



**Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**

Dziedzina: nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Dyscyplina: nauki medyczne

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg  
burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19**

mgr Diana Martonik

Promotor pracy: dr hab. Anna Parfieniuk-Kowerda

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Rogalska

Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii

Kierownik: prof. dr hab. Robert Flisiak

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia  
w Szkole Doktorskiej UMB

Białystok, 2023

*Pragnę serdecznie podziękować Promotor niniejszej pracy **dr hab. Annie Parfieniuk-Kowerdzie** za wsparcie merytoryczne podczas przygotowywania niniejszej rozprawy, a także za przekazaną wiedzę i wyrozumiałość.*

*Dziękuję również **prof. dr hab. Robertowi Flisiakowi** oraz wszystkim **współpracownikom** z Kliniki Chorób Zakaźnych i Hepatologii za wsparcie i życzliwość w trakcie realizacji pracy, a także **mgr Aleksandrze Starosz** i **dr hab. Kamilowi Grubczakowi** za pomoc w realizacji badań.*

***Rodzicom, bratu i przyjaciołom** dziękuję za obecność, okazaną mi cierpliwość i wsparcie.*

## **SPIS TREŚCI**

<b>1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ</b>	<b>4</b>
1.1. PRACA PRZEGLĄDOWA	4
1.2. PRACA ORYGINALNA	4
<b>2. ZESTAWIENIE PUBLIKACJI</b>	<b>5</b>
<b>3. WSTĘP</b>	<b>6</b>
<b>4. CEL PRACY</b>	<b>9</b>
<b>5. MATERIAŁ I METODY</b>	<b>10</b>
5.1. BADANA POPULACJA	10
5.2. POZYSKIWANIE MATERIAŁU I IZOLACJA JEDNOJĄDRZASTYCH KOMÓREK KRWI OBWODOWEJ (PBMC)	11
5.3. ANALIZA IMMUNOENZYMATYCZNA	11
5.3.1. <i>ELISA</i>	11
5.3.2. <i>Multiplex</i>	11
5.4. ANALIZA CYTOMETRYCZNA	12
5.5. ANALIZA STATYSTYCZNA	13
<b>6. WYNIKI</b>	<b>14</b>
<b>7. WNIOSKI</b>	<b>16</b>
<b>8. PRACA PRZEGLĄDOWA: THE ROLE OF TH17 RESPONSE IN COVID-19</b>	<b>17</b>
<b>9. PRACA ORYGINALNA: EFFECT OF ANTIVIRAL AND IMMUNOMODULATORY TREATMENT ON A CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH COVID-19</b>	<b>27</b>
<b>10. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM</b>	<b>47</b>
<b>11. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM</b>	<b>49</b>
<b>12. PIŚMIENNICTWO</b>	<b>51</b>
<b>13. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ NA PRZEPROWADZENIE BADAŃ</b>	<b>53</b>
<b>14. INFORMACJA O CHARAKTERZE UDZIAŁU WSPÓLAUTORÓW W PUBLIKACJACH WRAZ Z SZACUNKOWYM OKREŚLENIEM PROCENTOWEGO WKŁADU</b>	<b>54</b>

# **1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską**

## **1.1. Praca przeglądowa**

Martonik D, Parfieniuk-Kowerda A, Rogalska M, Flisiak R. The Role of Th17 Response in COVID-19. *Cells*. 2021; 10(6):1550. doi: 10.3390/cells10061550.

IF – 7,666, MNiSW – 140 pkt.

## **1.2. Praca oryginalna**

Martonik D, Parfieniuk-Kowerda A, Starosz A, Grubczak K, Moniuszko M, Flisiak R. Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19. *Front. Immunol.* 2023; 14:1222170. doi: 10.3389/fimmu.2023.1222170.

IF – 7,300, MNiSW – 140 pkt.

