Zrozumieć immunopatologię zakażenia wirusem SARS-CoV-2 – klucz do skutecznej terapii COVID-19

Ewa Brzezińska-Błaszczyk², Jolanta B. Zawilska¹, Natalia Hille³, Julia Szparowska³, Anna Małecka³, Mikołaj Grabia³, Zuzanna Chojnacka³

¹Zakład Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

²Zakład Immunologii Doświadczalnej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

³Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (student), Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Jolanta B. Zawilska, Zakład Farmakodynamiki,
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny
w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, Polska;
e-mail: jolanta.zawilska@umed.lodz.pl

Źródła finansowania

Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
Grant 503/6-164-01/503-61-001-19-00.

Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2021.03.11

Zaakceptowano: 2021.03.29

Opublikowano on-line: 2021.04.08

DOI

10.32383/farmpol/135136

ORCID

Ewa Brzezińska-Błaszczyk (ORCID iD: 0000-0002-1466-4321)

Jolanta Barbara Zawilska (ORCID iD: 0000-0002-3696-2389)

Natalia Hille (ORCID iD: 0000-0003-0743-6117)

Julia Szparowska (ORCID iD: 0000-0002-5120-2169)

Anna Małecka (ORCID iD: 0000-0003-3665-1326)

Mikołaj Grabia (ORCID iD: 0000-0002-9695-5367)

Zuzanna Chojnacka (ORCID iD: 0000-0002-3237-4264)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Understanding the immunopathology of SARS-CoV-2 infection – a key to successful COVID-19 therapy

In December 2019, an outbreak of pneumonia cases was reported in Wuhan, China. The new virus, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2) – a highly pathogenic strain of coronaviruses – was isolated on 7 January 2020 and identified as the cause of the outbreak. The SARS-CoV-2 virus rapidly spread across China and many other countries and led to an unprecedented public health crisis worldwide. While 80% of infected individuals remain asymptomatic or develop only mild symptoms, the remaining 20% experience a rapid progression of the disease and severe/critical clinical condition that could lead to death. In patients with severe/critical phase of COVID-19, the SARS-CoV-2 virus has been shown to disrupt the normal immune response, leading to dysregulation of the immune system function and development of uncontrolled hyperinflammatory processes. Several studies highlight relevant changes occurring both in innate and adaptive immune system. Recent data indicate that a hyperinflammatory syndrome induced by SARS-CoV-2 contributes to the disease severity and mortality. It was demonstrated that patients with severe/critical phase of COVID-19 exhibit lymphopenia, a decrease in number of NK cells, eosinophils and basophils, an increase in inflammatory monocytes and neutrophils, an impaired interferon- α production and activity, no detectable circulating interferon- β , and massive production of proinflammatory cytokines, commonly known as cytokine storm. Many reports suggest that acute respiratory depression syndrome, cardiac dysfunction, hepatic impairment, acute kidney injury, coagulopathies, and multi-organ failure, that are characteristic of severe/critical COVID-19, are not due to direct effects of SARS-CoV-2, but result from the exaggerated cytokine release in response to viral infection. A better understanding of the pathophysiology and immune system dysregulation associated with cytokine storm and acute respiratory distress syndrome in severe COVID-19 is imperative

to identify novel drug targets and to develop effective vaccines and drugs. In addition, the knowledge on the processes induced by SARS-CoV-2 infection opens a door for the development and introduction of predictive diagnostic tests that enable the prognosis of the course and severity of the disease.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, infection, innate immune response, adaptive immune response, cytokines, cytokine storm.

© Farm Pol, 2021, 77 (3): 155–165

Wstęp

Infekcja, bakteryjna czy wirusowa, indukuje szybką reakcję układu odpornościowego i rozwój odpowiedzi immunologicznej. W założeniu, reakcja układu odpornościowego ma doprowadzić do całkowitej eliminacji patogenu z organizmu, przy czym uruchamianie mechanizmów obronnych nie powinny powodować skutków ubocznych i prowadzić do zmian patologicznych. Po eliminacji patogenu odpowiedź immunologiczna wygasa. Oczywiście, nie zawsze obronne procesy immunologiczne są w pełni skuteczne. Mechanizmy obronne uruchamiane w odpowiedzi na infekcję, chociaż w zasadzie przebiegające zawsze według określonego schematu, cechują się pewną odmiennością w zależności od rodzaju patogenu. Z pewnością, nieco inaczej rozwija się odpowiedź w przypadku infekcji bakteryjnej, a inaczej przy infekcji wirusowej. W infekcji bakteryjnej duże znaczenie ma rodzaj bakterii, w tym szczególnie budowa ściany komórki bakteryjnej i obecność określonych składników budulcowych, m.in. peptydoglikanu, lipopolisacharydu, kwasów lipotejchowych, lipoarabomannanów i kwasów mykoloowych. Odpowiedź przeciwzakazna w znacznym stopniu zależy więc od tego, czy infekcja jest spowodowana bakterią Gram-dodatnią, bakterią Gram-ujemną, bakterią atypową czy też przez mykobakterie. Ponadto, inaczej przebiega odpowiedź na zakażenie bakterią/bakteriami zewnątrzkomórkowymi, a inaczej na zakażenie bakterią/bakteriami wewnątrzkomórkowymi. Na odpowiedź immunologiczną na zakażenie bakteryjne wpływa również rodzaj wytwarzanych przez nie egzotoksyn. Dla rozwoju odpowiedzi przeciwbakteryjnej pewne znaczenie ma także obecność, lub nie, otoczki bakteryjnej. Odpowiedź immunologiczna na infekcję wirusami, które należą do obligatoryjnych patogenów wewnątrzkomórkowych, zależy przede wszystkim od typu wirusa, czyli rodzaju i budowy jego kwasu nukleinowego. Specyfika odpowiedzi układu odpornościowego jest nieco inna przy

infekcji wirusami zawierającymi jednonicowe lub dwuniciowe RNA (wirusy ss-RNA i wirusy ds-RNA) albo jednonicowe lub dwuniciowe DNA (wirusy ss-DNA i wirusy ds-DNA). Pewne znaczenie ma obecność, lub nie, otoczki. Bez wątpienia istotny jest rodzaj cząsteczki błonowej stanowiącej receptor dla wirusa i występowanie tego receptora w poszczególnych populacjach komórek gospodarza; warunkuje to bowiem, które z nich będą stanowić cel ataku wirusa.

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie rozwija się według pewnego schematu. W pierwszym etapie uruchamiane są różnorodne mechanizmy humoralne i komórkowe obrony wrodzonej (dawniej: nieswoistej). W tym etapie istotną rolę odgrywają sprawne bariery anatomiczne skóry i błon śluzowych, które zabezpieczają przed wnikaniem patogenu do organizmu. Ważnym elementem barier ochronnych są ponadto drobnoustroje wchodzące w skład mikrobiomu. Główne mechanizmy humoralnej obrony wrodzonej to aktywność układu dopełniacza, różnorodne peptydy o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (defensyny, katelicyny), lizozym, laktoferyna, białka ostrej fazy, immunoglobuliny, w tym szczególnie wydzielnicza immunoglobulina A (sIgA). W komórkowych mechanizmach obrony wrodzonej uczestniczą głównie neutrofile, monocyty i makrofagi, komórki NK (ang. *Natural Killers*), nieswoiste komórki limfoidalne (ang. *Innate Lymphoid Cells*, ILCs), komórki tuczne i komórki dendrytyczne. Mechanizmy odporności wrodzonej są uruchamiane po rozpoznaniu obecności patogenu przez komórki układu odpornościowego, komórki skóry i błon śluzowych, przede wszystkim układu oddechowego i pokarmowego. Sygnałem, który inicjuje odpowiedź wrodzoną są charakterystyczne dla patogenu cząsteczki, tzw. molekularne wzorce związane z patogenem (ang. *pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs). Są to między innymi składniki ściany komórkowej bakterii (lipopolisacharyd, peptydoglikan, kwasy lipotejchowe, lipopeptydy i inne), flagelina wchodząca w skład rzęsek bakteryjnych, a także RNA lub DNA wirusów [1]. Cząsteczki PAMP drobnoustrojów są rozpoznawane przez wyspecjalizowane cząsteczki/receptory komórek gospodarza, tzw. receptory rozpoznające wzorce (ang. *pattern recognition receptors*, PRRs) zlokalizowane zarówno w błonie komórkowej, jak i w cytoplazmie komórek i/lub błonie endosomów. Do grupy PRR należą między innymi receptory Toll-podobne (ang. *Toll-like receptors*, TLRs), receptory NOD-podobne (ang. *NOD-like receptors*, NLRs) i receptory RIG-podobne (ang. *RIG-like receptors*, RLRs) [2, 3]. Ligandami dla PRR są również różne endogenne substancje powstające w trakcie uszkodzenia i/lub

