

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Eliška Pošmurná**

Role NETózy v patogenezi autoimunitních onemocněních

The role of NETosis in pathogenesis of autoimmune diseases

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Iva Brynychová

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného akademického titulu.

V Chotýšanech 8. 5. 2019

Podpis

## Abstrakt

Neutrofilní granulocyty jsou bílé krvinky schopné velice efektivního boje s patogeny pomocí fagocytózy, degranulace, ale také pomocí unikátní buněčné smrti, tzv. NETózy, kdy dochází k tvorbě neutrofilních extracelulárních sítí, které jsou schopné zachytit a pomocí antimikrobiálních složek zneškodnit mikroorganismy. NETóza bývá zahájena aktivací cytokiny, lyopolysacharidem nebo kyselinou phorbomystatovou. Aktivované neutrofilny putují do místa zánětu, kde se sítě dekondenzovaného chromatinu uvolňují do extracelulárního prostoru. Mimo buňku se tedy jako součást NETs dostává DNA, která je silným alarminem pro imunitní systém. Zvýšená tvorba NETs či problémy s jejich odbouráváním a likvidací se mohou podílet na patogenezi některých autoimunitních onemocnění (např. systémový lupus erythematosus, asociovaná vaskulitida, revmatoidní artritida, či diabetes mellitus). Tvorba NETs či jejich komponenty mohou ovlivňovat onemocnění či míru poškození okolní tkáně, mnohdy také korelují se závažností onemocnění (asociovaná vaskulitida) a mohou mít diagnostický potenciál (asociovaná vaskulitida, revmatoidní artritida či diabetes mellitus typu 1).

**Klíčová slova:** NETóza, NETs, neutrofilní granulocyty, autoimunitní onemocnění, imunitní systém

## Abstract

Neutrophil granulocytes – white blood cells are very effective in fight against pathogens with fagocytosis, degranulation, or NETosis, which is special form of cell death. During NETosis are created neutrophil extracellular traps, which can trap and destroy microorganisms with antimicrobial granules. NETosis can be initiated by activation of pro-inflammatory cytokines, lipopolysaccharides or phorbomystatic acid. Activated neutrophils get to the site of inflammation, where decondensed chromatin, part of NETs, gets into extracellular space. DNA in extracellular space is strong alarmin for immune system as part of NETs. Increased NETs production or problem with their elimination can play role in patogenesis of some autoimmune diseases (eg. Systematic lupus erythematoses, associated vasculitis, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus). NETs production or their components can affect diseases or degree of damage to the surrounding tissue. It also correlates with seriousness of disease (eg. Associoated vasculitis) and can have diagnostical potencial (eg. Asociated vaskuloitides, rheumatoid arthritis or diabetes mellitus type 1).

Keywords: NETosis, NETs, neutrophils, autoimmune diseases, immune system

# Obsah

1	Úvod.....	- 1 -
2	NETóza.....	- 2 -
2.1	Neutrofilní granulocyty .....	- 4 -
2.2	NETs – neutrofilní extracelulární síť .....	- 5 -
2.3	NETóza jako děj.....	- 6 -
3	Autoimunitní onemocnění a NETóza.....	- 9 -
3.1	NETóza a systémový lupus erythematoses.....	- 9 -
3.2	NETóza a ANCA – asociovaná vaskulitida .....	- 10 -
3.3	NETóza a revmatoidní artritida.....	- 11 -
3.4	NETóza a diabetes.....	- 12 -
4	Závěr.....	- 14 -
5	Seznam použitých zkratk.....	- 16 -
6	Seznam použité literatury .....	- 18 -

# 1 Úvod

Jednou ze složek imunitního systému každého organismu jsou leukocyty, bílé krvinky které zajišťují ochranu organismu. V posledních dekáдах se čím dál častěji začíná hovořit o autoimunitních onemocněních a alergiích. U lidí mnohem častěji propukají velice běžná virová či bakteriální onemocnění, která mají díky neustálému vývoji schopnost přizpůsobit se lékům, které je proti nim člověk schopen vyrobit.

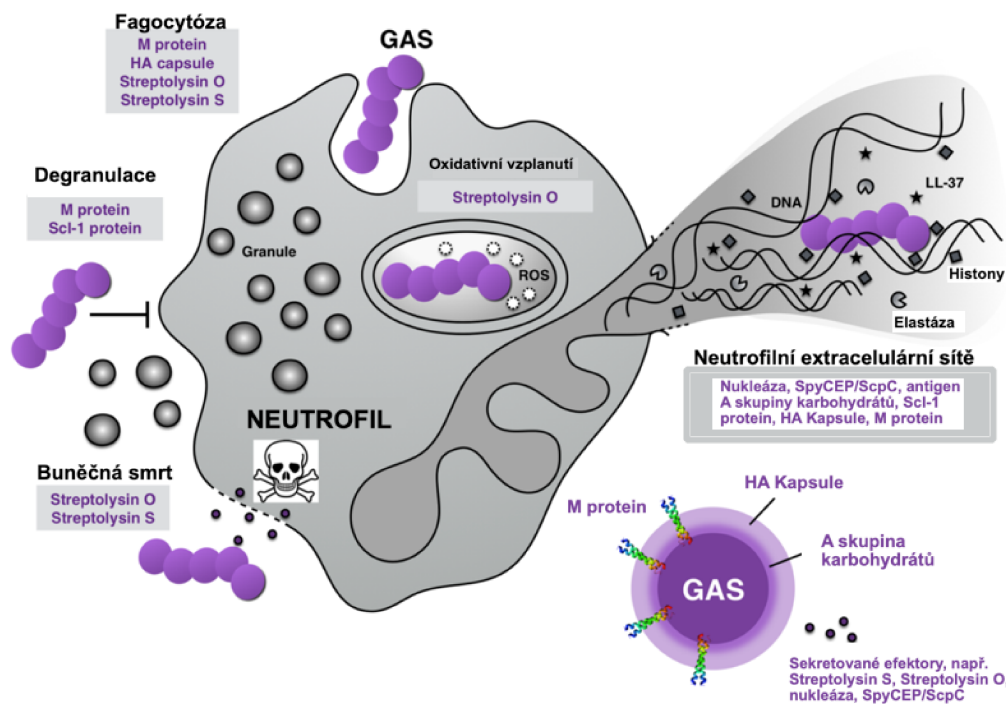
Leukocyty – stěžejní pro tuto bakalářskou práci, jsou neutrofilní granulocyty, které jsou první obrannou linií organismu v místě zánětu začínají boj s patogeny. Předpokládalo se, že k boji dochází především pomocí fagocytózy, tedy pohlcováním mikrobů, či sekrecí antimikrobiálních látek. Neutrofilní granulocyty byly první buňky, u kterých byla pozorována tvorba mimobuněčných sítí (tzv. NETs - neutrophils extracellular traps), díky kterým jsou schopny polapit a následně i zničit mikrobiální organismy, které se dostávají do těla (Brinkmann, 2004). Jsou důležitými činiteli, ale mohou být také příčinou ničení vlastních buněk organismu.

