บทบาทของ Shiga Toxin กับกลไกการเกิด Hemolytic Uremic Syndrome

Roles of Shiga Toxin in Pathogenesis of Hemolytic Uremic Syndrome

กุลวรา พูลผล*

Kulwara Poolpol*

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University

Received : 17 February 2016

Accepted : 26 July 2016

Published online : 11 August 2016

บทคัดย่อ

Hemolytic uremic syndrome (HUS) เป็นกลุ่มอาการที่มีลักษณะของภาวะซีดจากการมีเม็ดเลือดแดงแตก การอุดตันของหลอดเลือดที่ไต และการเกิดไตวายเฉียบพลัน ซึ่งสาเหตุหนึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการสร้าง Shiga toxin ได้แก่ *Shigella* spp. และที่พบเป็นสาเหตุมากที่สุดคือ *Escherichia coli* ที่สร้าง Shiga toxin ได้ หรือ enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) โดยมีปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญได้แก่ Shiga toxin (Stx) หลังจากที่ได้รับเชื้อ EHEC เข้าไปในร่างกายโดยการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไปจะทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และประมาณ 10% ของผู้ติดเชื้อสามารถเกิดภาวะแทรกซ้อน HUS ได้ โดยส่วนมากพบในผู้ติดเชื้อที่เป็นเด็กหรือผู้สูงอายุ การศึกษาถึงกลไกในการเกิด HUS นี้ เป็นที่น่าสนใจและมีความสำคัญอย่างมากในการทำให้เข้าใจถึงกระบวนการเกิดโรค ในบทความนี้ได้อธิบายถึงลักษณะทั่วไปของ Stx บทบาทของ Stx และกลไกในการเกิด HUS ที่มีสาเหตุจาก Stx ทั้งกระบวนการที่เกิดจาก Stx โดยตรงและกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับระบบคอมพลีเมนท์

คำสำคัญ : Shiga toxin, Typical Hemolytic Uremic Syndrome, Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), ระบบคอมพลีเมนท์

*Corresponding author. E-mail : kulwara@buu.ac.th

Abstract

Hemolytic uremic syndrome (HUS) is characterized by microangiopathic hemolytic anemia, glomerular thrombotic microangiopathy and acute renal failure. It is most common caused by infection with Shiga toxin producing bacteria such as *Shigella* spp. and especially Shiga toxin-producing *Escherichia coli* or enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Shiga toxin (Stx) is the most important virulent factor of EHEC. After ingestion contaminated foods, Stx initially causes gastrointestinal infection and approximately 10% of cases progress to HUS, especially in children and elderly. Study of HUS pathogenesis is interesting and important for a better understanding of the pathogenesis. In this review, characterization of Stx, role of Stx and mechanisms of Stx leading to HUS were described. Furthermore, the pathogenesis associated with the complement system was elucidated.

Keywords : Shiga toxin, Typical Hemolytic Uremic Syndrome, Enterohemorrhagic *E. Coli* (EHEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), The complement system

บทนำ

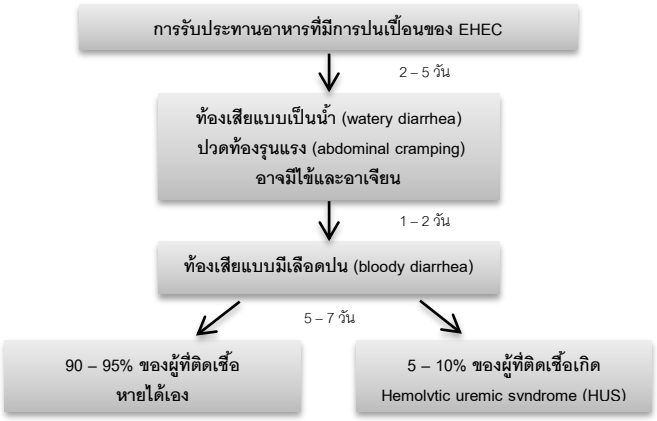
Shiga toxin (Stx) เป็นสารพิษ มีชื่อเรียกตามเชื้อ *Shigella dysentery* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่พบว่าสามารถผลิตสารพิษนี้ได้ และมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Verotoxin เนื่องจากสามารถทำลาย Vero cells ได้ (Gyles, 1992) ต่อมาพบว่าเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ผลิตสารพิษนี้ได้เช่นกัน จึงเรียก *E. coli* สายพันธุ์นี้ว่า Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) หรือ verotoxin-producing *E. coli* (VTEC)

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง Stx ได้และมีความรุนแรงมากที่สุด ได้แก่ *E. coli* O157:H7 เนื่องจากทำให้เกิดการระบาดที่รุนแรง และเมื่อไม่นานมานี้มีการระบาดครั้งใหญ่ในประเทศเยอรมันนี ในเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2554 จากสายพันธุ์ *E. coli* O104:H4 ซึ่งเป็น Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) แต่สามารถผลิต Stx ได้ หรืออาจเรียกเป็น enteroaggregative hemorrhagic *E. coli* (EAHEC) O104:H4 ซึ่งทำให้มีผู้ติดเชื้อจำนวนมาก (Beutin & Martin, 2012, Loos *et al*., 2012)

EHEC หรือ STEC สามารถพบได้ในทางเดินอาหารของสัตว์ เช่น วัว ควาย หมู และสัตว์ใหญ่ที่กินพืชหรือหญ้าเป็นหลัก เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานในสภาพแวดล้อมที่มี pH ต่ำๆ และสามารถเจริญเติบโตและพบการปนเปื้อนได้ในพืชผัก อาหาร นม และเครื่องดื่มต่างๆ เช่น น้ำแอปเปิ้ล น้ำส้ม เป็นต้น

การติดเชื้อ EHEC หรือ STEC ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและอาจเกิดกลุ่มอาการ Hemolytic uremic syndrome (HUS) ได้ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่เกิดจากการมีเม็ดเลือดแดงแตก ภาวะซีด ไตวายเฉียบพลัน เป็นต้น การติดเชื้อส่วนใหญ่แล้วเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป (Caprioli *et al*., 2005) ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรคได้นั้น ต่ำกว่า 100 เซลล์ และเมื่อได้รับเชื้อเข้าไปแล้ว ภายใน 2 – 5 วัน จะเกิดท้องเสียแบบเป็นน้ำ (watery diarrhea) และมักมีเลือดหรือมูกเลือดปนด้วย (bloody diarrhea) เนื่องจากเชื้อทำให้เกิดมีเลือดออกในทางเดินลำไส้ (hemorrhagic colitis) ในบางราย มีอาการปวดท้องรุนแรง (abdominal cramping) อาเจียน มักไม่พบอาการไข้ ส่วนใหญ่จะสามารถหายได้