śmierci komórki lub uszkodzenia tkanek. Są to tzw. wzorce molekularne związane z uszkodzeniem/niebezpieczeństwem (ang. *damage/danger-associated molecular patterns*, DAMPS). Częsteczki DAMP, zwane także alarminami, to białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*, HSPs), białka S100, ATP, peptydy przeciwdrobnoustrojowe z grupy defensyn, białko HMGB1 (ang. *high mobility group box 1*). Zadaniem cząsteczek DAMP jest z jednej strony aktywowanie mechanizmów obrony wrodzonej w celu szybkiej eliminacji patogenu, ale z drugiej strony równoczesne uruchamianie procesów naprawczych w tkankach [4]. Interakcja cząsteczek PAMP, a także DAMP z PRR prowadzi do aktywacji danej komórki układu odpornościowego i indukcji jej adekwatnej odpowiedzi. W zależności od typu receptora PRR, uruchamiane są różne ścieżki sygnałowe prowadzące do aktywacji szeregu czynników transkrypcyjnych, w tym przede wszystkim jądrowego czynnika transkrypcyjnego κ B (ang. *nuclear factor- κ B*, NF- κ B) oraz czynników regulujących gen dla interferonu (ang. *interferon-gene regulatory factors*, IRFs), które biorą udział w indukcji syntezy interferonów (ang. *Interferons*, IFNs) [5]. W warunkach podstawowych białka kompleksu enzymatycznego I κ B „unieruchamiają” NF- κ B w cytoplazmie. Różnorodne bodźce, w tym patogeny, stymulują fosforylację I κ B α . Ufosforylowane I κ B α ulegają ubikwitinacji i degradacji przez proteasomy, co pozwala na translokację NF- κ B z cytoplazmy do jądra komórkowego. NF- κ B indukuje transkrypcję szerokiego spektrum genów kodujących cytokiny i chemokiny prozapalne, białka odpowiedzi na stres i białka przeciwapoptotyczne. Aktywność NF- κ B jest niezbędna do aktywacji i przebiegu optymalnej odpowiedzi immunologicznej. Liczne badania wskazują na związek pomiędzy nasileniem aktywacji NF- κ B a zmianami immunopatologicznymi w płucach wywołanymi przez wirusy układu oddechowego, w tym SARS-CoV-2 [6].

W przebiegu mechanizmów obronnych skierowanych przeciwko patogenom znaczącą rolę odgrywa proces fagocytozy, w którym uczestniczą neutrofile, makrofagi i komórki tuczne. Rozpoznanie patogenu i jego związanie przez komórki fagocytyczne odbywa się przy współudziale receptorów zmiataczy (ang. *scavenger receptors*, SRs), receptorów lektynowych typu C (ang. *C-type lectin receptors*, CLRs) zaliczanych do grupy PRR, receptorów dla fragmentów Fc przeciwciał (FcRs) oraz receptorów dla składowych dopełniacza (ang. *complement receptors*, CRs). Należy podkreślić, że podczas fagocytozy dochodzi do „wybuchu tlenowego” i syntezy reaktywnych form tlenu. W pewnych sytuacjach pobudzone

neutrofile wyrzucają sieci DNA, które tworzą „pajęczynę” wokół drobnoustrojów. Takie neutrofilowe zewnątrzkomórkowe pułapki (ang. *neutrophil extracellular traps*, NET) oprócz DNA zawierają różne czynniki bójcze dla drobnoustrojów oraz enzymy. Na tej drodze patogeny są unieszkodliwiane i niszczone pozakomórkowo. Zewnątrzkomórkowe pułapki są wytwarzane także przez makrofagi, eozynofile i komórki tuczne [7]. Ważnym elementem humoralnej odporności wrodzonej jest również aktywacja układu dopełniacza. W przebiegu wrodzonej obrony skierowanej przeciwko patogenom dochodzi także do rozwoju reakcji cytotoksyczności komórkowej z udziałem przeciwciał (ang. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), w której głównie uczestniczą komórki NK. Wszystkie mechanizmy odporności wrodzonej, humoralne i komórkowe, rozwijane są niemal równocześnie i wzajemnie się uzupełniają. W miejscu wnikięcia patogenu dochodzi zatem do rozwoju zapalenia, którego celem jest szybka eliminacja czynnika indukującego procesy obronne. W warunkach prawidłowych, po skutecznym wyeliminowaniu patogenu, z reguły następuje samoistne wygaszenie procesu zapalnego i naprawa ewentualnych uszkodzeń tkanki.

Równocześnie z rozwojem odporności wrodzonej powoli dochodzi do uruchamiania mechanizmów odporności nabytej (dawniej: swoistej). Trzeba jednak zaznaczyć, że mechanizmy obrony wrodzonej są tak sprawne i skuteczne, że często wystarczają do całkowitej eliminacji patogenu. W odporności nabytej kluczową rolę pełnią limfocyty B, limfocyty T i ich poszczególne subpopulacje – komórki T pomocnicze Th (CD4+), w szczególności subpopulacje Th1, Th2 i Th17, komórki T cytotoksyczne Tc (CD8+) oraz komórki dendrytyczne i częściowo makrofagi. Prezentowane przez komórki prezentujące antygen (komórki dendrytyczne, makrofagi lub limfocyty B) antygeny danego patogenu, z udziałem cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej HLA (ang. *human leukocyte antigens*) klasy II, są rozpoznawane przez komórki CD4+. Dochodzi do aktywacji limfocytów B, które w kooperacji z limfocytami Th2 przekształcają się w komórki plazmatyczne syntetyzujące swoiste przeciwciała. W przypadku nabytej odpowiedzi humoralnej powstają głównie przeciwciała klas M i G, ale także klasy A. W mechanizmach nabytej odporności komórkowej prezentacja białka patogenu w kontekście cząsteczek HLA klasy I prowadzi do aktywacji limfocytów T CD8+ i, we współpracy z komórkami Th1, powstania cytotoksycznych limfocytów T (Tc, CTL) swoistych dla danego antygeny.