Proces tvorby těchto extracelulárních sítí je nazýván NETóza a jedná se o unikátní typ buněčné smrti neutrofilů, kdy je do extracelulárního prostoru uvolňován dekonzenzovaný chromatin a granulární obsah. Bylo pozorováno, že k tvorbě NETs dochází nejen při mikrobiální infekci, ale také za sterilních podmínek (spojených např. s trombózou, rakovinou či diabetem) (Fadini et al. 2016). NETs svým složením představují alarmin (molekulu poskytující signál nebezpečí), protože DNA je velmi silným aktivátorem imunitního systému. Zhoršená schopnost odbourávání NETs tak může být rizikovým faktorem při rozvoji autoimunitních onemocnění.

Cílem předkládané bakalářské práce je popsání této specifické buněčné smrti neutrofilních granulocytů – NETózi a její role v patogenezi vybraných autoimunitních onemocnění.

## 2 NETóza

NETóza je po boku apoptózy či nekrózy jedním z typů programované buněčné smrti, kterými se tělo brání cizorodým organismům, jež proniknou do těla. K programované buněčné smrti dochází při reakcích stimulovaných látkami uvnitř nebo vně buňky. Mezi tyto látky můžeme zařadit cytokiny, hormony nebo toxiny.



**OBRAZEK 1: MECHANISMY NEUTROFILNÍHO GRANULOCYTU V BOJI S PATOGENY. FAGOCYTOZA, BUNĚČNÁ SMRT, DEGRANULACE, NETS, OXIDAČNÍ PRASKNUTÍ (PŘEVZATO Z (Döhrmann, Cole and Nizet, 2016))**

Všechny výše vyjmenované typy buněčné smrti mají přesně stanovené kroky, které je nutné dodržet, aby nedošlo k chybě a následnému poškození organismu.

Při apoptóze můžeme v buňce pozorovat fragmentaci jádra, které není poškozené a uvnitř se silně kondenzuje chromatin. Dochází k celkovému smršťování buňky, na jehož konci se buňka rozpadá na malé apoptické váčky, které jsou odstraněny. Nedochozí tedy k úniku DNA do mimobuněčného prostoru a nedochází ke stimulaci imunitního systému. DNA je štěpena na velmi malé části (Fuchs *et al.*, 2007).

V nekrotickém jádře buňky je rozlišitelný euchromatin a heterochromatin, následně dojde k promíchání jaderného a cytoplazmatického materiálu buňky podléhající nekróze. Tyto buňky jsou následně odstraněny (Fuchs *et al.*, 2007). Při nekróze dochází k enzymatickému štěpení buněčných zbytků či denaturaci buněčných proteinů, do kterého se zapojují proteázy, DNázy, lysozomální enzymy.

Hlavním rozdílem mezi nekrózou a apoptózou je, že při nekróze dojde k vylití obsahu cytoplazmy mimo buňku. Při apoptóze jsou vytvořeny apoptické váčky, které mohou být likvidovány fagocytujícími buňkami v okolí.

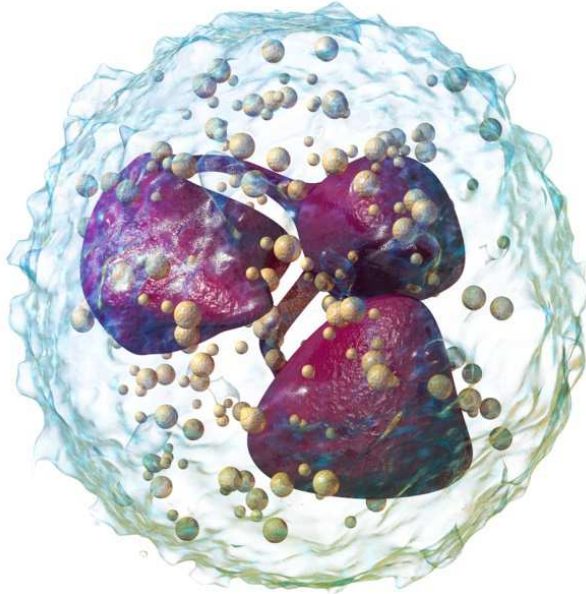
Další rozdíl mezi nekrózou a apoptózou je v době či rychlosti trvání. Nekróza probíhá v minutách, kdežto apoptóza v řádech hodin. Při výzkumu došlo k úmrtí 70 % neutrofilů, u kterých byla pomocí protilátek vyvolána apoptóza a které byly takto inkubovány po 18 hodin. Když byly neutrofilny inkubovány 15 minut s *S. aureans*, které vylučovaly vysoké koncentrace toxinů, došlo k úmrtí více jak 70 % buněk pomocí nekrózy (Fuchs *et al.*, 2007).

NETóza je v jednoduchosti aktivace a spuštění neutrofilních extracelulárních pastí (tzv. NETs – Neutrophil Extracellular Traps). Skutečnost, že neutrofilní granulocyty mohou tvořit extracelulární pasti (NETs) obsahující DNA, aby zabily bakterie, byla poprvé pozorována a popsána v roce 2004 Brinkmannem s kolegy (Brinkmann *et al.* 2004). Termín NETóza poprvé použili Steinberg a Grinstein v roce 2007, označili jím neutrofilní buněčnou smrt v důsledku tvorby extracelulárních pastí, což je primárně uznáváno jako ochrana proti mikrobiální infekci (Steinberg and Grinstein 2007). Od zavedení pojmu „NETóza“ byl tento jev podrobněji zkoumán a bylo zjištěno, že může být aktivován nejen bakteriální infekcí, ale také za sterilních podmínek (spojených např. s trombózou, rakovinou, aterosklerózou či diabetem (Fadini *et al.* 2016).

NETóza je tedy unikátní typ buněčné smrti, který je charakterizován uvolňováním dekonzenzovaného chromatinu a granulárního obsahu do extracelulárního prostoru a poprvé byl pozorován u neutrofilních granulocytů (Brinkmann *et al.* 2004). NETóza je pouze jedním z mechanismů, které může neutrofilní granulocyt pro boj s patogeny využít, dále obranu organismu zajišťuje fagocytózou, oxidativním vzplanutím, či degranulací (obr. 1) (Brinkmann, 2004).



## 2.1 Neutrofilní granulocyty



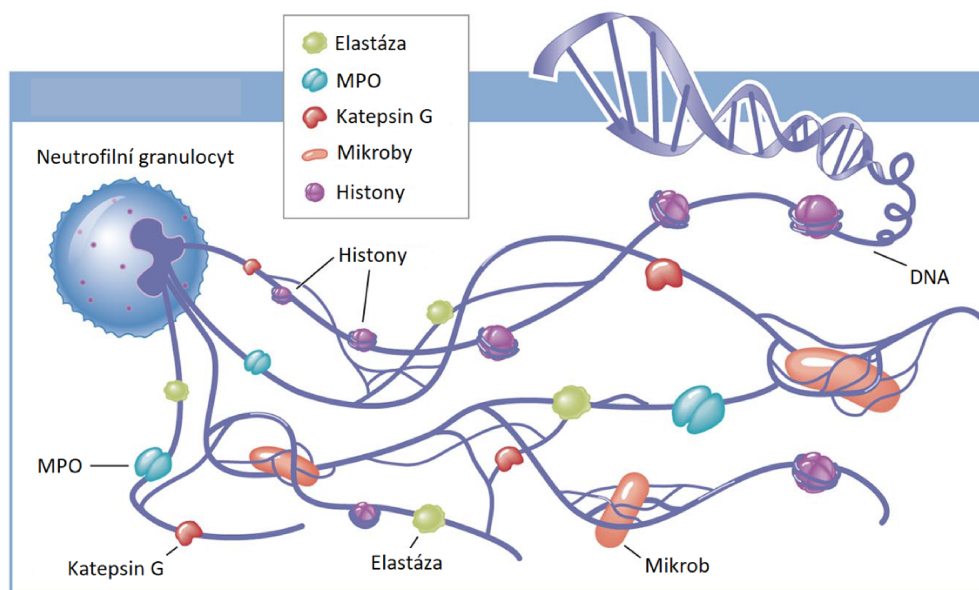
**OBRÁZEK 2: NEUTROFILNÍ GRANULOCYT, VÍNOVĚ MNOHOLALOČNATÉ JÁDRO, BÉŽOVÉ PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ GRANULE (PŘEVZATO Z: URL 1)**

