

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ»**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. Ι. ΓΙΑΜΑΡΕΛΛΟΣ-ΜΠΟΥΡΜΠΟΥΛΗΣ**

**ΜΑΡΙΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΑΔΑΜΗ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΔΥΣΡΥΘΜΙΣΗ ΣΤΗ ΝΟΣΟ COVID-19**

**ΑΘΗΝΑ 2021**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ: Ανοσιακή δυσρύθμιση στη νόσο COVID-19**

ΜΑΡΙΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΑΔΑΜΗ

A.M.: 20190585

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ε. Ι. Γιαμαρέλλος – Μπουρμπούλης, Καθηγητής,  
Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Ε. Ι. Γιαμαρέλλος – Μπουρμπούλης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Γεώργιος Δημόπουλος, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. Καρολίνα Ακινόσογλου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ

### Ανοσιακή Δυσρύθμιση στη νόσο COVID-19

Δεδομένης της τρέχουσας πανδημίας του 21<sup>ου</sup> αιώνα εξαιτίας της νόσου COVID-19, η προσπάθεια για κατανόηση και ερμηνεία της παθοφυσιολογίας αυτής φαντάζει επιτακτική, καθώς αποδεικνύεται απειλητική για τη ζωή εκατομμυρίων ανθρώπων. Όπως έχει ήδη μελετηθεί η ανοσολογική απόκριση στους ασθενείς με σήψη βακτηριακής αιτιολογίας, αυτή μπορεί να εκδηλωθεί με τρεις διαφορετικές καταστάσεις. Αρχικά, είτε ως ανοσοπαράλυση η οποία χαρακτηρίζεται από καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και σχετίζεται με την μειωμένη έκφραση του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου ( HLA-DR) στην επιφάνεια των CD14 μονοκυττάρων που ως συνέπεια έχει την ανεπαρκή αντιγονοπαρουσίαση, είτε ως σύνδρομο ενεργοποίησης μακροφάγων με επαγωγή μιας εκσεσημασμένης προφλεγμονώδους κατάστασης μέσω «καταιγίδας κυτταροκινών», είτε ως ενδιάμεση λειτουργική κατάσταση στην οποία εκδηλώνονται χαρακτηριστικά από τις δύο προηγούμενες καταστάσεις χωρίς φανερή δυσρύθμιση.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ανοσιακής απόκρισης 54 ασθενών με νόσο COVID-19, 26 με μη σοβαρή νόσο και 28 με εκδήλωση σοβαρής αναπνευστικής δυσχέρειας (ΣΑΔ) μετά από λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2, 104 ασθενών με βακτηριακής αιτιολογίας πνευμονία της κοινότητας και 21 ιστορικών μαρτύρων με λοίμωξη από H1N1 της πανδημίας του 2009. Οι ασθενείς με COVID-19 και ΣΑΔ παρουσιάζονται λιγότερο βαριά από την αντίστοιχη ομάδα ασθενών με σοβαρή βακτηριακή πνευμονία βάσει κλιμάκων αξιολόγησης της βαρύτητας όπως της σειριακής κλίμακας αξιολόγησης της οργανικής ανεπάρκειας (Serial organ failure assessment SOFA score και της κλίμακας οξείας φυσιολογίας και χρόνιας αξιολόγησης της υγείας II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II-APACHE II ). Οι ασθενείς αυτοί φαίνεται να υφίστανται ανοσιακή δυσρύθμιση με εκδήλωση οξείας κλινικής επιβάρυνσης

Κατόπιν διέγερσης των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος των ασθενών από μόρια λιποπολυσακχαρίτη (LPS) του παθογόνου

*Escherichia coli* O55:B5 διαπιστώνεται σταθερή παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (Tumor Necrosis Factor-α - TNF-α) στους ασθενείς με νόσο COVID-19 και στις τρεις καταστάσεις ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος, σε αντίθεση με τους ασθενείς με βακτηριακής αιτιολογίας λοίμωξη στους οποίους παρουσιάζεται σημαντική αύξηση του TNF-α κατά την ενδιάμεση κατάσταση, ενώ στη λοίμωξη από H1N1 η παραγωγή του είναι στατιστικά μικρότερη από αυτή της νόσου COVID-19. Όσον αφορά την παραγωγή της IL-1β από μονοπύρηννα του περιφερικού αίματος αυτή διαπιστώνεται σημαντικά μικρότερη κατά την κατάσταση της ανοσοπαράλυσης σε ασθενείς με σήψη από πνευμονία της κοινότητας βακτηριακής αιτιολογίας, σε αντίθεση με τους ασθενείς με λοίμωξη από SARS-CoV-2 στους οποίους σημαντικά μικρότερη παραγωγή αυτής διαπιστώνεται κατά την ανοσιακή δυσρύθμιση και υψηλότερες τιμές της στο σύνδρομο ενεργοποίησης μακροφάγων. Επιπλέον, σχετικά με την παραγωγή IL-6 στη νόσο COVID-19 σημειώνεται αντίστοιχα σταθερή παραγωγή αυτής σε όλες τις καταστάσεις της ανοσιακής απόκρισης. Σε βακτηριακής αιτιολογίας λοίμωξη σημαντική αύξηση αναδεικνύεται κατά την ενδιάμεση κατάσταση ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, ενώ μικρότερη παραγωγή αυτής διαπιστώνεται σε ασθενείς με λοίμωξη από H1N1. Τέλος, μετά από ενζυμική ανοσολογική δοκιμή (ELISA) στον ορό ασθενών με πνευμονία κοινότητας από SARS-CoV-2 δεν διαπιστώνεται σημαντική μεταβολή της τιμής συγκέντρωσης του TNF-α στις διαφορετικές καταστάσεις ανοσιακής ενεργοποίησης, αντιθέτως, οι τιμές συγκέντρωσης της IL-6 και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) διαπιστώνονται σημαντικά υψηλότερες σε κατάσταση ανοσιακής δυσρύθμισης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της ανωτέρω μελέτης αποδεικνύουν πως τα μονοπύρηννα του περιφερικού αίματος παραμένουν ικανά να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως TNF-α και IL-6 σε όλες τις καταστάσεις ανοσιακής απόκρισης με υψηλότερες συγκεντρώσεις στην φάση της ανοσιακής δυσρύθμισης, εντούτοις, η παραγωγή IL-1β παρουσιάζεται στατιστικά σημαντικά μειωμένη κατά την φάση αυτή. Όσον αφορά τη σήψη βακτηριακής αιτιολογίας και τη σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια μετά από ιογενή λοίμωξη από H1N1, τα μονοπύρηννα ανεπαρκούν να παράγουν σταθερά κυτταροκίνες με σημαντική ανεπάρκεια να διαπιστώνεται ιδίως κατά την φάση της ανοσοπαράλυσης.

## ABSTRACT

### IMMUNE DYSREGULATION IN COVID-19

In the era of 21<sup>st</sup> century when COVID-19 had first appeared, trying to understand and interpret the pathophysiology behind this new threat seems crucial, as million people's lives are in jeopardy. As it is already proven, the immune response in case of bacterial sepsis can be manifested in three different states. Firstly, either as immunoparalysis in which immune suppression is presented due to reduction of human leukocyte antigen (HLA-DR) expression on the surface of CD14 monocytes, or secondly, as macrophage activation syndrome (MAS) and hyperinflammatory responses provoked by «cytokine storm», or lastly, as an intermediate state in which both of the above immune responses are presented without any dysregulation.

In the current study immune responses of 54 patients with COVID-19, 26 of them without symptoms and 28 with severe respiratory failure (SRF), 104 patients with bacterial community acquired pneumonia and 21 historical patients with H1N1 influenza were compared. Patients with COVID-19 and SRF are presented less severe than those with bacterial community acquired pneumonia concerning scores of health severity evaluation such as Serial Organ Failure assessment score (SOFA score) and Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II). The above patients seem to undergo a kind of immune dysregulation with vivid clinical deterioration.

After exposure of peripheral blood mononuclear cells in *Escherichia coli* O55:B5 lipopolysaccharides (LPS) a steady production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was investigated for patients with COVID-19, contrary to patients with bacterial infection where significant increase was presented in intermediate state. On the other hand, in case of H1N1 infection production of TNF- $\alpha$  was significantly lower than COVID-19. Additionally, the production of IL-1 $\beta$  after the same stimulation proved a significant decrease during immunoparalysis for patients with bacterial infection, during immune dysregulation for patients with COVID-19 whereas higher production was presented during MAS. Moreover, as for IL-6 in COVID-19 it seemed to have a steady production in all of the three states of immune response, like TNF- $\alpha$ . In

bacterial infection higher production of IL-6 was presented in intermediate state, whereas lower production seemed to be in H1N1 infection. Finally, concentrations of TNF- $\alpha$  were measured in all of the three states of immune response by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in serum of patients with SARS-CoV-2 pneumonia where no significant alteration was noticed. Besides, concentrations of IL-6 and C-reactive protein (CRP) proved to be significantly higher in immune dysregulation state.

To sum up, the results of the current study depict that mononuclear cells of peripheral blood of patients with infection by SARS-CoV-2 remain potent to produce inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6 in all of the three states of immune response with higher concentrations of them being recognized during immune dysregulation. Nonetheless, a lower production of IL-1 $\beta$  is presented during this state. As for respiratory failure by bacterial as well viral pathogens such as H1N1, mononuclears face a deficit to produce cytokines in a steady manner, with more profound suppression during immunoparalysis.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με θέμα «Ανοσιακή δυσρύθμιση στη νόσο COVID-19» πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της ολοκλήρωσης των σπουδών μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ».

Με την ολοκλήρωσή της μου δίδεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή για την καθοδήγησή της καθόλη την διάρκεια διεξαγωγής της πτυχιακής μου εργασίας. Ξεχωριστή ευχαριστία από καρδιάς θα ήθελα να εκφέρω προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ε. Γιαμαρέλλο – Μπουρμπούλη που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω μια ερευνητική εργασία διαλέγοντας από κοινού θέμα που επάγεται στα άμεσα ενδιαφέροντά μου και στον τομέα που επιθυμώ να εξειδικευτώ μελλοντικά, μαθαίνοντας πολλά για την παθοφυσιολογία του ανοσολογικού συστήματος σε καταστάσεις εξωτερικής απειλής όπως η πανδημία από τη νόσο COVID-19 που διανύουμε. Επιπλέον, τον ευχαριστώ καθώς ήταν πάντα δίπλα μου διαθέσιμος να τον συμβουλευτώ οποιαδήποτε στιγμή είχα την ανάγκη.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου που συνέβαλαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο στην ολοκλήρωσή της.

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>ΣΕΛΙΔΑ</b>
Τριμελής επιτροπή	2
Περίληψη στην Ελληνική γλώσσα	3
Περίληψη στην Αγγλική γλώσσα	5
Ευχαριστίες	7
<b>Γενικό Μέρος</b>	
Εισαγωγή:Ανοσιακές διαταραχές στην COVID-19	9
Μεταβολές μονοκυττάρων στην COVID-19-	
• Αντιγόνο επιφανείας HLA-DR	12
• Πρόγνωση	15
Λεμφοκύτταρα	
• Τ-λεμφοκύτταρα	17
• Β-λεμφοκύτταρα	20
<b>Ειδικό Μέρος</b>	
Υλικά και Μέθοδοι	24
Στατιστική ανάλυση	25
Αποτελέσματα	26
Συζήτηση	40
<b>Βιβλιογραφία</b>	42



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Εισαγωγή: ανοσιακές διαταραχές στην COVID-19

Από τα τέλη του 2019 η ανθρωπότητα ήρθε αντιμέτωπη με την ραγδαία εξάπλωση ενός νέου RNA ιού του Sars-CoV-2, μέλος της οικογένειας ιών γνωστών ως κορονοιοί, η οποία είχε ως αποτέλεσμα μια πρωτόγνωρη εκδήλωση για τον 21<sup>ο</sup> αιώνα αυτήν της πανδημίας. Πλέον του ενός έτους ιατροί και επιστημονικές ερευνητικές κοινότητες προσπαθούν να επικεντρωθούν και να μελετήσουν τις μεταβολές που μπορεί ο ιός αυτός να επιφέρει στο ανοσιακό σύστημα του ξενιστή καθώς και το αντίκτυπο στην επιβίωσή του. Συγκριτικά με την ανοσιακή απόκριση που έχει μελετηθεί αρκετά στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς με σήψη βακτηριακής αιτιολογίας εκεί συναντώνται τρεις διακριτές καταστάσεις λειτουργίας του ανοσοποιητικού: το σύνδρομο ενεργοποίησης μακροφάγων (ΣΕΜ)<sup>1</sup>, η ανοσοπαράλυση προκαλούμενη από την σήψη η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή έκφραση ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (Human leukocyte antigen D related-HLA-DR) στην επιφάνεια των CD14 μονοκυττάρων<sup>2</sup> και η ενδιάμεση κατάσταση ανοσιακής απόκρισης η οποία στερείται κάποιας ανοσιακής δυσρύθμισης.

Όσον αφορά τις ανοσιακές διαταραχές που έχουν περιγραφεί στη νόσο Covid-19 ήδη πολύ πρώιμα δεδομένα από μικρές κοορτές ασθενών προτείνουν πως οι ασθενείς με σοβαρή νόσο πιθανά να υφίστανται μια υπερφλεγμονώδη κατάσταση επονομαζόμενη ως «καταιγίδα κυτταροκινών». Ωστόσο, η κατάσταση αυτή φαίνεται να αφορά στην πλειοψηφία κυρίως ασθενείς με COVID-19 εντός μονάδων εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα των κυτταροκινών αποδεικνύονται μικρότερα σε ασθενείς εκτός ΜΕΘ<sup>3</sup>. Επιπλέον, κατά την σύγκριση του ιού Sars-CoV-2 με τον ιό της γρίπης (H1N1) προοπτική μελέτη παρατήρησης που συμπεριέλαβε και μελέτη επικυρωποίησης των δεδομένων διαπιστώνει στατιστικά μεγαλύτερη εκδήλωση προφλεγμονώδους κατάστασης στους ασθενείς με H1N1 σε αντίθεση με μόνο στο 3-4% των ασθενών με λοίμωξη από Sars-CoV-2, καθιστώντας την λοίμωξη από H1N1 περισσότερο «φλεγμονώδη»<sup>3</sup>.

