


# Fenotypizácia bunkových populácií u pacientov s COVID-19

**Martina Barnová, Anna Bobčáková, Danka Slováková,  
Tatiana Košarišťanová, Jela Petrisková, Miloš Jeseňák**

Oddelenie klinickej imunológie a alergológie  
Univerzitná nemocnica Martin

*XX. Martinské dni imunológie 27. - 29. apríl 2022*



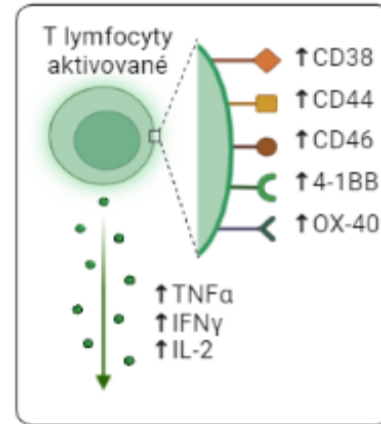
# Vyhlásenie o konflikte záujmov

- Nemám potenciálny konflikt záujmov

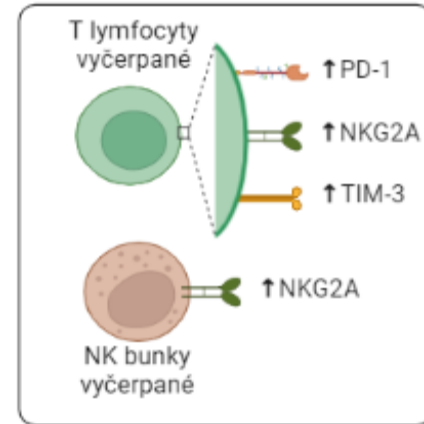
# Imunitný systém a COVID-19

- **Imunitný systém je prísne regulovaný aktivitou stimulačných a inhibičných imunitných receptorov.**
- **Koinhibičné a kostimulačné imunitné kontrolné receptory sú potrebné pre plnú aktiváciu T lymfocytov a ich efektorových funkcií ako je produkcia cytokínov.**
- **Počas chronických infekcií, dochádza k zmenám v narušení imunitnej homeostázy, vrátane up-regulácie inhibičných receptorov, ktoré negatívne ovplyvňujú funkčný a proliferačný potenciál T lymfocytovej odpovede.**
- **Pri akútnej infekcii up-regulácia inhibičných receptorov nemusí negatívne ovplyvňovať funkčnosť T lymfocytov.**

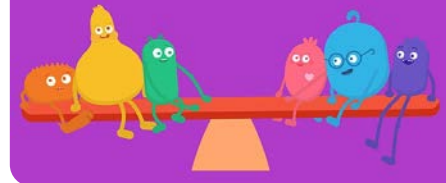
## Aktivácia T lymfocytov



## Vyčerpanie T lymfocytov a NK buniek



BALANCE IS IMPORTANT

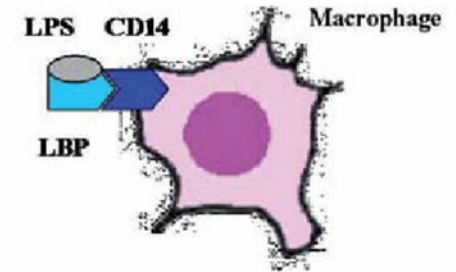


# CD14/HLA-DR (aktivované monocyty)

## Medicínsky význam:

CD14 - koreceptor charakteristický pre monocyty

- Súčasť nešpecifickej imunity
- Schopnosť fagocytózy
- **Fyziologické zastúpenie v krvi: 0-10% z leukocytov**
- **Na svojom povrchu exprimuje HLA-DR**



