

9. Ulusal

Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi

18-21 Nisan 2024

Papillon Zeugma Hotel Kongre Merkezi, Antalya

www.tiged2024.org



Transplantasyon ve NETozis

Prof. Dr. Demet ALAYGUT, MD, Ph.D.(cand.)

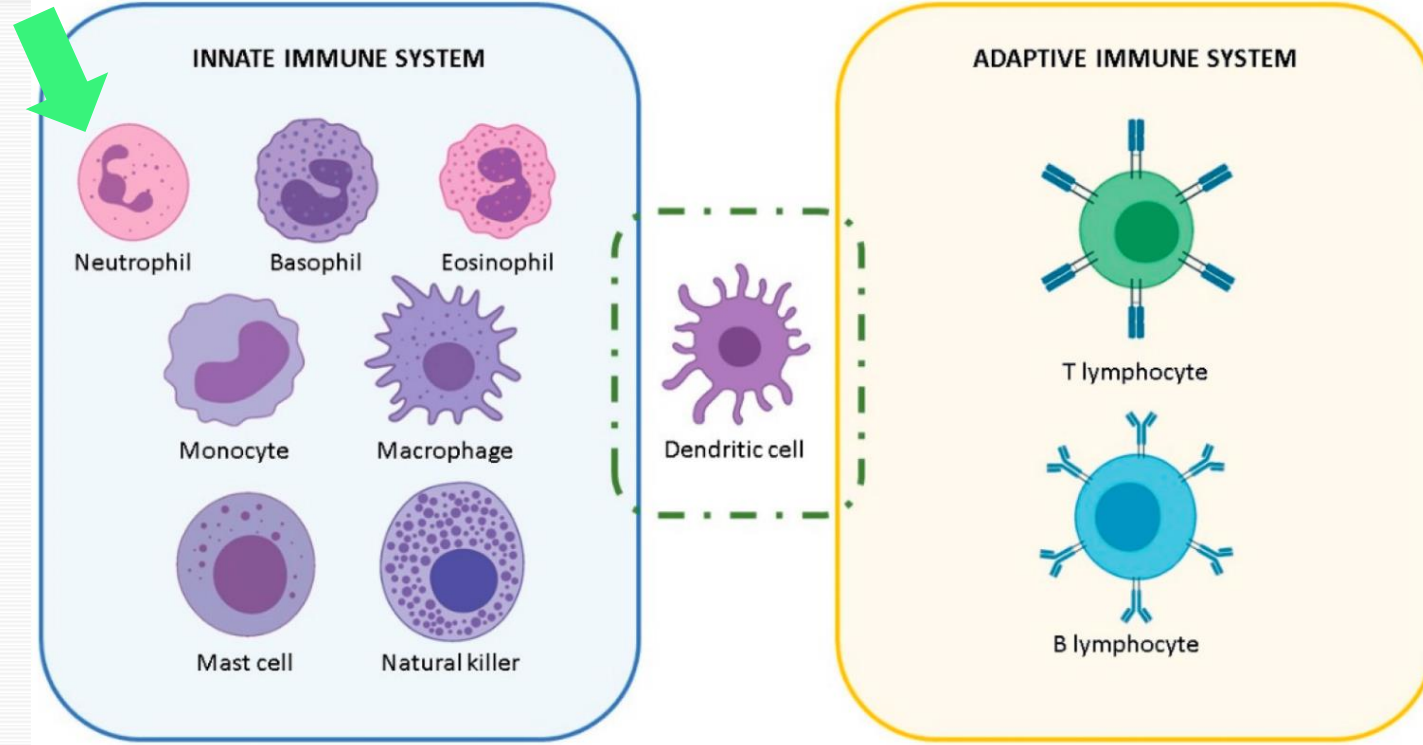
Izmir University of Health Sciences

Tepecik Training and Research Hospital

Department of Pediatric Nephrology, Turkey

Sunum İçeriği

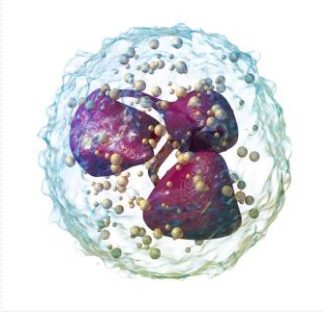
- Nötrofillerin Gelişimi ve Aktivasyonu
- NETs oluşumu, NETozisin Moleküler Metabolizması ve Tetikleyicileri
- Transplantasyonda NETozis
- Gelecekte bizi bekleyen neler ?



Nötrofillerin Gelişimi ve Aktivasyonu

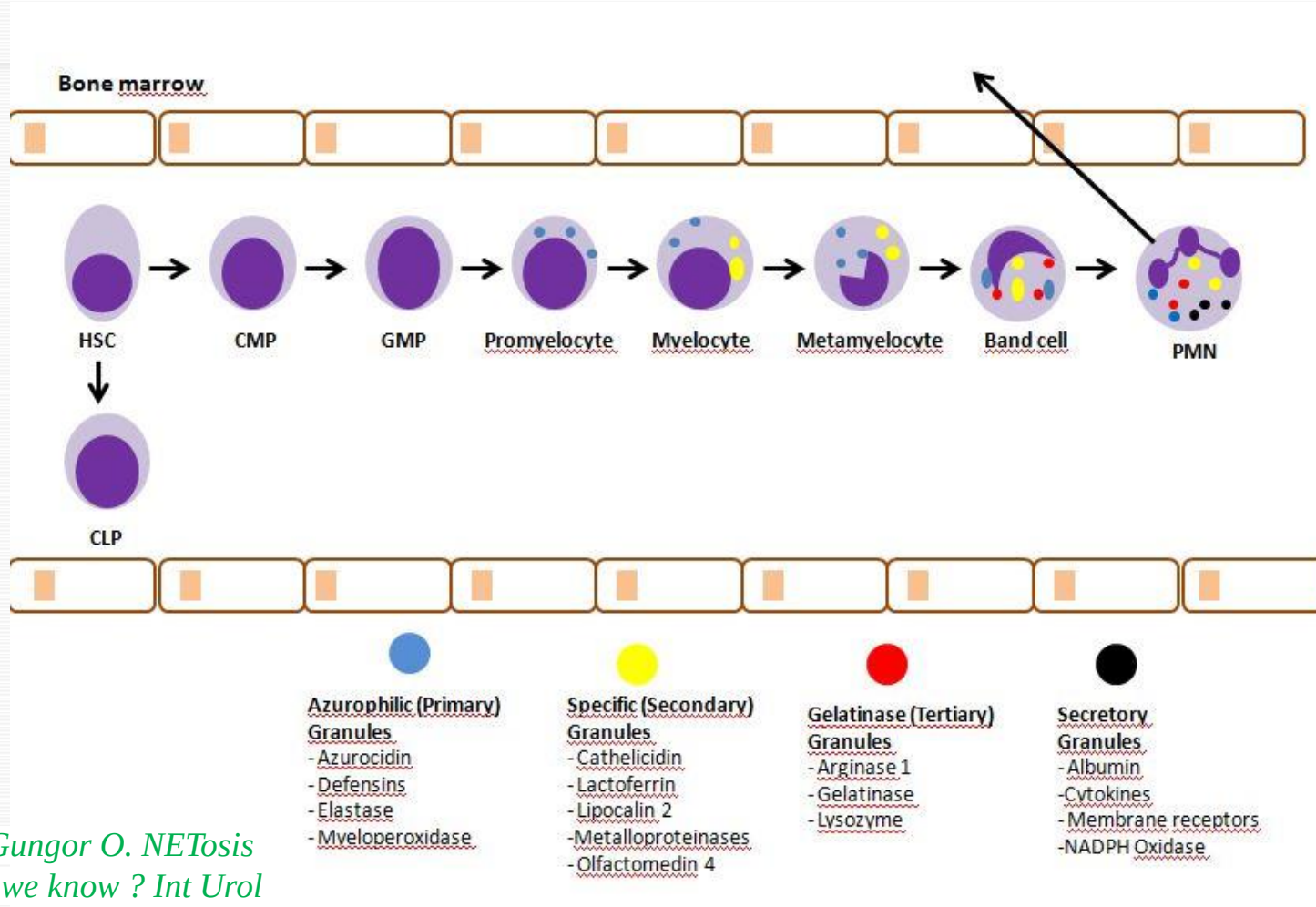


Nötrofiller

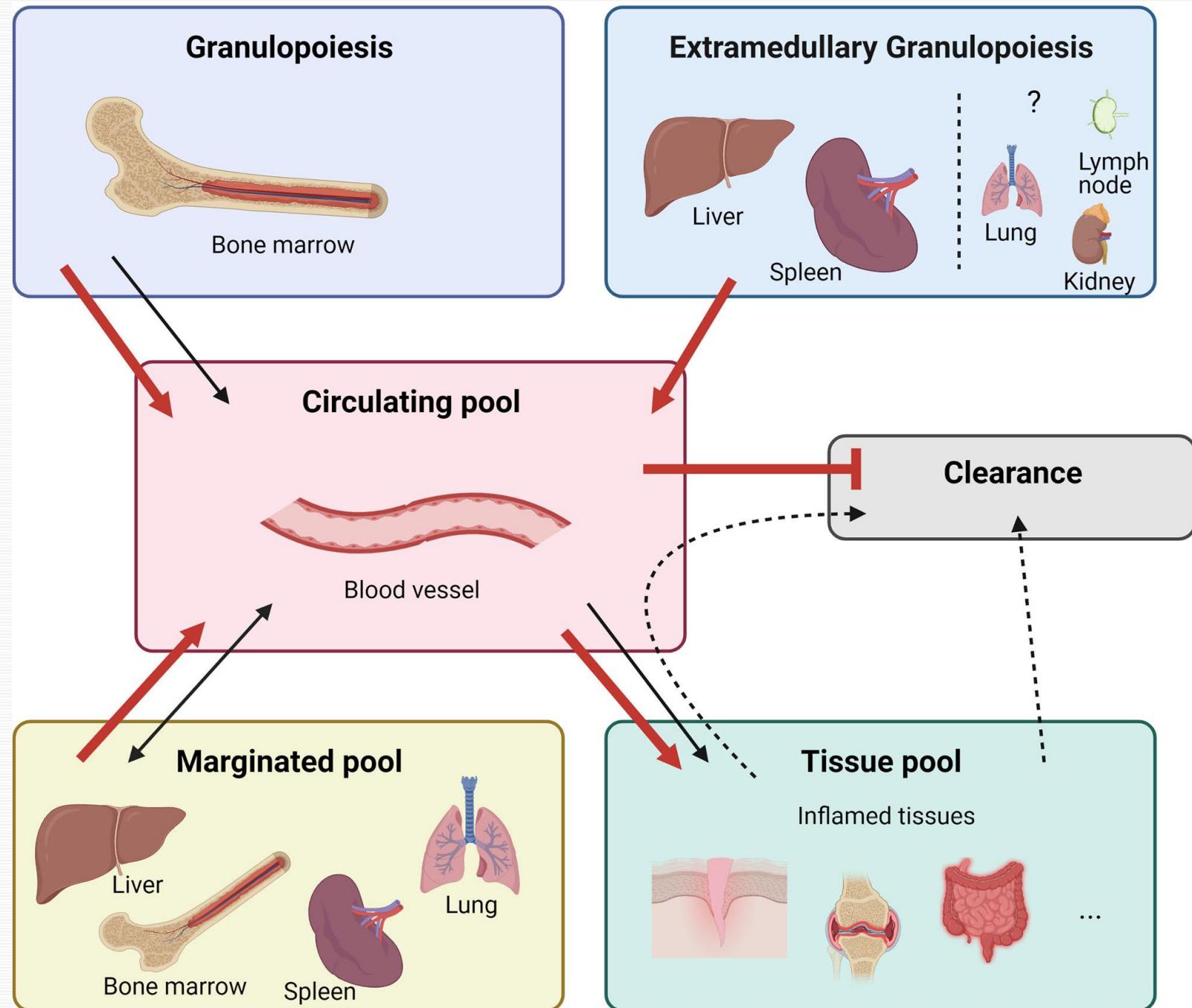


- Nötrofiller / polimorf nüveli lökositler (PMN), farklı efektör işlevleri yerine getirme özelliği olan doğal immun sistemin ana hücreleridir.
- Enfeksiyöz ajanları tanıma, etkili şekilde yok etme, mikroçevreye uygun yanıtlar verme yeteneğine sahiptirler.
- Aktivasyon, migrasyon, reaktif oksijen radikalleri oluşturma ve mediatör salınımı gibi fonksiyonlar gösterirler.
- Aktive olmuş bir nötrofil tüm bu işlevleri yaparken farklı hücre içi veya hücre dışı faktörlere yanıt olarak aynı anda hücre ölümü mekanizmalarını da aktive eder.

