



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ | DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE

Προς: Τμήμα Ιατρικής Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης

Θέμα Διατριβής στην Ελληνική και Αγγλική Γλώσσα:

**«ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ ΣΤΗΝ
ΑΝΟΣΟΘΡΟΜΒΩΣΗ»**

**«CELLULAR AND MOLECULAR MEDIATORS IN
IMMUNOTHROMBOSIS»**

Υποψήφια Διδάκτωρ:

Νάτση Αναστασία-Μαρία, Απόφοιτος Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δ.Π.Θ & ΔΜΣ «Βιολογία της Αναπαραγωγής, Βιοδείκτες, Περιγεννητική Ιατρική»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Σκένδρος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης (Επιβλέπων Καθηγητής)**
- **Ρίτης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης**
- **Κόφφα Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης**

Ιούλιος 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Το ανοσολογικό σύστημα αποκρίνεται σε εξωγενή (παθογόνα) και ενδογενή (π.χ. αθηρωμάτωση, αυτοανοσία) φλεγμονώδη ερεθίσματα, με σκοπό την διατήρηση της ομοιόστασης και την προστασία του οργανισμού. Πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος φλεγμονή και θρόμβωση ενεργοποιούνται παράλληλα και αλληλοεπιδρούν λειτουργικά, με σκοπό τον περιορισμό και την αντιμετώπισή του βλαπτικού ερεθίσματος. Η παραπάνω διαδικασία ονομάζεται μηχανισμός της ανοσοθρόμβωσης ή θρομβοφλεγμονής (immunothrombosis/thromboinflammation) [1-4].

Η ανοσοθρόμβωση αποτελεί δραστικό μηχανισμό της φυσικής/έμφυτης ανοσίας [1]. Κυτταρικοί πληθυσμοί και μεσολαβητές που πρωταρχικά συμμετέχουν και συνεργάζονται, είναι τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, το ενδοθήλιο, διάφορες κυτταροκίνες, το σύστημα του συμπληρώματος, καθώς και οι πρωτεάσες του συστήματος της πήξης [5-7].

Τα τελευταία χρόνια η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας, έχει περιγράψει σημαντικά μοριακά και λειτουργικά γεγονότα του μηχανισμού της ανοσοθρόμβωσης σε διάφορα κλινικά μοντέλα σηπτικής και άσηπτης φλεγμονής [8, 9]. Τα ενεργοποιημένα από την θρομβίνη αιμοπετάλια διεγείρουν τα ουδετερόφιλα προς σχηματισμό και απελευθέρωση δομών χρωματίνης (DNA και κιτρολλινοποιημένες ιστόνες), γνωστές ως NETs (εξωκυττάρια δίκτυα χρωματίνης/neutrophil extracellular traps). Τα NETs καθώς απελευθερώνονται (NETωση/NETosis) μεταφέρουν στον εξωκυττάριο χώρο δραστικές πρωτεάσες και αντιμικροβιακές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων. Η NETωση, εκτός από την αντιμικροβιακή της δράση παίζει σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση και επέκταση της θρομβοφλεγμονής [10].

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η διερεύνηση κυτταρικών και μοριακών μεσολαβητών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως προγνωστικοί/διαγνωστικοί βιοδείκτες ανοσοθρόμβωσης. Βασικοί στόχοι της μελέτης αποτελούν: α) η περαιτέρω μελέτη ήδη γνωστών κυτταρικών πληθυσμών και μεσολαβητών ανοσοθρόμβωσης (ουδετερόφιλα, αιμοπετάλια, ιστικός παράγοντας - TF, NETs, συμπλήρωμα) σε διάφορα κλινικά μοντέλα (π.χ.