Rola cytokin w odpowiedzi immunologicznej

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie jest niezwykle skomplikowana i przebiega z udziałem wielu różnych populacji komórek oraz czynników humoralnych. Reakcja układu odpornościowego na infekcję powinna być szybka i skuteczna, ograniczona w czasie i przestrzeni oraz powinna przebiegać z adekwatnym nasileniem. Po eliminacji patogenu, procesy obronne powinny wygasnąć, nie pozostawiając żadnych wyraźnych zmian patologicznych. Muszą zatem istnieć czynniki wpływające na przebieg procesów obronnych, regulujące ich nasilenie i kierunek, a wreszcie w odpowiednim momencie indukujące wyhamowanie tych procesów i ich całkowite wygaszenie. Biorąc pod uwagę różnorodność mechanizmów obronnych, procesy te muszą być prawidłowo koordynowane i równoważone. Choć w przebiegu procesów immunologicznych uczestniczy wiele różnych czynników humoralnych, to bez wątpienia głównymi czynnikami regulacyjnymi są cytokiny. Są to białka lub polipeptydy syntetyzowane przez komórki biorące bezpośredni udział w mechanizmach obronnych, ale także przez różne populacje komórek stacjonarnych, w tym komórki nabłonkowe, komórki śródbłonna naczyniowego i fibroblasty. Z reguły cytokiny są produkowane przez daną komórkę w odpowiedzi na pobudzenie. Niektóre komórki mogą jednak syntetyzować cytokiny konstytutywnie, chociaż w ilościach śladowych. Cytokiny charakteryzują się pleiotropowością, co oznacza, że mogą działać na wiele różnych populacji komórek i wywierać odmienne efekty. Cechuje je również redundancja, czyli zdolność różnych cytokin do wywierania takiego samego efektu. Mogą działać synergistycznie lub antagonistycznie wobec siebie. Do najbardziej znanych cytokin należą różne interleukiny (ang. *Interleukins*, ILs), w tym rodzina IL-1, do której należą IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18 i IL-33; ponadto IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-22, IL-23 i IL-27. Ważną grupę cytokin stanowią interferony, w tym IFN- α , IFN- β i IFN- γ oraz rodzina cząsteczek martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*, TNF) – TNF- α i limfotoksyna (LT). Wśród cytokin wyróżnia się ponadto czynniki stymulujące tworzenie kolonii (ang. *colony stimulating factors*, CSFs) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) i czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF). Odrębną i bardzo szeroką grupą cytokin są tzw.

małe cytokiny, czyli chemokiny. Mają stosunkowo niską masę cząsteczkową i cechują się wysoką homologią sekwencji. W grupie chemokin istotne znaczenie mają szczególnie CCL2 (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1), CCL3 (ang. *macrophage inflammatory protein*, MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) i CCL5 (ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*, RANTES), a z podrodziny CXC – CXCL8 (IL-8), CXCL9 (ang. *monokine induced by γ -interferon*, MIG) i CXCL10 (ang. *interferon inducible protein*, IP-10). Cytokiny regulują wiele procesów w organizmie, w tym wpływają na procesy immunologiczne; w szczególności modulują przebieg i natężenie procesów zapalnych. Niektóre z cytokin wykazują silne działanie prozapalne i dlatego promują rozwój zapalenia. Do tej grupy należą wszystkie cytokiny z rodziny IL-1 (z wyjątkiem IL-1Ra), TNF- α , IL-6, IL-15, IL-17, IL-22 i IL-27 oraz niemal wszystkie chemokiny. Cytokiny prozapalne stymulują napływ komórek obronnych do miejsca zapalenia (działanie chemotaktyczne), silnie aktywują komórki obronne do wydzielania kolejnych cytokin prozapalnych, w tym szczególnie wpływają na neutrofile i makrofagi, stymulują komórki żerne do fagocytozy i wytwarzania reaktywnych form tlenu, nasilają cytotoksyczność komórek NK i limfocytów Tc. Ponadto wiele z nich, głównie IL-6, ale także IL-1, IL-11 i IL-22, silnie indukuje wytwarzanie przez hepatocyty białek ostrej fazy. Niektóre cytokiny mają działanie przeciwzapalne, a więc poprzez różne mechanizmy hamują i wygaszają procesy zapalne. Do tej grupy należą IL-1Ra, IL-4, IL-10 oraz transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor* β , TGF- β). Wiele cytokin wpływa na przebieg procesów obronnych poprzez oddziaływanie na proliferację, różnicowanie i aktywność limfocytów B i różnych subpopulacji limfocytów T, regulując tym samym rozwój odpowiedzi nabytej. Niektóre cytokiny mają działanie immunoregulacyjne, bowiem modulują kierunek i natężenie procesów obronnych. Do tej grupy należą przede wszystkim IL-10 i TGF- β . Odrębną grupę cytokin stanowią IFN, w tym IFN- α i IFN- β . Są one wytwarzane i wydzielane przez komórki w odpowiedzi na zakażenie wirusem, a więc odgrywają wiodącą rolę w odporności przeciw-wirusowej.

Odpowiedź układu odpornościowego na zakażenia wirusowe

Jak już wcześniej wspomniano, odpowiedź układu odpornościowego w znacznym stopniu zależy od rodzaju patogenu. Podczas infekcji wirusowej dochodzi do uruchomienia niemal

wszystkich możliwych mechanizmów obronnych. W rozpoznaniu wirusa biorą udział wewnątrzkomórkowe PRR rozpoznające, w zależności od typu danego wirusa, jednoniciowe RNA (wirusy ss-RNA) – TLR7, TLR8 i RIG-I (receptor z grupy cząsteczek RLR), dwuniciowe RNA (wirusy ds-RNA) – TLR3, RIG-I i MDA5 (cząsteczka z grupy RLR), niemetylowane CpG DNA (wirusy DNA) – TLR9.

W pierwszym etapie bardzo szybko uruchamiane są podstawowe mechanizmy obrony wrodzonej, których celem jest hamowanie niekontrolowanej replikacji wirusa. Na tym etapie kluczową rolę pełnią IFN- α i IFN- β . IFN nie niszczy bezpośrednio wirusów, ale stymulują wytwarzanie w komórkach czynników przeciwwirusowych oraz indukują tzw. stan gotowości przeciwwirusowej. W wyniku działania IFN- α i IFN- β dochodzi do wytwarzania syntazy oligoadenylanowej. Enzym ten odpowiada za syntezę oligonukleotydów adenylanowych, a one aktywują endorybonukleazę – RNazę L, która rozkłada wirusowe mRNA i blokuje w ten sposób replikację wirusa. IFN aktywują również kinazę białkową R – ulega ona autofosforylacji, a następnie fosforyluje inne białka komórkowe. W wyniku tych procesów dochodzi do zahamowania translacji i syntezy białek wirusowych. Podkreślić należy, że kinaza białkowa R jest aktywna jedynie w obecności dwuniciowego RNA. IFN- α i IFN- β aktywują również syntezę GTP-az z rodziny dynamin, które po oligomeryzacji blokują rybonukleoproteiny wirusa i w konsekwencji uniemożliwiają replikację wirusów. IFN indukują także wiele innych czynników, które wpływają na destabilizację wirusowego RNA, hamują prawidłową aktywność wirusowych białek, indukują rozpad kapsydu lub uniemożliwiają wytwarzanie wirionów przez zakażone komórki [8, 9]. W odpowiedzi na zakażenie wirusem komórki wytwarzają nie tylko IFN- α i IFN- β , ale także wiele chemokin i cytokin. Z kolei cytokiny/chemokiny indukują napływ komórek obronnych, szczególnie neutrofili i makrofagów oraz komórek dendrytycznych, a następnie stymulują te komórki do aktywności przeciwwirusowej i wydzielania kolejnych cytokin. Rozwija się obronny proces zapalny. Ważnym mechanizmem obronnym jest aktywność komórek NK, które niszczą komórki zakażone wirusem na drodze naturalnej cytotoksyczności komórkowej lub, częściej, w mechanizmie ADCC. Wydaje się, że jednym z istotnych procesów wspierających mechanizmy obronne jest powstanie wewnątrzkomórkowego kompleksu białkowego – inflammasomu, aktywującego w komórce kaspazę-1, która uczestniczy w powstawaniu aktywnej formy silnych cytokin prozapalnych, tj. IL-1 β i IL-18, a także w indukcji syntezy niektórych alarmin, w tym HMGB1 [10].