## 2. Zestawienie publikacji

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	2	14,966	280
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	10	30,231	940
Streszczenia zjazdowe	7	-	-
<b>Razem</b>	<b>19</b>	<b>45,197</b>	<b>1220</b>

### 3. Wstęp

COVID-19 jest ostrą chorobą zakaźną układu oddechowego wywołaną zakażeniem wirusem SARS-CoV-2, należącym do grupy koronawirusów (CoVs). Jest to duża grupa otoczkowych wirusów zawierających jednoniciowy RNA o dodatniej polaryzacji, zakażających ssaki oraz ptaki. Dotychczas rozpoznano 6 gatunków CoVs patogennych dla człowieka (HCoVs), które powodowały zakażenia dróg oddechowych. Dwa z nich, o wysokiej zjadliwości (SARS-CoV oraz MERS-CoV) były przyczyną szczyrzających epidemii, które udało się ograniczyć metodami kontroli sanitarno-epidemiologicznej. Inne HCoVs są częstą (15-30%) przyczyną zakażeń górnych dróg oddechowych wśród ludzi (1, 2). Transmisja zakażeń SARS-CoV-2 odbywa się drogą kropelkową oraz przez zanieczyszczone przedmioty. Ze względu na fakt, że wirus jest obecny w wielu płynach ustrojowych (m.in. wydzielina z nosa i gardła, płwocina, łzy czy krew), nie wyklucza się innych dróg transmisji (3). Okres inkubacji COVID-19 wynosi 5 dni, a wśród objawów dominuje gorączka, kaszel, duszność oraz bóle mięśni (4).

Cytokiny odgrywają ważną rolę w immunopatologii zakażeń wirusowych. Szybka i dobrze skoordynowana odpowiedź układu immunologicznego stanowi pierwszą linię obrony w infekcji wirusowej. Jednakże zaburzona, nadmierna odpowiedź immunologiczna może powodować efekt odwrotny od zamierzonego, powodując uszkodzenie organizmu (5). Zjawisko „burzy cytokinowej” jest patologiczną reakcją układu immunologicznego charakteryzującą się szybką proliferacją i hiperaktywacją limfocytów T, makrofagów oraz komórek NK, a także nadprodukcją cytokin prozapalnych i mediatorów chemicznych uwalnianych w wyniku immunologicznej i nieimmunologicznej odpowiedzi organizmu. Uogólniona reakcja zapalna w przebiegu „burzy cytokinowej” w COVID-19 jest obarczona wysokim wskaźnikiem śmiertelności. Nieprawidłowe uwolnienie mediatorów prozapalnych prowadzi do apoptozy komórek nabłonka i śródbłonka tkanki płucnej powodując uszkodzenie mikrokrążenia, a także bariery nabłonkowej pęcherzyków płucnych, a to prowadzi do wycieku naczyniowego, obrzęku pęcherzykowego oraz hipoksji (6). Badania sugerują, że ciężkość przebiegu COVID-19 związana jest z podwyższonym poziomem mediatorów zapalnych, takich jak interleukiny (m.in. IL-2, IL-6, IL-10, IL-17), TNF, CCL2, IP-10, a także CRP, ferrytyny oraz D-dimerów. Wykazano, że podwyższony poziom interleukiny 6 wysoce koreluje ze śmiertelnością z powodu COVID-19 (7).

Dziewicze limfocyty T (ang. naïve T cells) CD4<sup>+</sup> różnicują się w kilka podgrup komórek efektorowych, w zależności od ich funkcji i uwalnianych cytokin. Główne podgrupy to pomocnicze limfocyty T typu 1 (Th1), pomocnicze limfocyty T typu 2 (Th2), pomocnicze