## Infekcie a COVID-19:

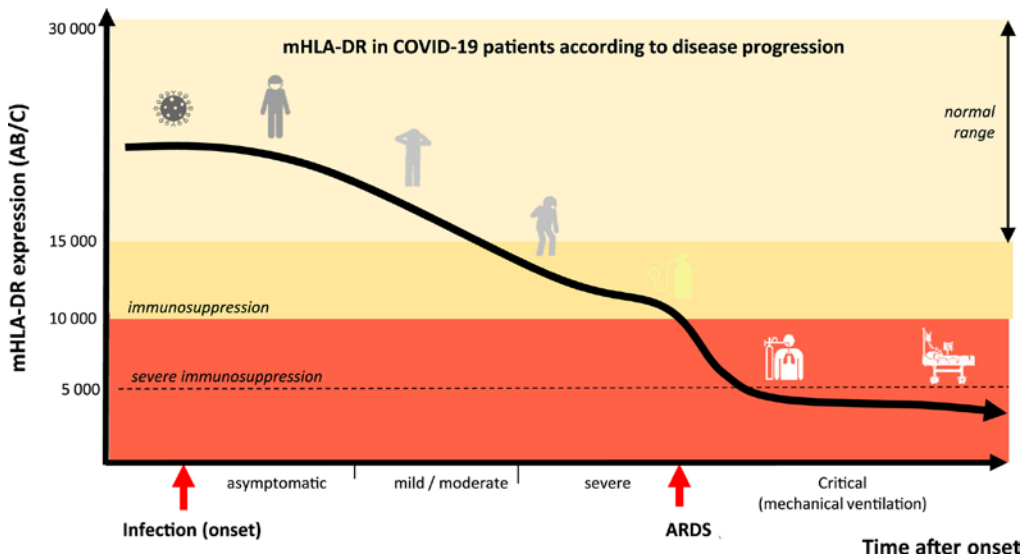
**Znížená expresia HLA-DR na monocytoch (syndróm monocytovej anergie) ilustruje fenomén endotoxínovej tolerancie charakteristický zmenenou funkcionalitou a odráža zníženú schopnosť prezentácie antigénu.**

### **Prognosticky relevantný marker v diagnostike sepsy.**

- Ak je detegovaných menej ako 30% CD14/HLA-DR v krvi, predpovedá to horšiu prognózu.
- Priebežným sledovaním expresie HLA DR na monocytoch je možné sledovať účinnosť terapie.

# CD14/HLA-DR (aktivované monocyty)

## Infekcie a COVID-19:



Znížená expresia HLA-DR na monocytoch (mHLA-DR) je spojená so závažným priebehom COVID-19.

- nie je taká výrazná ako pri septickom šoku,
- na JIS je nízka expresia mHLA-DR v priebehu času nemenná (alebo má tendenciu postupného zostupu),
- je spojená s funkčnou deaktiváciou monocytov (zmeneným uvoľňovaním zápalových cytokínov)
- je sprevádzaná „vymiznutím“ (CD14<sup>low</sup> CD16<sup>++</sup>) tiež označovaných ako „zápalové“ monocyty,
- v niektorých štúdiách je nízka expresia mHLA-DR spojená s úmrtnosťou na JIS.

Asociáciu medzi nízkou expresiou mHLA-DR a mortalitou pacientov hospitalizovaných na JIS je potrebné dôkladne zvážiť.

# CD8/CD38/HLA-DR

## Medicínsky význam:

CD38 - označovaný ako **cyklická ADP ribóza hydroláza**

- Indukcia sekrécie lymfocytov
- Regulácia migrácie imunitných buniek do miesta zápalu
- Produkty enzýmovej aktivity môžu prispieť k rozvoju cytokínovej burky a pľúcnej imunopatológii
- Bunková adhézia, signálna transdukcia a vápniková signalizácia
- **Úroveň aktivácie CD8<sup>+</sup> T lymfocytov závisí od koexpresie CD38 a HLA-DR**

## COVID-19 a infekcie:



Strata funkcie CD38 je spojená so zhoršenými imunitnými odpoveďami, metabolickými poruchami (autizmus).

Najvyššia MFI CD38/HLA-DR → akútna infekcia HCV a HBV, horúčka dengue, chrípka a ebola.



CD38 zvyšuje hyperaktivitu kontraktility dýchacích ciest, zvyšuje sa v pľúcach astmatických pacientov a zosilňuje zápalovú odpoveď hladkého svalstva dýchacích ciest.



**Najmä koexpresia CD38 a HLA-DR na CD8 T lymfocytoch sa považuje za efektívnejší marker imunitnej aktivácie počas vírusových infekcií (ebola, HIV, chrípka, horúčka dengue).**

# CD8/CD38/HLA-DR

ORIGINAL RESEARCH article

Pri infekcii CO  
majú protichob  
buniek: HLA-I

ORIGINAL RESEARCH article

Front. Immunol., 14 March 2022 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.861666>



CD38<sup>high</sup>  
Disorder and

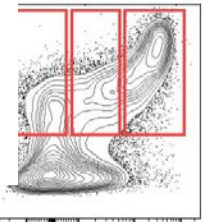


## Activated CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Cells Are Associated With Worse Clinical Outcome in Hospitalized COVID-19 Patients

