θρομβίνη, καθώς είναι πιο ευαίσθητος σε χαμηλότερα επίπεδα θρομβίνης από τον PAR4. Ένας άλλος ισχυρός ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων είναι η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η οποία μπορεί να είναι εξωγενής ή να απελευθερώνεται από τα πυκνά κοκκία των ίδιων των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, αποτελώντας ένα βρόχο ενεργοποίησης μεταξύ των αθροιζόμενων αιμοπεταλίων. Οι υποδοχείς ADP στα αιμοπετάλια είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών P2Y ²⁴. Ο P2Y1 εκκινεί την επαγόμενη από την ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ευθύνεται για την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων ενώ ο P2Y12 ενισχύει και σταθεροποιεί τα συσσωματώματα των αιμοπεταλίων. Το εκκρινόμενο από τα α-κοκκία ADP, μπορεί να αποτελέσει βρόχο ενεργοποίησης μεταξύ των αιμοπεταλίων που ενισχύει την συσσώρευση. Ο παράγων von Willenbrand (vWF) είναι γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους που παράγεται από τα σωματίδια Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων και από τα μεγακαρυοκύτταρα. Ανιχνεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και στον υποενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. Διαδραματίζει ουσιώδη ρόλο στην πρωτογενή και δευτερογενή αιμόσταση ως διαμεσολαβητής της προσκόλλησης αιμοπεταλίων και ως φορέας του παράγοντα πήξης FVIII ²⁵. Ο vWF εκτίθεται στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και υποβοηθά τη μετατόπιση των αιμοπεταλίων, ενώ αλληλεπιδρά με τον vWF, προκαλώντας μια διασταυρούμενη σύνδεση των αιμοπεταλίων που επιτρέπει τη συσσώρευση τους και το σχηματισμό θρόμβου^{25,26}.

Όταν τα αιμοπετάλια έχουν ενεργοποιηθεί, εκθέτουν αρνητικά φορτισμένη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) στη μεμβράνη τους μέσω ενεργοποίησης της σκραμπλάσης (π.χ. TMEM16F) ²⁷. Αυτό δρα ως αγκυροβόλιο για τη δημιουργία του συμπλόκου της προθρομβινάσης, το οποίο μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινική. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια επίσης συμβάλλουν στην ενδογενή οδό της πήξης με την έκκριση Poly-P από τα πυκνά κοκκία τους που ενεργοποιεί τον fXII. Εν τω μεταξύ, η πήξη per se θα ενεργοποιήσει επίσης τα αιμοπετάλια, καθώς η θρομβίνη θα διασπάσει και θα ενεργοποιήσει τους PARs στα αιμοπετάλια δημιουργώντας έτσι έναν θετικό βρόχο ανατροφοδότησης που ενισχύει σημαντικά την διαδικασία αιμόστασης/πήξης.

1.4 Στιχομυθία NETs –αιμοπεταλίων

1.4.α. Αλληλεπίδραση ουδετεροφίλων - αιμοπεταλίων

που οδηγεί στο σχηματισμό NETs

Συρρέοντα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν πως αιμοπετάλια ενδεχομένως διεγείρουν τα ουδετερόφιλα να εξακτινώσουν τις εξωκυττάριες ουδετεροφιλικές παγίδες τους. Υπάρχουν κυρίως δύο μηχανισμοί που μπορεί να οδηγήσουν σε επαγόμενη από τα αιμοπετάλια NETωση.

α) ως αποτέλεσμα της άμεσης επαφής κυττάρου-κυττάρου και του υποδοχέα-δεσμευτή αλληλεπίδρασης μεταξύ αιμοπεταλίων και ουδετεροφίλων, αντίστοιχα²⁸ και

β) μέσω διαλυτών μεσολαβητών που προέρχονται από τα αιμοπετάλια^{29, 30}

Ωστόσο, είναι πιθανή και η συνεργική δράση και των δύο μηχανισμών. Επιπλέον, ορισμένα παθογόνα αποδείχθηκε ότι δρουν άμεσα στα αιμοπετάλια, τα οποία στη συνέχεια οδηγούνται σε κατάντη σχηματισμό NETs με δεδομένο ότι τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια γενικά αποτυγχάνουν να προκαλέσουν NETs σχηματισμούς³¹. Εκτός του ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να επάγουν NETs, αποδεικνύεται σημαντικός ρόλος για τον TLR4 των αιμοπεταλίων στο σχηματισμό NETs κατά τη διάρκεια της σήψης. Η εμπλοκή του TLR4 των αιμοπεταλίων μέσω του LPS έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την ενισχυμένη δέσμευση των αιμοπεταλίων στα ουδετερόφιλα, την αποκοκκίωση των ουδετεροφίλων και τελικά το σχηματισμό NETs. Επιπλέον, τα NETs είναι σε θέση να συλλάβουν και να σκοτώσουν βακτήρια, αποδεικνύοντας την καίρια σημασία για το σχηματισμό NETs με τη μεσολάβηση αιμοπεταλίων σε σηπτικές συνθήκες.

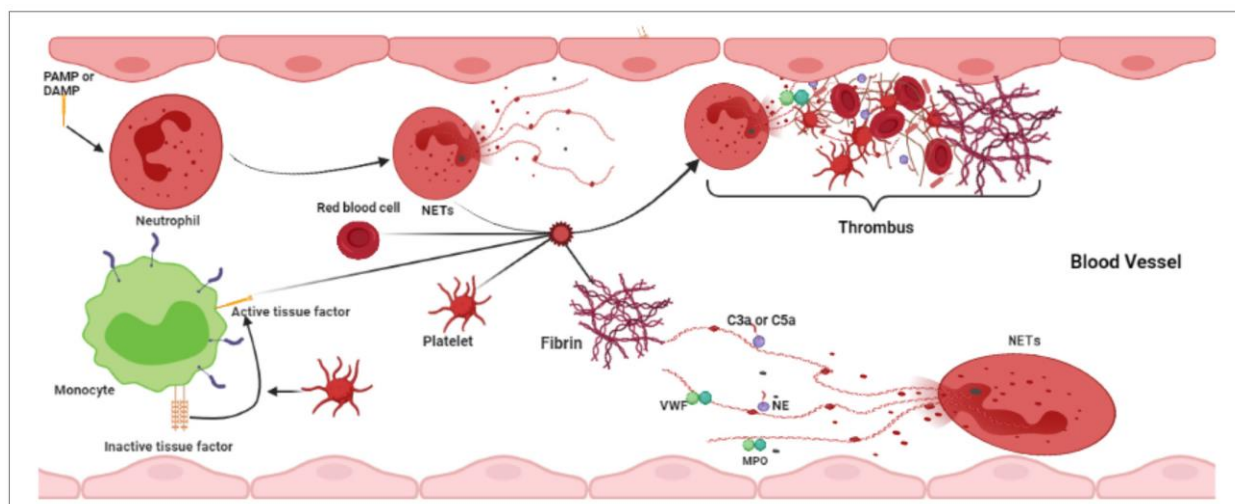
Οι σημαντικότεροι υποδοχείς που μεσολαβούν μεταξύ αιμοπεταλίων-ουδετεροφίλων είναι η P-σελεκτίνη και ο προσδέτης της, PSGL-1. Η P-σελεκτίνη αποθηκεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και αυτά τα κοκκία συγχωνεύονται με την πλασματική μεμβράνη μετά από διέγερση, οδηγώντας σε αύξηση της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων³². Η διακοπή της αλληλεπίδρασης P-σελεκτίνης/PSGL-1 είναι ικανή να αναστείλει τη NETωση που προκαλείται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια^{33,34}

1.4.β. Τα NETs ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και προάγουν την πήξη

Η φυσιολογία του σχηματισμού θρόμβων συχνά εξηγείται από την τριάδα του Virchow, η οποία περιλαμβάνει το τρίπτυχο : στάση της ροής του αίματος, βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων και υπερπηκτικότητα. Κλασικά, η εμφάνιση μιας από τις τρεις αναφερόμενες παραμέτρους μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό θρόμβου. Παραδόξως, τα NETs μπορούν να λειτουργήσουν ως ικρίωμα για το σχηματισμό θρόμβων, παρέχοντας έναν ουσιαστικό σύνδεσμο μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης^{35,36}. Πράγματι, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα NETs και, κατά συνέπεια ενεργοποιούνται. Πραμένει ανοιχτό στην έρευνα το ερώτημα αναφορικά με ποιο τμήμα των NETs πυροδοτεί αυτή την αντίδραση των αιμοπεταλίων. Η ηπαρίνη, γνωστή αντιπηκτική ουσία που απομακρύνει τις ιστόνες, είναι σε θέση να διαλύσει τα NETs και να απομακρύνει τα αιμοπεταλιακά συσσωματώματα από τα NETs τόσο αποτελεσματικά όσο και η επεξεργασία με DNase³⁷. Αυτό υποδηλώνει ότι όχι τα NETs (δηλ. η ελεύθερη χρωματίνη), αλλά μάλλον οι ενσωματωμένες πρωτεΐνες, όπως οι ιστόνες, μπορούν να προκαλέσουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και την πήξη. Επιπλέον, τα άθικτα NETs συχνά απέτυχαν να προκαλέσουν πήξη ή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in vitro*^{38,39}. Η οργάνωση του DNA στη χρωματίνη, εξουδετερώνοντας το αρνητικό φορτίο, κατήργησε την ικανότητα του DNA να πυροδοτεί την επαγόμενη από τη θρομβίνη πήξη, εξηγώντας ενδεχομένως γιατί τα άθικτα NETs, τα οποία επίσης αποτελούνται από ίνες χρωματίνης, ομοίως αποτυγχάνουν να την προάγουν³⁸. Παρ' όλα αυτά, τα άθικτα φέροντα ιστόνες NETs αποδείχθηκε ότι μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή θρομβίνης τόσο με την ανεξάρτητη από τα αιμοπετάλια ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης FXII και FXI, όσο και με την αιμοπεταλιοεξαρτώμενη απελευθέρωση ανόργανου πολυφωσφορικού άλατος (polyP). Αυτό ενισχύθηκε μετά την αποσυναρμολόγηση των NETs με DNάση, απελευθερώνοντας τις συνδεόμενες με τα NETs ιστόνες και άλλες πρωτεΐνες⁴⁰.

Το πολυP που προέρχεται από τα αιμοπετάλια είναι σε θέση να ενεργοποιήσει την ενδογενή οδό της πήξης με ενεργοποίηση του παράγοντα FXI ,μη εξαρτώμενη από τον παράγοντα FXII⁴¹. Είναι ενδιαφέρον ότι το αιμοπεταλιακό polyP με τη σειρά του ενεργοποίησε επίσης τα ουδετερόφιλα για NETωση σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομο με ανάσπαση ST (STEMI), μέσω αναστολής mTOR και επαγωγή της αυτοφαγίας⁴². Η παρουσία του PolyP συσχετίζεται με την παραγωγή

θρομβίνης στην περιοχή του εμφράγματος⁴² αποδεικνύοντας αλληλεπίδραση μεταξύ της θρομβίνης, των NET, των αιμοπεταλίων και του polyP που οδηγεί στο σχηματισμό θρόμβου. Βεβαίως η προπηκτική ικανότητα των NETs παραμένει ένα σχετικά αμφιλεγόμενο θέμα, διότι οι περισσότερες από τις μελέτες πραγματοποιήθηκαν in vitro και οι παθοφυσιολογικές συνθήκες που διαπιστώνονται στα ζωικά μοντέλα μπορεί να διαφέρουν παρέχοντας αποκλίνοντα αποτελέσματα. (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 : Αλληλεπίδραση μεταξύ των NET και των εμμόρφων συστατικών του αίματος για το σχηματισμό θρόμβωσης (τροποποιημένη από Zhou et al.¹³⁰)

1.5. Το ενδοθήλιο

1.5.α. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου

ως ενορχηστρωτής της στεφανιαίας νόσου

Η στεφανιαία όσος χαρακτηρίζεται από τη «λειτουργική» ή/και από τη «μορφολογική» στένωση των στεφανιαίων αγγείων που οδηγούν σε παρεμπόδιση της ροής του αίματος στον αυλό του αγγείου. «Λειτουργική» στένωση είναι εκείνη που προκαλείται από την σύσπαση των στεφανιαίων αγγείων, εξαιτίας της αύξησης του τόνου τους, καθώς και εκείνη που προκαλείται από την ανάπτυξη θρόμβου στο τοίχωμα των στεφανιαίων αγγείων με αποτέλεσμα τη μερική, παροδική, ή ακόμα και την ολική απόφραξη τους. «Μορφολογική» στένωση είναι εκείνη που προκαλείται από την αλλαγή της μορφής του τοιχώματος των στεφανιαίων αγγείων ως αποτέλεσμα υπερπλασίας, υπερτροφίας ή/και ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας που

οδηγεί στη μερική ή ολική απόφραξη τους. Η λειτουργική και η μορφολογική στένωση συνυπάρχουν, σχεδόν πάντα, στη στεφανιαία νόσο και αλληλοτροφοδοτούνται συνδεδεμένες με πολύπλοκες βιοχημικές διεργασίες (αύξηση τόνου στεφανιαίων αγγείων – ανοσολογική διαδικασία – θρομβογένεση). Ενίοτε ορισμένες από αυτές τις βιοχημικές διεργασίες (π.χ διατήρηση του τόνου των αγγείων) συνιστούν φυσιολογικούς μηχανισμούς λειτουργίας των κυττάρων που αποτελούν το τοίχωμα των στεφανιαίων αγγείων (ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες) ή αντιρροπιστικούς μηχανισμούς και βρίσκονται σε λεπτές ισορροπίες μεταξύ τους, που διαταράσσονται από την παρουσία ορισμένων παραγόντων κινδύνου όπως η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερλιπιδαιμία, το stress και το κάπνισμα.

Κομβικό ρόλο στις πολύπλοκες βιοχημικές διεργασίες που ευθύνονται για τη στένωση των στεφανιαίων αγγείων ενέχει η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, χιτώνα που αποτελεί την εσωτερική στιβάδα του αγγειακού τοιχώματος των στεφανιαίων αγγείων, οριοθετεί τον αυλό τους και έρχεται σε δομική και βιοχημική επαφή με το αίμα. Το ενδοθήλιο αποτελεί κυρίαρχο διαμεσολαβητή διαδικασιών που σχετίζονται με την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας αφενός με την ικανότητα του να παράγει αγγειοδραστικές ουσίες που καθορίζουν τον τόνο των στεφανιαίων αγγείων, καθώς και παράγοντες που ρυθμίζουν την αλλαγή της μορφολογίας των αγγείων με αποτέλεσμα την υπερπλασία και υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων τους, διαδικασία γνωστή ως αγγειακή αναδιαμόρφωση (vascular remodeling) και αφετέρου με την ικανότητα του να ανταποκρίνεται σε βιοχημικά ερεθίσματα που προέρχονται από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα T- λεμφοκύτταρα και τα αιμοπετάλια του αίματος και ελευθερώνονται κατά την έναρξη της φλεγμονώδους διεργασίας, της ανοσολογικής διέγερσης και της θρομβογενετικής πορείας, αντίστοιχα.

