

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗ ΚΑΤΑ SARS-CoV-2

Γεώργιος Κ. Παπαδόπουλος, Ph.D.

Καθηγητής (συνταξιούχος) Γεωργικής Χημείας και Φυσικής

Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων

ΤΕΙ Ηπείρου, Άρτα*

* Η διεύθυνση δίνεται αποκλειστικά για σκοπούς ταυτοποίησης. Από 1/10/2018 το ΤΕΙ Ηπείρου έχει απορροφηθεί από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων και το συγκεκριμένο τμήμα μετονομάστηκε σε Τμήμα Γεωπονίας

Δήλωση Σύγκρουσης Συμφερόντων

- Δεν υπάρχει καμία σύγκρουση συμφερόντων για τον παρουσιαστή της συγκεκριμένης ομιλίας.

Δήλωση ευγνωμοσύνης

- Προς όλους μας που τα πήγαμε τόσο καλά ως χώρα.
- Τα δύσκολα είναι μπροστά μας. Ας συνεχίσουμε να είμαστε στο ύψος των περιστάσεων, χωρίς να χάνουμε καθόλου την τάση μας για καλόπιστη κριτική.
- Ένα μεγάλο ευχαριστώ προς όλους τους συναδέλφους παγκοσμίως, που μας έδωσαν πολύτιμη γνώση, κάτω από πολύ δύσκολες συνθήκες. Οι παρατηρήσεις είναι για τη βελτίωση όλων μας.

Γενικό χαρακτηριστικό όλων των μελετών με ασθενείς που έχουν λοίμωξη από SARS-CoV-2

- Σταδιοποίηση(ποιήσεις;) των ασθενών ποικίλλει (αναγκαίο κακό!!)
- Βολικά η ημέρα 0 θεωρείται η ημέρα εισαγωγής σε νοσοκομείο. *Η πανδημία καθορίζει της επιλογές μας, και πρώτη επιλογή είναι να περιοριστεί η μετάδοση και να σωθούν οι ζωές των ασθενών.*
- Παρ' όλα αυτά η ανομοιογένεια μεγάλη, όπως θα φανεί στη παρουσίαση
- Ανάγκη μέσα από συγκεκριμένες κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους να γίνουν κατηγοριοποιήσεις που θα επιτρέψουν την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών παθογένεσης

Τί χαρακτηριστικά έχει ο ιός;

- Φαινομενικά υψηλή μολυσματικότητα
- Εξηγείται εν μέρει από την μεγάλη συγγένεια της ακιδοπρωτεΐνης (S) για τον κυτταρικό υποδοχέα της, το μετατρεπτικό ένζυμο 2 της αγγειοτασίνης (ACE2), μια ψευδαργυρο-εξαρτώμενη καρβοξυπεπτιδάση (αντίρροπη δράση προς αυτήν ρενίνης-αγγειοτασίνης), που επίσης απαιτεί ιόν χλωρίου
- Καθοριστική για τη μολυσματικότητα του ιού είναι η πρωτεολυτική διάσπαση (μέσω TMPRSS-2 ή φουρίνης) της S σε θραύσματα S1 και S2.
- S1: παραμένει προσκολλημένο στην ACE2
- S2: προάγει την σύντηξη του ιού με το κύτταρο-ξενιστή
- Η ενδοκυττάρωση του ιού χωρίς σύντηξη (δηλ. προγενέστερη διάσπαση σε S1 και S2) είναι περ. 100 φορές λιγότερο αποτελεσματική
- **Εντυπωσιακή η επιστημονική γνώση σε μικρό διάστημα, ελεύθερη πρόσβαση στις δημοσιευμένες εργασίες**

Κύτταρα-ξενιστές του ιού

- Προφανώς όσα εκφράζουν ACE2 και TMPRSS-2/φουρίνη
- Πολλά κύτταρα της αναπνευστικής οδού (πνευμονοκύτταρα, ενδοθηλιακά)
- Μία μόνον αναφορά για έκφραση ACE2 σε μονοκύτταρα CD14++CD16- (M. [Rutkowska-Zapala](#) et al. *Clin Exp Immunol.* **181**, 126-132, (2015)). Σε πολύ μικρότερο βαθμό σε λεμφοκύτταρα. Ο ιός έχει ανιχνευθεί σε μολυσμένα λεμφοκύτταρα T σε μία περίπτωση (X. Wang et al. *Cell & Mol Immunology*, in press <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0424-9>).
- Ανυπαρξία μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά sACE2 για κυτταρομετρία ροής!!

Γιατί δεν είναι εύκολο να μάθουμε πολύ περισσότερα για την ανοσοπαθολογία του ιού;

- Δεν είναι συνετό να γίνονται νεκροψίες ή να παίρνεται υλικό για βιοψίες
- Όποτε έχουν γίνει έχει καταδειχθεί ότι ο ιός εισβάλλει και στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων (Z. Varga, et al. *Lancet*. **292**, 1417-1418, (2020)).
- Συνεπώς, οι μικροβιολογικές/βιοχημικές αναλύσεις αίματος και η κυτταρομετρία ροής μπορεί να αποδειχθούν πολύτιμες στην αντιμετώπιση των βαρέως πασχόντων

Τί έχει δείξει μέχρι τώρα η κυτταρομετρία ροής για τη λοίμωξη από SARS-CoV-2, ιδιαίτερα στις σοβαρές/κρίσιμες περιπτώσεις