Anna Bobcakova<sup>1</sup>, Martina Barnova<sup>2\*</sup>, Robert Vysehradsky<sup>1</sup>, Jela Petriskova<sup>2</sup>, Ivan Kocan<sup>1</sup>, Zuzana Diamant<sup>3,4,5</sup> and Milos Jesenak<sup>1,2,6\*</sup>

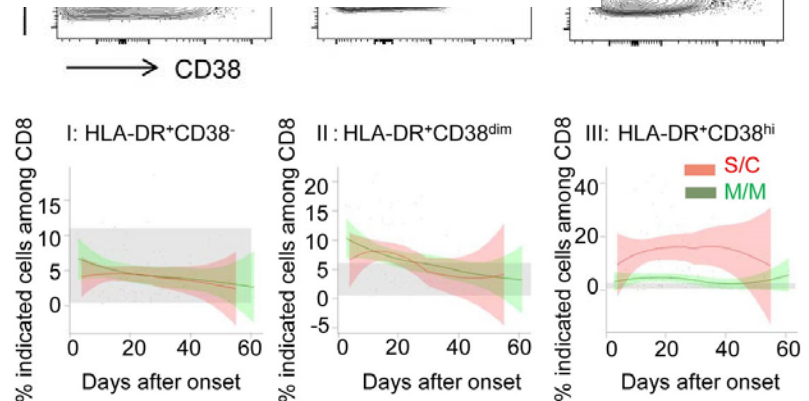
J<sup>†</sup>, Kai Han<sup>†</sup>, Yonghong  
in Liu<sup>†</sup> and Yaxian Kong<sup>†</sup>

evere/Critical



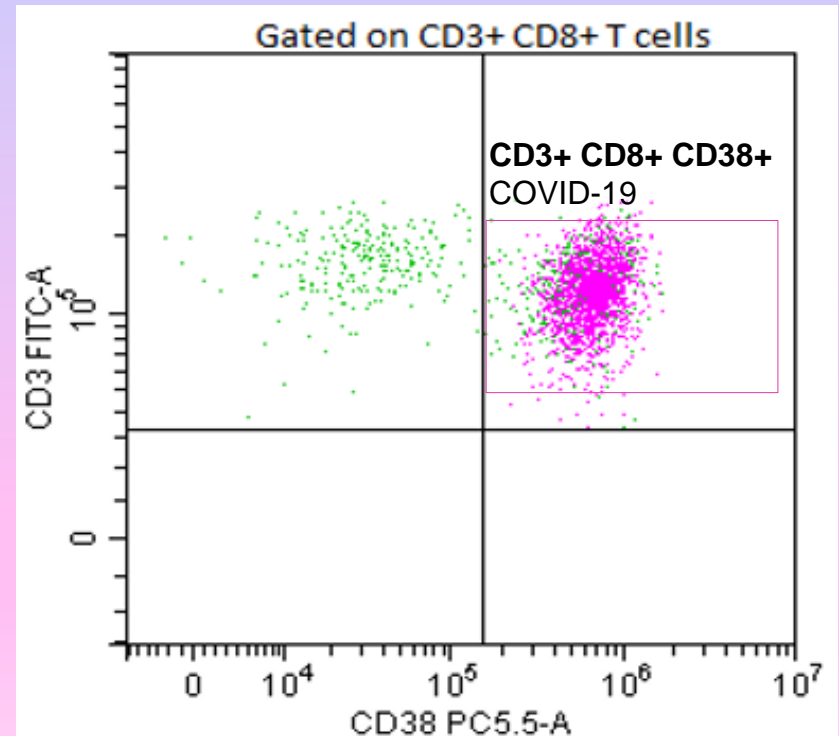
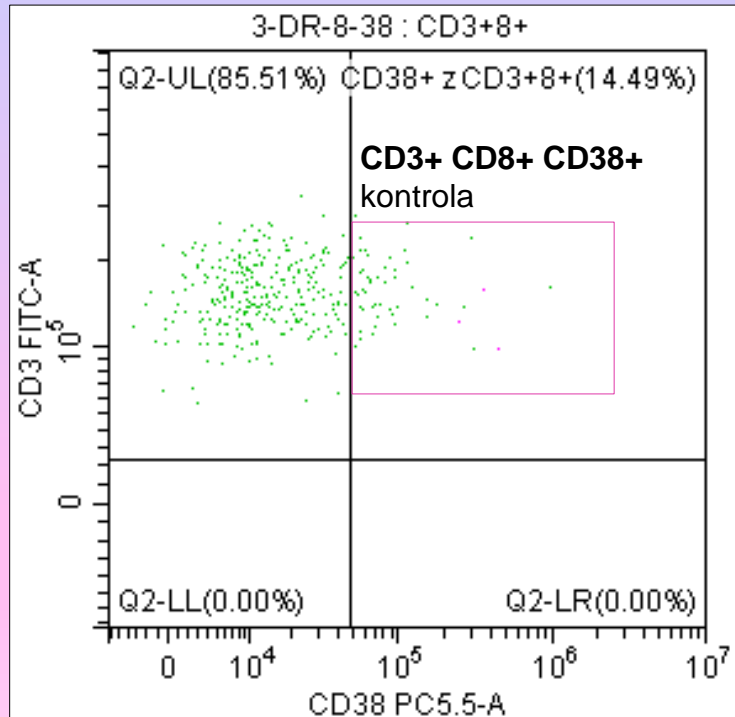
- HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>dim</sup> CD8<sup>+</sup> prítomné najmä v stredných prípadoch a u zdravých jedincov. Nízka expresia ICI, vysoká expresia 4-1BB a GITR, silnejší potenciál cytotoxicity a slabšia citlivosť na apoptózu.