limfocyty T typu 17 (Th17) i regulatorowe limfocyty T (Treg) (8). Zwiększona ekspresja transduktora sygnału i aktywatora transkrypcji 1 (STAT1) oraz czynnika transkrypcyjnego T-box 21 (TBX21) indukuje komórki o fenotypie Th1 i produkcję interleukiny 2 (IL-2), interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i czynnika martwicy nowotworów (TNF). Komórki Th1 są odpowiedzialne za pośredniczenie w odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym poprzez promowanie aktywacji makrofagów, limfocytów B, komórek NK i limfocytów T CD8+. Mimo że komórki Th1 są niezbędne do usuwania patogenów wewnątrzkomórkowych, nadmierna odpowiedź Th1 związana jest z chorobami takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów i stwardnienie rozsiane (9, 10). Badania nad COVID-19 wykazały korzystną rolę odpowiedzi Th1 skierowanej przeciwko SARS-CoV-2 w ustępowaniu objawów oraz infekcji u osób w okresie rekonwalescencji. Natomiast komórki Th2 aktywowane przez zwiększoną ekspresję STAT6 i białka wiążącego GATA 3 (GATA3) wytwarzają IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 i są odpowiedzialne za pośredniczenie w odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom zewnątrzkomórkowym poprzez promowanie aktywacji eozynofili, bazofili i komórek tucznych. Dysregulacja odpowiedzi Th2 jest związana z zaostrzeniem reakcji alergicznych i chorób autoimmunologicznych, takich jak toczeń rumieniowaty układowy (9, 11). W układzie odpornościowym komórki Th17 odgrywają zarówno rolę ochronną, jak i patogenną, dlatego fenotyp ten został powiązany z przewlekłym stanem zapalnym i chorobami autoimmunologicznymi. Komórki Th17 wytwarzają wiele cytokin, w tym IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), IL-10 i IFN- $\gamma$  (12-14). Coraz więcej badań sugeruje, że odpowiedź Th17 odgrywa ważną rolę w patogenezie zapalenia płuc wywołanego przez COVID-19. Zaostrzenie odpowiedzi immunologicznej następuje poprzez uwalnianie cytokin, takich jak IL-17 i GM-CSF, promowanie migracji neutrofilów i osłabienie odpowiedzi Treg. W przeciwieństwie do komórek Th17, komórki Treg wykazują ekspresję mediatorów przeciwzapalnych (IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$ ) i odgrywają ważną rolę w osłabianiu nadmiernej aktywności układu odpornościowego (15).

Tocilizumab jest rekombinowanym, humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, wiążącym się z receptorami IL-6, wywierającym działanie immunosupresyjne i osłabiającym aktywność IL-6. Obecnie stosowany jest on głównie w chorobach autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów. Badania wskazują, że podanie tocilizumabu ma, w określonych warunkach, korzystny wpływ na przebieg i wygaszenie burzy cytokinowej, wywołanej infekcją wirusową. Badania kliniczne wykazały, że tocilizumab jest skuteczny w leczeniu ciężkich stanów z obustronnym zajęciem płuc i podwyższonym poziomem IL-6 (4, 5).

Glikokortykosteroidy (GKS) są szeroko stosowane w leczeniu pacjentów w krytycznym stanie zainfekowanych przez inne HCoV, m.in. MERS i SARS. GKS wykazują efekty farmakologiczne przy każdej zastosowanej terapeutycznie istotnej dawce, poprzez klasyczne mechanizmy genomowe. Niektóre efekty immunosupresyjne oparte są na indukcji transkrypcji genowej i syntezy inhibitorów białek NF- $\kappa$ B, które powodują zahamowanie syntezy kolejnych białek takich jak interleukiny 1 i 6. Zmniejszają też proliferację, aktywację, różnicowanie i przetrwanie zarówno limfocytów T, jak i makrofagów. Czas podania, a także początkowa dawka GKS mają ogromne znaczenie dla rezultatu leczenia pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby. Zbyt wczesne podanie hamuje inicjację mechanizmów obronnych organizmu, zwiększając tym samym poziom wirerii i ostatecznie prowadząc do niekorzystnych konsekwencji. W związku z tym GKS stosowane są głównie u pacjentów z ciężką chorobą, u których występuje uogólniona reakcja zapalna z „burzą cytokinową”. Zahamowanie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej poprzez terminowe podanie GKS we wczesnym stadium „burzy cytokinowej” skutecznie zapobiega ostrej niewydolności oddechowej, chroniąc funkcje życiowe pacjentów (4, 5).