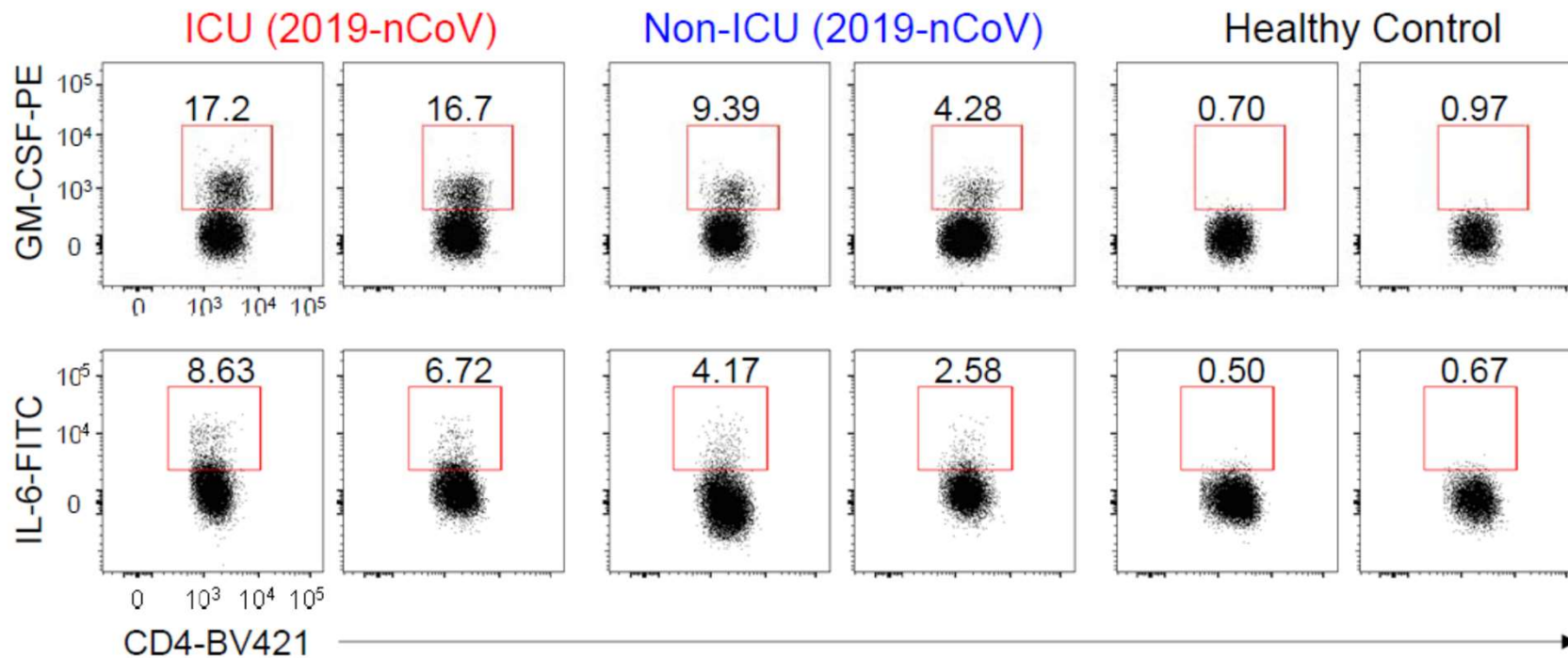
- Λευκοκυττάρωση (κυρίως στα ουδετερόφιλα) και παράλληλη μείωση κατ' απόλυτο αριθμό των λεμφοκυττάρων
- Ανάλογα με την μελέτη, η μείωση των λεμφοκυττάρων μπορεί να αφορά τα CD4+ μόνον (ενδεχόμενα και τα CD4+ Τρυθμ) ή και CD8+ λεμφοκύτταρα Τ, μονοκύτταρα, ορισμένες φορές και λεμφοκύτταρα Β και φυσικά φονικά κύτταρα (NK)
- Η μείωση μπορεί να είναι δραματική, κατ' απόλυτο αριθμό (π.χ. $< 100/\mu\text{L}$, στα CD8+/CD28+ (κλασσικά κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα Τ, τα κατ' εξοχήν τελικά δραστικά κύτταρα εναντίον μολυσμένων κυττάρων του ξενιστή))
- Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει αύξηση του ποσοστού των CD4+ και CD8+ λεμφοκυττάρων Τ τα οποία εκφράζουν HLA-DR (δείκτης ενεργοποίησης;).
- Σε αρκετές περιπτώσεις έχει εμφανιστεί σύνδρομο καταιγίδας κυτοκινών, στο οποίο τεκμηριώθηκε με ΚΡ ενδοκυττάρια παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Θεραπευτική παρέμβαση με Tocilizumab R (μονοκλωνικό κατά IL-6Rα) (μονοκεντρικές μελέτες, γίνονται και πολυκεντρικές)

Καταιγίδα κυτοκινών και Τρυθμ

- Τα CD4⁺ Τρυθμ (ενεργά, CD25^{high}CD45RA⁻FoxP3^{high}, και παρθένα CD25^{int}CD45RA⁺FoxP3^{low}) στους πολύ σοβαρώς νοσούντες προφανώς αδυνατούν να ελέγξουν το φαινόμενο της καταιγίδας κυτοκινών. Άγνωστος ο λόγος. Συμβατό με το συμπέρασμα αυτό το γεγονός ότι εμφανίζονται μειωμένα (**Προσοχή!** το κριτήριο CD25^{high}CD127^{-/low}FoxP3^{high} είναι προβληματικό (Petsiou M. et al. *Cytometry B*, in press)).

Αδόκιμη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών σε ασθενείς με λοίμωξη SARS-CoV-2
Ασθενείς εντός ΜΕΘ, σε σύγκριση με εκτός ΜΕΘ και με υγιείς μάρτυρες A1.