Η πλεοψηφία των ασθενών με COVID-19 φαίνεται να παρουσιάζει ελλείμματα ως προς την φυσική ανοσία με μείωση των λεμφοκυττάρων και ταυρόχρονα μειωμένη έκφραση των HLA-DR στην επιφάνεια των μονοκυττάρων. Ομοίως, ελλείμματα παρατηρούνται και στην επίκτητη ανοσία με πολλούς λεμφοκυτταρικούς υποτύπους να υφίστανται λειτουργική καταστολή συμπεριλαμβανομένης και του σηματοδοτικού μονοπατιού τύπου I και τύπου II παραγωγής IFN- $\gamma$  (ιντερφερόνης- $\gamma$ ), η απουσία της οποίας στους ασθενείς με COVID-19 σε αντίθεση με H1N1 φαίνεται να περιορίζει την αντιική δράση του ανοσοποιητικού<sup>3</sup>.

Σε μια προσπάθεια για επαρκέστερη κατανόηση της ανοσιακής απόκρισης μετά από λοίμωξη από τον ιό Sars-CoV-2 διεξάγονται πολλές προοπτικές μελέτες παρατήρησης με στόχο την καταγραφή δεδομένων σε τακτικές χρονικές στιγμές μετά την αρχική λοίμωξη από τον ιό. Στις πρώτες ημέρες εκδήλωσης της νόσου κυρίως το χρονικό διάστημα μεταξύ 11<sup>ης</sup> -14<sup>ης</sup> ημέρας, αποδεικνύεται κρίσιμο για κλινική επιβάρυνση του ασθενούς εξαιτίας της μέγιστης μείωσης του αριθμού τόσο των μονοκυττάρων όσο και των HLA-DR καθώς και λόγω της εκσεσημασμένης λεμφοπενίας. Κατά την συσχέτιση μη ειδικών δεικτών φλεγμονής όπως C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), φερριτίνης, δ-διμερών με την μέτρηση κυττάρων φυσικής ανοσίας (πολυμορφοπύρρηνα, υπότυποι μονοκυττάρων και HLA-DR) όσο πιο αυξημένοι παρουσιάζονται οι μη ειδικοί δείκτες φλεγμονής στα αρχικά στάδια της νόσου τόσο μεγαλύτερη η μεταβολή της φυσικής ανοσίας και πιο αργή η ανάκαμψη από την φάση της ανοσοπαράλυσης, κάτι που δεν φαίνεται να συμβαίνει σε βακτηριακής αιτιολογίας λοίμωξη.

Αναφορικά με την επίκτητη ανοσία, η παρουσία CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων φαίνεται να αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη καθώς τα κύτταρα αυτά δείχνουν να μεταβάλλουν την λειτουργικότητά τους, αντίθετα τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα παρουσιάζονται περισσότερο δραστικά και λειτουργικά.<sup>4</sup> Επιπλέον, όσον αφορά την κινητική των κυττάρων αυτών και τη συσχέτισή της με την έκβαση της νόσου φαίνεται πως σε ασθενείς που τελικά θα πεθάνουν το ανοσιακό μοντέλο που επικρατεί κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου, χρονικό διάστημα  $\leq 10$  ημερών, είναι η «υπολειτουργία» των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων και συνακόλουθα η μειωμένη παραγωγή IFN- $\gamma$ . Αντιθέτως, κατά το ενδιάμεσο στάδιο της λοίμωξης την 11<sup>η</sup> έως 20<sup>η</sup> ημέρα, παρουσιάζεται ένα αντιφατικό μοτίβο λεμφοπενίας με μείωση του αριθμού των CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων και ραγδαίας αύξησης της έκφρασης των HLA-DR και της

παραγωγής IFN- $\gamma$ . Στο τελικό στάδιο της νόσου, όπως αυτό προσδιορίζεται μετά τις 21 ημέρες, σημειώνεται στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού όλων των κυττάρων [CD4+, CD8+, κυττάρων φυσικοί φονείς (NK), και δενδριτικών κυττάρων (DC) ], της έκφρασης των HLA-DR και της παραγωγής IFN- $\gamma$ , γεγονός που οδηγεί σε ανοσοπαράλυση<sup>5</sup>. Εντούτοις, η ανοσοκαταστολή στην λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 είναι λιγότερο έκδηλη συγκριτικά με τους ασθενείς με βακτηριακής αιτιολογίας σηπτική καταπληξία<sup>6</sup>.

## Μεταβολές μονοκυττάρων στην COVID-19- Αντιγόνο επιφανείας HLA-DR

Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος αποτελούν μέρος της φυσικής ανοσίας, η οποία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας που ενεργοποιείται μετά την εισβολή από οτιδήποτε αναγνωρίζεται ως «ξένο» από τον ξενιστή. Συμμετέχουν τόσο στην διαδικασία της φλεγμονώδους απάντησης λειτουργώντας ως προ-φλεγμονώδη κύτταρα, όσο και στη λύση αυτής ως αντι-φλεγμονώδη κύτταρα. Το γεγονός αυτό τα καθιστά από τη φύση τους πολύ «προσαρμοστικά» κύτταρα. Όσον αφορά την διαδικασία της φλεγμονής ασκούν καθοριστικό ρόλο στην διεξαγωγή της φαγοκυττάρωσης, στην διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης καθώς και στην επαγωγή της επίκτητης ανοσιακής απόκρισης με την ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες αυτές διασπείρονται εντός της κυκλοφορίας ή «μετανάστεύουν» σε ιστούς και λεμφοειδή όργανα<sup>7</sup>.

Έχουν αναγνωριστεί τρεις διακριτοί υπότυποι μονοκυττάρων οι οποίοι βασίζονται στην έκφραση των συμπλεγμάτων διαφοροποίησης (Clusters of Differentiation, CD) CD14 και CD16. Αυτά κατηγοριοποιούνται στα: κλασσικά μονοκύτταρα που εκφράζονται ως CD14+CD16-, τα ενδιάμεσα CD14+CD16+ και τα μη κλασσικά μονοκύτταρα CD14-CD16+. Αυξημένα ποσοστά από τα ενδιάμεσα και τα μη κλασσικά έχουν ανιχνευθεί σε φλεγμονώδεις συνθήκες. Τα κλασσικά φαίνεται να επάγουν την φαγοκυττάρωση, τις ανοσιακές αποκρίσεις και την μετανάστευση, τα ενδιάμεσα την αντιγονοπαρουσίαση, ενώ, τα μη κλασσικά είναι υπεύθυνα για τις αντιικές αποκρίσεις<sup>7</sup>.

Πολλές μελέτες περιγράφουν τις μεταβολές των μονοκυττάρων στους ασθενείς με νόσο COVID-19 οι οποίες επηρεάζουν την ανοσιακή τους απόκριση. Το ποσοστό των ενδιάμεσων μονοκυττάρων CD4<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> παρουσιάζεται υψηλό στο περιφερικό αίμα των νοσηλευόμενων ασθενών με COVID-19 συγκριτικά με ασθενείς που δεν χρήζουν νοσηλείας ενώ το υψηλότερο ποσοστό αυτών των κυττάρων παρουσιάζουν βαρέως πάσχοντες ασθενείς των μονάδων εντατικής θεραπείας. Οι ασυμπτωματικοί ή μη σοβαρά ασθενείς παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό κλασσικών μονοκυττάρων ( $p=0.002$ ,  $p<0.001$ , αντίστοιχα), ενώ οι υγιείς και οι ασυμπτωματικοί φαίνεται να έχουν χαμηλότερα ποσοστά μη κλασσικών μονοκυττάρων συγκριτικά με τους βαρέως πάσχοντες ( $p=0.011$ ,  $p=0.041$ , αντίστοιχα).<sup>7</sup> Η μετακίνηση των ενδιάμεσων και μη

κλασικών μονοκυττάρων στους πνεύμονες σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου. Ακόμη, αξιοσημείωτο εύρημα αποτελεί το ποσοστό έκφρασης του CD14 συμπλέγματος διαφοροποίησης στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, το οποίο υπολογίζεται με τη μέθοδο μέσης φθορίζουσας πυκνότητας και όσο χαμηλότερο το ποσοστό έκφρασης, τόσο σοβαρότερη εκδηλώνεται η νόσος. Ο ρόλος του CD14 μορίου στην επιφάνεια των μονοκυττάρων δεν είναι απόλυτα γνωστός, ωστόσο, η έκφρασή του σημαίνει την διαφοροποίησή του μονοκυττάρου σε μακροφάγο το οποίο συντελεί στην επαγωγή κυτταροκινών και στην φαγοκυττάρωση. Τέλος, η σημαντική αύξηση της IL-6 σε ασθενείς με μέτρια και σοβαρή νόσο COVID-19 από τα μονοκύτταρα, αναδεικνύει τα κύτταρα αυτά ως βασικούς συντελεστές στην καταιγίδα κυτταροκινών<sup>7</sup>.

Η διαδικασία με την οποία τα μονοκύτταρα καταλήγουν να επάγουν τον καταρράκτη των κυτταροκινών και να συμβάλουν στην διαδικασία της φλεγμονώδους απάντησης έναντι του ιού είναι μέσω της αντιγονοπαρουσίασης. Η διαδικασία αυτή έγκειται στην λειτουργία του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex-MHC). Υπάρχουν δύο τάξεις μορίων MHC, η πρώτη τάξη I η οποία αφορά διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια εμπύρηνων κυττάρων και η τάξη II η οποία αφορά μόνο αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά, κύτταρα Langerhans, Β λεμφοκύτταρα), κύτταρα θυμικού επιθηλίου και δραστικά Τ- λεμφοκύτταρα, επιπλέον, εμπύρηννα κύτταρα με τη δράση IFN-γ μπορούν να εκφράσουν MHC-II. Συνεπώς, η παρουσίαση αντιγόνων μέσω του MHC-II της επιφάνειας των μονοκυττάρων στα CD4<sup>+</sup> Τ-λεμφοκύτταρα πυροδοτεί τον καταρράκτη της φλεγμονής.

Κύριο χαρακτηριστικό της ανοσοπαράλυσης στην βακτηριακή σήψη, μια κατάσταση που οι μηχανισμοί της έχουν μελετηθεί εκτενώς, αποτελεί η μειωμένη εκφράση των HLA-DR στην επιφάνεια των μονοκυττάρων (mHLA-DR)<sup>2</sup>. Τα μονοκύτταρα υφίστανται λειτουργική διαφοροποίηση με συνοδό απώλεια της αντιγονοπαρουσιαστικής τους ικανότητας που ως συνέπεια έχει την μειωμένη απελευθέρωση κυτταροκινών, κατάσταση αποκαλούμενη και ως φαινόμενο ανοχής ενδοτοξινών. Άλλος μηχανισμός εκτός της μειωμένης έκφρασης των mHLA-DR που έχει προταθεί είναι μέσω υψηλής έκφρασης μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, PD-L1 (programmed death-ligand 1), η οποία σχετίζεται με καταστολή της επίκτητης ανοσίας<sup>8</sup>. Το κομμάτι αυτό της αντιγονοπαρουσίασης και της έκφρασης του mHLA-DR φαίνεται

να έχει ισχύ και να αποτελεί κλειδί στην κατανόηση του ανοσολογικού μηχανισμού για τη νόσο COVID-19, σηματοδοτώντας ένα αρκετά υποσχόμενο πεδίο παρέμβασης<sup>9</sup>

Στην περίπτωση της λοίμωξης από τον ιό SARS-CoV-2 πρόσφατες μελέτες με πειραματικά μοντέλα υποδεικνύουν πως δομικά συστατικά του ιού όπως η πρωτεΐνη ακίδα (S- spike), το νουκλειικό καψίδιο (N) και άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες είναι ικανά να επάγουν την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων<sup>10</sup>. Ακόμα και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού όπως η SARS-CoV-2 ORF7a που προσομοιάζει με ανοσοσφαιρίνη, φαίνεται να επιδρούν στα CD14<sup>+</sup> μονοκύτταρα πυροδοτώντας σημαντική παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων IL-6, IL-1β, IL-8 και TNF-α<sup>8</sup>

## Πρόγνωση

Όσον αφορά τη σήψη στις βακτηριακές λοιμώξεις αποδεικνύεται ότι η μειωμένη έκφραση του HLA-DR σχετίζεται με καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και ως εκ τούτου με χειρότερη πρόγνωση, αυξημένη θνητότητα και νοσοκομειακές επιλοιώξεις<sup>9</sup>. Από την άλλη πλευρά, κατά την εκσεσημασμένη ενεργοποίηση των μακροφάγων όπως σε κατάσταση αιμοφαγοκυτταρικής λεμφοιστιοκυττάρωσης ή στο σύνδρομο απελευθέρωσης κυτοκινών η συγκέντρωση του mHLA-DR παρουσιάζεται ιδιαίτερα αυξημένη. Συνεπώς, στη νόσο COVID-19 η διερεύνηση και ερμηνεία των μεταβολών που παρουσιάζονται στο σύστημα αντιγονοπαρουσίασης ανάλογα με τη φάση της νόσου είναι σημαντική για την πρόβλεψη της εξέλιξης και της έκβασης αυτής.

Στην πλειοψηφία των μελετών καταγράφεται σημαντικά μειωμένη έκφραση των mHLA-DR σε ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 ήδη κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες<sup>9,11</sup>. Επιπλέον, όσο μεγαλύτερη μείωση του ποσοστού έκφρασης του mHLA-DR, τόσο υψηλότερη αποδεικνύεται η βαρύτητα ενώ αυξάνεται η πιθανότητα νοσηλείας σε ΜΕΘ. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την μέτρηση της έκφρασης του mHLA-DR ως δείκτη βαρύτητας και χρησιμοποίησής του πιθανά ως εργαλείο ταχείας αξιολόγησης στο τμήμα διαλογής των ασθενών<sup>9</sup>.

