

COVID-19

cytokinová bouře a význam vitamínu C pro funkci imunitních buněk



Základní součástí mechanismů, kterými koronavirus SARS-CoV-2 napadá organismus a způsobuje onemocnění COVID-19, je porucha imunity. Abnormální funkce imunitních buněk přispívá k závažným stavům jako je ARDS, sepse a multiorgánové selhání u pacientů s tímto onemocněním. Imunitní buňky (makrofágy, neutrofilny a lymfocyty) potřebují pro zajištění svých funkcí vitamin C, proto jeho deficit vede k jejich dysfunkci. Jedním z projevů této dysfunkce je tzv. cytokinová bouře, která je příčinou závažného průběhu COVID-19 u některých pacientů. Suplementace kyseliny askorbové u lidí s tímto onemocněním se stala předmětem aktuálního výzkumu. V současnosti probíhají takto zaměřené tři klinické studie (v Kanadě, Itálii a Číně). Americká autorka Doris Loh publikovala referát, založený na rešerši odborné literatury k tomuto tématu; protože se jedná o aktuální tematiku, obsah zde shrnujeme.¹

Charakter onemocnění

U pacientů se závažným průběhem COVID-19 se často rozvíjí stav označovaný jako ARDS (syndrom akutní respirační tísně). Klinická studie, do níž byli zařazeni pacienti s COVID-19, které proběhla ve Wuhanu, ukázala, že 50 z 54 pacientů, kteří zemřeli, mělo známky ARDS, zatímco ve skupině 137 pacientů, kteří přežili, mělo tento syndrom jen 9 osob.² Epidemiologické studie probíhající v Číně ukázaly, že až 20 % pacientů s COVID-19 má těžký průběh s pneumonií a až 10 % vyžaduje intenzivní péči.³ ARDS je tedy vysoce rizikový stav; omezit jeho výskyt by radikálně snížilo mortalitu pacientů hospitalizovaných pro COVID-19.

K známkám ARDS patří dušnost, hypoxémie (nízká oxygenace krve), snížená koncentrace oxidu dusnatého (NO) v séru, vysoká prevalence sepse, vysoká koncentrace zánětlivých markerů.⁴ Pacienti se zvýšenou hladinou těchto markerů potřebují častěji umělou plicní ventilaci a mají vyšší mortalitu⁵ a oboustranné opacity na CT plic. I pacienti s negativním výsledkem při PCR testování (rtRT-PCR, tj. real-time-reverse transcriptase PCR) mohou mít abnormální nález na CT plic. V čínské studii u 75 % pacientů se suspektním COVID-19 (tj. osob, které byly v blízkém kontaktu s infikovanými a objevily se u nich respirační a další příznaky) mělo negativní PCR, ale abnormální CT (opacity).⁶

Strategie viru

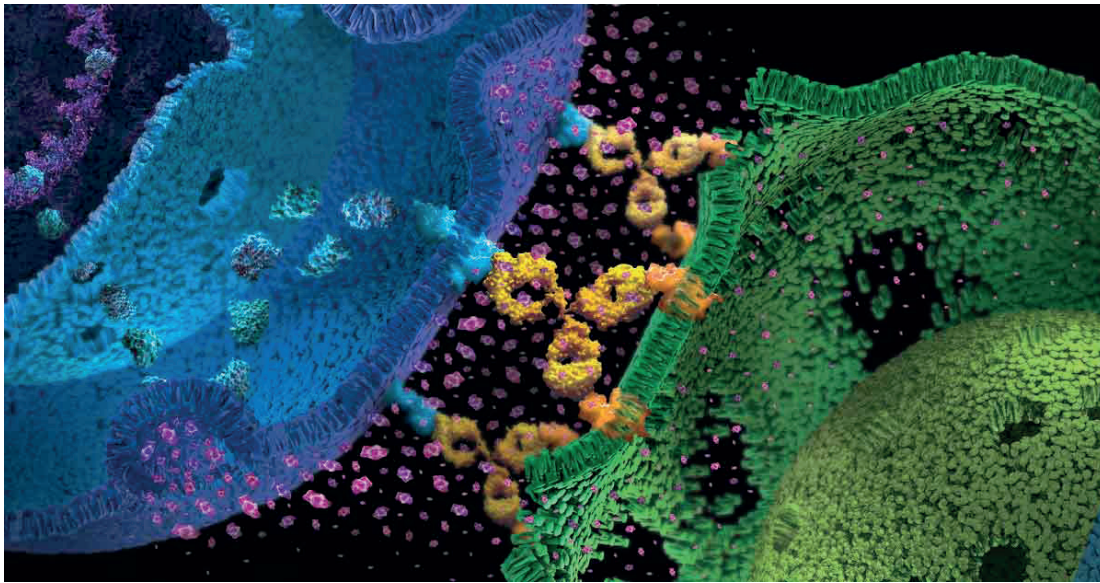
SARS-CoV-2 je RNA virus, jehož strukturální proteiny jsou tzv. spike protein (S), envelope protein (E), membránový protein (M) a nukleokapsidový protein. K transkribovaným, tzv. nestrukturálním proteinům patří proteiny orf1a, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF10 and ORF8. Tyto nestrukturální proteiny jsou syntetizovány až v hostitelské buňce transkripcí virové RNA do hostitelské DNA. Využívají k tomu hostitelovy buněčné metabolické dráhy a zajišťují tak přežití a replikaci viru. Vícestupňová útočná strategie SARS-CoV-2 má několik složek. Virus používá k průniku do buněk, zvláště plicních, spike