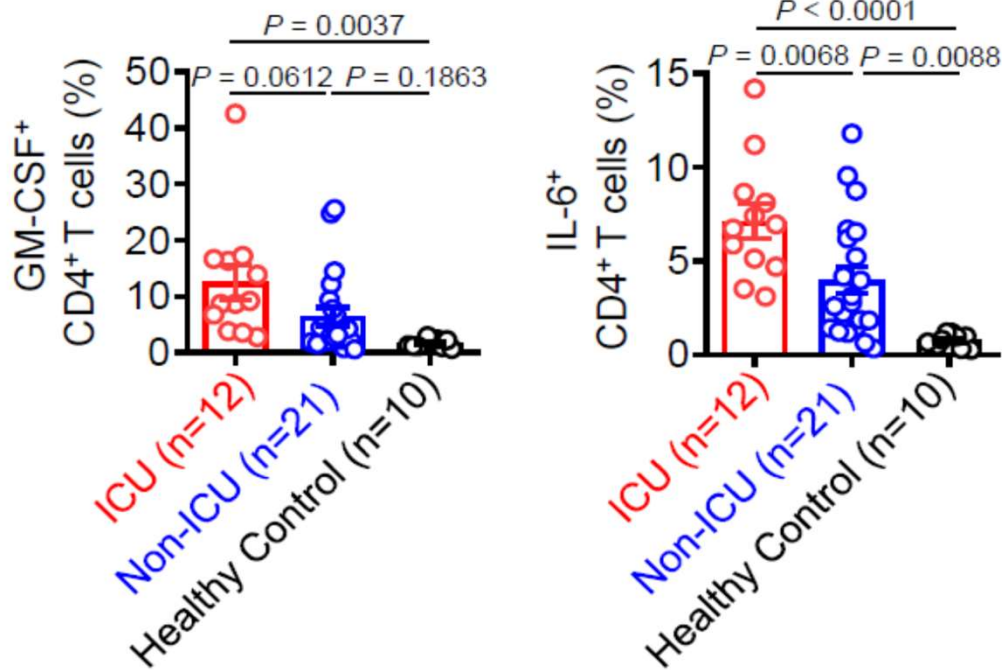
a



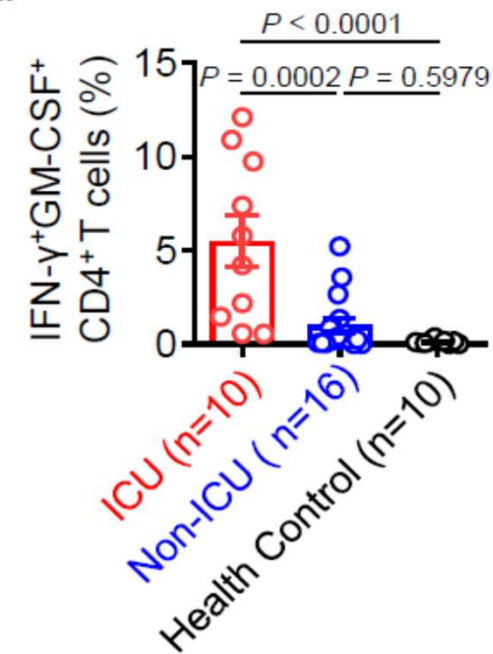
Από Y. Zhou et al. BioRxiv . Προσοχή!! Η παραγωγή κυτοκινών ήταν τόσο μεγάλη από κάθε κύτταρο ώστε δεν χρειάστηκε η συνήθης 4-ωρη προεπώαση των κυττάρων με διεγέρτη της παραγωγής και αναστολέα της έκκρισης κυτοκινών!!!

Αδόκιμη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών σε ασθενείς με λοίμωξη SARS-CoV-2
Ασθενείς εντός ΜΕΘ σε σύγκριση με εκτός ΜΕΘ και με υγιείς μάρτυρες A2.