αθηρωμάτωση, αυτοανοσία, λοίμωξη), β) η προσπάθεια ανίχνευσης και ανάδειξης νέων κυτταρικών υποπληθυσμών και μεσολαβητών ανοσοθρόμβωσης. Θα μελετηθούν ασθενείς με οξεία και χρόνια φλεγμονή (λοιμώδη ή μη λοιμώδη) και διαφορετικό καρδιαγγειακό κίνδυνο (χαμηλός, μέτριος, υψηλός) [11], καθώς και αντίστοιχοι (φύλου/ηλικίας) υγιείς μάρτυρες. Θα χρησιμοποιηθούν σύγχρονες μέθοδοι μεταγραφωμικής, μοριακής και κυτταρικής ανάλυσης, καθώς και σταθμισμένες *in vitro* λειτουργικές δοκιμασίες, με βάση την προηγούμενη εμπειρία του τμήματός μας στην μεταφραστική έρευνα στο πεδίο της θρομβοφλεγμονής.

SUMMARY

The immune system responds to exogenous (pathogenic) and endogenous (e.g., atheromatosis, autoimmunity) inflammatory stimuli, in order to protect from tissue damage and maintain homeostasis. Experimental and clinical studies have shown that during the activation of the immune system inflammation and thrombosis are activated concomitantly and interconnected functionally against several harmful stimuli. This process is called immunothrombosis or thromboinflammation [1-4].

Immunothrombosis is mainly an intravascular effector mechanism of innate immunity [1]. Cellular populations and mediators that primarily participate and cooperate are neutrophils, monocytes, platelets, endothelium, various proinflammatory cytokines, the complement system, as well as the proteases of the coagulation system [5-7].

In recent years, our research team has described key molecular and functional events of the immunothrombosis mechanism in various clinical models of septic and sterile inflammation [8, 9]. Specifically, thrombin-activated platelets trigger neutrophils to form and release extracellularly chromatin structures (DNA and citrullinated histones), known as NETs (extracellular neutrophil extracellular traps). During this process (NETosis), NETs are decorated and transfer to the extracellular space active proteases and antimicrobial proteins from the cytoplasm of neutrophils. Additionally to its antimicrobial activity, NETosis plays an important role in the initiation, propagation and maintenance of thromboinflammation [10].

The purpose of this PhD thesis is to investigate cellular and molecular mediators as potential prognostic/diagnostic biomarkers of immunothrombosis. The main objectives of the study are: a) to further study already known cell subsets and mediators of immunothrombosis (neutrophils, platelets, tissue factor-TF, NETs, complement system) in various relevant clinical models (e.g., atheromatosis, autoimmunity, infection), b) to suggest novel cellular subpopulations and mediators in immunothrombosis. Patients with acute and chronic inflammation (infectious or non-infectious) belonging to different levels of cardiovascular risk (low, moderate, high) [11], as well as gender/age-matched healthy individuals (controls) will be recruited and studied. Classical and next-generation methods of transcriptional, molecular and

cellular analysis, coupled with well-established *in vitro* functional tests, will be used, based on our previous experience in translational research.

References:

1. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
2. Chrysanthopoulou, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts*. J Pathol, 2014. **233**(3): p. 294-307.
3. Mitroulis, I., et al., *Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29318.
4. Stakos, D.A., et al., *Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2015. **36**(22): p. 1405-14.
5. Mastellos, D.C., et al., *Complement C3 vs C5 inhibition in severe COVID-19: Early clinical findings reveal differential biological efficacy*. Clin Immunol, 2020. **220**: p. 108598.
6. Tomasson, G., P.A. Monach, and P.A. Merkel, *Thromboembolic disease in vasculitis*. Curr Opin Rheumatol, 2009. **21**(1): p. 41-6.
7. Apostolidou, E., et al., *Neutrophil extracellular traps regulate IL-1beta-mediated inflammation in familial Mediterranean fever*. Ann Rheum Dis, 2016. **75**(1): p. 269-77.
8. Skendros, P., et al., *Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis*. J Clin Invest, 2020. **130**(11): p. 6151-6157.
9. Kambas, K., et al., *Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45427.
10. Stakos, D., et al., *Traps N' Clots: NET-Mediated Thrombosis and Related Diseases*. Thromb Haemost, 2020. **120**(3): p. 373-383.
11. Kleemann, R., et al., *Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis*. Genome Biol, 2007. **8**(9): p. R200.