เองภายใน 5 - 10 วัน ประมาณ 5 - 10% ของผู้ที่ติดเชื้อ สามารถเกิดกลุ่มอาการ HUS ตามมาได้ ซึ่งส่วนมากจะเกิดในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี และในผู้สูงอายุ (Palermo *et al*., 2009) ขั้นตอนและระยะเวลาในการเกิดโรค ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 อาการและระยะเวลาในการเกิดโรคจากการติดเชื้อ EHEC

ปัจจัยในการก่อโรคของ EHEC

EHEC มีปัจจัยในการก่อโรคหลายชนิด โดยทั่วไปปัจจัยสำคัญในขั้นตอนแรกคือ การเกาะติด (adhesion) กับเซลล์ของร่างกายมนุษย์ (โฮสต์เซลล์; host cells) โดยโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดนี้ ได้แก่ adhesin ซึ่งจะไปจับบนผิวของโฮสต์เซลล์บริเวณที่มี receptor หรือบริเวณที่จะก่อโรคเพื่อที่จะเริ่มกระบวนการก่อโรคต่อไป นอกจากนี้แล้ว pili, outer membrane proteins เช่น invasin-intimin family of proteins, surface carbohydrates ก็ยังมีคุณสมบัติในการเป็น adhesin ได้อีกด้วย ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง ได้แก่ Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป มีส่วนประกอบทางเคมีและทางชีวภาพที่แตกต่างกันในแต่ละสปีชีร์ LPS มีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิด innate immune response ผ่านทาง Toll-like receptor (TLR) 4 ทำให้มีการหลั่ง pro-inflammatory mediators ต่างๆ แคปซูลก็เป็นปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญโดยมีคุณสมบัติในการป้องกันแบคทีเรียจากการถูกจับกินโดยเม็ดเลือดขาว (anti-phagocytosis) กลไกหนึ่งเนื่องจากการที่มีแคปซูลอยู่รอบเซลล์ของแบคทีเรียทำให้ C3b ที่เกาะอยู่บนผิวของแบคทีเรียไม่สามารถจับกับ C3b receptor บนเม็ดเลือดขาวหรือ phagocytes ได้ จึงไม่ถูกจับกิน และยังมีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดของแบคทีเรียด้วย Endotoxins จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง pro-inflammatory cytokines ซึ่งทำให้เกิดอาการไข้ ช็อค โลหิตเป็นพิษ และการติดเชื้อที่อวัยวะต่างๆ ทั่วร่ายกายได้ Exotoxins มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดอาการท้องเสียและภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ สำหรับเชื้อ EHEC ปัจจัยก่อโรคที่มีความรุนแรงมากที่สุด ได้แก่ exotoxin ซึ่งมีชื่อว่า Shiga toxin (Karch, 2001)

Shiga toxin (Stx)

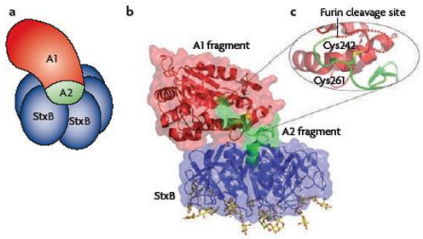
Shiga toxin มีชื่อมาจาก toxin ของ*Shigella dysenteriae* serotype 1 (O'Brien *et al*., 1982) ซึ่งมีโครงสร้างและคุณสมบัติเหมือนกันกับที่พบในเชื้อ EHEC

<u>โครงสร้างของ Stx</u>

Stx ถูกถอดรหัสสารพันธุกรรมมาจากยีนใน pathogenicity islands (PAI) ซึ่งมาจาก bacteriophages มีขนาด 70 kDa มีโครงสร้างเป็นแบบ AB_5 holotoxin ซึ่งประกอบด้วย A subunit ที่มีขนาด 30 kDa (A1 และ A2 fragments ที่มีขนาด 27.5 kDa และ 7.5 kDa ตามลำดับ) และ B subunits ซึ่งประกอบไปด้วย 5 subunits ที่เหมือนกัน โดยมีขนาด subunit ละ 7.5 kDa (O'Brien & Holmes, 1987, Obrig, 1997) (ภาพที่ 2) B subunits เป็นส่วนที่ใช้ในการจับกับ receptors ของ Stx ซึ่งได้แก่ globotriaosylceramide (Gb3) และจำพวก glycolipid receptors โดยที่ A subunit ทำหน้าที่สลาย (hydrolyze) adenine residues ของ 60S ribosomal subunit ของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) (Lingwood, 1996)

<u>ชนิดของ Stx</u>

สามารถแบ่ง Stx ได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ Stx1 และ Stx2 โดย A subunit ของ Stx ทั้งสองชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน 57% และใน B subunits มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน 60% (Muthing *et al*., 2009) Stx1 เป็นชนิดเดียวกับที่พบใน *S. dysenteriae* serotype 1 (Takao *et al*., 1988) Stx2 มีบทบาทคล้ายกับ Stx1 แต่มีความรุนแรงในการก่อโรคและมีความเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิด HUS มากกว่า (Jenkins *et al*., 2003) เชื้อ EHEC อาจผลิต Stx1 หรือ Stx2 ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรืออาจพบผลิตได้ทั้งสองชนิดก็ได้ (O'Brien *et al*., 1992, Nakao & Takeda, 2000)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Shiga toxin ดัดแปลงจาก (Johannes & Romer, 2010)