Αρκετές είναι και οι μελέτες που προσπαθούν να καταγράψουν την κινητική της έκφρασης του mHLA-DR κατά την εξέλιξη της νόσου. Οι περισσότερες αφορούν σε ασθενείς της ΜΕΘ και εκφράζονται σε αριθμό αντισωμάτων ανά κύτταρο. Κατά την παρακολούθηση αυτής από την πρώτη εβδομάδα μέχρι και ένα μήνα μετά σημειώνονται μικρότερες τιμές του mHLA-DR σε ασθενείς με λοίμωξη από COVID-19 συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες<sup>9,11</sup>, αλλά όχι σε τόσο χαμηλά επίπεδα όσο παρουσιάζεται στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία βακτηριακής αιτιολογίας<sup>11</sup>. Επιπλέον, η τιμή έκφρασης του mHLA-DR παρουσιάζεται σχεδόν σταθερή με μικρή τάση προς μείωση με ορισμένες μελέτες να προσδιορίζουν χρονικά το διάστημα αυτό τουλάχιστον για τις πρώτες πέντε ημέρες μετά την εισαγωγή στη ΜΕΘ<sup>11</sup>, άλλες πάλι από την πρώτη εβδομάδα μέχρι και τον πρώτο μήνα μετά<sup>9</sup>. Ωστόσο, η παρατεταμένη παραμονή στη ΜΕΘ (μετά από τρεις εβδομάδες) και η παρουσία βακτηριακών επιλοιώξεων παρουσιάζουν αντίστοιχη μεταβολή της κινητικής του mHLA-DR με

αυτήν της βακτηριακής σήψης<sup>9</sup>. Επιπλέον, η χαμηλότερη έκφραση του mHLA-DR φαίνεται να συσχετίζεται με μεγαλύτερη θνητότητα στη ΜΕΘ<sup>9</sup>.

Αναλύσεις κυττάρων περιφερικού αίματος βαρέως πασχόντων μετά από λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 υποδεικνύουν καλύτερη πρόγνωση για όσους παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά μονοκυττάρων, μακροφάγων ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ) και χαμηλότερα ουδετεροφίλων ( $p < 0.05$ ) κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο<sup>12</sup>, ενώ αντίθετα χαμηλότερες τιμές μονοκυττάρων σχετίζονται με σοβαρή νόσο. Τέλος, η αύξηση των μονοκυττάρων φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με καλή πρόγνωση <sup>7</sup>



## Λεμφοκύτταρα

### T- λεμφοκύτταρα

Όπως σε κάθε ιό έτσι και στην λοίμωξη από τον SARS-CoV-2 μετά την ενεργοποίηση του πρώτου σταθμού άμυνας, αυτόν της φυσικής ανοσίας, σε λίγες ημέρες η μετανάστευση των δενδριτικών κυττάρων σε λεμφαδενικούς ιστούς επάγει το επίκτητο σύστημα της ανοσιακής απάντησης βασιζόμενο στην δράση τόσο των T- όσο και των B- λεμφοκυττάρων. Πολλές είναι οι μελέτες που προσπαθούν να αναδείξουν το ανοσολογικό αποτύπωμα του ιού στους κυτταρικούς πληθυσμούς του περιφερικού αίματος και στην αντισωματική απόκριση με στόχο τη συσχέτιση των μεταβολών αυτών με την βαρύτητα και την έκβαση της νόσου αποσκοπώντας στην ανεύρεση πιθανών θεραπευτικών μέσων<sup>13</sup>

Από τον πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων προέρχονται 2 είδη δραστικών κυττάρων, τα βοηθητικά-CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων τα οποία μέσω έκκρισης κυτταροκινών διαφοροποιούνται σε βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, τύπου 1 βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (Th1), τύπου 2 βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (Th2) και T<sub>fh</sub> (λεμφαδενικά βοηθητικά) κύτταρα, ενώ συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων, των κυτταροτοξικών CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων καθώς και των κυττάρων φυσικής ανοσίας όπως τα μακροφάγα. Τα κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup>-T λεμφοκύτταρα με τη σειρά τους παίζουν καθοριστικό ρόλο στην καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων από τους ιούς. Άλλος πολύ σημαντικός υπότυπος των T-κυττάρων είναι τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (Tregs) τα οποία συμμετέχουν στην ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης επάγωντας την καταστολή της φλεγμονής όταν αυτό ενδείκνυται. Ωστόσο, στην λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 πολλές είναι οι αναφορές στις οποίες ενδέχεται ο αριθμός τους να είναι μειωμένος, γεγονός που οδηγεί σε κατάσταση συνεχούς φλεγμονής<sup>14</sup>.

Μελέτη καταγραφής των μεταβολών της επίκτητης ανοσίας σε φάση ανάρρωσης 10 εβδομάδες μετά την λοίμωξη παρουσιάζει αυξημένο ποσοστό έκφρασης HLA-DR και CD38<sup>+</sup> στην επιφάνεια των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων δηλώνοντας μια σταθερά εξαρτώμενη από τον ιο ενεργοποίησή τους κατά την εξέλιξη της νόσου. Το CD38<sup>+</sup> αφορά μια κυκλική υδρολάση ριβόζης η οποία αποτελεί γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας λευκοκυττάρων. Η αυξημένη έκφρασή της στην επιφάνεια

των CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυτταρων φαίνεται να ενισχύει την κυτταροτοξική τους δράση και να προάγει την παραγωγή κυτταροκινών. Κατά τη φάση ανάρρωσης στον ορό ασθενών τα επίπεδα των δραστικών κυττάρων μνήμης, τόσο των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων μνήμης όσο και των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυτταρων μνήμης, ελέγχονται αυξημένα, με τα τελευταία να δρούν κυρίως κυτταροτοξικά ως προς τα μολυσμένα κύτταρα από τον ιό SARS-CoV-2. Αντιθετα, η λειτουργία των CD4<sup>+</sup> δραστικών λεμφοκυττάρων μνήμης δεν είναι ξεκάθαρο εάν έχει περισσότερο βοηθητική δράση στην επαγωγή των ειδικών B-λεμφοκυττάρων ή συντελεί και αυτή συνεπικουρικά στην κυτταροτοξική δράση<sup>13</sup>. Άλλες πάλι μελέτες αναφέρουν πως Th1 λεμφοκύτταρα μνήμης έχουν προστατευτικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι των θανατηφόρων συνεπειών της λοίμωξης από SARS-CoV-2<sup>15</sup>.

Αυτό το οποίο είναι ευρέως αποδεκτό και υποστηρίζεται από την πλειοψηφία των μελετών τόσο με πειραματικά δεδομένα, όσο και με κλινικές μελέτες με ζώντες οργανισμούς, είναι ότι κατά τα πρώιμα στάδια της λοίμωξης από COVID-19 η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζει σημαντική λεμφοπενία η οποία περιλαμβάνει όλους τους υποτύπους των λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα στον ορό ασθενών όλων των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (CTLs), κυττάρων φυσικών φονέων (NK) και T κυττάρων φυσικών φονέων (NKT) παρουσιάζονται κάτω από το όριο αναφοράς κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου. Ωστόσο, τα επίπεδα των ενεργοποιημένων CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων παρουσιάζονται αυξημένα. Ειδικότερα, μελέτη των επιπέδων των T-λεμφοκυττάρων στον ορό ασθενών που απεβίωσαν εντός των πρώτων 28 ημερών από την εισαγωγή τους αναδεικνύει αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις των CD3<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων, ενώ το ποσοστό των ενεργοποιημένων CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων παρουσιάζεται σημαντικά υψηλότερο. Όσον αφορά την κινητική των T-λεμφοκυττάρων στις περισσότερες μελέτες η πτωτική πορεία κατά την αρχική φάση της λοίμωξης προσδιορίζεται χρονικά περίπου εντός των δύο πρώτων εβδομάδων, 1<sup>η</sup> εβδομάδα κατά τους Wang *et al*<sup>16</sup> και Deng *et al*<sup>14</sup>, την 2<sup>η</sup> εβδομάδα κατά τους Huang *et al*<sup>17</sup>. Στους ασθενείς με καλή έκβαση ο αριθμός των κυττάρων αυτών φαίνεται να επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα, κάτι που δεν αποδεικνύεται στην αντίθετη περίπτωση. Η συσχέτιση του αριθμού των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων με την έκβαση της νόσου επιβεβαιώνεται από μελέτες καταγραφής των κυττάρων αυτών σε περιφερικό αίμα δύο διαφορετικών ομάδων ασθενών ως προς το χρονικό διάστημα

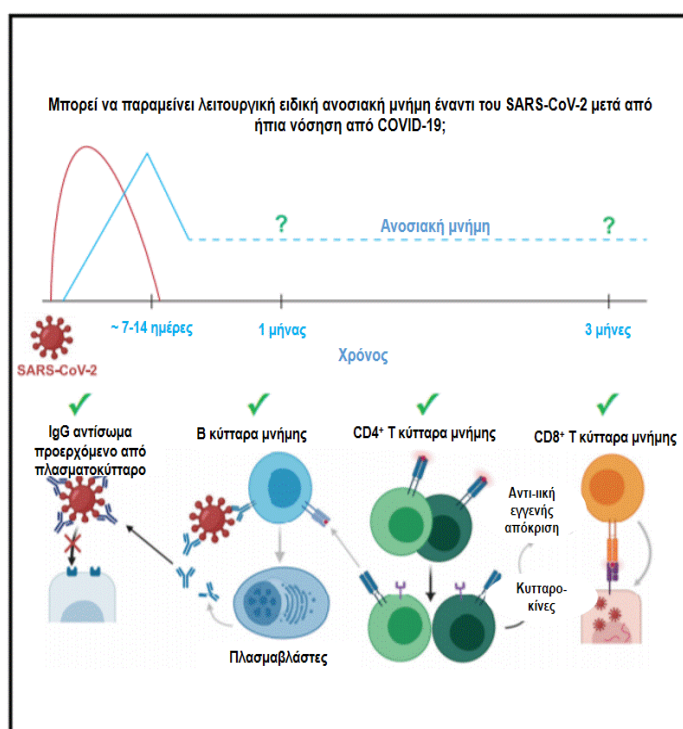
της ανοσολογικής τους απάντησης. Η πρώτη αφορά ασθενείς με άμεση όπως αυτή προσδιορίζεται χρονικά σε διάστημα λιγότερο της μίας εβδομάδας, και σε μια δεύτερη με ανοσιακή απόκριση σε χρονικό διάστημα μεγαλύτερο της μίας εβδομάδας<sup>14</sup>. Συνεπώς, στην φυσική εξέλιξη μιας ιογενούς λοίμωξης ο συνδυασμός σημαντικής λεμφοπενίας από την μία πλευρά και λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης ειδικών κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων από την άλλη φαίνεται να συσχετίζεται με περισσότερο δυσμενή έκβαση.

Αξιοσημείωτη είναι η διαπίστωση από αρκετές μελέτες πως κατά την πρώιμη φάση της λοίμωξης ο ιός αυτός είναι ικανός να διαλάθει της φλεγμονώδους απόκρισης με συνέπεια την μειωμένη παραγωγή τόσο των CD8<sup>+</sup> T-κυτταροτοξικών, όσο και των βοηθητικών CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων<sup>18</sup>. Ο λόγος των CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά και δεν επηρεάζεται από τα διαφορετικά στάδια βαρύτητας της λοίμωξης. Σε αντίθεση με τον αριθμό κοκκιοκυττάρων του περιφερικού αίματος ο οποίος σχετίζεται με την βαρύτητα και αποδεικνύεται αυξημένος στους ασθενείς με σοβαρή λοίμωξη<sup>7,18</sup>.

Σε μια προσπάθεια διερεύνησης της προαναφερθείσας λεμφοπενίας, πολλές μελέτες υποδεικνύουν τους πιθανούς μηχανισμούς αυτής. Στο πλαίσιο αυτό ως πιθανοί μηχανισμοί αναφέρονται η διαδικασία της νέκρωσης ή της απόπτωσης των λεμφοκυττάρων, ωστόσο, η παρατήρηση αυτή δεν αποδεικνύεται στατιστικά σημαντική κατά την σύγκριση ασθενών με λοίμωξη από SAR-CoV-2 και υγιών μαρτύρων<sup>19</sup>. Αντίθετα, ως πιθανότερη αιτία αποδεικνύεται η κατανομή των T-λεμφοκυττάρων στο πνευμονικό παρέγχυμα που ως αποτέλεσμα έχει καταστροφικές συνέπειες στο συγκεκριμένο ανατομικό όργανο<sup>19</sup>. Άλλες πάλι μελέτες προτείνουν ως πιθανούς μηχανισμούς καταστολής των λεμφοκυττάρων τη δράση του διαλυτού υποδοχέα της IL-2<sup>20</sup> ή της ανασταλτικής δράσης του άξονα PD1-PDL1<sup>10,21,22</sup>. Η προκαλούμενη αυτή λεμφοπενία της λοίμωξης από COVID-19 και ως εκ τούτου της πλημμελούς ανοσιακής απόκρισης, κυρίως μέσω της ανασταλτικής δράσης του άξονα PD1-PDL1, φαίνεται να συσχετίζεται με αυξημένο ποσοστό σοβαρών επιλοιώξεων με αυξημένη επίπτωση ιδίως από *C. albicans*, παθογόνου της κατηγορίας μυκήτων που υπο κανονικές συνθήκες αποτελεί αποικιστή της φυσιολογικής χλωρίδας<sup>22</sup>.