W obronie przeciwwirusowej bardzo ważną rolę odgrywają mechanizmy odporności nabytej. Z pewnością kluczowe znaczenie ma aktywność limfocytów CTL (komórki T CD8+) oraz swoiste przeciwciała neutralizujące skierowane przeciwko białkom wirusa. Przy opłaszczeniu zainfekowanej komórki przeciwciałami skierowanymi przeciwko białkom wirusa, może być również uruchamiany układ dopełniacza. Z reguły mechanizmy immunologiczne obrony wrodzonej i nabytej są wystarczające do eliminacji wirusa. Nie dochodzi przy tym do żadnych procesów patologicznych i trwałych uszkodzeń tkanek.

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie wirusem SARS-CoV-2

Od pierwszych tygodni po identyfikacji wirusa SARS-Cov-2, nowego patogenu z grupy koronawirusów, i opisach przebiegu wywołanej przez niego choroby (COVID-19), rozpoczęto badania mające na celu poznanie procesów obronnych i mechanizmów immunologicznych rozwijanych w odpowiedzi na infekcję tym patogenem [11, 12]. Badania takie były i nadal są bardzo intensywne, albowiem obserwacje już z pierwszych tygodni pandemii pokazały, że u około 15% pacjentów przebieg choroby jest ciężki, u 5% krytyczny – z niewydolnością oddechową, wstrząsem septycznym i dysfunkcją wielu narządów, a nawet prowadzi do zgonu [13, 14].

Poznanie mechanizmów obronnych rozwijanych w odpowiedzi na zakażenie SARS-CoV-2 to nie tylko głębsze zrozumienie patomechanizmu choroby, ale także możliwość wprowadzenia skutecznej terapii. Ponadto, znajomość przebiegu procesów indukowanych infekcją SARS-CoV-2 pozwala na opracowanie predykcyjnych testów diagnostycznych umożliwiających prognozowanie przebiegu i ciężkości choroby. Zrozumienie patofizjologii COVID-19, w tym procesów immunologicznych, było i, biorąc pod uwagę pojawianie się nowych mutacji wirusa, jest nadal niezbędne dla opracowania skutecznych szczepionek.

Kluczowe pytania jakie się nasuwają to, (1) czy odpowiedź układu odpornościowego na infekcję SARS-CoV-2 jest typowa dla zakażeń wirusowych czy też ma swoją specyfikę i (2) dlaczego u niektórych chorych infekcja tym wirusem wywołuje gwałtowną odpowiedź immunologiczną, co indukuje rozwój wielu procesów patologicznych często doprowadzających do zgonu pacjenta [15]. Obecnie przypuszcza się, że u osób u których przebieg choroby jest łagodny, rozwija się prawidłowa, „klasyczna” odpowiedź immunologiczna. U takich pacjentów obserwuje

się charakterystyczne cechy aktywacji układu odpornościowego, zarówno mechanizmów humoralnych, jak i komórkowych rozwijanych w odpowiedzi na zakażenie wirusowe. Należy przy tym podkreślić, że u chorych z łagodnym przebiegiem choroby szybko pojawiają się efektorowe limfocyty CTL (Tc CD8+), komórki niezbędne do skutecznej eliminacji infekcji [16, 17]. Limfocyty te niszczą zakażoną komórkę na drodze reakcji cytolitycznej lub indukują programowaną śmierć komórki – apoptozę. W odpowiedzi na zakażenie SARS-CoV-2 rozwija się również humoralna odpowiedź nabyta; wytwarzane są przeciwciała IgM, a następnie IgG [12, 13]. Rozwój prawidłowej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie SARS-Cov-2 obserwuje się przede wszystkim u dzieci i osób młodych, u których układ odpornościowy jest bardzo sprawny, a ich komórki mają wysoki poziom ekspresji cząsteczek TLR, co warunkuje szybkie rozpoznanie infekcji wirusowej i uruchomienie procesów obronnych [18, 19].

Ciężki przebieg COVID-19 u niektórych chorych może bezpośrednio wynikać z zaburzeń funkcji układu odpornościowego [15, 20]. Taka sytuacja występuje często u osób starszych, po 65 roku życia. Można przypuszczać, że jest to związane z naturalnym, fizjologicznym procesem „immunosenescencji”, czyli starzeniem się układu odpornościowego. Starzenie układu odpornościowego dotyczy w większym stopniu mężczyzn niż kobiet, u których ochronną rolę pełnią estrogeny. Starzenie układu odpornościowego to przede wszystkim zaburzenia w aktywności procesów odporności nabytej. U osób starszych dochodzi do osłabienia funkcji limfocytów T, w tym subpopulacji Th2 CD4+ – komórek współuczestniczących w dojrzewaniu obwodowych limfocytów B oraz w powstawaniu komórek plazmatycznych. Tym samym zostaje osłabiona odporność humoralna i zdolność wytwarzania przeciwciał. Osłabiona jest również aktywność cytotoksyczna limfocytów Tc. Zaobserwowano także zmniejszoną ekspresję cząsteczek TLR przez komórki układu odpornościowego. Co istotne, u osób starszych obserwuje się „fizjologicznie” podwyższone poziomy cytokin prozapalnych, przy czym osłabiona jest zdolność wygaszania procesu zapalnego. Ponadto, na skutek starzenia się układu odpornościowego coraz więcej komórek ulega apoptozie i jest eliminowanych przez aktywowane makrofagi w tkankach. To indukuje w tkankach ciągle bezobjawowy proces zapalny, w trakcie którego stale wytwarzane są małe ilości mediatorów prozapalnych, w tym IL-6 i TNF- α . Stan taki nazywany jest często „stanem gotowości prozapalnej” [21, 22]. Generalnie więc, u osób starszych

dużo szybciej i łatwiej może dochodzić do rozwoju nadmiernego stanu zapalnego. Do patologicznej, nadmiernej reakcji układu odpornościowego na SARS-CoV-2 może dochodzić także u osób młodszych z chorobami, którym towarzyszy przewlekły stan zapalny niskiego stopnia (ang. *low grade inflammation*), czyli także występuje „gotowość prozapalna”. Warto podkreślić, że również u osób otyłych obserwuje się przewlekły stan zapalny, bowiem adipocyty wytwarzają duże ilości cytokin prozapalnych [23]. Ważnym czynnikiem wpływającym na przebieg COVID-19 są również współistniejące choroby płuc, a szczególnie przewlekła obturacyjna choroba płuc (POCHP) [24]. Celem ataku wirusa SARS-CoV-2 są komórki górnych dróg oddechowych, a następnie oskrzela, oskrzeliki i pneumocyty typu II w pęcherzykach płucnych. Pneumocyty ulegają uszkodzeniu, pęcherzyki płucne zapadają się, pojawia się odczyn zapalny i wysięk [25]. U osoby bez chorób współistniejących w obrębie płuc taka sytuacja jest groźna, ale nie zagraża bezpośrednio życiu. U pacjenta z chorobami płuc powyższa sytuacja jest bardzo niebezpieczna – chory się dusi, rozwija się kwasica metaboliczna, może dojść do szybkiego rozwoju zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ang. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS). Należy przecież pamiętać, że prawidłowa odpowiedź obronna rozwijana w odpowiedzi na infekcję jest szybka, ale jednak musi dojść do określonej sekwencji zdarzeń, co trwa od kilkudziesięciu godzin do kilku dni. Tak więc w szczególnych sytuacjach, zanim dojdzie do rozwoju efektywnej reakcji obronnej, może już rozwinąć się ARDS.