1.5.β. Βιοχημικές διαδικασίες που συνδέονται με το ενδοθήλιο και εμπλέκονται στη στεφανιαία νόσο

Πολλές θεωρίες (η υπόθεση απάντησης στη μυοκαρδιακή βλάβη, η υπόθεση της διήθησης με λιπίδια , η λυσοσωματική θεωρία) έχουν διατυπωθεί για τη στεφανιαία νόσο ως αποτέλεσμα ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας στα στεφανιαία αγγεία. Εκ τούτου συνάγεται ότι όλες τους εκφράζουν επιμέρους γεγονότα που συνδέονται άρρηκτα μεταξύ τους και συγκλίνουν στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας.

Η διαδικασία της ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας ξεκινά ως αντιστρεπτή βιοχημική δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων των στεφανιαίων αγγείων, όταν αυτά διατηρούν ακόμα τη δομική ακεραιότητα τους⁴³⁻⁴⁶. Η παρουσία παραγόντων κινδύνου όπως υπέρτασης και σακχαρώδους διαβήτη οδηγεί στη συσσώρευση ROS στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κατ' αυτόν τον τρόπο αφενός αποκαλύπτονται υποδοχείς που μέχρι τούδε βρίσκονταν εν τω βάθει στην λιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και αφετέρου διεγείρονται ποικίλα ενζυμικά συστήματα. Οι κατεχολαμίνες, αυτό-οξειδούμενες στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, ελευθερώνουν ROS που είναι δραστικά οξειδωτικά προϊόντα της ατελούς αναγωγής του οξυγόνου. Οι ROS επιδρούν στην λιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγουν την αποκάλυψη τόσο των υποδοχέων όσο και ενζύμων στον αυλό των στεφανιαίων αγγείων. Ταυτόχρονα αιμοδυναμικές παράμετροι που συνοδεύουν τα υψηλά επίπεδα των κατεχολαμινών στο αίμα διεγείρουν την αποκάλυψη τόσο υποδοχέων όσο και ενζύμων αλλά και ειδικούς διαύλους (κανάλια ασβεστίου τύπου L και αντλίες (αντλία Na^+/H^+) που μεταβάλλουν την διαπερατότητα και το δυναμικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παράλληλα, ποσοστό της γλυκόζης, εισέρχεται με παθητική διάχυση στο εσωτερικό των ενδοθηλιακών κυττάρων όπου μεταβολίζεται από την αλδολάση της αναγωγής σε φρουκτόζη καταναλώνοντας τα αποθέματα του συνενζύμου NADPH που απαιτείται για τη λειτουργία του βασικότερου ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού των ενδοθηλιακών κυττάρων των στεφανιαίων αγγείων, την οξειδάση της ανηγμένης γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ROS. Το υπόλοιπο μέρος της γλυκόζης αυτό-οξειδώνεται με παραγωγή και στην περίπτωση αυτή ROS που προκαλούν αποκάλυψη υποδοχέων στον αυλό των στεφανιαίων αγγείων. Στην αποκάλυψη των υποδοχέων συνεισφέρει και η διόγκωση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τη φρουκτόζη που σχηματίζεται.

Αποτέλεσμα του συνδυασμού της διέγερσης των υποδοχέων αυτών από τους ειδικούς διεγέρτες τους και της δράσης της κινινάσης II, είναι η διέγερση της φωσφολιπάσης C που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το ένζυμο αυτό επιδρά στη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, ένα από τα σημαντικότερα φωσφογλυκολιπίδια που εμπεριέχεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην κυτταρική μεμβράνη, και τη διασπάει σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3) και σε διακυλογλυκερόλη (DAG) που αποτελούν σημαντικούς δευτερογενείς μεταβιβαστές.

Το κεντρικό βιοχημικό γεγονός της συνδυασμένης δράσης τους στο εσωτερικό του ενδοθηλιακού κυττάρου είναι η αύξηση του ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου που σηματοδοτεί την αύξηση της παραγωγής αγγειοδραστικών μορίων, καθώς και τη διέγερση της παραγωγής πρωτεϊνικών μορίων (υποδοχείς, αυξητικοί και χημειοτακτικοί παράγοντες που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν συντίθενται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, Οι ουσίες που παράγονται κατά αυτόν τον τρόπο δρουν τόσο στα ενδοθηλιακά (αυτοκρινής δράση) όσο και στα λεία μυϊκά κύτταρα των στεφανιαίων αγγείων (παρακρινής δράση) και ταυτόχρονα ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων με κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα (μονοκύτταρα / μακροφάγα, T- λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια).

1.5.γ. Φλεγμονώδης διαδικασία στη στεφανιαία νόσο

Στην έναρξη της φλεγμονώδους διαδικασίας⁴⁷⁻⁵⁰ εμπλέκονται κυρίως τα μονοκύτταρα και του ουδετερόφιλα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα αυτά κυκλοφορούν ελεύθερα στον ενδοαγγειακό χώρο. Χημειοτακτικοί παράγοντες που προέρχονται από το διηγεμένο ενδοθήλιο και την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας (CSFs, MCP – 1, ox LDL, TGFβ, IL – 1) προσανατολίζουν την κίνηση των κυττάρων αυτών προς τα σημεία παραγωγής τους. Εκεί, τα μονοκύτταρα, με τη βοήθεια των ίδιων χημειοτακτικών παραγόντων και, κυρίως, δια μέσου ειδικών υποδοχέων της τάξης των γλυκοπρωτεϊνών που επάγονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (MCP – 1, VCAM – 1) καθώς και των μονοκυττάρων από την επίδραση ουσιών που παράγονται από τα ίδια τα μονοκύτταρα (IL – 1) και από τα ουδετερόφιλα (λευκοτριένιο B4, κλάσματα συμπληρώματος) προσκολλώνται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και μετακινούνται δια μέσου των διενδοθηλιακών συνδέσμων (integrins) στον υπενδοθηλιακό χώρο, όπου μετατρέπονται σε μακροφάγα. Με αυτή τη μορφή τους τα κύτταρα αυτά διατηρούν τη ζωτικότητα τους και αποφεύγουν την απόπτωση και τη νέκρωση με την βοήθεια των αυξητικών παραγόντων των κοκκιοκυττάρων (CSFs) που παράγουν τόσο τα ίδια, όσο και όλα τα άλλα κύτταρα. (ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, T – λεμφοκύτταρα). Άλλωστε, οι CSFs συμμετέχουν στην περαιτέρω ενεργοποίηση και στον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν μία τεράστια ποικιλία ρυθμιστών αύξησης (CSFs, EGF, IGF, IGF – 1, bFGF, TGFβ,

PDGF, TGF α) ,λεμφοκινών και κυτοκινών (IL – 1, IFN – γ , TNF α) μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα T – λεμφοκύτταρα. Ταυτόχρονα τα ενεργοποιημένα μακροφάγα προσλαμβάνουν οξειδωμένες LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, δια μέσου μίας βιοχημικής διεργασίας που είναι γνωστή ως «αναπνευστική έκρηξη», λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμά τους και χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου, παράγουν αφενός ROS που με την καταλυτική επίδραση της μυελοϋπεροξειδάσης που ελευθερώνεται ταυτόχρονα, μετατρέπονται σε ισχυρά οξειδωτικά μόρια (υποχλωριώδες οξύ, χλωραμίνες), και αφετέρου πρωτεολυτικά ένζυμα (ελαστίνη, κολλαγενάση).. Επιπρόσθετα, οι υποδοχείς τύπου Toll (TLR) στα λευκοκύτταρα διαμεσολαβούν τη φλεγμονή και τις ανοσολογικές αποκρίσεις⁵¹. Σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομο, τα μονοκύτταρα συσσωρεύονται εντός των θρόμβων και υπερεκφράζουν ειδικά τον TLR-4. Σε συνδυασμό με τα τοπικά πρότυπα έκφρασης χημειοκινών και κυτταροκινών, η αύξηση του TLR-4 αντανάκλα μια συντονισμένη ενεργοποίηση αυτής της φλεγμονώδους οδού στο σημείο της στεφανιαίας απόφραξης στο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα αποβάλλουν NETs που έχουν σημαντική επίδραση στην προσκόλληση των φλεγμονωδών κυττάρων, στην παραγωγή κυτταροκινών, την αποικοδόμηση του γλυκοκάλυκα των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη χημειοταξία. Οι οξειδωτικές ουσίες και τα πρωτεολυτικά ένζυμα επιδρούν στο ενδοθήλιο προκαλώντας τη λύση της συνέχειας του και καταστρέφουν το συνδετικό οστό. Η απώλεια της δομικής ακεραιότητας του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αγγείων σ' αυτό το σημείο της βιοχημικής διαδικασίας της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας, πυροδοτεί τη θρομβογένεση.

1.5.δ. Θρομβογένεση στη στεφανιαία νόσο

Όταν τα στεφανιαία αγγεία είναι φυσιολογικά, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν ελεύθερα με το αίμα στον αυλό τους και δεν προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ουσίες (φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο, θρομβοσπονδίνη) που αποτελούν διεγέρτες των αιμοπεταλίων και παράγονται από τα κύτταρα των στεφανιαίων αγγείων, αποθηκεύονται στον υπενδοθηλιακό χώρο και δεν έρχονται σε επαφή με τα αιμοπετάλια. Αντίθετα, ουσίες [PGI₂, προσταγλανδίνη E (PGE), EDRF, ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (t – PA), διφωσφορική αδενοσίνη (ADP)] που παρε-

μποδίζουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους και παράγονται από τα κύτταρα των στεφανιαίων αγγείων, εκκρίνονται απευθείας στον αγγειακό αυλό. Έτσι, το ακέραιο ενδοθήλιο των στεφανιαίων αγγείων αποτελεί μία κατ' εξοχήν αντιθρομβογενετική επιφάνεια.

Οι σημαντικότερες αιτίες που μπορούν να προκαλέσουν έναρξη της θρομβογένεσης στη στεφανιαία νόσο⁵²⁻⁵⁵, είναι η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου και η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας που έχει αναπτυχθεί στον υπενδοθηλιακό χώρο των στεφανιαίων αγγείων.

Η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αγγείων στη στεφανιαία νόσο προκαλείται, κυρίως, από την επίδραση των μεταλλοπρωτεϊνών, πρωτεολυτικών ενζύμων και των οξειδωτικών ουσιών που παράγονται από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Η διαρκής παρουσία των παραγόντων κινδύνου στη στεφανιαία νόσο, δεν επιτρέπει την επούλωση της λύσης της συνέχειας του ενδοθηλίου από την επίδραση των αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται τόσο από τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όσο και από τα άλλα είδη κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος (λεία μυϊκά κύτταρα) και του αίματος (μακροφάγα) που εμπλέκονται στην παθογένεση της στεφανιαίας νόσου. Σ' αυτό συμβάλλει η μοναδικότητα της ανταπόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων στους ποικίλης προελεύσεως αυξητικούς παράγοντες.

Τα κύτταρα του ενδοθηλίου πολλαπλασιάζονται με την επίδραση των αυξητικών παραγόντων με τρόπο τέτοιο, που επιτρέπει τη διατήρηση της «δομής της μονοστιβάδας». Τα κύτταρα που βρίσκονται στο σημείο λύσης της συνέχειας του ενδοθηλίου βάλλονται από τους συνεχείς πολλαπλασιασμούς που υφίστανται από την επίδραση των αυξητικών παραγόντων, χωρίς να επιτυγχάνουν τη δομική αποκατάσταση του ενδοθηλίου εξαιτίας της διαρκούς παρουσίας των παραγόντων που ευνοούν τη λύση του. Ταυτόχρονα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε απομακρυσμένες θέσεις εκατέρωθεν του σημείου λύσης της συνέχειας του ενδοθηλίου, πολλαπλασιάζονται διατηρώντας τη «δομή της μονοστιβάδας». Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας οφείλεται σε αιμοδυναμικές πιέσεις, στη μετακίνηση κυττάρων με την επίδραση αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων κατά τη διαδικασία αλλαγής της μορφής του αγγείου, ως αποτέλεσμα υπερπλασίας και υπερτροφίας των κυττάρων του και στην επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων προερχομένων από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα του υπενδοθηλιακού χώρου στο συνδετικό ιστό της αθηρωματικής πλάκας. Η επαφή των αιμοπεταλίων με το