Rozdielny pomer expresie týchto dvoch subpopulácií môže prispieť k odlišnej imunitnej odpovedi a klinickému výsledku progresie COVID-19.



# Imunofenotypizácia CD3+ CD8+ CD38+

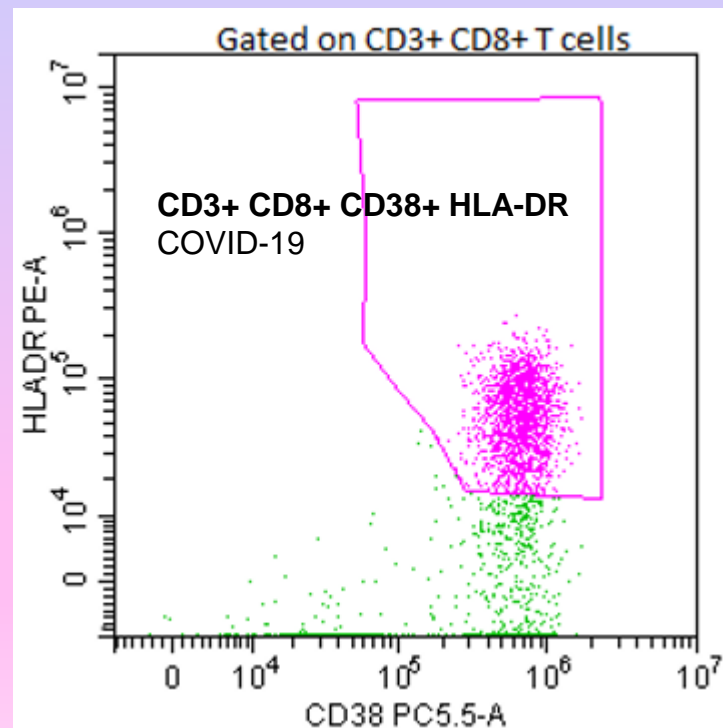
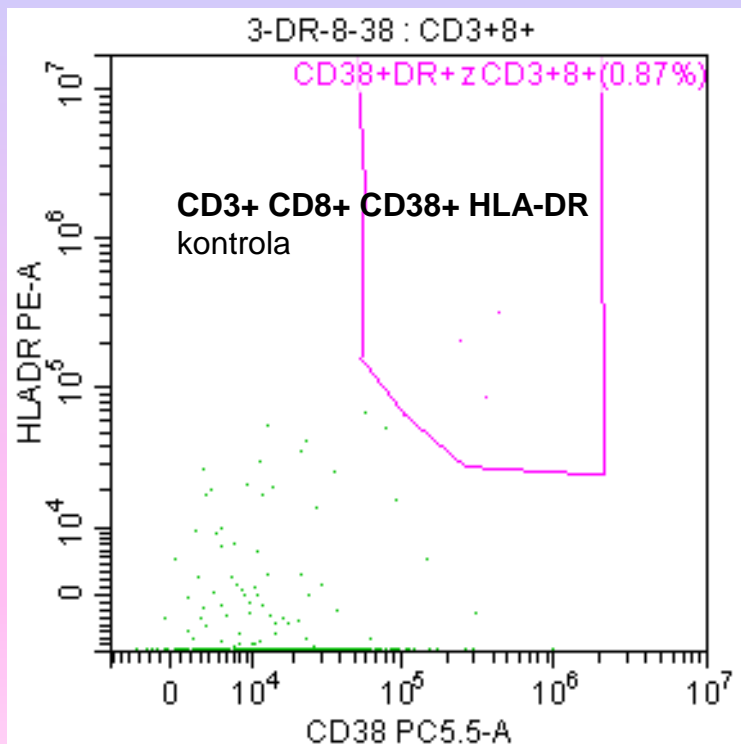
## Kontrola verus COVID-19 pacient