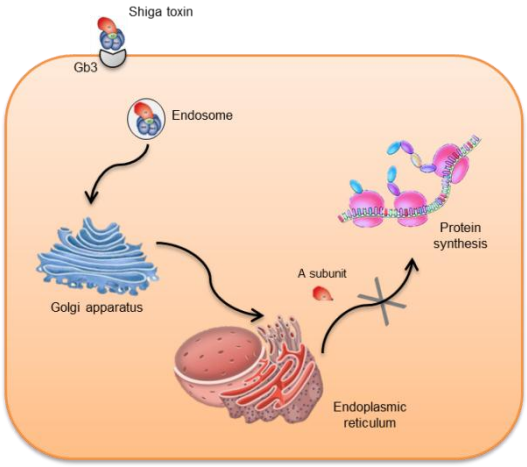
(a) แสดงรูปร่างของ Shiga toxin ซึ่งประกอบไปด้วย A subunit (A1 และ A2 fragments) และ B subunits (pentameric B subunits)

(b) แสดงโครงสร้างสายเปปไทด์ของ Shiga toxin และบริเวณส่วนที่ใช้จับกับ globotriaosylceramide (Gb3) ซึ่งอยู่ในส่วน B subunits

(c) แสดงบริเวณของ A subunit ที่จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ furin และบริเวณ disulphide bond ที่เชื่อมระหว่าง A1 และ A2 fragments

<u>บทบาทของ Stx</u>

Stx มีคุณสมบัติเป็น cytotoxin คือเป็นพิษต่อเซลล์หรือทำลายเซลล์ Stx จะจับกับ receptor ของมัน ซึ่งได้แก่ globotriaosylceramide (Gb3) ผ่านทาง B subunits และจะเข้าไปในเซลล์โดยกระบวนการ endocytosis โดยจะอยู่ใน vesicle หรือเรียกว่า endosome และเคลื่อน (retrograde transport) ผ่าน Golgi apparatus และไปยัง endoplasmic reticulum จากนั้นส่วนของ A subunit จะถูกย่อยโดย furin-like protease ให้แยกตัวออกมาจากนั้น A1 fragment จะย่อยเบสอะดีนีน (adenine residues) ใน 28S ribosomal RNA ของ 60S ribosomal subunit โดยมีผลกับการ folding ของโปรตีน จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและทำให้เกิด apoptosis หรือการตายของเซลล์ในที่สุด (Johannes & Romer, 2010, Lee *et al*., 2010) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ Shiga toxin ภายในโฮสต์เซลล์

B subunits ของ Shiga toxin จับกับ Gb3 ซึ่งเป็น receptor บนผิวของเซลล์จากนั้นถูก endocytosis เข้ามาอยู่ใน endosome และการเคลื่อนที่ (retrograde transport) ภายในเซลล์ไปยัง Golgi apparatus และ endoplasmic reticulum จากนั้น A subunit (fragment A) จะถูกย่อยและไปยัง ribosome ทำให้เกิดการ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งทำให้เซลล์ตายในที่สุด

Hemolytic uremic syndrome (HUS)

HUS มีลักษณะอาการที่สำคัญ ได้แก่ ซีดจากภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (microangiopathic hemolytic anemia) ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) และไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ในทางพยาธิสภาพ HUS เป็นลักษณะของการอุดตันของหลอดเลือดที่ไต (glomerular thrombotic microangiopathy) เนื่องจาก endothelial cells ถูกทำลาย โดยที่เซลล์จะเริ่มมีการบวมและหลุดออกจาก basement membrane จากนั้นจะเกิดการกระตุ้นของระบบการแข็งตัวของเลือด (coagulation) มีการแสดงออกของ von Willebrand factor (vWF) ซึ่งทำให้มีการดึงดูดเกล็ดเลือด (platelet) และเกิดการรวมตัวของ fibrin ทำให้เกิด microthrombi เกิดการอุดตันในหลอดเลือดและทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย (Ruggenenti *et al*., 2001)

โดยทั่วไปแล้ว สาเหตุของการเกิด HUS สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามสาเหตุที่แตกต่างกัน ได้แก่

1) Typical HUS หรือ diarrhea-associated HUS (D+HUS) หรือ EHEC-associated HUS (eHUS) มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ EHEC หรือ STEC พบว่า 90% ของผู้ที่มีอาการ HUS เป็นชนิด D+HUS ผู้ที่ติดเชื้อ EHEC แล้วพบว่าจะมีประมาณ 10% ของผู้ที่ติดเชื้อเกิด HUS ตามมา โดยส่วนใหญ่จะพบในเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 5 ปี และในผู้สูงอายุ

2) Atypical HUS (aHUS) หรือ non-diarrhea hemolytic uremic syndrome (D-HUS) พบ HUS ชนิดนี้ไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อหายแล้วสามารถเกิดอาการซ้ำกลับมาอีกได้ (recurrence) aHUS ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ EHEC แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบอาการท้องเสียได้ในผู้ป่วยบางราย (Rosales *et al*., 2012) สาเหตุของการเกิด aHUS คือ เกิดจากความบกพร่อง การกลายพันธุ์ (mutations) หรือเกิด polymorphisms ของโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมการทำงาน (regulatory proteins) ของระบบคอมพลีเมนท์ (complement system) ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับ alternative pathway ได้แก่ complement factor H (CFH), complement factor H-related proteins 1,3, 4 (CFHR-1, CFHR-3, CFHR-4), membrane co-factor protein (MCP หรือ CD46), factor I (FI), complement activators factor B (FB), complement component 3 (C3)เป็นต้น (Zipfel *et al*., 2007, Jozsi *et al*., 2008, Dragon-Durey *et al*., 2009, Moore *et al*., 2010) ความบกพร่องของโปรตีนดังกล่าวทำให้ไม่สามารถควบคุมการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ได้ เกิดการกระตุ้นคอมพลีเมนท์มากเกินไป จึงทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ร่างกาย นอกจากนี้ยังพบ aHUS ในผู้ป่วยที่มี FH autoantibodies ซึ่งเกิดจากความบกพร่องของ CFHR-1 และทำให้สามารถจัดเป็น HUS อีกกลุ่มหนึ่งได้ว่า DEAP-HUS (Deficiency of CFHR plasma proteins and Autoantibody Positive form of Hemolytic Uremic Syndrome) (Zipfel *et al*., 2010)