συνδετικό ιστό των αγγείων εξαιτίας της λύσης της συνέχειας του ενδοθηλίου ή με το συνδετικό ιστό της αθηρωματικής πλάκας εξαιτίας της διάσπασης της, γίνεται δια μέσου υποδοχέων της μεμβράνης των αιμοπεταλίων (γλυκοπρωτεΐνες Ia, Ib, IIb/IIIa και με ειδικές πρωτεΐνες προσκόλλησης, όπως φιβρονεκτίνη και παράγοντας von Willebrand .Μετά από την επαφή των πρώτων αιμοπεταλίων με το συνδετικό ιστό, νέα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα πρώτα δια μέσου του συμπλέγματος των γλυκοπρωτεϊνών IIb/IIIa, του ινωδογόνου και των ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} , σχηματίζοντας συσσωματώματα. Η προσκόλληση των συσσωματωμάτων των αιμοπεταλίων στο συνδετικό ιστό του υπενδοθηλιακού χώρου (πρωτογενής αιμόσταση) έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους, που εκδηλώνεται με την απελευθέρωση διαφόρων ουσιών από τα ειδικά αποθηκευτικά κυστίδια του κυτταροπλάσματος τους, ως αποτέλεσμα αύξησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου στα κύτταρα αυτά. Από τις ουσίες που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια, άλλες (ADP, TxA_2) προωθούν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, άλλες {ADP,σεροτονίνη (5-HT), TxA_2 } διεγείρουν την παραγωγή αγγειοδραστικών ουσιών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και άλλες αποτελούν αυξητικούς παράγοντες (PDGF, EGF, TGF α , IGF – 1). Άλλωστε, η επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων καταλύει το σχηματισμό θρομβίνης από την ανενεργή, πρόδρομη προθρομβίνη, συναθροίζοντας αποτελεσματικά τους παράγοντες της πήξης που απαρτίζουν το σύμπλεγμα της προθρομβινάσης, στο περιβάλλον του πρωτογενούς αιμοστατικού θρόμβου, όπου, επιπλέον, συναντώνται φωσφολιποειδή και ασβέστιο που ελευθερώνεται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Με αυτή τη διαδικασία σχηματίζεται ινώδες που σταθεροποιεί το θρόμβο από τα συγκολλημένα αιμοπετάλια. Παράλληλα, το ενδοθήλιο περιορίζει την ινωδόλυση παράγοντας ουσίες όπως η πρωτεΐνη C, η αντιθρομβίνη II, η θρομβοδουλίνη και κυρίως ο t - PA. Ο σταθεροποιημένος θρόμβος μπορεί να προκαλέσει μερική, παροδική ή πλήρη απόφραξη των στεφανιαίων αγγείων. Όταν αιτία της δημιουργίας είναι η επιφανειακή διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας (τοιχωματικός θρόμβος), ο σταθεροποιημένος θρόμβος μπορεί να ενσωματωθεί σ' αυτή και να τη διογκώσει συνεισφέροντας με τον τρόπο αυτό στην επιδείνωση της νόσου. Το υπόλειμμα από την επιφανειακή διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας μπορεί ακόμα να προκαλέσει παροδική απόφραξη του αγγείου μετακινούμενο από την ροή του αίματος. Αντίθετα όταν αιτία της δημιουργίας του είναι η βαθιά διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας, ο σταθεροποιημένος θρόμβος είναι συνήθως ευμεγέθης και προκαλεί πλήρη απόφραξη των στεφανιαίων αγγείων. Η θρόμβωση των στεφανιαίων

αρτηριών είναι ο τελικός παθογενετικός μηχανισμός των οξέων ισχαιμικών επεισοδίων, συμπεριλαμβανομένου του εμφράγματος του μυοκαρδίου και του αιφνιδίου θανάτου που αντανακλά τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αθηρωματικής πλάκας, της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, του αγγειόσπασμου και της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

1.6. Φλεβική θρομβοεμβολική νόσος (Φλεβοθρόμβωση):

Αναψηλάφηση της τριάδας του Virchow

Η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος και με τον όρο περιγράφονται συλλήβδην η πνευμονική εμβολή (PE) και η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT) είναι συχνή νοσολογική οντότητα με μείζονες επιπλοκές που συνδέονται με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Η τριάδα του Virchow⁵⁶ χρησιμεύει ως ένα εξαιρετικό πλαίσιο για την κατανόηση των παραγόντων κινδύνου της θρόμβωσης, που είναι η υπερπηκτικότητα, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και η στάση. Πρόσφατα, ωστόσο, προτάθηκε να επεκταθεί αυτή η τριάδα σε τετράδα, λαμβάνοντας υπόψη την πρωταρχική επιρροή του ανοσοποιητικού συστήματος και της απορρύθμισής του στη θρόμβωση⁵⁷

1.6.α. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στη φλεβοθρόμβωση

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να προάγουν την πήξη, με επίδραση στα αιμοπετάλια, στις πρωτεΐνες της πήξης και το ινωδολυτικό σύστημα. Βλάβη στο ενδοθήλιο οδηγεί σε προσκόλληση αιμοπεταλίων στο υπενδοθηλιακώς κείμενο κολλαγόνο. Αυτό διευκολύνεται από τον παράγοντα Willebrand (vWF), προϊόν του φυσιολογικού ενδοθηλίου που βρίσκεται στο πλάσμα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγονται επίσης από κυτοκίνες ή από μικροβιακή ενδοτοξίνη για να εκκρίνουν ιστικό παράγοντα, ο οποίος ενεργοποιεί την εξωγενή οδό της πήξης του αίματος. Με σύνδεση στους ενεργοποιημένους παράγοντες IX και X, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενισχύουν περισσότερο τις καταλυτικές δραστηριότητες των παραγόντων αυτών της πήξης. Τελικά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν αναστολείς του ενεργοποιητού του πλασμογόνου (PAI), οι οποίοι καταστέλλουν την ινωδόλυση. Συνεπώς παρά το ότι το ακέραιο ενδοθήλιο των φλεβών αποτελεί εξαιρετική αντιθρομβωτική επιφάνεια όταν υποστεί βλάβη, μετατρέπεται σε έντονα θρομβογόνο επιφάνεια. Οι ρήξεις του ενδοθηλίου, ανεξάρτητα από το αίτιο ή τους προδιαθεσικούς παράγοντες, οδηγούν στην έκθεση υπενδοθηλιακού κολλαγόνου, την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, την

απελευθέρωση του ιστικού παράγοντα και την τοπική εξάντληση της προστακυκλίνης και του PAI.

1.6.β. Στάση του αίματος

Η στάση του αίματος αποτελεί μείζονα παράγοντα για την ανάπτυξη φλεβικών θρόμβων. Η φυσιολογική ροή του αίματος είναι γραμμική, δηλαδή τα κυτταρικά στοιχεία ρέουν στο κέντρο του αυλού του αγγείου και χωρίζονται από το ενδοθήλιο από ζώνη πλάσματος που ρέει με βραδύτερο ρυθμό. Γι' αυτό το λόγο, η στάση του αίματος διαταράσσει τη γραμμική ροή και φέρει τα αιμοπετάλια σε επαφή με το ενδοθήλιο. Επιπλέον, παρεμποδίζει την αραίωση των ενεργοποιημένων παραγόντων της πήξης από το νέο αίμα. Επίσης, επιβραδύνει την προσκόμιση αναστολέων των παραγόντων της πήξης και επιτρέπει την ανάπτυξη θρόμβων και τέλος, προάγει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και με αυτό τον τρόπο προδιαθέτει σε τοπική θρόμβωση και σε προσκόλληση αιμοπεταλίων.

1.6.γ. Υπερπηκτικότητα

Πρόκειται για κατάσταση που καθορίζεται επακριβώς ως η οποιαδήποτε αλλοίωση των οδών της πήξης του αίματος που προδιαθέτει σε θρόμβωση. Όσον αφορά στους κληρονομικούς παράγοντες κινδύνου, η μετάλλαξη του παράγοντα V (που αναφέρεται ως μετάλλαξη Leiden) είναι εστιακή μετάλλαξη (single – point mutation) του γονιδίου που κωδικοποιεί τον παράγοντα V. Ο παράγοντας αυτός συνδέεται με πενταπλάσια αύξηση της συχνότητας της DVT σε ετεροζυγώτες και με 50πλάσια αύξηση σε ομοζυγώτες. Ο μεταλλαγμένος παράγοντας V εμφανίζει ανθεκτικότητα στην αντιπηκτική επίδραση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, οπότε και παρατηρείται λειτουργική ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C. Οι ασθενείς με πρωτογενείς καταστάσεις υπερπηκτικότητας που σχετίζονται με κληρονομική απουσία φυσικών αντιπηκτικών παραγόντων (π.χ. αντιθρομβίνη III, πρωτεΐνη C ή πρωτεΐνη S), εμφανίζουν συχνά φλεβική θρόμβωση και υποτροπιάζουσα θρομβοεμβολή κατά την εφηβική ηλικία ή την αρχή της ενήλικης ζωής. Πιο αναλυτικά, η ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης III αυξάνει στο 25πλάσιο τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ενώ η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C ή S αυξάνει τον κίνδυνο στο δεκαπλάσιο. Η μετάλλαξη του γονιδίου του παράγοντα II ή προθρομβίνης (G20210A) φαίνεται επίσης ότι διαμορφώνει μια σημαντική πρωτοπαθή υπερπηκτική κατάσταση. Στην περίπτωση

αυτή, επίσης μία άλλη μετάλλαξη ενός γονιδίου (single – gene mutation) είναι σημαντικά συχνότερη σε ασθενείς με ανεξήγητη ή υποτροπιάζουσα DVT. Άλλοι κληρονομικοί προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου είναι τα αυξημένα επίπεδα των παραγόντων VIII και IX και XI και οι διαταραχές της ινωδόλυσης.

1.6.δ. Η επιπρόσθετη συνεισφορά των ουδετεροφίλων στην τριάδα του Virchow

Η φλεβοθρόμβωση θεωρείται ως το αποκορύφωμα της διατάραξης της αυστηρά ρυθμισμένης ισορροπίας των προπηκτικών παραγόντων, των αντιπηκτικών παραγόντων και των ινωδολυτικών μηχανισμών από επίκτητους ή κληρονομικούς παράγοντες κινδύνου. Ωστόσο, η κατανόηση της της θρομβωτικής διαδικασίας άρχισε να εξελίσσεται το 2005, όταν κατεδείχθη ότι τα λευκοκύτταρα στρατολογούνται σε έναν αναπτυσσόμενο θρόμβο συνήθως σε 2-3 λεπτά μετά τον τραυματισμό και αυτό βαίνει αυξανόμενο με την πάροδο του χρόνου. Η γνώση τεκμηριώθηκε όταν απεδείχθη ότι τα ουδετερόφιλα, και όχι τα αιμοπετάλια είναι τα πρώτα κύτταρα που συσσωρεύονται στο σημείο του αγγειακού τραυματισμού μέσω ενός μορίου ενδοκυτταρικής προσκόλλησης-1 (ICAM-1)/λειτουργίας λευκοκυττάρων που σχετίζεται με αντιγόνο-1 (LFA-1). Έτσι, έναν αιώνα αργότερα, ο ρόλος των μονοκυττάρων και των ουδετεροφίλων έχει αποκτήσει ιδιαίτερη δυναμική αφού θεωρούνται ως κύριοι συντελεστές της προθρομβωτικής κατάστασης τόσο στα αρτηριακά όσο και στα φλεβικά θρομβωτικά νοσήματα. Ενώ η παρουσία ουδετεροφίλων στους θρόμβους έχει καταστεί γνωστή από ετών ο ακριβής μηχανικός τους ρόλος στη διαδικασία της σχηματισμού του θρόμβου δεν είχε διερευνηθεί επαρκώς. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πώς οι εξωκυτταρικές παγίδες των ουδετεροφίλων (NETs) και τα μικροσωματίδια που προέρχονται από τα ουδετερόφιλα συμβάλλουν στη θρόμβωση. Η ενεργοποίηση του φλεγμονώματος είναι ένας άλλος μηχανισμός που διευκρινίστηκε τελευταία και πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση της οδού της πήξης. Έχει επίσης προταθεί ⁵⁷ να αναβαθμιστεί η τριάδα του Virchow σε τετράδα, λαμβάνοντας υπόψη την πρωταρχική επιρροή του ανοσοποιητικού συστήματος και της απορρύθμισής του στη θρόμβωση.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η συσχέτιση των ουδετεροφιλικών εξωκυττάρων παγίδων (NETs) με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη θρόμβωση (αρτηριακή και φλεβική) εξετάστηκαν βάσει των ήδη υπαρχουσών, δημοσιευμένων μελετών, μέσω μίας συστηματικής ανασκόπησης. Προκειμένου να εντοπιστούν οι καταλληλότερες για το θέμα έρευνες, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στις έγκυρες βάσεις δεδομένων Pubmed, Scopus και Science Direct, και η αναζήτηση αυτή επετεύχθη μέσω της αξιοποίησης συνδυασμού των συναφών λέξεων – κλειδιών. Τα άρθρα τα οποία εντοπίστηκαν από τη διαδικασία βιβλιογραφικής αναζήτησης αξιολογήθηκαν βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων προκειμένου να διασφαλιστεί εν μέρει η ποιότητα και η ομοιογένεια των επιλεγμένων μελετών .

2.1 Στόχος της ανασκόπησης

Στόχος της παρούσης μελέτης είναι διαμέσου της συστηματικής αναδίφησης της βιβλιογραφίας , να ταυτοποιηθούν και να παρουσιαστούν μελέτες που συσχετίζουν την ύπαρξη NETs με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και προκαλούν κλινικά εκδηλωθείσα θρόμβωση αφορώσα είτε στο αρτηριακό είτε στο φλεβικό σκέλος της κυκλοφορίας.

2.2. Κριτήρια εισόδου / Κριτήρια Αποκλεισμού μελετών

Αφού συγκεντρώθηκαν όλα τα άρθρα βάσει της αναζήτησης με τις κατάλληλες λέξεις – κλειδιά, τα άρθρα αυτά αξιολογήθηκαν ως προς διάφορα χαρακτηριστικά και επελέγησαν προς ανάλυση μόνο εκείνα που πληρούσαν συγκεκριμένα κριτήρια. Αναλυτικότερα, ως κριτήρια εισόδου των μελετών στην παρούσα ανασκόπηση καθορίστηκαν τα ακόλουθα:

- Η γλώσσα γραφής των μελετών θα πρέπει να είναι είτε η αγγλική είτε η ελληνική.
- Οι μελέτες θα πρέπει να έχουν δημοσιευθεί σε έγκυρα, επιστημονικά περιοδικά.
- Οι έρευνες θα πρέπει να έχουν θέμα σχετικό με τη συσχέτιση ουδετεροφιλικών εξωκυττάρων παγίδων με την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και την επαγωγή θρόμβωσης είτε αρτηριακής είτε φλεβικής διαπιστωμένης ως κλινικό συμβάν (

οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ,οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση, πνευμονική εμβολή)