Ostatnio pojawiły się informacje mogące mieć znaczenie dla przebiegu i ciężkości COVID-19. Jak powszechnie wiadomo, białko kolca (S) wirusa SARS-CoV-2 wiąże się do błonowego receptora – konwertazy angiotensyny 2 (ACE2). W ostatnich badaniach zaobserwowano, że białko S może się także wiązać do cząsteczki CD26 (dipeptydylopeptydazy IV), która występuje w błonie wielu komórek organizmu, w tym limfocytów T i makrofagów. CD26 może występować również w postaci rozpuszczalnej (sCD26) we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym. Sugeruje się, że poziom sCD26 może wpływać na przebieg COVID-19; przy wysokim poziomie białko to wiąże się z wirusem SARS-CoV-2. W ten sposób ilość „wolnych” cząstek wirusa ulega zmniejszeniu, a tym samym wnikanie wirusa do komórek, poprzez wiązanie do ACE2 czy do błonowej cząsteczki CD26, jest zredukowane, a przebieg choroby może być łagodniejszy [26, 27]. Te ciekawe obserwacje wymagają jednak dalszej weryfikacji.

Burza cytokinowa

Dane kliniczne dowodzą, że większość pacjentów w stanie krytycznym i zmarłych nie wykazywała poważnych objawów klinicznych we wczesnych stadiach zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Stan kliniczny tych osób nieoczekiwanie pogorszył się w późniejszych stadiach COVID-19, a rozwijający się zespół ostrej niewydolności oddechowej i niewydolność wielonarządowa w krótkim czasie doprowadziły do zgonu [15, 28–30]. Przypuszcza się, że w sytuacji, gdy układ odpornościowy nie może w prawidłowy sposób zwalczyć infekcji, utrzymujący się stan zapalny może doprowadzić do rozwoju hipercytokinemii, powszechnie znanej jako burza cytokinowa (ang. *cytokine storm*, CS), a następnie do zespołu uwalniania cytokin (ang. *cytokine release syndrome*, CRS), nazywanego także zespołem burzy cytokinowej (ang. *cytokine storm syndrome*, CSS). Burza cytokinowa, a w szczególności ogromna miejscowa produkcja cytokin, to kluczowy czynnik, który determinuje nasilenie objawów i śmiertelność pacjentów zakażonych wirusem SARS-CoV-2. Zaktywowane komórki, głównie neutrofile i makrofagi, wydzielają olbrzymie ilości cytokin prozapalnych, a także związki toksyczne, enzymy i reaktywne formy tlenu. W wyniku tych procesów i niekontrolowanego stanu zapalnego dochodzi do stresu oksydacyjnego, który stymuluje kolejne komórki do produkcji cytokin [6, 31–33]. Mamy zatem sytuację samonapędzającego się błędnego koła, które bardzo trudno zatrzymać.

Zespół uwalniania cytokin obejmuje cztery procesy:

- nadprodukcję cytokin, które powodują napływ różnych komórek odpornościowych do miejsca zakażenia;
- uszkodzenie/śmierć bezpośrednio zakażonych komórek, w tym komórek nabłonka pęcherzyków płucnych i śródbłonka naczyniowego;
- koagulopatię wynikającą z uszkodzenia śródbłonka naczyniowego;
- wyczerpanie populacji limfocytów [34].

Wiele badań wskazuje na to, że zespół ostrej niewydolności oddechowej, obrzęk płuc, zaburzenia czynności serca, zaburzenia czynności wątroby, ostre uszkodzenie nerek, koagulopatie i niewydolność wielonarządowa, charakterystyczne dla ciężkiego/krytycznego stanu COVID-19, nie wynikają z bezpośredniego działania SARS-CoV-2, a są konsekwencją burzy cytokinowej/zespołu uwalniania cytokin [35].

Obraz kliniczny pacjentów w fazie ciężkiej/krytycznej COVID-19 przypomina zespół uwalniania cytokin (ang. *cytokine release syndrome*, CRS) – rozległy stan zapalny, który może być wywołany

lekami lub infekcją. Zespół ten często pojawia się w przebiegu chorób autoimmunologicznych (młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów, chorobie Still'a o początku w wieku dorosłym i w układowym toczniu rumieniowatym) oraz leczenia o podłożu immunologicznym [36].

Za specyficzną odpowiedź immunologiczną na zakażenie koronawirusami odpowiadają przede wszystkim limfocyty T. Limfocyty Th2-CD4+ stymulują limfocyty B do rozwoju w kierunku komórek plazmatycznych, które wydzielają swoiste przeciwwirusowe przeciwciała neutralizujące, natomiast cytotoksyczne limfocyty Tc-CD8+ uruchamiają program śmierci komórek zainfekowanych wirusem [37]. Szybka indukcja limfocytów Th-CD4+ specyficznych dla SARS-CoV-2 w ostrej fazie COVID-19 była związana z łagodnym przebiegiem choroby i przyspieszoną eliminacją wirusa. W przeciwieństwie do tego, przedłużający się brak tych komórek zaobserwowano w przypadkach ciężkiego/krytycznego przebiegu COVID-19. Z kolei obecność komórek Tc-CD8+ specyficznych dla SARS-CoV-2 wiąże się z łagodniejszym przebiegiem choroby i lepszym rokowaniem [38].

W COVID-19 ważnym czynnikiem indukującym rozwój niekontrolowanego hiperodczynu zapalnego może być wytwarzanie przez neutrofile zewnątrzkomórkowych pułapek (NET) i w efekcie śmierć tych komórek na drodze tzw. NETozy. W trakcie tego procesu dochodzi wprawdzie do eliminacji wirusa, ale równocześnie do tkanek dostaje się wiele różnych enzymów neutrofilowych, w tym elastazę. Czynniki te mogą indukować rozwój procesu zapalnego, a równocześnie enzymy neutrofilowe silnie uszkadzają tkankę płucną [7, 39].

Trudno jednoznacznie określić, które cytokiny i chemokiny odgrywają kluczową rolę w rozwoju burzy cytokinowej wywołanej infekcją SARS-Cov-2. Z pewnością istotne znaczenie mają IL-1, IL-6 i TNF- α [33].

IL-1 to grupa cytokin obejmująca IL-1 α , IL-1 β , IL-18 i inne, które stymulują funkcjonowanie układu odpornościowego oraz indukują procesy zapalne. Pobudzają limfocyty T, eozynofile, bazofile, komórki dendrytyczne i komórki NK. IL-1 α jest produkowana przez makrofagi, komórki śródbłonka, limfocyty, neutrofile, fibroblasty i astrocyty. Związana z błoną komórkową IL-1 α działa miejscowo, natomiast IL-1 β jest uwalniana do krwi i działa ogólnoustrojowo. IL-18, produkowana m.in. przez makrofagi, komórki dendrytyczne i komórki nabłonkowe, zwiększa syntezę IL-4 i IL-13. IL-1 α i IL-1 β , nasilają przepływ informacji w czasie ostrej fazy zapalenia, przemieszczanie się komórek układu odpornościowego do pierwotnego miejsca zapalenia, pobudzenie komórek nabłonka oraz wtórną produkcję cytokin [33].

IL-6, uważana za „oko cyklonu”, jest produkowana głównie przez monocyty i makrofagi, a w mniejszym stopniu przez limfocyty T i B, komórki śródbłónka naczyń, keratynocyty i chondrocyty. IL-6 jest cytokiną plejotropową, która działa wielokierunkowo na komórki układu odporności wrodzonej i nabytej; odgrywa kluczową rolę w regulacji mechanizmów obronnych organizmu. Główną rolą IL-6 jest inicjowanie i regulacja ostrej odpowiedzi zapalnej oraz ułatwianie rozwoju i ukierunkowanie odpowiedzi wrodzonej i nabytej. IL-6 stymuluje różnicowanie limfocytów B, pobudza cytotoksyczne limfocyty T, stymuluje wydzielanie IL-2 przez limfocyty T oraz produkcję białek ostrej fazy przez hepatocyty. IL-6 wiąże się z transbłonowym receptorem IL-6R, tworząc kompleks IL-6/IL-6R. Kompleks ten indukuje homodimeryzację białka gp130. Dochodzi do aktywacji wewnątrzkomórkowego szlaku transdukcji sygnału: kinazy TYK-2, JAK1 i JAK2 → czynnik transkrypcyjny STAT3 → transkrypcja IL-6. Wysokie poziomy IL-6 mogą aktywować układ krzepnięcia i zwiększać przepuszczalność naczyń krwionośnych, stwarzając warunki do szybkiego rozprzestrzeniania się mediatorów prozapalnych i komórek zapalnych [40]. Donoszono, że wysokie poziomy IL-6 występują u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19, co dowodzi, że IL-6 może nasilać uszkodzenie tkanki płucnej [29]. Podniesiony poziom IL-6 jest związany z limfopenią, osłabioną cytotoksycznością limfocytów Tc-CD8+ i aktywacją śródbłónka naczyń.