Nötrofillerin Gelişimi (Granülopoez)



Alaygut D, Ozturk I, Ulu S, Gungor O. NETosis and kidney disease: what do we know ? *Int Urol Nephrol.* 2023 Aug;55(8):1985-1994

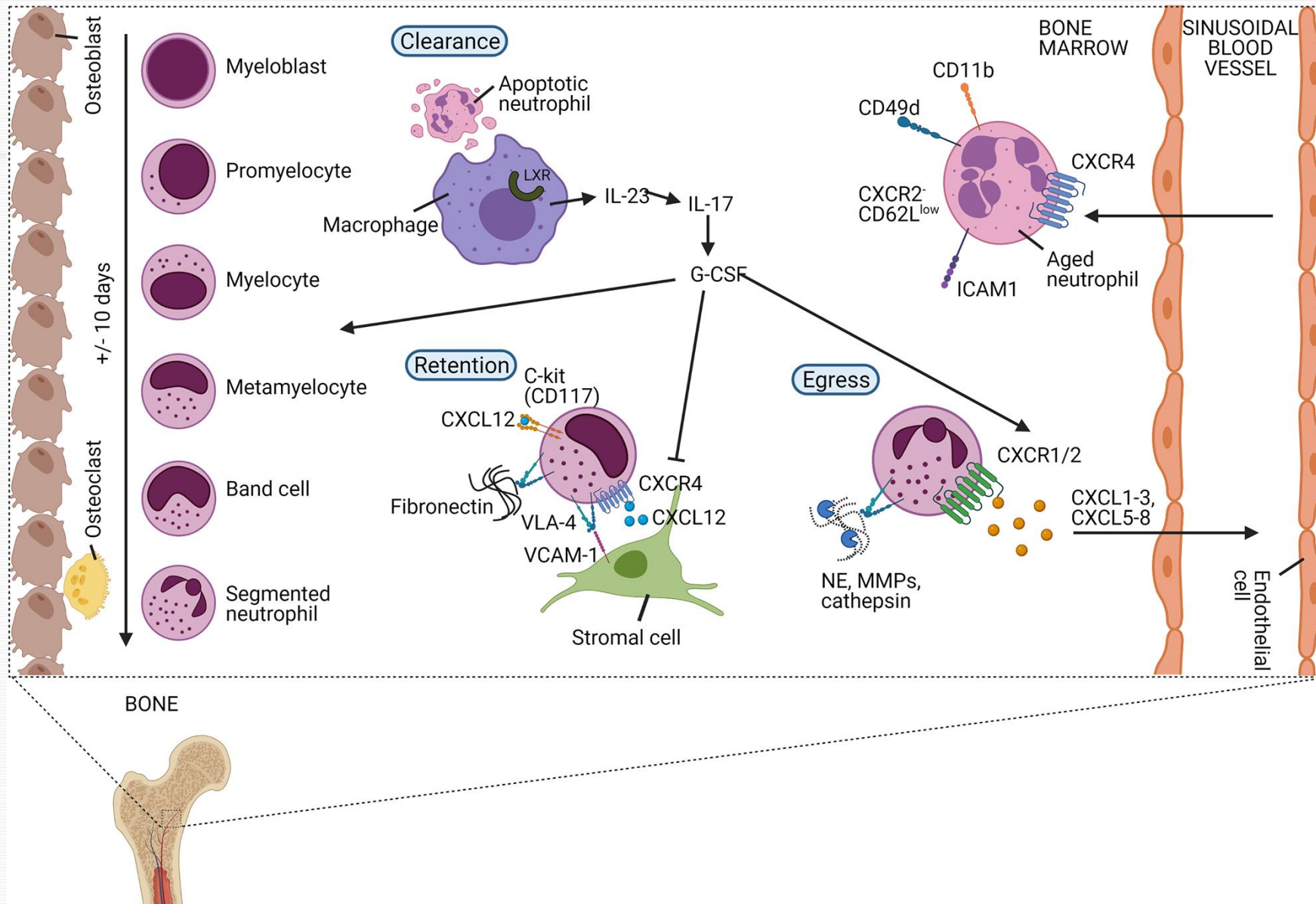


*Bert Malengier-Devlies et al.
Neutrophil Homeostasis and
Emergency Granulopoiesis: The
Example of Systemic Juvenile
Idiopathic Arthritis. Front Immunol.
2021 Dec 13;12:766620.*

Nötrofillerin Gelişimi & Sitokinler

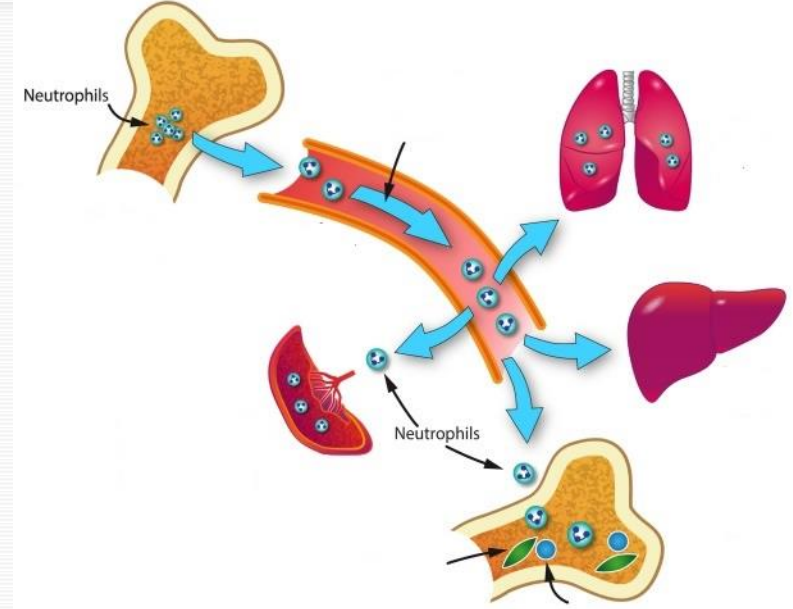
- *Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF)*, nötrofillerin kemik iliğinde çoğalmasını, farklılaşmasını ve çıkışını düzenleyen önemli bir büyüme faktörüdür.
- Nötrofiller, stromal hücreler tarafından salınan CXCL12'yi bağlayan CXCR4 reseptörü veya kök hücre antijeni CD117 (C-kit) aracılığıyla kemik iliğinde tutulur.
- CXCR4/CXCL12 etkileşimlerini sonlandırır ve CXCR2'ye bağlanan CXCL1-3 ve CXCL5-8 gibi nötrofilik kemotaktikleri serbest bırakır.
- Yaşlanmış nötrofiller, makrofajlar tarafından yutulmak üzere kemik iliğine geri göç eder.
- Nötrofiller normal homeostatik durumda **G-CSF / IL 23/ IL-17** aksı ile dengededirler

Nötrofillerin Gelişimi & Sitokinler



Nötrofil Hayat Siklusu

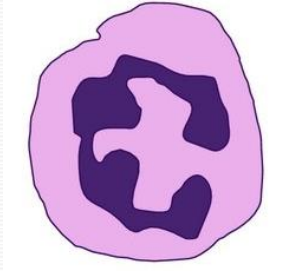
- Dolaşımdaki lökositlerin %70'i nötrofildir, yaşam süreleri 8 saat -7 gün
- Kandaki sayıları, Kİ'deki granülopoez ile periferdeki dağılımları arasındaki ilişkiye göre belirlenir
 - Mikrovasküler yataklarda birikim
 - Dokulara ekstravazasyon
 - Makrofajlar tarafından eferositoz ile klirens



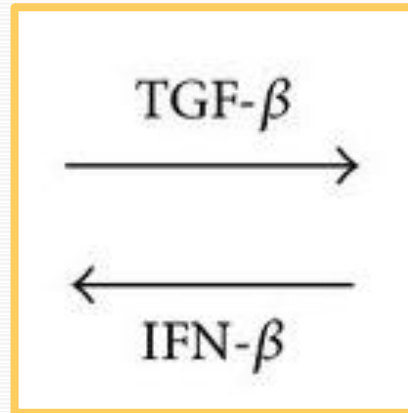
Nötrofil Tipleri

↑ TNF α ekspresyonu
↓ Arg1 / CXCR4 / MMP-9 / VEGF

N1 antitümör hücresi

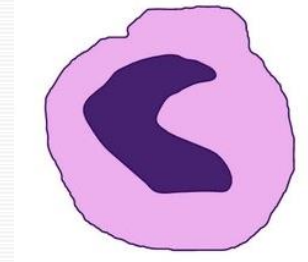


- Matür
- Sitotoksik
- Proapoptotik
- Antiangiogenik
- T hücre stimulatorü
- İmmun aktivasyon



↓ TNF α ekspresyonu
↑ Arg1 / CXCR4 / MMP-9 / VEGF

N2 protümör hücresi

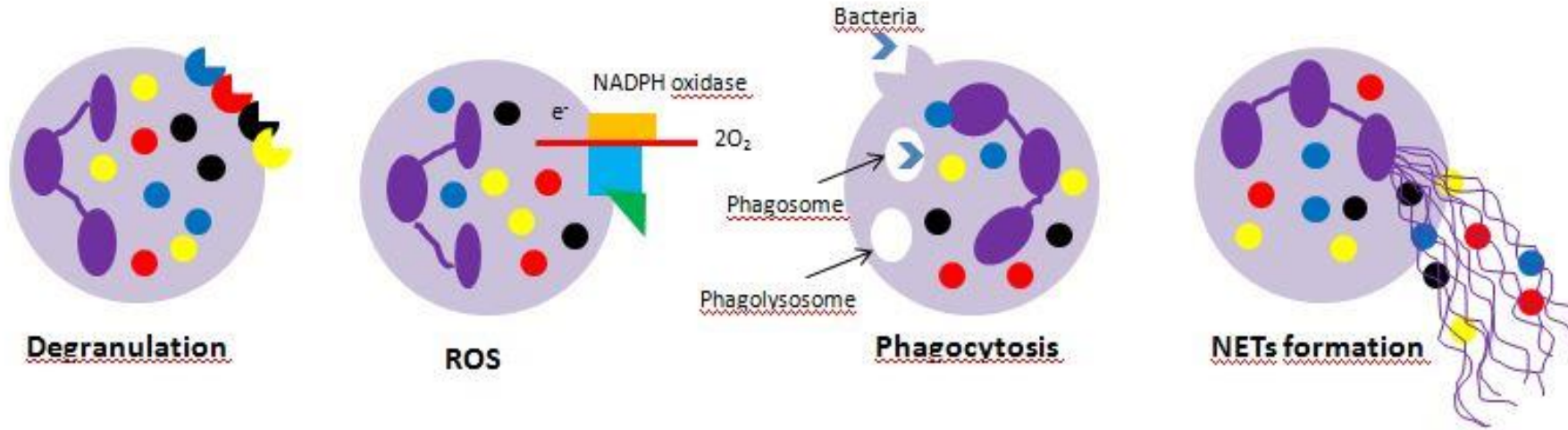


- İmmatür
- Karsinogenezis
- Antiapoptogenik
- Proangiogenik
- T hücre stimülasyonu yok
- İmmunsupresyon

Nötrofil Aktivasyonu

- Mikrobiyal (!) bazı komponentler ve bazı sitokinler Kİ'nde acil granülopoez başlatma ve nötrofillerin dolaşıma salınmasını sağlama yeteneğine sahiptirler.
- Hasarlı dokulara nötrofillerin ekstrasvazasyonu “**nötrofil swarming**” denen ve karmaşık sürece sahip bir durumdur.
- ***Aktivatörler:***
 - Doku hasarı → Damage –associated molecular patterns (DAMPs),
 - İskemi / Reperfüzyon hasarı (IRH)
 - Toll-like reseptörlerinin aktive olması
 - Trombosit aktivasyonu, platelet- nötrofil etkileşimi
 - Sitokinler, kompleman sistemi uyarıcıları, proinflamatuvar mediyatörler
 - ?

Nötrofil Aktivasyon Mekanizmaları

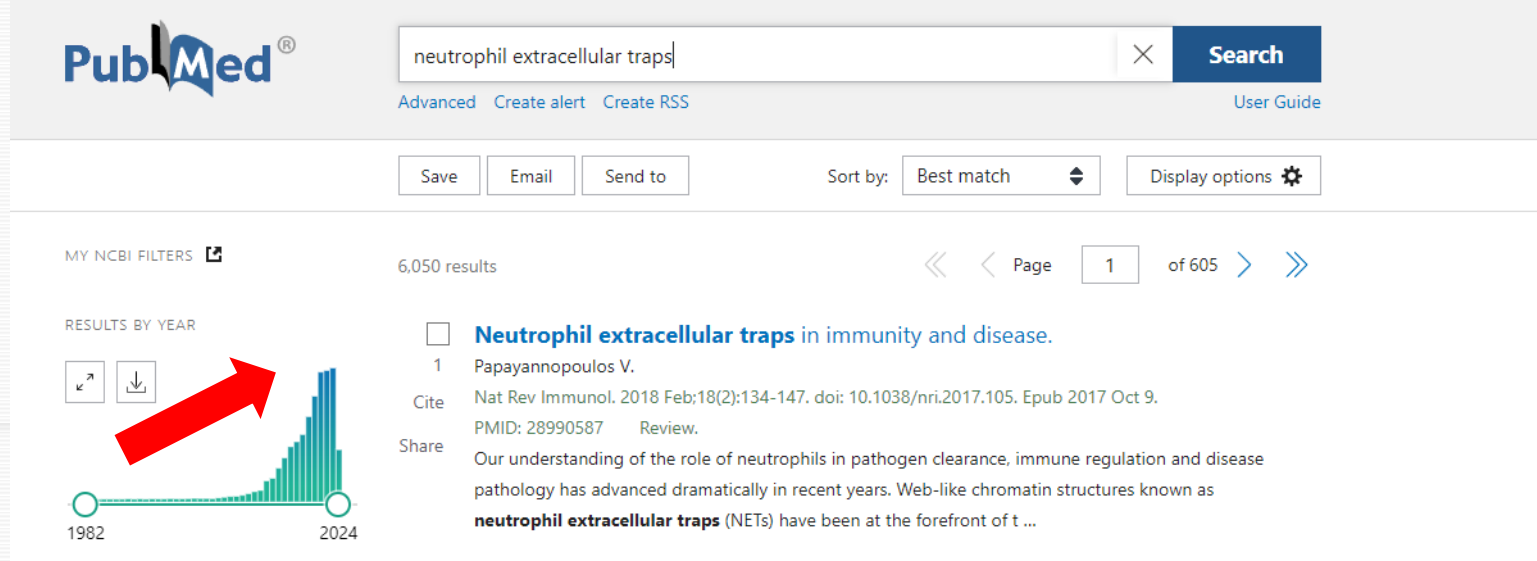


NETs : Neutrophil extracellular traps

NETs → Kromatin iskele üzerinde yer alan, ağısı, büyük ve ekstrasellüler yerleşimli sitozolik ve granül proteinlerini içeren yapı