Neutrofilní granulocyty (Obr. 2), neutrofilny či polymorfonukleární leukocyty, patří do skupiny granulocytů, které jsou schopné např. fagocytózy, degranulace či NETózy. Společně s nimi jsou v této skupině bazofilní a eozinofilní granulocyty, které jsou též schopné mechanismu NETózy. Obranné mechanismy jsou využívány při boji s mikroorganismy a patogeny, které se dostanou do organismu.

Jedná se o leukocyty o velikosti 10–15  $\mu\text{m}$ , které mají mnoholaločnaté jádro. V cytoplazmě nalezneme 3 typy granulí: primární (azurofilní) obsahující myeloperoxidázu, sekundární (specifické) s laktoferinem a terciální granule s želatinázou (Borregaard, 2010). Granulocyty tvoří jednu z nejpočetnějších složek všech leukocytů organismu. V krvi jich však najdeme pouze malé procento. Nejvíce jich lze detekovat v kostní dřeni, kde jsou kumulovány v nedozrálém stavu. Dozrávají až po kontaktu se stimulanty, jakými jsou např. prozánětlivé cytokiny či patogeny. Po stimulaci jsou krevním řečištěm transportovány až do místa zánětu, kde jsou důležitým prvkem boje s patogeny. Podle výzkumu provedeného týmem doktora Fuchse z roku 2007 je NETóza v některých případech účinná více než fagocytóza, která je na druhou stranu častější a rozšířenější v boji s patogeny (Fuchs *et al.*, 2007).

Neutrofilní granulocyty vznikají v kostní dřeni. Denně jich je v těle dospělého jedince vytvořeno cca  $2 \times 10^{11}$  (Borregaard, 2010).

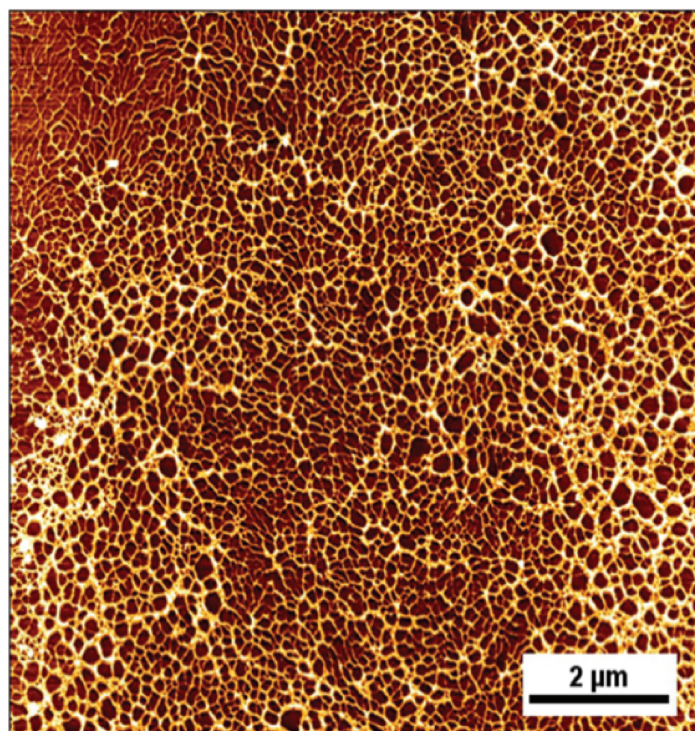
## 2.2 NETs – neutrofilní extracelulární síť



**OBRÁZEK 3: NEUTROFILNÍ EXTRACELULÁRNÍ SÍŤ, KTERÁ SE SKLÁDÁ Z DNA, ELASTÁZY, MPO (MYELOPEROXYDÁZY), KATEPSINU G, HISTONŮ (UPRAVENO A PŘEVZATO Z (Usher and Stockley, 2013))**

Neutrofilní granulocyty jsou schopny produkovat neutrofilní extracelulární síť během NETózy. Tyto sítě mají svoji velice specifickou strukturu (obr. 3), která je silně baktericidní a díky tomu schopna velice efektivní likvidace.

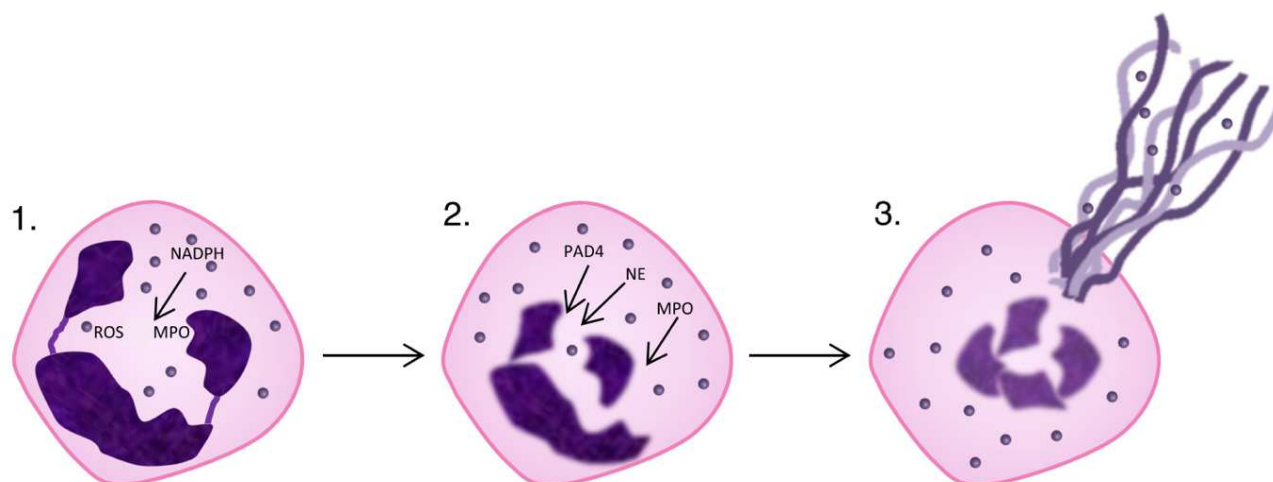
Tuto vlastnost NETs získávají díky neutrofilní elastáze, která je schopna degradovat virulentní gram negativní bakterie. Neutrofilní proteázy potom působí na virulentní struktury gram pozitivních bakterií (Brinkmann, 2004). NETs dělíme na genomovou a globulární část. Genomová část o velikosti 15–17 nm je složena z DNA a histonů z jádra neutrofilního granulocytu. Globulární část je poskládána z neutrofilní elastázy (NE), myeloperoxydázy (MPO), katepsinu G, laktoferinu, cathelicidinu (LL-37), lidských neutrofilních peptidů (HNPs) a želatinázy. Tato část se pohybuje svojí velikostí mezi 25–50 nm (Brinkmann, 2004). NETs (obr. 4) jsou 3× až 5× větší než plocha kondenzovaného chromatinu (Pires, Felix and Delcea, 2016).