## Β-λεμφοκύτταρα

Καθώς λοιπόν η χυμική ανοσία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανοσιακή απόκριση και στην κάθαρση του ιού στην COVID-19 λοίμωξη, πολλοί ερευνητές επιδιώκουν να την μελετήσουν. Ως γνωστόν, κατά την εισβολή του ιού τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε τύπου 1 βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα-Th1, τύπου 2 βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα-Th2 κύτταρα και T<sub>fh</sub> (λεμφαδενικά βοηθητικά) κύτταρα. Τα δύο τελευταία ευθύνονται για την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και την μετατροπή τους σε κύτταρα μνήμης και σε πλασματοκύτταρα. Τα αντισώματα παράγονται από πλασματοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους προέρχονται από Β-λεμφοκύτταρα που διαφοροποιούνται στον μυελό των οστών.



Όσον αφορά τα παρθένα Β-λεμφοκύτταρα αυτά όταν αναγνωρίσουν το αντιγονικό ερέθισμα διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα βραχείας διάρκειας και Β-λεμφοκύτταρα βλαστικών κέντρων στον σπλήνα και τους λεμφαδένες, όπου παρουσιάζονται ικανά να παράγουν μονοκλωνική αντισωματική απάντηση. Όταν

επικρατήσει το Β-λεμφοκύτταρο με τον ειδικό υποδοχέα έναντι του συγκεκριμένου παθογόνου πολλαπλασιάζεται με τη βοήθεια των  $T_{fh}$  κυττάρων, έτσι μετατρέπεται σε πλασματοκύτταρα μακράς διάρκειας, τα οποία μεταναστεύουν στον μυελό και παράγουν αντισώματα για μήνες, καθώς και Β λεμφοκύτταρα μνήμης μακράς διάρκειας που παραμένουν στους λεμφαδένες σε φάση '0'. Σε περίπτωση επαναλοίμωξης αυτά τα κύτταρα μνήμης που έχουν εκτεθεί στον SARS-CoV-2 και εκφράζουν τον κατάλληλο υποδοχέα σύνδεσης με αυτόν, πολλαπλασιάζονται γρήγορα και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα παράγοντας προστατευτικές IgG ανοσοσφαιρίνες, με τη βοήθεια των  $CD4^+$  Τα βοηθητικών κυττάρων<sup>23</sup>.

Σε μια προσπάθεια καταγραφής των υποτύπων των Β-λεμφοκυττάρων κατά την εξέλιξη της νόσου, αποδεικνύεται πως τόσο τα παρθένα Β κύτταρα όσο και τα πλάσματοκύτταρα παραμένουν σε υψηλά επίπεδα στον ορό των ασθενών ακόμη και 10 εβδομάδες μετά τη νόσηση, ενώ τα επίπεδα των Β κυττάρων μνήμης παραμένουν ανεπηρέαστα, όπως τα επίπεδα στον ορό υγιών μαρτύρων. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα Τ κύτταρα μνήμης που παραμένουν σε υψηλά επίπεδα στον ορό αναρωθέντων ασθενών. Αναφορικά με τα επίπεδα των πλασματοκυττάρων, αυτά είναι υψηλότερα όσο πιο σοβαρή είναι η νόσηση<sup>13</sup>, ενώ φαίνεται να μην είναι πλέον παρόντα στον ορό ασθενών σε φάση ανάρρωσης ένα μήνα μετά τη νόσηση<sup>23</sup>.

Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 κωδικοποιεί 10 μοναδικά πρωτεϊνικά προϊόντα τα οποία αποτελούν : 4 δομικές πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας (S), φάκελος (E), μεμβράνη (M), νουκλειικό καψίδιο (N)), 5 μη δομικές πρωτεΐνες που αποτελούν ανοιχτό πλαίσιο μετάφρασης-open reading frame (ORF3a, ORF6, ORF7, ORF8, ORF10), και 1 μη δομική πολυπρωτεΐνη (ORF1ab)<sup>24</sup>. Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα δεν είναι ξεκάθαρο ποιοι αντιγονικοί επίτοποι του ιικού προτεώματος αναγνωρίζονται από το ανοσιακό σύστημα. Πολλές μελέτες αναφέρουν πως τόσο η κυτταρική όσο και η χυμική ανοσία στρέφονται κυρίως έναντι των δομικών πρωτεϊνών του ιού<sup>26</sup>. Όπως και στον SARS-COV, ομοίως και στη λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 η είσοδος του στα κύτταρα πραγματοποιείται μέσω διασύνδεσης ενός υποδοχέα σύνδεσης (receptor-binding domain-RBD) της πρωτεΐνης ακίδας (spike-S) του ιού με τον υποδοχέα αγγειοτενσίνης του μετατρεπτικού ενζύμου (ACE2) ο οποίος ανευρίσκεται στα κύτταρα του ξενιστή<sup>13, 23</sup>. Τα αντισώματα έναντι των (S) και (RBD) είναι οι κύριοι στόχοι των εξουδετερωτικών αντισωμάτων καθώς εμποδίζουν την πρόσδεση αυτή στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού<sup>25</sup>.

Πολλές μελέτες αποδεικνύουν πως η πλειοψηφία των ασθενών με COVID-19 παράγει ειδικά αντισώματα έναντι της S και RBD κατά τη διάρκεια των 2 με 3 πρώτων εβδομάδων κατά την αρχική φάση ανοσιακής απόκρισης και πως τα RBD αντισώματα είναι ικανά να εξουδετερώσουν τον ιό τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και σε ζωντανούς οργανισμούς<sup>23,26</sup>. Τα επίπεδα των RBD-ειδικών αντισωμάτων για IgG, IgM, IgA φαίνεται να αυξάνονται γρήγορα τις πρώτες τρεις εβδομάδες από τη νόσηση, έπειτα τα επίπεδα των IgG, IgM διατηρούνται σταθερά ενώ των IGA μετά την 25<sup>η</sup> ημέρα μειώνονται<sup>26</sup>. Μια ερμηνεία της παρατήρησης αυτής αποτελεί πως η πρώιμη ανίχνευση των IgA ανοσοφαιρινών προέρχεται από τα βραχείας διάρκειας πλασματοκύτταρα, ενώ τα μακράς διάρκειας θεωρείται πως είτε δεν παράγουν IgA ανοσοσφαιρίνες είτε αυτές εναποτίθενται σε ιστούς με συνέπεια να μην περνούν στην κυκλοφορία του αίματος<sup>23</sup>. Συγκριτικά με τα ειδικά αντισώματα έναντι του S και του RBD, μεγαλύτερη εξουδετερωτική ικανότητα φαίνεται να έχουν τα δεύτερα και πως τα επίπεδα αυτών είναι αντίστοιχα της βαρύτητας της νόσου<sup>26</sup>.

Η ανεύρεση ειδικών IgG RBD αντισωμάτων στον ορό ασθενών 1 έως 3 μήνες μετά από ήπιας βαρύτητας νόσηση οφείλεται στα ειδικά B κύτταρα μνήμης τα οποία αποδεικνύεται πως διατηρούνται σε φάση ανάρρωσης<sup>23</sup>. Ωστόσο, έχουν υπάρξει αναφορές για ασθενείς με πιστοποιημένη λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 όπου στην φάση ανάρρωσης δεν διαπιστώνονται ειδικά αντισώματα έναντι του ιού. Η παρατήρηση αυτή έχει περιγραφεί σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όπως αυτούς υπο χημειοθεραπεία, οι οποίοι παρόλα αυτά καταφέρνουν να «εξουδετερώσουν» τον ιό. Το γεγονός αυτό ενέχει την υπόνοια ύπαρξης ενός επιπλέον μηχανισμού που συμβάλει στην ιική κάθαρση και στη λύση της λοίμωξης πέραν της δράσης των αντισωμάτων. Βάση αυτών φαίνεται πως ένα ποσοστό 25%-50% των ασθενών σε φάση ανάρρωσης δεν παρουσιάζουν αντισώματα ειδικά για το RBD σε αντίθεση με ένα 50-60% που παρουσιάζει. Επιπλέον, τα υψηλότερα επίπεδα των ειδικών αντισωμάτων έναντι των S και RBD κατά τη φάση ανάρρωσης και όχι τόσο έναντι του νουκλειικού καψιδίου είναι αυτά που πιθανά προσφέρουν στους ασθενείς καλύτερη προστασία σε περίπτωση επανέκθεσης στον ιό<sup>13</sup>.

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως σε ασθενείς με ήπια νόσο COVID-19 αυτά τα ειδικά αντισώματα έναντι RBD από B κύτταρα μνήμης και έναντι της πρωτεΐνης S διαπιστώνονται στον ορό των ασθενών έως και 3 μήνες μετά με ταυτόχρονη διατήρηση της ικανότητας παραγωγής αντισωμάτων ικανών να εξουδετερώσουν τον

ιό σε περίπτωση επαναλοίμωξης. Ωστόσο, η ικανότητα αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη βαρύτητα νόσησης. Εντούτοις, τα επίπεδα που χρειάζονται ώστε τα αντισώματα να προκαλέσουν ιική κάθαρση δεν είναι ακόμη ξεκάθαρα γνωστά. Αναφορικά με τα Τ κύτταρα μνήμης ιδίως τα CD8<sup>+</sup>, φαίνεται πως και αυτά διατηρούν την ικανότητα επαγωγής κυτταροκινών ιδίως IFN-γ και κυτταρολυτικών μορίων ακόμη και 3 μήνες μετά την αρχική λοίμωξη. Συνεπώς, τα λεμφοκύτταρα μνήμης στην ήπια νόσηση από COVID-19 φαίνεται να αποτελούν καίριας σημαντικότητας για την ανοσιακή απόκριση έναντι του ιού<sup>23</sup>.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Υλικά και Μέθοδοι

Για την τρέχουσα μελέτη, δείγμα αίματος συλλέχθηκε κατά το πρώτο 24ωρο εισαγωγής των ασθενών με πνευμονία της κοινότητας και σήψη καθώς και πνευμονία της κοινότητας μετά από λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2. Στην μελέτη συμμετείχαν ασθενείς και των δύο φύλων. Ως πνευμονία της κοινότητας ορίστηκε η παρουσία νέων διηθημάτων σε ακτινογραφία θώρακος σε ασθενή χωρίς προηγούμενη επαφή με σύστημα υγείας τις προηγούμενες 90 ημέρες, ενώ η σήψη ορίστηκε σύμφωνα με τα κριτήρια κατά Sepsis-3<sup>27</sup>. Ως πνευμονία της κοινότητας από τον ιό Sars-CoV-2 ορίστηκε η λοίμωξη με απεικονιστική επιβεβαίωση είτε με ακτινογραφία θώρακος είτε με αξονική τομογραφία και θετικό για COVID-19 μοριακό έλεγχο από αναπνευστικές εκκρίσεις. Για τους ασθενείς με σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια και ανάγκη για μηχανικό αερισμό (ΜΑ) έγινε συλλογή αίματος εντός του πρώτου 24ώρου από την διασωλήνωση και τα αποτελέσματα αυτών χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση. Κριτήρια αποκλεισμού ήταν η λοίμωξη από ιό ανθρωπινής ανοσοανεπάρκειας, η ουδετεροπενία και η προηγούμενη λήψη ανοσοκατασταλτικής αγωγής (κορτικοστεροειδή, βιολογικοί παράγοντες και βιολογικά ανοσοτροποποιητικά). Ως σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια (ΣΑΔ) ορίστηκε η σοβαρή μείωση του αναπνευστικού πηλίκου καθιστώντας αναγκαία την διασωλήνωση και την ανάγκη μηχανικού αερισμού.

Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν μετά από σταδιακή φυγοκέντρηση σε φικόλη για 20min στα 1,400 g. Μετά από 3 πλυσίματα σε πάγο PBS pH 7.2 τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος καταμετρήθηκαν σε πιάτο Neubauer με trypan blue για τον αποκλεισμό των νεκρωμένων κυττάρων. Έπειτα αραιώθηκαν σε RPMI 1640 εμπλουτισμένα με 2mM L-γλουταμίνης, 500μg/mL γενταμικίνης, 100U/mL πενικιλλίνης G, 10mM πυρουβικού, 10% ορού βόειου εμβρύου (Biochrom) και τοποθετήθηκαν σε ειδικές θήκες ενός 96-well plate. Ο τελικός όγκος ανά θήκη ήταν 200μL με πυκνότητα  $2 \times 10^6$  κύτταρα/mL. Τα μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος τέθηκαν σε διάστημα 24h ή 5 ημερών στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub> και σε αντιγονικό ερέθισμα με 10ng/mL *Escherichia coli* O55:B5 λιποπολυσακχαρίτης (LPS). Μετά την επώαση τα κύτταρα αφαιρέθηκαν και αναλύθηκαν σε κυτταρομετρία ροής.



Οι συγκεντρώσεις των TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A και IFN $\gamma$  μετρήθηκαν σε υπερκείμενα κυττάρων ή/και ορού δύο φορές με ενζυμική ανοσολογική δοκιμή (ELISA). Τα κατώτερα ανιχνεύσιμα όρια ήταν: για τον TNF- $\alpha$  40 pg/mL; για την IL-1 $\beta$  10 pg/mL; για την IL-6 10 pg/mL; για την IL-17A 10 pg/mL; και για την IFN- $\gamma$  12.5 pg/mL. Οι συγκεντρώσεις φερριτίνης μετρήθηκαν στον ορό με την μέθοδο της ενζυμικής ανοσολογικής δοκιμής (ELISA). Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης ήταν τα 75ng/mL.