c

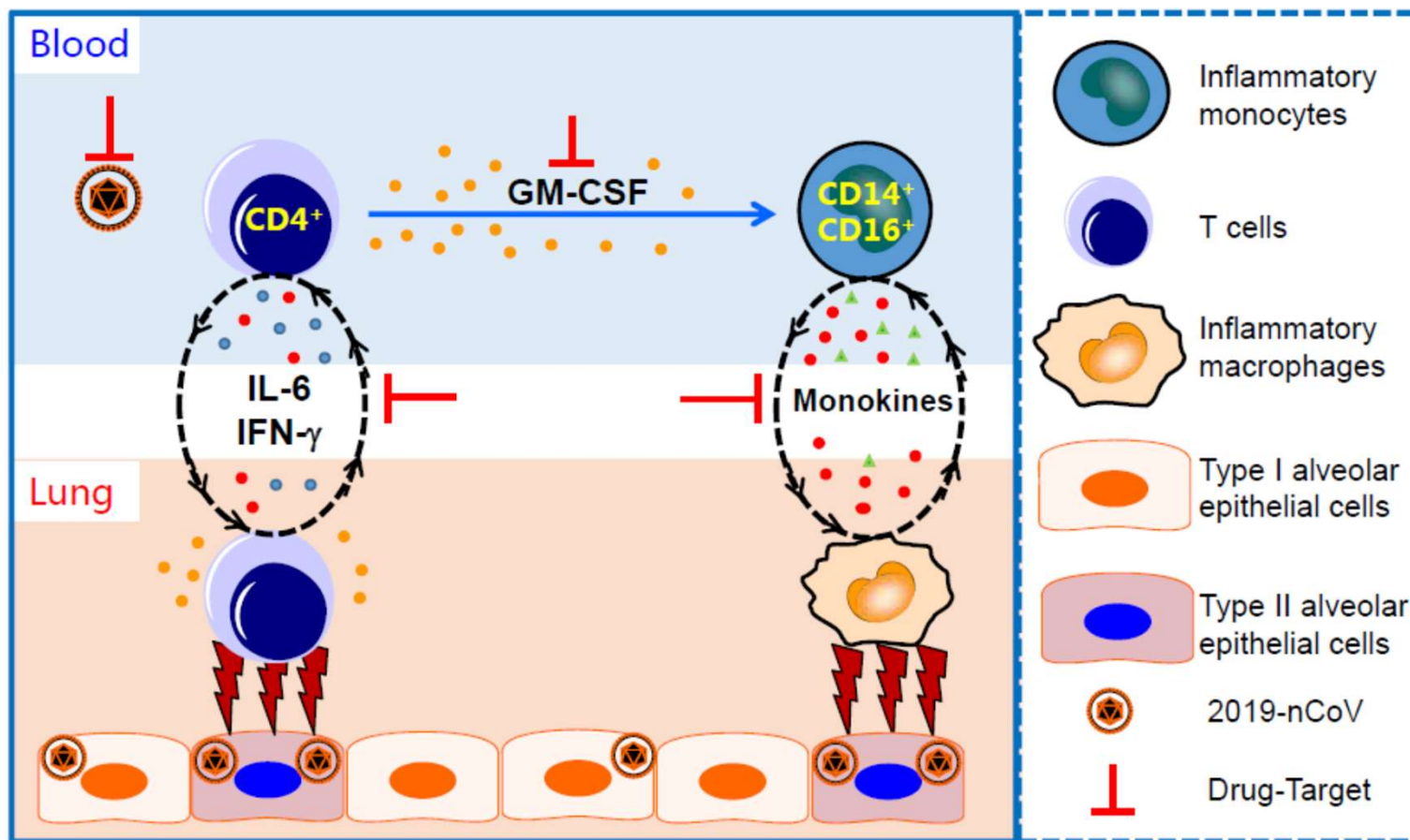


d



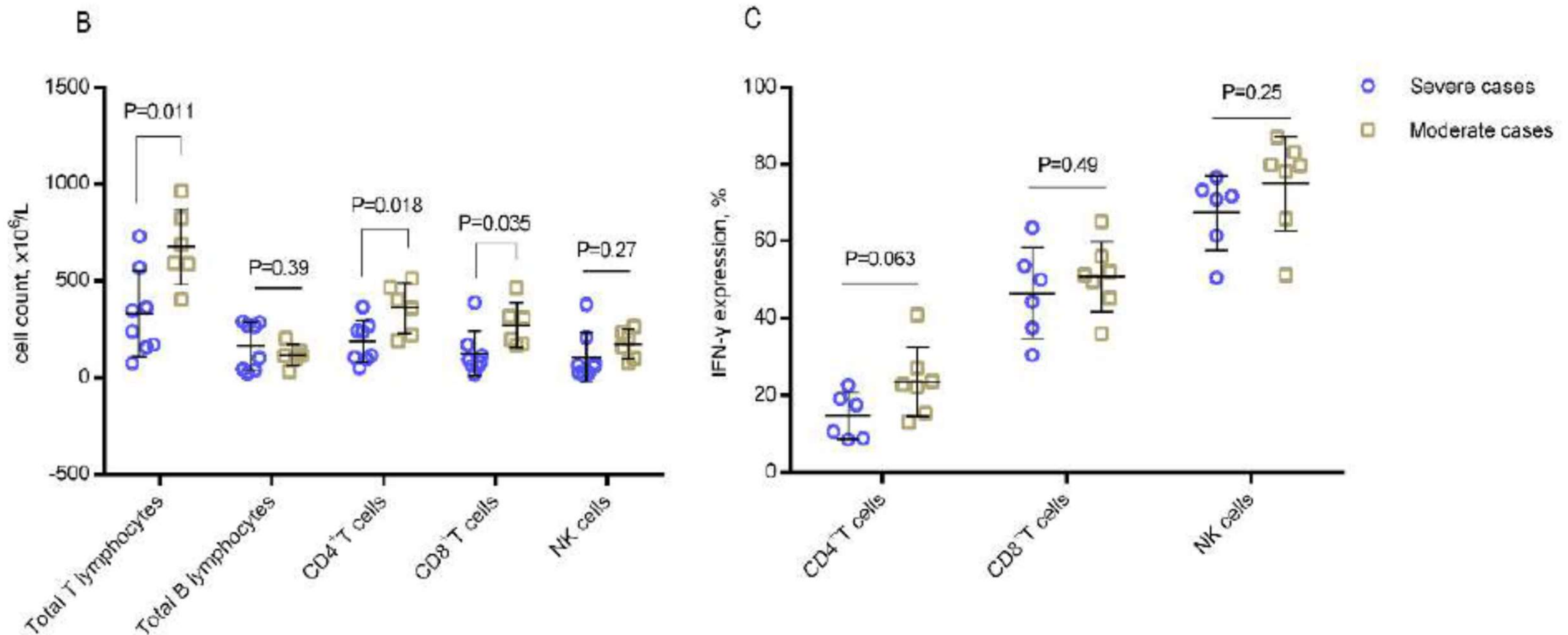
Από Y. Zhou et al. BioRxiv. **Προσοχή!!** Η παραγωγή κυτοκινών από κάθε κύτταρο ήταν τόσο μεγάλη ώστε δεν χρειάστηκε η συνήθης 4-ωρη προεπώαση των κυττάρων με διεγέρτη της παραγωγής και αναστολέα της έκκρισης κυτοκινών!!! Παραγωγή TNFα όχι στατιστικώς σημαντική.

Πιθανός μηχανισμός αδόκιμης παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών σε ασθενείς με λοίμωξη SARS-CoV-2



Από Y. Zhou et al. BioRxiv. **Προσοχή!!** Δεν λαμβάνουν υπ' όψη πιθανή λοίμωξη του ενδοθηλίου. Επίσης, σε πρωτογενείς καλλιέργειες βρογχοκυττάρων έχει φανεί ότι η λοίμωξη από τον SARS-CoV-2 μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή IL-6!! (tenOevre et al, Cell in press)

Αδόκιμη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών σε ασθενείς με λοίμωξη SARS-CoV-2 Ήπιες προς πολύ σοβαρές περιπτώσεις. B1



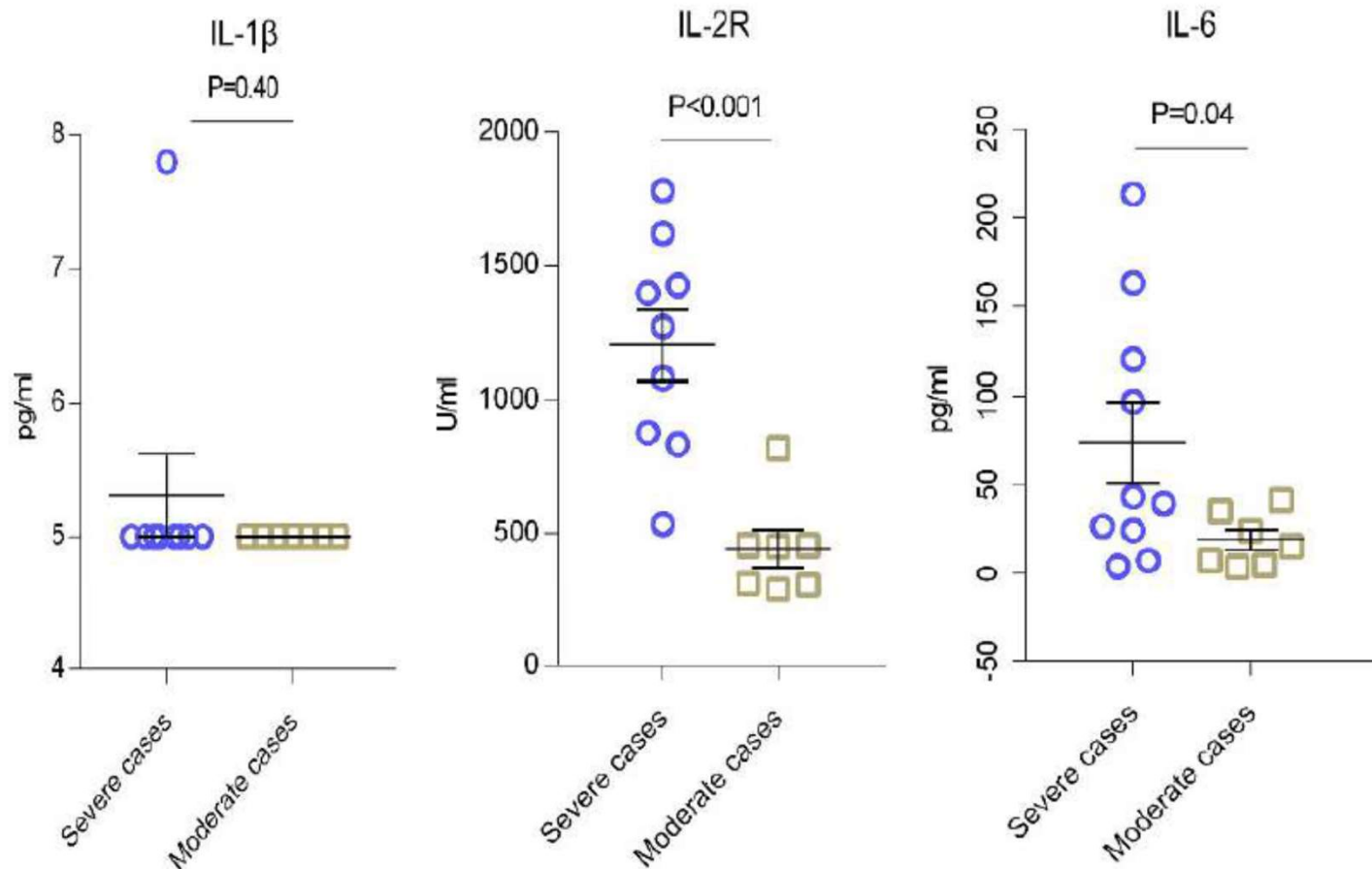
Από: Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2620-2629. doi:10.1172/JCI137244.