กลไกการเกิด Typical HUS

ดังที่กล่าวข้างต้น typical HUS เกิดจากการติดเชื้อ EHEC หรือ *E. coli* ที่มีการผลิต Stx ได้ทำให้มีการติดเชื้อที่ทางเดินอาหารมีอาการท้องเสีย แบบมีเลือดปน ซึ่งบทบาทของ Stx ในการทำให้เกิดการท้องเสียนั้นคล้ายกับ exotoxin ชนิดอื่น โดยทำให้เกิดการติดเชื้อที่บริเวณลำไส้ใหญ่ Stx จะไปทำลาย brush border microvilliในลำไส้ใหญ่ Stx สามารถทำลาย microvascular endothelial cells ซึ่งทำให้เกิดเลือดออกในลำไส้ใหญ่ (hemorrhagic colitis) จึงพบอุจจาระมีเลือดปน (Jacewicz *et al*., 1999)

สำหรับกลไกในการเกิด HUS นั้น หลังจากที่ Stx เข้าไปในทางเดินอาหารและอยู่ภายใน intestinal epithelial cells แล้ว Stx จะสามารถผ่านออกไปยังกระแสเลือดได้ กระบวนการดังกล่าวนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาจเกี่ยวข้องกับการจับกับ Gb4 (globotriosylceramide) receptors บน epithelial cells (Zumbrun *et al*., 2010) เซลล์เป้าหมายของ Stx คือ glomerular endothelial cells ที่ไต และคาดว่า Stx จะเคลื่อนที่ภายในกระแสเลือดไปยังไตโดยอาศัยการจับกับเซลล์ต่างๆ ที่อยู่ในกระแสเลือด มีงานวิจัย พบว่า Stx สามารถจับได้กับ P blood group antigens บนเม็ดเลือดแดง, ลิมโฟไซต์ชนิด B (Cohen *et al*., 1990), โมโนไซต์, กรานูโลไซต์ (te Loo *et al*., 2000), เกล็ดเลือดและกลุ่มของเกล็ดเลือดที่เกาะกับเม็ดเลือดขาว (platelet-leukocyte aggregates; PLAs) (Cohen *et al*., 1990, Bitzan *et al*., 1994, Lingwood, 1999, te Loo *et al*., 2000, Stahl *et al*., 2009) โดยที่พบว่านิวโตรฟิลน่าจะเป็นเซลล์ที่สำคัญที่สุดในการนำ Stx ไปยังไต (te Loo *et al*., 2000) และมีงานวิจัยให้เหตุผลสนับสนุนว่า Stx จับกับ receptor บนนิวโตรฟิลได้อย่างหลวมๆ (low affinity) ดังนั้นเมื่อ Stx เจอกับ Gb3 ก็จะหลุดออก

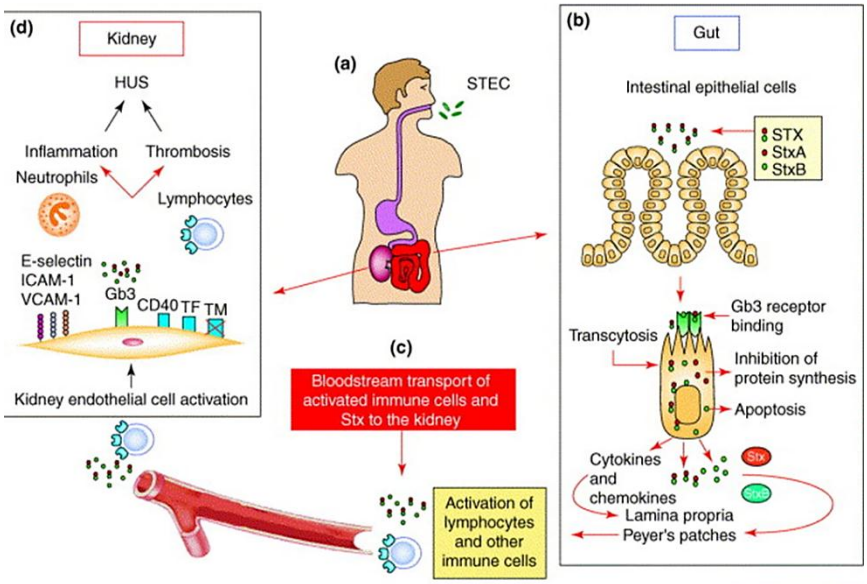
จาก receptor บนนิวโตรฟิลและไปจับกับเซลล์ที่มี Gb3 แทน (Griener *et al*., 2007) Brigotti และคณะยังพบอีกว่า receptor ที่อยู่บนนิวโตรฟิลที่ทำหน้าที่จับกับ Stx ได้แก่ Toll-like receptor (TLR) 4 (Brigotti *et al*., 2013)

Gb3 พบได้บน endothelial cells ที่ไต สมอง ตับ ตับอ่อน หัวใจ และ hematopoietic cells (Ergonul *et al*., 2003, Griener *et al*., 2007) สามารถถูกกระตุ้นให้แสดงออกได้โดย proinflammatory cytokines อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดที่อธิบายว่าเพราะเหตุใดจึงไปเกิดโรคที่ไต แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่า Gb3 มีการแสดงออกที่ไตมากที่สุด นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานพบว่า podocytes และ renal tubules ก็มีการแสดงออกของ Gb3 เช่นกัน (Hughes *et al*., 1998, De Petris *et al*., 2006, Morigi *et al*., 2006, Locatelli *et al*., 2014) Stxใช้ B subunits จับกับ Gb3 จากนั้นจะถูกนำเข้าไปในเซลล์โดยกระบวนการ endocytosis และอยู่ภายใน endosome จากนั้นเคลื่อน (retrograde transport) ผ่าน Golgi apparatus และ endoplasmic reticulum ส่วน A subunit จะถูกย่อยและ A1 fragment จะย่อยอะดีนีน (adenine residues) ใน 28S ribosomal RNA มีผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์ และยังมีรายงานพบว่า Stx สามารถทำลาย nuclear DNA ของเซลล์ซึ่งชักนำให้เกิดการ apoptosis ได้ (Brigotti *et al*., 2002)

นอกจากนี้แล้ว มีงานวิจัยพบว่า Stx จะทำหน้าที่เสมือนเป็น NF-κβ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ glomerular endothelial cells หลั่ง cytokines เช่น interleukin-8 (IL-8) และยังกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ P-selectin ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่จับกับเม็ดเลือดขาวบนผิวของ glomerular endothelial cells ด้วยจึงทำให้มีการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวมาที่ไตมากขึ้น (Zoja *et al*., 2002)