## 4. Cel pracy

1. Analiza wpływu leczenia na przebieg „burzy cytokinowej” u pacjentów z COVID-19, ze szczególnym uwzględnieniem leczenia immunomodulującego;
2. Ocena wybranych subpopulacji limfocytów T i profilu cytokin wydzielanych podczas zakażenia SARS-CoV-2 oraz ich korelacja z ciężkością przebiegu choroby;
3. Ocena poziomu wewnątrzkomórkowej ekspresji IL-17A oraz IL-22 przez wybrane subpopulacje limfocytów.

## 5. Materiał i metody

### 5.1. Badana populacja

Do badania włączono 44 pacjentów z COVID-19 hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku od stycznia do maja 2021 r., u których zastosowano leczenie tocilizumabem, glikokortykosteroidami i/lub remdesiwirem. Zakażenie SARS-CoV-2 zostało potwierdzone za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) w certyfikowanym ośrodku diagnostycznym przed przyjęciem do szpitala. Ponadto 20 zdrowych ochotników zaszczepionych przeciwko SARS-CoV-2 zostało włączonych do grupy kontrolnej.

Przed i w trakcie leczenia wykonywano pomiary parametrów życiowych uwzględnione w zmodyfikowanej skali wczesnego ostrzegania (MEWS) (saturacja, częstość akcji serca, ciśnienie krwi, częstość oddechów, temperatura ciała, czujność, diureza), a także oznaczenia laboratoryjne m.in. morfologia, parametry krzepnięcia, białka ostrej fazy i inne badania niezbędne do właściwej opieki zgodnej z dobrą praktyką kliniczną. Skala MEWS pozwala na klasyfikację pacjentów w zależności od ich stanu klinicznego:

1. Typ bezobjawowy lub łagodny
2. Stabilni pacjenci z objawami ze strony układu oddechowego i/lub ogólnoustrojowymi
3. Pacjenci niestabilni klinicznie z niewydolnością oddechową
4. Pacjenci w stanie krytycznym (zespół ostrej niewydolności oddechowej).

Z badania wykluczono pacjentów z bezobjawową/łagodną chorobą oraz pacjentów, u których obecność zmian zapalnych w płucach nie została potwierdzona w badaniach obrazowych. Dodatkowymi kryteriami wykluczającymi były: obecność chorób autoimmunologicznych, nowotworów złośliwych i stosowanie leczenia immunomodulującego chorób innych niż COVID-19. Postępowanie i leczenie były zgodne z aktualnymi krajowymi zaleceniami dotyczącymi COVID-19 (16, 17).

Remdesiwir otrzymali pacjenci przyjęci do szpitala w ciągu pierwszego tygodnia od wystąpienia objawów, deksametazon otrzymali pacjenci z zastosowanym leczeniem przeciwwirusowym, którzy wymagali również tlenoterapii, a tocilizumab otrzymali pacjenci ze stężeniem IL-6 powyżej 100 pg/ml. Leczenie sklasyfikowano w następujący sposób: a) terapia przeciwwirusowa - remdesiwir; b) terapia immunomodulująca - tocilizumab lub/i

deksametazon; c) terapia mieszana - połączenie leczenia przeciwwirusowego i immunomodulującego.

Pacjenci z saturacją (SpO<sub>2</sub>) wynoszącą 90% lub mniej, którzy wymagali tlenoterapii wysokoprzepływowej lub nieinwazyjnej wentylacji mechanicznej z dwupoziomowym dodatnim ciśnieniem w drogach oddechowych (BiPAP) w celu skorygowania hipoksemii, zostali sklasyfikowani jako osoby z ciężkim COVID-19. Pacjenci, którzy nie spełniali kryteriów ciężkiego COVID-19, byli klasyfikowani jako umiarkowani.