### **Στατιστική ανάλυση**

Οι ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως ποσοστά και διαστήματα εμπιστοσύνης και η σύγκριση έγινε με Fisher test. Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση και η σύγκριση έγινε με το Student' s "t-test". Για τη σύγκριση των ομάδων με μικρό αριθμό ασθενών χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Mann-Whitney U test και οι μεταβλητές παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή και τυπικό σφάλμα. Τα ζεύγη συγκρίσεων έγιναν με το Wilcoxon's rank-signed test. Οι μη παραμετρικές συσχετίσεις έγιναν σύμφωνα με τη συσχέτιση κατά Spearman. Κάθε τιμή του p κάτω από το 0.05 θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

## Αποτελέσματα

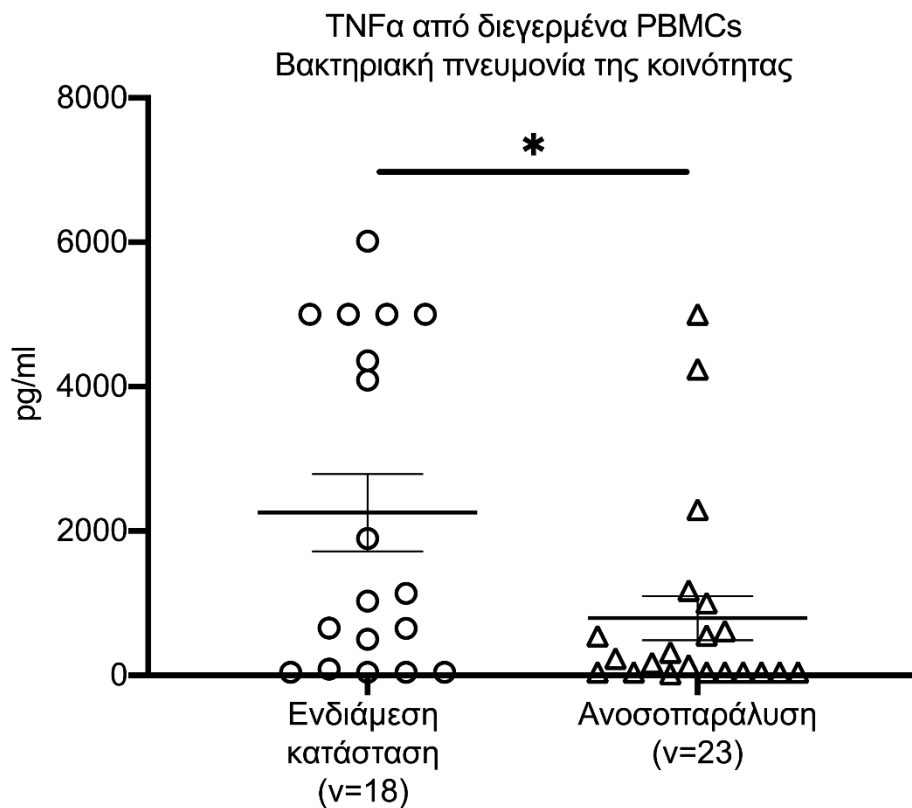
Η αξιολόγηση των διαφορετικών καταστάσεων ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος και της ανοσιακής δυσρύθμισης ελέγχθηκε μεταξύ δύο ομάδων κοορτής, η πρώτη αποτελούμενη από ασθενείς με βακτηριακής αιτιολογίας πνευμονία της κοινότητας και η δεύτερη από πνευμονία μετά από λοίμωξη από τον ιό Sars-CoV-2. Σε κάθε κοορτή οι ασθενείς διαχωρίστηκαν περαιτέρω σε αυτούς με εκδήλωση σοβαρής αναπνευστικής δυσχέρειας, όπως αυτή ορίστηκε με την ανάγκη για μηχανικό αερισμό (MA) και σε αυτούς χωρίς.

Στην μελέτη συμμετείχαν συνολικά 104 ασθενείς με σήψη βακτηριακής αιτιολογίας, 21 ιστορικοί μάρτυρες με λοίμωξη από τον ιό H1N1 και 54 ασθενείς με πνευμονία κοινότητας οφειλόμενη σε λοίμωξη από τον ιό Sars-CoV-2. Τα βασικά χαρακτηριστικά αυτών με σοβαρή νόσο COVID-19 αφορούσαν στην πλειονότητα άνδρες (89.3% συγκριτικά με 48.2% των ασθενών με βακτηριακής αιτιολογίας πνευμονία,  $p:0.0003$ ), ηλικίας περί τα  $74 \pm 12.6$  έτη για βακτηριακής αιτιολογίας σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια, ενώ τα  $67.8 \pm 10.8$  έτη για λοίμωξη από τον ιό Sars-CoV-2 διαφορά στατιστικά σημαντική ( $p < 0.0001$ ). Αντίστοιχη στατιστικά σημαντική ηλικιακή διαφορά διαπιστώνεται και στους ασθενείς με εκδήλωση μη σοβαρής αναπνευστικής ανεπάρκειας ( $74.8 \pm 16.8$  έτη για βακτηριακής αιτιολογίας, ενώ  $59.2 \pm 10.3$  έτη για λοίμωξη από τον ιό Sars-CoV-2,  $p < 0.0001$ ).

Αξιοσημείωτη παρατήρηση αφορά στους παραδοσιακούς δείκτες βαρύτητας όπως αυτοί καθορίζονται από τις κλίμακες οξείας φυσιολογίας και χρόνιας αξιολόγησης της υγείας II (acute physiology and chronic health evaluation- APACHE II), της κλίμακας σειριακής αξιολόγησης οργανικής ανεπάρκειας (sequential organ failure assessment score -SOFA score) και του δείκτη συνοσηροτήτων κατά Charlson (Charlson's comorbidity index-CCI). Βάση αυτών στατιστικά μεγαλύτερη βαρύτητα παρουσιάζουν ασθενείς με βακτηριακή πνευμονία της κοινότητας συγκριτικά με αυτούς με λοίμωξη από Sars-CoV-2, είτε εκδηλώνοντας σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια είτε όχι. APACHE II  $26.63 \pm 8.52$  σε ασθενείς με σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια και βακτηριακή πνευμονία συγκριτικά με  $10.17 \pm 3.64$  στην αντίστοιχη ομάδα ασθενών με λοίμωξη από Sars-CoV-2,  $p < 0.0001$  και  $18.5 \pm 8.19$  συγκριτικά με  $5.88 \pm 3.40$  στις αντίστοιχες ομάδες ασθενών χωρίς εκδήλωση αναπνευστικής

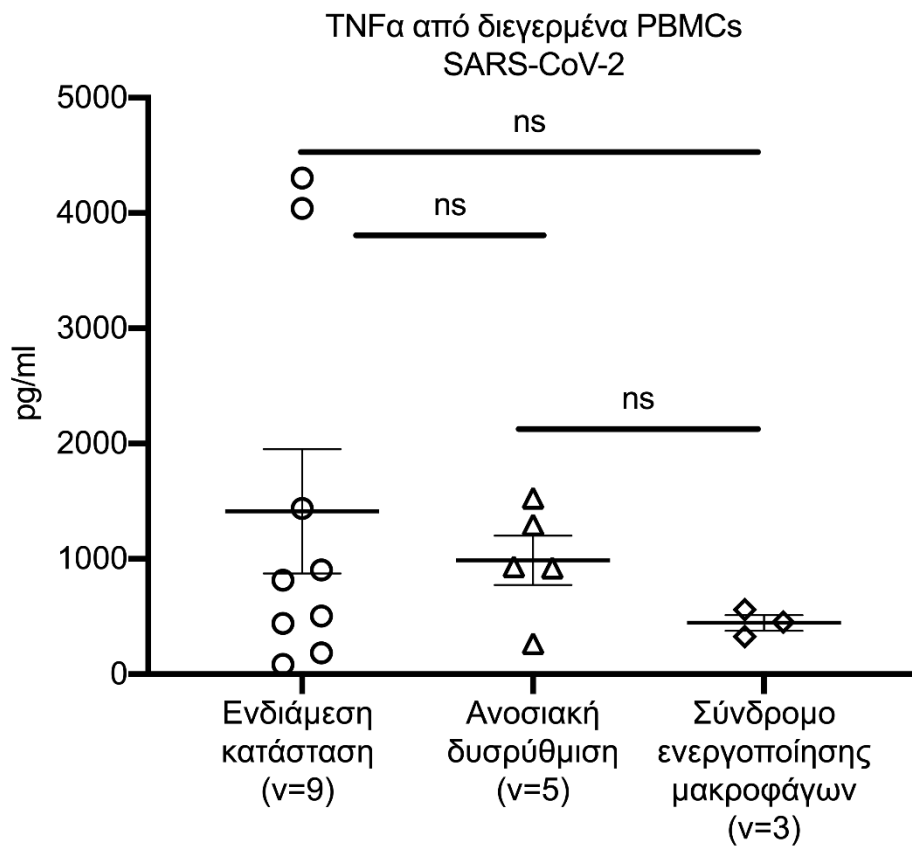
δυσχέρειας. Όσον αφορά την κλίμακα SOFA κατά την προσέλευση των ασθενών με σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια αυτή ήταν  $11.46 \pm 3.15$  σε βακτηριακής αιτιολογίας λοίμωξη συγκριτικά με  $5.71 \pm 2.19$  σε λοίμωξη από Sars-CoV-2,  $p < 0.0001$ , ενώ αντίστοιχα  $7.87 \pm 3.81$  συγκριτικά με  $1.50 \pm 0.82$  στην ομάδα των ασθενών χωρίς αναπνευστική δυσχέρεια,  $p < 0.0001$ . Η παραπάνω παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι ασθενείς με νόσο COVID-19 υφίστανται μια οξεία ανοσιακή δυσρύθμιση με συνοδό επιβάρυνση της αναπνευστικής τους ικανότητας προτού η συνολική κλινική τους κατάσταση επιδεινωθεί.

Αντίστοιχα, ο δείκτης συνοσηροτήτων (CCI) ο οποίος είναι μεγαλύτερος στην ομάδα των ασθενών με αναπνευστική δυσχέρεια μετά από λοίμωξη από Sars-CoV-2 ( $3.39 \pm 2.16$  συγκριτικά με  $2.16 \pm 1.46$  ασθενών χωρίς αναπνευστική δυσχέρεια) παραμένει σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τις αντίστοιχες καταστάσεις βακτηριακής πνευμονίας και σήψης ( $5.57 \pm 2.20$  συγκριτικά με  $5.53 \pm 2.13$ , αντίστοιχα). Επιπλέον, η καλή κλινική κατάσταση και το επίπεδο επικοινωνίας των ασθενών που αξιολογείται με την κλίμακα Γλασκώβης (GCS) (GCS εισαγωγής  $14.71 \pm 0.20$  σε ασθενείς με λοίμωξη από Sars-CoV-2 και αναπνευστική δυσχέρεια συγκριτικά με  $8.80 \pm 4.76$  ασθενών με βακτηριακή πνευμονία,  $p < 0.0001$ ), όσο το εργαστηριακό προφίλ της εισαγωγής (αριθμός λευκοκυττάρων  $9447.8 \pm 3308.6$  συγκριτικά με  $17666.9 \pm 12799.9$  αντίστοιχα,  $p < 0.0001$ ) επιβεβαιώνει την ανωτέρω εκτίμηση περί ραγδαίας επιδείνωσης.



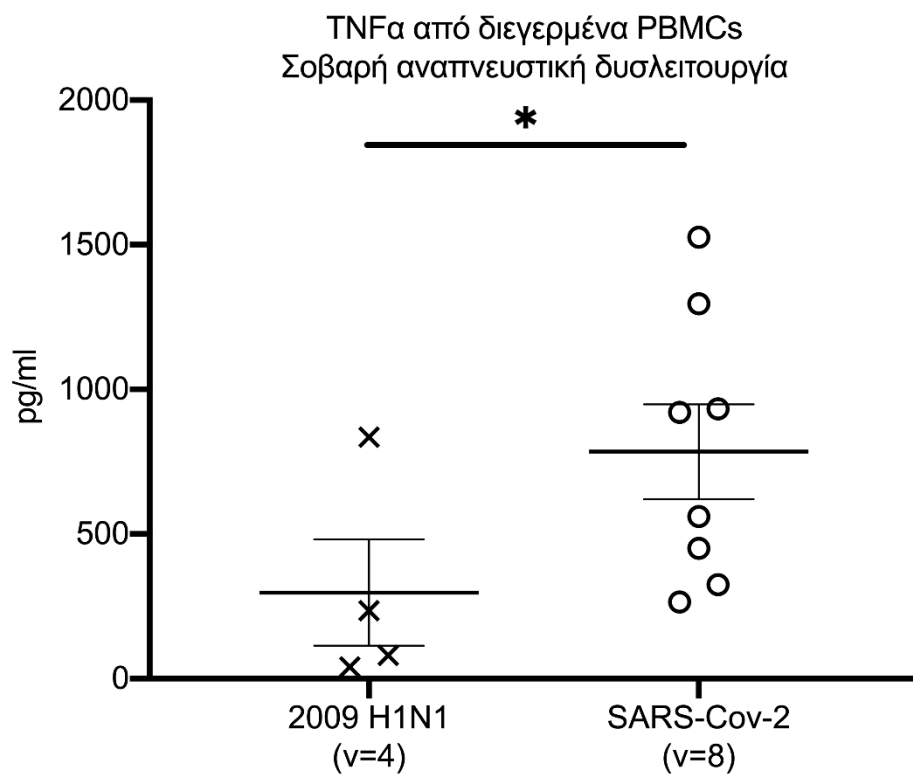
**Εικόνα 1.** Σύγκριση παραγωγής TNF-α από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος, κατόπιν διέγερσης αυτών από μόρια λιποπολυσακχαρίτη του *Escherichia coli* O55:B5 (LPS), σε διαφορετικές καταστάσεις ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος όπως κατά την ενδιάμεση κατάσταση και την φάση της ανοσοπαράλυσης. Η σύγκριση αυτή αφορά ασθενείς με σήψη από πνευμονία της κοινότητας βακτηριακής αιτιολογίας, από την οποία αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική αύξηση παραγωγής TNF-α κατά την ενδιάμεση κατάσταση.