protein, který se váže na receptory ACE2 na buněčném povrchu. Tento receptor je přítomen na části buněk plicních sklípků, tzv. alveolárních buňkách typu II (AT2 cells). Tyto buňky exprimují geny, které jsou schopny zvýšit virovou replikaci a transmisí. Aby byl spike protein aktivní, musí být rozštěpen působením furinových enzymů. Ty patří mezi tzv. proprotein konvertázy, skupiny enzymů, které mění některé proteiny z inaktivní formy do biologicky aktivní formy. Furinové enzymy aktivují např. růstové faktory, hormony, ale také např. prozánětlivé cytokiny. Virus SARS-CoV-2 používá proteiny, označované jako viroporiny (E, Orf3a) k vytváření iontových kanálů, které umožňují výstup virů z buněk po jejich replikaci. Viroporiny ale také zvyšují patogenitu virů, aktivují inflamason (intracelulární protein spouštějící zánětlivý proces), což přispívá k vzniku cytokinové bouře a rozvoji ARDS.⁷

Role hemoglobinu

Studie, publikovaná koncem března 2020, odhalila mechanismy, kterými virus SARS-CoV-2 působí na hemoglobin, což je jeden z procesů, vedoucí ke vzniku ARDS. Tento výzkum ukázal, že některé nestrukturální proteiny viru vstupují do erytrocytů a uvolňují železo z hemu. Tím ztrácí hemoglobin schopnost přenášet kyslík.⁸

Hemoglobin je tetramerní protein, tvořený čtyřmi podjednotkami, tzv. globiny. Globin je tvořen polypeptidovým řetězcem, na který je navázán jeden hem. Základem molekuly hemu je protoporfyrin, tvořený 4 pyrrolovými jádry s centrálně vázaným železem. Hemové železo je šestivazné – čtyřmi vazbami je spojeno s atomy dusíku pyrrolových jader. Další valencí se železo váže s aminokyselinou histidinem v globinovém řetězci. Šestá valence železa je určena pro molekulu kyslíku. Proces působení viru na hemoglobin probíhá tak, že po vstupu do erytrocytů způsobí virus v buňce (transkripcí na DNA) syntézu nestrukturálních proteinů. Protein ORF8 a povrchový glykoprotein mají schopnost navázat se na porfyriny hemu, zatímco proteiny orf1ab, ORF10 a ORF3a koordinovaně napadají hem 1-beta řetězce hemoglobinu a odpo-



Studie, publikovaná koncem března 2020, odhalila mechanismy, kterými virus SARS-CoV-2 působí na hemoglobin.

jují železo z porfyrinu (to je nahrazeno výše jmenovanými proteiny, např. ORF8). V důsledku tohoto útoku klesá množství hemoglobinu, schopného přenášet kyslík a CO₂, což má dopad na funkci plicních buněk. Následkem vzniklé dysfunkce erytrocytů, pokud jde o oxygenační schopnost, vznikají zánětlivé změny v plicních buňkách, které se projevují na CT obrazem opacit typu mléčného skla (ground glass opacities).

