



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΡΑΚΗΣ

DEMOCRITUS
UNIVERSITY
OF THRACE

Θέμα Διατριβής:

«ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ
ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΙ ΜΕ ΤΗΝ ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ»

«INNATE IMMUNITY RELATED
INFLAMMATORY PHENOTYPES»

Υποψήφιος Διδάκτωρ:

Γαβριηλίδης Ευστράτιος, Ειδικευόμενος Παθολογίας,
Α' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική Π.Γ.Ν. Αλεξανδρούπολης

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Σκένδρος Παναγιώτης,
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Δ.Π.Θ
(επιβλέπων καθηγητής)

Ρίτης Κωνσταντίνος,
Καθηγητής Παθολογίας Δ.Π.Θ

Παπαγόρας Χαράλαμπος,
Επίκουρος Καθηγητής Ρευματολογίας Δ.Π.Θ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι δυνητικά παθογόνων μορίων. Πυροδοτεί φαγοκυτταρικούς μηχανισμούς, ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, θέτει το υπόστρωμα για την επαγωγή της ειδικής ανοσίας και ενορχηστρώνει την φλεγμονώδη απάντηση προς διατήρηση της ομοιότητας.¹

Πληθώρα φλεγμονωδών καταστάσεων, που αποτελούν σήμερα αντικείμενο έρευνας, σχετίζονται με τη φυσική ανοσία. Τα αίτια της φλεγμονής ενδέχεται να είναι λοιμώδη (παθογόνοι μικροοργανισμοί), αλλά και μη, όπως αυτοάνοσα, αυτοφλεγμονώδη ή νεοπλασματικά. Είναι σημαντική η διάκριση των αιτιών της φλεγμονώδους απόκρισης για την εφαρμογή εξατομικευμένης θεραπείας^{1,2}. Στην καθημερινή κλινική πράξη η διερεύνηση του πυρετού ή της φλεγμονής αδιευκρίνιστης αιτιολογίας είναι δύσκολη. Η δυσχέρεια στη διαφορική διάγνωση μπορεί να μεταφράζεται σε αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών, ή ανοσοτροποποιητικών θεραπειών, με αποτέλεσμα, την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών μικροβίων, την διαταραχή της ποιότητας ζωής του ασθενούς, την αύξηση της νοσηρότητας και της θνητότητας³.

Η φυσική ανοσία, συμβάλλει καθοριστικά στην άμυνα και τη διατήρηση της ομοιοστασίας, αλλά η υπέρμετρη ενεργοποίησή της, μπορεί να αποτελέσει αίτιο φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και τα φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου⁴. Συμμετέχει στην επαγωγή και στην έκφραση διαφόρων φλεγμονωδών φαινοτύπων. Κατά τη «γένεση» της αυτοανοσίας, μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων προάγει την ειδική ανοσία

και ρηγνύει την ανοσοανοχή. Από την άλλη, μέσω της έκκρισης προφλεγμονώδων κυτταροκινών και διαφόρων εκτελεστικών μηχανισμών όπως είναι το οξειδωτικό stress, η αυτοφαγία και η απελευθέρωση των εξωκυττάρων δικτύων χρωματίνης (Neutrophil Extracellular Traps: NETs) δημιουργεί φλεγμονώδες περιβάλλον που αναλόγως του οργάνου στόχου θα οδηγήσει σε συγκεκριμένο κλινικό φαινότυπο^{4,5}.

Τα τελευταία χρόνια, σημείο ιδιαίτερου ερευνητικού ενδιαφέροντος στη μελέτη της φυσικής ανοσίας αποτελούν τα ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα παράγονται και ωριμάζουν στον μυελό των οστών. Αποτελούν την πλειονότητα των λευκοκυττάρων και τα πρώτα που συναθροίζονται χημειοτακτικά στις θέσεις της φλεγμονής. Μέχρι πρόσφατα πιστευόταν ότι πρόκειται για βραχύβια κύτταρα χωρίς ιδιαίτερες ικανότητες διαφοροποίησης και ο ρόλος τους περιορίζεται στην αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών⁶⁻⁸. Την τελευταία δεκαετία σημαντική ώθηση δόθηκε στην έρευνα της βιολογίας του ουδετεροφίλου και αναδείχθηκαν μηχανισμοί με τους οποίους τα κύτταρα αυτά διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τη θρόμβωση^{6,9,10}. Το ουδετερόφιλο διαθέτει ποικίλους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors-PRRs), οι οποίοι του επιτρέπουν να εξασκεί τις κλασσικές αντιμικροβιακές και φλεγμονώδεις δράσεις μέσω της φαγοκυττάρωσης, και της αποκοκκίωσης αντιμικροβιακών πεπτιδίων, κυτταροκινών και χημειοκινών⁷. Ένας τρίτος μηχανισμός δράσης των ουδετεροφίλων που πρωτοπεριγράφηκε το 2004, είναι η κατά τον κυτταρικό θάνατο τους, απελευθέρωση των NETs¹⁰.