\*:  $p < 0.05$ , οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



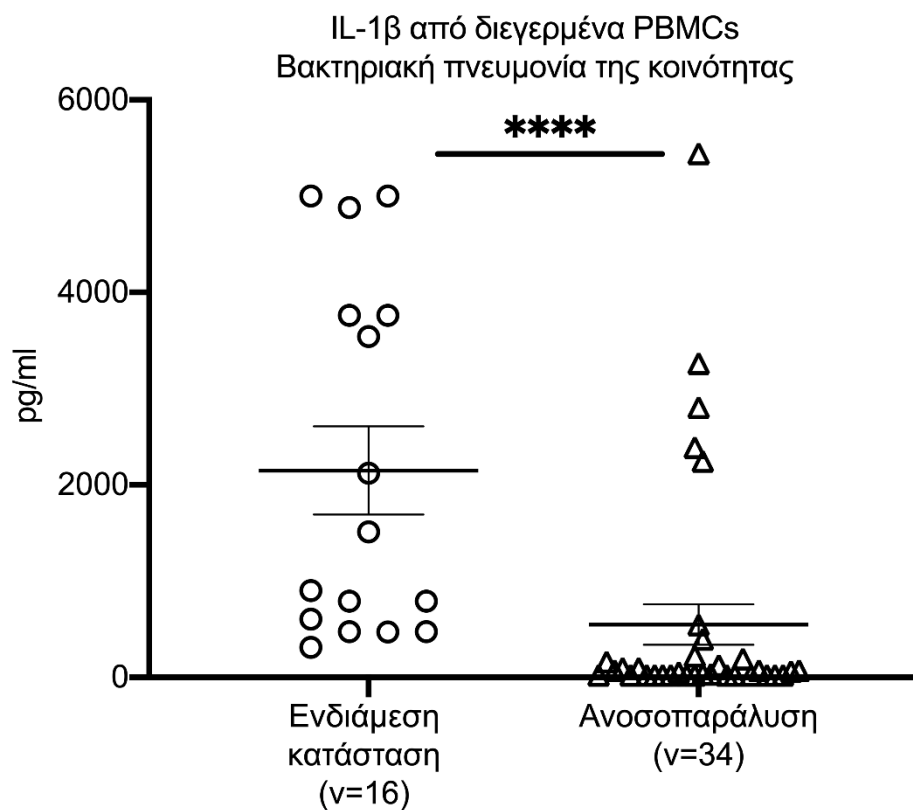
**Εικόνα 2.** Σύγκριση παραγωγής TNF-α από μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος κατόπιν διέγερσης αυτών από μόρια λιπτοπολυσακχαρίτη του *Escherichia coli* O55:B5 (LPS) σε ασθενείς με πνευμονία της κοινότητας από SARS-CoV-2 μεταξύ τριών καταστάσεων ανοσιακής ενεργοποίησης: της ενδιάμεσης κατάστασης, της φάσης ανοσιακής δυσρύθμισης και του συνδρόμου ενεργοποίησης μακροφάγων. Από αυτήν τη σύγκριση δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών καταστάσεων.

ns: στατιστικά μη σημαντική διαφορά, οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



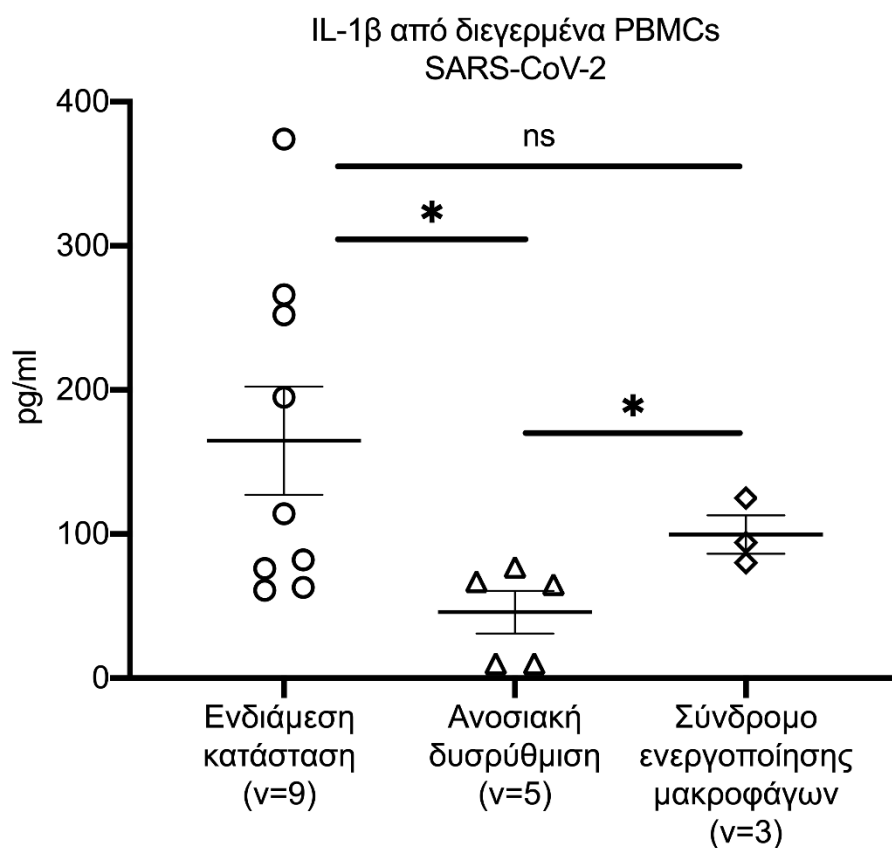
**Εικόνα 3:** Σύγκριση παραγωγής TNF-α από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος κατόπιν διέγερσης αυτών από μόρια λιποπολυσακχαρίτη του *Escherichia coli* O55:B5 (LPS) μεταξύ ασθενών με σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια σε έδαφος λοίμωξης από τον ιό 2009H1N1 και ασθενών με λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2. Από την ανωτέρω σύγκριση προκύπτει σημαντικά μειωμένη παραγωγή TNF-α από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με λοίμωξη από τον ιό 2009H1N1 σε σχέση με αυτή που παρατηρείται σε λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2

\*:  $p < 0.05$ , οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



**Εικόνα 4.** Σύγκριση παραγωγής IL-1β από μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος μετά από διέγερση αυτών από μόρια λιπτοπολυσακχαρίτη του *Escherichia coli* O55:B5 (LPS), σημαντική αύξηση αυτής παρατηρείται κατά την ενδιάμεση κατάσταση ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος συγκριτικά με την κατάσταση της ανοσοπαράλυσης σε ασθενείς με σήψη από πνευμονία της κοινότητας βακτηριακής αιτιολογίας.

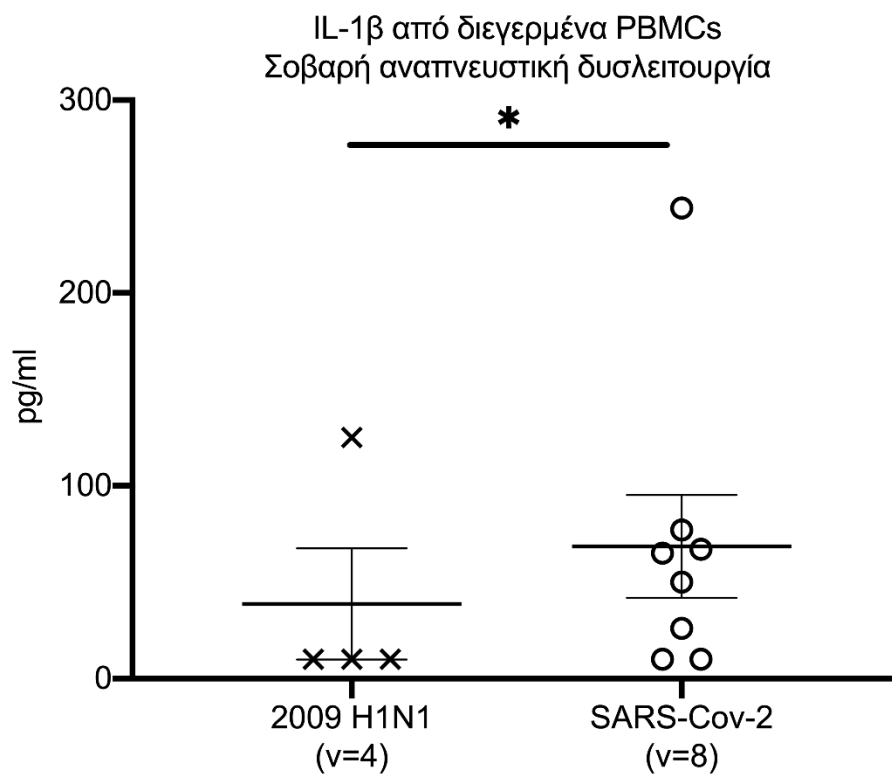
\*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



**Εικόνα 5.** Σύγκριση παραγωγής IL-1β από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με πνευμονία της κοινότητας από SARS-CoV-2 σε τρεις καταστάσεις ανοσιακής ενεργοποίησης: της ενδιάμεσης κατάστασης, της κατάστασης ανοσιακής δυσρύθμισης και του συνδρόμου ενεργοποίησης μακροφάγων. Σημαντική αύξηση παραγωγής IL-1β σημειώνεται κατά την ενδιάμεση κατάσταση ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού.

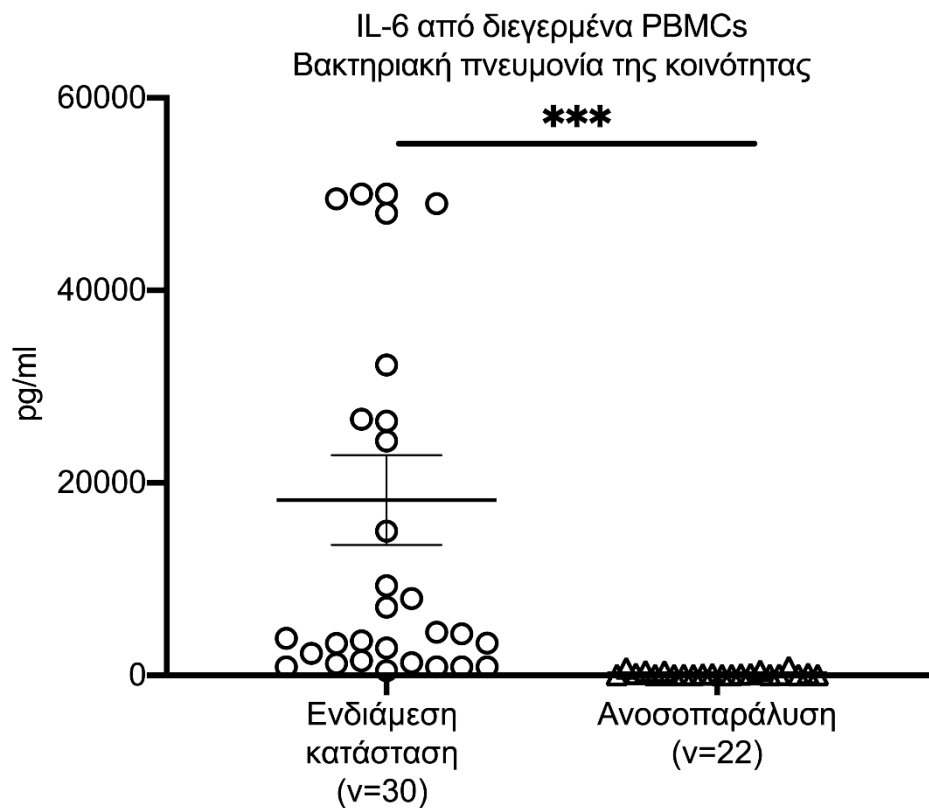
\*:  $p < 0.05$ , ns: στατιστικά μη σημαντική διαφορά, οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις





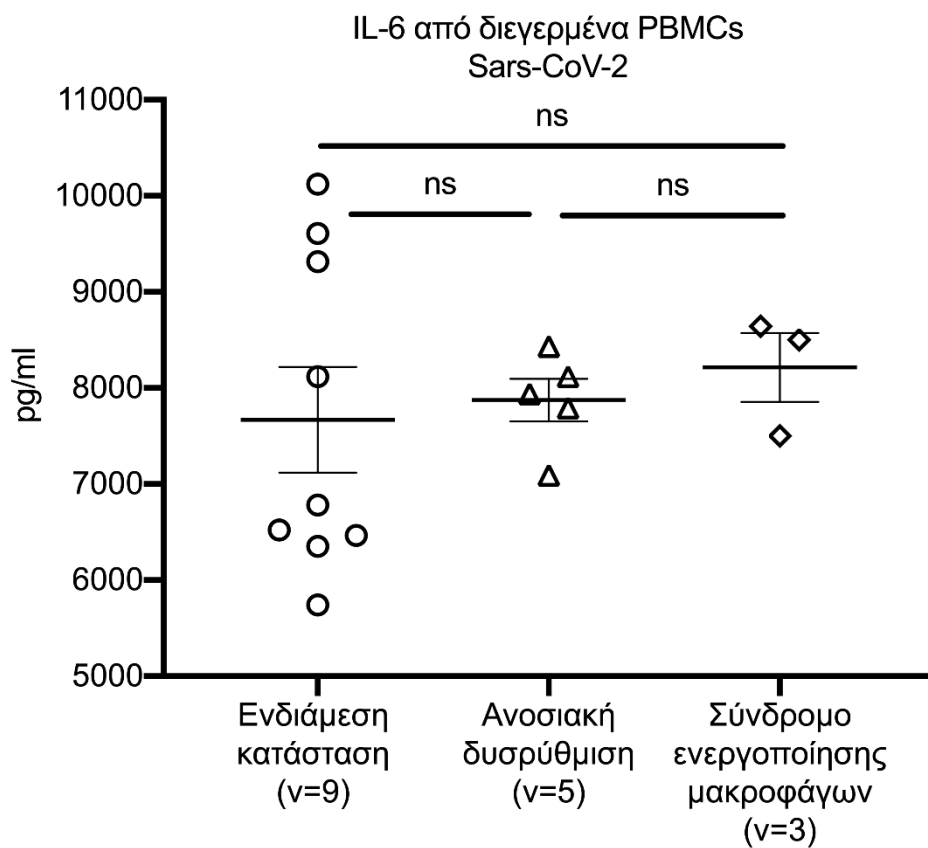
**Εικόνα 6.** Σύγκριση ασθενών με σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια μετά από λοίμωξη από τον ιό 2009H1N1 και μετά απο τον ιό SARS-CoV-2. Στατιστικά σημαντική αύξηση IL-1β παρουσιάζεται από μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών με λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 κατόπιν διέγερσης αυτών με μόρια λιποπολυσακχαρίτη του *Escherichia coli* O55:B5 (LPS).