## **5.2. Pozyskiwanie materiału i izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC)**

Od każdego uczestnika pobrano 7,5 ml krwi do probówki S-Monovette z aktywatorem skrzepu (Sarstedt, Niemcy) i 4,9 ml krwi do probówki S-Monovette z EDTA (Sarstedt, Niemcy) przy przyjęciu do szpitala przed zastosowaniem leczenia oraz w piątym dniu leczenia. Krew odwirowano, a surowicę i osocze zamrożono w temperaturze -80°C. Aby uzyskać PBMC, pozostałą krew odwirowano w gradiencie gęstości (Pancoll 1,077 g/l, PAN Biotech, Niemcy), następnie komórki dwukrotnie przepłukano buforowaną fosforanem solą fizjologiczną bez wapnia i magnezu (PBS; Corning, USA) i zamrożono w płodowej surowicy bydlęcej (PAN Biotech, Niemcy) z 10% dodatkiem dimetylosulfotlenku (Sigma-Aldrich, USA).

## **5.3. Analiza immunoenzymatyczna**

### **5.3.1. ELISA**

Testy immunoenzymatyczne do ilościowego wykrywania IL-17A, IL-17F, IL-22 i IL-23 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) przeprowadzono zgodnie z protokołami producenta, a poziom absorbancji odczytano przy długości fali 450 nm przy użyciu czytnika mikropłytek BioTek EL800 (Agilent Technologies, USA). Poziom każdego biomarkera wyrażono w pg/ml.

### **5.3.2. Analiza multipleksowa**

Do ilościowego oznaczenia biomarkerów w surowicy, w tym: B7-H3, CCL2, CCL5, CXCL10, IFN-alfa, IFN-gamma, IL-1 beta, IL-4, IL-6, IL-6R, IL-10, IL-13, IL-21, IL-28B, IL-33, GM-CSF, TIM-1 użyty został zestaw Luminex Discovery Assay (R&D Systems, USA).

Pomiary przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu systemu Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, USA). Poziom każdego biomarkera wyrażono w pg/ml.

#### 5.4. Analiza cytometryczna

Po rozmrożeniu, komórki PBMC zawieszono w pożywce hodowlanej RPMI 1640 z 10-procentowym dodatkiem cielej surowicy płodowej (PAN Biotech, Niemcy) oraz zweryfikowano żywotność komórek wykorzystując kamerę Burkera oraz 0,4% roztwór błękitu trypanu (komórki wykazywały żywotność na poziomie 95-100%). Do analizy cytometrycznej komórek Th17 i Th22 wykorzystano 500 000 komórek, których ocena fenotypu została poprzedzona 4-godziną inkubacją w obecności koktajlu aktywującego leukocyty z brefeldyną A (BD Pharmingen; BD Bioscience, CA, USA) w temperaturze 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Do wykazania obecności zewnątrzkomórkowych markerów limfocytów CD4 i CD8 wykorzystano następujące przeciwciała monoklonalne sprzężone z fluorochromami: anti-CD4 FITC (klon RPA-T4) i anti-CD8 PE-Cy7 (klon RPA-T8) (BD Bioscience, CA, USA). Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej, bez dostępu do światła przez 25 min a następnie niezwiązane przeciwciała odplukano wykorzystując buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej bez jonów wapnia i magnezu (PBS; Corning, VA, USA). Następnie komórki poddano procesowi permabilizacji wykorzystując do tego Permeabilization Buffer 2 (BD Bioscience, CA, USA), ponownie wypłukano oraz wykonano barwienie wykrywające wewnątrzkomórkową produkcję cytokin: anti-IL-17A PE (klon SCPL1362) i anti-IL-22 Alexa Fluor 647 (klon MH22B2) (BD Bioscience, CA, USA). Ponownie komórki poddano inkubacji przez 25 min w warunkach braku dostępu do światła oraz temperatury pokojowej. Następnie, po upływie tego czasu niezwiązane przeciwciała odplukano z wykorzystaniem PBS. Po zakończonym procesie barwienia komórki zabezpieczono z wykorzystaniem buforu utrwalającego CellFix (BD Bioscience, CA, USA) oraz przechowywano w temperaturze 4°C do momentu oznaczenia na cytometrze przepływowym FACS Calibur (BD Bioscience, CA, USA). Wstępnie uzyskane wyniki następnie analizowano z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania FlowJo® (Tree Star Inc., OR, USA).