Podle hypotézy těchto autorů⁸ je proces šíření viru takovýto: prostřednictvím ACE2 receptoru vstupuje virus do buněk, včetně imunitních, které pak produkují nejen protilátky, ale i virové nestrukturální proteiny. Působením protilátek dochází k hemolýze a napadení hemoglobinu, resp. hemu, odstranění železa z hemu a jeho nahrazení virovým proteinem. Vzniklý porfyrinový komplex podporuje šíření viru, je to další způsob, jak se může virus vstupovat do buněk (vedle mechanismu prostřednictvím vazby spike proteinu na ACE2 receptor). V séru stoupá hladina železa z rozpadlého hemu, a sekundárně se zvyšuje hladina ferritinu (sérového proteinu, který váže ionty železa).⁸

Kromě toho díky dysfunkci hemoglobinu dochází ke snížení schopnosti přenosu kyslíku, vzniká hypoxie, která aktivuje hypoxické dráhy včetně aktivace hypoxického aktivního faktoru HIF 1 alfa. Následkem toho se zvyšuje exprese furinových enzymů. Tím se podporuje replikace a šíření viru. Virus napadá hem pravděpodobně proto, že si tak zajišťuje řetězec kroků, které vedou k jeho replikaci.

Virus působí i na játra, především nepřímo.⁹ U znač-

né části pacientů se závažným postižením COVID-19 jsou zvýšené hladiny jaterních enzymů (ALT i AST), a to nikoli přímým působením viru na játra, ale prostřednictvím role jater v metabolismu železa a virem pozměněného hemu. Játra regulují homeostázu železa v celém organismu. Kontrolují uvolňování recyklovaného železa z jaterních makrofágů, které tvoří zásobárnu železa. Produkují haptoglobin, který váže volný, toxický, oxidovaný hem. Haptoglobin se nachází hlavně v jaterních makrofázích, které pohlcují volný hem a metabolizují jej tak, že uvolněné železo může být zabudováno do ferritinu. Zvýšené uvolněné železo z virem narušeného hemu vede ke zvýšenému množství ferritinu a makrofágů. A vyšší počet makrofágů u COVID-19 je jednou z příčin cytokinové bouře. Makrofágy mají totiž vedle své role v metabolismu železa řadu dalších rolí, vedle řízení hemopoézy, homeostázy a schopnosti fagocytózy k nim patří i schopnost produkce řady cytokinů (např. IL-1, IL-8, IL-12, TNF, GM-CSF). Proto jejich zvýšený počet vede k cytokinové bouři.¹⁰ Souvislost mezi hladinou ferritinu, cytokinovou bouří a závažností COVID-19 byla prokázána.¹¹

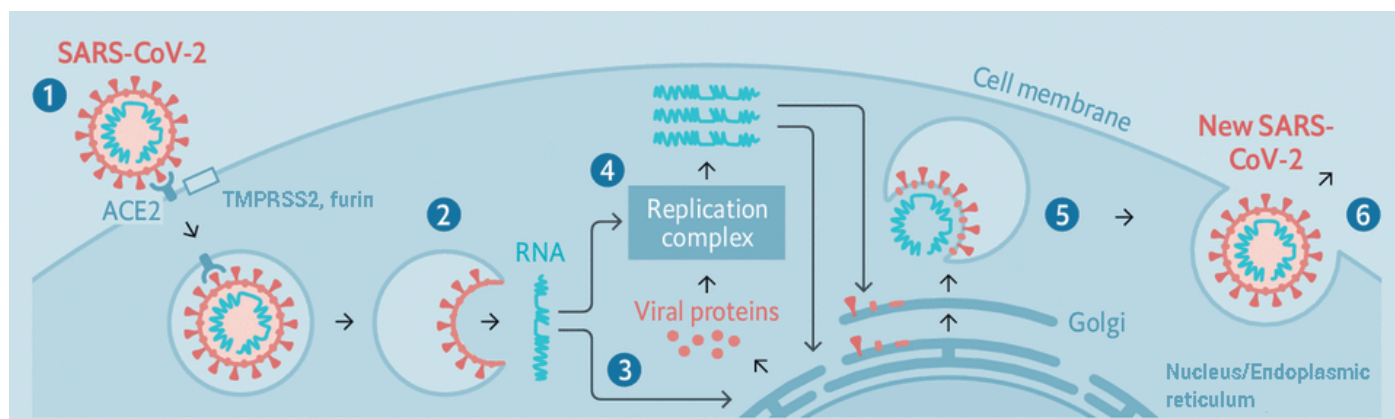
Makrofágy, role oxidu dusnatého a inflamazomu