Τα NETs αποτελούν εξωκυττάρια δίκτυα χρωματίνης, που εκκρίνονται μέσω της διαδικασίας της αυτοφαγίας των ουδετεροφίλων (NETωση/NETosis). Κατά την NETωση η χρωματίνη αποσυμπυκνώνεται, η πυρηνική και κυτταρική μεμβράνη διασπάται και απελευθερώνονται τα NETs^{8,11}. Τα NETs φέρουν ποικιλία εξαιρετικά δραστικών βιομοριών /

πρωτεϊνών, τα οποία διαφέρουν αναλόγως της φλεγμονώδους κατάστασης.

Παρά το σημαντικό ρόλο των ουδετεροφίλων στη φλεγμονή, λίγα είναι γνωστά σχετικά με την ύπαρξη ξεχωριστών φαινοτύπων ουδετερόφιλων/NETs που ανταποκρίνονται διαφορετικά σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Επιπλέον, η επίδραση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος στο φαινότυπο και τη λειτουργία των ουδετερόφιλων/NETs και πως αυτή επηρεάζει την παθογένεια ποικίλων διαταραχών δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως. Παραδείγματα διαφοροποίησης της «ποιότητας» των NETs αναλόγως του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος, αποτελούν η επαγόμενη μέσω NETs έκφραση του ιστικού παράγοντα (tissue factor-TF) σε θρομβωτικές καταστάσεις, της IL-17 στην πνευμονική ίνωση, της IL-1β στο μεσογειακό πυρετό και άλλα αυτοφλεγμονώδη σύνδρομα, όπως η ελκώδης κολίτιδα, και της LL37 στην αυτοανοσία του συστηματικού ερυθματώδους λύκου¹²⁻¹⁵. Επιπλέον, από πρόσφατες πειραματικές μελέτες σε ποντίκια τα NETs φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση της τρυψίνης, τη φλεγμονή και την ιστική καταστροφή στην οξεία παγκρεατίτιδα¹⁶, καθώς και στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε έδαφος μη αλκοολικής στεατοηπατιτίτιδας¹⁷. Στις παραπάνω μελέτες δε, η αναστολή της NETωσης, έδειξε να είναι αποτελεσματικός θεραπευτικός στόχος^{16,17}. Τα παραδείγματα αυτά καταδεικνύουν τη ανάγκη περαιτέρω κατανόησης των μηχανισμών της NETωσης και την εκλεκτική συμμετοχή της στους φαινοτύπους της φλεγμονής.

Το συμπλήρωμα αποτελεί ένα δίκτυο 30 και πλέον πρωτεϊνών του πλάσματος, οι οποίες κατά την ενεργοποίηση τους πυροδοτούν ένα καταρράκτη αντιδράσεων που παρεμβαίνουν στη φλεγμονώδη απόκριση, την καταστροφή παθογόνων μέσω της οψωνοποίησης αλλά και τη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης. Υπάρχουν τρεις οδοί μέσω των οποίων

πραγματοποιείται η ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Αυτές είναι i) η κλασική οδός, η οποία επάγεται μέσω αντισωμάτων προσκολλημένων σε αντιγόνα ii) η εναλλακτική οδός κατά την οποία η ενεργοποίηση του συμπληρώματος γίνεται απευθείας στην επιφάνεια του αντιγόνου, και iii) η οδός της λεκτίνης, κατά την οποία, η πρωτεΐνη λεκτίνη που συνδέει μαννόζη (Mannose binding lectin: MBL) συνδέεται με το άκρο της μαννόζης που βρίσκεται επί του αντιγόνου. Ανεξάρτητα της οδού που θα ενεργοποιηθεί το αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση του C3 κλάσματος σε C3a και τελικά ο σχηματισμός ενός συμπλόκου που αποκαλείται τελικό σύμπλεγμα προσβολής μεμβράνης (C5b,C6,C7,C8,C9: Membrane attack complex-MAC) στόχος του οποίου είναι η λυτική καταστροφή των παθογόνων. Ανεξάρτητα με τον τελικό σχηματισμό του MAC, σε πρώιμη φάση τα κλάσματα του συμπληρώματος επάγουν την έκκριση κυτταροκινών και χημειοκινών με αποτέλεσμα την ενίσχυση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Προς αποφυγή της υπέρμετρης φλεγμονώδους δράσης του, το σύστημα του συμπληρώματος ελέγχεται από ανασταλτικά μόρια^{1,10}.