Uwzględnione w analizie limfocyty zostały początkowo poddane stratyfikacji na podstawie ich morfologii: względnej wielkości (FSC; *forward scatter*) oraz ziarnistości (SSC; *side scatter*). Następnie bazując na pozytywnej ekspresji markera (CD4<sup>+</sup>) wyodrębniono limfocyty pomocnicze Th (*T helper cells*) oraz cytotoksyczne Tc (*T cytotoxic cells*) CD8<sup>+</sup>. Końcowym etapem analizy było poddanie ocenie poziomu ekspresji IL-17A oraz IL-22

w wymienionych subpopulacjach limfocytów oraz przedstawienie uzyskanych danych w postaci odsetka limfocytów posiadających ekspresję wskazanej cząsteczki jak też bezwzględnej liczby komórek.

## **5.5. Analiza statystyczna**

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania GraphPad (Prism Software, USA). Analizę porównawczą między grupami, w zależności od rozkładu, przeprowadzono za pomocą testu t lub testu U Manna-Whitneya dla zmiennych ilościowych i chi-kwadrat dla zmiennych jakościowych. Do porównania między grupami przed i w trakcie leczenia zastosowano test t dla par i test rang Wilcoxona, a następnie post hoc Benjamini, Krieger i Yekutieli. Aby ocenić panoramiczny profil biomarkerów w surowicy i bezwzględnej liczby komórek we krwi obwodowej, dane znormalizowano za pomocą transformacji logarytmicznej. Korelację między analizowanymi parametrami oceniano za pomocą testu korelacji Spearmana. Różnice uznawano za istotne statystycznie, jeśli p wynosiło mniej niż 0,05.

## 6. Wyniki

Wszystkie grupy wiekowe w populacji są podatne na zakażenie SARS-CoV-2, zasadniczo jednak mężczyźni w wieku powyżej 60 lat z chorobami współistniejącymi są bardziej narażeni na rozwój ciężkiej choroby wymagającej hospitalizacji. W badanej grupie większość pacjentów stanowili mężczyźni (72,7%) z medianą wieku wynoszącą 63 lata, podczas gdy w grupie kontrolnej większość stanowiły kobiety (55,0%) z medianą wieku wynoszącą 57 lat. Najczęściej występującymi chorobami współistniejącymi zarówno u pacjentów, jak i zdrowych ochotników były nadciśnienie tętnicze (odpowiednio 56,8% i 20,0%) oraz dyslipidemia (odpowiednio 18,2% i 10,0%). Szczegółowa charakterystyka pacjentów i zdrowych ochotników została przedstawiona w Tabeli 1 (strona 31. niniejszej rozprawy).

Badania laboratoryjne wykorzystywane są w ocenie ryzyka i prognozowaniu skutków COVID-19, gdyż wczesne rozpoznanie progresji choroby ma zasadnicze znaczenie dla skutecznego leczenia. W przeprowadzonym badaniu pacjenci wykazywali znacznie wyższe poziomy ALT, AST, CRP i D-dimerów oraz niższą liczbę limfocytów i płytek krwi niż zdrowi ochotnicy w grupie kontrolnej. Ponadto pacjenci mieli podwyższone poziomy PCT, fibrynogenu i LDH. Co więcej, pacjenci z ciężką postacią choroby mieli znacznie wyższy poziom LDH niż pacjenci z umiarkowaną chorobą, przy braku istotnie statystycznej różnicy w pozostałych parametrach laboratoryjnych. Szczegółowe dane przedstawiono w Tabeli 2 (strona 32. niniejszej rozprawy) oraz w materiałach uzupełniających w Tabeli Suplementarnej 2 (strona 46. niniejszej rozprawy).