U COVID-19 hraje významnou roli porucha produkce oxidu dusnatého (NO). Volný, extracelulární hem u pacientů s COVID-19 se podílí na rozkladu NO a to dále přispívá ke vzniku cytokinové bouře a ARDS. Snížená hladina endoteliálního NO vede ke vzniku hypertenze, prokoagulačního stavu a systémového zánětu. 90 % hospitalizovaných pacientů s COVID-19 trpí zvýšenou krevní koagulací a deplecí NO. Ztráta NO vede ke snížené schopnosti potlačovat virovou replikaci a je jednou z hlavních příčin selhávání imunity u COVID-19.

Odborná redakce
Edukafarm, Praha

LITERATURA

- Loh D. Covid-19, ARDS and cytokine storms. The recycling of ascorbic acid by macrophages, neutrophils and lymphocytes. The Jay Campbell Podcast. https://youtu.be/E9uPyV_cBLg
- Zhou F, Yu T, Du R, 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(10229):1054-1062.
- The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2020;41:145-151.
- Spadaro S, Spark M, Turini C, et al. Biomarkers for Acute Respiratory Distress syndrome and prospects for personalised medicine. *J Inflamm (London)* 2019;16:1.
- Kovačević P, Dragić S, Vidović J, et al. Serum levels of nitric oxide as a predictor of survival in acute respiratory distress syndrome caused by H1N1 pneumonia? *Signa Vitae* 2015;10(1):63.
- Chua F, Armstrong-James D, Desai SR, et al. The role of CT in case ascertainment and management of COVID-19 pneumonia in the UK: insights from high-incidence regions. *Lancet* 2020. <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S2213-2600%2820%2930132-6>.
- Braun F, Sauter D. Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clin Transl Immunology* 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6682551/>
- Liu W, Li H. COVID-19: Attacks the 1-Beta chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism. *ChemRxiv*. Preprint. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11938173.v8>.
- Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; 5(5):428-430.
- Bloomer SA, Brown KE. Iron-induced liver injury: A critical reappraisal. *Int J Mol Sci* 2019;20:2132.
- Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020;395(10229):1033-1034.
- Akerstrom S, Mousavi-Jazi M, Klingstrom J, et al. Nitric oxide inhibits the replication cycle of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* 2005;79(3):1966-1969.
- Liao M, Liu Y, Yuan J, et al. The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single-cell RNA sequencing. *medRxiv* 2020.02.23.20026690; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.23.20026690>.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling Thiols. Implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003;278:22546-54.



Obr. 1. Replikace viru SARS-CoV-2 v hostitelské buňce.

1: Spike protein virionu se napojuje na receptor ACE2. Enzymy TMPRSS2 a furin naštěpují virový spike protein a pomáhají proniknutí viru do buňky. 2: Virion uvolňuje svoji RNA. 3: RNA se přepisuje do buněčné DNA, tvoří se virové proteiny. 4: Tyto proteiny vytvářejí replikační komplex, tvoří se další RNA. 5: V Golgihou aparátu vytvářejí tyto proteiny a RNA nový virion. 6: Nový virion je uvolňován z buňky. Tento proces je v imunitních buňkách doprovázen jejich aktivací a prozánětlivou „cytokinovou bouří“. Ta může vést k respiračním příznakům, poškození a selhání vitálních orgánů. (Upraveno podle: Song Z, et al. *Viruses* 2019,11:59, Geng YJ, et al. *Cardiovasc Pathol* 2020;47:107228)