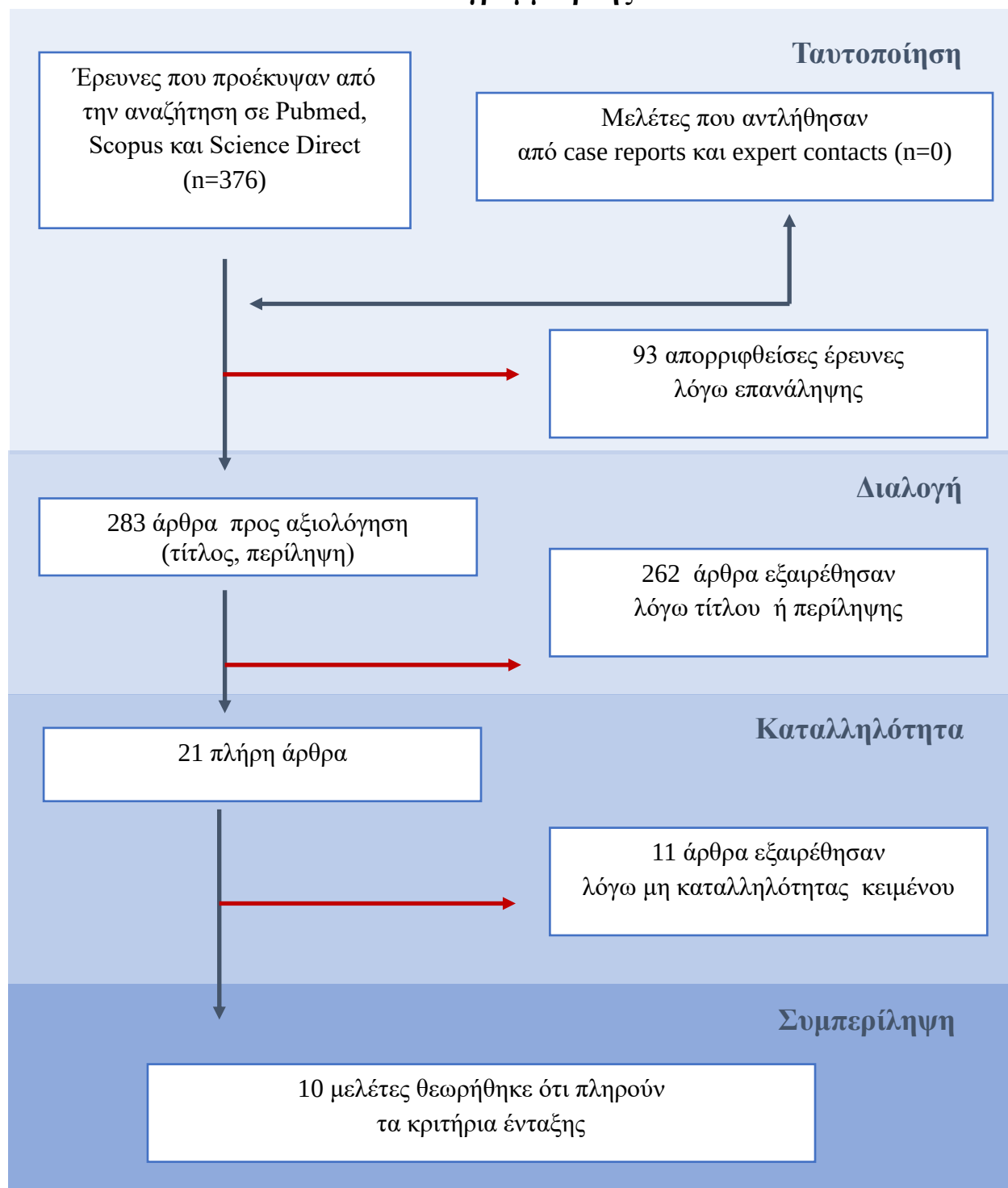
Βάσει των παραπάνω κριτηρίων εισόδου, προσαρμόστηκαν και τα ακόλουθα κριτήρια αποκλεισμού. Βάσει των κριτηρίων αυτών, αποκλείονται οι εξής μελέτες:

- Οι μελέτες που γράφτηκαν σε άλλη γλώσσα εκτός της αγγλικής ή της ελληνικής.
- Οι μελέτες που δεν έχουν δημοσιευθεί σε έγκυρα, επιστημονικά περιοδικά.
- Οι δευτερογενείς έρευνες, και κυρίως οι ανασκοπήσεις και οι μετα-αναλύσεις, καθώς και οι αναφορές περιστατικών.
- Οι έρευνες που έχουν θέμα μη σχετικό με τη συσχέτιση ουδετεροφιλικών εξωκυτταρίων παγίδων και την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και την επαγωγή κλινικά διαπιστούμενης θρόμβωσης

2.3. Στρατηγική Αναζήτησης

Στη στρατηγική αναζήτησης ακολουθήθηκε το κάτωθι διάγραμμα ροής του PRISMA 2020 με σκοπό τη διασφάλιση αξιοπιστίας των ευρημάτων.

Διάγραμμα ροής



Κεφάλαιο 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. 1. Ασθένειες που σχετίζονται με τα NETs

Με εφαλτήριο την έρευνα σε ζωικά μοντέλα και in-vitro πειράματα που παρέχουν όλο και περισσότερες αποδείξεις για τον κεντρικό παθοφυσιολογικό ρόλο των NETs σε πληθώρα ασθενειών, μεταβαίνουμε σταδιακά στην τεκμηρίωση της σημασίας στις θρομβωτικές επιπλοκές στον ανθρώπινο οργανισμό. Υπάρχει ένα αξιοσημείωτο φάσμα καρδιαγγειακών, φλεγμονωδών, αυτοάνοσων, μεταβολικών και λοιμωδών νοσημάτων και ορισμένων σηπτικών καταστάσεων στις οποίες τα NETs θεωρείται ότι συμβάλλουν στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα⁵⁸

Διάφοροι εκλυτικοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί ως επαγωγείς της NETωσης in-vitro, επίσης όμως έχουν επίσης ανιχνευθεί in-vivo πυροδότες του σχηματισμού NETs. Η ποικιλομορφία των NETs επαγωγέων σε διαφορετικές νόσους έχει βελτιώσει την κατανόηση του ρόλου τους στις διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Πίνακας 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1		
Νοσήματα	Εκφάνσεις	Επαγωγείς δημιουργίας NETs
Καρδιαγγειακά	Αθηροσκλήρωση ,Θρόμβωση Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής	IL-8 , oxLDL , HMGB-1 , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Αυτοάνοσα	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος Ρευματοειδής Αρθρίτις Ουρική Αρθρίτις Ελκώδης κολίτις	IFN-α, Ακετυλιωμένες ιστόνες ,L-8, IL-17, IL-23, TNF-α, ANCAs, RNPs, IL-17A, TNF-α Ενισχυμένη παραγωγή ROS
Μεταβολικά	Παχυσαρκία & Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II	Υπεργλυκαιμία , IL-6, IL-8, TNF-α, ομοκυστεΐνη
Νεοπλάσματα	Μεταστατικό Ca μαστού Μεταστατικός ορθοκολικός Ca	G-CSF , IL-8 ,υποξία
Λοιμώδη	Σήψη COVID-19	HMGB-1 , oxLDL ,HMGB-1, υποξία

3.1.α. Τα NETs ως επαγωγείς της αθηροσκλήρωσης

Οι αθηροσκληρωτικές παθήσεις αποτελούν την κυρίαρχη κύρια αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως^{59,60}. Η ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, που ξεκινά με το σχηματισμό λιπιδίων ραβδώσεων και εξελίσσεται σε αθήρωμα και το σχηματισμό πλάκας, βασίζεται σε μια χρόνια φλεγμονώδη διεργασία που καθοδηγείται από τα λιπίδια και στην οποία συμμετέχουν αγγειακά και ανοσοποιητικά κύτταρα⁶¹. Είναι γνωστό ότι η υπερλιπιδαιμία μπορεί να προκαλέσει λευκοκυττάρωση, η οποία αποδείχθηκε ότι συσχετίζεται θετικά με την αθηροσκλήρωση και τις συναφείς με αυτή ασθένειες^{62,63}. Οι πρώτες ενδείξεις για τη σημασία των ουδετεροφίλων στην ανθρώπινη αθηροσκλήρωση προέκυψαν έμμεσα, όταν τα αυξημένα επίπεδα MPO προέβλεπαν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου ανεξάρτητα από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου. Οι υψηλοί αριθμοί των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων ως σημαντική πηγή MPO⁶⁴ συνδέθηκε τόσο με το σχηματισμό και τη βαρύτητα των αθηρωματικών βλαβών όσο και της χρόνιας σταθερής στηθάγχης⁶⁵. Άμεση αξιολόγηση των αθηρωματικών βλαβών αποκάλυψε την παρουσία MPO⁶⁶ και ουδετεροφίλων που παράγουν την προφλεγμονώδη IL-8⁶⁷. Η έκταση της ουδετεροφιλικής διήθησης συσχετίστηκε με προφλεγμονώδη κατάσταση και επιρρεπείς σε ρήξη αθηρωματικές πλάκες⁶⁸. Τα NETs, αποτελούμενα μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού αμυντικού συστήματος του ξενιστή κατά των παθογόνων εισβολέων, δύνανται να απελευθερωθούν ως απόκριση σε μη φλεγμονώδη ερεθίσματα (π.χ. διατμητική τάση, λιπιδικά μόρια, προθρομβωτικοί παράγοντες, συσσωρευμένα αιμοπετάλια ή προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες), όπως συμβαίνει στην πορεία της αθηροσκλήρωσης. Πράγματι, τα NETs έχουν εντοπιστεί στην ενδοτοιχωματική επιφάνεια αρτηριών σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο, όπου συντηρούν τη φλεγμονή μέσω μηχανισμών κυτταρικής προσκόλλησης και προάγουν την κυτταρική δυσλειτουργία και την ιστική βλάβη μέσω της κυτταροτοξικότητας που σχετίζεται με αυτά.

Επιπλέον, τα επίπεδα των υποκατάστατων δεικτών NETωσης dsDNA και χρωματίνη συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με τη βαρύτητα της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης και την εμφάνιση ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών συμβάντων⁶⁹. Τα πειραματικά μοντέλα για τον εντοπισμό μηχανιστικών οδών της αθηροσκλήρωσης συνήθως βασίζονται σε ποντίκια με ανεπάρκεια της Apo E ή του υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, τα οποία σιτίζονται με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά για να αναπτύξουν αθηρωματικές βλάβες. Εκ τούτου

ταυτοποιήθηκε πλειάδα παραγόντων που υποδηλούν τον σχηματισμό και την εξέλιξη των αθηρωμάτων και επιβεβαιώνουν τον σημαντικό ρόλο των ουδετεροφίλων στην ανάπτυξη της πλάκας. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας σε ποντίκια με ανεπάρκεια απολιποπρωτεΐνης E(ApoE-/-) βρέθηκε ότι συσχετίζεται στενά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων ⁷⁰. Η ιντερλευκίνη-1β παίζει κεντρικό ρόλο ως επαγωγέας του σχηματισμού NETs σε αυτό το πλαίσιο: Η κρυσταλλική χοληστερόλη απορροφάται από τα μονοκυτταρικά μακροφάγα και ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη απάντησή τους για την απελευθέρωση κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένης της ιντερλευκίνης-1β. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των Th17 κυττάρων ενισχύει τη στρατολόγηση ανοσοποιητικών κυττάρων και πυροδοτεί NETωση σε περιοχές των αθηρωματικών βλαβών που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη. Δεδομένου ότι οι κρύσταλλοι χοληστερόλης μπορούν επίσης να επάγουν άμεσα τη NETωση, αποδείχθηκε ότι τα στάδια σηματοδότησης της NETωσης, όπως η αναπνευστική έκρηξη ROS και η μετατόπιση της NE στον πυρήνα αποτελούν τον υποκείμενο ενδοκυτταρικό μηχανισμό, όταν τα ουδετερόφιλα του ανθρώπινου αίματος αλληλεπιδρούν με κρυστάλλους χοληστερόλης. Στην ίδια κατεύθυνση ο αναστολέας της NADPH οξειδάσης διφαινυλενοϊωδόνιο ή ο αναστολέας της NE και της πρωτεΐνης 3 εμποδίζουν επιτυχώς τον εξαρτώμενο από τις ROS σχηματισμό NETs και τη μετατόπιση της NE στον πυρήνα που καθοδηγείται από κρυστάλλους χοληστερόλης in-vitro. Έτσι, τα ποντίκια με ανεπάρκεια ApoE/NE/πρωτεΐνης 3 παρουσίασαν περίπου 3πλάσια μείωση του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας σε σύγκριση με τα ποντίκια που είχαν απωλέσει την ApoE. Επιπλέον, η αποικοδόμηση των NETs με επεξεργασία με DNase I σε ApoE-/- ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα 3πλάσια μείωση του μεγέθους της αθηρωματικής βλάβης, αλλά στα ApoE/NE/πρωτεΐνης 3 που στερούνται NETs, το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας δεν επηρεάστηκε από την DNase I. Σε Apo E knockout ποντίκια, τα ουδετερόφιλα που προσκολλήθηκαν στην αθηρωματικές βλάβες της καρωτίδας, απελευθέρωσαν DNA, ενδεικτικό του σχηματισμού NETs. Επιπρόσθετα, η παρουσία των NETs επαληθεύτηκε περαιτέρω σε αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις των ποντικών σε συνδυασμό με την αύξηση των προφλεγμονωδών δεικτών IL-1α, IL-1β και IL-6 ⁷¹. Τα NETs, μέσω των ιστονών, προκάλεσαν λυτικό κυτταρικό θάνατο των λείων μυϊκών κυττάρων στις αθηρωματικές βλάβες, οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση της πλάκας ⁷². Με την ταξινόμηση των πλακών σε ευάλωτες σε ρήξη ή επιρρεπείς σε διάβρωση ⁷³ υποδηλώνεται ότι οι παθογενετικοί μηχανισμοί είναι

εντελώς διαφορετικοί σε αυτές τις δύο οντότητες. Οι ευάλωτες σε ρήξη πλάκες περιέχουν συνήθως πολλά μακροφάγα, φιλοξενούν μεγάλες λιπιδικές δεξαμενές συγκροτούσες έναν ευμεγέθη λιποειδικό πυρήνα, αλλά έχουν χαμηλή περιεκτικότητα διάμεσου κολλαγόνου και λίγα λεία μυϊκά κύτταρα που καλύπτονται από λεπτό ινώδες περίβλημα. Η ρήξη του λεπτού ινώδους περιβλήματος αποτελεί παθογενετικό μηχανισμό περίπου στα δύο τρίτα των στεφανιαίων επεισοδίων ⁷⁴ Αντίθετα, οι διαβρωμένες πλάκες παρουσιάζουν συνήθως παχύ ή ακόμη και άθικτο ινώδες κάλυμμα με ασυνεχές ενδοθηλιακό στρώμα ⁷⁵ Η διήθηση των ουδετεροφίλων φαίνεται να είναι κρίσιμη για τη διάβρωση, όπως προκύπτει από μελέτη με οπτική συνεκτική τομογραφία για τη διαφορική διάκριση μεταξύ ρήξης και διάβρωσης της πλάκας σε οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Από τους 25 ασθενείς που συμπεριελήφθησαν, επτά παρουσίασαν διάβρωση και τα επίπεδα της MPO ήταν εντυπωσιακά αυξημένα σε σύγκριση με τους ασθενείς με ρήξη της πλάκας ⁷⁶ Αξιολόγηση ανθρώπινων δειγμάτων ενδοαρτηρεκτομής κατέδειξε ότι η παρουσία των NETs συσχετίστηκε θετικά με την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων, χαρακτηριστικό γνώρισμα των διαβρωμένων πλακών. Ωστόσο, το φορτίο των NETs δεν διέφερε σε αμφοτέρους τους τύπους της βλάβης, υπογραμμίζοντας τη σημαντική ρυθμιστική λειτουργία των ουδετεροφίλων.