# Imunofenotypizácia CD3+ CD8+ CD38+ HLA-DR+

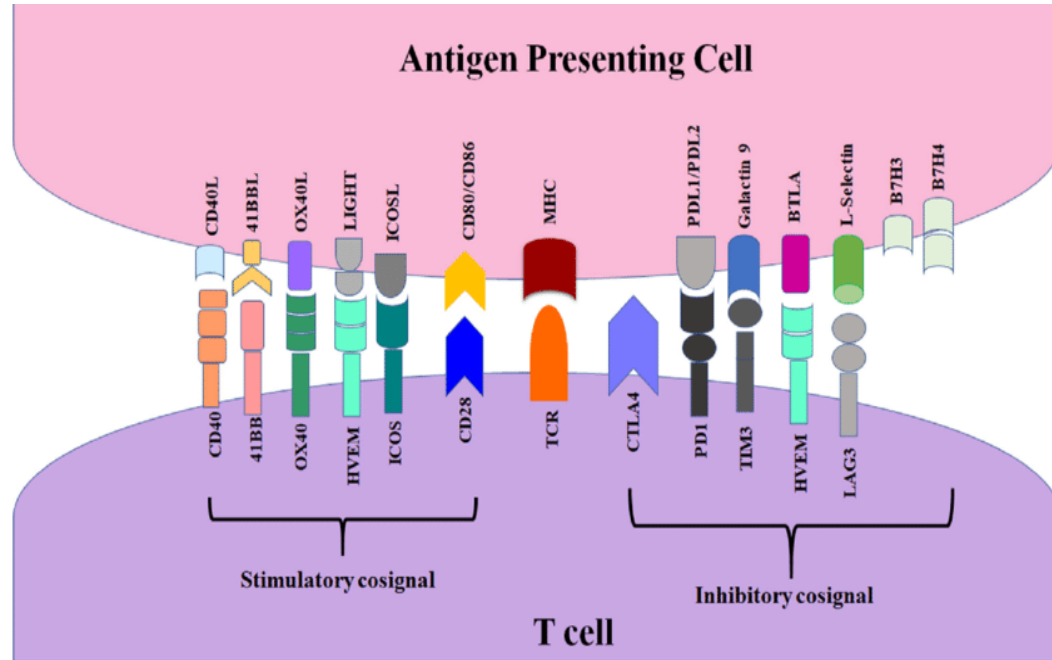
## Kontrola verus COVID-19 pacient



# Od hyperaktivácie k vyčerpaniu

Po stave nadmernej aktivácie a antigénnej stimulácie T bunkových receptorov, dochádza k fenoménu vyčerpania T lymfocytov robustnou koinhibičnou molekulovou signalizáciou alebo obmedzenou prítomnosťou kostimulačných receptorov – CD28.

Vyčerpané T lymfocyty na svojom povrchu exprimujú inhibičné receptory PD-1 (CD279), TIM-3 (CD 366) CTLA-4 a LAG-3 a ich expresia signifikantne rastie pri posune medzi asymptomatickým a symptomatickým, ev. medzi miernym až kritickým štádiom infekcie.



# PD-1/CD279

## (receptor programovanej bunkovej smrti 1)

### Medicínsky význam:

- Kontrolný bod imunitného systému
- Signalizácia cez PD-1: udržanie periférnej tolerancie a eliminácie autoreaktívnych klonov T lymfocytov
- Terapeutické cielenie (inhibítory PD-1) - zlepšenie T lymfocytovej odpovede proti vírusovým a nádorovým ochoreniam.