Jde tedy o mechanismus zprostředkovaný vlivem viru na hemoglobin.¹²

Makrofágy potřebují k produkci NO a oxidativního vzplanutí, které používají k destrukci patogenů, velké množství askorbátu, jež přijímají z plasmy. Pokud nemají dost askorbátu, pak jejich funkce, včetně produkce NO a ničení patogenů, selhává. Jejich počet ale roste, protože je narušená schopnost zpětné vazby, která by regulovala počet monocytů, tj. buněk, z kterých makrofágy vznikají. U pacientů s COVID-19, postižených ARDS, se proto nachází zvýšené množství makrofágů.¹³ Deficit NO v makrofázích je pravděpodobně jednou z příčin cytokinové bouře u COVID-19.

Jaterní makrofágy jsou zdrojem aktivace NLP3 inflammasomu a sekrece cytokinu IL-1beta. Inflammasomy jsou proteinové oligomery, které aktivují zánětlivé procesy. Koronaviry SARS-CoV prostřednictvím viroporinů aktivují NLRP3 inflammasomy za účelem diseminace viru. Počet jaterních makrofágů v odezvě na přítomnost mimobuněčného hemu roste. Za normálních okolností je jejich počet regulován zpětnou vazbou na jejich mateřské buňky – monocyty. Pokud ale makrofágy nejsou schopné zajistit negativní zpětnou vazbu, která by vedla k regulaci počtu jejich mateřských buněk – monocytů a tím k regulaci produkce makrofágů (právě u COVID-19 tato zpětná vazba nefunguje), roste neregulovaně počet makrofágů, aktivuje se stále více inflammasomů a to dále podporuje cytokinovou bouři.

Pro syntézu NO je zásadní role kofaktoru enzymu NO-syntázy – tetrahydrobiopterinu

U pacientů s COVID-19 jsou přítomny funkčně vyčerpané T lymfocyty, a jejich počet je obvykle snížený. Pro jejich proliferaci je potřebný glutathion, k jehož aktivaci je nutná přítomnost askorbátu.

(BH4). Podávání vitamínu C zvyšuje produkci NO. Důvodem je fakt, že askorbát je potřebný pro regeneraci BH4, bez kterého k syntéze NO nemůže docházet.¹⁴ Endogenní NO potlačuje virovou replikaci. Rychlost jeho syntézy je závislá na dostupnosti BH4, který je aktivní pouze v redukovaném stavu. Pokud je oxidován volnými radikály, a nedojde k jeho následné aktivaci (redukci) askorbátem, syntéza NO se zastavuje. Jak ukázal výzkum, jiné antioxidanty v této roli nemohou askorbát nahradit.

Neutrofilly

Neutrofilly také používají askorbát pro intracelulární oxidativní vzplanutí (oxidative burst), potřebné pro likvidaci patogenů. Pacienti s COVID-19 mají zvýšené množství neutrofilů, zatímco počet lymfocytů je u nich snížený.¹⁵ Neutrofilly zabíjejí patogeny pomocí oxidativního vzplanutí za účasti NO a superoxidu.¹⁶ Pokud neutrofilly nemají dostatek NO, nemohou migrovat a pohlcovat patogeny. NO má i ochranný význam pro epi-

tel: chrání epitelální buňky před agresivním působením neutrofilů tím, že brání jejich adhezi k epitelu.¹⁷ Neutrofilly potřebují veliké množství askorbátu, aby zajistily regeneraci BH4 (tetrahydrobiopterinu) pro syntézu NO.¹⁸

Neutrofilly recyklují dehydroaskorbát (DHA) zpět na askorbát. Potřebují NO a glutathion, aby mohly migrovat na ta místa v organismu, kde jsou přítomny patogeny. K udržování glutathionu v redukovaném stavu (GSH) používají nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) vzniklý v pentózovém cyklu, v kterém je rate-limitujícím enzymem glukózo-6-fosfát dehydrogenáza (G6PD). Neutrofilly potřebují NADPH také pro tvorbu NET (neutrofilových extracelulárních pastí), které jsou prostředkem pro zachycování a usmrcování patogenů a bránění v jejich diseminaci. Jak neutrofilly, tak lymfocyty potřebují k zajištění své funkce vysokou hladinu askorbátu.^{19,20}