Zaburzenia odpowiedzi immunologicznej skutkujące nadmiernym stanem zapalnym są cechą charakterystyczną COVID-19. Oprócz bezpośredniego uszkodzenia płuc wywołanego wirusem, nadmierna aktywacja układu odpornościowego w odpowiedzi na inwazję SARS-CoV-2 pobudza komórki układu odpornościowego do uwalniania zarówno cytokin pro-, jak i przeciwzapalnych. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że stężenia CCL5/RANTES, GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-10 i CXCL10/IP-10 były znacząco podwyższone u pacjentów z COVID-19 w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami. Co więcej, przy przyjęciu pacjenci z ciężką chorobą mieli istotnie wyższe stężenie IL-10 i CXCL10/IP-10 niż pacjenci z umiarkowaną chorobą. Pacjenci z COVID-19 wykazywali również znacznie wyższy poziom IL-17A, IL-17F i IL-22, bez istotnej statystycznie różnicy pomiędzy pacjentami z umiarkowanym i ciężkim przebiegiem choroby (Rycina 4A, strona 33. niniejszej rozprawy).

W badanej grupie pacjenci mieli znacznie obniżoną bezwzględną liczbę komórek CD4+, jak i CD8+ (Rycina 4B, strona 33. niniejszej rozprawy). Co więcej, pomimo zmniejszonej bezwzględnej liczby limfocytów T CD4+ i CD8+, komórki te wykazywały nadmierną aktywację i zwiększoną ekspresję IL-17A i IL-22. Wykazano istotnie wyższy odsetek zarówno limfocytów T CD4+, jak i CD8+ wydzielających IL-17A oraz limfocytów T CD4+ wydzielających IL-22 u pacjentów z COVID-19 (Rycina 5, strona 34. niniejszej rozprawy). W trakcie leczenia pacjenci z ciężkim przebiegiem mieli niższą bezwzględną liczbę limfocytów, w tym CD4 + i CD8 +, co może być związane z tym, że w większości ciężkich przypadków choroba postępowała podczas hospitalizacji. Natomiast pacjenci z umiarkowaną postacią choroby wykazywali odpowiedź na leczenie, poprzez wzrost bezwzględnej liczby limfocytów T CD4+ i CD8+ (Rycina 7, strona 36. niniejszej rozprawy).

Liczba dostępnych badań dotyczących wpływu leczenia przeciwwirusowego i immunomodulującego na profil cytokin u pacjentów z COVID-19 jest niewielka, stąd wpływ leczenia na odpowiedź immunologiczną jest wciąż niejasny. W przeprowadzonym badaniu leczenie remdesiwirem (RDV) spowodowało istotny spadek stężeń IL-6, IL-10, IFN-alfa i CXCL10/IP-10, co sugeruje wyciszenie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej u pacjentów otrzymujących leczenie przeciwwirusowe. Natomiast zastosowane leczenie immunomodulujące spowodowało znaczne obniżenie poziomu IL-10, IFN-alfa, CXCL10/IP-10 i B7-H3, a także zwiększenie poziomu IL-22 i IL-1 beta. Zastosowanie leczenia immunomodulującego ogranicza ekspresję cytokin prozapalnych i pobudza ekspresję cytokin przeciwzapalnych, łagodząc w ten sposób uszkodzenia tkanek podczas infekcji. W badanej grupie połączenie leczenia przeciwwirusowego i immunomodulującego spowodowało znaczny spadek poziomów IL-17F, IL-10, IFN-alfa, CXCL10/IP-10 i B7-H3, a także wzrost IL-17A i IL-1 beta. Jednak wzrost poziomu cytokin prozapalnych, takich jak IL-17A i IL-1 beta, może być związany z większą liczbą ciężkich przypadków i zgonów w tej grupie (Rycina 9, strona 38. niniejszej rozprawy).