TNF- α jest produkowany przez makrofagi, monocyty, neutrofile, pobudzone limfocyty, komórki tuczne, astrocyty, adipocyty i komórki mięśni gładkich. TNF- α odgrywa kluczową rolę w infekcjach wirusowych, w tym w burzy cytokinowej. W zakażeniu SARS-CoV-2 poziomy TNF- α , IL-6 i receptora dla IL-2 wzrastają na początku infekcji i pozostają podwyższone przez cały okres choroby. W przebiegu COVID-19 wzrost poziomu TNF- α jest widoczną cechą pogorszenia stanu zdrowia pacjenta [11, 15].

W rozwoju burzy cytokinowej uczestniczą także inne cytokiny/chemokiny. Badania pierwszej grupy 41 pacjentów z COVID-19 w Wuhan, które doprowadziły do odkrycia SARS-CoV-2, pokazały, że profil cytokin w osoczu jest podobny do tego, jaki występuje we wtórnej limfohistiocytozie hemofagocytarnej (ang. *secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis*, sHLH) – zagrażającego życiu stanu ekstremalnej reakcji zapalnej organizmu. U pacjentów z COVID-19 osoczowe poziomy IL-1 β , receptora dla IL-1, G-CSF, GM-CSF, TNF- α oraz chemokin CXCL10, CCL2 i CCL3 były znacznie wyższe niż u osób zdrowych. Ponadto, u pacjentów przyjętych na oddziały intensywnej

terapii poziomy IL-2, IL-7, IL-19, GM-CSF, CXCL10, CCL2, CCL3 i TNF- α były wyższe od poziomów we krwi pacjentów nie wymagających intensywnego leczenia [28, 29, 41, 42]. Badania przeprowadzone przez Liu i wsp. [42] na grupie 69 pacjentów z ciężką postacią COVID-19 wykazały znacznie podwyższone poziomy IL-6, które korelowały z maksymalną temperaturą ciała podczas hospitalizacji oraz z podwyższonymi poziomami dehydrogenazy mleczanowej (LDH), białka CRP, ferrytyny i D-dimerów. Co więcej, podwyższony poziom IL-6 był związany z bardziej zaawansowanymi zmianami płucnymi uwidocznionymi w badaniach tomografii komputerowej (TK) klatki piersiowej. Znamienny spadek IL-6 i poprawę wyników badań TK zaobserwowano u pacjentów w fazie zdrowienia, natomiast poziom tej interleukiny nadal wzrastał u pacjentów z pogłębiającymi się objawami klinicznymi. W badaniach autopsyjnych pacjentów z COVID-19 wykazano, że poziomy IL-6, CXCL8 oraz TNF- α osiągały najwyższe wartości przed zgonem i były skorelowane z patologicznymi objawami hemofagocytozy [43]. Podwyższone poziomy cytokin prozapalnych w osoczu pacjentów z COVID-19 opisywali także inni autorzy [41, 44].

W osoczu krwi pacjentów obserwowano również znaczny wzrost poziomu chemokin: CCL2, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9 i CXCL16. Podwyższone poziomy chemokin CXCL9 i CXCL16 stymulujących migrację komórek T lub NK, CCL8 i CCL2, które rekrutują monocyty i makrofagi, oraz CXCL8 (klasycznego czynnika chemotaktycznego neutrofilii) wskazują na dominującą rolę tych komórek w procesach patoimmunologicznych w przebiegu COVID-19 [45].

W przeprowadzonych dotychczas badaniach wszyscy pacjenci z COVID-19 mieli jednojądrzaste nacieki zapalne w miąższu płuc, składające się głównie z limfocytów i makrofagów. Nacieki limfocytarne obejmował zarówno komórki Th-CD4+, jak i Tc-CD8+ w obszarze śródmiąższowym pęcherzyków płucnych i oskrzelików, z przewagą limfocytów Th-CD4+. Limfocyty Th-CD4+ gromadziły się wokół małych naczyń krwionośnych; w naczyniach tych często występowały mikrozakrzepy bogate we włókna [46]. W badaniach *post mortem* w świetle pęcherzyków płucnych obserwowano dużą liczbę makrofagów CD68+ i komórek wielojądrzastych [47, 48].

Burza cytokinowej towarzyszy utrzymujące się obniżone ciśnienie tętnicze krwi, hipo- lub hipertermia oraz uszkodzenia wielonarządowe. W obrazie badań laboratoryjnych dominują zaburzenia hematologiczne (leukopenia, trombocytopenia), spadek liczby komórek NK i wzrost liczby neutrofilii, podniesiony poziom trójglicerydów, D-dimerów i ferrytyny oraz markery uszkodzeń

tkanek [49]. U 72–85% pacjentów z ciężką postacią COVID-19 występuje limfopenia, która obejmuje limfocyty Th-CD4+, Tc-CD8+ oraz komórki NK [50].

Poziomy białka CRP, LDH, ferrytyny i IL-6, oznaczone podczas przyjęcia do szpitala, były wyższe u pacjentów, którzy później zmarli niż u tych, którzy wyzdrowieli [51, 52]. Ponadto osoby, które zmarły miały podwyższone markery stanu zapalnego przez cały okres hospitalizacji, a pogorszeniu stanu zdrowia, które poprzedziło zgon, towarzyszyło nasilenie zapalenia [52].

Cechą charakterystyczną zaawansowanej postaci COVID-19 jest głęboka limfopenia [53–55]. W wyniku infekcji SARS-CoV-2 spada liczba limfocytów oraz zmniejsza się ich podatność na czynniki stymulujące odpowiedź immunologiczną. W ciężkich przypadkach COVID-19 odsetek limfocytów spadał poniżej 20% [55]. Bez względu na liczbę limfocytów jest markerem prognostycznym dla ciężkości choroby i śmiertelności, ze znacznym zmniejszeniem obwodowych limfocytów Th-CD4+ i Tc-CD8+ stwierdzonym zarówno w umiarkowanych, jak i ciężkich przypadkach choroby [29, 54, 56]. Liczba limfocytów poniżej 800/ μ L, limfocytów Th-CD4+ <300/ μ L i limfocytów Tc-CD8+ <400/ μ L z dużym prawdopodobieństwem wskazują na to, że w krótkim czasie pacjent umrze. Co więcej, u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 liczba limfocytów T była odwrotnie skorelowana z osoczwymi stężeniami TNF- α , IL-6, IL-10 [57].

Dodatkowo, skład limfocytów T, które przeżyły może zaostrzać stan zapalny w COVID-19. W połączeniu z monocytami wytwarzającymi IL-6 i GM-CSF u pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby stwierdzono zwiększony odsetek limfocytów Th1 CD4+, które produkują IL-6, GM-CSF i IFN- γ . W szczególności pacjenci wymagający przyjęcia na oddział intensywnej terapii mieli znacznie wyższy odsetek komórek Th1 z koekspresją GM-CSF i IFN- γ . Te limfocyty przemieszczają się do płuc i nasilają uszkodzenie tkanki płucnej. Skala wzrostu odsetka neutrofilów w stosunku do limfocytów jest ważnym markerem prognostycznym w przypadkach ciężkiego przebiegu infekcji [15].