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, δείχνουν μια αμφίδρομη σχέση μεταξύ NETωσης, ενεργοποίησης του συμπληρώματος και πήξης, καταδεικνύοντας τα τρία αυτά συστήματα ως μία ενιαία οντότητα με τρεις διαφορετικές όψεις^{10,18}. Μελέτη ασθενών με COVID-19 λοίμωξη έδειξε ενεργοποίηση του συμπληρώματος και αυξημένα επίπεδα NETs που εκφράζουν TF στο πλάσμα προτείνοντας την ανάγκη εφαρμογής στοχευμένων θεραπειών έναντι των μηχανισμών ανοσοθρόμβωσης¹⁸.

Επιπρόσθετα, άλλα δεδομένα υποστηρίζουν, πως μεταξύ «ενιαίων οντοτήτων», όπως τα ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, ενδέχεται να υπάρχει διαφορετική απόκριση στη θεραπεία, αναλόγως της ποιότητας των κυτταροκινών που προσελκύουν ή εκφράζουν τα ουδετερόφιλα μέσω των NETs στο μικροπεριβάλλον της εντερικής

φλεγμονής. Με τον τρόπο αυτό καταδείχθηκε ως πιθανώς θεραπευτικός στόχος η αναστολή της IL-1β σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται στη χορήγηση άλλων βιολογικών παραγόντων, όπως οι αντι-TNF.^{15,19}

Συμπερασματικά, η φυσική ανοσία αποτελεί βασικό ενορχηστρωτή της φλεγμονώδους απάντησης. Η κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων προκαλεί την έκφραση διαφόρων φλεγμονωδών φαινοτύπων αποτελεί σημείο εντατικής έρευνας τα τελευταία χρόνια στην εφαρμογή εξατομικευμένης προσέγγισης και θεραπευτικής των ασθενών.

Κύριος σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής, είναι να μελετηθούν μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας που ρυθμίζουν την έκφραση της φλεγμονής σε διάφορα κλινικά μοντέλα λοίμωξης, αυτοανοσίας, αυτοφλεγμονής και ίνωσης. Θα μελετηθούν:

- a) Το μεταγράμμα των ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος με μοριακή ανάλυση υψηλής απόδοσης (RNA-seq) σε ασθενείς με ενεργό νόσο/φλεγμονή και σε ύφεση για τον εντοπισμό νέων στόχων/μονοπατιών που συνδέονται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων
- b) Η ικανότητα των ουδετεροφίλων να ενεργοποιούν την αυτοφαγία ή/και να σχηματίζουν NETs σε διάφορες καταστάσεις φλεγμονής, τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και σε όργανα στόχους, και η πρωτεϊνική συστασή τους.
- c) Η έκφραση σημαντικών (με βάση την RNA seq ανάλυση) πρωτεϊνών στα ουδετερόφιλα.
- d) Η αλληλεπίδραση των ουδετεροφίλων/NETs με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση (πχ περιφερικά μονοκύτταρα, αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες).
- e) Η συσχέτιση μηχανισμών φυσικής ανοσίας, όπως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, η απελευθέρωση κυτταροκινών/χημειοκινών και πρωτεασών του συστήματος της πήξης με τον άξονα αυτοφαγία/NETωση.

e) Η ανάδειξη πιθανών μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών λύσης της φλεγμονής (resolution of inflammation).

Πρόκειται για μη παρεμβατική ερευνητική μελέτη που θα εκπονηθεί στο Εργαστήριο Μοριακής Αιματολογίας, στην Α' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης (ΔΠΘ), στα πλαίσια εκπόνησης διδακτορικής διατριβής.