**OBRÁZEK 4: NETs POD ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM. (PŘEVZATO Z (PIRES, FELIX AND DELCEA, 2016))**

## 2.3 NETóza jako děj

Neutrofilní granulocyty jsou schopny tří různých typů NETózy a to: vitální, suicidální a mitochondriální. Při suicidální NETóze se do tvorby NETs zapojují vedle NE také reaktivní formy kyslíku (ROS), které pak mají za následek smrt neutrofilního granulocytu. Kdežto u vitální NETózy při tvorbě NETs nejsou použity ROS a neutrofilní granulocyt si i přes úplnou ztrátu jádra zachovává své biologické funkce jako je chemotaxe a fagocytóza (Pilszczek et al., 2010; Yipp et al., 2012; Clark et al., 2007). Tato NETóza je až 3× rychlejší než suicidální, trvá od 5 do 60 minut. Posledním typem je mitochondriální NETóza, při které je z neutrofilního granulocytu pro tvorbu NETs uvolňována mitochondriální DNA. Zajímavostí je, že tato NETóza je pozorována především u pacientů, kteří prodělali chirurgický zákrok (Berthelot *et al.*, 2017).



**OBRÁZEK 5: VZNIK NEUTROFILNÍCH EXTRACELULÁRNÍCH SÍTÍ; NADPH (NIKOTINAMIDADENINDINUKLEOTIDFOSFÁT), ROS (REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU), MPO (MYPEROXIDÁZA), PAD4 (PEPTYDYLRARGININ 4), NE (NEUTROFILNÍ ELASTÁZA). 1. DOŠLO K STIMULACI NEUTROFILNÍHO GRANULOCITU, DO REAKCE SE ZAPOJUJE ROS, NADPH A ZAČÍNÁ SE UVOLŇOVAT S PRIMÁRNÍCH GRANULÍ MPO. 2. V NEUTROFILNÍM GRANULOCYTU POZORUJEME PAD4, NE A TAKÉ DEKONDENZACI MNOHOLÁČNATÉHO JÁDRA. 3. NETS VYTVOŘENÉ Z LÁTEK V ČÁSTI 2 A TAKÉ Z CHROMATINU. (PŘEVZATO A UPRAVENO (USHER A STOCKLEY, 2013))**

Jak již bylo řečeno, NETóza je jedním z důležitých mechanismů, který se podílí na ochraně těla před mikroorganismy či patogeny. Jedná se o proces programované buněčné smrti, kdy jsou neutrofilní granulocyty stimulovány prozánětlivými cytokiny, interleukinem-8 (IL-8), lypopolysacharidem (LPS) či kyselinou forbomystatovou (PMA) (Brinkmann, 2004). Po stimulaci neutrofilního granulocytu začíná v kostní dřeni dozrávání, kdy po přibližně 45 minutách jsme schopni dozrálé neutrofilní granulocyty detekovat (Fuchs *et al.*, 2007), z azurofilních granulí se uvolňuje MPO a společně s NE je transportována

do mnoholaločnatého jádra neutrofilního granulocytu, tento transport trvá přibližně 60 minut. V dozrálých a stimulovaných neutrofilních granulocytech začíná po 60. minutě od stimulace dekondezace chromatinu, jádro přestává být mnoholaločnaté a dojde k dilataci mezi vnější a vnitřní jadernou membránou. V 0. minutě dilatace jsou hodnoty  $18,8 \pm 3,9$  nm a v 60. minutě  $27,9 \pm 5,8$  nm. Ve 120. minutě od stimulace můžeme pozorovat NE, jak se navazuje na chromatin stále v procesu dekondezace a z jaderné membrány se začínají tvořit drobné vezikuly. Po rozpadu jaderné membrány na vezikuly, kdy je již dokončena dekondezace chromatinu, dojde k perforaci cytoplazmatické membrány. Granulované proteiny spolu s DNA a histony se vylijí do mezibuněčného prostoru, kde se začínají navazovat a tvořit NETs. Při tvorbě NETs (obr. 5) se do extracelulárního prostoru dostává NE, která je její součástí. Právě NE může mít za následek poškození endoteliálních buněk v místě zánětu. Toto poškození je typické při systémovém lupusu erythematos (Fuchs *et al.*, 2007).

Když jsou v místě zánětu vytvořeny NETs, jsou neutrofilní granulocyty schopny interagovat s velkou škálou mikroorganismů a patogenů, např. s viry, bakteriemi, houbami či extracelulárními parazity (Lu *et al.*, 2012). Zástupci těchto mikroorganismů jsou viry, jmenovitě např. Influenza a H1N1 (Narasaraju *et al.*, 2011) nebo Feline leukemia virus (Wardini *et al.*, 2010). Jako příklad bakterií lze jmenovat *Salmonella typhimurium* (Brinkmann, 2004) a *Shigella flexneri* (Brinkmann, 2004) nebo *Streptococcus Suis* (Scapinello *et al.*, 2011) či *Yersenia enterocolitica* (Casutt-Meyer *et al.*, 2010). Z extracelulárních parazitů poté *Plasmodium falciparum* (Baker *et al.*, 2008), *Toxoplasma gondii* (Abi Abdallah *et al.*, 2012) a *Eimeria bovis* (Behrendt *et al.*, 2010). *Aspergillus fumigatus* (McCormick *et al.*, 2010) a *Candida glabrata* (Springer *et al.*, 2010) najdeme mezi houbami.

Všechny procesy v těle jsou schopny regulace. Mezi regulátory NETózy patří difenyléndiol (DPI), hodnota pH, nikotin, reaktivní formy kyslíku (ROS), peptidylarginin 4 (PAD4) či Rac proteiny.

DPI je inhibítozem nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) oxidázy, zabraňuje tvorbě NETs a produkci ROS, tím pádem se podílí i na regulaci smrti buněk. A to v případě, že byl neutrofilní granulocyt stimulován PMA nebo *S. aureus*. Při této stimulaci jsou pozorovány primární váciky a z nich se uvolňující MPO a NE, dále také dekondezace jádra, navazování všech komponentů a postupná tvorba NETs (Fuchs *et al.*, 2007). Významnou úlohu hrají ROS, např.  $^1O_2$ . Potlačení a omezení tvorby ROS by mohlo pomoci při regulaci tvorby NETs a minimalizovat tak poškození např. endoteliálních buněk (Nishinaka *et al.*,

2011). Hodnota pH je významným ukazatelem rychlosti NETózy, kdy se zvyšující se hodnotou pH se zvyšuje také intenzita tvorby NETs. Pokud je tedy hodnota pH vyšší než běžná hodnota pH krve (~7,4), má to pozitivní dopad na tvorbu NETs. V kyslejších prostředí bude NETóza zpomalována (Khan et al., 2018), což by mohlo být výhodou při léčbě autoimunitních onemocnění. Ve studii z roku 2016 zařazují mezi faktory, které ovlivňují NETózu, nikotin, který může být stimulantem nedozrálých neutrofilních granulocytů. Pokud jsou neutrofilní granulocyty stimulovány nikotinem, začne tvorba NETs a celý proces NETózy se zpožděním 2–4 hodiny. V následujících 10 hodinách se pak tvorba NETs neustále navyšuje (Hosseinzadeh et al., 2016). Důležitou roli v tvorbě NETs hraje i peptidylarginin 4, který podporuje dekonenzaci chromatinu. Za jeho přítomnosti se lépe přeměňuje arginin a citrulin na histonových ocáscích (Li et al., 2010). Rac proteiny, malé G-proteiny, mají svoji úlohu v regulaci zánětlivých signálů a z části ovlivňují tvorbu ROS (Dinauer, 2003).

