

Studie: u pacientů po covidu-19 dochází k přeprogramování makrofágů a aktivaci inflamazomu

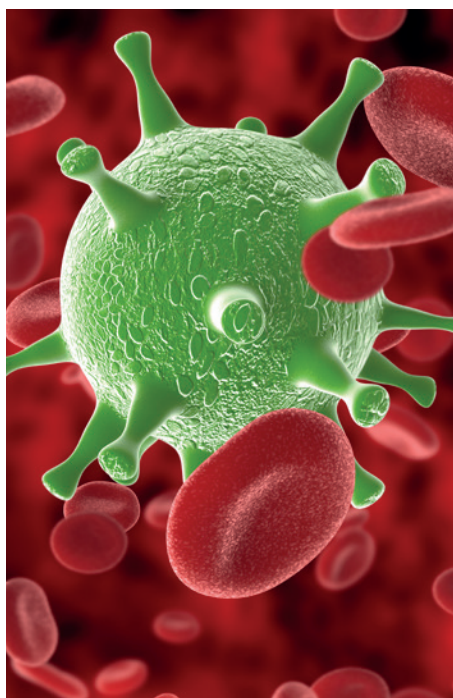
Imunologické mechanismy, spojené s onemocněním covid-19 a související s hyperzánětlivou reakcí organismu, nebyly dosud v úplnosti vysvětleny. Nově byla publikována studie, která se snažila objasnit některé z těchto mechanismů.¹ Autoři se soustředili na vliv covidu-19 na přeprogramování makrofágů pacientů a roli, kterou v těchto mechanismech hraje působení S proteinu na vrozenou i adaptivní imunitu.

Úvod

Dosud je relativně málo známo o proaktivní či škodlivé roli, kterou hraje reakce imunitního systému u pacientů s covidem-19. To je příčinou těžkostí při hledání adekvátních léčebných strategií. U některých pacientů s tímto onemocněním se rozvíjí těžká bronchopneumonie a vzniká intenzivní, neadekvátní zánětlivá reakce s mohutnou produkcí prozánětlivých cytokinů.² Tato fáze imunitní reakce je základem mechanismu některých typů terapeutických strategií, například podávání kortikosteroidů, blokátorů receptoru interleukinu 6, inhibitorů interleukinu 1 nebo inhibitorů Januskináz. Dosud je však nedostatek podrobnějších informací o spouštěcích této přehnané reakce a roli, kterou v ní hrají prozánětlivé cytokiny. Relativně prokázána je základní role zvýšené hladiny cytokinu interleukinu 1 beta (IL-1 beta), jehož sekrece je primárně iniciovaná inflamazomy, tedy multiproteinovými intracelulárními receptory, které jsou zodpovědné za koordinaci rané fáze reakce na přítomnost nebezpečných patogenních mikroorganismů v buňkách. Inflamazom aktivuje enzym kaspáza 1, která štěpí prekurzor pro-IL-1 beta na aktivní prozánětlivý cytokin IL-1 beta. Ten je následně z buněk uvolňován. U infekce virem SARS-CoV-2 nejsou detaily tohoto procesu zcela objasněny. V uvedené laboratorní in vitro studii¹ se autoři zaměřili na mechanismy tohoto procesu, především na roli virového spike proteinu (S proteinu), hlavního antigenu SARS-CoV-2, při aktivaci inflamazomu a produkci interleukinu 1 beta v makrofázích pacientů, kteří prodělali covid-19.

Metodika, výsledky

Aby mohli studovat význam S proteinu, tedy povrchové struktury viru SARS-CoV-2, pro signalizaci v rámci imunitního systému, autoři studie tento protein izolovali a purifikovali.



U některých pacientů s covidem-19 vzniká intenzivní, neadekvátní zánětlivá reakce.

Poté jej inkubovali s makrofágy pacientů, kteří prodělali covid-19, a stejnými typy buněk od zdravých osob. Ukázalo se, že S protein spouští sekreci IL-1 beta v makrofázích postcovidových pacientů, zatímco u kontrol k této sekreci nedocházelo, a to ani po mnohonásobném zvýšení koncentrace S proteinu. Tento jev (zvýšení produkce IL-1 beta v makrofázích pacientů v reakci na stimulaci S proteinem) má se-

lektivní povahu: nespecifický podnět, kterým bylo působení lipopolysacharidu (LPS), mělo za následek vzestup sekrece prozánětlivých cytokinů IL-1 beta a TNF-alfa v makrofázích obou skupin. Tento test ukázal, že inflamazom v buňkách kontrolní skupiny byl sice funkční, ale ve skupině pacientů byl vzestup produkce IL-1 beta větší. Z toho lze usuzovat, že prodělání covidu-19 predisponuje makrofágy k vyšší reaktivitě na zánětlivé podněty.

