

## PREHLADOVÝ ČLÁNOK

# Úloha neutrofilov a neutrofilných extracelulárnych pascí pri renálnych ochoreniach bakteriálneho pôvodu

## *The role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in renal diseases of bacterial origin*

Katarína Krivošíková<sup>1</sup>, Ľubomíra Tóthová<sup>2</sup>, Alexandra Gaál Kovalčíková<sup>1,2</sup>, Ľudmila Podracká<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Detská klinika, Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Národného ústavu detských chorôb, Bratislava

<sup>2</sup>Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

### SÚHRN

**Krivošíková K, Tóthová Ľ, Gaál Kovalčíková A, Podracká Ľ. Úloha neutrofilov a neutrofilných extracelulárnych pascí pri renálnych ochoreniach bakteriálneho pôvodu**

Neutrofilové sú centrálnou zložkou vrodeného imunitného systému. V posledných rokoch si získali značnú pozornosť vďaka novoobjaveným biologickým efektorovým funkciám a ich zapojeniu do rôznych patologických stavov. Neutrofilové predstavujú prvú líniu obrany imunitného systému a pôsobia ako fyzická a chemická bariéra proti patogénom. Aktivované neutrofilové môžu okrem iného uvoľňovať svoj obsah – dekonzenzovaný chromátin spolu s antimikrobiálnymi granulárnymi proteínmi, a vytvárať tak tzv. neutrofilové extracelulárne pasce (neutrophil extracellular traps – NETs). Tvorba NETov sa spúšťa kontaktom s rôznymi prozápalovými stimulmi, vrátane mikroorganizmov, cytokínov, imunitných komplexov a iných. V súčasnosti sú popísané dva základné mechanizmy tvorby NETov. Klasický spôsob je jednou z foriem programovanej bunkovej smrti závislým od NADPH-oxidázy, pričom je najlepšie preskúmaným mechanizmom. Druhý spôsob tvorby NETov charakterizuje rapidná bunková odpoveď na vonkajší stimul, pričom pasca sa uvoľní bez porušenia bunkovej membrány, takže nedochádza k usmrteniu neutrofilu. Zatiaľ čo NETy sú veľmi účinné pri eliminácii patogénov, môžu tiež spôsobiť vážne poškodenie, ak sa uvoľnia v nadmernom množstve alebo ich odstraňovanie nie je efektívne. Cieľom tohto článku je sprostredkovať pohľad na úlohu neutrofilov a spôsob tvorby NETov v závislosti od rôznych stimulov. Tiež sumarizuje súčasné poznatky o úlohe NETov v patofyziológii infekcií močových ciest a hemolyticko-uremického syndrómu indukovaného infekciou *E. coli*.

**Kľúčové slová:** vrodená imunita, poškodenie obličiek, zápal, STEC-HUS, infekcie močových ciest

### SUMMARY

**Krivošíková K, Tóthová Ľ, Gaál Kovalčíková A, Podracká Ľ. The role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in renal diseases of bacterial origin**

Neutrophils are a central component of the innate immune system. In recent years, neutrophils have gained considerable attention due to their newly discovered biological effector functions and their involvement in various pathological conditions. Neutrophils represent the first line of the immune system defense and act as a physical and chemical barrier against pathogens. Activated neutrophils can release contents – decondensed chromatin along with antimicrobial granular proteins creating neutrophil extracellular traps (NETs). The NET formation is triggered by the contact with various pro-inflammatory stimuli, including microorganisms, cytokines, immune complexes, and others. Currently, we know two basic mechanisms of NET formation. The classical way is one of the forms of programmed cell death dependent on NADPH-oxidase; it is the best described mechanism. The second way of NET formation is characterized by a rapid cellular response to an external stimulus, whereby the trap is released without breaking the cell membrane, so that the neutrophil is not killed. While NETs are very effective at eliminating pathogens, they can also cause serious damage if released in excess or removed inefficiently. This review provides a simple and comprehensible view of the role of neutrophils and the mechanism of NET formation depending on various stimuli, and also summarizes the current knowledge on the role of NETs in the pathophysiology of urinary tract infections and hemolytic uremic syndrome induced by *E. coli* infection.

**Key words:** innate immunity, kidney injury, inflammation, STEC-HUS, urinary tract infections

Obrázky publikovány se souhlasem majitele práv, společnosti BioRender Plan.

### Podakovanie

Táto práca bola vypracovaná s finančnou podporou projektom: VEGA č. 1/0212/22 Úloha extracelulárnej DNA a neutrofilových pascí pri infekciách močových ciest a APVV č. APVV-18-0287 Neinvazívne a predsa nevyužívané markery obličkových funkcií: problémy, príčiny a príležitosti.

**Korešpondenčná adresa:**

prof. MUDr. Ľudmila Podracká, CSc.  
 Detská klinika LFUK a NUDCH  
 Limbova 1  
 83340 Bratislava  
 ludmila.podracka@nudch.eu

**ÚVOD**

Neutrofilý sú hlavnými efektormi vrodenej imunitnej odpovede a prvé špecifické bunky, ktoré migrujú do miesta zápalu, rozpoznávajú a zneškodňujú široké spektrum mikrobiálnych patogénov.<sup>(1)</sup> Na sprostredkovanie dôležitých patofyziologických funkcií v organizme využívajú základné mechanizmy zahrňujúce fagocytózu, tvorbu cytokínov, reaktívnych kyslíkových radikálov, degradáciu proteolytickými enzýmami či uvoľňovanie granulovaných antimikrobiálnych peptidov.<sup>(1,2)</sup> Neutrofilý však môžu napádať a eliminovať patogény aj priamo, „vystreľovaním“ neutrofilných extracelulárnych pascí (NETy).<sup>(3)</sup> Presná regulácia formovania NETov je nevyhnutná pre udržanie homeostatickej rovnováhy v tele.