Η υπερλιπιδαιμία οδηγεί σε κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγοντας την εναπόθεση λιπιδίων και τον επακόλουθο σχηματισμό πλάκας, ο οποίος συνιστά την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Δεδομένου ότι τα ουδετερόφιλα συμβάλλουν στην αθηροσκλήρωση προκαλώντας ενδοθηλιακή βλάβη και δρομολογώντας τη στρατολόγηση νέων λευκοκυττάρων στη βλάβη, έχει διερευνηθεί η συμβολή των NETs που εντοπίστηκαν in-vivo σε αθηροσκληρωτικό περιβάλλον στον καρωτιδικό διχασμό ποντικού. Συμπληρωματικά προς αυτό το εύρημα, NETs ανιχνεύθηκαν σε ανθρώπινες πλάκες που ελήφθησαν με ενδοαρτηρεκτομή ^{73,77} Η παρουσία NETs είναι εμφανής κυρίως σε επιφανειακές διαβρώσεις κοντά σε συστάδες αποπτωτικών ενδοθηλιακών κυττάρων σε αντίθεση με τις πλούσιες σε λιπίδια, ευάλωτες πλάκες.

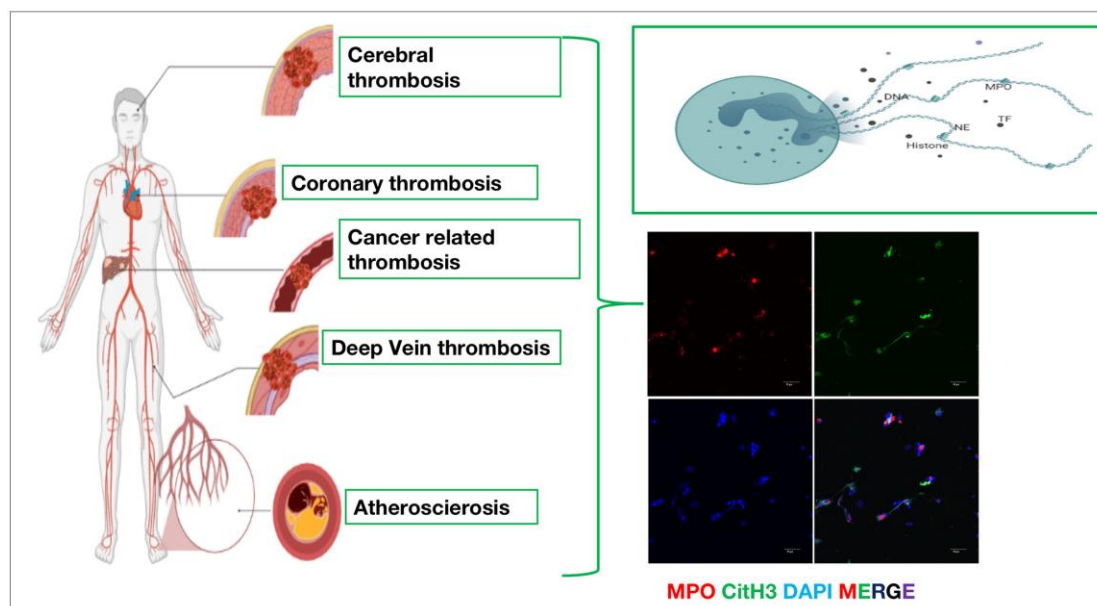
3.1.β. Διαμεσολαβούμενη από τα NETs θρόμβωση

Καρδιαγγειακές παθήσεις, εν μέρει επίσης σχετιζόμενες με την αθηροσκλήρωση, όπως η αρτηριακή θρόμβωση και επίσης η φλεβική θρόμβωση, συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων αιτιών νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως,

σχετίζονται με τα NETs και την αλληλεπίδρασή τους με την ενεργοποίηση των ενδογενών και εξωγενών μονοπατιών πήξης^{18,78} (εικόνα 3). Η επαγόμενη από την υποξία ενδοθηλιακή απελευθέρωση της P-σελεκτίνης και του παράγοντα von Willebrand συμβάλλει στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, με αποτέλεσμα τα απελευθερούμενα NETs να σχηματίζουν ένα ικρίωμα για τη σύνδεση αιμοπεταλίων, ερυθροκυττάρων, ινόδους και παραγόντων πήξης. Τα ουδετερόφιλα επίσης αυξάνουν την παραγωγή θρομβοξάνης A2, η οποία ευοδώνει τις αλληλεπιδράσεις των ουδετεροφίλων με το ενδοθήλιο μέσω της ενισχυμένης έκφρασης του μορίου διακυτταρικής προσκόλλησης 1⁷⁹.

Αυτή η διαδικασία διεγείρει περαιτέρω τη NETωση μέσω αλληλεπιδράσεων με τις ιντεγκρίνες, τις ROS και την πρωτεΐνη B1 της ομάδας υψηλής κινητικότητας⁸⁰. Αφ' ενός, τα NETs συμβάλλουν στη θρόμβωση και την πηκτικότητα ενεργοποιώντας τον παράγοντα πήξης XIIa και κινητοποιώντας τα σωμάτια Weibel-Palade⁸⁰. Αφ' ετέρου, η συνδεδεμένη με τα NETs ελαστάση των ουδετεροφίλων (NE) αποδομεί τον αναστολέα του ιστικού παράγοντα, ισχυρό ανασταλτικό της πήξης, και ενισχύει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ενεργοποιώντας πρωτεολυτικά υποδοχείς στα αιμοπετάλια^{81,82}.

Επιπρόσθετα τα NETs εξουδετερώνουν τις επιδράσεις της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (APC), η οποία αδρανοποιεί τους παράγοντες πήξης Va και VIIIa αλλά μπορεί επίσης να καταστρέψει τις εξωκυτταρικές ιστόνες των NETs^{83,84}. Η επεξεργασία των ουδετεροφίλων με APC πριν από την επαγωγή της NETωσης μειώνει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα NETs⁸⁵. Όσον αφορά στην in-vivo σημασία των επιδράσεων των NETs στην αιμόσταση, η ανεπάρκεια NE σε ποντίκια ή η εφαρμογή αναστολέων NE δεν είχαν σημαντική επίδραση στη NETωση, στο μέγεθος του θρόμβου ή στη συχνότητα της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης και λοιπών περισσότερο επιδραστικών παραγόντων in vivo⁸⁶.



Εικόνα 3: Ο αναδύμενος ρόλος των εξωκυτταρικών παγίδων των ουδετεροφίλων (NETs) στην αθηροσκλήρωση, την αρτηριακή θρόμβωση και την φλεβική θρόμβωση (Zhou et al ¹³⁰)

3.2. Ο ρόλος των NETs στην αρτηριακή θρόμβωση

Ο ρόλος των NETs στην αρτηριακή θρόμβωση μελετήθηκε κυρίως σε δύο κύριες καταστάσεις, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο.

3.2.α. Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

Εκτός από την ίδια την αθηροσκλήρωση, τα ουδετερόφιλα εμπλέκονται καθοριστικά στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, οξεία και απειλητική για τη ζωή νόσο. Τα ουδετερόφιλα αφθονούν τόσο στις ραγείσες όσο και στις διαβρωμένες πλάκες ασθενών που κατέληξαν από έμφραγμα ⁸⁷. Πέραν των δειγμάτων αυτοψίας, η ευρεία χρήση συσκευών αναρρόφησης θρόμβου στο οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου με ανάσπαση ST (STEMI) ⁸⁸ παρέχει τη δυνατότητα της λεπτομερούς εξέτασης των θρόμβων σε μεγάλο αριθμό ασθενών διερευνώντας παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που διέπουν τη στεφανιαία θρόμβωση. Τοιουτοτρόπως απεκαλύφθη ότι τα λευκοκύτταρα αποτελούν κύριο συστατικό των νωπών θρόμβων⁸⁹. Η πλειονότητα των λευκοκυττάρων του θρόμβου ήταν ουδετερόφιλα τα οποία συνενυρίσκοντο με

μεγάλες ποσότητες ενδοθελίνης-1⁹⁰, ισχυρού αγγειοσυσπαστικού και προφλεγμονώδους μεσολαβητού που σχετίζεται με τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας μετά από STEMI ⁹¹. Η συσσώρευση των ουδετεροφίλων στην ένοχη βλάβη συσχετίστηκε με τοπική αύξηση των προθρομβωτικών παραγόντων και του μεγέθους του εμφράγματος⁹². Αυτό επιβεβαιώθηκε από την παρατήρηση ότι ο αριθμός των ουδετεροφίλων στο θρόμβο σχετιζόταν με διαταραχή της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας και μείωση της λειτουργικότητας της αριστεράς κοιλίας κατά την εξάμηνη παρακολούθηση⁹³. Ομοίως, η παρουσία των NETs κατεδείχθη σε θρόμβους της ένοχης βλάβης⁹⁴. Τα NETs ήταν «διακοσμημένα» με προφλεγμονώδη ιντερλευκίνη-17, η οποία οδηγεί στη συσσώρευση ουδετεροφίλων⁹⁵ και είναι σημαντική στην παθογένεια του STEMI⁹⁶. NETs στην ένοχη βλάβη επίσης περιεγράφησαν, επαγόμενα από πρωτεΐνες της ομάδας υψηλής κινητικότητας 1 (HMG box -1), ένα σημαντικό μόριο που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος.

Τα ουδετερόφιλα που απομονώθηκαν από το ένοχο σημείο της βλάβης ήταν πιο επιρρεπή να υποστούν NETωση ex vivo σε σύγκριση με ουδετερόφιλα που συλλέγονται από στεφανιαία αγγεία που δεν σχετίζονται με το έμφραγμα ⁹⁷. Τα NETs έφεραν ιστικό παράγοντα, σημαντικό μεσολαβητή της πήξης. Τα NETs συμβάλλουν επίσης στην ίνωση του μυοκαρδίου οδηγώντας σε αυξημένη ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των ινοβλαστών στην περιοχή της ένοχης βλάβης ⁹⁸.

3.2.β. Οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο

Τα NETs αποδείχθηκε επίσης ότι σχετίζονται με το οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο. Αυξημένες συγκεντρώσεις των NETs στο πλάσμα ταυτοποίησαν τους ασθενείς που είχαν αυξημένο κίνδυνο θνητότητας κατά τη διαμήκη παρακολούθηση μετά από ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ⁹⁹ ενώ τα νουκλεοσώματα συσχετίστηκαν με τη νευρολογική υπολειμματική δυσλειτουργία και το μέγεθος του εμφράκτου ¹⁰⁰.

Η ανοσοϊστολογική ανάλυση δειγμάτων θρομβεκτομής αποκάλυψε μεγάλο αριθμό ουδετεροφίλων θετικών για citH3 ¹⁰¹. Το φορτίο των NETs σε θρόμβους ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου που ανακτήθηκαν μετά από ενδοαγγειακή θεραπευτική προσέγγιση συσχετίστηκε με την πολυπλοκότητα της επέμβασης, μετρούμενης ως διάρκεια της διαδικασίας ¹⁰².

Όσον αφορά στην πρόγνωση και στην έκβαση, οι διαλυτοί δείκτες NETs συσχετίστηκαν με υψηλότερη βαθμολογία NIHSS, δείκτη της σοβαρότητας του

εγκεφαλικού επεισοδίου. Αυξημένη συνολική θνητότητα αναφέρθηκε σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα citH3 που κυμαίνονταν στο ανώτερο τεταρτημόριο¹⁰³. Από μηχανιστική άποψη, σε μοντέλο ποντικού με ισχαιμία/επαναιμάτωση της εγκεφαλικής αρτηρίας αποκαλύφθηκε σημαντική επιδείνωση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από εξωγενή έγχυση ιστονών, αναδεικνύοντας τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των συστατικών των NETs και των καταστροφική τους επίδραση στους αγγειακούς ιστούς¹⁰⁴.

3.2.γ. Ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής χαρακτηρίζεται από διάταση του αγγείου και σχηματισμό πολυστρωματικών ενδοαυλικών θρόμβων¹⁰⁵ ενώ η διαδικασία της αποδόμησης του τοιχώματος της αορτής και η συνεπακόλουθη απώλεια των μηχανικών ιδιοτήτων αυτής αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο ως φλεγμονώδης κατάσταση¹⁰⁶.

Τα ουδετερόφιλα διαλαμβάνουν καθοριστική σημασία, καθώς η εξάντλησή τους με τη χρήση ενός ειδικού, κυτταροτοξικού αντισώματος οδηγεί σε μείωση της πιθανότητας εμφάνισης κοιλιακού αορτικού ανευρύσματος¹⁰⁷. Τα NETs αποδείχθηκε ότι αφθονούν σε υλικό από ενδοαυλικούς θρόμβους της κοιλιακής αορτής¹⁰⁵ και συνεδράζουν με την IL-1β στους θρόμβους αυτούς¹⁰⁸, της IL-1β θεωρουμένης ως προφλεγμονώδους ουσίας που επάγει το σχηματισμό NETs.