\*:  $p < 0.05$ , οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



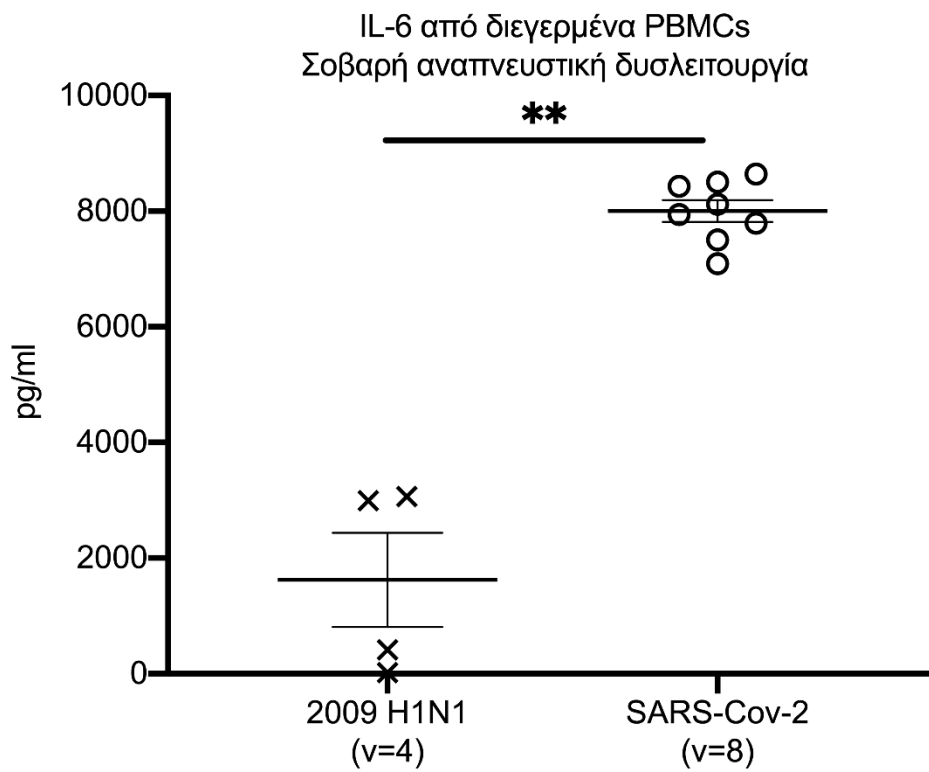
**Εικόνα 7.** Σύγκριση παραγωγής IL-6 από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος κατόπιν διέγερσης αυτών από μόρια λιπτοπολυσακχαρίτη του *Escherichia coli* O55:B5 (LPS) σε διαφορετικές καταστάσεις ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος, κατά την ενδιάμεση κατάσταση και κατά τη φάση της ανοσοπαράλυσης σε ασθενείς με σήψη από πνευμονία της κοινότητας βακτηριακής αιτιολογίας. Στατιστικά σημαντική αύξηση παραγωγής IL-6 αναδεικνύεται κατά την ενδιάμεση κατάσταση ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού.

\*\*\*:  $p < 0.001$ , οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



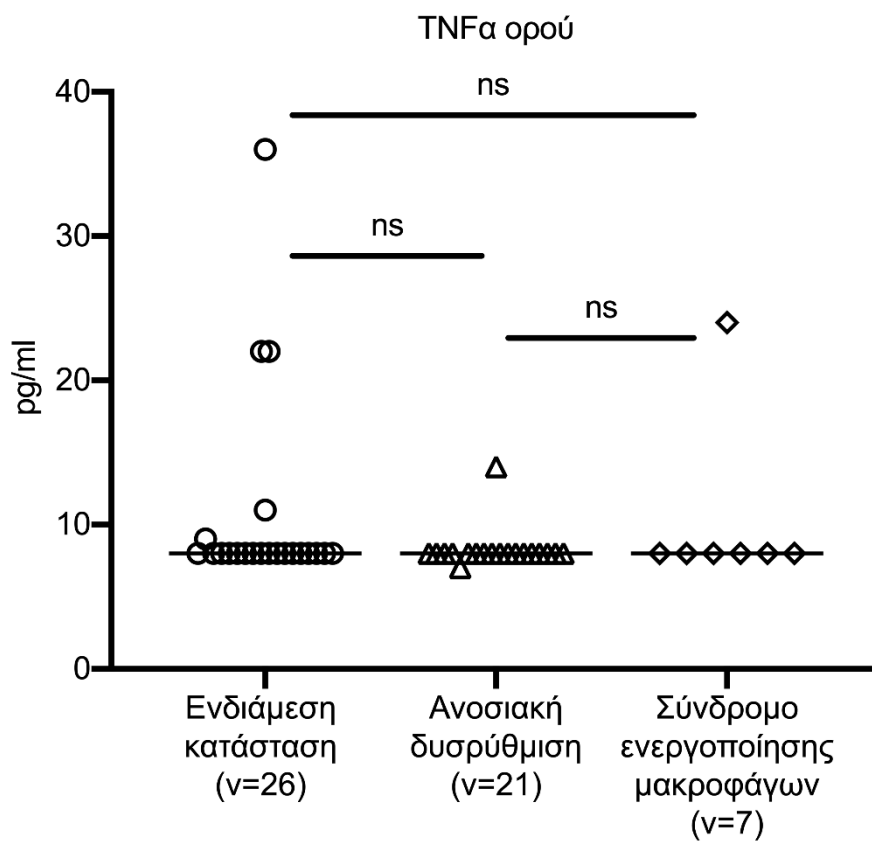
**Εικόνα 8.** Κατά τη σύγκριση μεταξύ τριών καταστάσεων ανοσιακής ενεργοποίησης: της ενδιάμεσης κατάστασης, της ανοσιακής δυσρύθμισης και του συνδρόμου ενεργοποίησης μακροφάγων δεν αναδύεται στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την παραγωγή IL-6 από μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με πνευμονία της κοινότητας μετά από λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2.

ns: στατιστικά μη σημαντική διαφορά, οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



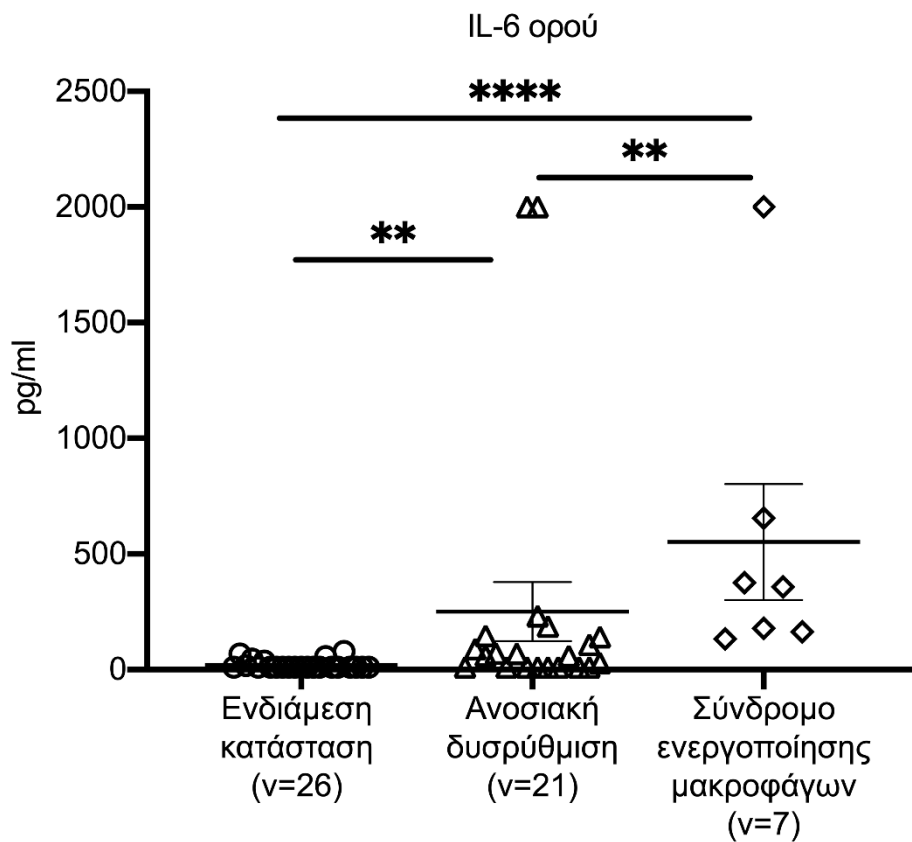
**Εικόνα 9.** Στατιστικά σημαντικότερη παραγωγή IL-6 σημειώνεται από τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια από τον ιό SARS-CoV-2 σε συγκριτικά μετά από λοίμωξη από τον ιό 2009H1N1

\*\* :  $p < 0.01$ , οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



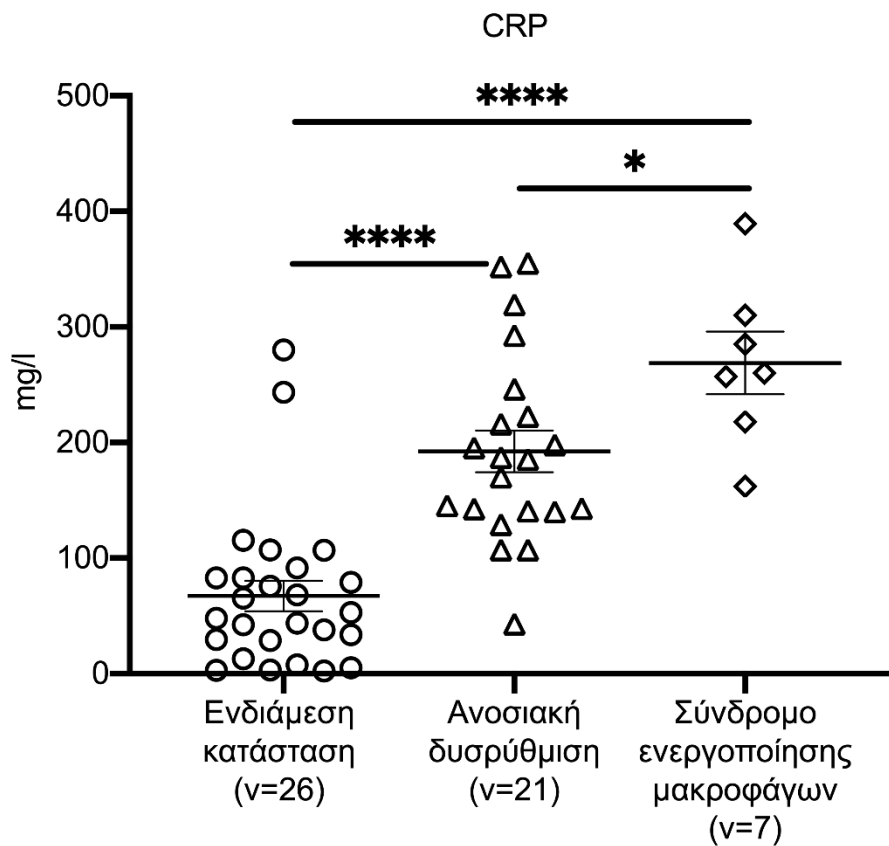
**Εικόνα 10.** Σύγκριση τιμής συγκέντρωσης του TNF-α σε ορό αίματος ασθενών με πνευμονία της κοινότητας από SARS-CoV-2 στις διαφορετικές καταστάσεις ανοσιακής ενεργοποίησης όπως την ενδιάμεση κατάσταση ,την κατάσταση ανοσιακής δυσρύθμισης και του συνδρόμου ενεργοποίησης μακροφάγων, μεταξύ των οποίων δεν αναδεικνύεται σημαντική διαφορά.

ns:στατιστικά μη σημαντική διαφορά, οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



**Εικόνα 11.** Σύγκριση τιμής συγκέντρωσης IL-6 ορού αίματος ασθενών με πνευμονία της κοινότητας από SARS-CoV-2 μεταξύ τριών καταστάσεων ανοσιακής ενεργοποίησης: της ενδιάμεσης κατάστασης, της ανοσιακής δυσρύθμισης και του συνδρόμου ενεργοποίησης μακροφάγων. Σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτής παρατηρείται στην κατάσταση ανοσιακής δυσρύθμισης σε σχέση με την ενδιάμεση κατάσταση.

\*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις



**Εικόνα 12.** Σύγκριση τιμής συγκέντρωσης CRP ορού αίματος ασθενών με πνευμονία της κοινότητας από SARS-CoV-2 μεταξύ τριών καταστάσεων ανοσιακής ενεργοποίησης: της ενδιάμεσης κατάστασης, της ανοσιακής δυσρύθμισης και του συνδρόμου ενεργοποίησης μακροφάγων. Σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτής παρατηρείται στην κατάσταση ανοσιακής δυσρύθμισης σε σχέση με την ενδιάμεση κατάσταση.