NETs Oluşumu, NETozisin Moleküler Metabolizması ve Tetikleyicileri

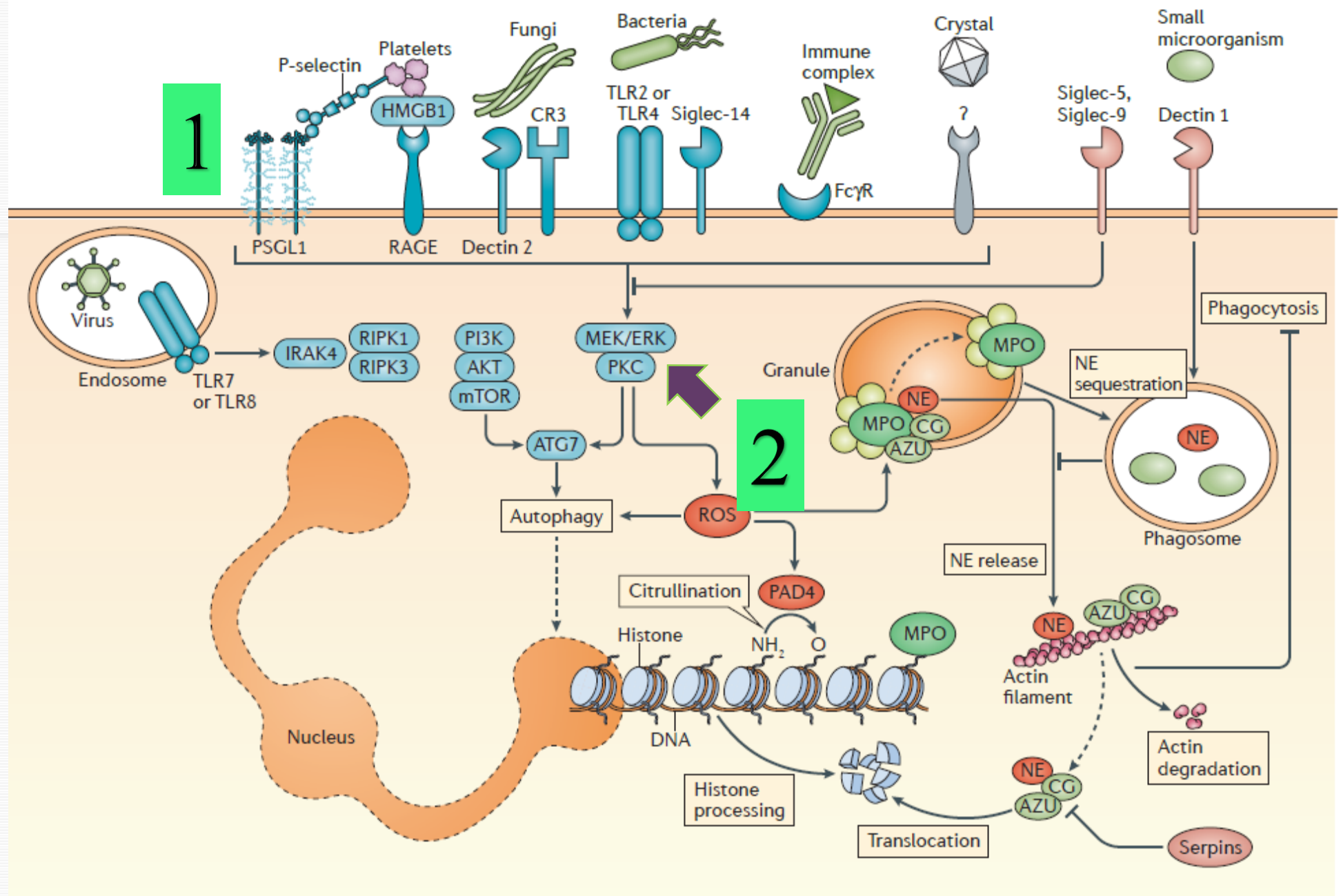




- 1996 yılında Takei ve ark. nötrofillerin ilk kez mitojen forbol-12-miristat-13-asetat (PMA) ile aktivasyonunun gerçekleştiğini bildirdi.
- 2004 ‘de Brinkmann ve ark. PMA ile aktiflenen, kromatin ve granül proteinlerinden zengin ağların, **neutrophil extracellular traps (NETs)**’ i farklı bir savunma şekli olduğunu yayınladı.

Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A. and Sendo, F. (). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 59, 229-240

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004.;303, 1532-1535.

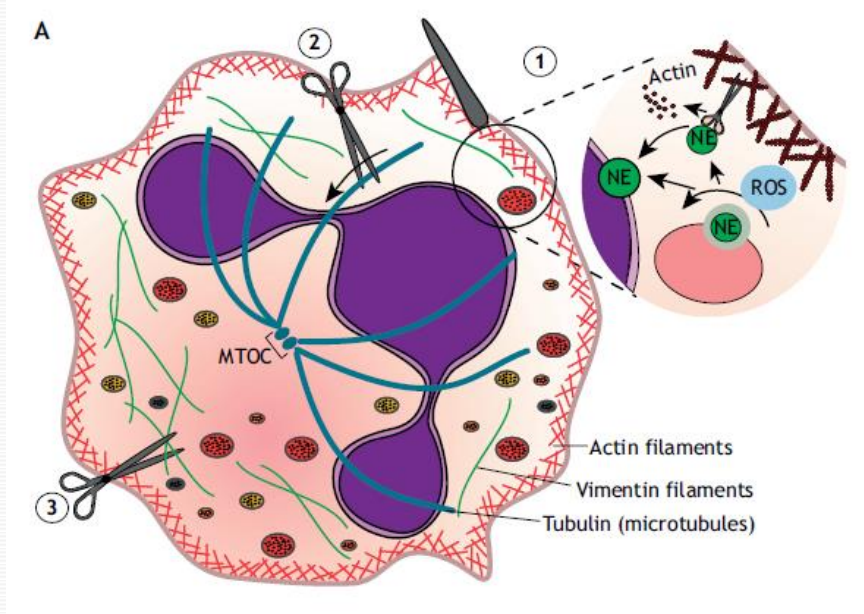


Andres Hidalgo et al. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. Cardiovascular Research (2022) 118, 2737–2753

ROS

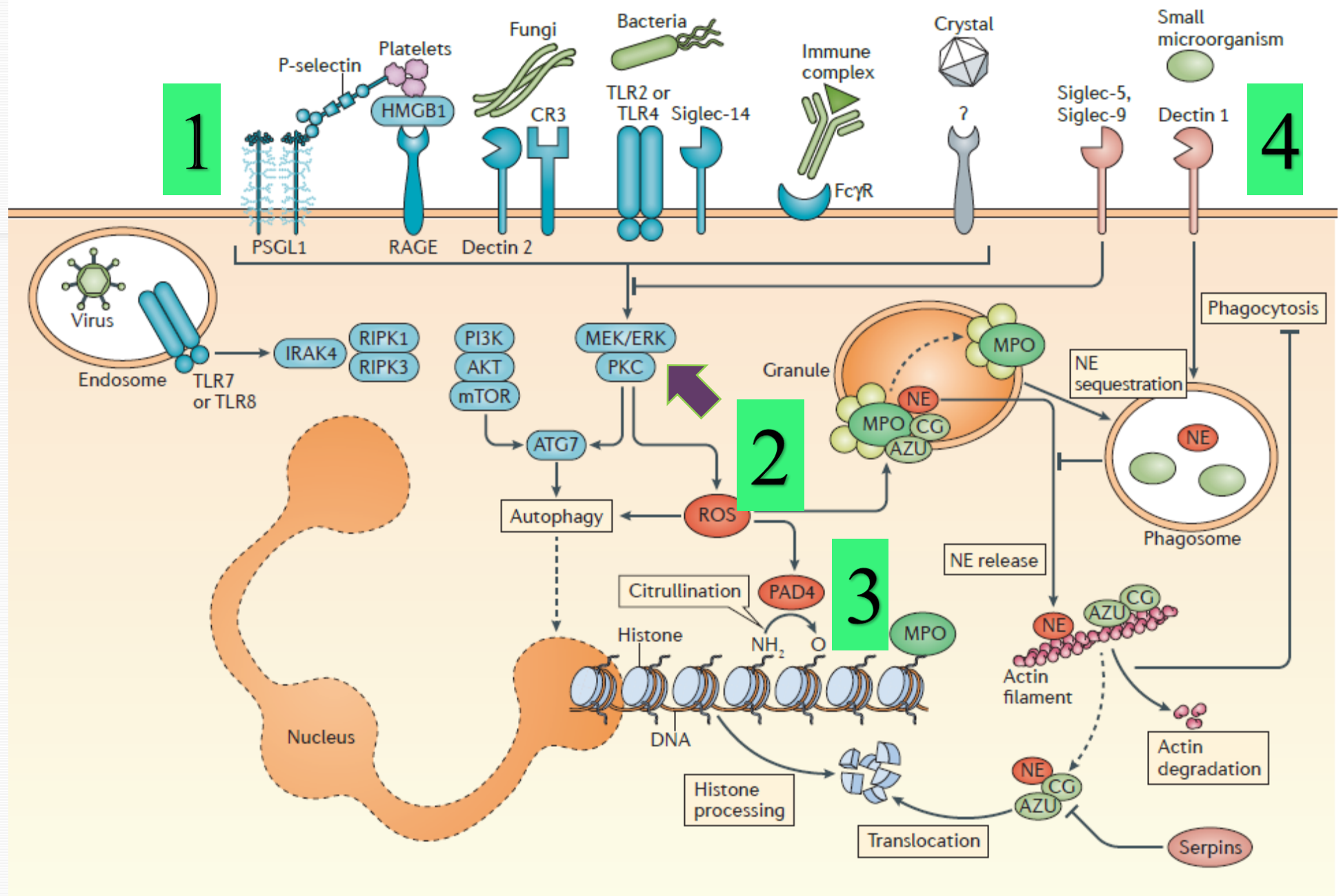
ROS- mediated cysteine glutathionyl

2. Mikrotübüllerin mikrotübül düzenleme merkezine (MTOC) giden serbest artı uçlarının kesilmesi



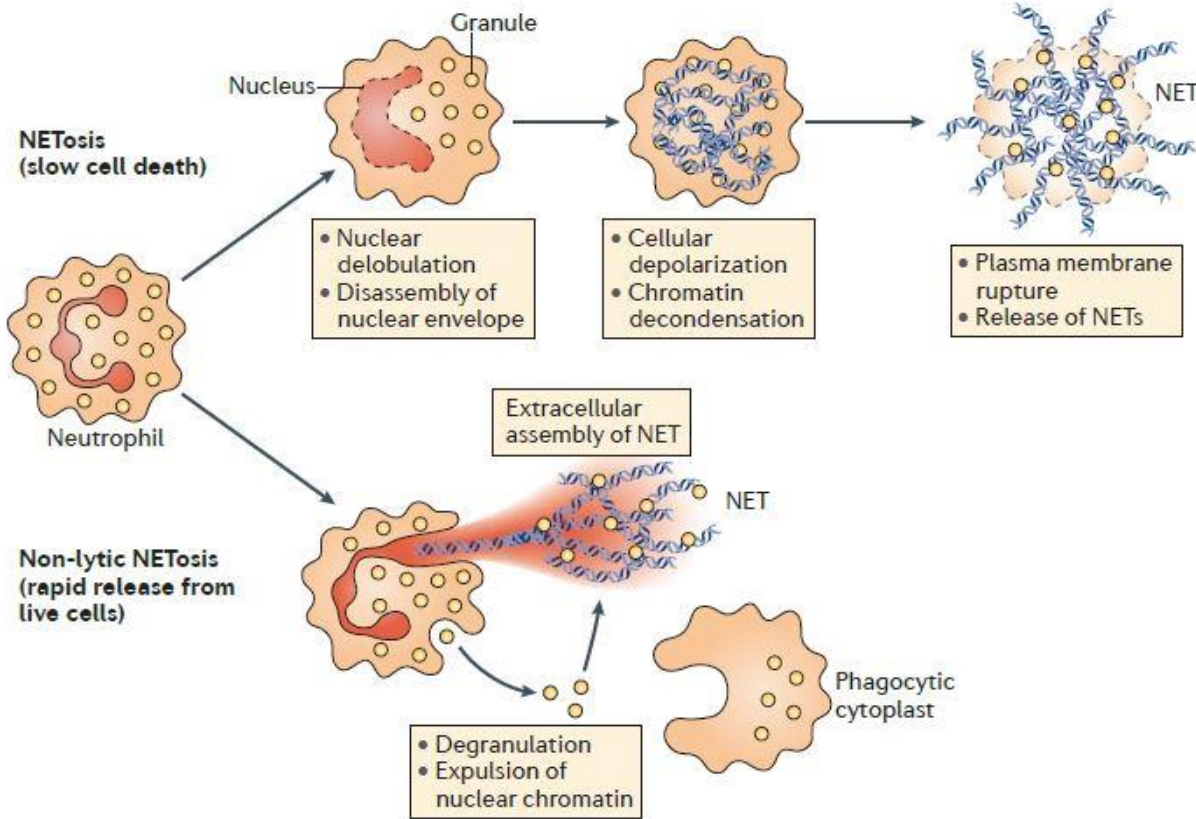
1. Aktin liflerinin ROS bağımlı şekilde NE ile yıkımı

3. Vimentinin, (özellikle periferik) yapısının sökülmesi .



Andres Hidalgo et al. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. Cardiovascular Research (2022) 118, 2737–2753

Her NETosis hücre ölümü mü ?



Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
(PKC yi aktive ederek ROS oluşturur)

Histon proteinleri

Nötrofil elastaz (NE)

Myeloperoksidaz (MPO)

Calprotectin

Defensin

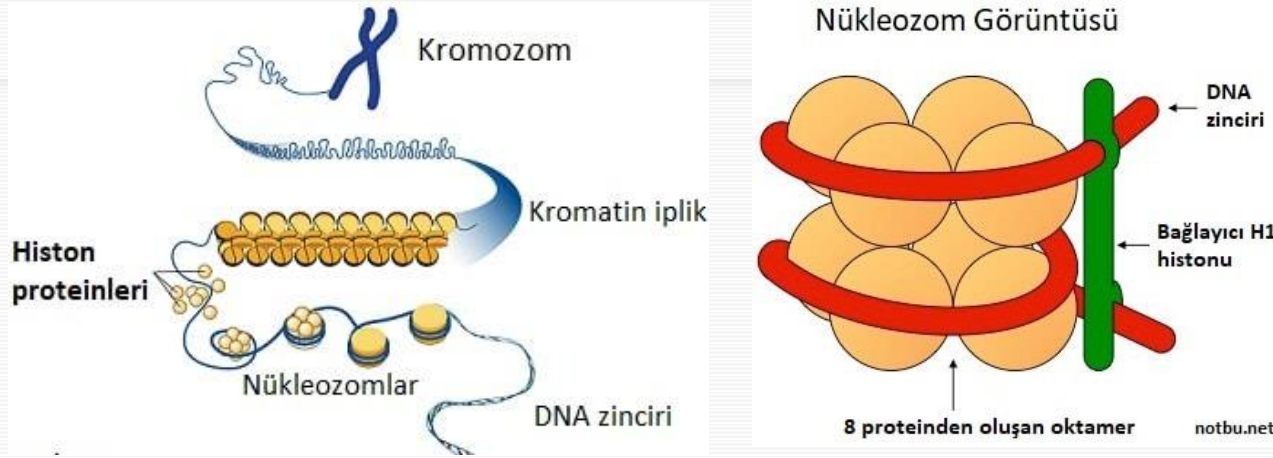
Actin

Damage –associated
molecular patterns (DAMPs)

- Her NETs salınımı hücre ölümü değildir.
- NETs içeriği aktivatörün tipine göre değişiyor.
- DAMPs ve Histon proteinleri ↔ NETs arasında bir döngü var



Ekstrasellüler Histonlar Tehlikelidir...