We krwi obwodowej pacjentów z COVID-19 stwierdzono znaczną ekspansję monocytów zapalnych. Badania przeprowadzone metodą cytometrii przepływowej pokazały zwiększenie populacji monocytów zapalnych: GM-CSF+CD14+, CD14+CD16+ i IL-6+CD14+. Odsetek monocytów CD14+CD16+ wytwarzających IL-6 był skorelowany z nasileniem objawów choroby [58]. Ponadto, u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 dochodzi do wyczerpania obwodowych komórek NK. Liczba obwodowych komórek NK była

znacznie niższa u pacjentów z ciężką postacią choroby w porównaniu z pacjentami łagodnie przechodzącymi zakażenie SARS-CoV-2 oraz osobami zdrowymi [59].

Ciężkiemu i krytycznemu przebiegowi COVID-19 towarzyszy upośledzona odpowiedź IFN typu I [60]. Wykazano, że produkowane przez koronawirusy białka niestrukturalne (ang. *non-structural proteins*, Nsp) – Nsp1, Nsp3, Nsp12, Nsp13 i Nsp14, białka pomocnicze (Orf3, Orf6 i Orf7a/b) oraz białka strukturalne – błonowe (M) i nukleokapsydu (N) – mogą osłabiać produkcję interferonów oraz blokować szlaki transdukcji sygnału uruchamiane przez te cytokiny [61]. U pacjentów z niskim stężeniem IFN typu I w osoczu diagnozowano wysokie miano wirusa SARS-CoV-2 we krwi, zaostrożoną odpowiedź zapalną i podwyższone poziomy TNF- α i IL-6 [60].

Szybka replikacja wirusa prowadzi do apoptozy i pyroptozy zakażonych komórek. Pyroptoza to niedawno zidentyfikowana zapalna postać zaprogramowanej śmierci komórek [10]. Przypuszcza się, że pyroptoza komórek może uczestniczyć w patomechanizmie burzy cytokinowej wywołanej przez SARS-CoV-2 [62]. Proces pyroptozy inicjują wielobiałkowe kompleksy nazywane inflamasomami, w tym NLRP3 [63–65]. Do aktywacji inflamasomów dochodzi na skutek uwalniania reaktywnych form tlenu lub DNA z uszkodzonych mitochondriów oraz napływu Ca^{2+} i wypływu K^+ przez wiroporyny – specjalne kanały jonowe zbudowane z białek wirusa [62, 66]. Koronawirusy wytwarzają dwa rodzaje wiroporyn: E i 3a. Udo wodniono, że wiroporyna E SARS-CoV-2 działa jako wybiórczy kanał Ca^{2+} i pobudza inflamasom NLRP3 [63]. NLRP3 ulega oligomeryzacji i przez białko adaptorowe ASC łączy się z pro-kaspazą-1, tworząc kompleks wielobiałkowy. Pro-kaspaza-1 ulega przekształceniu do aktywnej kaspazy-1. Kaspaza-1 rekrutuje i rozszczepia gansderminę D (GSDMD) oraz przekształca pro-IL-1 β i pro-IL-18 do aktywnych form interleukin [64]. IL-1 β i IL-18 są uwalniane do środowiska zewnątrzkomórkowego, gdzie rekrutują więcej komórek zapalnych; dochodzi do rozszerzania odpowiedzi zapalnej [10]. Wzrost stężenia IL-1 β w surowicy pacjentów z COVID-19 może wskazywać na pyroptozę komórek. Aktywny N-końcowy fragment GSDMD wbudowuje się do błony komórkowej tworząc pory. Dochodzi do obrzęku i lizy komórek, po czym następuje uwolnienie na zewnątrz macierzy komórkowej i cytokin [67].

Obecnie nie dysponujemy ujednoliconym standardem diagnostyki zespołu burzy cytokinowej (CSS) związanej z COVID-19. Niewątpliwie do opracowania takiego standardu potrzebne są dalsze badania kliniczne i laboratoryjne.

W swojej najnowszej pracy Gao i wsp. [34] zaproponowali wykorzystanie następujących objawów/parametrów w diagnostyce CSS:

- nagła lub szybka progresja choroby obejmująca wiele narządów (w tym uszkodzenie serca, wątroby lub nerek);
- znaczący spadek liczby limfocytów we krwi obwodowej;
- znaczne podwyższenie wskaźników stanu zapalnego, takich jak stężenie CRP i ferrytyny w surowicy oraz odczyn Biernackiego;
- podwyższenie poziomu różnych cytokin i chemokin, w tym przede wszystkim: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , CXCL10, CCL2 i CCL3.

Ponieważ CSS jest wysoce heterogennym zespołem chorobowym i może dawać nietypowe objawy, opracowanie specjalnego testu diagnostycznego, który byłby pomocny we wczesnym rozpoznawaniu CSS należy uznać za priorytet.