V ostatných rokoch sa výskum upriamuje na neutrofilý a ich význam v patogenéze a progresii mnohých ochorení obličiek.<sup>(4–6)</sup> Imunopatologické mechanizmy nefropatií sú rôznorodé, zahŕňajúce aktiváciu a migráciu imunitných buniek, dysreguláciu zápalových mediátorov, aktiváciu komplementu, ako aj tvorbu autoprotílátok a imunitných komplexov.<sup>(6,7)</sup> Reparačné mechanizmy po imunitne sprostredkovanom poškodení renálneho tkaniva môžu viesť k fibróze a v konečnom dôsledku k poklesu a strate obličkových funkcií.<sup>(8)</sup> V nasledujúcom prehľade bližšie predstavíme unikátnu úlohu neutrofilov pri tvorbe a uvoľňovaní extracelulárnych pascí a ich miesto v patogenéze vybraných ochorení obličiek vyvolaných infekčným agensom.

**VRODENÁ IMUNITA A NEUTROFILY V ODPOVEDI NA BAKTERIÁLNU INFEKCIU**

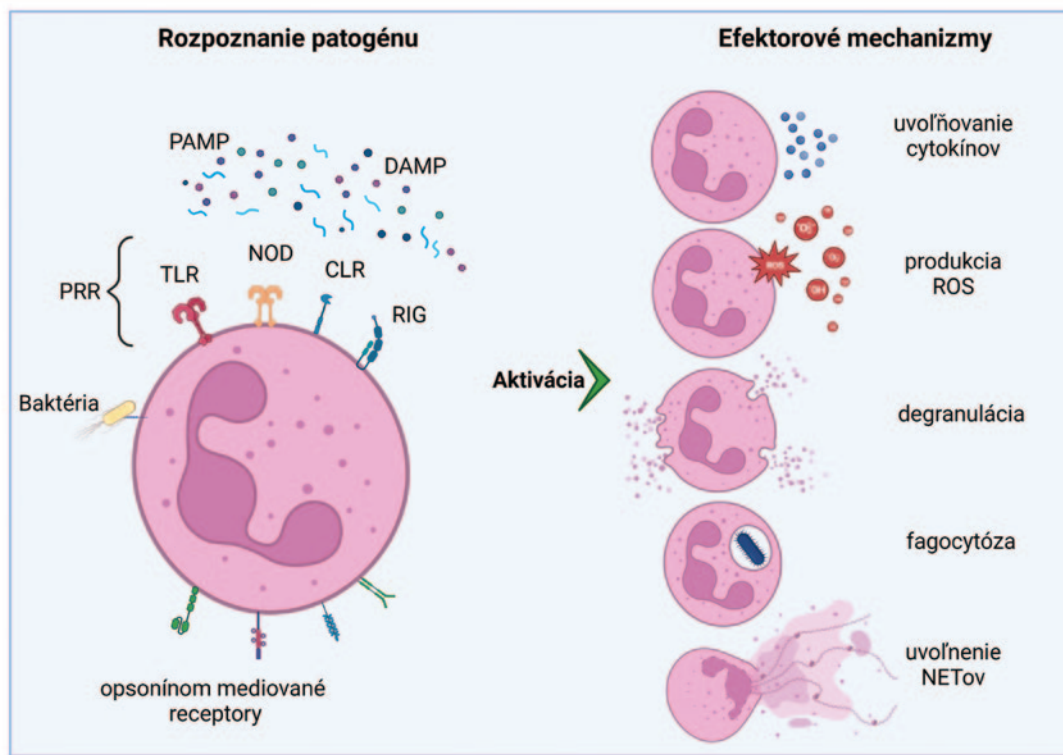
Vrodený imunitný systém sa skladá z mnohých zložiek, ktoré sa spolupodieľajú na antimikrobiálnej obrane. Tieto zložky zahŕňajú fyzikálne bariéry, mukózne sekréty, antimikrobiálne peptidy, v krvi prítomné voľne vylučované antimikrobiálne proteíny, intersticiálnu tekutinu či fagocytujúce leukocyty, vrátane neutrofilov. Vrodená imunitná odpoveď predstavuje prvú líniu obrany proti bakteriálnym infekciám. Dominantnú úlohu pri spustení tejto odpovede má rozpoznávanie infekčného agens mechanizmami vrodenej imunity v kontexte s jedinečnými vlastnosťami mikroorganizmu a hostiteľa.<sup>(9)</sup>

Neutrofilý sú prevládajúcou subpopuláciou cirkulujúcich leukocytov (40–70 %) a pri infekcii sú to prvé bunky imunitného systému v mieste zápalu, kde buď priamo a/alebo prostredníctvom cytokínov a chemokínov modulujú aktivitu ďalších imunitných buniek.<sup>(10)</sup> Počas infekcie alebo pri poškodení tkaniva sa v prostredí nachádzajú s patogénom asociované molekulárne vzory (PAMP) a/alebo s poškodením asociované molekulárne vzory (DAMP), ktoré slúžia ako