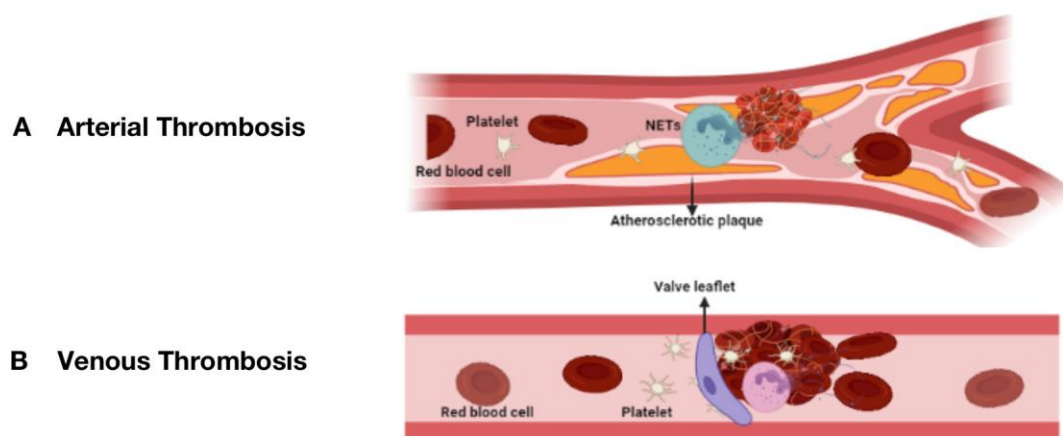
3.3. Ο ρόλος των NETs στη φλεβική θρόμβωση

Η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος εκδηλώνεται είτε ως πνευμονική εμβολή (PE), είτε ως εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση DVT¹⁰⁹. Τα επίπεδα του πυρηνικού DNA αποδείχθηκε ότι είναι αυξημένα στην PE και προβλέπουν ανεξάρτητα τη θνητότητα¹¹⁰. Τα NETs και στο πλαίσιο της φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου φαίνεται πως δεν είναι αθώοι θεατές, αλλά συμβάλλουν στην ουδετερόφιλο-καθοδηγούμενη διαδικασία της και στην επέκταση της φλεβοθρόμβωσης. Σε μοντέλο απολίνωσης της κάτω κοίλης φλέβας σε αρουραίο, τα προφλεγμονώδη ουδετερόφιλα παρατηρήθηκαν στους προκύψαντες θρόμβους και στα τοιχώματα της φλέβας¹¹¹. Στον άνθρωπο οι προφλεγμονώδεις δείκτες ιντερλευκίνη (IL)-6 και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη στο πλάσμα ήταν αυξημένοι στην εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση και

μειώνονταν σταδιακά μετά την έναρξη της νόσου, ενώ η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη προέβλεπε το μεταθρομβωτικό σύνδρομο¹¹².

Ο πιθανός ρόλος των NETs στη φλεβική θρόμβωση αποδείχθηκε από πείραμα, όπου τα NETs παρείχαν ένα ινώδες ικρίωμα για την ινική, τον παράγοντα von Willebrand (vWF) και τα αιμοπετάλια. Στη συνέχεια παρατηρήθηκαν NETs σε θρόμβους από μπαμπούνιους που υποβλήθηκαν σε πειραματική DVT¹¹³. Σε μοντέλο ποντικού με DVT, παρατηρήθηκαν μεγάλες ποσότητες DNA σε θρόμβους, σχηματίζοντας δομές που μοιάζουν με NETs⁸⁰. Οι παρατηρήσεις αυτές συμπληρώθηκαν από απόδειξη ότι τμήματα των θρόμβων ήταν πλούσια στον ειδικό για τη NETωση δείκτη citH3, ο οποίος συνεδράζεται με τον παράγοντα von Willebrand.

Σε DVT τα επίπεδα DNA βρέθηκαν αυξημένα, διαγιγνώσκοντας DVT με ευαισθησία 81%. Επίσης, το DNA του θρόμβου συσχετίστηκε θετικά με τα D-dimer, τη δραστηριότητα του vWF, την κλινική βαθμολογία Wells και την MPO που προέρχεται από τα ουδετερόφιλα¹¹⁴. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν με συγκεντρώσεις των νουκλεοσωμάτων, οι οποίες κατεδείχθησαν αυξημένες σε ασθενείς με DVT και συσχετίστηκαν θετικά με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων¹¹⁵. (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ο μηχανισμός σχηματισμού θρόμβων στην αρτηριακή θρόμβωση (A), τη φλεβική θρόμβωση (B) (τροποποιημένη από Zhou et al¹³⁰)

3.4. NETs και αιμοπετάλια: Παιχνίδια εξουσίας στην επαγωγή ανοσοθρόμβωσης στην COVID-19

Αναφορικά με τη λοίμωξη COVID-19, συγκλίνοντα βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν τα ουδετερόφιλα ως δείκτη σοβαρότητας και εξέλιξης της νόσου και της βαρύτητας της πνευμονικής βλάβης. Βαρέως πάσχοντες ασθενείς με COVID-19 έχουν υψηλότερη αναλογία ουδετεροφίλων προς λεμφοκύτταρα και εμφανίζουν υπερπηκτικότητα¹¹⁶. Τα ουδετερόφιλα προσλαμβάνονται από τους πνεύμονες μετά την είσοδο και τη μόλυνση με τον ιο SARS-CoV-2 και η ουδετεροφιλία είναι ένα σύνηθες εργαστηριακό εύρημα σε ασθενείς με COVID-19¹¹⁷. Η επακόλουθη ανάπτυξη πνευμονίας, ARDS και πολυοργανικής ανεπάρκειας μπορεί να είναι άμεσο αποτέλεσμα διαφόρων λειτουργιών των ουδετεροφίλων ως σημαντικά επιδραστικών παραγόντων στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς, ιδίως μέσω του σχηματισμού NETs. Επιπλέον, οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές κυτοκινών πλάσματος IL-1b, IL-6, IL-7, IL-8, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , PDGF και TNF α σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες¹¹⁸. Συγκεκριμένα, οι IL-1b, IL-8, TNF α και G-CSF αποτελούν NET- επαγωγείς και υψηλότερα επίπεδα αυτών των κυτταροκινών, μπορεί να διεγείρουν τα ουδετερόφιλα να σχηματίζουν ευκολότερα NETs¹¹⁹. Οι ασθενείς με COVID-19 παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα συμπλόκων MPO-DNA, ελεύθερου DNA και H3cit, τα οποία είναι όλα ενδεικτικά του σχηματισμού NETs¹²⁰. Εν παραλλήλω με το σχηματισμό NETs, μικροθρόμβοι, πλούσιοι σε αιμοπετάλια, ινική και κοκκιοκύτταρα, βρέθηκαν στα αγγεία των πνευμόνων, των νεφρών, και της καρδιάς ασθενών με COVID -19¹²¹. Εγκεφαλικοί θρόμβοι από ασθενείς με COVID-19 με απόφραξη μεγάλων αγγείων επί οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, παρουσιάζουν αυξημένη διήθηση από ουδετερόφιλα¹²². Έχει καταδειχθεί ότι τα NETs φέρουν TF¹²³ και διαμεσολαβούν την αυξημένη επίπτωση της ανοσοθρόμβωσης κατά τη λοίμωξη με SARS-CoV-2. Στην ίδια κατεύθυνση τα αιμοπετάλια των ασθενών με COVID-19 αλληλεπιδρούν με τον SARSCoV- 2 μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από το ACE-2 και μετά την επαφή με τον ιό, αυξάνουν την έκκριση των GPVI, CXCL4 και CCL5 in vitro, καθώς και την επιφανειακή έκφραση της P-σελεκτίνης¹²⁴. Έτσι, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται σε μεγάλο βαθμό μετά από επαφή με τον ιό και απελευθερώνουν χημειοκίνες που προάγουν τη διαδικασία της NETωσης. Αντίστοιχα, έχουν ανιχνευθεί υποομάδες αιμοπεταλίων με υψηλότερη αντιδραστικότητα που συμβάλλουν στην ανοσοθρομβωτική διεργασία. Επίσης τα

NETs σε ασθενείς προσβληθέντες από SARS-CoV-2, δύνανται να προκαλέσουν ενεργοποίηση της θρομβίνης μέσω της εγγενούς οδού της πήξης δρώντας στον FXII. Μειωμένη δραστικότητα DNάσης στο πλάσμα αυτών των ασθενών οδηγεί σε μειωμένη κάθαρση των NETs, και αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη ενεργοποίηση του FXII στους πνεύμονες των ασθενών με COVID-19¹²⁵.

Εν τούτοις παραμένει ασαφές, εάν ο σχηματισμός NETs σε COVID-19 προηγείται της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ή αν τα αιμοπετάλια κυριαρχούν στα ανοσοθρομβωτικά δρώμενα και τις ακολουθήσασες επιπλοκές. Φαίνεται αληθοφανές ότι τα ουδετερόφιλα αρχικά με το σχηματισμό NETs ξεκινούν τον επαγόμενο καταρράκτη. Η παρατηρούμενη ουδετεροφιλία, καθώς και η συσχέτιση μεταξύ των δεικτών NETs και της πηκτικότητας δίνουν έρεισμα σε αυτή τη θεωρία.. Ωστόσο, τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν από τον ιό και άλλα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Πιθανόν αμφότεροι οι καταρράκτες να αλληλοανατροφοδοτούνται δεδομένου ότι τόσο τα ουδετερόφιλα όσο και τα αιμοπετάλια αποτελούν κύτταρα φρουρούς του πνευμονικού ιστού.

3.5. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η αιτιολογική συσχέτιση ενός αιτίου με μία νόσο αποδεικνύεται μόνο όταν με την θεραπευτική αντιμετώπιση του αιτίου προκύπτει αναστροφή στην εξελικτική πορεία της νόσου. Επί του παρόντος έχουμε μόνο ενδείξεις κυρίως σε πειραματικό επίπεδο για την θεραπευτική αξία της αναστολής σχηματισμού NETs.

α. Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση της PAD-4 θεωρείται κρίσιμη για την αποτελεσματική εκτύλιξη της χρωματίνης στη διαδικασία της NETωσης, η χορήγηση χλωριούχου αμιδίνης σε πειραματικό μοντέλο απέτρεψε τις θρομβωτικές εμφράξεις¹²⁶. Αυτές οι παρατηρήσεις υπογραμμίζουν μια ορισμένη εξάρτηση της NETωσης από την ενζυμική δραστηριότητα της PAD4 και παρά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα καθιστούν τη φαρμακευτική αναστολή της PAD4, δυνητικό αλλά υποσχόμενο στόχο για τη θεραπεία της ανθρώπινης αθηροσκληρωτικής και θρομβωτικής νόσου.

β. Η δεοξυριβονουκλεάση (DNάση) αποικοδομεί τα NETs με υδρόλυση της ραχοκοκαλιάς του DNA. Έτσι, η επαρκής δραστικότητα της DNάσης προτάθηκε ότι είναι ζωτικής σημασίας για την ομοιοστατική ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού

NETs και της αποικοδόμησης. Η στόχευση της χρωματίνης και των NETs από τη DNάση 1 απεδείχθη ότι είναι ευεργετική στην πειραματική DVT και στο ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο¹²⁶. Λαμβάνοντας υπ'όψιν αυτά τα στοιχεία σχετικά με τα οφέλη της εφαρμογής της DNάσης σε διάφορα μοντέλα ασθενειών, εγείρεται η πιθανότητα θεραπευτικού οφέλους από την DNάση 1.

γ. Ηπαρίνη. Λόγω των αντιπηκτικών τους ιδιοτήτων, η μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη και η μικρού μοριακού βάρους ηπαρίνη συνιστούν από καιρό αναγνωρισμένους θεραπευτικούς ακρογωνιαίους λίθους για την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Δεδομένης της φλεγμονώδους συνιστώσας των θρομβωτικών νόσων, είναι ενδιαφέρον ότι οι ηπαρίνες ενέχουν μια ποικιλία από αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις¹²⁷, οι οποίες φαίνεται να μην σχετίζονται με την αντιπηκτική τους δράση. Επιπλέον, οι ηπαρίνες περιορίζουν τον σχηματισμό NETs, τόσο *in vitro* και *in vivo*¹²⁸ αλλά μπορούν επίσης να στοχεύσουν τα υπάρχοντα NETs με διάφορους τρόπους: η ηπαρίνη αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα της ελαστάσης των ουδετερόφιλων και της καθεψίνης G, σημαντικών ενζυμικών συστατικών των NETs¹²⁹. Δέσμευση και μετατόπιση των ιστονών από την ηπαρίνη προάγει την αποσυναρμολόγηση των NETs, περιορίζοντας τις προθρομβωτικές ιδιότητες. Ταυτόχρονα, η υπερβολική απελευθέρωση των ιστονών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού θανάτου και της NETωσης φαίνεται να εξουδετερώνει την αντιθρομβωτική λειτουργία της ηπαρίνης, εξηγώντας ενδεχομένως τουλάχιστον μερικώς την ανθεκτικότητα στην ηπαρίνη. Κατά συνέπεια, οι θεραπευτικές στοχεύσεις των NETs θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο αντιμετώπισης των θρομβωτικών επιπλοκών τους.

3.6 . Σύνθεση αποτελεσμάτων

Στις συμπεριληφθείσες μελέτες της παρούσας ανασκόπησης καταδεικνύεται θετική συσχέτιση μεταξύ ύπαρξης NETs και κλινικά εμφανούς θρόμβωσης (Πίνακας 2).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 NETs στην κλινικά διαπιστωθείσα αθηροσκλήρωση , την αρτηριακή και τη φλεβική θρόμβωση		
Πληθυσμός	Κύρια ευρήματα	Αναφορά
Ασθενείς με σοβαρή αθηροσκλήρωση (n=282)	Δείκτες νέτωσης αυξημένοι σε ασθενείς με σοβαρή Στεφανιαία Νόσο	69
Ασθενείς με νόσο καρωτίδων υποβληθέντες σε καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή (n=56)	Η διέγερση των TLR2 και ο επαγόμενος σχηματισμός NETs συσχετίστηκε με την ενδοθηλιακή απόπτωση και τη διάβρωση πλακών	73
Ασθενείς με STEMI (N=62)	Τα NETs ήταν παρόντα στους αποφρακτικούς θρόμβους	94
Ασθενείς με STEMI (n=18)	Η αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων από τη θρομβίνη αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα στο σημείο ρήξης της πλάκας κατά τη διάρκεια του οξέος STEMI έχει ως αποτέλεσμα τον τοπικό σχηματισμό NET και τη δημιουργία ενεργού TF	97
Ασθενείς με STEMI (n=50)	Τα NETs σχετίζονται με την ινωτική αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου παρατηρούμενα στην περιοχή της ένοχης βλάβης	98
Ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (n=68)	Η H3Cit, ως σήμα κατατεθέν των NETs ανευρέθη σε όλους τους εγκεφαλικούς θρόμβους. Στόχευση των NETs με την DNA-άση 1 πιθανόν να ενέχει θρομβολυτικό θεραπευτικό όφελος	101
Ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (n=108)	Τα εμπεριεχόμενα στους εγκεφαλικούς θρόμβους NETs ευθύνονται για την αντίσταση στην επαναιμάτωση	102
Ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (n=243)	Τα επίπεδα των NETs σχετίζονται με τη σοβαρότητα του ΑΕΕ μετρούμενη με τη νευρολογική κλίμακα NIHSS .Η CitH3 προβλέπει ανεξάρτητα τη θνητότητα σε 1 έτος παρακολούθησης και είναι πιο αυξημένη σε ηλικιωμένους διαβητικούς με ιστορικό κολπικής μαρμαρυγής	103
Ασθενείς με DVT ((n=47)	Το κυκλοφορούν DNA του πλάσματος είναι αυξημένο σε ασθενείς DVT και συσχετίζεται με τους βιοδείκτες της DVT. Η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του κυκλοφορούντος DNA και της MPO υποδηλώνει ότι τα ουδετερόφιλα μπορεί να αποτελούν πηγή DNA του πλάσματος σε ασθενείς με DVT.	114
Ασθενείς με DVT (n=150)	Τα αυξημένα επίπεδα τόσο των κυκλοφορούντων νουκλεοσωμάτων όσο και των συμπλεγμάτων ελαστάσης-α1-αντιθρυψίνης συσχετίστηκαν με τριπλάσιο κίνδυνο DVT	115