Autoři dále zkoumali nitrobuňčnou koncentraci inflamazomu NRLP3, který je zodpovědný za produkci cytokinu IL-1 beta v makrofázích. Opět se ukázalo, že po stimulaci buněk S proteinem se zvyšovala koncentrace tohoto inflamazomu v makrofázích pacientů, kteří prodělali covid-19, nikoli v buňkách kontrolní skupiny. Obdobné rozdíly byly nalezeny i v oblasti genové exprese, respektive transkripce genu pro syntézu IL-1 beta. V makrofázích postcovidových pacientů byla již výchozí hladina (před stimulací S proteinem) vyšší než u kontrol, což svědčí o vyšší pohotovosti těchto buněk k syntéze prozánětlivého cytokinu. Tyto rozdíly mezi makrofágy pacientů, kteří prodělali covid-19, a makrofágy od zdravých osob potvrdila ještě celá řada dalších detailních laboratorních testů, které autoři studie provedli.

Rozdíly byly nalezeny i v oblasti exprese genů, které regulují stresovou reaktivitu buněk: genů kódujících nitrobuňčnou homeostázu iontů kovů, buněčné oxidoredukční procesy a signalizaci nukleárního faktoru kappa B. Na těchto procesech významně závisí funkce vrozené imunity a imunitní paměti. Například v makrofázích pacientů, kteří prodělali covid-19, byla podstatně méně exprimována řada oxidoreduktáz, které jsou zodpovědné za neutralizaci intracelulárního stresu. Tento defekt podle autorů studie činí buňky pacientů méně chráněné před podněty stimulujícími prozánětlivou reakci včetně aktivace inflamazomu pro sekreci IL-1 beta. Obdobné rozdíly byly zjištěny i v oblasti epigenetických regulací, které zvyšují pohotovost

makrofágů postcovidových pacientů ke spuštění prozánětlivé aktivity. Další testy ukázaly, že imunitní paměť makrofágů může být dlouhodobá, může existovat několik měsíců.

Diskuse

Výsledky studie ukázaly některé mechanismy, kterými virus SARS-CoV-2 ovlivňuje imunitní systém pacientů po prodělaném covidu-19. Virus prostřednictvím S proteinu působí bouřlivou zánětlivou reakci, respektive sekreci prozánětlivých cytokinů v makrofázích. Makrofágy jsou imunitní buňky, které vznikají z monocytů po vstupu do tkání. Jsou to profesionální fagocyty. Jsou součástí nespecifické imunity a účastní se zánětlivé reakce. Tyto buňky, jak ukázala studie, hrají klíčovou roli v neadekvátně vystupňované zánětlivé reakci vyvolané v lidském organismu infikovaném virem SARS-CoV-2. S protein má duální roli, a to jak ve vrozené, tak adaptivní imunitě. S proteinem spouštěný inflamazom (a následná produkce prozánětlivého cytokinu IL-1 beta, který představuje první linii obrany organismu) vyžaduje předchozí aktivaci monocytů. Množství IL-1 beta produkováné makrofágy u pacientů s covidem-19 nekoreluje vždy se závažností klinického obrazu tohoto onemocnění, ale u vyšší míry infekce bývá klinický obraz závažnější, což autoři dávají do souvislosti s vyšší kvantitou aktivovaných makrofágů, které vstupují do plicní tkáně u tohoto typu pacientů.

Významné je zjištění, že makrofágy pacientů, kteří prodělali covid-19, zůstávají reaktivní (produkují tedy uvedený prozánětlivý cytokin) i v postcovidové fázi, to znamená po ukončení klinicky manifestního onemocnění. Výsledky naznačují, že zvýšená míra infekce vede nejen k vyšší aktivaci makrofágů ve smyslu větší produkce IL-1 beta, ale zároveň dochází u tohoto typu pacientů k vyšší míře vstupu těchto buněk do plicní tkáně. Roli v této vyšší infiltraci plic makrofágy hraje lokální sekrece molekul signalizujících vnitřní poškození (DAMP, Damage-associated molecular patterns), tedy molekul, které iniciují a zároveň udržují zánětlivou odpověď organismu. Tyto molekuly označované jako alarmíny se uvolňují ze stresovaných buněk podstupujících nekrózu. Jak ukázal výzkum, sérové hladiny molekul tohoto typu (heterodimeru S100A8/S100A9 označovaného jako kalprotektin) u pacientů se závažným průběhem covidu-19 jsou zvýšené. I v této studii autoři potvrdili up regulaci příslušných genů v makrofázích i v období, kdy virus SARS-CoV-2 byl z organismu odstraněn, tedy v postcovidovém období.

Dalším faktorem zvyšujícím závažnost

klinického průběhu covidu-19 je kvantita receptorů ACE2, které umožňují vstup viru SARS-CoV-2 do buněk. Jde především o plicní buňky; na monocytech se zvýšené množství tohoto receptoru nepodařilo prokázat. Naproti tomu na monocytech/makrofázích pacientů s covidem-19 byl prokázán zvýšený výskyt (i aktivace) toll-like receptorů TLR2, tedy receptorů schopných rozpoznat potenciálně nebezpečné struktury. Tyto receptory jsou součástí vrozené imunitní odpovědi. Jejich stimulace je potřebná pro destrukci viru SARS-CoV-2, takzvanou pyroptózu, což je programovaná buněčná smrt spouštěná v rámci zánětlivého procesu.