Αδόκιμη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών σε ασθενείς με λοίμωξη SARS-CoV-2 Ήπιες προς πολύ σοβαρές περιπτώσεις B2.

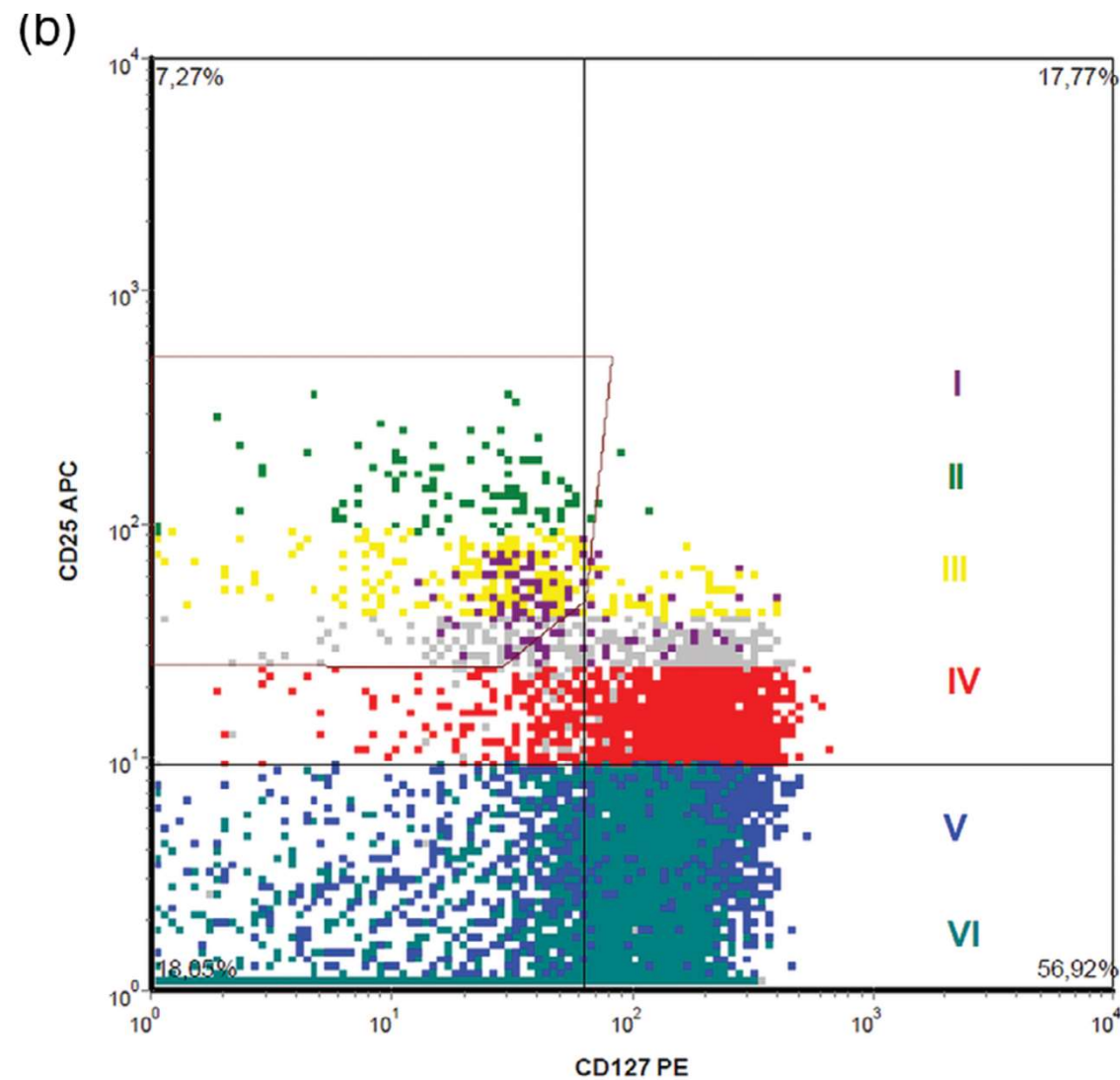
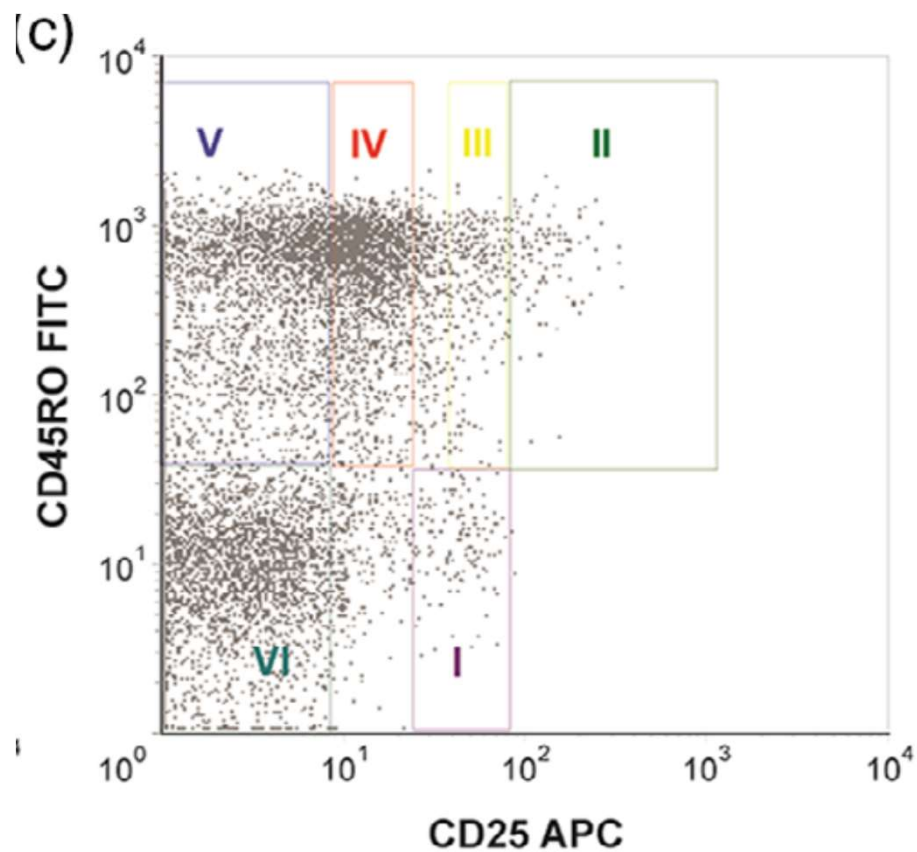
IL-6Rα(CD130)--gp130
 K_d για IL-6 = 10 pM ~ **237 pg/mL**