\*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , \*  $p < 0.05$ , οι μπάρες υποδεικνύουν τη μέση τιμή και τα βέλη τις στατιστικές συγκρίσεις

## Συζήτηση

Στην τρέχουσα μελέτη αναδεικνύεται η διαφορετική ανοσιακή απάντηση του ξενιστή μετά από λοίμωξη από Sars-CoV-2 στις διάφορες καταστάσεις ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συγκριτικά με αντίστοιχη λοίμωξη βακτηριακής αιτιολογίας ή άλλης ιογενούς λοίμωξης όπως στην περίπτωση της γρίπης από H1N1 του 2009. Συνοπτικά, σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα για την παθοφυσιολογία της σήψης από λοιμώξεις βακτηριακής αιτιολογίας ορισμένοι ασθενείς παρουσιάζουν μια κατάσταση υπερφλεγμονώδους απόκρισης σε ποσοστό περίπου 5% γνωστό ως σύνδρομο ενεργοποίησης μακροφάγων. Αυτό χαρακτηρίζεται από αυξημένες τιμές φερριτίνης, πανκυτταροπενία, υπερτριγλυκεριδαιμία, ηπατοσπληνομεγαλία, αύξηση των κυτταροκινών IL-1β, IL-18, TNF, IFN-γ. Ένα λίγο μεγαλύτερο ποσοστό 25% παρουσιάζει μια μορφή ανοσοπαράλυσης η οποία χαρακτηρίζεται από μείωση των HLA-DR σε λιγότερο από 30% στην επιφάνεια των μονοκυττάρων εμποδίζοντας έτσι την διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης και της συνεπακόλουθης ενεργοποίησης τόσο της φυσικής όσο και της ειδικής ανοσίας. Ωστόσο, η πλειοψηφία των ασθενών με σήψη βακτηριακής αιτιολογίας φαίνεται να βρίσκεται σε ενδιάμεση κατάσταση παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά και από τις δύο ανοσιακές καταστάσεις<sup>28</sup>

Η ανοσολογική απόκριση στη νόσο COVID-19 όπως αποδεικνύεται στην τρέχουσα μελέτη φαίνεται να διαφέρει σε αρκετά σημεία από αυτήν της βακτηριακής λοίμωξης καθώς και άλλης ιογενούς λοίμωξης όπως της γρίπης από τον ιό H1N1. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού σε περιπτώσεις σοβαρής λοίμωξης από Sars-CoV-2 διατηρούν την ικανότητά τους να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως TNF-α και IL-6 σε όλες τις καταστάσεις ανοσιακής απόκρισης όπως κατά την φάση της ενεργοποίησης των μακροφάγων, της ανοσοπαράλυσης και της ενδιάμεσης κατάστασης. Το γεγονός αυτό δεν παρατηρείται σε σήψη βακτηριακής αιτιολογίας ή σοβαρής αναπνευστικής δυσχέρειας από τον ιό H1N1 του 2009, όπου κατά την φάση ανοσοπαράλυσης τα μονοκύτταρα ανεπαρκούν να παράγουν κυτταροκίνες<sup>32</sup>. Αντιθέτως, η παραγωγή IL-1β φαίνεται να διαφέρει σημαντικά στις διαφορετικές καταστάσεις ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού μετά από λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 με στατιστικά σημαντική αύξηση κατά την ενδιάμεση κατάσταση. Στην περίπτωση αυτή, τα ανωτέρω γεννούν την υπόθεση ενός διαφορετικού



μηχανισμού ανοσιακής απόκρισης μετά την λοίμωξη από τον οποίο φαίνεται να υπάρχει ελαττωματική λειτουργία των λεμφοειδών κυττάρων, ενώ τα μονοκύτταρα συνεχίζουν να παράγουν σταθερά TNF-α και IL-6. Επιπλέον, η σημαντικά αυξημένη τιμή συγκέντρωσης IL-6 στον ορό ασθενών σε κατάσταση ανοσιακής δυσρύθμισης καθώς επίσης και της CRP ως παράγωγο αυτής μέσω ηπατικής ενεργοποίησης, επιβεβαιώνει την σημασία της IL-6 ως υποκινητή υπερφλεγμονώδους κατάστασης μετά από σοβαρή λοίμωξη από τον ιό Sars-CoV-2. Αντίθετα, η τιμή συγκέντρωσης του TNF στις διαφορετικές καταστάσεις ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά, ενώ η μικρή τιμή συγκέντρωσης IFN-γ, όπως προκύπτει από το πείραμα αλλά δεν αναγράφεται σε σχήμα, υποδεικνύει πως η T-λεμφοκυτταρική απόκριση μέσω των Th1 δεν συμμετέχει στην φλεγμονώδη ανοσιακή απόκριση της λοίμωξης από Sars-CoV-2.

Η διαπίστωση σταθερά αυξημένης παραγωγής IL-6 και η ταυτόχρονα μειωμένη έκφραση υποδοχέων του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας HLA-DR στην επιφάνεια των CD-14<sup>+</sup> μονοκυττάρων όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες<sup>29</sup> υποδεικνύει έναν μοναδικό συνδυασμό ελαττωματικής αντιγονοπαρουσίασης και λεμφοπενίας με συνοδό υπερπαραγωγή κυτταροκινών στην πλειοψηφία των ασθενών με σοβαρή λοίμωξη από τον ιό Sars-CoV-2. Η κατάσταση αυτή αποτελεί την ανοσιακή δυσρύθμιση της άμυνας του οργανισμού η οποία φαίνεται να αφορά την πλειοψηφία (75%) των ασθενών με νόσο COVID-19. Από την άλλη πλευρά, ένα μικρότερο ποσοστό ασθενών (25%) παρουσιάζει μερική διαταραχή της διαδικασίας της αντιγονοπαρουσίασης και εκδήλωση του συνδρόμου ενεργοποίησης των μακροφάγων. Κατάσταση στην οποία κύριος συντελεστής της υπερφλεγμονώδους διεργασίας αποτελεί η IL-1β (δεδομένα από διαφορετικό πείραμα της τρέχουσας μελέτης).

Συνεπώς, σε περιπτώσεις σοβαρής λοίμωξης από Sars-CoV-2 τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται να διατηρούν ακέραια την ιδιότητά τους να παράγουν κυτταροκίνες προάγοντας την φλεγμονώδη απόκριση του ανοσοποιητικού μέσω ενός ιδιαίτερου μηχανισμού ανοσιακής δυσρύθμισης ο οποίος χαρακτηρίζεται από πλημμελή αντιγονοπαρουσίαση και λεμφοπενία με κύριο υποκινητή αυτής της την IL-6. Η κατάσταση αυτή είναι διαφορετική από την κατάσταση ανοσοπαράλυσης στην βακτηριακή σήψη ή την σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια όπως έχει παρατηρηθεί πως προκαλείται μετά από λοίμωξη από τον ιό της γρίπης 2009 H1N1.

## Βιβλιογραφία

1. Kyriazopoulou E, Leventogiannis K, Norrby-Teglund A, Dimopoulos G, Pantazi A, Orfanos Se et al Macrophage activation-like syndrome: an immunological entity associated with rapid progression to death in sepsis. *BMC Med.* 2017 Sep 18;15(1):172.
2. Lukaszewicz Ac, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B et al Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med.* 2009 Oct;37(10):2746-52.
3. Philip A. Mudd, Jeremy Chase Crawford, Jackson S. Turner, Aisha Souquette, Daniel Reynolds, Diane Bender et al Distinct inflammatory profiles distinguish COVID-19 from influenza with limited contributions from cytokine storm *Science* Volume 6(50):eabe3024 December 9, 2020
4. Payen D, Cravat M, Maadadi H, Didelot C, Prosic L, Dupuis C et al Longitudinal Study of Immune Cells in Severe COVID-19 Patients. *Front Immunol.* 2020 Oct 23;11:580250
5. Wang F, Hou H, Yao Y, Wu S, Huang M, Ran X et al Systemically comparing host immunity between survived and deceased COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020 Aug;17(8):875-877
6. Kox M, Frenzel T, Schouten J, Van De Veerdonk FI, Koenen HJpm, Pickkers P on behalf of the RCI-COVID-19 study group. COVID-19 patients exhibit less pronounced immune suppression compared with bacterial septic shock patients. *Crit Care.* 2020 May 26;24(1):263.
7. Kazancioglu S, Yilmaz Fm, Bastug A, Sakalli A, Ozbay Bo, Buyuktarakci C, Bodur H et al Lymphocyte Subset Alteration and Monocyte CD4 Expression Reduction in Patients with Severe COVID-19. *Viral Immunol.* 2021 Jun;34(5):342-351
8. Zhou Z, Huang C, Zhou Z, Huang Z, Su L, Kang S et al Structural insight reveals SARS-CoV-2 ORF7a as an immunomodulating factor for human CD14<sup>+</sup> monocytes. *iScience.* 2021 Mar 19;24(3):102187.

9. Benlyamani I, Venet F, Coudereau R, Gossez M, Monneret G. Monocyte HLA-DR Measurement by Flow Cytometry in COVID-19 Patients: An Interim Review. *Cytometry A*. 2020 Dec;97(12):1217-1221.
10. Avendaño-Ortiz J, Lozano-Rodríguez R, Martín-Quirós A, Maroun-Eid C, Terrón V, Valentín J et al Proteins from SARS-CoV-2 reduce T cell proliferation: A mirror image of sepsis. *Heliyon*. 2020 Dec;6(12):e05635. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05635. Epub 2020 Nov 30.
11. Spinetti T, Hirzel C, Fux M, Walti Ln, Schober P, Stueber F et al Reduced Monocytic Human Leukocyte Antigen-DR Expression Indicates Immunosuppression in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesth Analg*. 2020 Oct;131(4):993-999.
12. Wei LL, Wang WJ, Chen DX, Xu B. Dysregulation of the immune response affects the outcome of critical COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2020 Nov;92(11):2768-2776.
13. Kratzer B, Trapin D, Ettl P, Körmöczi U, Rottal A, Tuppy F et al Immunological imprint of COVID-19 on human peripheral blood leukocyte populations. *Allergy*. 2021 Mar;76(3):751-765.
14. Rezaei M, Marjani M, Mahmoudi S, Mortaz E, Mansouri D. Dynamic Changes of Lymphocyte Subsets in the Course of COVID-19. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021;182(3):254-262.
15. Wei LI, Wang Wj, Chen Dx, Xu B. Dysregulation of the immune response affects the outcome of critical COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2020 Nov;92(11):2768-2776.
16. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L et al Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis*. 2020 May 11;221(11):1762-1769.
17. Huang W, Berube J, McNamara M, Saksena S, Hartman M, Arshad T et al Lymphocyte Subset Counts in COVID-19 Patients: A Meta-Analysis. *Cytometry A*. 2020 Aug;97(8):772-776.
18. FLombardi A, Trombetta E, Cattaneo A, Castelli V, Palomba E, Tirone M ET AL Early Phases of COVID-19 Are Characterized by a Reduction in Lymphocyte Populations and the Presence of Atypical Monocytes. *Front Immunol*. 2020 Dec 9;11:560330.

19. Xu J, Liu Z, Liu H, Luo Y, Kang K, Li X et al Decreased T Cell Levels in Critically Ill Coronavirus Patients: Single-Center, Prospective and Observational Study. *J Inflamm Res.* 2021 Apr 9;14:1331-1340.
20. Zhang Y, Wang X, Li X, Xi D, Mao R, Wu X et al Potential contribution of increased soluble IL-2R to lymphopenia in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020 Aug;17(8):878-880.
21. Avendaño-Ortiz J, Lozano-Rodríguez R, Martín-Quirós A, Maroun-Eid C, Terrón V, Valentín J et al Proteins from SARS-CoV-2 reduce T cell proliferation: A mirror image of sepsis. *Heliyon.* 2020 Dec;6(12):e05635.
22. Moser D, Biere K, Han B, Hoerl M, Schelling G, Choukér A et al COVID-19 Impairs Immune Response to *Candida albicans*. *Front Immunol.* 2021 Feb 26;12:640644.
23. Rodda LB, Netland J, Shehata L, Pruner KB, Morawski PA, Thouvenel CD ET AL. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell.* 2021 Jan 7;184(1):169-183.e17.
24. Crooke Sn, Ovsyannikova Ig, Kennedy Rb, Poland Ga. Immunoinformatic identification of B cell and T cell epitopes in the SARS-CoV-2 proteome. *Sci Rep.* 2020 Aug 25;10(1):14179.
25. Cox Rj, Brokstad Ka. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020 Oct;20(10):581-582.
26. Koutsakos M, Rowntree Lc, Hensen L, Chua By, Van De Sandt Ce, Habel Jr et al Integrated immune dynamics define correlates of COVID-19 severity and antibody responses. *Cell Rep Med.* 2021 Mar 16;2(3):100208.
27. Mervyn Singer, Clifford S Deutschman, Christopher Warren Seymour et al The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) *JAMA.* 2016;315(8):801-810.
28. Hotchkiss Rs, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013 Dec;13(12):862-74.
29. Ohno Y, Kitamura H, Takahashi N, Ohtake J, Kaneumi S, Sumida K et al IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2016 Feb;65(2):193-204.

30. Mudd PA, Crawford JC, Turner JS, Souquette A, Reynolds D, Bender D et al Distinct inflammatory profiles distinguish COVID-19 from influenza with limited contributions from cytokine storm. *Sci Adv.* 2020 Dec 9;6(50):eabe3024.

Η Μαρία Ευαγγελία Αδάμη του Γεωργίου με Αριθμό Μητρώου 20190585 γνωρίζοντας τις συνέπειες της λογοκλοπής, δηλώνω υπεύθυνα ότι η παρούσα εργασία με τίτλο «Ανοσιακή δυσρύθμιση στην COVID-19» αποτελεί προϊόν αυστηρά προσωπικής εργασίας και όλες οι πηγές που έχω χρησιμοποιήσει έχουν δηλωθεί κατάλληλα στις βιβλιογραφικές παραπομπές και αναφορές. Τα σημεία όπου έχω χρησιμοποιήσει ιδέες, κείμενο ή / και πηγές άλλων συγγραφέων, αναφέρονται ευδιάκριτα στο κείμενο με την κατάλληλη παραπομπή και η σχετική αναφορά περιλαμβάνεται στο τμήμα των βιβλιογραφικών αναφορών με πλήρη περιγραφή.