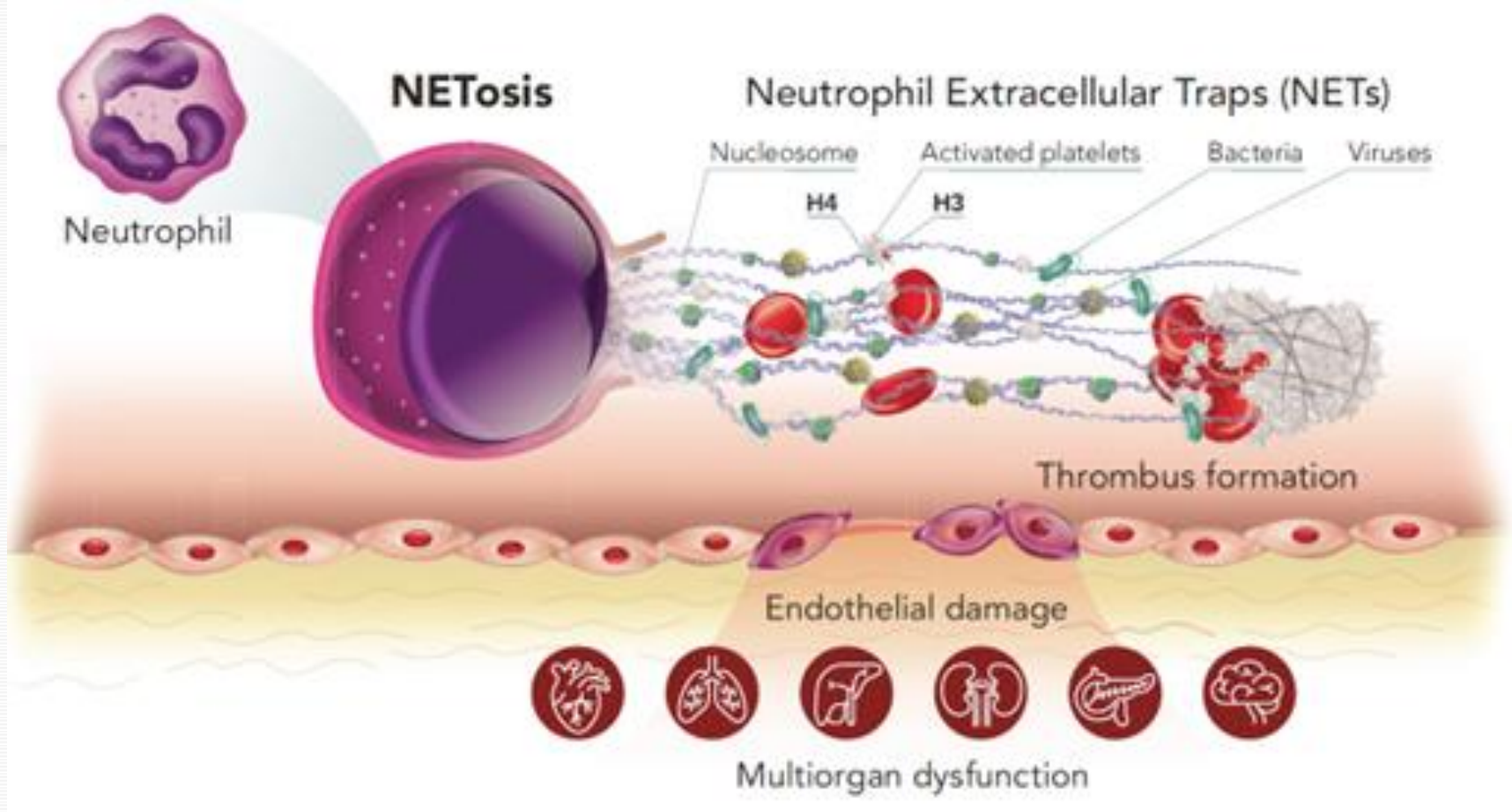


- Potent hasar mediatörleridir
 - Çok güçlü sitotoksik etki (mikrovasküler endotelial hücreler ve renal epitel hücreleri için toksiktirler)
 - DNA ve RNA ya nonspesifik bağlanarak ölüme neden olurlar
 - Histona bağlı gerçekleşen hücre nekrozu daha fazla histonun açığa çıkmasına yol açar.

NETs İlişkili Prediktif Biyobelirteçler

- Cell-free DNA (cf-DNA)
- CitH3
- NE
- MPO
- .
- .
- .

Sonuç olarak



Hücre hasarı

İnflamasyon

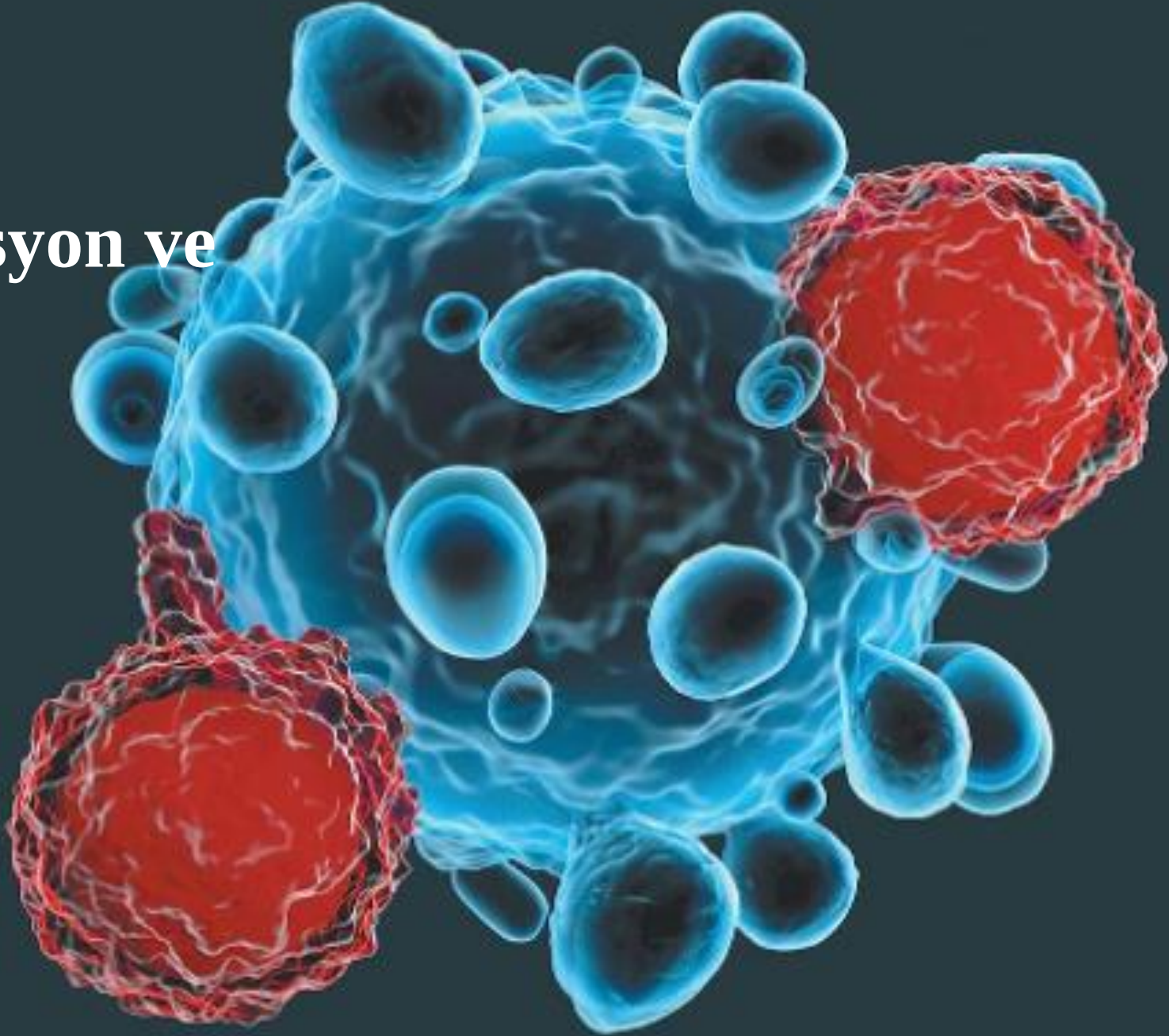
Vazooklüzyon

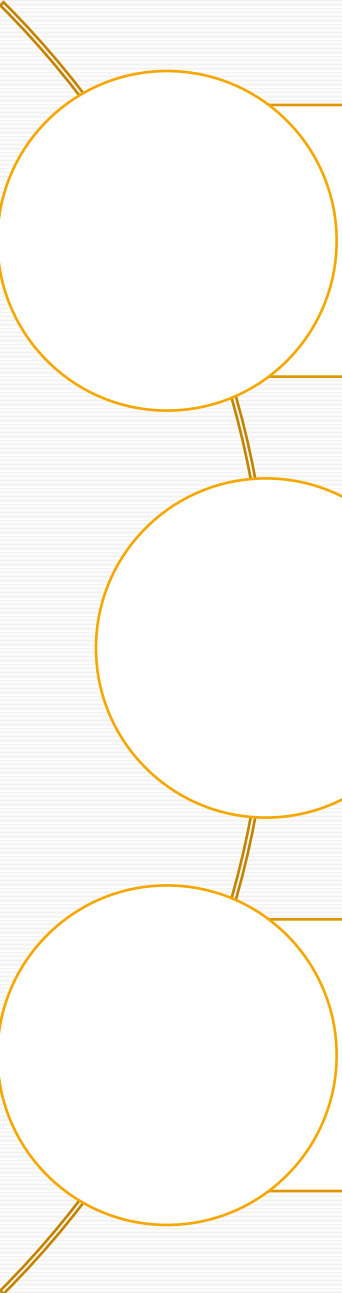
Tümör büyümesi

Otoantikor

Kemokin ve sitokin degr

Transplantasyon ve NETozis





Transplante edilen organda ilk bulunan hücreler nötrofillerdir. Hem doğal hem edinsel bağışıklık sistemi yanıtlarını başlatırlar.

Bir çok çalışma nötrofillerin yıkıcı etkilerinin iskemi reperfüzyon hasarı ile ilişkili olduğunu belirtse de unutulmaması gereken en önemli nokta ortamda ***steril inflamasyonun da*** olduğudur.

Hasarlı hücrelerden veya hücre dışı matriksten salınan DAMPs'lar → dolaşımdaki nötrofillerin yapışmasını tetiklemek için vasküler endoteli aktive eden inflamatuvar araçları salgılamak için yerleşik makrofajları uyarır. Aktive olan vasküler endotel IL-1beta ile nötrofil alımını başlatır.

Transplantasyon & Nötrofiller

NETOZİS

- Akut hasar
- İskemi reperfüzyon hasarı

- Akut hücresel rejeksiyon
- Antikor ilişkili rejeksiyon

- Kronik rejeksiyon
- İnflamasyonun rezolüsyonu

Transplantasyon & Nötrofiller

Akut hasar / İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi başlangıcı

İskeminin Hücresel Düzeyde Etkileri

Membran potansiyelinin değişmesi

İyon dağılımında değişme ($\uparrow \text{Ca}^{+2} / \text{Na}^{+1}$)

Hücre iskelet yapısında bozulma

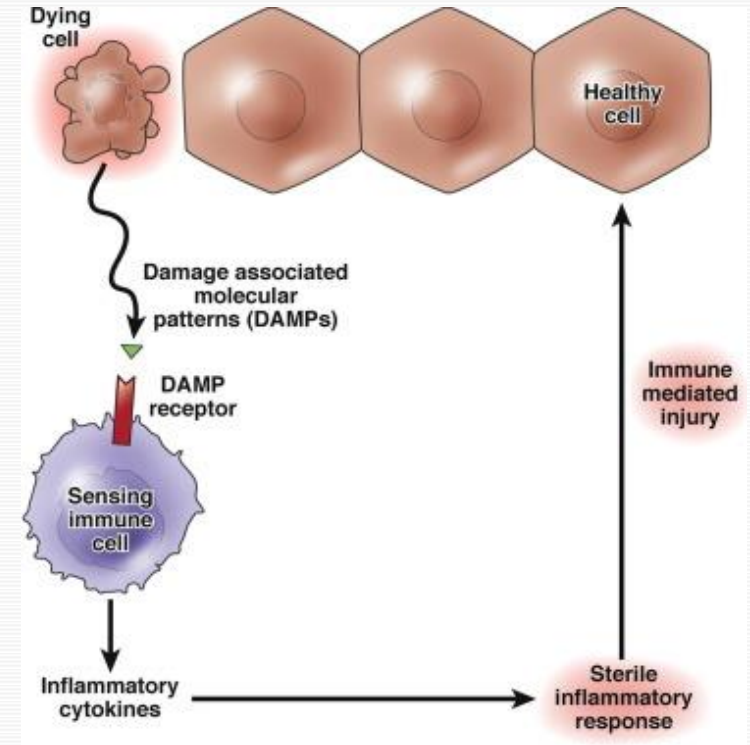
$\uparrow$ Hipoksantin, ROS

$\downarrow$ O_2 , ATP, fosfokreatin ve glutatyon

Hücresel asidoz

Organel hasarı ve hücresel şişme

Reperfüzyon



Fu-Chao Liu, Yueh-Hsun Chuang, Yung-Fong Tsai, Huang-Ping Yu. *Role Of Neutrophil Extracellular Traps Following Injury Shock*, Vol. 41, No. 6, pp. 491Y498, 2014