ligandy pre receptory rozpoznávania vzorov (PRR) a DAMP receptory neutrofilov. Výsledkom biologickej interakcie je aktivácia rezidentných makrofágov a mastocytov<sup>(11)</sup> a opätovná tvorba zápalových mediátorov, ako sú chemokíny CXCL1 a CXCL2, ktoré stimulujú na povrchu neutrofilov receptory spojené s G-proteínom (GPCR).<sup>(12)</sup> DAMP a PAMP môžu aj priamo aktivovať receptory lokalizované na neutrofiloch, čo vedie k ich ďalšej migrácii do miesta zápalu.<sup>(13)</sup> Neutrofilý disponujú účinnými antimikrobiálnymi „zbraňami“, ktoré zahŕňajú antimikrobiálne peptidy (napr. laktoferín,  $\alpha$ -defenzíny a katelicidín LL-37, tiež známe ako ľudské neutrofilné peptidy), proteolytické enzýmy, cytokíny a reaktívne formy kyslíka (ROS).<sup>(1,14)</sup> Pri antimikrobiálnej ochrane využívajú viaceré mechanizmy: fagocytózou zabíjajú invazívne patogény a bránia ich šíreniu; uvoľňujú toxické proteíny z azurofilných (primárnych) granúl, špecifických (sekundárnych) granúl a želatinázových (terciárnych) granúl; alebo vychytávajú patogény pomocou extracelulárnych pascí, ktorých centrálnou zložkou je DNA (extracelulárna DNA – ecDNA) (obr. 1).

**NEUTROFILNÉ EXTRACELULÁRNE PASCE**

NETy sú sieťovité extracelulárne štruktúry pozostávajúce z dekonenzovaného chromatinu, histónov a antimikrobiálnych látok pochádzajúcich z neutrofilových granúl.<sup>(3)</sup> Molekuly s antimikrobiálnym účinkom sú v týchto štruktúrach výrazne koncentrované, čím napomáhajú eliminácii patogénov a bránia ich šíreniu do okolia. K najvýznamnejším molekulám patrí neutrofilová elastáza, myeloperoxidáza, katelicidín, katepsín G, pentraxín 3, želatináza, proteínáza 3 či proteíny viažuce peptidoglykán.<sup>(14,15)</sup> Po aktivácii neutrofilu dochádza k dekonenzácii chromatinu a tvorbe komplexov s granulárnymi proteínmi, ktoré bunka následne vypudzuje do extracelulárneho priestoru. Hoci boli extracelulárne pasce prvýkrát opísané v neutrofiloch a myslelo sa, že fungujú ako „pasca“ na zabíjanie inváznych mikroorganizmov, najnovšie vedecké práce preukázali, že pasce môžu vytvárať aj iné typy granulocytov.<sup>(16)</sup> Eozinofilné extracelulárne pasce sa podieľajú na ochrane pred parazitmi a plnia úlohu pri alergickej reakcii.<sup>(17)</sup> Bazofily môžu tiež externalizovať chromatín a zabíjať baktérie pri deficite fagocytárnej aktivity.<sup>(18)</sup> Aj mastocyty tvorbou pascí prispievajú k obrane proti niektorým patogénom.<sup>(19)</sup> Extracelulárne pasce môžu tvoriť aj monocyty alebo makrofágy.<sup>(20)</sup> Zdá sa, že tento proces funguje ako alternatívny obranný mechanizmus, ktorý sa aktivuje, pokiaľ nie je dostatočná bunková fagocytárna kapacita.<sup>(21)</sup>



Obr. 1: Neutrofilý – stimulácia, aktivácia, efektorové funkcie

PAMP – s patogénom asociované molekulárne vzory, DAMP – s poškodením asociované molekulárne vzory, PRR – receptory rozpoznávania vzorov, TLR – Toll-like receptory, NOD – receptory pre oligomerizačné domény viažúce nukleotidy, CLR – lektínové receptory typu C, RIG – receptor podobný génu indukovanému kyselinou retinovou, ROS – reaktívne formy kyslíka, NET – neutrofilová extracelulárna pasca

Vyrobené pomocou Biorender.com.

Tvorba NETov sa spúšťa kontaktom s rôznymi prozápalovými stimulmi. Patria sem PAMP molekuly odvodené od bakteriálnych, hubových, vírusových alebo mikrobiálnych patogénov, napr. lipopolysacharid (LPS) alebo N-formylované chemotaktické oligopeptidy. Ďalšiu skupinu tvoria DAMP molekuly zahrňujúce intracelulárne proteíny a proteíny extracelulárnej matrix uvoľnené zo „stresovaných“ alebo umierajúcich buniek.<sup>(22)</sup> Pri tvorbe NETov sa kontaktom PRR receptorov s patogénnymi mikroorganizmami, imunitnými komplexmi, cytokínmi a/alebo mitogénmi, vrátane forbol-12-myristát-13-acetátu (PMA), spúšťajú signálne dráhy aktivovaných proteínkináz (MAPK), ktoré indukujú tvorbu ROS. Následne, peptidyl-arginín-deimináza typu 4 (PAD4) a granulované enzýmy (neutrofilová elastáza a myeloperoxidáza) modifikujú históny a dekondujú chromatin.<sup>(23)</sup> Citrulinizácia enzýmom PAD4 a enzymatická degradácia histónov destabilizuje štruktúru chromatinu, praská jadrová a bunková membrána a dekonduovaný chromatin sa dostáva do extracelulárneho priestoru.<sup>(24)</sup> Tento typ tvorby NETov sa označuje ako „samovražedná NETóza“, ktorú na rozdiel od apoptózy sprevádza respiračné vzplanutie sprostredkované NADPH-oxidázou (NOX).<sup>(25)</sup>