PhD ABSTRACT

Innate immunity constitutes the first line of defense against potentially pathogenic molecules. It stimulates phagocytic mechanisms, activates the complement system, instructs the induction of adaptive immunity and promote the inflammatory response to maintain homeostasis.¹

Various inflammatory conditions are tightly related to innate immunity constituting a field of intensive research today. The causes of inflammation may be infectious (pathogens), as well as non-infectious: autoimmune, autoinflammatory or neoplastic. In clinical practice, it is crucial to distinguish the causes of the inflammatory response, in order to apply individualized therapies.^{1,2} In this context, fever of unknown origin (FUO) is a challenging clinical scenario. Difficulties in differential diagnosis may lead to delay initiation of the appropriate treatment or/and unnecessary use of antibiotics, or immunomodulatory therapies, resulting in resistant bacteria, impairing quality of life, morbidity and mortality.³

Excessive activation of innate immunity may lead to inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and inflammatory bowel disease.⁴ Moreover, during the pathogenesis of autoimmunity, through antigen-presenting cells, it promotes adaptive immunity and breaks down immunotolerance. On the other hand, through the secretion of pro-inflammatory cytokines and various effector mechanisms, such as oxidative stress, autophagy and the release of neutrophil extracellular traps (NETs) will lead to organ damage and various clinical phenotypes related to the inflammatory environment.^{4,5}

In recent years, neutrophils have been a point of particular research interest in the study of innate immunity. Neutrophils are produced and mature in the bone marrow. They represent the most abundant innate immune cells and are

the first to migrate to sites of tissue inflammation. The traditional concept that neutrophils comprise terminally differentiated cells with limited plasticity and highly conserved function, which is due to their low transcriptional activity, has been critically revised.⁶⁻⁸ The last decade a major boost in neutrophil biology research and mechanism emerged, suggesting their implication in orchestrate inflammation, complement activation and thrombosis.^{6,9,10} Neutrophils' pattern recognition receptors (PRRs) allow them to exert their antimicrobial and inflammatory activity through phagocytosis and degranulation of antimicrobial peptides, cytokines and chemokines.⁷ An additional mechanism of neutrophil action, first described in 2004, is the release of NETs during cell-death.¹⁰

NETs form extra-cellular chromatin networks that are released through the process that is closely associated with autophagy and called NETosis. During NETosis, chromatin is deconcentrated, nuclear and cell membrane dissolve and the NETs are released.^{8,11} NETs "carry" a variety of highly active biomolecules/proteins, which vary depending on the inflammatory disease environment. Despite the well-described important role of neutrophils in inflammation, little is known about the existence of distinct neutrophil/NETs phenotypes in different inflammatory conditions and how the inflammatory environment affects the pathogenesis of various disorders. Examples of differentiation on the composition of NETs depending on the inflammatory microenvironment are the NET-induced expression of tissue factor (TF) in thrombotic conditions, IL-17 in pulmonary fibrosis, IL-1 β in Mediterranean fever and other autoinflammatory syndromes, such as ulcerative colitis and the expression of LL37 in systemic lupus erythematosus.¹²⁻¹⁵ In addition recent experimental studies in mice have shown that NETs play a key role in trypsin activation, inflammation and tissue destruction in acute pancreatitis¹⁶, as well as in the development of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic

steatohepatitis.¹⁷ In these studies, the inhibition of NETosis, is suggested to be an effective therapeutic target.^{16,17} Therefore further research in understanding the mechanism of NETosis and its selective involvement in inflammatory phenotypes is needed.

Complement is a network of more than 30 plasma proteins which activate and trigger a cascade of reactions that interfere with the inflammatory response, destroy pathogens through opsonization and regulate the immune response. There are three pathways of complement activation: i) The classical pathway, which is triggered by antibodies binding to antigen surface ii) The alternative pathway in which complement is triggered directly by the antigen surface and iii) The lectin pathway wherein, the mannose binding lectin (MBL) protein binds to the mannose ligand over the antigen. Regardless the pathway activated, it results to the activation of the C3 fraction (C3a) and ultimately the formation of a complex called the membrane attack complex (MAC) which constitutes of C5b,C6,C7,C8,C9 fractions. MAC is an activator of innate and adaptive immunity and a cytolytic effector in the plasma membranes of pathogens. To avoid its excessive inflammatory action, complement system is controlled by inhibitory molecules.^{1,10}

Recent experimental and clinical data, suggest a bidirectional role between NETosis, complement activation and coagulation, demonstrating these systems as a unique entity with three different aspects.^{10,18} A recent COVID-19 study demonstrated simultaneous complement activation, as well as TF-enriched NETs in plasma of patients suggesting targeted therapies against immunothrombosis.¹⁸

Additionally, other data suggest that distinct disease clinical phenotypes, such as ulcerative colitis and Crohn's disease of inflammatory bowel disease (IBD), may be characterized by a different response to treatment, depending on the proteins that neutrophils express through NETs in the microenvironment

of intestinal inflammation. In this way, inhibition of IL-1 β is suggested as a candidate therapeutic target in ulcerative colitis patients refractory to other biological agents, such as anti-TNF.^{15,19}

In conclusion innate immunity, is a key orchestrator of the inflammatory response. Understanding the mechanisms inducing the expression of various inflammatory phenotypes is an attractive research field today, in order to apply a personalized approach to treat patients.