Makrofágy u pacientů, kteří prodělali covid-19, se chovají odlišně, pokud jde o aktivaci inflamazomu, než makrofágy osob, které toto onemocnění neprodělaly. Je zjevné, že prodělaní onemocnění mění reaktivitu těchto buněk v mnoha směrech, což, jak ukázala uvedená studie, souvisí s aktivací určitých genů, které se podílejí na regulaci zánětlivé reakce na infekci, respektive přítomnost S proteinu. Jde především o aktivaci inflamazomu.

Studie dále ukázala, že jakmile došlo k aktivaci inflamazomu makrofágů S-proteinem, zůstává tato složka imunity dlouhodobě v aktivovaném stavu i u pacientů, kteří se z onemocnění zotavili a jejichž klinický stav se zdá být normalizován. Tento „excitovaný“ stav makrofágů je zjištěný minimálně několik týdnů po skončení aktivní fáze onemocnění. Vzhledem k tomu, že životnost cirkulujících monocytů je relativně krátká a známky aktivace inflamazomu po stimulaci sekundárním antigenním podnětem v těchto buňkách jsou dlouhodobé, musí se u pacientů, kteří prodělali covid-19, uplatňovat mechanismy imunologické paměti. Podle autorů studie se uplatňují v této aktivaci transkriptomické, epigenetické a funkční reprogramovací mechanismy v myeloidních progenitorech v kostní dřeni i v cirkulujících monocytech.

Ve studii byly prokázány některé z těchto mechanismů dlouhodobě zvýšené reaktivity u pacientů, kteří prodělali covid-19. Jeden z nich spočívá v tom, že monocyty/makrofágy těchto pacientů jsou nositeli transkripční „signatury“ v oblasti homeostázy kovových iontů a buněčného oxidačně-redukčního procesu, který ovlivňuje funkce vrozené imunity. Změny se týkají dysregulace specifického typu proteinů (například metalothioneinů a proteinů skupiny S100), které působí jako modulatory funkcí a paměti vrozené imunity tím, že regulují metalicko-iontovou homeostázu imunitních buněk.³ U pacientů, kteří prodělali covid-19, studie zjistila významnou

down-regulaci metalothioneinů (které působí jako antioxidanty a modulují aktivaci transkripčního faktoru kappa-B) v makrofázích.⁴ Proto funkce makrofágů těchto pacientů je narušená, vzniká v nich oxidační stres, a jak ukázaly jiné studie, právě oxidační stres je významným modulátorem aktivace NLRP3 inflamazomu.⁵

Dalším výsledkem v referované studii je identifikace odchylek v oblasti epigenetických a microRNA faktorů silně ovlivňujících vrozenou imunitu. Nejdůležitější z těchto odchylek, zjevných u pacientů po prodělaném covidu-19, jsou epigenetické modifikace histonu, které mají za následek aktivaci makrofágů ve smyslu prozánětlivého stavu včetně zvýšené produkce cytokinu IL-1 beta. Dalším významným jevem potvrzeným ve studii je zjištění, že některé z 30 microRNA, odlišně regulovaných v makrofázích postcovidových pacientů, jsou spojeny s přeprogramováním funkcí vrozené imunity. Ve výsledku pak vznikají patologické imunitní reakce s převahou prozánětlivého nastavení, respektive dlouhodobé a selektivní aktivace inflamazomu.

Autoři na závěr vyjadřují naději, že výsledky studie bude možno využít i pro design terapeutických a/nebo preventivních cest v oblasti infekce SARS-CoV-2, respektive covidu-19. V makrofázích pocházejících od pacientů, kteří prodělali covid-19, je signalizace inflamazomu (pre)aktivovaná, a právě na ovlivnění této oblasti by mohly být založeny některé strategie pro terapii hyperzánětlivých syndromů spojených s infekcí SARS-CoV-2. Podle autorů by se výsledky studie daly využít také při testování bezpečnosti a imunogenicity proticovidových vakcín, v jejichž mechanismu účinku hraje roli S protein. ■

Literatura

1. Theobald SJ, Simonis A, Georgomanolis A, et al. Long-lived macrophage reprogramming drives spike protein-mediated inflammasome activation in COVID-19. *EMBO Mol Med* 2021;13:e14150.
2. Mangalmurti N, Hunter CA. Cytokine storms: understanding COVID-19. *Immunity* 2020;53:19–25.
3. Ulas T, Pirr S, Fehlhaber B, et al. S100-alarmin-induced innate immune programming protects newborn infants from sepsis. *Nat Immunol* 2017;18:622–632.
4. Wang S, Song R, Wang Z, et al. S100A8/A9 in inflammation. *Front Immunol* 2018;9:1298.
5. Prochnicki T, Latz E. Inflammasomes on the crossroads of innate immune recognition and metabolic control. *Cell Metab* 2017;26:71–93.

MUDr. Pavel Kostiuk, CSc.