**Zvýšená expresia PD-1 je jedným z hlavných markerov vyčerpania T lymfocytov pri chronických infekciách a nádorových ochoreniach.**

**Signalizačnú dráhu PD1/PD-L1 môžu využiť nádorové bunky na únik pred IS.**

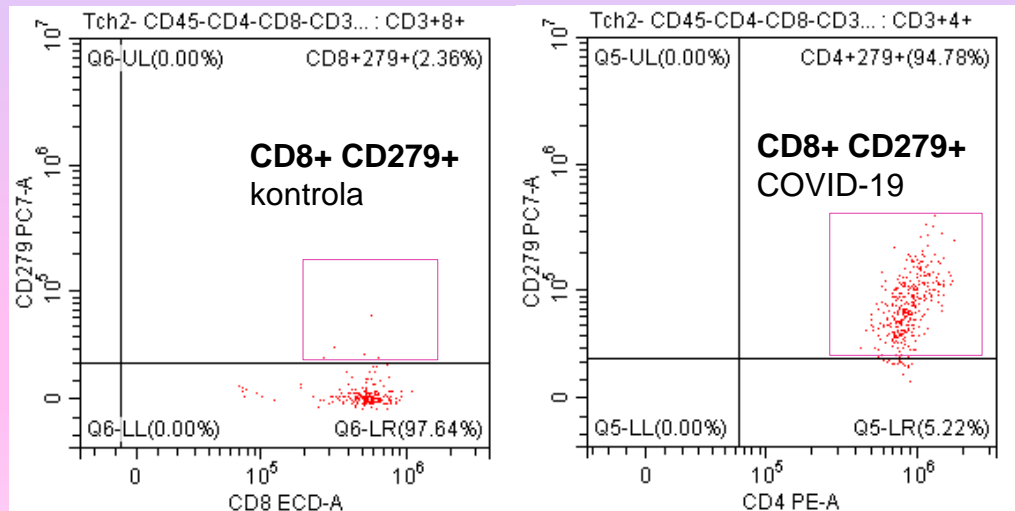
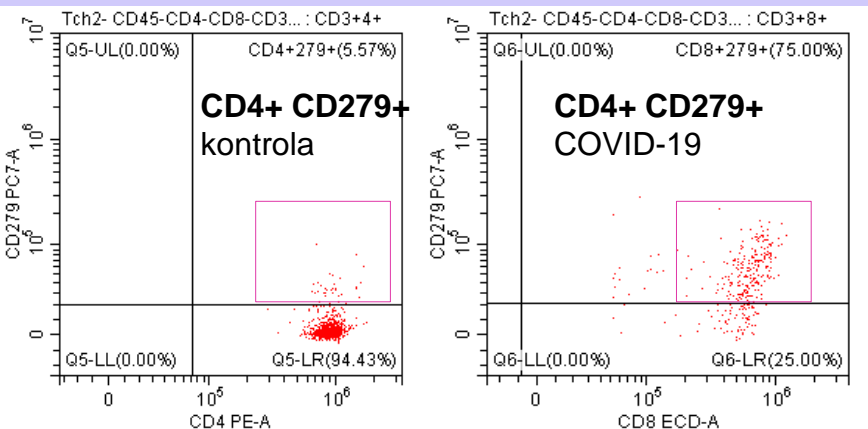
### COVID-19 a infekcie:

- Funkcia PD-1 prvýkrát opísaná počas chronickej lymfocytovej choriomeningitídy (LCM)
- Expresia PD-1 na CD8<sup>+</sup> T lymfocytoch pozitívne koreluje s vysokou vírusovou záťažou, progresiou ochorenia, zníženým počtom CD4<sup>+</sup> T lymfocytov a samotným narušením funkčnosti CD8<sup>+</sup> T lymfocytov pri HIV, HBV a HCV infekcii.

**Pacienti s ťažkým až kritickým stupňom COVID-19 vykazujú štatisticky zvýšené percentá PD-1 na CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytoch v porovnaní s kontrolnou skupinou.**

# Imunofenotipizácia CD4+ CD8+ CD279+

## Kontrola verus COVID-19 pacient



# TIM-3/CD366

## (imunoglobulín T lymfocytov obsahujúci mucínovú doménu 3)

### Medicínsky význam:

- Kontrolný bod imunitného systému
- Exprimovaný na povrchu pomocných a cytotoxických T lymfocytov produkujúcich IFN gamma
- TIM-3 a PD-1 sa môžu podieľať na vyčerpaní NK buniek

**Negatívne reguluje imunitnú odpoveď a spolu s PD-1 a LAG-3 (z angl. *Lymphocyte-activation gene 3*) patrí k markerom vyčerpania CD8<sup>+</sup> T lymfocytov**