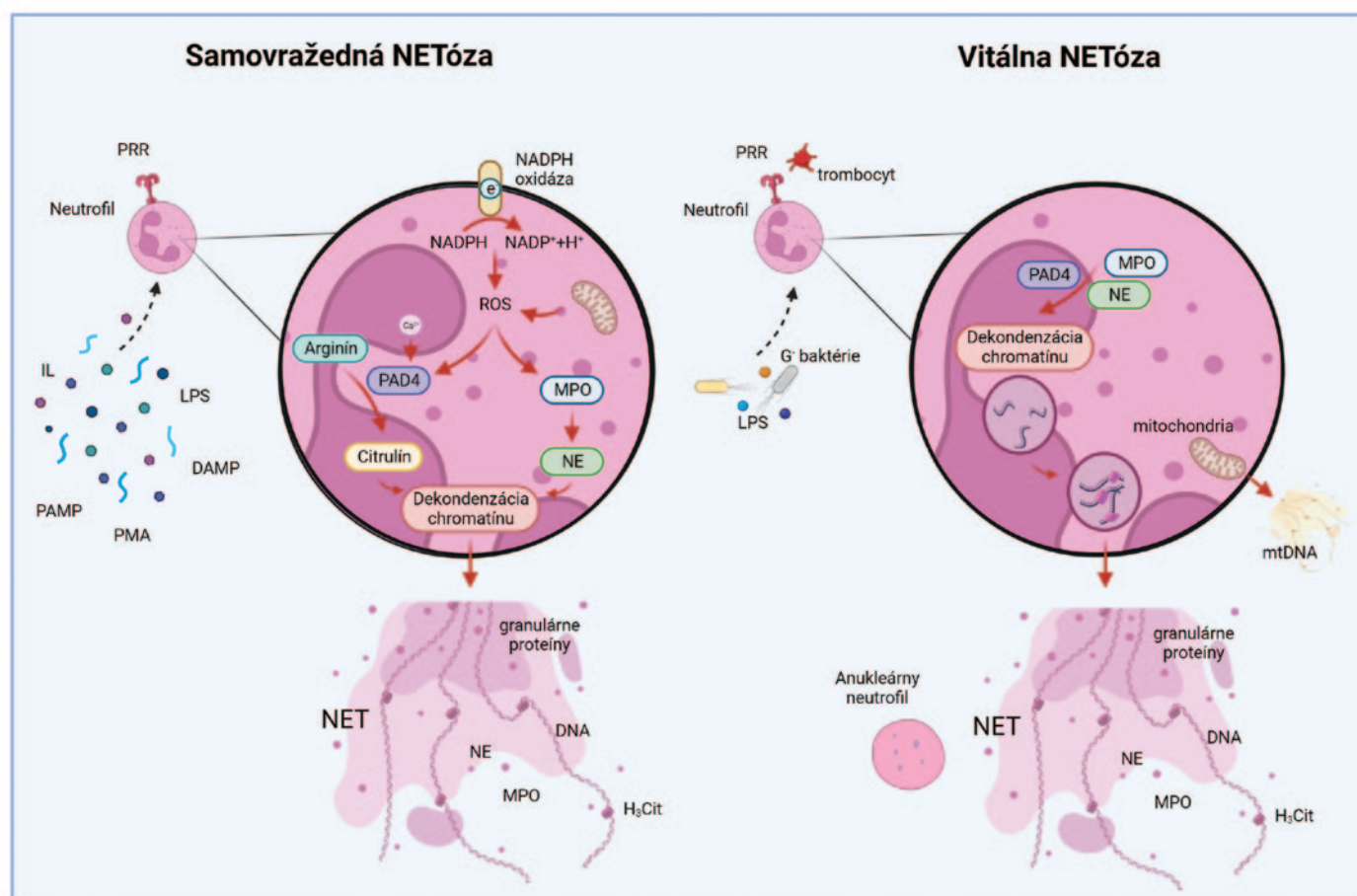
Iný spôsob tvorby NETov tzv. vitálna NETóza je charakterizovaná okamžitou bunkovou odpoveďou na vonkajší stimul. Pri vitálnej NETóze sa z dekonduovaného jadra tvoria vezikuly obsahujúce jadrovú DNA (nDNA), ktoré sa transportujú k bunkovej membráne. Vezikuly sa s bunkovou membránou následne spájajú a vypudujú NETy von z bunky bez porušenia integrity samotného neutrofilu.<sup>(26)</sup> Je pozoruhodné, že v procese vitálnej NETózy sa z neutrofilov stávajú anukleárne cytoplasy, ktoré sú stále pohyblivé a dokážu

vnímať chemotaktické gradienty.<sup>(27)</sup> K vitálnemu spôsobu generovania NETov, ktorý je závislý od ROS, dochádza aj pri aktivácii neutrofilov faktorom stimulujúcim kolónie granulocytov/makrofágov (GM-CSF). V tomto prípade sa po následnom kontakte s LPS alebo s komplementovým faktorom 5a uvoľňujú NETy výlučne odvodené z mitochondriálnej DNA (mtDNA) (obr. 2).<sup>(28)</sup>

Vzhľadom na rozdiely medzi mtDNA a nDNA vo veľkosti a štruktúre môžeme predpokladať, že NETy odvodené z ktoréhokoľvek zdroja sa môžu líšiť vo svojom štruktúrnom zložení, a teda aj vo svojej funkcii. V súčasnosti teda nie je úplne jasné, či a ako tieto rôzne typy NETov koexistujú a aké odlišné funkcie vykonávajú. Je potrebné zdôrazniť, že taktiež stále neexistuje jednotný konsenzus o presnom slede udalostí vedúcich k tvorbe NETov a bunkovej smrti,<sup>(12)</sup> a preto ďalšie štúdium týchto procesov je potrebné. Dôležitú úlohu NETov pri renálnych ochoreniach bakteriálneho pôvodu opísaných v nasledujúcich častiach však podporuje množstvo dôkazov publikovaných rôznymi výskumnými skupinami.