Další parametr, který může ovlivnit tvorbu NETs, je hladina kyslíku v krvi. Podle studie z roku 2016 (Heinemann 2016) je tvorba NETs při hypoxii redukována v závislosti na PMA. Neutrofilny také jinak reagují při hypoxii a normoxii. Je tedy důležité si uvědomit, že při studiu neutrofilů je nutné dbát i na hladinu kyslíku.

### 3 Autoimunitní onemocnění a NETóza

V případě autoimunitních onemocnění (AO) se jedná o multifaktoriální onemocnění. Propuknutí AO není vždy zcela zřejmé, má určitý genetický základ, který je podpořen vlivy z vnějšího prostředí jedince. Imunitní systém organismu reaguje na podnět, který zapříčiní, že buňky organismu jsou vyhodnoceny jako tělu nebezpečné a mělo by dojít k jejich zničení.

Autoimunitní onemocnění můžeme rozdělit na orgánově specifická a nespecifická. Při orgánově specifickém AO dochází k poškození tkání autoreaktivními T-lymfocyty nebo autoprotilátkami. Autoprotilátky mohou ovlivnit funkci v cílových strukturách nebo mají toxický efekt. Mezi orgánově specifická onemocnění patří např. celiakie, kdy tělo reaguje na lepek přijímaný potravou, psoriáza, diabetes a další. Mezi orgánově nespecifická autoimunitní onemocnění či systémová autoimunitní onemocnění patří systémový lupus erythematoses nebo revmatoidní artritida. K imunokomplexovému poškození tkání dojde reakcí, která je namířena proti antigenům a konzervovaným strukturám v jádře.

NETóza může mít vliv na rozvoj AO, protože při tvorbě NETs se do extracelulárního prostoru dostává volná DNA (cfDNA), která funguje jako alarmin pro imunitní systém a podílí se na spuštění imunitní odpovědi (Korabečná 2017).

#### 3.1 NETóza a systémový lupus erythematoses

Systémový lupus erythematoses (SLE) je multiorgánové onemocnění typické vytvářením protilátek proti různým strukturám v buněčném jádře jedince. Mezi nejčastější struktury patří dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (ds-DNA) či antinukleární protilátky (ANA). Onemocnění je častější u žen a asi v 60 % případů se toto onemocnění projeví mezi 13. a 40. rokem života. SLE postihuje kůži, klouby, plíce, srdce, centrální nervovou soustavu (CNS), krevní buňky nebo cévy. Má vysokou úmrtnost, která souvisí s napadením více orgánů imunitním systémem a jejich selhávání (Jarrot *et al.*, 2016).

U SLE hrají významnou úlohu v patogenezi granulocyty s nízkou hustotou (tzv. LDG – low-density granulocytes), což je skupina granulocytů s odlišným fenotypem a funkcí. Neutrofilní granulocyty, především LDG, u SLE pacientů vylučují dsDNA. Při větším množství LDG je tedy zvýšena tvorba NETs. Neutrofilní granulocyty reagují imunitní odpovědí i na dsDNA ostatních granulocytů. Produkce jako taková nemá vliv na vážnost onemocnění. Když je dsDNA mimo buňku, je to alarmin pro imunitní systém, který se všichni volnou DNA snaží degradovat (E. Villanueva *et al.*, 2011). LDG při NETóze

vylučují velkou škálu imunostimulačních molekul a autoantigenů, které jsou důležité pro stimulaci adaptivní i vrozené imunity. Pokud je u SLE pacientů v krvi zvýšené množství LDG, mají tito pacienti zvýšenou náchylnost ke kožním infekcím. U pacientů, v jejichž séru detekujeme zvýšenou hladinu anti-dsDNA, nalezneme v kůži velké agregáty NETs. NETs také u těchto pacientů extrudují dsDNA a LL-37, což jsou důležité antigenní stimuly pro tvorbu anti-dsDNA (E. Villanueva *et al.*, 2011).

Společně s apoptickými buňkami u SLE pacientů cirkulují v krvi mikročástice schopné aktivovat plazmocytoidní dendritické buňky (pDC) a myeloidní dendritické buňky (mDC). Imunitní komplexy přinutí pDC k sekreci prozánětlivých cytokinů, například interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) a interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Právě IFN- $\alpha$  je sekretován ve velkém množství, což může mít za následek, že onemocnění je orgánově nespecifické (Dieker *et al.*, 2016).

Při SLE jsou poškozovány endoteliální buňky, příčinou je zvýšená tvorba NETs a vylévání NE do extracelulárního prostoru při perforaci cytoplazmatické membrány neutrofilního granulocytu. Při výzkumu Handono a kol. bylo pozorováno, že terapeutický potenciál by mohlo mít podávání dávek vitamínu D (1,25 (OH)2D3), který je schopný imunomodulace. Vitamin D by měl snížit časné praskání neutrofilních granulocytů u pacientů se systémovým lupusem, čímž by se zabránilo vylévání obsahu granulocytů (Handono *et al.*, 2016).

Při výzkumu Jarrot a kol. došli k závěru, že u onemocnění SLE a AAV (Antineutrophile Cytoplasmatic Antibodies associated Vasculitida) dochází k překrytí. U většiny zkoumaných subjektů byla prokázána obě tato onemocnění. Rozpětí jejich nástupu se však lišilo bez závislosti na tom, které onemocnění propuklo dříve. Onemocnění také sdílí klinické příznaky, kterými jsou například artritida či kožní léze. Odlišit se od sebe dají například demograficky nebo renální patologií, kterou pacienti trpěli, způsobené jak AAV, tak i SLE, a u každého onemocnění je patologie rozlišná (Jarrot *et al.*, 2016).

### **3.2 NETóza a ANCA – asociovaná vaskulitida**

Jedná se o systémové onemocnění, při kterém nekrotizují malé a střední cévy. Onemocnění je spojené s MPO a také s proteinázou 3 (PR3). ANCA – asociovaná vaskulitida (AAV) se dá rozdělit do několika typů podle toho, vůči čemu je nejvíce reaktivní. Např. MPO-ANCA, která je reaktivní vůči MPO a PR3-ANCA, která reaguje na PR3. Jednou z klinicko-patologických variant onemocnění je mikroskopická polyangitida, při které jsou napadány malé a střední cévy v glomerulu (Kallenberg, 2011).

Neutrofilní granulocyty aktivované prozánětlivými cytokiny patogenů po tomto stimulu exprimují na svůj povrch MPO a PR3. Na MPO a PR3 se následně naváží protilátky ANCA. Takto aktivované neutrofilie způsobují poškození vaskulárních endotelových buněk, toto poškození vede k rozvoji vaskulitidy malých cév (Kusunoki *et al.*, 2016).