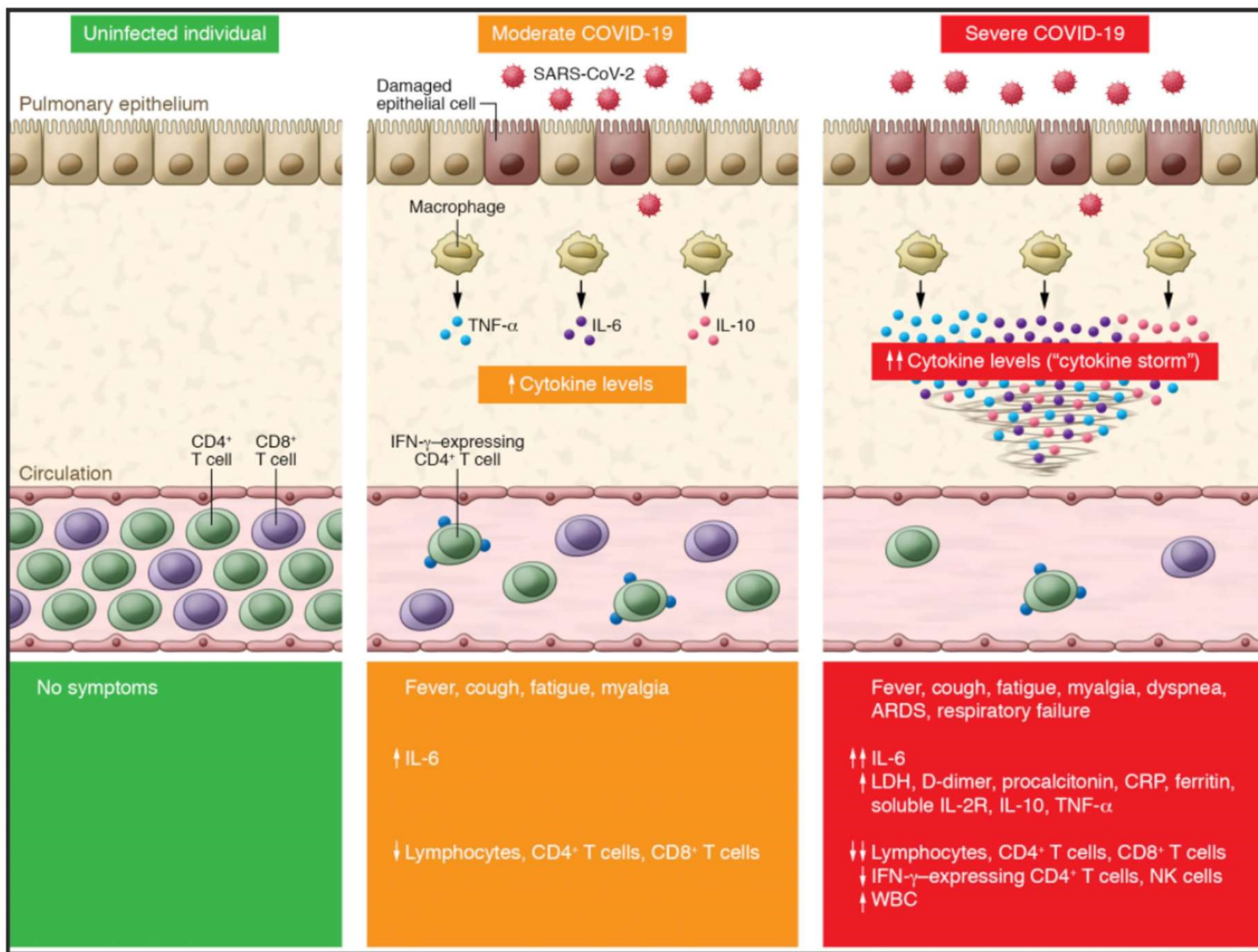
**Αυτό είναι απατηλό! Υπάρχει
Και διαλυτή μορφή του IL-6Rα
όπως και της gp130, οπότε η
συγκέντρωση της ελεύθερης
IL-6 είναι ενδεχόμενα η μισή
αλήθεια.**

Από: Chen G, Wu D, Guo W, 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



Απλός τρόπος χαρακτηρισμού-οριοθέτησης παρθένων και δραστικών Τρυθμ, Petsiou et al. Cytometry B, in press





Πιθανός μηχανισμός καταιγίδας κυτοκινών, SF Pedersen & Y-C Ho *J Clin Invest*, 2020.