## NETY PRI INFEKCIÁCH MOČOVÝCH CIEST

Infekcie močových ciest (IMC) sa prejavujú nešpecifickými klinickými príznakmi, od asymptomatického priebehu až po febrilný stav s urosepsou. Obavy klinikov vyvoláva najmä tvorba renálnych jaziev, ktoré sa vyvinú u približne 18–22 % detí po prvom ataku IMC a až u 50 % detí s febrilnými alebo opakovanými IMC.<sup>(29–31)</sup> Najčastejším vyvolávateľom je uropatogénna *Escherichia coli* (UPEC), ktorá sa šíri v močovom



Obr. 2: Samovražedná vs. vitálna tvorba NETov

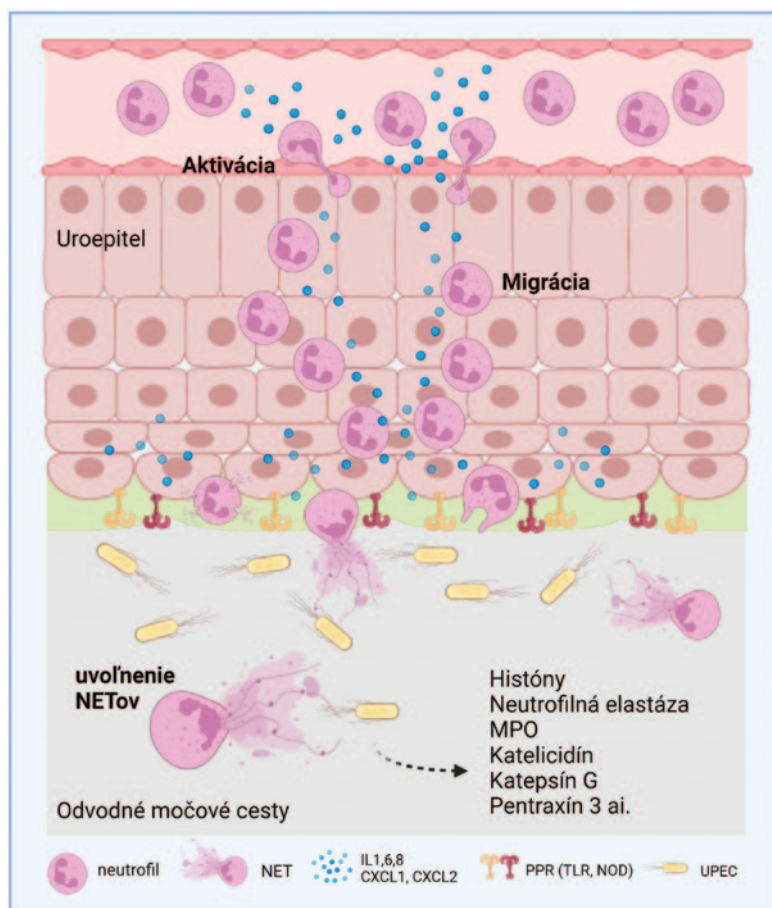
PAMP – s patogénom asociované molekulárne vzory, DAMP – s poškodením asociované molekulárne vzory, PRR – receptory rozpoznávania vzorov, IL – interleukíny, LPS – lipopolysacharid, PMA – forbol-12-myristát-13-acetát, NADPH – nikotinamidadenínindukleotidfosfát, ROS – reaktívne formy kyslíka, PAD4 – peptidyl-arginín-deimináza typu 4, MPO – myeloperoxidáza, NE – neutrofilová elastáza, DNA – deoxyribonukleová kyselina, mtDNA – mitochondriálna DNA, H<sub>2</sub>Cit – citrulinovaný histón, NET – neutrofilová extracelulárna pasca

Vyrobené pomocou Biorender.com.

trakte ascendentne.<sup>(32)</sup> Adhéziou P-fimbrií na glykoreceptory uroepitelu sa aktivujú Toll-like receptory (TLR), najmä TLR4, spúšťa sa imunitná odpoveď,<sup>(33)</sup> uvoľňujú sa transkripčné faktory, vrátane NF-κB a interferónového regulačného faktoru 3 (IRF3), a aktivujú sa neutrofilové cytokíny a chemokíny. Tieto patogenetické mechanizmy zodpovedajú za klinické prejavy IMC.<sup>(34,35)</sup>

Ako sme uviedli vyššie, NETy majú pozitívne účinky pri kontrole a potlačaní bakteriálnych infekcií. Vďaka širokým antimikrobiálnym vlastnostiam dokážu obmedziť rast bakteriálnych kolónií či baktérie eradikovať. Pri febrilných IMC sa v zápalovom tkanive hromadia početné aktivované neutrofilové bunky. Na povrchu infikovaných uroepitelových buniek sa exprimuje receptor viažuci chemokín CXCL8/IL8, ktorý má silné chemoatraktívne vlastnosti a uľahčuje migráciu neutrofilov do tkaniva.<sup>(35)</sup> Z uvedených mechanizmov možno predpokladať, že neutrofilové bunky ako rozhodujúce efektorové bunky vrodenej imunitnej odpovede reagujú na prítomnosť baktérií v močových cestách lokálnou tvorbou NETov (obr. 3). Avšak nedostatočná tvorba NETov alebo