U mikroskopické polyangitidy (MPA; jedná se o MPO-ANCA) dochází k navázání patogenní ANCA na povrch neutrofilů aktivovaných prozánětlivými cytokiny. Tímto spojením dojde k podpoření tvorby NETs a následuje destrukce malých a středních cév v glomerulu (Nakazawa *et al.*, 2013).

Jak se ale ukázalo, u AAV pacientů je vyšší hladina NETs a asociovaných proteinů NETs, které se dají využít k hodnocení závažnosti onemocnění, jelikož s ním korelují. Nevýhodou je však malá citlivost či specifická těchto testů. Proto je třeba provádět nové studie, které by napomohly k lepší detekci (Söderberg and Segelmark, 2018).

### **3.3 NETóza a revmatoidní artritida**

Revmatoidní artritida (RA) je chronickým autoimunitním onemocněním postihujícím především klouby, může se však rozšířit do celého těla, kdy je u takovýchto pacientů zvýšena mortalita až o 1,5 % oproti zdravé populaci (van den Hoek *et al.*, 2017). Častěji se toto onemocnění vyskytuje u žen, kdy je prevalence 0,51 %, kdežto u mužů 0,16 % (Zlatkovič-Švenda *et al.*, 2013). Mortalita u dlouhodobě nemocných pacientů je poměrně vysoká, ve studii, kde bylo 11 let sledováno 1 429 pacientů starších 18 let, zemřela v tomto období asi 1/3 pacientů (32 %). Příčinou smrti bylo např. kardiovaskulární onemocnění (31 %), nádorové onemocnění (24 %), respirační onemocnění (22 %), cévní mozková příhoda (10 %) a jiná (Young *et al.*, 2006).

U RA dochází k nevratnému poškození synoviální chrupavky a má další množství extraartikulárních projevů. Za normálních okolností je synoviální chrupavka infiltrována imunitními a efektorovými buňkami. Tyto buňky a cytokiny se podílejí na šíření odpovědi a podněcují efektorové buňky k poškození chrupavky a kosti. Zhrubnutí synovia a omezení zpětného vstřebávání tekutiny do kloubu mají za následek typické příznaky revmatoidní artritidy jako je otok, ztuhlost kloubů, snížená mobilita a také bolest kloubů. Na rentgenovém snímku lze všechny tyto příznaky pozorovat jako zúžení kloubního prostoru a mají za následek postupnou invaliditu pacienta (Brown and Isaacs, 2014).

U pacientů s RA je typická přítomnost protilátek proti citrulinovaným proteinům (ACPA). Tyto protilátky můžeme rozdělit na pozitivní a negativní. Pokud má pacient ACPA – pozitivní



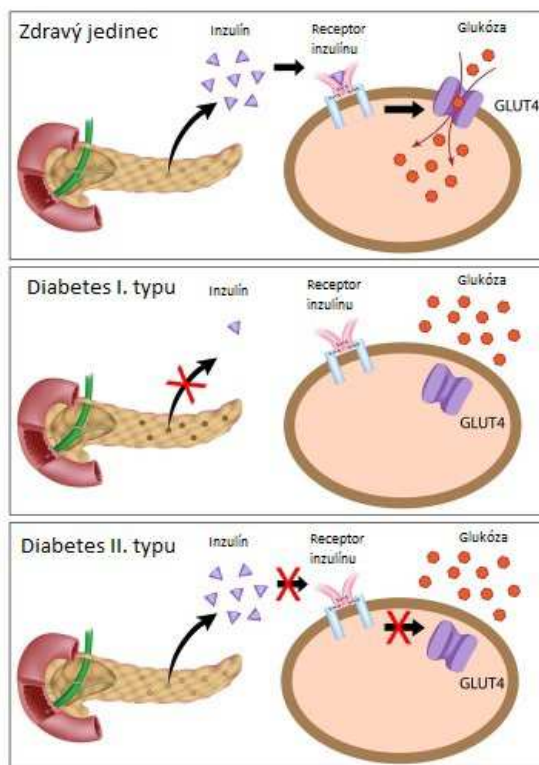
revmatoidní artritidu, bude mít onemocnění závažnější a těžší průběh. U pacientů s ACPA – negativní revmatoidní artritidou není průběh onemocnění tolik závažný. ACPA rozpoznávají v modifikovaných proteinech aminokyseliny citrulin, který je generován pomocí peptidyl arginin deaminázy 5 (PAD5). Jak už bylo řečeno, ACPA rozpozná proteiny, které obsahují citrulin. Mezi ně můžeme počítat i homocitrulin, který vzniká konvertováním lysinu za pomoci kyanatů, které jsou důležité v karbamylaci (Trouw, Huizinga and Toes, 2013). Revmatoidní artritida se může rozvinout i u pacientů, kteří nemají specifikovanou artritidu nebo artralgií, které jsou předpokladem onemocnění. Pokud se u pacientů bude vyskytovat ACPA, je určitá pravděpodobnost, že se revmatoidní artritida projeví. Genetickým rizikem, které stojí za revmatoidní artritidou, jsou alely lidského leukocytárního antigenu nebo protein tyrosin fosfatáza typu 22 (PTPN22) (Trouw, Huizinga and Toes, 2013).

V periferní krvi pacientů je zvýšené množství NETs. Četnost a aktivita NETózy pozitivně korelují s množstvím ACPA a také se systémovými markery zánětů. U těchto pacientů vykazovaly neutrofilní granulocyty větší sklon k tvorbě NETs než neutrofilní granulocyty od zdravých jedinců. K NETóze docházelo nejčastěji v periferních oblastech a kloubech (Khandpur *et al.*, 2013).

Při diagnostice revmatoidní artritidy by mohla být použita detekce zvýšené hladiny komponent NETózy. Jako nejlepší marker se u této diagnostiky dle výzkumu z roku 2014 jeví nukleozómy. Výsledkem testu byla senzitivita 91 % a specifita 92 % (Sur Chowdhury *et al.*, 2014).

### **3.4 NETóza a diabetes**

Mezi autoimunitní onemocnění řadíme také Diabetes mellitus typu 1 (T1DM), který je orgánově specifický. Hladina glukózy v krvi pacientů s T1DM je zvýšená, a to z důvodu destrukce beta buněk pankreatu, které jsou odpovědné za produkci inzulínu (obr. 6). Pacienti jsou náchylní k infekcím a špatnému hojení ran. Za zmínku však stojí i diabetes mellitus typu 2 (T2DM), který je metabolickým onemocněním, kdy jsou pacienti rezistentní na inzulín (obr. 6). Propuknutí onemocnění je z části závislé na genetické predispozici v kombinaci s vnějšími vlivy na organismus, kterými může být špatné stravování a životní styl (strava s vysokým podílem tuků, nedostatek pohybu a s tím spojená obezita). Onemocnění se projevuje ve středním věku, kdy jsou receptory na inzulín opotřebené a nejsou schopny na něj reagovat. Pokud je tělo enormně zatíženo glukózou může k propuknutí onemocnění dojít dříve (Seino *et al.*, 2010).



**OBRÁZEK 6: POROVNÁNÍ ZDRAVÉHO JEDINCE S DIABETEM TYPU I TYPU II (PŘEVZATO A UPRAVENO Z URL 2)**

k rezistenci na inzulin a IL-6 má diabetogenní účinky na hypofýzu, kde jsou stimulována centra pro produkci adenokortikoidních hormonů v kůře nadledvin (Alexandraki *et al.*, 2008).