Lymfocyty

U pacientů s COVID-19 jsou přítomny funkčně vyčerpané T lymfocyty, a jejich počet je obvykle snížený. Pro jejich proliferaci je potřebný glutathion, k jehož aktivaci je nutná přítomnost askorbátu. DHA zvyšuje expresi G6PD v lymfocytech šestinásobně, což vede k významnému nárůstu hladiny glutathionu v lymfocytech. Existuje korelace mezi hladinou glutathionu a askorbátu v lymfocytech; po podání askorbátu stoupá i nitro-buněčný glutathion. Pacienti s COVID-19 mají obvykle lymfopenii. Ale pacienti se závažnou formou COVID-19 (s pneumonií) mají ještě mnohem výrazněji

snížený počet lymfocytů. A k dobré imunitě je potřebný správný poměr lymfocytů a neutrofilů. U nejméně závažnějších pacientů s COVID-19 (u těch, kteří museli být hospitalizováni na JIP) je tento poměr výrazně narušený.²¹

Rozdíly ve farmakokinetice kyseliny askorbové a askorbátu sodného

Na základě těchto patofyziologických předpokladů, tedy nezastupitelné roli vitamínu C pro funkci imunitních buněk, vyplývá i význam jeho dostatečné suplementace. Je třeba připomenout, že zánětlivé procesy vedou ke zvýšené spotřebě askorbátu v organismu a mají za následek jeho výrazný systémový deficit. Podle autorky řešerše¹ je pro suplementaci u osob postižených virovou infekcí kombinace perorálně podávané kyseliny askorbové a intravenózně aplikovaného askorbátu sodného. Obě formy se liší svým pH: kyselina má pH 1 až 2,5, askorbát sodný 5,6 až 7. Jejich biologická dostupnost se liší. Nedávno byl publikován farmakokinetický výzkum,²² v kterém byla po jednotlivých minutách měřena plasmatická hladina po perorálním podání kyseliny askorbové a intravenózní aplikaci askorbátu sodného. Výzkum ukázal, že hladina kyseliny askorbové rychle stoupá, po vstupu do buněk rychle klesá, ale poté co dochází k její regeneraci, hladina opět stoupá, a tento děj se opakuje, ale peaky jsou stále nižší. Naproti tomu hladina askorbátu sodného po intravenózním podání stoupá pomaleji, ale postupně, bez výrazných výkyvů. Hladina askorbátu (po i.v. aplikaci) postupně převyšuje hladinu kyseliny askorbové, která byla podána per os. Farmakokinetika perorálně podané kyseliny askorbové se tedy významně liší od farmakokinetiky intravenózně podaného askorbátu sodného.

Souhrn

Koronavirus SARS-CoV-2 napadá plicní buňky pomocí spike proteinu, který se váže na receptor ACE2 na povrchu buněk. Napadá hem v erytrocytech, užívá porfyriny jako „trojské koně“ k infikování buněk. Extracelulární hem v plicích narušuje funkci alveolárních buněk II. typu. Extracelulární hem je nefunkční, nepřenáší kyslík. Nedostatek kyslíku aktivuje hypoxické dráhy, které mohou zvýšit hladinu furinových enzymů, jež aktivují produkci prozánětlivých cytokinů. Kyselina askorbová má schopnost zabránit stabilizaci hypoxického komplexu HIF-1alfa (tedy faktoru, který podporuje aktivitu furinových enzymů, zvyšujících nebezpečí šíření infekce).

Extracelulární hem destrukce NO mnohonásobně rychleji než normální hem. Destrukce NO vede k depleci kyseliny askorbové, která je potřebná pro regeneraci BH4. Deplece askorbátu poškozuje všechny imunitní buňky včetně neutrofilů, neutrofilů a lymfocytů, které závisí na recyklaci kyseliny askorbové, aby byl produkován NO, NADPH a glutathion. Zvyšuje se produkce ferritinu díky tomu, že stoupá množství makrofágů,

vychytávajících volné železo, vytěsněné viroporiny SARS-CoV-2 z hemu.