Κεφάλαιο 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεδομένης της δικτυακής δομής των NETs, τούτα παρέχουν το πλαίσιο – ελκυστή για τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και ερυθρών αιμοσφαιρίων ενώ τα συστατικά τους μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τα μηχανισμό πήξης. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που οφείλεται σε διαφορετικές αιμοδυναμικές, οξειδωτικές, βιοχημικές και προφλεγμονώδεις διαταραχές με καταλύτες το κάπνισμα, τη διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων και την υπέρταση, προηγείται της έναρξης της αθηροσκλήρωσης. Σε απόκριση στον ιστικό τραυματισμό, το αμυντικό σύστημα του ξενιστή πυροδοτεί ποικιλία φλεγμονωδών και αιμοστατικών αντιδράσεων, που αποσκοπούν στην αποκατάσταση της ομοιοστατικής ισορροπίας. Μια κατάσταση εμμένουσας ενεργοποίησης και διασταυρούμενης συνομιλίας μεταξύ φλεγμονής και υπερπηκτικότητας μπορεί να οδηγήσει είτε σε επιδείνωση της ιστικής βλάβης (π.χ. εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας) είτε σε θρόμβωση. Στην πραγματικότητα, η χρόνια φλεγμονή και η διαταραχή της πηκτικότητας θεωρούνται αλληλοπεριχωρούντες μηχανισμοί στην παθογένεια τόσο της αθηροσκλήρωσης όσο και της θρόμβωσης. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν καταδείξει ότι η απελευθέρωση των NETs είναι κρίσιμο βήμα στο σχηματισμό φλεβικών θρόμβων και ότι η παρουσία των NETs θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη για το στάδιο οργάνωσης του αναπτυσσόμενου θρόμβου. Μείζον ερώτημα αποτελεί η μεταφορά της έρευνας από το ζωικό πρότυπο στον άνθρωπο, το εάν τα NETs που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και επάγουν μια προπηκτική κατάσταση, συμβάλουν ουσιαστικά στην παθογένεια της θρόμβωσης και εάν εν τέλει η παρουσία τους αυξάνει την κλινική πιθανότητα των θρομβοεμβολικών επιπλοκών.

Σχετικά με την αρτηριακή θρόμβωση, σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα, έχει αποδειχθεί η τοπική συσσώρευση NETs που φέρουν TF στο σημείο της στεφανιαίας θρόμβωσης⁹⁷. Τα ουδετερόφιλα του αίματος που απελευθερώνουν NETs εκθέτοντας TF παρατηρούνται μόνο στην ένοχη για το έμφραγμα αρτηρία ασθενών. Ο εκτιθέμενος στα NETs TF είναι λειτουργικός και ικανός να επάγει τόσο τη δημιουργία θρομβίνης όσο και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με τη μεσολάβηση θρομβίνης. Η ακεραιότητα του ικρίωματος των NETs είναι απαραίτητη για τη λειτουργικότητα του TF. Κατά συνέπεια, η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-πολυμορφοκυττάρων συνεχίζει να παράγει θρομβίνη, διαιωνίζοντας τη θρομβογένεση

μέσω των NETs ακόμη και μετά την αρχική θρόμβωση, οδηγώντας στην επέκταση του θρόμβου.

Η ανοσοθρόμβωση, επίσης αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό της παθοφυσιολογίας του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου¹⁰¹ όπου η θρόμβωση και η φλεγμονή σχηματίζουν έναν βρόχο αμφίδρομης ρύθμισης ο οποίος συμβάλλει στην ισχαιμική βλάβη στον εγκέφαλο. Η citH3 ως ο πιο ειδικός δείκτης για τον έλεγχο της παρουσίας NETs στο πλάσμα και στους θρόμβους, αυξάνει κατά ποσοστό 70% σε ασθενείς με οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ομοίως αυξημένα εμφανίζονται τα επίπεδα cfDNA αλλά και τα νουκλεοσώματα που σχετίζονται με τη σοβαρότητα του εγκεφαλικού επεισοδίου όπως αξιολογείται με τη βαθμονόμηση NIHSS. Δεδομένου ότι τόσο η θρόμβωση όσο και η φλεγμονή θα μπορούσαν να επηρεαστούν από τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς πριν από την έναρξη του οξέος συμβάντος, μελετήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις, με πιο ενδιαφέροντα ευρήματα τη συσχέτιση των δεικτών NETs με την ηλικία, τα επίπεδα γλυκόζης πλάσματος, το ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης και κολπικής μαρμαρυγής. Η γήρανση είναι γνωστό ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εγκεφαλικό επεισόδιο. Υπό αυτό το πρίσμα η citH3 συσχετίστηκε με την ηλικία και ήταν σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς ηλικίας άνω των 65 ετών. Τα υψηλότερα επίπεδα NETs κατά την εγκατάσταση του εγκεφαλικού επεισοδίου προβλέπουν ανεξάρτητα δυσμενέστερη έκβαση εντός του πρώτου έτους.

Τοιουτοτρόπως, τα αυξημένα επίπεδα των κυκλοφορούντων νουκλεοσωμάτων και των δεικτών ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων σχετίζονται με τριπλάσια αύξηση της φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου. Το DNA που προάγει το σχηματισμό ινώδους ενισχύοντας τη δραστηριότητα των παραγόντων τόσο της εξωγενούς όσο και της ενδογενούς οδού της πήξης και οι ιστόνες που ενισχύουν τη δημιουργία θρομβίνης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και επάγουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, κατεδείχθη ότι αυξάνουν σε οξεία DVT και η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC (0,814), υποδηλώνει ότι το αυξημένο DNA πλάσματος μπορεί να προβλέψει την παρουσία DVT^{114, 115}. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συσχετίσεις παρέμειναν παρόμοιες μετά από προσαρμογή για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες.

Η παρούσα ανασκόπηση διαθέτει το πλεονέκτημα ότι εξετάζει την κλινική σημασία της ενεργοποίησης αιμοπεταλίων από τα NETs εστιάζοντας συστηματικά στην επισυμβαίνουσα αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση. Λίγες αναφορές στη βιβλιογραφία διαλαμβάνουν τη μελέτη της συσχέτισης των NETs με την

τεκμηριωμένη κλινικά θρόμβωση. Οι περισσότερες αφορούν αφηγηματικές ή βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις οι οποίες συχνά επικεντρώνονται σε υποσύνολο in vitro μελετών που ενώ η αποτελεσματικότητα τους είναι αναντικατάστατη στην παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης NETs και αιμοπεταλίων, μιας συσχέτισης που εξ ορισμού διαμορφώνεται στο εργαστηριακό πλαίσιο, ενέχουν στοιχεία μεροληψίας. Ωστόσο πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και σοβαροί περιορισμοί της παρούσης ανασκόπησης, όπως το μικρό δείγμα των συμπεριληφθεισών μελετών, η βραχεία και ποικίλλουσα διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών καθώς επίσης και η ετερογένεια του χαρακτήρα της κάθε μελέτης με επικράτηση των αναδρομικών στοιχείων έναντι του προοπτικού σχεδιασμού, που δεν επιτρέπει την ομογενή σύνθεσή τους προς εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Κεφάλαιο 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνιστώντας έναν ενδιαφέροντα ανοσοποιητικό μηχανισμό μετά τον θάνατο των ουδετεροφίλων, ο ρόλος των NETs στις θρομβωτικές νόσους έχει επαληθευτεί σε κλινικά δείγματα και σε πειράματα στο ζωικό πρότυπο. Η παρούσα μελέτη σκιαγράφησε τη συσχέτιση των ουδετεροφιλικών εξωκυττάρων παγίδων με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εστιάζοντας στην κλινική εμφάνιση αρτηριακών και φλεβικών θρομβωτικών νόσων. Η ταυτοποίηση των NETs ή των παρενθέτων δεικτών αυτών παρέχει νέα εργαλεία για την ιατρική ακριβείας ως προς τη διάγνωση και την πρόβλεψη της έκβασης των θρομβοεμβολικών νόσων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των υφιστάμενων μελετών δεν είναι αρραγή και εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη ισχυρότερων πειραματικών αποδείξεων για την πραγματική επίδραση της αναστολής των NETs στην πρόληψη της θρόμβωσης. Αναμφίβολα, μελλοντικές μελέτες θα προάγουν περαιτέρω τις γνώσεις μας σχετικά με τις χωροχρονικές διαδικασίες του σχηματισμού θρόμβων που εκκινούν από τα ουδετερόφιλα και θα αποσαφηνίσουν την κλινική σημασία της αλληλεπίδρασης NETs και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στο πλαίσιο της ανοσοθρόμβωσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134:907–934
2. Ley K, Hoffman HM, Kubes P, et al. (2018) Neutrophils: new insights and open questions. *Sci Immunol* 3. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579>
3. Cowland JB, Borregaard N (2016) Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev* 273:11–28. <https://doi.org/10.1111/imr.12440>
4. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
5. Yipp, B.G.; Kubes, P. (2013) NETosis How vital is it? *Blood* : 122; 2784–2794.
6. Douda, D.N.; Yip, L.; Khan, M.A., et al. (2014) Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. *Blood* :123; 597–600.
7. Remijsen, Q.; Vanden Berghe, T.; Wirawan, E.; et al. (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*: 21; 290–304.
8. Delgado-Rizo, V.; Martínez-Guzmán, M.A.; Iñiguez-Gutierrez, L.; et al . (2017) Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front. Immunol*: 8;81.
9. Papayannopoulos, V.; Metzler, K.D.; Hakkim, A.; Zychlinsky, A. (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Boil*: 191: 677–691.
10. Metzler, K.D.; Goosmann, C.; Lubojemska, A.; et al. (2014) Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep.* : 8;883–896.
11. Wang, J. (2018) Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res*: 371; 531–539.
12. Khan, M.A.; Palaniyar, N.(2017) Transcriptional firing helps to drive NETosis. *Sci. Rep*: 7; 41749.

13. Brinkmann, V.(2018) Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J. Innate Immun*: 10; 414–421.
14. Nomura, K.; Miyashita, T.; Yamamoto, Y.; et al. (2019) Citrullinated Histone H3: Early Biomarker of Neutrophil Extracellular Traps in Septic Liver Damage. *J. Surg. Res* : 234; 132–138.
15. De Bont, C.M.; Koopman, W.J.; Boelens, W.C.; Pruijn, G.J.(2018) Stimulus-dependent chromatin dynamics, citrullination, calcium signalling and ROS production during NET formation. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Bioenerg*: 1865;1621–1629.
16. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozzero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol*. (2006) 133:251–8. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x
17. Lindemann S, Krämer B, Seizer P, Gawaz M. (2007) Platelets, inflammation, and atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 5 (Suppl. 1):203–11. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02517.x
18. Engelmann B, Massberg S. (2013) Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 13:34–45. doi: 10.1038/nri3345
19. Sayit AT, Gunbey PH, Terzi Y. (2015) Is the mean platelet volume in patients with acute cholecystitis an inflammatory marker? *J Clin Diagn Res*. 9:TC05–7. doi: 10.7860/JCDR/2015/12028.6061
20. Menter DG, Kopetz S, Hawk E, et al. (2017) Platelet «first responders» in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 36:199–213. doi: 10.1007/s10555-017-9682-0
21. Thon JN, Italiano JE. (2012) Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*. 210:3–22. doi: 10.1007/978-3-642-29423-5_1
22. Pagel O, Walter E, Jurk K, Zahedi RP. (2017) Taking the stock of granule cargo: platelet releasate proteomics. *Platelets*. 28:119–28. doi: 10.1080/09537104.2016.1254762
23. De Candia E. (2012) Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb Res*. 129:250–6. doi: 10.1016/j.thromres.2011.11.001
24. Hardy AR, Jones ML, Mundell SJ, Poole AW. (2004) Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood*. 104:1745–52. doi: 10.1182/blood-2004-02-0534

25. Randi AM, Laffan MA. (2017) Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *J Thromb Haemost.* 15:13–20. doi: 10.1111/jth.13551
26. Xu XR, Zhang D, Oswald BE, et al.(2016) Platelets are versatile cells: new discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 53:409–30. doi: 10.1080/10408363.2016.1200008
27. Gyobu S, Ishihara K, Suzuki J, et al . (2017) Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114:6274–9. doi: 10.1073/pnas.1703391114
28. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, et al . (2012) Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 12(3):324–33. doi: 10.1016/j.chom.2012.06.011
29. Matsumoto K, Yasuoka H, Yoshimoto K, et al . (2021) Platelet CXCL4 mediates neutrophil extracellular traps formation in ANCA-associated vasculitis. *Sci Rep.* 11(1):222. doi: 10.1038/s41598-020-80685-4
30. Zhan Y, Ling Y, Deng Q, et al.(2022) HMGB1-mediated neutrophil extracellular trap formation exacerbates intestinal Ischemia / Reperfusion-induced acute lung injury. *J Immunol.* 208(4):968–78. doi:10.4049/jimmunol.2100593
31. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al.(2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.*13(4):463–9. doi: 10.1038/nm1565
32. Blair P, Flaumenhaft R.(2009) Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 23(4):177–89. doi: 10.1016/j.blre.2009.04.001
33. Jung CJ, Yeh CY, Hsu RB, et al (2015) Endocarditis pathogen promotes vegetation formation by inducing intravascular neutrophil extracellular traps through activated platelets. *Circulation* 131(6):571-81. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011432
34. Etulain J, Martinod K, Wong SL, et al . (2015) P selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* 126 (2):242–6. doi: 10.1182/blood-2015-01-624023
35. Elaskalani O, Abdol Razak NB, Metharom P. (2018) Neutrophil extracellular traps induce aggregation of washed human platelets independently of

- extracellular DNA and histones. *Cell Commun Signal*.16(1):24. doi: 10.1186/s12964-018-0235-0
36. Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu YB, et al. (2017) In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood* 129 (8):1021–9. doi: 10.1182/blood-2016-06-722298
 37. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(36):15880–5. doi: 10.1073/pnas.1005743107
 38. Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu YB, et al. (2017) In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood* 129 (8):1021–9. doi: 10.1182/blood-2016-06-722298
 39. Letsiou E, Teixeira Alves LG, Felten M, et al. (2021) Neutrophil-derived extracellular vesicles activate platelets after pneumolysin exposure. *Cells* 10(12):3581. doi: 10.3390/cells10123581
 40. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, et al.(2014) Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through plateletdependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(9):1977–84. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304114
 41. Morrissey JH, Choi SH, Smith SA.(2012) Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood* 119 (25):5972–9. doi:10.1182/blood-2012-03-306605
 42. Chrysanthopoulou A, Kambas K, Stakos D , et al. (2017) Interferon lambda1/IL-29 and inorganic polyphosphate are novel regulators of neutrophil-driven thromboinflammation. *J Pathol*. 243(1):111–22. doi:10.1002/path.4935
 43. Kita T., Kume N., Minami M., et al. (2001) Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947:199–205. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03941.x. [
 44. Steinberg D. (1990) Arterial metabolism of lipoproteins in relation to atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 598:125–135. doi: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb42284.x.
 45. Tsimikas S. (2006) Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 8:55–61. doi: 10.1007/s11883-006-0065-1.