การจับกับของ Stx กับเซลล์เม็ดเลือดยังไปกระตุ้น macrophage ให้มีการหลั่ง cytokines, tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6 และ IL-8 ซึ่งสนับสนุนให้เกิด glomerular endothelial และ renal tubular ถูกทำลาย (van Setten *et al*., 1996, Nakao & Takeda, 2000) การตายของ microvascular endothelial cells ยังกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเกล็ดเลือด (platelet activation) และการสร้าง fibrin ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะอุดตันของหลอดเลือด (thrombosis) และเกิด thrombocytopenia นอกจากนี้แล้ว von Willebrand factor (vWF), platelet aggregating factor และ plasminogen activator inhibitor-1 ซึ่งถูกหลั่งมาจาก activated endothelial cells ก็ยังทำให้เกิด platelet adhesion และmicrothrombi formation บน endothelial cells

การศึกษาความสัมพันธ์ของ Stx กับ vWF ซึ่งเป็น multimeric plasma glycoprotein มีบทบาททำให้เกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือดพบว่า Stx สามารถจับกับ vWF ได้และยังสามารถยับยั้งการทำงานของ ADAMTS13 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย vWF (Nolasco *et al*., 2005, Lo *et al*., 2013) ดังนั้นจึงทำให้เกิดการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดที่มากเกินไปและเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด กลไกการเกิด HUS จากเชื้อ EHEC แสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงกลไกการเกิด hemolytic uremic syndrome (HUS) โดย Shiga toxin

(a) หลังจากที่ได้รับเชื้อ STEC หรือ EHEC เข้าไปในระบบทางเดินอาหาร

(b) เชื้อหลั่ง Stx ซึ่งจับกับ Gb3 receptor ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ทำให้เกิด apoptosis รวมถึงมีการหลั่ง pro-inflammatory cytokines และ chemokines ต่างๆ

(c) Stx จับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์อื่นๆ เพื่อเคลื่อนไปยังไต

(d) glomerular endothelial cells ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ receptor ต่างๆ การทำงานของ coagulation factors และ adhesion molecules ซึ่งยังส่งผลให้เกิดการรวมตัวของเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก เกิดการอักเสบ (inflammation) เกิดการอุดตันของเลือด (thrombosis) และทำให้เกิดการทำงานของไตผิดปกติในที่สุด (Heyderman *et al*., 2001)

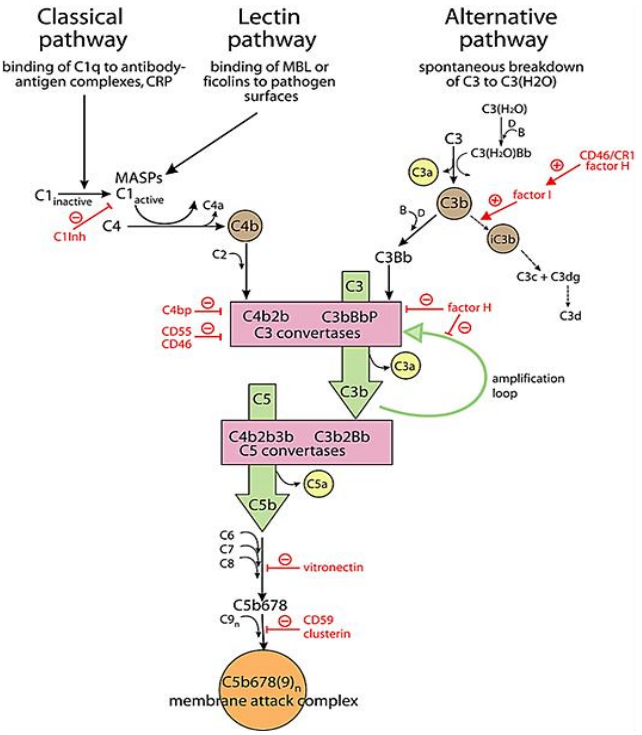
อย่างไรก็ตาม กลไกในการเกิด HUS จากการติดเชื้อ EHEC ก็ยังไม่สามารถอธิบายได้ทั้งหมด และปัจจุบันการศึกษาในหนูทดลองก็ยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก เนื่องจากในหนูไม่มีการแสดงออกของ Gb3 ซึ่งเป็น receptor ของ Stx นอกจากกลไกการเกิดโรคที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น เมื่อไม่นานมานี้ พบว่านอกจากที่ Stx จะมีผลทำลายเซลล์โดยตรงแล้ว ระบบคอมพลีเมนท์ก็มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด HUS โดยพบว่า Stx สามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ที่มากขึ้น (Orth *et al*., 2009) ซึ่งสามารถส่งผลทำให้เซลล์ถูกทำลายได้เช่นกัน

กลไกการเกิด Typical HUS กับระบบคอมพลีเมนท์

ระบบคอมพลีเมนท์เป็นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายชนิด innate immune response ประกอบไปด้วยโปรตีนประมาณ 30 - 40 ชนิด ทั้งที่อยู่อิสระใน plasma และที่อยู่บนผิวของเซลล์ มีบทบาทในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกาย กำจัดเซลล์ที่ตายแล้ว และเกี่ยวข้องกับการพัฒนาให้เกิด adaptive immunity เป็นต้น การกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์

แบ่งออกได้เป็น 3 กลไก (pathways)ได้แก่ classical pathway, lectin pathway และ alternative pathway โดยมีการกระตุ้นที่ต่างกันคือ classical pathway และ lectin pathway เกิดจาก antigen-antibody complex หรือการจับกับจุลินทรีย์สำหรับ alternative pathway สามารถเกิดได้โดยไม่ต้องอาศัยแอนติบอดีเป็นตัวกระตุ้น แต่สามารถถูกกระตุ้นได้โดยสารหลายชนิด เช่น โพลีแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เป็นต้น ท้ายสุดของการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์จะทำให้เกิด membrane attack complex (MAC) เกิดเป็นช่องที่ผิวเซลล์และทำให้เซลล์ตาย การเกิดการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ที่มากเกินไปสามารถทำให้เซลล์ที่บริเวณนั้นเกิดความเสียหายได้ อย่างไรก็ตามในระบบคอมพลีเมนท์ก็มีโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ไม่ให้ถูกกระตุ้นมากเกินไป เช่น factor H, factor I, CD46 หรือ membrane cofactor protein เป็นต้น (ภาพที่ 5)