**Kombinovaná blokáda TIM-3 a PD-1 viedla k zlepšeniu odpovede CD8<sup>+</sup> T lymfocytov počas LCM infekcie**

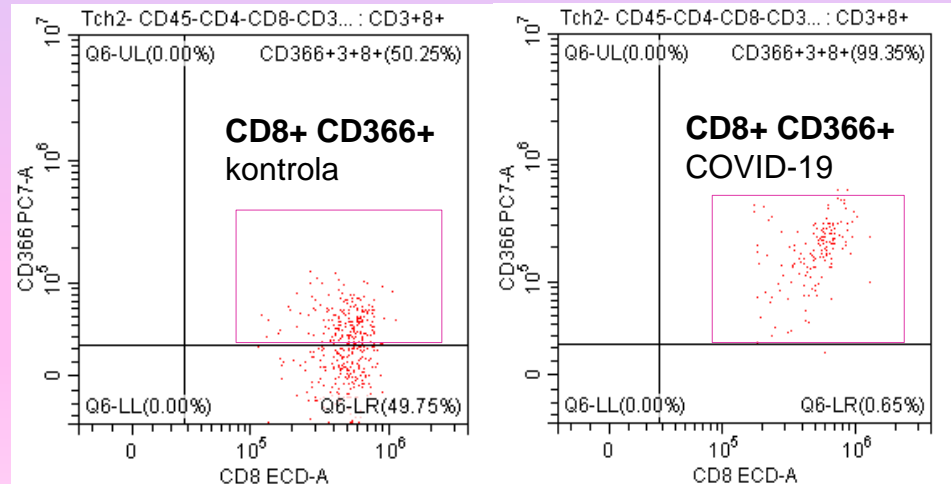
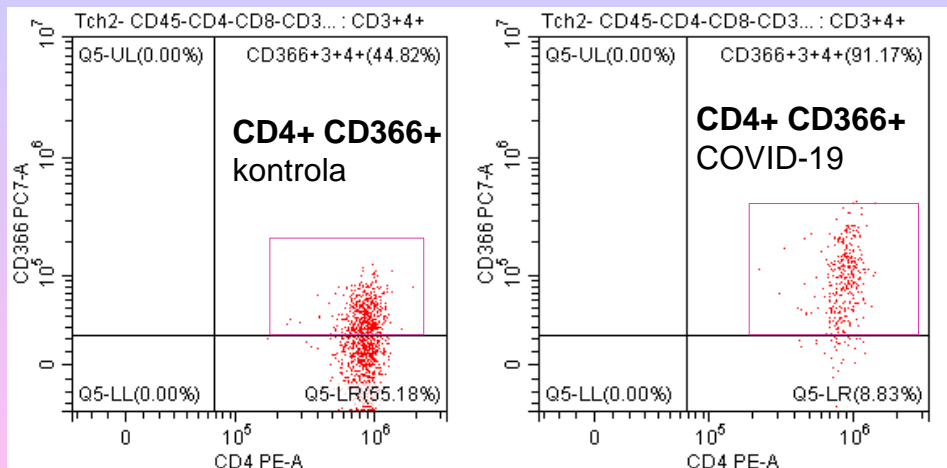
### COVID-19 a infekcie:

- Úloha TIM-3 pri vyčerpaní T lymfocytov bola prvýkrát opísaná u pacientov s HIV infekciou neskôr pri hepatitíde typu B a C.

**Zvýšená expresia TIM-3 na NK bunkách a CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytov bola pozorovaná u pacientov s nepriaznivými výsledkami COVID-19.**

# Imunofenotypizácia CD4+ CD8+ CD366+

## Kontrola verus COVID-19 pacient



# NKG2A/CD159

## receptor NK buniek

### Medicínsky význam:

- NK bunky a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty - eliminácia buniek infikovaných vírusom (antivírusová imunita)
- Neprimeraná regulácia môže viesť k vážnym organovým poškodeniam
- NKG2A je imunitný kontrolný bod exprimovaný na povrchu NK buniek a aktivovaných CD8<sup>+</sup>, ktorý po väzbe na HLA-E prenáša inhibičné signály

**Hoci inhibičné receptory sú pri chronických vírusových infekciách spojené s vyčerpaním T lymfocytov počas akútnej vírusovej infekcie je NKG2A nevyhnutný na vyváženú nadmernej aktivácie, prevenciu apoptózy, udržanie špecifickej odpovede CD8<sup>+</sup> T lymfocytov.**