Transplantasyon & Nötrofiller

Akut hasar / İskemi reperfüzyon hasarı

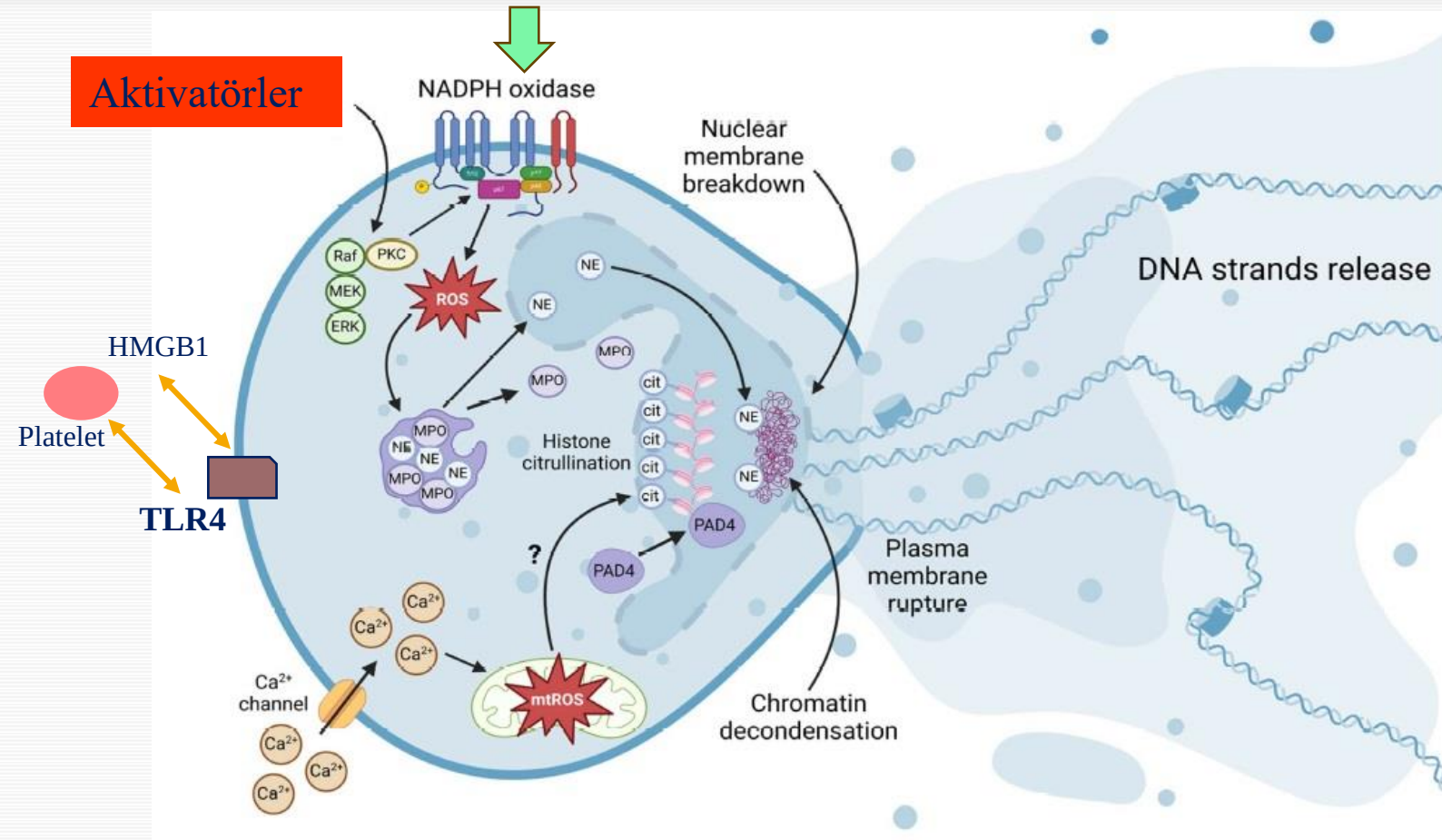
Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) ve Reseptörleri

Molekül	Reseptör
Nükleus	
HMGB1 (High Mobility Group Box 1)	TLR2,TLR4,TLR9,CD24,RAGE
Histon	TLR2,TLR4,NLRP3
DNA	TLR9, AIM2
Sitozol	
S100 protein	TLR2,TKR4,RAGE
Heat shock protein	TLR2,TLR4, CD14,CD91,CD34
Ürik asit	NLRP3
Mitokondri	
ATP	P2X ₇ , NLRP, P2Y ₂
Formyl peptid	FPR1, FPR2
mtDNA	TLR9
Ekstrasellüler matriks	
Hyaluronik asit	TLR2, TLR4,CD44

Transplantasyon & Nötrofiller

Akut hasar / İskemi reperfüzyon hasarı

C5, NO, Superoksit, IL8, TNF α , IFN



Transplantasyon & Nötrofiller

Akut hasar / İskemi reperfüzyon hasarı

basic research

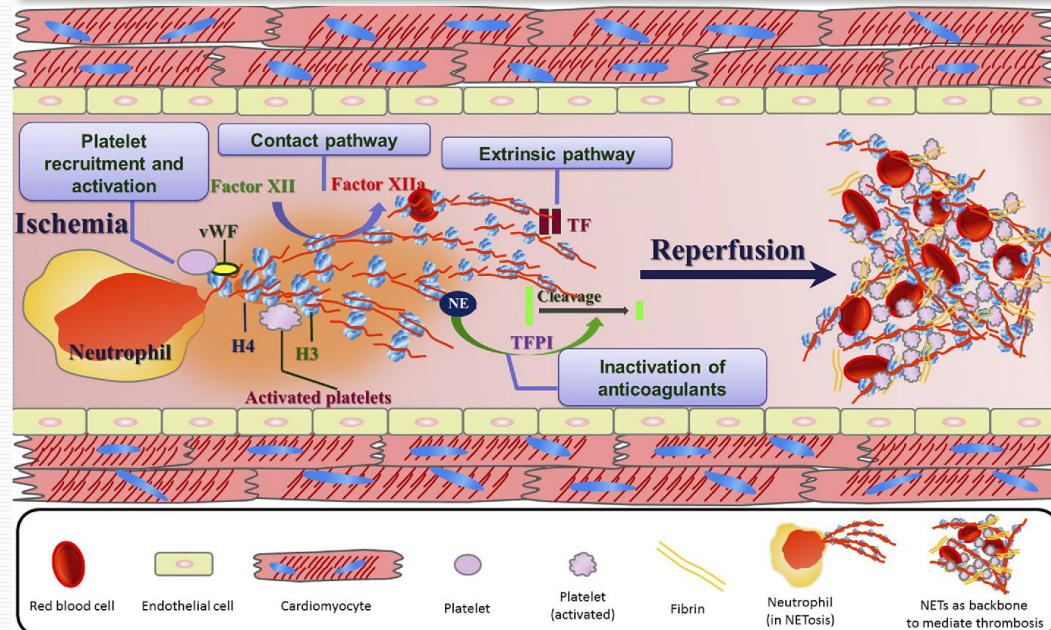
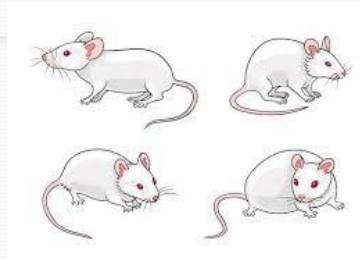
www.kidney-international.org

Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps



Marcel P.B. Jansen¹, Diba Emal¹, Gwendoline J.D. Teske¹, Mark C. Dessing¹, Sandrine Florquin¹ and Joris J.T.H. Roelofs¹

¹Department of Pathology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands



Renal IRH

Trombosit
aktivasyonu

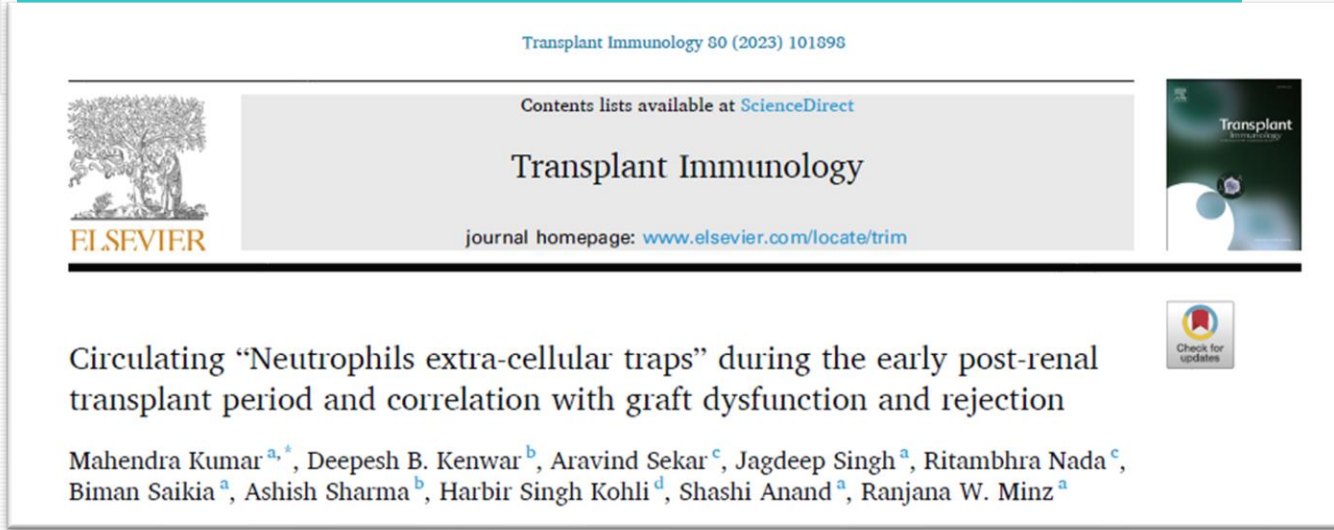
Nekrotik hücrelerden
artmış DNA salınımı,
DAMP etkisi

Trombosit- granülosit
ilişkisinin artması,
NETs oluşumu

- ✓ Trombosit aktivasyonu → P selectin ↑ → Platelet-granülosit bağlantısı, granülosit aktivasyonu → NETs oluşumu
- ✓ Antitrombotik ajanlar NETs oluşumunu azaltabilir !

Transplantasyon & Nötrofiller

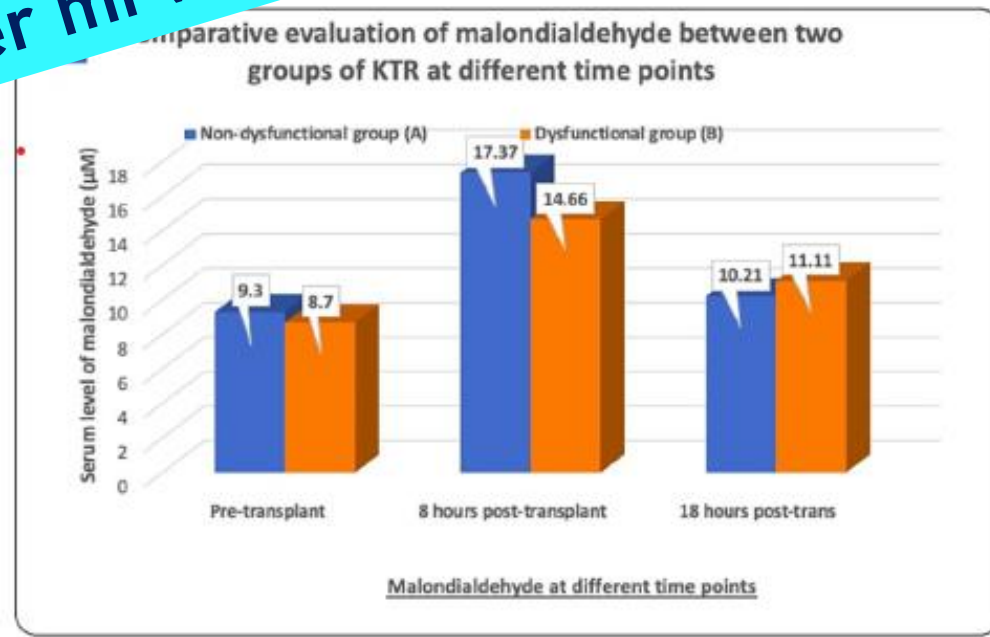
Akut hasar / İskemi reperfüzyon hasarı



- ✓ 30 böbrek tx
- ✓ Grup A non graft disfonksiyonu (n=16)
- ✓ Grup B erken disfonksiyon
 - Biyopsi ile kanıtlı rejeksiyon (n= 6)
 - Spesifik biyopsi bulgusu yok (n=8)
- ✓ Erken disfonksiyon : Serum kreatinin seviyesinin %25 ve üzerinde artması
- ✓ Pre transplant / posttransplant 8-10. h / posttransplant 18-20.h
 - ELISA ile MPO-DNA kompleksi (Sirküle olan NETs) ve MDA (malondialdehid) IRH'ı için biomarker

Demographic and basic characteristics of the kidney transplant recipient.

NETs oluşumunda genetik yada bilinmeyen ek immünolojik faktörler mi var ????