Piśmiennictwo

1. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449: 819–826. doi: 10.1038/nature0624.
2. Amor S, Fernández Blanco L, Baker D. Innate immunity during SARS-CoV-2: evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. *Clin Exp Immunol.* 2020; 202(2): 193–209. doi: 10.1111/cei.13523.
3. Kell AM, Gale MJ Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* 2015; 479–480: 110–121. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.01.
4. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 826–837. doi: 10.1038/nri2873.
5. Jefferies CA. Regulating IRFs in IFN Driven Disease. *Front Immunol.* 2019; 10: 325. doi: 10.3389/fimmu.2019.00325.
6. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 cytokine storm; What we know so far. *Front Immunol.* 2020; 11: 1446. doi: 10.3389/fimmu.2020.01446.
7. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps – the dark side of neutrophils. *J Clin Invest.* 2016; 126(5): 1612–1620. doi: 10.1172/JCI84538.
8. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* 2019; 50(4): 907–923. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.025.
9. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4): 778–809. doi: 10.1128/CMR.14.4.778–809.2001.
10. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev.* 2017; 277(1): 61–75. doi: 10.1111/immr.12534.
11. Allegra A, Di Gioacchino M, Tonacci A, Musolino C, Gangemi S. Immunopathology of SARS-CoV-2 Infection: Immune Cells and Mediators, Prognostic Factors, and Immune-Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(13): 4782. doi: 10.3390/ijms2113478.
12. Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K, Shi Y. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology* 2020; 160(3): 261–268. doi: 10.1111/imm.13223.
13. Bordallo B, Bellas M, Cortez AF, Vieira M, Pinheiro M. Severe COVID-19: what have we learned with the immunopathogenesis? *Adv Rheumatol.* 2020; 60(1): 50. doi: 10.1186/s42358-020-00151-7.
14. Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni C. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1): 84. doi: 10.1038/s41392-020-0191-1.
15. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hedge S, Kim J, Kuksin M. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* 2020; 52(6): 910–941. doi: 10.1016/j.immuni.2020.05.00.
16. Carsetti R, Zaffina S, Mortari EP, Terreri S, Corrente F, Capponi C, et al. Spectrum of innate and adaptive immune response to SARS CoV 2 infection across asymptomatic, mild and severe cases; a longitudinal cohort study. *medRxiv.* 2020; doi: 10.1101/2020.06.22.20137141.
17. Chen Z, Werry JE. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20: 529–536. doi: 10.1038/s41577-020-0402-6.
18. Dhochak N, Singhal T, Kabra SK, Lodha R. Pathophysiology of COVID-19: Why Children Fare Better than Adults? *Indian J Pediatr.* 2020; 87(7): 537–546. doi: 10.1007/s12098-020-03322-y.
19. Felsenstein S, Hedrich CM. SARS-CoV-2 infections in children and young people. *Clin Immunol.* 2020; 220: 108588. doi: 10.1016/j.clim.2020.108588.
20. Garcia LF. Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. *Front Immunol.* 2020; 11: 1441. doi: 10.3389/fimmu.2020.01441.
21. Chen Y, Klein SL, Garibaldi BT, Li H, Wu C, Osevala NM et al. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. *Ageing Res Rev.* 2021; 65: 101205. doi: 10.1016/j.arr.2020.101205.
22. Pietrobon AJ, Teixeira FME, Sato MN. Immunosenescence and Inflammaging: Risk Factors of Severe COVID-19 in Older People. *Front Immunol.* 2020; 11: 579220. doi: 10.3389/fimmu.2020.579220.
23. Michalakis K, Ilias I. SARS-CoV-2 infection and obesity: Common inflammatory and metabolic aspects. *Diabetes Metab Syndr.* 2020; 14(4): 469–471. doi: 10.1016/j.dsx.2020.04.033.
24. Higham A, Mathioudakis A, Vestbo J, Singh D. COVID-19 and COPD: a narrative review of the basic science and clinical outcomes. *Eur Respir Rev.* 2020; 29(158): 200199. doi: 10.1183/16000617.0199-2020.
25. Bösmüller H, Matter M, Fend F, Tzankov A. The pulmonary pathology of COVID-19. *Virchows Arch.* 2021; 19: 1–14. doi: 10.1007/s00428-021-03053-1.
26. Solerte SB, Di Sabatino A, Galli M., Fiorina P. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibition in COVID-19. *Acta Diabetol.* 2020; 57: 779–783. doi: 10.1007/s00592-020-01539-z.
27. Krejner-Bienias A, Grzela K, Grzela T. DPP4 Inhibitors and COVID-19-Holy Grail or Another Dead End? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2021; 69(1): 1. doi: 10.1007/s00005-020-00602-5.
28. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020; 130(5): 2620–2629. doi: 10.1172/JCI137244.
29. Huang C, Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 10223: 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
30. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5(1): 18. doi: 10.1038/s41572-019-0069-0.
31. Kuppalli K, Rasmussen AL. A glimpse into the eye of the COVID-19 cytokine storm. *EBioMedicine* 2020; 55: 102789. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102789.
32. Song P, Li W, Xie J, Hou Y, You C. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. *Clin Chim Acta* 2020; 509: 280–287. doi: 10.1016/j.cca.2020.06.017.
33. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012; 76(1): 16–32. doi: 10.1128/MMBR.05015-1.
34. Gao YM, Xu G, Wang B, Liu BC. Cytokine storm syndrome in coronavirus disease 2019: A narrative review. *J Intern Med.* 2021; 289(2): 147–161. doi: 10.1111/joim.13144.
35. Shimizu M. Clinical features of cytokine storm syndrome. W: Cron R, Behrens E. (Red.). *Cytokine Storm Syndrome.* Cham: Springer (2019); 31–42. doi: 10.1007/978-3-030-22094-5_3.
36. Melenotte C, Silvin A, Goubet AG, Lahmar I, Dubuisson A, Zumla A, et al. Immune responses during COVID-19 infection. *Oncoimmunology* 2020; 9(1): 1807836. doi: 10.1080/2162402X.2020.1807836.
37. Toor SM, Saleh R, Sasidharan Nair V, Taha RZ, Elkord E. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology* 2021; 162(1): 30–43. doi: 10.1111/imm.1326.
38. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* 2021; S0092-8674(21)00007-6. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
39. Cicco S, Cicco G, Racanelli V, Vacca A. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs): Two Potential Targets for COVID-19 Treatment. *Mediators Inflamm.* 2020; 2020: 7527953. doi: 10.1155/2020/7527953.
40. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy* 2016; 8: 959–970. doi: 10.2217/imt-2016-0020.
41. Chi Y, Ge Y, Wu B, Zhang W, Wu T, Wen T, et al. Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus

- Disease 2019 in China. *J Infect Dis.* 2020; 222(5): 746–754. doi: 10.1093/infdis/jiaa363.
42. Liu QQ, Cheng A, Wang Y, Li H, Hu L, Zhao X, Wang T, He F. Cytokines and their relationship with the severity and prognosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a retrospective cohort study. *BMJ Open* 2020; 10(11): e041471. doi: 10.1136/bmjopen-2020-041471.
43. Bryce C, Grimes Z, Pujadas E, Ahuja S, Beasley MB, Albrecht R. Pathophysiology of SARS-CoV-2: targeting of endothelial cells renders a complex disease with thrombotic microangiopathy and aberrant immune response. The Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. *medRxiv.* 2020. doi: 10.1016/2020.05.18.20099960.
44. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(8): 1937–1942. doi: 10.1093/cid/ciaa449.
45. Gustine JN, Jones D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *Am J Pathol.* 2021; 191(1): 4–17. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.08.009.
46. Zarrilli G, Angerilli V, Businello G, Sbaraglia M, Traverso G, Fortarezza F. The Immunopathological and Histological Landscape of COVID-19-Mediated Lung Injury. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(2): 974. doi: 10.3390/ijms22020974.
47. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20: 1135–1140. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30434-5.
48. Fox SE, Akmatbekov A, Harbert JL, Li G, Quincy Brown J, Vander Heide RS. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *Lancet Respir Med.* 2020; 8: 681–686. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30243-5.
49. Henry BM, De Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematology, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a metaanalysis. *Clin Chem Lab Med.* 2020; 58(7): 1021–1028. doi: 10.1515/cclm-2020-0369.
50. Fathi N, Rezaei N. Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities. *Cell Biol Int.* 2020; 44(9): 1792–1797. doi: 10.1002/cbin.11403.
51. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020; 46: 846–848. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x.
52. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020; 395: 1054–1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
53. Zhao Q, Meng M, Kumar R, Wu Y, Huang J, Deng Y, et al. Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: a systemic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020; 96: 131–135. doi: 10.1016/j.ijid.2020.04.086.
54. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, Xu Y, Tian Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020; 17: 533–535. doi: 10.1038/s41423-020-0402-2.
55. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1): 33. doi: 10.1038/s41392-020-0148-4.
56. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(6): 992–1000.e3. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.009.
57. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 2020; 11: 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
58. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev.* 2020; 7: 998–1002. doi: 10.1093/nsr/nwaa041.
59. Li M, Guo W, Dong Y, Wang X, Dai D, Liu X, et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8(+) T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front Immunol.* 2020; 11: 580237. doi: 10.3389/fimmu.2020.580237.
60. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 2020; eabc6027. doi:10.1126/science.abc6027.
61. Suryawanshi RK, Koganti R, Agelidis A, Patil CD, Shukla D. Dysregulation of Cell Signaling by SARS-CoV-2. *Trends Microbiol.* 2021; 29(3): 224–237. doi: 10.1016/j.tim.2020.12.007.
62. Yang M. Cell Pyroptosis, a Potential Pathogenic Mechanism of 2019-nCoV Infection. *SSRN* 2020. doi: 10.2139/ssrn.3527420.
63. Chen IY, Moriyama M, Chang MF, Ichinohe T. Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Front Microbiol.* 2019; 10: 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2019.00050.
64. Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19(8): 477–489. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0.
65. Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome – A Key Player in Antiviral Responses. *Front Immunol.* 2020; 11: 211. doi: 10.3389/fimmu.2020.00211.
66. Farag NS, Breiting U, Breiting HG, El Azizi MA. Viroporins and inflammasomes: a key to understand virus-induced inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2020; 122: 105738. doi: 10.1016/j.biocel.2020.105738.
67. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; 526(7575): 660–665. doi: 10.1038/nature15514.