เป็นที่ทราบกันว่าความบกพร่องของการทำงานในระบบคอมพลีเมนท์เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิด atypical HUS แต่สำหรับ typical HUS มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ EHEC อย่างไรก็ตาม เมื่อไม่นานมานี้มีงานวิจัยค้นพบว่าระบบคอมพลีเมนท์ก็มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิด typical HUS ได้เช่นกัน



ภาพที่ 5 ระบบคอมพลีเมนท์ การกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ประกอบด้วย 3 pathways ได้แก่ classical pathway, lectin pathway และ alternative pathway โดยสุดท้ายแล้วทั้ง 3 pathways ทำให้เกิด terminal membrane attack complex เหมือนกัน (Oksjoki *et al*., 2007)

มีการศึกษาพบว่า Stx สามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ผ่านทาง alternative pathway ได้ (Orth *et al*., 2009) และยังพบการเกิด C3 deposition บน platelet-leukocyte complex ของผู้ป่วย typical HUS ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดการ

กระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ขึ้นบนผิวของเซลล์ (Stahl *et al*., 2011) การศึกษาปริมาณโปรตีนในระบบคอมพลีเมนท์ใน serum ของผู้ป่วยที่เป็น acute typical HUS พบว่ามีปริมาณ factor B (Bb) และ soluble terminal complement complex หรือ sC5b-9 มากกว่าในคนปกติและในผู้ป่วยโรคไตระยะสุดท้าย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าระบบคอมพลีเมนท์มีการถูกกระตุ้นในช่วงเวลาเริ่มต้นที่เป็น HUS (Thurman *et al*., 2009, Ferraris *et al*., 2015) Stx ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ และ C3a ที่เกิดมีผลกับการแสดงออกของ P-selectin ทำให้เกิด microvascular thrombosis นอกจากนี้แล้วการทดลองในหนูที่มี factor B บกพร่อง (factor B-deficient mice) ซึ่ง factor B เป็นตัวสำคัญในการกระตุ้นคอมพลีเมนท์ พบว่าไม่เกิดความผิดปกติของ glomerular cells หรือการทำงานของไตผิดปกติ ชี้ให้เห็นว่าคอมพลีเมนท์มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรค อย่างไรก็ตาม การทดลองในหนูทดลอง บางครั้งอาจจะไม่ประสบความสำเร็จมากนัก เนื่องจากหนูทดลองอาจจะไม่เกิดภาวะ glomerular thrombotic microangiopathy เลยก็ได้เนื่องจากปกติแล้วหนูไม่มี Gb3 ซึ่งเป็น receptor ของ Stx (Morigi *et al*., 2011) Rvidsson และคณะ พบว่า Stx สามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดแดงแตก (complement-mediated hemolysis) และเกิด complement-coated red blood cell microvesicles ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันได้ (Arvidsson *et al*., 2015)

โปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ มีบทบาทสำคัญมากในการควบคุมการทำงานไม่ให้มากเกินไป มีหลายงานวิจัยอธิบายกลไกของ Stx ในการจับกับโปรตีนดังกล่าวซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ที่มากเกินไปและทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ในที่สุด Orth และคณะ พบว่า Stx สามารถจับกับ factor H และทำให้การทำงานของ factor H บนผิวของ epithelial-like cells ช้าลง (Orth *et al*., 2009) นอกจากนี้ Stx ยังสามารถจับได้กับโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ FH ตัวอย่างเช่น factor H-like protein 1 (FHL-1) และ factor H-related protein1(FHR-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานระบบคอมพลีเมนท์เช่นกัน (Poolpol *et al*., 2014) Stx ลดการแสดงออกของ CD59 บน renal tubular epithelial และ glomerular endothelial cells (Ehrlenbach *et al*., 2013) นอกจากนี้แล้ว ยังมีรายงานการเสียชีวิตของผู้ป่วย typical HUS ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ mutation ของ CD46 ซึ่งทำให้การทำหน้าที่ในการควบคุมระบบคอมพลีเมนท์ลดลง (Fang *et al*., 2008) และมีรายงานพบ mutation ของ FH gene ในผู้ป่วยที่เป็น typical HUS (Caillaud *et al*., 2016)

การรักษา typical HUS ปัจจุบัน ใช้การรักษาตามอาการ อาจเป็นการฟอกไตการเปลี่ยนถ่ายพลาสมา หรืออาจต้องมีการปลูกถ่ายไต (Keir *et al*., 2012) เมื่อไม่นานมานี้ การรักษาด้วยยาชนิดเดียวกับ aHUS ได้ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในผู้ป่วยอายุ 3 ปี จำนวน 3 คน ในช่วงที่มีการระบาดในประเทศเยอรมันนี โดยการให้ eculizimab ซึ่งเป็น monoclonal antibody ต่อโปรตีน C5 ของระบบคอมพลีเมนท์ โดย eculizimab จะไปจับกับ C5 ทำให้ยับยั้งการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ ดังนั้นจึงช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายได้ (Lapeyraque *et al*., 2011) ผลของการรักษาด้วย eculizimabในผู้ป่วย typical HUS พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ

ดังนั้น จากงานวิจัยที่ได้กล่าวมา น่าจะสามารถยืนยันได้ว่าระบบคอมพลีเมนท์เป็นอีกกลไกหนึ่งในการทำให้เกิด typical HUS กล่าวคือ Stx ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์โดยที่อาจไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมระบบคอมพลีเมนท์ และผลจากการกระตุ้นคอมพลีเมนท์ก็ทำให้เกิดกลไกต่างๆ ที่ส่งผลทำให้เกิด HUS ในที่สุด