<https://jci.me/137647/pdf>

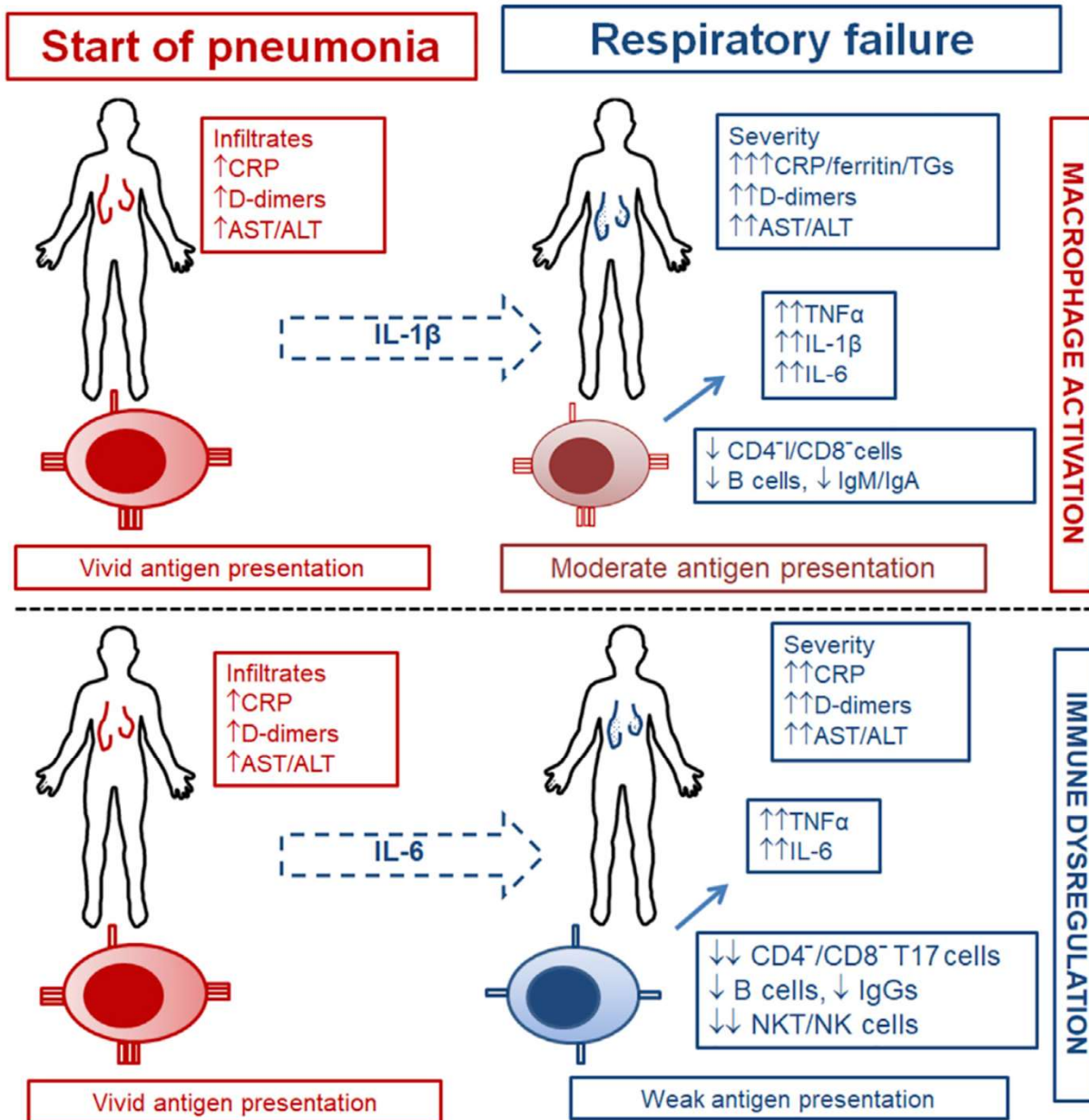
Στις ήπιες περιπτώσεις τα κυτταροτοξικά CD8⁺ λεμφοκύτταρα T λογικά είναι σε θέση να σκοτώσουν τα μολυσμένα από τον ιό επιθηλιακά κύτταρα.

Προσοχή!! Ούτε εδώ έχει ληφθεί υπ' όψιν η πιθανή συμμετοχή του ενδοθηλίου

Η πρώτη δημοσιευμένη μελέτη από την Ελλάδα που χρησιμοποιεί εκτεταμένα κυτταρομετρία ροής

- Προσπαθεί να ενσωματώσει βιοχημικά, μικροβιολογικά και κυτταρομετρικά δεδομένα σε ένα μοντέλο 4 σταδίων της σοβαρώς εξελισσόμενης νόσου
- Βρίσκει μείωση κατ' απόλυτο αριθμό CD4+, CD8+ λεμφοκυττάρων T από το 2^ο στάδιο και μετά
- Βρίσκει μεγάλη μείωση του αριθμού μορίων HLA-DR ανά κυκλοφορούν μακροφάγο. *Αν ισχύει και στον χώρο της ιστικής βλάβης, και αφορά και τα λεμφοκύτταρα B και τα δένδριτικά κύτταρα, ουσιαστικά δείχνει μια από της αιτίες της ανοσοανεπάρκειας στις πολύ σοβαρές περιπτώσεις*
- *Η χρήση Tocilizumab R αποδείχθηκε επιτυχής*

Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure [published online ahead of print, 2020 Apr 17]. *Cell Host Microbe*. 2020;S1931-3128(20)30236-5.



Στάδια της σοβαρώς εξελισσόμενης νόσου

MAS: macrophage activation syndrome

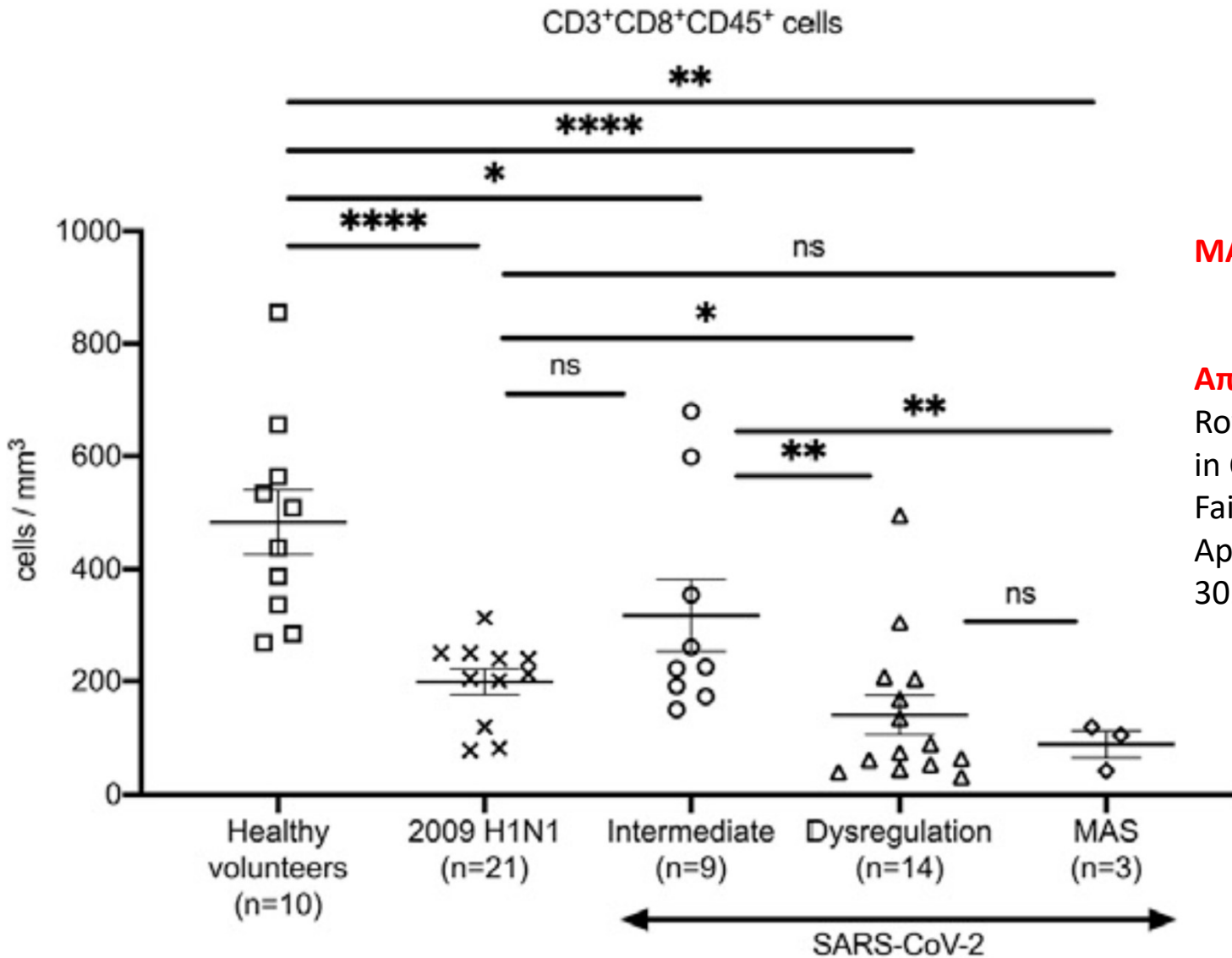
Από: Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19