46. Kaplan M., Aviram M.(1999) Oxidized low density lipoprotein: Atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. Clin. Chem. Lab. Med. 37:777–787. doi: 10.1515/CCLM.1999.118.
47. Hansson, G.K. (2005) Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. N. Engl. J. Med. 352, 1685–1695.
48. Ruparelia, N.; Choudhury, R.(2020) Inflammation and atherosclerosis: What is on the horizon? Heart 106, 80–85.
49. Libby, P.(2021) Inflammation during the life cycle of the atherosclerotic plaque. Cardiovasc. Res. 117, 2525–2536.
50. Ministrini, S.; Carbone, F.; Montecucco, F. (2021) Updating concepts on atherosclerotic inflammation: From pathophysiology to treatment. Eur. J. Clin. Investig. 51, e13467.
51. Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, et al . (2010) Cellular actors, toll like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. Eur Heart J. 31:1457–1469. doi: 10.1093/eurheartj/ehq084
52. Sambola A, García Del Blanco B, Ruiz-Meana M, et al. (2016) Increased von Willebrand factor, P-selectin and fibrin content in occlusive thrombus resistant to lytic therapy. Thromb Haemost. 115:1129–1137. doi: 10.1160/TH15-12-0985
53. Undas A, Ariëns RA. (2011) Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31:e88–e99. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.230631
54. Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. (2017) Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 37:e13–e21. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.308564
55. Quadros AS, Cambruzzi E, Sebben J, et al . (2012) Red versus white thrombi in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: clinical and angiographic outcomes. Am Heart J. 164:553–560. doi: 10.1016/j.ahj.2012.07.022CrossrefMedlineGoogle Scholar
56. Kumar DR, Hanlin E, Glurich I, et al . (2010) Virchow's contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology. Clin Med Res 8:168–172. <https://doi.org/10.3121/cmr.2009.866>

57. Kapoor S, Opneja A, Nayak L (2018) The role of neutrophils in thrombosis. *Thromb Res* 170:87–96. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.08.005>
58. Mutua, V.; Gershwin, L.J. (2021) A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 61 (2): 194-211
59. Roth, G.A.; Johnson, C.; Abajobir, A.; et al. (2017) Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 1–25.
60. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators (2016) Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388, 1459–1544.
61. Rafieian-Kopaei, M.; Setorki, M.; Doudi, M.; et al . (2014) Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *Int. J. Prev. Med.* 5, 927–946.
62. Friedman, G.D.; Klatsky, A.L.; Siegelaub, A.B. (1974) The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 290, 1275–1278.
63. Giugliano, G.; Brevetti, G.; Lanero, S.; et al . (2010) Leukocyte count in peripheral arterial disease: A simple, reliable, inexpensive approach to cardiovascular risk prediction. *Atherosclerosis* 210, 288–293.
64. Huang ZS, Jeng JS, Wang CH, et al . (2001) Correlations between peripheral differential leukocyte counts and carotid atherosclerosis in non-smokers. *Atherosclerosis* 158:431–436
65. Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Cosin-Sales J ,et al. (2004) Multiple complex stenoses, high neutrophil count and C-reactive protein levels in patients with chronic stable angina. *Atherosclerosis* 175:151–157.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.03.013>
66. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 94:437–444. <https://doi.org/10.1172/jci117342>
67. Marino F, Tozzi M, Schembri L, et al. (2015) Production of IL-8, VEGF and elastase by circulating and intraplaque neutrophils in patients with carotid atherosclerosis. *PLoS One* 10:e0124565.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124565>

68. Ionita MG, van den Borne P, Catanzariti LM, et al .(2010) High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1842–1848. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.110.209296>
69. Borissoff JI, Joosen IA, Versteilen MO, et al. (2013) Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:2032–2040. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.113.301627>
70. Drechsler, M.; Megens, R.T.A.; Zandvoort, M.V.; et al. (2010) Hyperlipidemia-Triggered Neutrophilia Promotes Early Atherosclerosis. *Circulation* 122, 1837–1845.
71. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V (2015) Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349:316–320. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8064>
72. Silvestre-Roig C, Braster Q, Wichapong K, et al . (2019) Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature* 569:236–240. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1167-6>
73. Quillard T, Araujo HA, Franck G, et al . (2015) TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *Eur Heart J* 36:1394–1404. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv044>
74. Prati F, Uemura S, Souteyrand G, et al. (2013) OCT-based diagnosis and management of STEMI associated with intact fibrous cap. *JACC Cardiovasc Imaging* 6:283–287. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2012.12.007>
75. Libby P (2017) Superficial erosion and the precision management of acute coronary syndromes: not one-size-fits-all. *Eur Heart J* 38:801–803. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw599>
76. Ferrante G, Nakano M, Prati F, et al. (2010) High levels of systemic myeloperoxidase are associated with coronary plaque erosion in patients with acute coronary syndromes: a clinic pathological study. *Circulation* 122:2505–2513. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.955302>
77. Megens, R.T.A.; Vijayan, S.; Lievens, D.; et al. (2012) O. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 107, 597–598.

78. Kimball, A.S.; Obi, A.T.; Diaz, J.A.; Henke, P.K. (2016) The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front. Immunol.* 7, 236. [CrossRef]
79. Rossaint, J.; Kuhne, K.; Skupski, J.; et al. (2016) Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response. *Nat. Commun.* 7, 13464.
80. von Bruhl, M.L.; Stark, K.; Steinhart, A.; et al.(2012) Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 819–835.
81. Massberg, S.; Grahl, L.; von Bruehl, M.L ; et al.(2010) Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* 16, 887–896.
82. Sambrano, G.R.; Huang,W.; Faruqi, T.; et al. (2000) Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J. Biol. Chem.* 275, 6819–6823.
83. Griffin, J.H.; Fernandez, J.A.; Gale, A.J.; Mosnier, L.O.(2007) Activated protein C. *J. Thromb. Haemost.* 5 (Suppl. 1), 73–80.
84. Griffin, J.H.; Zlokovic, B.V.; Mosnier, L.O. (2015) Activated protein C: Biased for translation. *Blood* 125, 2898–2907.
85. Healy, L.D.; Puy, C.; Fernandez, J.A.; et al.(2017) Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo. *J. Biol. Chem.* 292, 8616–8629.
86. Martinod, K.;Witsch, T.; Farley, K.; et al .(2016) Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 14, 551–558.
87. Naruko T, Ueda M, Haze K, et al . (2002) Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 106:2894–29
88. Beran G, Lang I, Schreiber W,et al . (2002) Intracoronary thrombectomy with the X-sizer catheter system improves epicardial flow and accelerates ST-segment resolution in patients with acute coronary syndrome: a prospective, randomized, controlled study. *Circulation* 105:2355–2360
89. Rittersma SZ, van der Wal AC, Koch KT, et al . (2005) Plaque instability frequently occurs days or weeks beforeocclusive coronary thrombosis: a pathological thrombectomy study in primary percutaneous coronary

- intervention. *Circulation* 111:1160–1165.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000157141.00778.ac>
90. Adlbrecht C, Bonderman D, Plass C, et al. (2007) Active endothelin is an important vasoconstrictor in acute coronary thrombi. *Thromb Haemost* 97:642–649
 91. Taylor AJ, Bobik A, Richards M, et al. (2004) Myocardial endothelin-1 release and indices of inflammation during angioplasty for acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. *Am Heart J* 148:e10.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2004.03.018>
 92. Distelmaier K, Winter MP, Dragschitz F, et al. (2014) Prognostic value of culprit site neutrophils in acute coronary syndrome. *Eur J Clin Investig* 44:257–265. <https://doi.org/10.1111/eci.12228>
 93. Arakawa K, Yasuda S, Hao H, et al. (2009) Significant association between neutrophil aggregation in aspirated thrombus and myocardial damage in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Circ J* 73:139–144
 94. de Boer OJ, Li X, Teeling P, et al. (2013) Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 109:290–297.
<https://doi.org/10.1160/th12-06-0425>
 95. Liao YH, Xia N, Zhou SF, et al. (2012) Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *J Am Coll Cardiol* 59:420–429.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.10.863>
 96. Mora-Ruiz MD, Blanco-Favela F, Chavez Rueda AK, et al. (2019) Role of interleukin-17 in acute myocardial infarction. *Mol Immunol* 107:71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.01.008>
 97. Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, et al. (2015) Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 36:1405–1414.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv007>
 98. Hofbauer TM, Mangold A, Scherz T, et al. (2019) Neutrophil extracellular traps and fibrocytes in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 114:33. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0740-3>

99. Rainer TH, Wong LK, Lam W, et al. (2003) Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 49:562–569
100. Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P, et al. 2006) Nucleosomes in serum of patients with early cerebral stroke. *Cerebrovasc Dis* 21:32–37. <https://doi.org/10.1159/000089591>
101. Laridan E, Denorme F, Desender L, et al . (2017) Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann Neurol* 82:223–232. <https://doi.org/10.1002/ana.24993>
102. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. (2018) Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke* 49:754–757. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.117.019896>
103. Valles J, Lago A, Santos MT, et al. (2017) Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance. *Thromb Haemost* 117:1919–1929. <https://doi.org/10.1160/th17-02-0130>
104. De Meyer SF, Suidan GL, Fuchs TA, et al . (2012) Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1884–1891. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.112.250993>
105. Delbosc S, Alsac JM, Journe C, et al. (2011) Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One* 6:e18679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018679>
106. Piechota-Polanczyk A, Jozkowicz A, Nowak W, et al . (2015) The abdominal aortic aneurysm and intraluminal thrombus: current concepts of development and treatment. *Front Cardiovasc Med* 2:19. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2015.00019>
107. Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, et al . (2005) Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 112:232–240. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.104.517391>
108. Meher AK, Spinoso M, Davis JP, et al. (2018) Novel role of IL (Interleukin)-1beta in neutrophil extracellular trap formation and abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38:843–853. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.117.309897>
109. Di Nisio M, van Es N, Buller HR (2016) Deep vein thrombosis and pulmonary

- embolism. *Lancet* 388:3060–3073. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30514-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30514-1)
110. Jimenez-Alcazar M, Limacher A, Panda R, et al. (2018) Circulating extracellular DNA is an independent predictor of mortality in elderly patients with venous thromboembolism. *PLoS One* 13: e0191150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191150>
 111. Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, et al. (1995) Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:258–268
 112. Roumen-Klappe EM, den Heijer M, van Uum SH, et al. (2002) Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. *J Vasc Surg* 35:701–706
 113. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176:231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
 114. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, et al. (2013) Plasma DNA is elevated in patients with deep vein thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 1. <https://doi.org/10.1016/j.jvsv.2012.12.002>
 115. van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN, et al. (2013) Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:147–151. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.112.300498>
 116. Petito E, Falcinelli E, Paliani U, et al (2021) Association of neutrophil activation, more than platelet activation, with thrombotic complications in coronavirus disease 2019. *J Infect Dis* 223(6):933–44. doi: 10.1093/infdis/jiaa756
 117. Huang C, Wang Y, Li X, et al. (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395 (10223):497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
 118. Velavan TP, Meyer CG. (2020). Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers. *Int J Infect Dis*. 95:304–7. doi: 10.1016/j.ijid.2020.04.061
 119. An Z, Li J, Yu J, et al. (2019) Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF-κB signaling in macrophages. *Cell Cycle* 18(21):2928–38. doi: 10.1080/15384101.2019.1662678

120. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, et al. (2020) Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* 5(11):e138999. doi: 10.1172/jci.insight.138999
121. Nicolai L, Leunig A, Brambs S, et al.(2020) Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation* 142(12):1176–89. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048488
122. Genchi A, Semerano A, Schwarz G, et al. (2022) Neutrophils predominate the immune signature of cerebral thrombi in COVID-19 stroke patients. *Acta Neuropathol Commun* 10(1):14. doi: 10.1186/s40478-022-01313-y
123. Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, et al.(2020) Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest.* 130 (11):6151–7. doi: 10.1172/JCI141374
124. Shen S, Zhang J, Fang Y, et al.(2021) SARS-CoV-2 interacts with platelets and megakaryocytes via ACE2-independent mechanism. *J Hematol Oncol* 14(1):72. doi: 10.1186/s13045-021-01082-6
125. Englert H, Rangaswamy C, Deppermann C, et al. (2021) Defective NET clearance contributes to sustained FXII activation in COVID-19-associated pulmonary thrombo-inflammation. *EBioMedicine* 67:103382 doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103382
126. Pena-Martinez C, Duran-Laforet V, Garcia-Culebras A, et al. (2019) Pharmacological modulation of neutrophil extracellular traps reverses thrombotic stroke tPA (tissue-type plasminogen activator) resistance. *Stroke* 50:3228–3237. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.119.026848>
127. Mulloy B, Hogwood J, Gray E, et al (2016) Pharmacology of heparin and related drugs. *Pharmacol Rev* 68:76–141. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011247>
128. Manfredi AA, Rovere-Querini P, D'Angelo A, Maugeri N (2017) Low molecular weight heparins prevent the induction of autophagy of activated neutrophils and the formation of neutrophil extracellular traps. *Pharmacol Res* 123:146–156. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.08.008>
129. Folco EJ, Mawson TL, Vromman A, et al. (2018) Neutrophil extracellular traps induce endothelial cell activation and tissue factor production through interleukin-1alpha and cathepsin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38:1901–1912. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.118.311150>

130. Zhou Y, Tao W, Shen F, et al (2021) . The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Arterial, Venous and Cancer-Associated Thrombosis. *Front Cardiovasc Med.* Dec 2;8:786387. doi: 10.3389/fcvm.2021.786387. PMID: 34926629; PMCID: PMC8674622.