aberrantná NETóza môže viesť k zápalovej a autoimunitnej patológii s poškodením vlastného tkaniva. K takýmto stavom dochádza ako aj pri nadprodukcii NETov, tak aj kvôli porušeniu mechanizmov ich eliminácie (napríklad pri absencii DNázy I).<sup>(36)</sup> V oboch týchto prípadoch môžu NETy slúžiť ako užitočný biomarker zápalu, poškodenia tkaniva a autoimunity, preto je regulácia týchto mechanizmov kľúčová. Moreira a kol. zistili, že chorí s IMC majú vyššie koncentrácie ecDNA v moči ako zdraví jedinci.<sup>(37)</sup> Keďže ďalšie komponenty NETov sa v tejto štúdii nevyšetrovali, pôvod močovej ecDNA sa nedá exaktne potvrdiť. Je pravdepodobné, že časť celkovej ecDNA je bakteriálneho pôvodu. Taktiež obličky prefiltrujú menšie množstvo ecDNA z plazmy do moču, ktoré ale predstavuje len malý zdroj z celkového klirensu ecDNA v systémovom obehu.<sup>(38)</sup> Možno však predpokladať, že infekcia zapríčiňuje nekrozu buniek v močových cestách, z ktorých sa uvoľňuje DNA do moču. Ďalším zdrojom môže byť aktívne vylúčená DNA z neutrofilov stimulovaných infekciou, čo podporuje koreláciu medzi koncentráciou ecDNA a počtom neutrofilov



Obr. 3: Tvorba NETov ako odpoveď na infekciu močových ciest

NET – neutrofilová extracelulárna pasca, IL – interleukín, PRR – receptory rozpoznávania vzorov, TLR – Toll like receptory, NOD – receptory pre oligomerizačné domény viažuce nukleotidy, UPEC – uropatogénna *Escherichia coli*

Vyrobené pomocou Biorender.com.

v moči.<sup>(37)</sup> Zaujímavé je, že až o dekádu neskôr sa v detailne dizajnovanej štúdií dokázala tvorba NETov ako odpoveď na IMC.<sup>(39)</sup> Vo vzorkách moču sa detegovali fragmenty DNA a proteóm obohatený o históny a obsah azurofilných granúl, ktoré kvalitatívnym zložením korešpondovali s *in vitro* vytvorenými NETmi. Prostredníctvom imunofluorescenčnej mikroskopie bola potvrdená prítomnosť neutrofilov s dekonenzovaným chromatinom, zvyšky granúl na periférii bunky, myeloperoxidáza a ecDNA. Jadrovým farbením boli identifikované v týchto štruktúrach usmrtené bakteriálne bunky.<sup>(40)</sup> Aj v našej klinickej štúdií sme zistili signifikantne vyššie koncentrácie ecDNA v moči u detí s IMC oproti zdravým deťom, ktoré pozitívne korelovali so stupňom zápalu a leukocytúriou.<sup>(41)</sup> Navyše, koncentrácie ecDNA korelovali so stanovenými nadmernými koncentraciami myeloperoxidázy a katelicidínu v moči, ktoré tvoria štrukturálne zložky NETov.<sup>(41)</sup> Súčasťou štúdie bol aj animálny experiment s využitím PAD4 deficientných myši, u ktorých sme fluorescenčnou mikroskopiou potvrdili zníženú schopnosť tvorby NETov *in vitro*. Zároveň tieto myši mali vyššiu nálož baktérií v obličkovom tkanive, čo naznačuje, že tvorba NETov neprebíha len v dôsledku IMC, ale môže byť priamo zapojená do patomechanizmu IMC.<sup>(41)</sup>

Štúdium tvorby NETov a ich významu pri infekciách močových ciest je v súčasnosti len na začiatku a poskytuje priestor pre ďalší výskum a potenciálne klinické možnosti

jeho využitia. Doteraz publikované štúdie boli zamerané na sledovanie produkcie NETov, resp. ich jednotlivých zložiek v moči. Chýbajú ale štúdie, ktoré by sa bližšie zaoberali týmito procesmi v postihnutých tkanivách aj na molekulárnej úrovni a ich dopadom na celý organizmus. Lepšie pochopenie aktivácie a regulácie tvorby NETov, signálnych dráh či toxicity NETov prinesie dokonalejší obraz o chorobných procesoch a obranných mechanizmoch v obličkách a močových cestách. V konečnom dôsledku by toto pochopenie mohlo pomôcť vývoju nových možností terapeutickú intervencie, využitiu jednotlivých komponentov NETov ako neinvazívnych biomarkerov IMC či vytvoreniu stratégií manažmentu týchto infekcií.

## NETY PRI HEMOLYTICKO-UREMICKOM SYNDRÓME

Infekcia Shiga toxín (Stx) produkujúcou *Escherichia coli* predstavuje najčastejšiu príčinu „typického“ hemolyticko-uremického syndrómu (STEC-HUS), ktorý patrí do etiopatogeneticky heterogénnej skupiny trombotických mikroangiopatií.<sup>(42)</sup> Charakterizovaný je trombocytopéniou, imunitne nepodmiernenou hemolytickou anémiou a akútnym poškodením obličiek.<sup>(43)</sup> Stx, hlavný patogénny faktor STEC, tvorí jedna podjednotka A, ktorá má aktivitu N-glykozidázy na 28S ribozomálnej RNA. Vďaka tomu dochádza

k inhibícii syntézy proteínov v eukaryotických bunkách. Toxín tvorí aj 5 podjednotiek B (pentamér), ktoré sa viažu na globotriaolylceramid na povrchu hostiteľských buniek.<sup>(44)</sup> Stx po uvoľnení z baktérií v čreve vstupuje do krvného obehu a napáda endotel v kapilárach glomerulov. Viaceré štúdie preukázali, že interakcia Stx s neutrofilmi vedie k ich aktivácii s lokálnou zápalovou reakciou a poškodením endotelu.<sup>(44–47)</sup> Navyše, Stx priamo stimuluje neutrofile k tvorbe ROS a rôznych aktivačných látok, vedie k degranulácii, ale aj k uvoľňovaniu NETov, čím prispieva k amplifikácii mikrovaskulárneho poškodenia v obličkách.<sup>(47,48)</sup>