Patients with Severe Respiratory Failure [published online ahead of print, 2020 Apr 17]. *Cell Host Microbe*. 2020;S1931-3128(20)30236-5.

cells / mm³

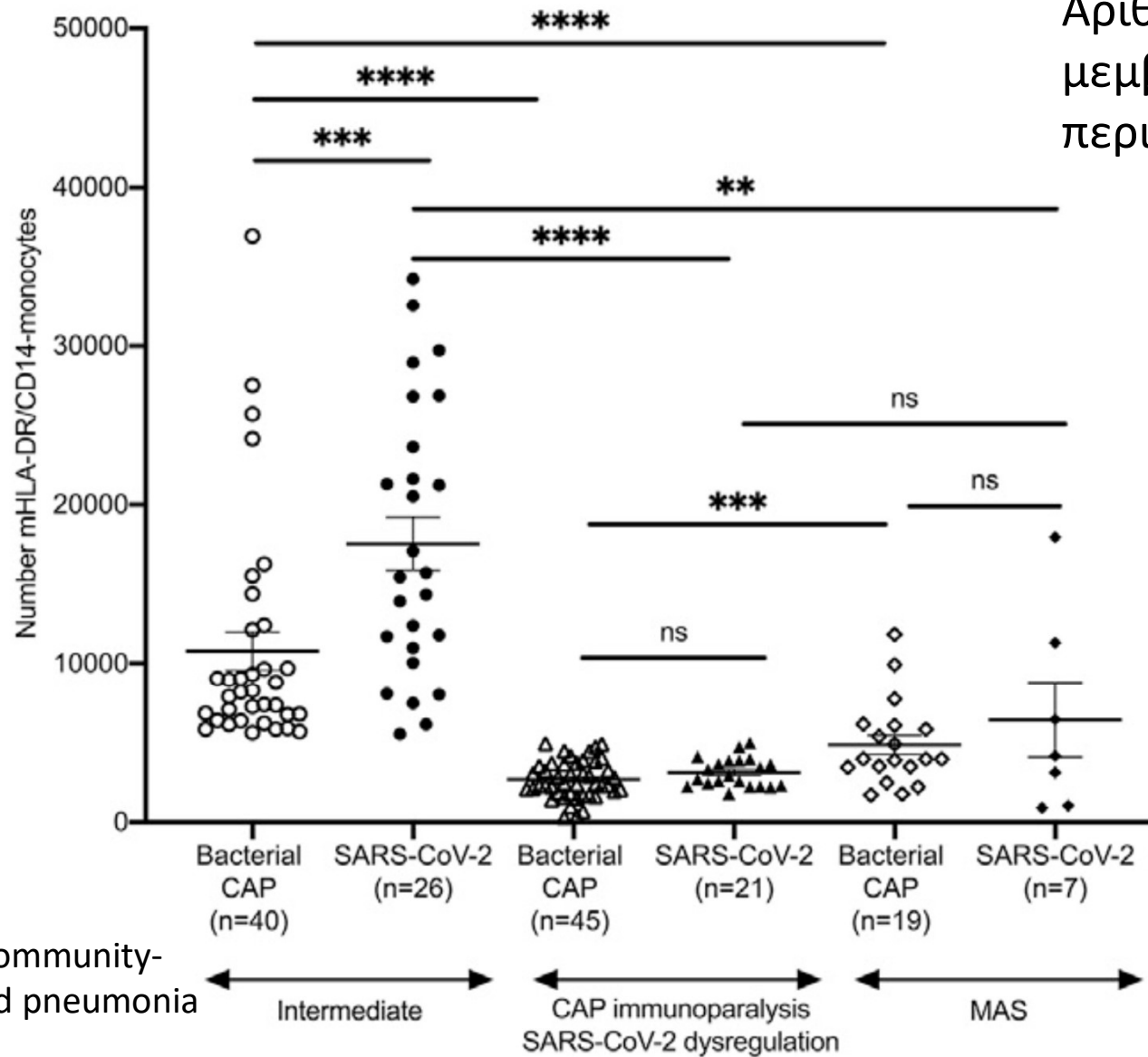
Από: Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure [published online ahead of print, 2020 Apr 17]. *Cell Host Microbe*. 2020;S1931-3128 (20)30236-5.

B



MAS: macrophage activation syndrome

Από: Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure [published online ahead of print, 2020 Apr 17]. *Cell Host Microbe*. 2020;S1931-3128(20)30236-5.

A

Αριθμός μορίων HLA-DR στην κυτταρική
μεμβράνη CD14⁺ μονοκυττάρων
περιφερικού αίματος

**MAS: macrophage activation
syndrome**

Από: Giamarellos-Bourboulis EJ,
Netea MG, Rovina N, et al.
Complex Immune Dysregulation in
COVID-19 Patients with Severe
Respiratory Failure [published
online ahead of print, 2020 Apr
17]. *Cell Host Microbe*.
2020;S1931-3128(20)30236-5.

Ελάχιστα κοινά χαρακτηριστικά σοβαρής νόσου

- Μείωση κατ' απόλυτο αριθμό των κυττάρων που θα καταπολεμήσουν τον ιό: CD8+ T (εναντίον των μολυσμένων κυττάρων), CD4+ T (βοήθεια και προς CD8+ λεμφοκύτταρα T και προς λεμφοκύτταρα B (για παραγωγή αντισωμάτων)
- Εμφάνιση μονοκυττάρων/μακροφάγων με μεγάλη περιεκτικότητα σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-6, GM-CSF, IFN-γ) που μπορεί να οδηγήσουν σε καταιγίδα κυτοκινών
- Σε τεκμηριωμένες περιπτώσεις του δεύτερου, η παρέμβαση με α-IL-6R Ab (π.χ. Tocilizumab R) φαίνεται να βοήθησε (μία μελέτη 21 ατόμων, αναμένονται τα αποτελέσματα πολυκεντρικών μελετών)

Ευχαριστώ για την προσοχή σας

- Θα προσπαθήσω να απαντήσω τις ερωτήσεις σας