Transplantasyon & Nötrofiller

Akut hasar / İskemi reperfüzyon hasarı

Cellular and Molecular Life Sciences (2023) 80:322
<https://doi.org/10.1007/s00018-023-04967-6>

Cellular and Molecular Life Sciences

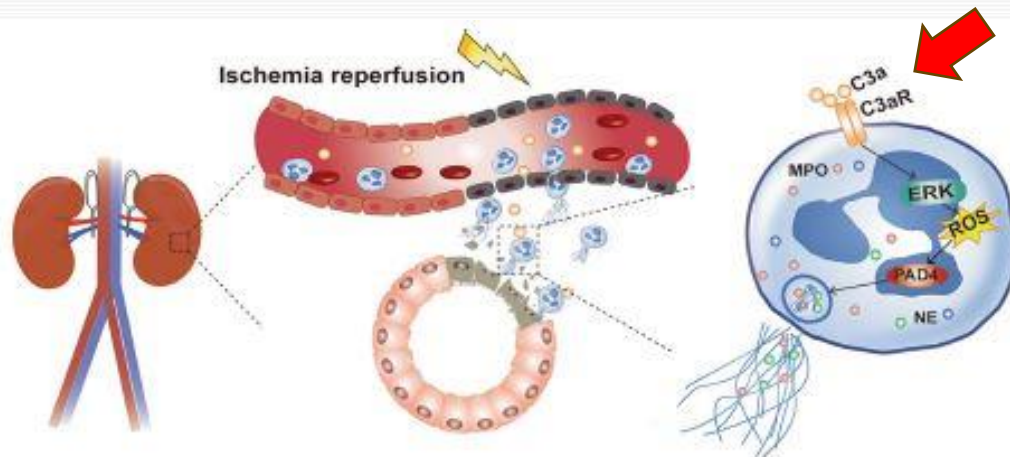
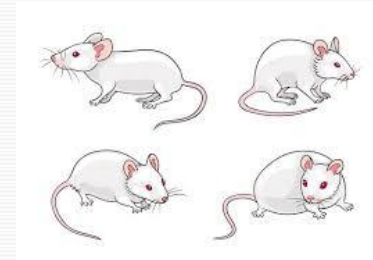
ORIGINAL ARTICLE



Knockout of the C3a receptor protects against renal Ischemia reperfusion injury by reduction of NETs formation

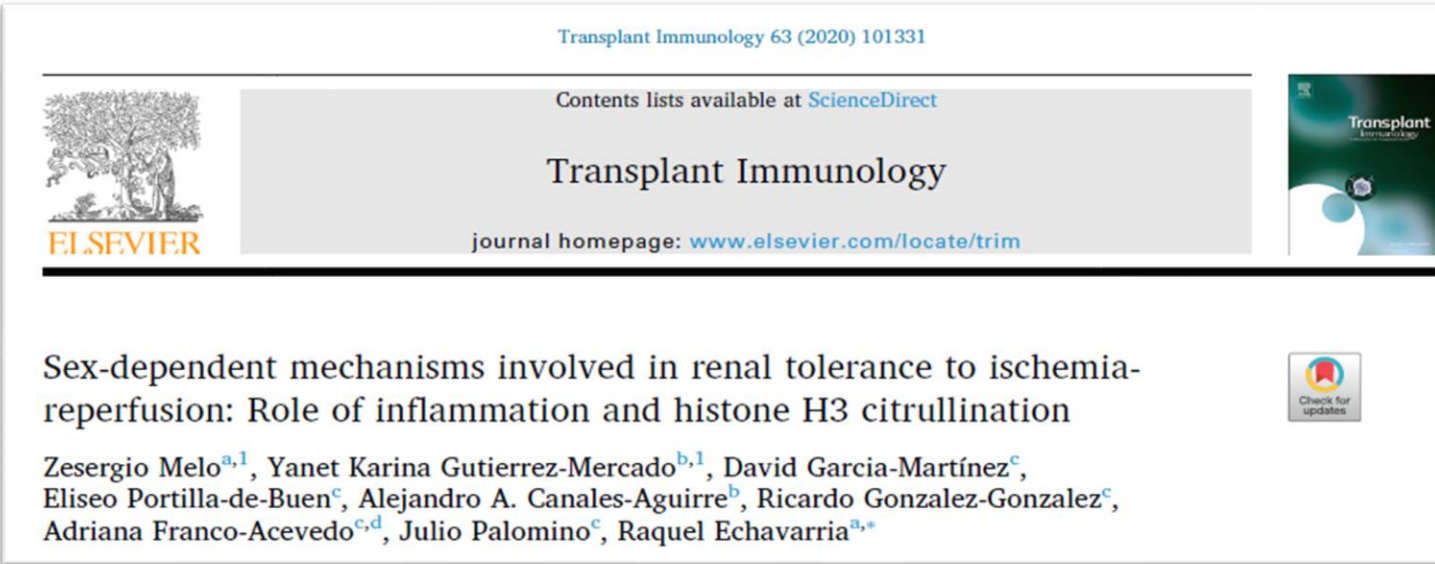
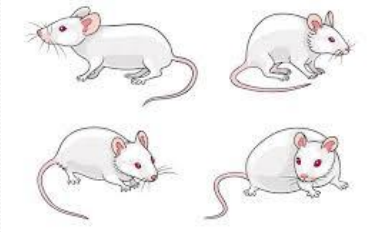
Xiaoting Wu^{1,2,3} · Danyu You^{1,2,3} · Maoen Pan⁵ · Mengjie Weng^{1,2,3} · Qionghong Xie⁴ · Yi Guan⁴ · Jing Zheng^{1,2,3} · Songhua Lin^{1,2,3} · Xiaohong Zhang^{1,2,3} · Chuanming Hao⁴ · Jianxin Wan^{1,2,3}

Received: 26 April 2023 / Revised: 20 August 2023 / Accepted: 6 September 2023 / Published online: 10 October 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023

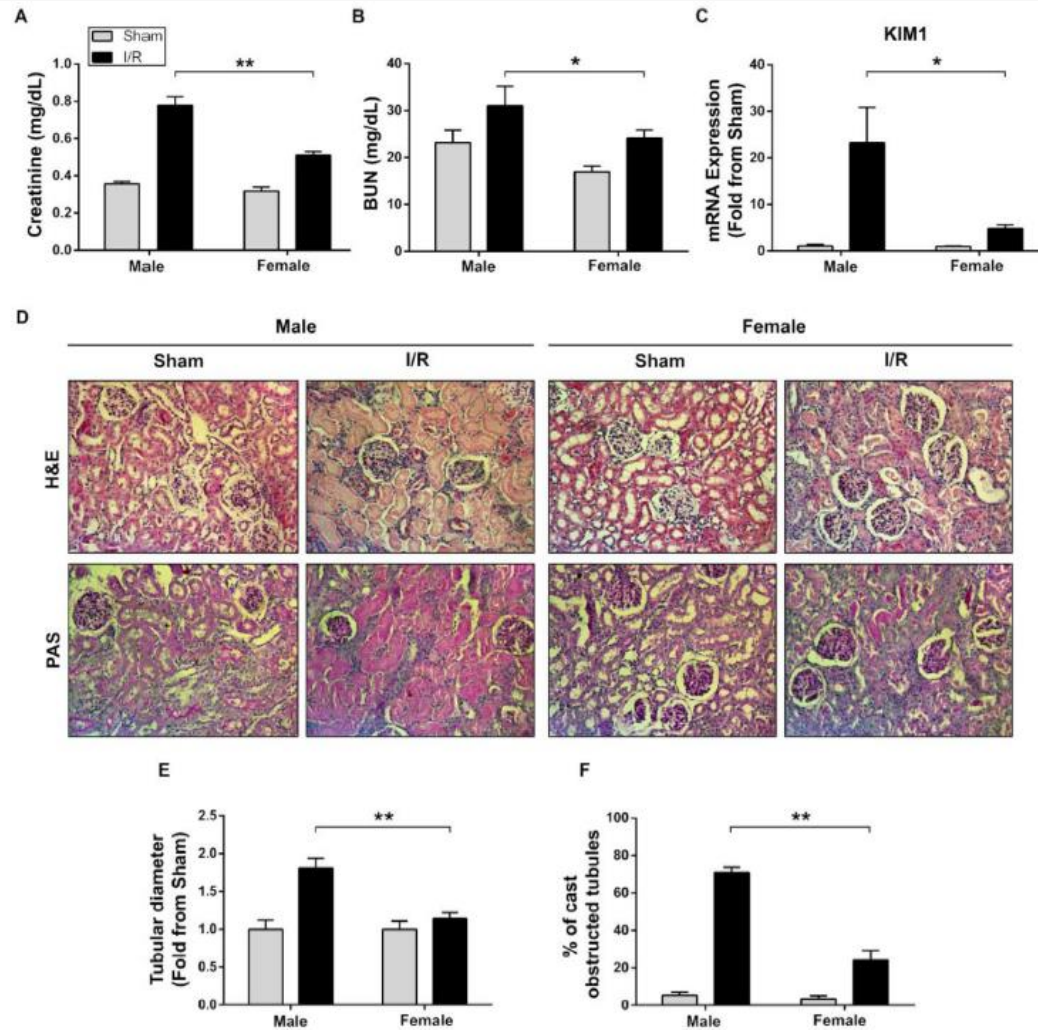


Transplantasyon & Nötrofiller

Akut hasar / İskemi reperfüzyon hasarı



- ✓ M,F, overektomili F Wistar rat
- ✓ 45 dk unilateral renal iskemi, 24 h reperfüzyon sonrası örnekler toplanmış
- ✓ Histolojik analiz
- ✓ Serum üre, kreatinin, IL1B, IL 18, VEGFA, E2, H3cit
- ✓ Real time PCR (KIM1, IL1B, IL6, IL18, VEGF, VEGFR, prolaktin reseptörü, PAD4, NE,



✓ IRH sonrası

- ✓ Female cinsiyet → sitokin ekspresyonu, MPO (+) hücre infiltrasyonu ↓, renal fonksiyonlarda düzelme
- ✓ Serum ve tubulde H3c → F > M