Vyšší tvorba NETs souvisí také s výrazně zvýšenou cirkulací NE a PR3 u pacientů T1DM oproti zdravým kontrolním subjektům (Wang *et al.*, 2014). Nejvýraznější je hladina cirkulace u pacientů trpících onemocněním méně než 1 rok, a to cirkulace NE  $\sim 5\times$  vyšší a cirkulace PR3  $\sim 3\times$  vyšší. Rozdíl v hladinách neutrofilních serinových proteáz se mezi pohlavími neliší a má případný diagnostický potenciál u T1DM (Wang *et al.*, 2014).

V rámci výzkumu Wang a kol. bylo prokázáno, že v případě hyperglykemie docházelo ke spontánní tvorbě NETs, kdy nebylo zapotřebí stimulů u T2DM. Ve vzorcích od zdravých jedinců k tvorbě NETs nedocházelo vůbec. Produkce NETs je i v tomto případě závislá na ROS (Wang *et al.*, 2019).

Právě zvýšená hodnota glukózy u pacientů s diabetem T1 má vliv na aktivitu neutrofilních granulocytů. Dochází k častější NETóze a tvorbě NETs (Menegazzo *et al.*, 2015). Vliv na diabetes mají i cytokiny, které jsou nadměrně produkovány. Mezi prozánětlivé cytokiny patří např. interleukin-6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Tyto cytokiny mají vliv cytotoxický, cytostatický a cytokidní. TNF- $\alpha$  samostatně nebo v kombinaci s interleukinem-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) se podílí na autoimunitním napadání  $\beta$ -buněk v pankreatu. TNF- $\alpha$  může dokonce přispět

## 4 Závěr

NETóza jako proces neutrofilních granulocytů je stimulována PMA, LPS či prozánětlivými cytokiny. Tyto látky jsou produkovány cizorodými mikroorganismy přítomnými v organismu. Neutrofilní granulocyty jsou tedy první obrannou linií organismu v boji s patogeny.

Vytvořené NETs jsou díky NE baktericidní a jsou schopny účinně likvidovat patogeny. Problémem při tvorbě NETs je volná DNA, která se dostává do extracelulárního prostoru a je alarminem pro imunitní systém, který se aktivuje a může tak zaútočit i na buňky tělu vlastní.

Proces vytváření NETs trvá v průměru 3 hodiny, kdy se po aktivaci neutrofilů v kostní dřeni, uvolňuje NE a MPO a putují do jádra, kde za přispění ROS dochází k dekonenzaci chromatinu, na který se právě NE a MPO naváží. Nakonec dojde k lýze buňky a směs látek se dostává do extracelulárního prostoru v místě zánětu, kde se začínají tvořit NETs. Celý proces uvnitř neutrofilního granulocytu probíhá při jeho migraci krevním řečištěm z kostní dřene až k místu vniku patogenu do organismu. NETózu a NETs je možné pozorovat i u pacientů po chirurgickém zákroku.

Při SLE LDG vylučují dsDNA a jsou v organismu ve zvýšeném množství, které má za následek zvýšenou tvorbu NETs. Pacienti s tímto onemocněním mají vyšší náchylnost ke kožním infekcím. Kvůli zvýšené tvorbě NETs dochází také k poškozování endoteliálních buněk. Bylo zjištěno, že se SLE vyskytuje velmi často společně s AAV.

Při AAV jsou neutrofilny stimulovány protilátkami, které zapříčiní, že se na neutrofil naváží protilátky ANCA, čímž je podpořena tvorba NETs. Vyšší tvorba NETs má za následek poškození vaskulárních endotelových buněk. Tvorba NETs se dá využít při diagnostice, jelikož koreluje se závažností onemocnění. Je však třeba přijít na specifitější testy, aby byla diagnostika přesnější.

U pacientů s RA je typická přítomnost ANCA protilátek, s jejich množstvím koreluje aktivita neutrofilů a tvorba NETs. Navýší se tedy NETóza a to především v periferních oblastech a v kloubech. Zvýšené množství NETs se dá využít v diagnostice. Jako nejspolehlivější marker se ukázaly nukleozómy.

Při T1DM jsou poškozovány  $\beta$ -buňky pankreatu imunitním systémem, který je stimulován prozánětlivými cytokiny, které aktivují neutrofilny k tvorbě NETs. Tvorba NETs je také podpořena zvýšenou hladinou glukózy. Díky zvýšené tvorbě NETs v organismu cirkulují ve větším množství NE a PR3, které mají možný diagnostický potenciál u T1DM.

Ve výše zmíněných onemocněních hraje NETóza výraznou úlohu v jejich patogenezi, avšak k přiblížení a konkretizování této role je zapotřebí dalších studií. V komponentách najdeme i velký potenciál pro diagnostiku, ten je však třeba také podpořit dalšími studiemi, aby diagnostika byla co nejpřesnější a nejspecifičtější.

## 5 Seznam použitých zkratek

AAV	ANCA asociovaná vaskulitida
ACPA	protilátky proti citrulinovaným proteinům
ANCA	protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (Antineutrophile cytoplasmatic antibodies)
ANA	antinukleární protilátky
AO	autoimunitní onemocnění
cfDNA	volná DNA (cell free DNA)
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPI	difenyléndiodium
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
GAD65	dekarboxyláza glutamové kyseliny
HNPs	lidské neutrofilní peptidy
IFN- $\alpha$	interferon alfa
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL-1 $\beta$	interleukin -1 $\beta$
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
LDG	granulocyty s nízkou hustotou
LL-37	kathelicidin
LPS	lypopolysacharidy
mDC	myeloidní dendritická buňka
MPA	mikroskopická polyangitida
MPO	myoperoxidáza
MPO-ANCA	AAV reagující proti MPO
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NE	neutrofilní elastáza
NETs	neutrofilní extracelulární síť
PAD4	peptidylarginin 4
PAD5	peptidylarginin deamináza 5
pDC	plazmocytoïdní dendritická buňka
PMA	kyselina forbolmyrastatová

PR3	proteináza 3
PR3-ANCA	AAV reagující proti PR3
PTPN22	protein tyrosinfosfatáza 22
RA	revmatoidní artritida
ROS	reaktivní formy kyslíku
SLE	systemový lupus erythematoses
T1DM	diabetes mellitus typ 1
T2DM	diabetes mellitus typ 2
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa

## 6 Seznam použité literatury

- Abi Abdallah, D. S. *et al.* (2012) 'Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology, 80(2), pp. 768–77.
- Alexandraki, K. I. *et al.* (2008) 'Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: Associations with low-grade systemic inflammation', *Journal of Clinical Immunology*, 28(4), pp. 314–321.
- Baker, V. S. *et al.* (2008) 'Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age', *Malaria Journal*, 7(1), p. 41.
- Behrendt, J. H. *et al.* (2010) 'Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite Eimeria bovis', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(1), pp. 1–8.
- Berthelot, J. M. *et al.* (2017) 'NETosis: At the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis', *Joint Bone Spine*. Soci&eacute;t&eacute; fran&ccedil;aise de rhumatologie, 84(3), pp. 255–262.
- Borregaard, N. (2010) 'Neutrophils, from Marrow to Microbes', *Immunity*. Cell Press, pp. 657–670.
- Brinkmann, V. (2004) 'Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria', *Science*, 303(5663), pp. 1532–1535.
- Brown, P. M. and Isaacs, J. D. (2014) 'Rheumatoid arthritis: from palliation to remission in two decades.', *Clinical medicine (London, England)*. Royal College of Physicians, 14 Suppl 6(Suppl 6), pp. s50-5.
- Casutt-Meyer, S. *et al.* (2010) 'Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword.', *PloS one*. Public Library of Science, 5(12), p. e15159.