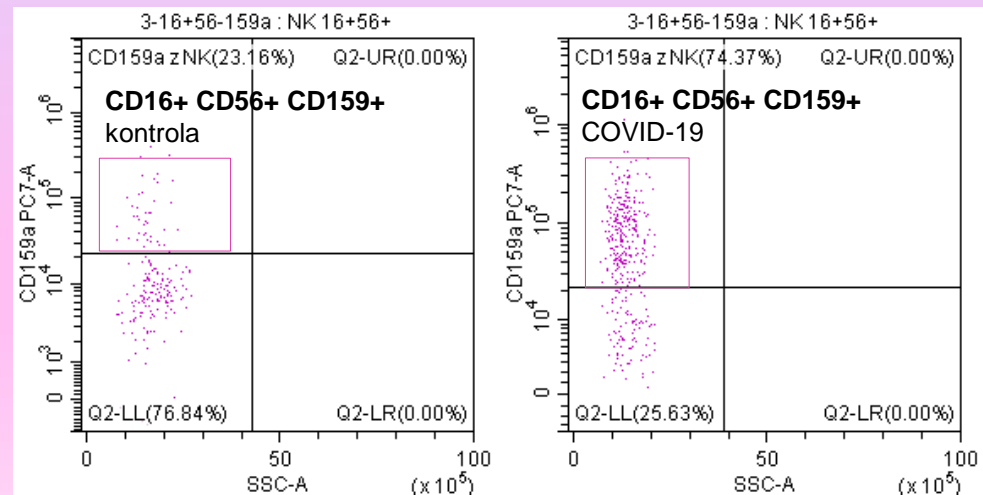
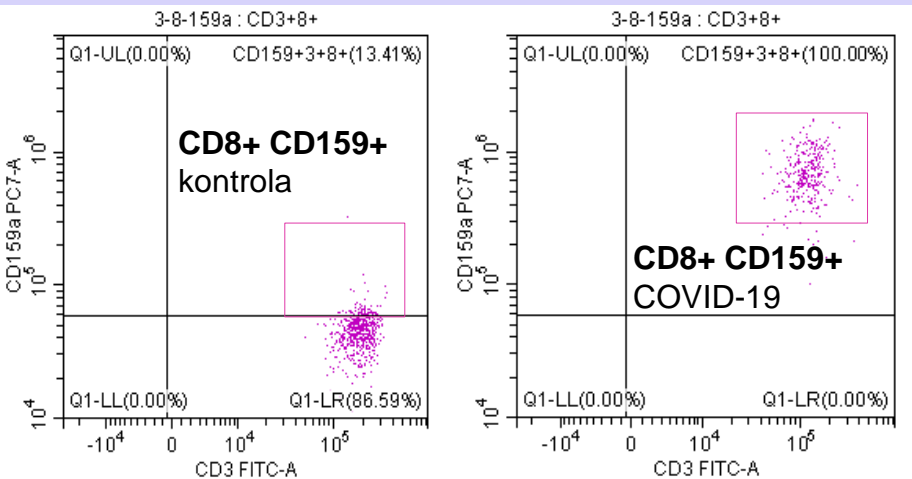
### COVID-19 a infekcie:

- CD94/NKG2 a ich ligandy zohrávajú úlohu v mnohých ochoreniach, pri ktorých môže byť ich expresia v rôznych typoch buniek pozmenená - HCV, HIV.

**U pacientov s COVID-19 zvýšené koncentrácie IL-6 a IL-10 vedú k zvýšenej expresii NKG2A na NK bunkách a naivných CD8<sup>+</sup> T lymfocytoch, čo môže viesť k zvýšeniu ich inhibičného účinku na lymfocytovú populáciu a narušeniu rovnováhy medzi lymfocytmi a neutrofilmi.**

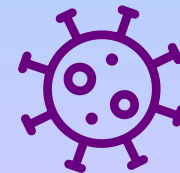
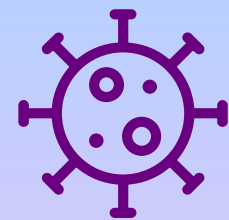
# Imunofenotypizácia CD8+ CD159+ a CD16+ CD56+ CD159+

## Kontrola verus COVID-19 pacient





# Záver



**Analýza inhibičných a aktivačných markerov na povrchu imunocytov otvára nové možnosti pre stanovenie prognózy neočakávaných komplikácií a rôzneho stupňa závažnosti mnohých ochorení nie len infekčných.**

**Lepšie pochopenie zmien v imunoprofile pacientov s COVID-19 môže viesť k novým možnostiam v terapeutickej intervencii alebo podpore imunity.**