Transplantasyon & Nötrofiller

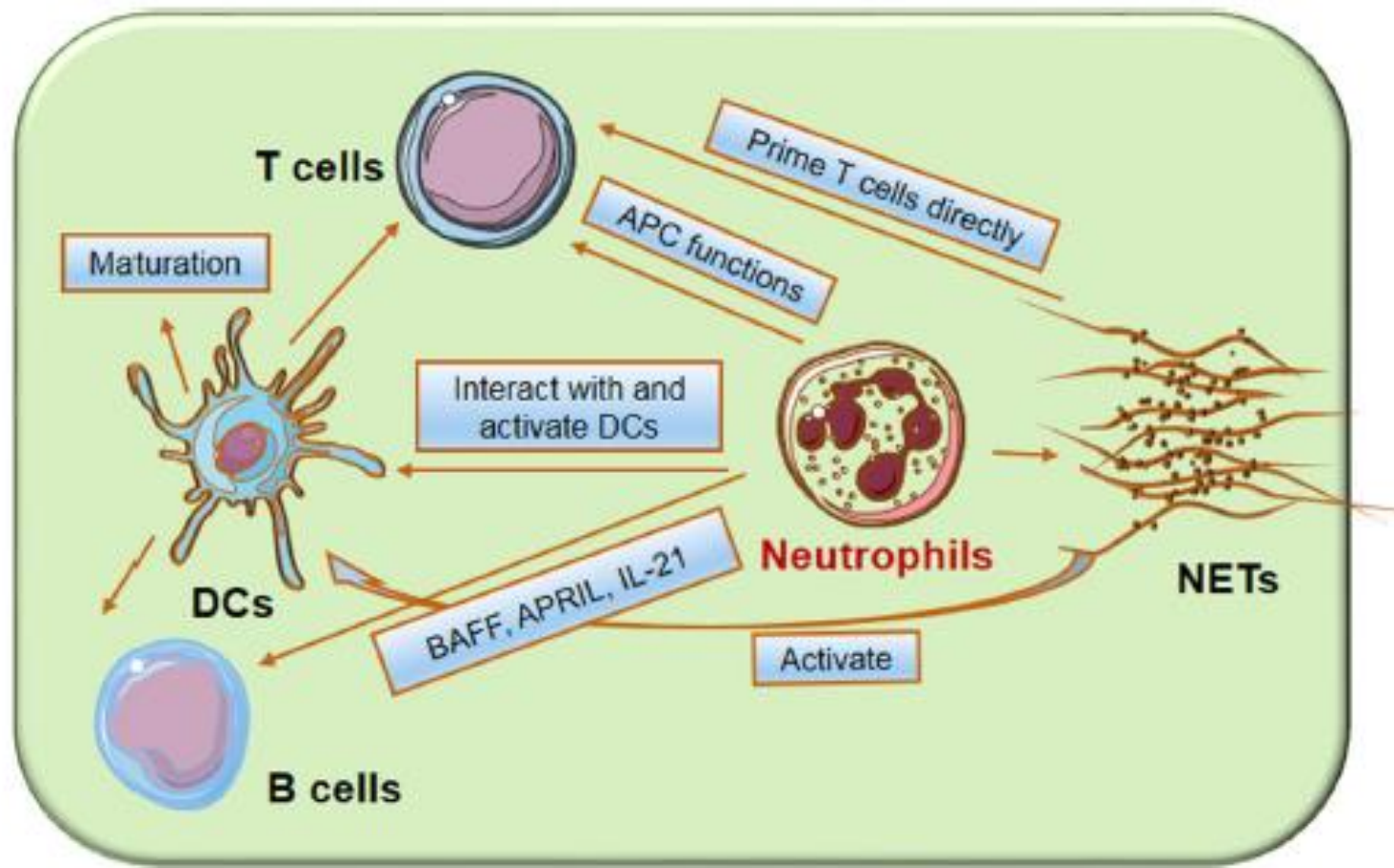
NETOZİS

- Akut hasar
- İskemi reperfüzyon hasarı

- Akut hücresel rejeksiyon
- Antikor ilişkili rejeksiyon

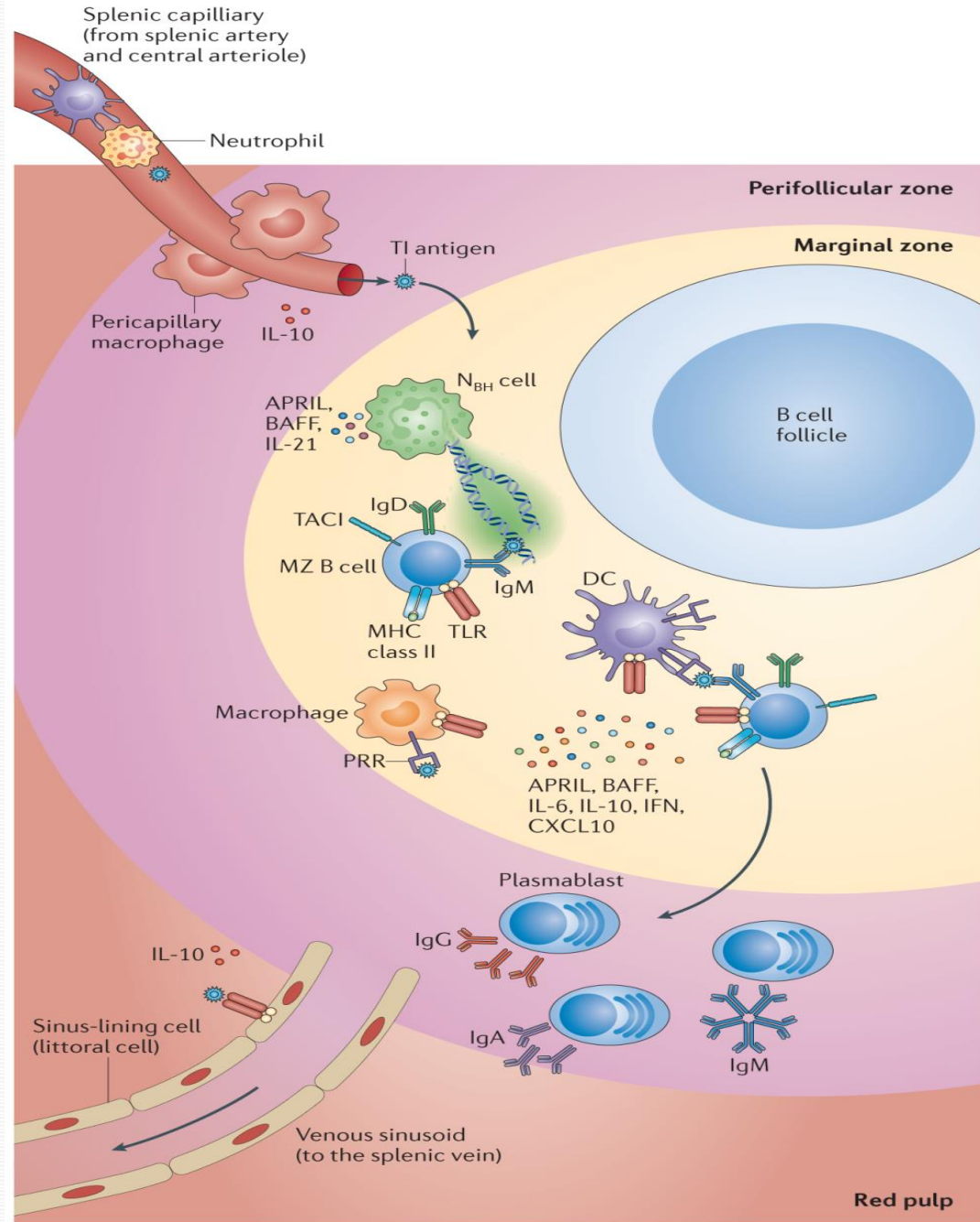
- Kronik rejeksiyon
- İnflamasyonun rezolüsyonu

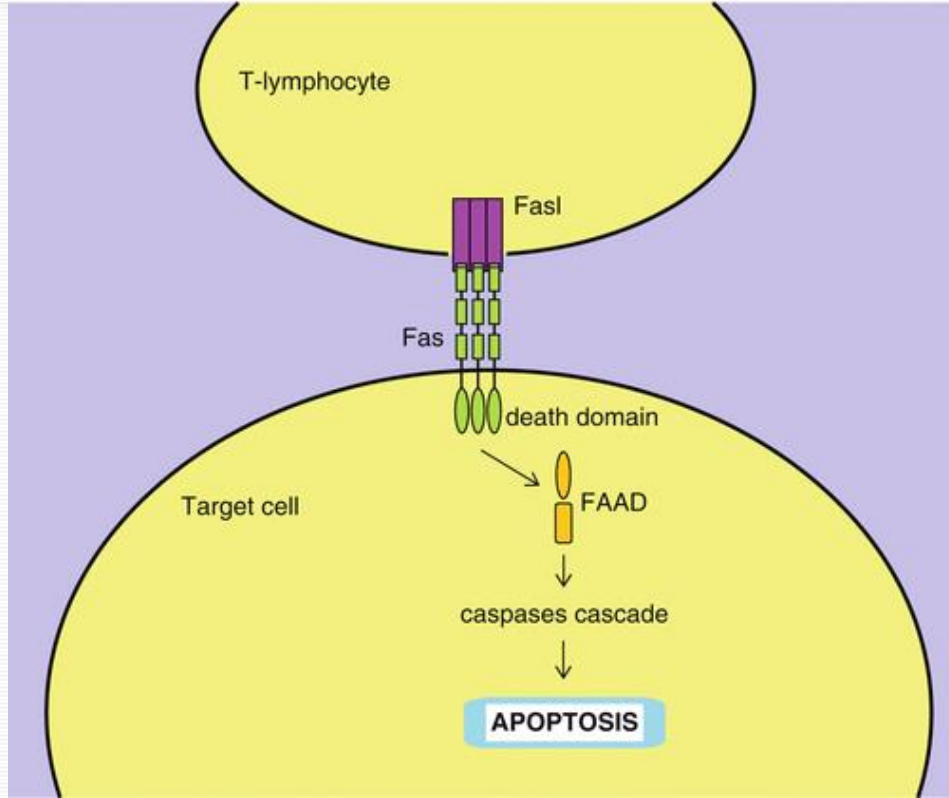
Transplantasyon & Nötrofiller



Yang Li, Wei Wang, Fan Yang, Yanan Xu, Chang Feng and Yong Zhao. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Communication and Signaling* 2019; 17:147.

- ✓ Dalak perimarginal zonunda yer alan nötrofiller özellikle BAFF, APRIL, IL-21 salgılar→ B hücre stimulan faktör
- ✓ TLR sinyalini inhibe eden CD11b ve CD24 ü daha fazla eksprese ederler



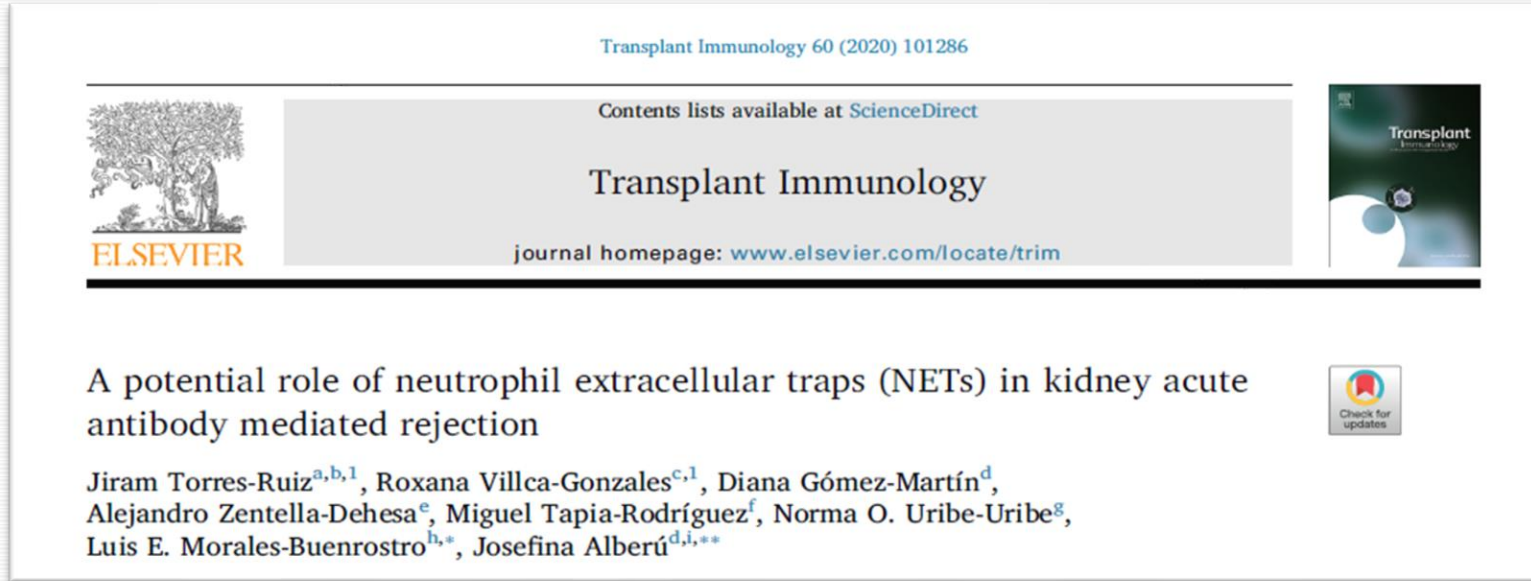


- Nötrofiller, Fas ligand (CD95 ligand) ekspresyonlarını artırarak aktive CD8⁺ T hücrelerini stimüle edebilirler
 - (CCL1, CCL2, CCL5 gibi kemoatraktanları indükleyerek)

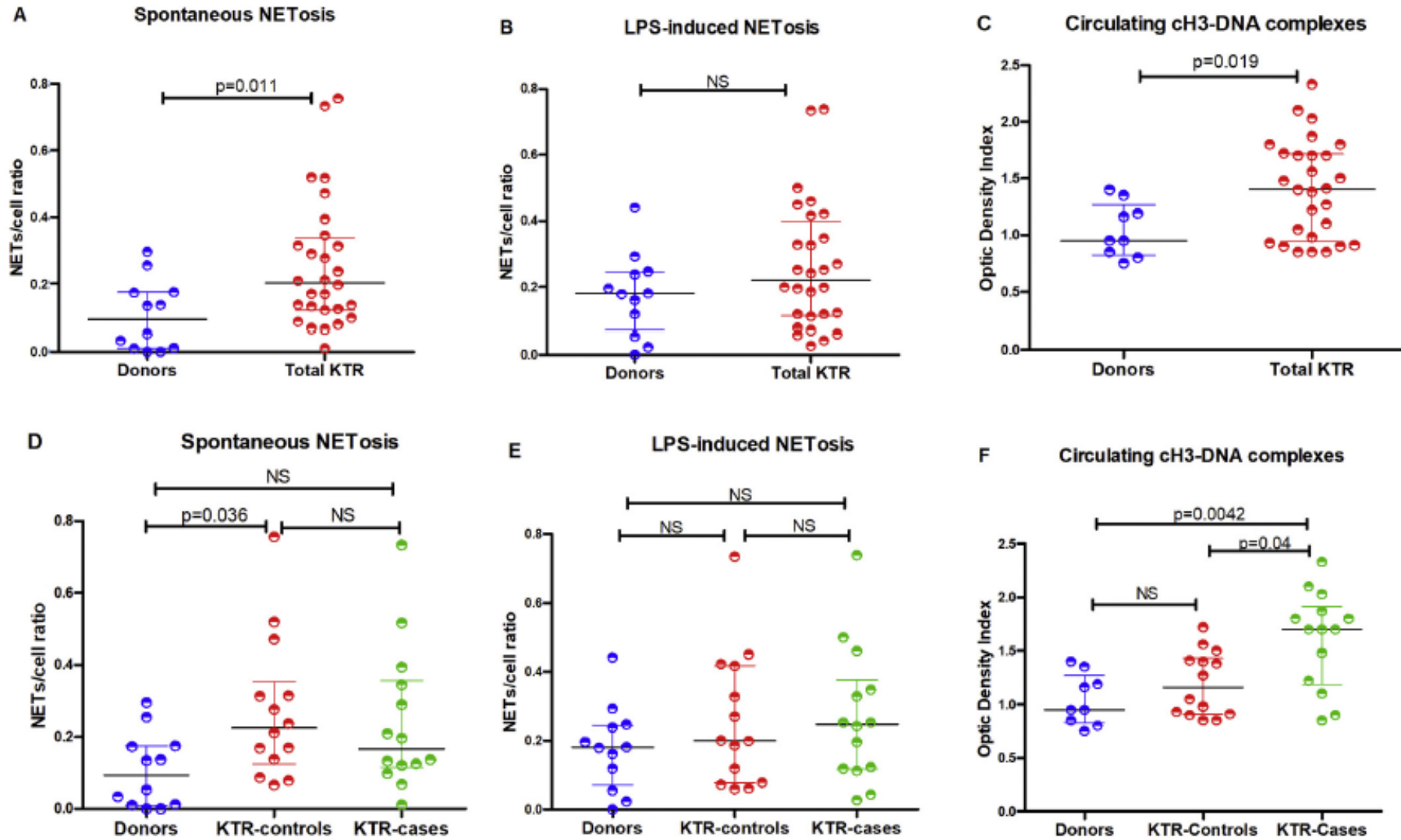
Danielle D et al. Neutrophil expression of Fas ligand and perforin directs effector CD8 T cell infiltration into antigen-challenged skin . J Immunol. 2012 Sep 1;189(5):2191-202.

Transplantasyon & Nötrofiller

Akut hücresel rejeksiyon / Akut humoral rejeksiyon



- ✓ AAMR (n=14)
- ✓ Böbrek tx (herhangi immünolojik olayı olmayan) (n=14) / Kontrol grubu Donör (n=12)
- ✓ Spontan ve lipopolisakkarit ile indüklenen NETosis IF ile değerlendirildi (NET / hücre)
- ✓ Plazmada ELISA ile CitH3-DNA
- ✓ Renal biyopsilerde ise MPO ve cH4 değerlendirildi.



Böbrek nakli yapılmış hastalarda sağlıklı vericilere kıyasla artmış spontan NETosis gözlenirken, AAMR'li olanlarda daha fazla miktarda serumda dolaşan NETs'ler bulunmaktadır.