The main objective of this PhD thesis is to study the molecular and cellular mechanisms of innate immunity that regulate the expression of inflammation in various clinical models of infection, autoimmunity, autoinflammation and fibrosis. The following will be studied:

- a) Peripheral blood neutrophil transcriptome with RNA-seq in patients with active disease and in remission to identify new targets/pathways associated with neutrophil activation
- b) The ability of neutrophils to activate autophagy and/or to form NETs in various inflammatory settings, both in peripheral blood as well as in target tissue, and their proteomic
- c) The expression of most significant (based on RNA-seq analysis) proteins in neutrophils
- d) The interaction of neutrophils/NETs with other cell populations involved in the inflammatory response (e.g. peripheral monocytes, platelets, endothelial cells, fibroblasts)
- e) Possible molecular and cellular mechanisms associated with the resolution of inflammation.

This is a non-interventional, observational study which will be conducted at the Laboratory of Molecular Hematology and the First Department of Internal Medicine of the Democritus University of Thrace.

References

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6th Ed, Updated Ed. Saunders-Elsevier, Philadelphia 2010.
2. John P. Ioannidis, Fotini B. Karassa et al. Biologic agents in rheumatology: unmet issues after 200 trials and \$200 billion sales. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Nov;9(11):665-673
3. William F. Wright, Paul G. Auwaerter. *Open Forum Inf. Diseases*, 2020 May; 7(5): ofaa132
4. Victoria Saferding, Stephan Bluml. Innate Immunity as the trigger of systematic autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, Vol 110, June 2020, 102382
5. Moncef Zouali and Antonio La Cava. Innate Immunity Pathways in Autoimmune Diseases. *Frontiers Immunology*, 04 June 2019.
6. Chatfield S.M, et al (2018). Expanding Neutrophil Horizons: New Concepts in Inflammation. *J Innate Immunology* 10(5-6): 422-431
7. Alberto Mantovani, Marco A Cassatella et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 11, 519-531 (2011)
8. Skendros P., Mitroulis I., Ritis K. Autophagy in Neutrophils: From Granulopoiesis to Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Cell & Developmental Biology*; 2018 Sep 4; 6:109
9. Soehlein O., Steffens S. et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunology* 201 Apr;17(4),248-261
10. Cynthia M. De Bont, Wilbert C Boelens & Ger J. Pruijn. NETosis, complement and coagulation: A triangular relationship. *Nature, Cellular & Molecular Immunology* 16, 19-27 (2019)

11. Boeltz S, Amini P et al. To NET or not to NET: Current opinions and state of the science regarding the the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*; 2019;26: 395-408
12. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis*. 2014 Oct;73(10):1854-63.
13. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan;75(1):269-77.
14. Skendros P, Chrysanthopoulou A, Rousset F, et al. Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) links stress with IL-1 β -mediated familial Mediterranean fever attack through autophagy-driven neutrophil extracellular traps. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Nov;140(5):1378-1387.e13.
15. Angelidou I, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, et al. REDD1/Autophagy Pathway Is Associated with Neutrophil-Driven IL-1 β Inflammatory Response in Active Ulcerative Colitis. *J Immunol*. 2018 Jun 15;200(12):3950-3961.
16. M. Merza, H. Hartman et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice with severe Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2015; 149:1920-1931.
17. D. van der Windt, V. Sud et al. Neutrophil Extracellular Traps promote Inflammation and development of hepatocellular carcinoma in non alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2018 Oct;68(4): 1347-1360.
18. Skendros P., Mitsios A. et al. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19

Immunothrombosis. *Journal of Clinical Investigation*, 2020;130(11):6151-6157

19. Friedrich, M., Pohin, M., Jackson, M. A., Korsunsky, I., Bullers, S. J., Rue-Albrecht, K., Christoforidou, Z., Sathananthan, D., Thomas, T., Ravindran, R., Tandon, R., Peres, R. S., Sharpe, H., Wei, K., Watts, G. F. M., Mann, E. H., Geremia, A., Attar, M., Oxford IBD Cohort Investigators, ... Powrie, F. M. (2021). IL-1-driven stromal-neutrophil interactions define a subset of patients with inflammatory bowel disease that does not respond to therapies. *Nature Medicine*, 27(11), 1970–1981.