บทสรุป

การติดเชื้อ EHEC หรือ STEC ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารและสามารถเกิด HUS ซึ่งเป็นอาการแทรกซ้อนที่รุนแรงได้ Stx เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญและกลไกในการทำให้เกิด HUS เกิดจากการที่ Stxไปทำลายเซลล์โดยตรง นอกจากนี้ระบบคอมพลีเมนท์ก็ยังมีความเกี่ยวข้องในการทำให้เกิด HUS ได้อีกด้วย การศึกษาถึงกลไกในการเกิดโรค HUS มีความสำคัญมาก และในปัจจุบันก็ยังมีนักวิจัยหลายท่านที่พยายามศึกษาเพื่อให้ทราบถึงกระบวนการเกิดโรคอย่างละเอียด และโดยเฉพาะกลไกที่จะทำให้อธิบายได้ว่าเพราะเหตุใดจึงเกิด HUS ในผู้ป่วยบางกลุ่ม ทั้งนี้นอกจากจะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการเกิดโรคแล้วยังมีประโยชน์อย่างมากในด้านของการค้นหาวิธีป้องกันและรักษาที่มีประสิทธิภาพอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Arvidsson, I., Stahl, A.L., Hedstrom, M.M., Kristoffersson, A.C., Rylander, C., Westman, J.S., Storry, J.R., Olsson, M.L. & Karpman, D. (2015). Shiga toxin-induced complement-mediated hemolysis and release of complement-coated red blood cell-derived microvesicles in hemolytic uremic syndrome. *J Immunol, 194*, 2309-2318.

Beutin, L. & Martin, A. (2012). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J Food Prot, 75*, 408-418.

Bitzan, M., Richardson, S., Huang, C., Boyd, B., Petric, M. & Karmali, M.A. (1994). Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infection and immunity, 62*, 3337-3347.

Brigotti, M., Alfieri, R., Sestili, P., Bonelli, M., Petronini, P.G., Guidarelli, A., Barbieri, L., Stirpe, F. & Sperti, S. (2002). Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB J, 16*, 365-372.

Brigotti, M., Carnicelli, D., Arfilli, V.*, et al.* (2013). Identification of TLR4 as the receptor that recognizes Shiga toxins in human neutrophils. *J Immunol, 191*, 4748-4758.

Caillaud, C., Zaloszyc, A., Licht, C., Pichault, V., Fremeaux-Bacchi, V. & Fischbach, M. (2016). CFH gene mutation in a case of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome (STEC-HUS). *Pediatr Nephrol, 31*, 157-161.

Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H. & Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic Escherichia coli: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res, 36*, 289-311.

Cohen, A., Madrid-Marina, V., Estrov, Z., Freedman, M.H., Lingwood, C.A. & Dosch, H.M. (1990). Expression of glycolipid receptors to Shiga-like toxin on human B lymphocytes: a mechanism for the failure of long-lived antibody response to dysenteric disease. *Int Immunol, 2*, 1-8.

De Petris, L., Patrick, J., Christen, E. & Trachtman, H. (2006). Urinary podocyte mRNA excretion in children with D+HUS: a potential marker of long-term outcome. *Ren Fail, 28*, 475-482.

Dragon-Durey, M.A., Blanc, C., Marliot, F., Loirat, C., Blouin, J., Sautes-Fridman, C., Fridman, W.H. & Fremeaux-Bacchi, V. (2009). The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *Journal of medical genetics, 46*, 447-450.

Ehrlenbach, S., Rosales, A., Posch, W., Wilflingseder, D., Hermann, M., Brockmeyer, J., Karch, H., Satchell, S.C., Wurzner, R. & Orth-Holler, D. (2013). Shiga toxin 2 reduces complement inhibitor CD59 expression on human renal tubular epithelial and glomerular endothelial cells. *Infect Immun, 81*, 2678-2685.

Ergonul, Z., Hughes, A.K. & Kohan, D.E. (2003). Induction of apoptosis of human brain microvascular endothelial cells by shiga toxin 1. *J Infect Dis, 187*, 154-158.

Fang, C.J., Fremeaux-Bacchi, V., Liszewski, M.K., Pianetti, G., Noris, M., Goodship, T.H. & Atkinson, J.P. (2008). Membrane cofactor protein mutations in atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), fatal Stx-HUS, C3 glomerulonephritis, and the HELLP syndrome. *Blood, 111*, 624-632.

Ferraris, J.R., Ferraris, V., Acquier, A.B., Sorroche, P.B., Saez, M.S., Ginaca, A. & Mendez, C.F. (2015). Activation of the alternative pathway of complement during the acute phase of typical haemolytic uraemic syndrome. *Clin Exp Immunol, 181*, 118-125.

Griener, T.P., Mulvey, G.L., Marcato, P. & Armstrong, G.D. (2007). Differential binding of Shiga toxin 2 to human and murine neutrophils. *J Med Microbiol, 56*, 1423-1430.

Gyles, C.L. (1992). Escherichia coli cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol, 38*, 734-746.

Heyderman, R.S., Soriani, M. & Hirst, T.R. (2001). Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? *Trends Microbiol, 9*, 262-266.

Hughes, A.K., Stricklett, P.K. & Kohan, D.E. (1998). Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human proximal tubule cells. *Kidney Int, 54*, 426-437.

Jacewicz, M.S., Acheson, D.W., Binion, D.G., West, G.A., Lincicome, L.L., Fiocchi, C. & Keusch, G.T. (1999). Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis. *Infection and immunity, 67*, 1439-1444.

Jenkins, C., Willshaw, G.A., Evans, J., Cheasty, T., Chart, H., Shaw, D.J., Dougan, G., Frankel, G. & Smith, H.R. (2003). Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. *Journal of medical microbiology, 52*, 941-947.

Johannes, L. & Romer, W. (2010). Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol, 8*, 105-116.

Jozsi, M., Licht, C., Strobel, S., Zipfel, S.L., Richter, H., Heinen, S., Zipfel, P.F. & Skerka, C. (2008). Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood, 111*, 1512-1514.

Karch, H. (2001). The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)--associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost, 27*, 207-213.

Keir, L.S., Marks, S.D. & Kim, J.J. (2012). Shigatoxin-associated hemolytic uremic syndrome: current molecular mechanisms and future therapies. *Drug Des Devel Ther, 6*, 195-208.

Lapeyraque, A.L., Malina, M., Fremeaux-Bacchi, V.*, et al.* (2011). Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med, 364*, 2561-2563.

Lee, M.S., Cherla, R.P. & Tesh, V.L. (2010). Shiga toxins: intracellular trafficking to the ER leading to activation of host cell stress responses. *Toxins (Basel), 2*, 1515-1535.