Transplantasyon & Nötrofiller

NETOZİS

- Akut hasar
- İskemi reperfüzyon hasarı

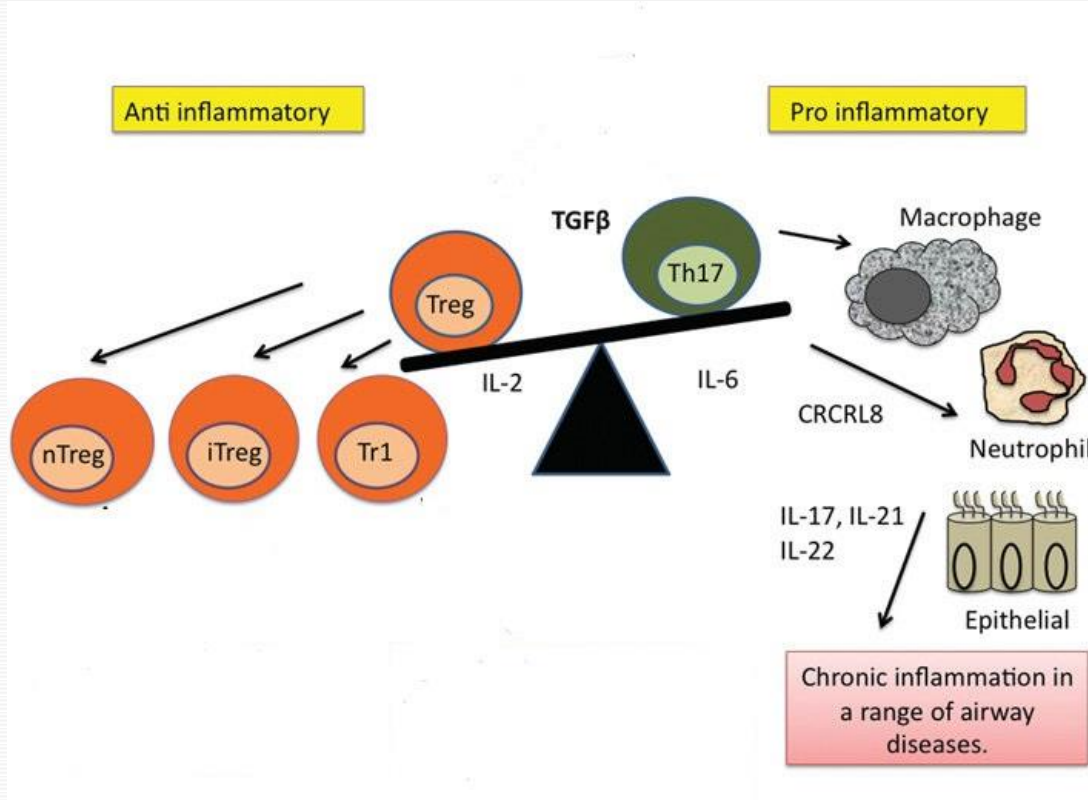
- Akut hücresel rejeksiyon
- Antikor ilişkili rejeksiyon

- Kronik rejeksiyon
- İnflamasyonun rezolüsyonu

Transplantasyon & Nötrofiller

Kronik Rejeksiyon

- Kronik rejeksiyondaki allograftlarda nötrofil infiltrasyonu saptanmıştır. Bu özellikle IL-17 ve Th17 hücreleri ile ilişkilidir.



IL-17 ilişkili nötrofiller

**NETs İlişkili Patolojilerde
Potansiyel Terapötik Hedefler
Neler Olabilir ?**



Table 1 Table representing potential anti-NETs therapeutics and mode of action

Anti-NET therapeutics	Pharmacological compounds	Target	Mode of action
Anti-inflammatory/immunomodulatory	Acetylsalicylic acid (Aspirin)	Cyclooxygenase enzyme (COX),	Inhibits thromboxane A2 inhibiting platelets
	Cyclosporine A	Cytophilin - downregulation of NFAT	Inhibiting the calcineurin pathway
	Chlor-amidine	PAD4	Inhibition of PAD4 required for NETosis
	<i>PGE2</i>	EP2 and EP4 receptors	Physiologic inhibition of NETosis through cAMP-PKA pathway and protein kinase A-dependent manner
Anti-thrombosis	<i>PA-dPEG24</i>	Complement C1	Complement inhibition, blocking MPO pathway of NETosis
	Antibiotic (azithromycin, chloramphenicol, gentamicin)	Cytokines including- IL-6 and IL-8	Immunomodulating effects by influencing the activation and migration of neutrophils
	Thrombomodulin	Protein C	Anticoagulant, inhibit NETosis
	Activated protein C (APC)	Protein C	Anticoagulant, disrupt extracellular histones
NADPH/ROS inhibitors	Heparin	Antithrombin	Anticoagulant, suppresses histones
	Anti-high-mobility group box 1 (Anti-HMGB1)	HMGB1	Modulation of neutrophil chemotaxis, diminish NETOSIS
	C1 esterase inhibitor (C1INH)	Complement factor (factor XIIa), kallikrein	Binds histones
	Metformin	mTORC1, AMPK	Antidiabetic, inhibits mitochondrial ROS, inactivates the PKC-NOX pathway blunting NETosis
Nucleases	Chloroquine/hydroxychloroquine	MMPs, TIMPs	Antimalarial, inhibits cytokine production, interferes with the stimulatory effect of platelet aggregation, maintaining extracellular matrix homeostasis
	Diphenyleneiodonium chloride (DPI)	NADPH	Inhibits NADPH oxidase ROS production
	<i>N</i> -Acetylcysteine (NAC)	ROS	Inhibits ROS production, prevents thrombus formation
	Recombinant human DNase	DNA matrixes	Reduces neutrophil infiltration, cleaves DNA matrixes
Notable compounds	Staphylokinase	Plasminogen, alpha-defensins	Converting NETs to deoxyadenosine mediating death of immune cells
	Probiotics	PKC pathway	Dampening ROS production
	Vitamin D		Reduces endothelial damage, decreases cell apoptosis

Victoria Mutua, Laurel J. Gershwin. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* (2021) 61:194–211

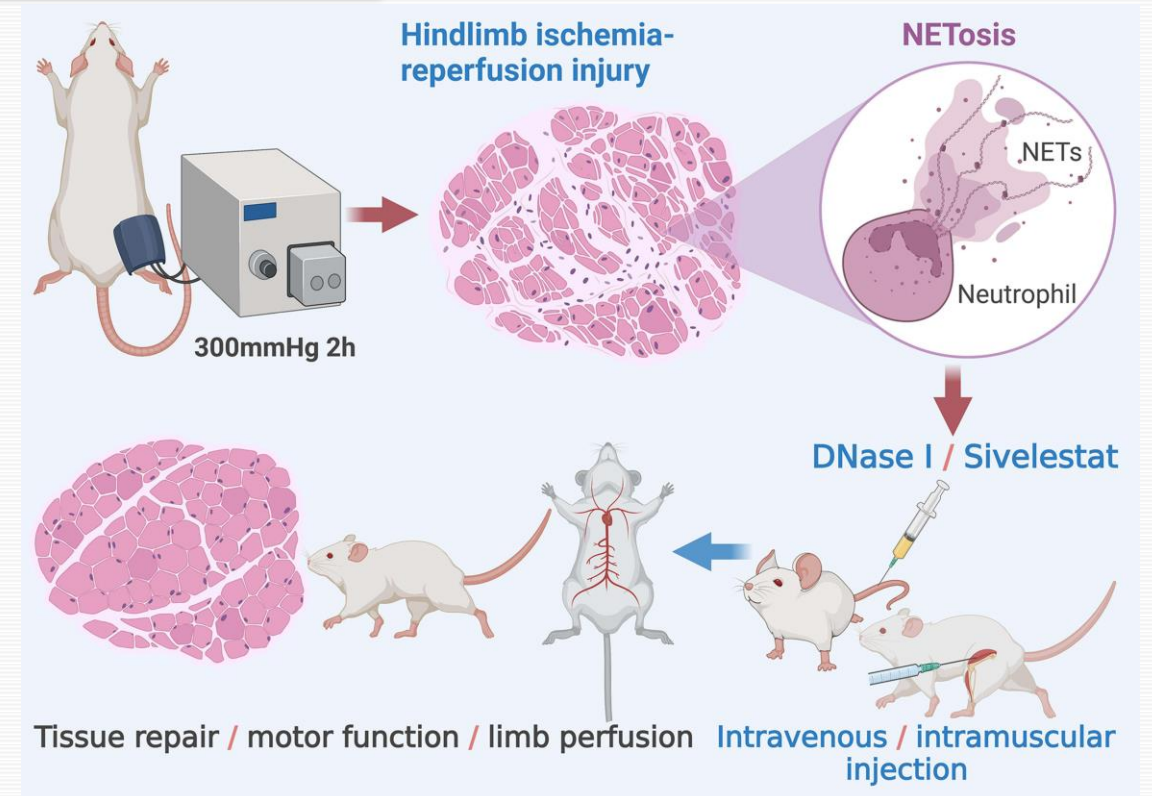
NET İlişkili Patolojilerde Potansiyel Terapötik Hedefler Neler Olabilir ?

- DNase I
- Antihiston antikor kullanımı
- PAD4 inhibisyonu
- High mobility group box 1 blokajı
- PKC inhibisyonu
- NADPH oksidaz inhibitörü
- MPO inhibitörü
- Raf-MEK-ERK yolağının inhibisyonu
- Anti-MPO antikorları
- Glikoprotein IIb / IIIa ile platelet-platelet ilişkisini bloke etmek

DNase I and Sivelestat Ameliorate Experimental Hindlimb Ischemia-Reperfusion Injury by Eliminating Neutrophil Extracellular Traps

Chun-Lian Wang¹, Yan Wang², Qi-Lan Jiang³, Yang Zeng⁴, Qing-Ping Yao⁵, Xing Liu⁶, Tao Li⁷, Jun Jiang¹

- ✓ NETs eliminasyonu IRH'nın yarattığı doku hasarını azaltır, vasküler remodelling, hastalık prognozunda iyileşme
- ✓ DNase I → cfDNA'yı kaldırır, kalp, böbrek ve intestinal sistem de kullanıldı
- ✓ Sivelestat → NE inhibitörü, myokard, mesane, testis, karaciğer, intestinal sistem



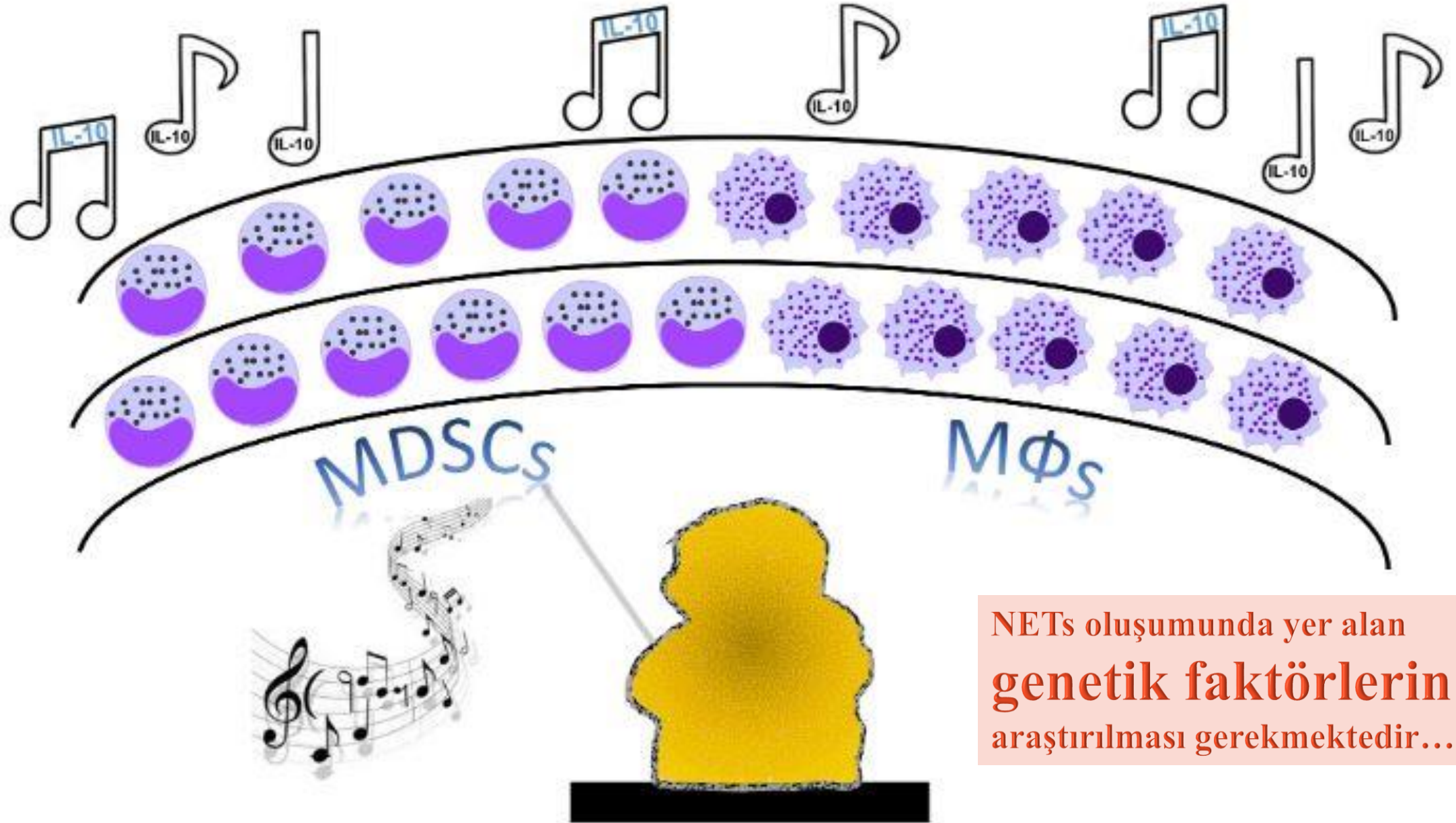
Research Article

Inhibition of Peptidyl Arginine Deiminase-4 Prevents Renal Ischemia-Reperfusion-Induced Remote Lung Injury

- ✓ PAD4 inhibitörü → GSK484, intraperitoneal enjeksiyon
- ✓ Pulmoner PAD4 ekspresyonu, nötrofil infiltrasyonu, Cit-H3 ekspresyonu, NETs, inflamatuvar sitokinler, pulmoner apoptozis değerlendirilmiş.

Son Sözler...

- NETs ve NETosis, anti-inflamatuvar ve pro-inflamatuvar etkilere sahip özel bir nötrofil aktivasyon durumudur.
- NETs yapısı ve içeriği stimulus türüne göre değişir, bu da ekstrasellüler alana çıkan moleküllerin çeşitliliğine neden olur.
- İmmun defansda rol almakla birlikte kontrol altında tutulmadığında konakçı hücresi için toksik etkilere sahiptir.
- İmmun sistemin hem doğal hem adaptif yanıtını içeren transplantasyon gibi komplike süreçlerdeki rolü son yıllarda belirginleşti ve bilgilerimiz artmaya devam ediyor.
- NETs içeriğindeki moleküller özel hasta gruplarında biyobelirteçler bulmamızda, anti-NETs tedaviler ise graft survisini etkileyen patolojileri çözümlememizde faydalı olacaktır....



NETs oluşumunda yer alan
genetik faktörlerin
araştırılması gerekmektedir...

9. Ulusal

Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi

18-21 Nisan 2024

Papillon Zeugma Hotel Kongre Merkezi, Antalya

www.tiged2024.org



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

TEPECİK
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA
HASTANESİ

Teşekkür Ederim...