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463–9.

Dieker, J. *et al.* (2016) ‘Circulating Apoptotic Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus Patients Drive the Activation of Dendritic Cell Subsets and Prime Neutrophils for NETosis’, *Arthritis and Rheumatology*, 68(2), pp. 462–472.

Dinauer, M. C. (2003) ‘Regulation of neutrophil function by Rac GTPases’, *Current Opinion in Hematology*, 10(1), pp. 8–15.

Döhrmann, S., Cole, J. N. and Nizet, V. (2016) ‘Conquering Neutrophils’, *PLoS Pathogens*. Edited by W. E. Goldman. Public Library of Science, p. e1005682.

Fadini GP, Menegazzo L, Scattolini V, Gintoli M, Albiero M, Avogaro A. A perspective on NETosis in diabetes and cardiometabolic disorders. *NutrMetabCardiovascDis*. 2016;26(1):1–8.

Fuchs, T. A. *et al.* (2007) ‘Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps’, *Journal of Cell Biology*, 176(2), pp. 231–241.

Handono, K. *et al.* (2016) ‘Vitamin D Prevents Endothelial Damage Induced by Increased Neutrophil Extracellular Traps Formation in Patients with Systemic Lupus Erythematosus’, *Acta Medica Indonesiana*, 46(3).

van den Hoek, J. *et al.* (2017) ‘Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study’, *Rheumatology International*. Springer Berlin Heidelberg, 37(4), pp. 487–493.

Hosseinzadeh, A. *et al.* (2016) ‘Nicotine induces neutrophil extracellular traps’, *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5), pp. 1105–1112.

Jarrot, P. A. *et al.* (2016) ‘Systemic lupus erythematosus and antineutrophil cytoplasmic



antibody-associated vasculitis overlap syndrome in patients with biopsy-proven glomerulonephritis', *Medicine (United States)*, 95(22), p. e3748.

Kallenberg, C. G. M. (2011) 'Pathogenesis of ANCA-Associated Vasculitis, an Update', *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 41(2), pp. 224–231.

Khan, M. A., Philip, L. M., Cheung, G., Vadakepeedika, S., Grasmann, H., Swezey, N., & Palaniyar, N. (2018). Regulating NETosis: Increasing pH Promotes NADPH Oxidase Dependent NETosis. *Frontiers in Medicine*, 5, p.19

Khandpur, R. *et al.* (2013) 'NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis', *Science Translational Medicine*, 5(178), p. 178ra40.

Korabecna, M. and Tesar, V. (2017) 'NETosis provides the link between activation of neutrophils on hemodialysis membrane and comorbidities in dialyzed patients', *Inflammation Research*. Springer International Publishing, 66(5), pp. 369–378.

Kusunoki, Y. *et al.* (2016) 'Peptidylarginine Deiminase Inhibitor Suppresses Neutrophil Extracellular Trap Formation and MPO-ANCA Production.', *Frontiers in immunology*. Frontiers Media SA, 7, p. 227.

Li, P. *et al.* (2010) 'PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps', *The Journal of Experimental Medicine*, 207(9), pp. 1853–1862.

Lu, T. *et al.* (2012) 'A NET Outcome', *Frontiers in Immunology*, 3, 365

McCormick, A. *et al.* (2010) 'NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*', *Microbes and Infection*, 12(12–13), pp. 928–936.

Menegazzo, L. *et al.* (2015) 'NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes', *Acta Diabetologica*, 52(3), pp. 497–503.

Nakazawa, D. *et al.* (2013) 'Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient

with microscopic polyangiitis', *La Presse Médicale*, 42(4), p. 755.

Narasaraju, T. *et al.* (2011) 'Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis', *The American Journal of Pathology*, 179(1), pp. 199–210.

Nishinaka, Y. *et al.* (2011) 'Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(1), pp. 75–79.

Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, *et al.* A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010;185(12):7413–25.

Pires, R. H., Felix, S. B. and Delcea, M. (2016) 'The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy', *Nanoscale*. The Royal Society of Chemistry, 8(29), pp. 14193–14202.

Scapinello, S. *et al.* (2011) 'Bactericidal activity of porcine neutrophil secretions', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 139(2–4), pp. 113–118.

Seino, Y. *et al.* (2010) 'Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus', *Journal of Diabetes Investigation*, 1(5), pp. 212–228.

Söderberg, D. and Segelmark, M. (2018) 'Neutrophil extracellular traps in vasculitis, friend or foe?', *Current Opinion in Rheumatology*, 30(1), pp. 16–23.

Springer, D. J. *et al.* (2010) 'Extracellular Fibrils of Pathogenic Yeast *Cryptococcus gattii* Are Important for Ecological Niche, Murine Virulence and Human Neutrophil Interactions', *PLoS ONE*. Edited by D. Fox, 5(6), p. e10978.

Steinberg BE, and Grinstein S. 2007. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE* 2007(379):pe11.

Sur Chowdhury, C. *et al.* (2014) 'Enhanced neutrophil extracellular trap generation in

rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility', *Arthritis Research & Therapy*, 16(3), p. R122.

Trouw, L. A., Huizinga, T. W. J. and Toes, R. E. M. (2013) 'Autoimmunity in rheumatoid arthritis: Different antigens - Common principles', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(SUPPL. 2), pp. ii132–ii136.

Usher, A. K. H. and Stockley, R. A. (2013) 'The link between chronic periodontitis and COPD: a common role for the neutrophil?', *BMC medicine*. BioMed Central, 11, p. 241.

Villanueva, Eneida *et al.* (2011) 'Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 187(1), pp. 538–52.

Villanueva, E. *et al.* (2011) 'Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus', *The Journal of Immunology*, 187(1), pp. 538–552.

Wang, L. *et al.* (2019) 'Hyperglycemia Induces Neutrophil Extracellular Traps Formation Through an NADPH Oxidase-Dependent Pathway in Diabetic Retinopathy', *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 9, p. 3076.

Wang, Y. *et al.* (2014) 'Increased Neutrophil Elastase and Proteinase 3 and Augmented NETosis Are Closely Associated With b-Cell Autoimmunity in Patients With Type 1 Diabetes', *Diabetes*, 63, pp. 4239–4248.

Wardini, A. B. *et al.* (2010) 'Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus', *Journal of General Virology*, 91(1), pp. 259–264.

Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386–93.

Young, A. *et al.* (2006) 'Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis', *Rheumatology*, 46(2), pp. 350–357.

Zlatković-Švenda, M. I. *et al.* (2013) 'Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia', *Rheumatology International*. Springer Berlin Heidelberg, 34(5), pp. 649–658.

### **Internetové odkazy**

URL1 <[https://www.wikiskripta.eu/w/Neutropenie\\_u\\_d%C4%9Bt%C3%AD#/media/File:Blusen\\_0676\\_Neutrophil\\_\(crop\).png](https://www.wikiskripta.eu/w/Neutropenie_u_d%C4%9Bt%C3%AD#/media/File:Blusen_0676_Neutrophil_(crop).png)> citováno 28. 4. 2019

URL2 <<https://www.hayadan.org.il/autoimmune-0601143>> citováno 28. 4. 2019