Klinické štúdie zistili, že pacienti so STEC-HUS majú v porovnaní so zdravými jedincami vyššie plazmatické koncentrácie cirkulujúcej ecDNA a nukleozómov. Neutrofile týchto pacientov sú náchylnejšie na spontánne uvoľnenie NETov.<sup>(47)</sup> Tiež sa zistilo, že aj nedostatočná degradácia NETov a ich pretrvávanie v milieue môže prispievať k ďalšiemu poškodeniu obličiek v dôsledku protrombotických vlastností NETov.<sup>(49)</sup> NETy stimulujú tvorbu protrombotického tkanivového faktora, ktorý aktivuje koaguláciu a môže slúžiť ako „sieť“ na zachytávanie krvných doštičiek.<sup>(50)</sup> Okrem toho, NETy aktivujú komplement a prostredníctvom Stx indukujú vychytávanie C3b v glomeruloch a na krvných doštičkách, čo podporuje mikrovaskulárnu trombózu a ďalšie poškodenie obličiek.<sup>(51–53)</sup> Poškodenie endotelu s tvorbou mikrotrombov (mikroangiopatia) je hlavnou príčinou zlyhania obličiek u pacientov so STEC-HUS.<sup>(54)</sup> V nedávnej experimentálnej štúdii na myšacom modeli HUS sa znížil stupeň endotelovej dysfunkcie, keď sa narušila tvorba NETov alebo sa vyčerpali krvné doštičky z okolitého tkaniva.<sup>(55)</sup> To naznačuje, že tvorbu NETov pri STEC-HUS podporujú okrem Stx aj trombocyty, a tak významne prispievajú k endotelovej „toxícite“. Uvedené výsledky po prvýkrát zdokumentovali kľúčovú úlohu trombocytov ako modulátorov poškodenia endotelu prostredníctvom tvorby NETov v reakcii na Stx.

Tieto závery prinášajú nový pohľad na potenciálnu liečbu cieleňú na zníženie tvorby NETov, a tým zmiernenie poškodenia endotelu pri HUS.

## ZÁVER

NETy sú sieťovité štruktúry s vysokou lokálnou koncentráciou veľmi aktívnych antimikrobiálnych molekúl. Silná intermolekulárna väzba zabraňuje jednotlivým zložkám prestupovať do okolitého prostredia, čím sa obmedzuje poškodenie tkaniva. Ak však nie je množstvo a miesto tvorby NETov, ako aj ich včasné odstránenie prísne kontrolované, môže prevaha NETov spôsobiť vážne následky a indukovať mnohé patofyziologické procesy. Spôsoby tvorby NETov sa intenzívne študujú, avšak mnohé otázky týkajúce sa týchto mechanizmov a fyziologickej úlohy pasci zostávajú otvorené. V prvom rade ide o signalizačné mechanizmy iniciácie tvorby NETov. Nie je jednoznačne definované, na základe akých podmienok dochádza k stimulácii jednotlivých procesov tvorby NETov; a tiež procesy vedúce k modifikácii a dekonenzácii chromatinu zostávajú nejasné. Preto je dôležité lepšie porozumieť rôznym signálnym dráham zúčastňujúcim sa na tvorbe NETov a mechanizmu ich účinku pri rôznych patologických stavoch, napr. ochorenia obličiek, a hľadať potenciálne nástroje na intervenciu. Medzi také dnes už napríklad patrí rekombinantná DNáza 1, ktorou možno znížovať viskozitu hlienu pri cystickej fibróze a zlepšovať funkciu pľúc.<sup>(56)</sup> Inhibitory NE sa zase používajú pri chronickej obštrukčnej chorobe pľúc.<sup>(57,58)</sup> PAD4 je nadmerne exprimovaná pri väčšine onkologických ochorení,<sup>(59)</sup> pričom inhibitory tohto enzýmu by mohli zlepšiť klinický výsledok. Detailné pochopenie molekúl indukujúcich tvorbu NETov a mechanizmov ich degradácie môže úspešne modifikovať pozitívny ako aj patogénny potenciál NETov. |

## LITERATÚRA

1. Burn GL, Foti A, Marsman G, et al. The Neutrophil. *Immunity* 2021; 54: 1377–1391.
2. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe* 2014; 15: 526–536.
3. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532–1535.
4. Salazar-Gonzalez H, Zepeda-Hernandez A, Melo Z, et al. Neutrophil extracellular traps in the establishment and progression of renal diseases. *Medicina* 2019; 55: 431.
5. Sepe V, Libetta C, Gregorini M, Rampino T. The innate immune system in human kidney inflammation. *J Nephrol* 2022; 35: 381–395.
6. Tecklenborg J, Clayton D, Siebert S, Coley SM. The role of the immune system in kidney disease. *Clin Exp Immunol* 2018; 192: 142–150.
7. Mastroianni-Kirsztajn G, Hornig N, Schlumberger W. Autoantibodies in renal diseases - clinical significance and recent developments in serological detection. *Front Immunol* 2015; 6: 221.
8. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10: 493–503.
9. Kubelkova K, Macela A. Innate immune recognition: an issue more complex than expected. *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 9: 241.
10. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014; 15: 602–611.
11. Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR. Neutrophils and bacterial immune evasion. *J Innate Immun* 2018; 10: 432–441.
12. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 159–175.
13. Pittman K, Kubes P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J Innate Immun* 2013; 5: 315–323.
14. Dömer D, Walther T, Möller S, et al. Neutrophil extracellular traps activate proinflammatory functions of human neutrophils. *Front Immunol* 2021; 12: 636954.
15. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Front Immunol* 2017; 8: 81.
16. Vorobjeva NV. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Moscow Univ Biol Sci Bull* 2020; 75: 173–188.
17. Ueki S, Konno Y, Takeda M, et al. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137: 258–267.
18. Yousefi S, Morshed M, Amini P, et al. Basophils exhibit antibacterial activity through extracellular trap formation. *Allergy* 2015; 70: 1184–1188.
19. von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 2008; 111: 3070–3080.