Poškození jater, nekontrolované uvolňování NLRP3 inflamasomů a zvýšená produkce cytokinů pokračuje, když počet jaterních makrofágů stoupá kvůli poruše zpětnovazebních mechanismů. Navýšení hladiny kyseliny askorbové perorálním podáním umožňuje makrofágům, aby nejen ničily virus, ale regulovaly své mateřské buňky – monocyty. Tím se může normalizovat jak počet makrofágů, tak jejich funkce.

Nedostatek glutathionu způsobuje funkční vyčerpání lymfocytů. Navýšení hladiny kyseliny askorbové perorálním podáním zvýší hladinu glutathionu tím, že podporuje expresi G6PD, čímž se zvyšuje produkce NADPH. Zvýšená hladina glutathionu vede k normalizaci počtu lymfocytů.

Nedostatek NO a glutathionu snižuje schopnost neutrofilů migrovat a produkovat oxidativní vzplanutí. Nedostatek NADPH brání neutrofilům v produkci superoxidu důležitého pro zničení patogenů za účasti neutrofilních extracelulárních pastí. Kyselina askorbová zvyšuje hladinu NO, NADPH a glutathionu v neutrofilech a tím podporuje jejich funkčnost.

Imunitní buňky jsou vitálně závislé na dodávání vitamínu C. Kombinace perorálního podávání kyseliny askorbové a intravenózní aplikace askorbátu sodného je podle autorky řešerše¹ optimální pro podporu imunity u pacientů s COVID-19.

Suplementace vitamínu C

Pokud jde o dávkování vitamínu C v souvislosti s onemocněním COVID-19, uvádí autorka,¹ že upřednostňuje perorální podávání kyseliny askorbové, a to v následujících dávkách:

Prevence: zvýšit perorální dávky oproti běžné potřebě. Osoby se známkami virové infekce: začít dávkou 3 g, za hodinu 1 g, dále stejná dávka v intervalu 1 hodiny. Tento cyklus opakovat každých 8 hodin. Když příznaky zmizí, přejít na rytmus 1–2 g/hod. do dosažení celkové dávky 8–12 g/24 hod. Během závažných infekcí stoupá potřeba vitamínu C.

Intravenózně se vitamin C podává obvykle ve formě askorbátu sodného. Intravenózní podávání vitamínu C snižuje systémový oxidativní stres, způsobený prozánětlivými cytokiny. Infuze má být podávána rychlostí 500 mg—1 g za hodinu (celkovou denní dávkou autorka nespecifikuje). Intravenózní aplikace je vhodná především pro osoby, které nemohou perorálně přijímat kyselinu askorbovou, ale je vhodná i jako doplněk perorálního podání kyseliny askorbové. Intravenózní aplikace askorbátu je podle autorky vhodný způsob, jak podpořit jaterní funkce, umožnit antioxidační ochranu buněk a tkání. Přidání intravenózní aplikace vitamínu C k perorálnímu podávání podle autorky umožňuje, aby perorálně podaná kyselina askorbová podporovala regeneraci hemu, podporovala funkci imunitních buněk a působila proti případné eskalaci cytokinové bouře.¹

LITERATURA

- Guo YR, Cao QD, Hong ZS, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res* 2020;7(1):11.
- Chen Y, Junger WF. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol* 2012;844:115–24.
- Galkina SI, Golenkina EA, Vityasova VM, et al. Nitric oxide in life and death of neutrophils. *Curr Med Chem* 2019;26(31):5764–5780.
- Saini R, Singh S. Inducible nitric oxide synthase: An asset to neutrophils. *J Leukoc Biol* 2019;105:49–61.
- Elferink JGR, De Koster BM. Glutathione-induced enhancement of neutrophil locomotion. *Immunobiology* 1991;184:25–36.
- Azevedo EP, Rochael NC, Guimaraes-Costa AB, et al. A metabolic shift toward pentose phosphate pathway is necessary for Amyloid Fibril-andPhorbol12-Myristate 13-Acetate-induced Neutrophil Extracellular Trap (NET) formation. *J Biol Chem* 2015;290(36):22174–83.
- Zheng M, Gao Y, Wang G, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular Molecular Immunol* 2020;17:533–535.
- Fonorow O, Hickey S. Unexpected early response in oral bioavailability of ascorbic acid. *Townsend Letter* 2020. <https://www.townsendletter.com/article/online-unexpected-oral-vitamin-c-response/>