Lingwood, C.A. (1996). Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends in microbiology, 4*, 147-153.

Lingwood, C.A. (1999). Glycolipid receptors for verotoxin and *Helicobacter pylori*: role in pathology. *Biochimica et biophysica acta, 1455*, 375-386.

Lo, N.C., Turner, N.A., Cruz, M.A. & Moake, J. (2013). Interaction of Shiga toxin with the A-domains and multimers of von Willebrand Factor. *J Biol Chem, 288*, 33118-33123.

Locatelli, M., Buelli, S., Pezzotta, A.*, et al.* (2014). Shiga toxin promotes podocyte injury in experimental hemolytic uremic syndrome via activation of the alternative pathway of complement. *J Am Soc Nephrol, 25*, 1786-1798.

Loos, S., Ahlenstiel, T., Kranz, B.*, et al.* (2012). An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 hemolytic uremic syndrome in Germany: presentation and short-term outcome in children. *Clin Infect Dis, 55*, 753-759.

Moore, I., Strain, L., Pappworth, I.*, et al.* (2010). Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood, 115*, 379-387.

Morigi, M., Buelli, S., Zanchi, C., Longaretti, L., Macconi, D., Benigni, A., Moioli, D., Remuzzi, G. & Zoja, C. (2006). Shigatoxin-induced endothelin-1 expression in cultured podocytes autocrinally mediates actin remodeling. *Am J Pathol, 169*, 1965-1975.

Morigi, M., Galbusera, M., Gastoldi, S.*, et al.* (2011). Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis. *J Immunol, 187*, 172-180.

Muthing, J., Schweppe, C.H., Karch, H. & Friedrich, A.W. (2009). Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb Haemost, 101*, 252-264.

Nakao, H. & Takeda, T. (2000). *Escherichia coli* Shiga toxin. *Journal of natural toxins, 9*, 299-313.

Nolasco, L.H., Turner, N.A., Bernardo, A., Tao, Z., Cleary, T.G., Dong, J.F. & Moake, J.L. (2005). Hemolytic uremic syndrome-associated Shiga toxins promote endothelial-cell secretion and impair ADAMTS13 cleavage of unusually large von Willebrand factor multimers. *Blood, 106*, 4199-4209.

O'Brien, A.D. & Holmes, R.K. (1987). Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev, 51*, 206-220.

O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thompson, M.R. & Formal, S.B. (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by Escherichia coli. *The Journal of infectious diseases, 146*, 763-769.

O'Brien, A.D., Tesh, V.L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M.P., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A.A. & Keusch, G.T. (1992). Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology, 180*, 65-94.

Obrig, T.G. (1997). Shiga toxin mode of action in *E. coli* O157:H7 disease. *Front Biosci, 2*, d635-642.

Oksjoki, R., Kovanen, P.T., Meri, S. & Pentikainen, M.O. (2007). Function and regulation of the complement system in cardiovascular diseases. *Front Biosci, 12*, 4696-4708.

Orth, D., Khan, A.B., Naim, A.*, et al.* (2009). Shiga toxin activates complement and binds factor H: evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome. *J Immunol, 182*, 6394-6400.

Palermo, M.S., Exeni, R.A. & Fernandez, G.C. (2009). Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther, 7*, 697-707.

Poolpol, K., Orth-Holler, D., Speth, C., Zipfel, P.F., Skerka, C., de Cordoba, S.R., Brockmeyer, J., Bielaszewska, M. & Wurzner, R. (2014). Interaction of Shiga toxin 2 with complement regulators of the factor H protein family. *Mol Immunol, 58*, 77-84.

Rosales, A., Hofer, J., Zimmerhackl, L.B., Jungraithmayr, T.C., Riedl, M., Giner, T., Strasak, A., Orth-Holler, D., Würzner, R. & Karch, H. (2012). Need for long-term follow-up in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome due to late-emerging sequelae. *Clin Infect Dis, 54*, 1413-1421.

Ruggenenti, P., Noris, M. & Remuzzi, G. (2001). Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int, 60*, 831-846.

Stahl, A.L., Sartz, L. & Karpman, D. (2011). Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood, 117*, 5503-5513.

Stahl, A.L., Sartz, L., Nelsson, A., Bekassy, Z.D. & Karpman, D. (2009). Shiga toxin and lipopolysaccharide induce platelet-leukocyte aggregates and tissue factor release, a thrombotic mechanism in hemolytic uremic syndrome. *PloS one, 4*, e6990.

Takao, T., Tanabe, T., Hong, Y.M., Shimonishi, Y., Kurazono, H., Yutsudo, T., Sasakawa, C., Yoshikawa, M. & Takeda, Y. (1988). Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin. *Microbial pathogenesis, 5*, 57-69.

te Loo, D.M., Monnens, L.A., van Der Velden, T.J., Vermeer, M.A., Preyers, F., Demacker, P.N., van Den Heuvel, L.P. & van Hinsbergh, V.W. (2000). Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood, 95*, 3396-3402.

Thurman, J.M., Marians, R., Emlen, W.*, et al.* (2009). Alternative pathway of complement in children with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol, 4*, 1920-1924.

van Setten, P.A., Monnens, L.A., Verstraten, R.G., van den Heuvel, L.P. & van Hinsbergh, V.W. (1996). Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood, 88*, 174-183.

Zipfel, P.F., Mache, C., Muller, D., Licht, C., Wigger, M., Skerka, C. & European, D.-H.U.S.S.G. (2010). DEAP-HUS: deficiency of CFHR plasma proteins and autoantibody-positive form of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol, 25*, 2009-2019.

Zipfel, P.F., Edey, M., Heinen, S.*, et al.* (2007). Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS genetics, 3*, e41.

Zoja, C., Angioletti, S., Donadelli, R.*, et al.* (2002). Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1. *Kidney Int, 62*, 846-856.

Zumbrun, S.D., Hanson, L., Sinclair, J.F., Freedy, J., Melton-Celsa, A.R., Rodriguez-Canales, J., Hanson, J.C. & O'Brien, A.D. (2010). Human intestinal tissue and cultured colonic cells contain globotriaosylceramide synthase mRNA and the alternate Shiga toxin receptor globotetraosylceramide. *Infect Immun, 78*, 4488-4499.