20. Li L, Li X, Li G, et al. Mouse macrophages capture and kill *Giardia lamblia* by means of releasing extracellular trap. *Dev Comp Immunol* 2018; 88: 206–212.
21. Rawat S, Vratl S, Banerjee A. Neutrophils at the crossroads of acute viral infections and severity. *Mol Aspects Med* 2021; 81: 100996.
22. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–820.
23. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 134–147.
24. Neubert E, Meyer D, Rocca F, et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun* 2018; 9: 3767.
25. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231–241.
26. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2010; 185: 7413–7425.
27. Yipp BG, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 2012; 18: 1386–1393.
28. Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009; 16: 1438–1444.
29. Bandari B, Sindgikar SP, Kumar SS, et al. Renal scarring following urinary tract infections in children. *Sudan J Paediatr* 2019; 19: 25–30.
30. Shaikh N, Ewing AL, Bhatnagar S, Hoberman A. Risk of renal scarring in children with a first urinary tract infection: a systematic review. *Pediatrics* 2010; 126: 1084–1091.
31. Masajtis-Zagajewska A, Nowicki M. New markers of urinary tract infection. *Clin Chim Acta* 2017; 471: 286–291.
32. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 2002; 113 (Suppl 1A): 14s–19s.
33. Ragnarsdóttir B, Fischer H, Godaly G, et al. TLR- and CXCR1-dependent innate immunity: insights into the genetics of urinary tract infections. *Eur J Clin Invest* 2008; 38 (Suppl 2): 12–20.
34. Ragnarsdóttir B, Svanborg C. Susceptibility to acute pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria: host-pathogen interaction in urinary tract infections. *Pediatr Nephrol* 2012; 27: 2017–2029.
35. Weichhart T, Haidinger M, Hörl WH, Säemann MD. Current concepts of molecular defence mechanisms operative during urinary tract infection. *Eur J Clin Invest* 2008; 38 Suppl 2: 29–38.
36. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc)* 2020; 85: 1178–1190.
37. García Moreira V, Prieto García B, de la Cera Martínez T, Alvarez Menéndez FV. Elevated transrenal DNA (cell-free urine DNA) in patients with urinary tract infection compared to healthy controls. *Clin Biochem* 2009; 42: 729–731.
38. Celec P, Vlčková B, Lauková L, et al. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. *Expert Rev Mol Med* 2018; 20: e1.
39. Yu Y, Kwon K, Tsitrin T, et al. Characterization of early-phase neutrophil extracellular traps in urinary tract infections. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006151.
40. Yu Y, Sikorski P, Bowman-Gholston C, et al. Diagnosing inflammation and infection in the urinary system via proteomics. *J Transl Med* 2015; 13: 111.
41. Krivošíková K, Šupčíková N, Gaál Kovalčíková A, et al. Neutrophil extracellular traps in urinary tract infection. *Front Pediatr* 2023; 11.
42. George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2014; 371: 654–666.
43. Talarico V, Aloe M, Monzani A, et al. Hemolytic uremic syndrome in children. *Minerva Pediatr* 2016; 68: 441–455.
44. Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicol* 2001; 39: 1629–1635.
45. Fernandez GC, Lopez MF, Gomez SA, et al. Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 76–84.
46. Leffler J, Prohászka Z, Mikes B, et al. Decreased neutrophil extracellular trap degradation in Shiga toxin-associated haemolytic uraemic syndrome. *J Innate Immun* 2017; 9: 12–21.
47. Ramos MV, Mejias MP, Sabbione F, et al. Induction of neutrophil extracellular traps in Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *J Innate Immun* 2016; 8: 400–411.
48. Feitz WJC, Suntharalingham S, Khan M, et al. Shiga toxin 2a induces NETosis via NOX-dependent pathway. *Biomedicines* 2021; 9.
49. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 15880–15885.
50. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13: 463–469.
51. Wang G, Ma N, Meng L, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in lipocalin-2-promoted human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 2015; 410: 207–213.
52. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 2012; 188: 3522–3531.
53. Locatelli M, Buelli S, Pezzotta A, et al. Shiga toxin promotes podocyte injury in experimental hemolytic uremic syndrome via activation of the alternative pathway of complement. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 1786–1798.
54. Westra D, Volokhina EB, van der Molen RG, et al. Serological and genetic complement alterations in infection-induced and complement-mediated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2017; 32: 297–309.
55. Landoni VI, Pittaluga JR, Carestia A, et al. Neutrophil extracellular traps induced by Shiga toxin and lipopolysaccharide-treated platelets exacerbate endothelial cell damage. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12: 897019.
56. Terlizzi V, Castellani C, Taccetti G, Ferrari B. Dornase alfa in cystic fibrosis: indications, comparative studies and effects on lung clearance index. *Ital J Pediatr* 2022; 48: 141.
57. Kuna P, Jenkins M, O'Brien CD, Fahy WA. AZD9668, a neutrophil elastase inhibitor, plus ongoing budesonide/formoterol in patients with COPD. *Respir Med* 2012; 106: 531–539.
58. Shute JK, Calzetta L, Cardaci V, et al. Inhaled nebulised unfractionated heparin improves lung function in moderate to very severe COPD: A pilot study. *Pulm Pharmacol Ther* 2018; 48: 88–96.
59. Zhu D, Lu Y, Wang Y, Wang Y. PAD4 and its inhibitors in cancer progression and prognosis. *Pharmaceutics* 2022; 14.