## 7. Wnioski

1. Zastosowanie leczenia przeciwwirusowego i/lub immunomodulującego spowodowało znaczące obniżenie ekspresji cytokin prozapalnych i zwiększenie bezwzględnej liczby komórek T.
2. Zakażenie SARS-CoV-2 powoduje zwiększoną ekspresję cytokin u hospitalizowanych pacjentów z COVID-19, a także limfopenię, w szczególności spadek liczby limfocytów T CD4+ i CD8+.
3. Pomimo zmniejszonej liczby limfocytów T CD4+ i CD8+, obie podgrupy wykazywały nadmierną aktywację i zwiększoną ekspresję IL-17A i IL-22, a zatem ukierunkowanie leczenia na odpowiedź typu Th17 może złagodzić reakcję zapalną u pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby.



# The Role of Th17 Response in COVID-19

Diana Martonik <sup>\*</sup>, Anna Parfieniuk-Kowerda, Magdalena Rogalska  and Robert Flisiak 

Department of Infectious Diseases and Hepatology, Medical University of Białystok, 15-540 Białystok, Poland; anna.parfieniuk@umb.edu.pl (A.P.-K.); magda.rogalska@umb.edu.pl (M.R.); robert.flisiak1@gmail.com (R.F.)

<sup>\*</sup> Correspondence: diana.martonik@umb.edu.pl

**Abstract:** COVID-19 is an acute infectious disease of the respiratory system caused by infection with the SARS-CoV-2 virus (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Transmission of SARS-CoV-2 infections occurs through droplets and contaminated objects. A rapid and well-coordinated immune system response is the first line of defense in a viral infection. However, a disturbed and over-activated immune response may be counterproductive, causing damage to the body. Severely ill patients hospitalised with COVID-19 exhibit increased levels of many cytokines, including Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and tumor necrosis factor (TNF). Increasing evidence suggests that Th17 cells play an important role in the pathogenesis of COVID-19, not only by activating cytokine cascade but also by inducing Th2 responses, inhibiting Th1 differentiation and suppressing Treg cells. This review focuses on a Th17 pathway in the course of the immune response in COVID-19, and explores plausible targets for therapeutic intervention.

**Keywords:** COVID-19 pneumonia; SARS-CoV-2; cytokines; Th17 response



**Citation:** Martonik, D.; Parfieniuk-Kowerda, A.; Rogalska, M.; Flisiak, R. The Role of Th17 Response in COVID-19. *Cells* **2021**, *10*, 1550. <https://doi.org/10.3390/cells10061550>

Academic Editor: Isabella Quinti

Received: 15 May 2021  
Accepted: 16 June 2021  
Published: 19 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

COVID-19 is an acute infectious disease of the respiratory system caused by infection with the SARS-CoV-2 virus (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), belonging to the coronavirus family. Coronaviruses (CoVs) are a large group of enveloped, positive-strand RNA viruses that infect mammals and birds. So far, seven species of human pathogenic CoVs (HCoVs) have been identified. Two of these, with high virulence Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) and Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus (MERS-CoV), caused widespread epidemics, which were limited by sanitary and epidemiological control methods. Other HCoVs are a common (15–30%) cause of upper respiratory tract infections in humans [1]. Transmission of SARS-CoV-2 infections occurs through droplets and contaminated objects. Due to the presence of the virus in many bodily fluids (including nasal and pharyngeal secretions, sputum, tears and blood), other transmission routes are not excluded [2]. The incubation period is five days, and the symptoms include fever, cough, dyspnea and muscle pain [3].

Upon hospital admission, patients exhibit many abnormalities in laboratory test results, including a decreased lymphocyte, monocyte and platelet count, as well as an increased level of C-reactive protein (CRP), D-dimers, lactate dehydrogenase (LDH), alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) [4]. Chest CT findings in patients with COVID-19 pneumonia include ground glass opacities (GGOs), crazy paving patterns and peripheral consolidation [5,6].

Cytokines play an important role in the immunopathology of viral infections. A rapid and well-coordinated immune system response is the first line of defense in a viral infection. However, a disturbed and over-activated immune response may be counterproductive, causing damage to the body. Excessive activation of immune system in response to both infectious and non-infectious agents causing production of pro-inflammatory cytokines is described as “cytokine storm syndrome” (CSS), an acute inflammatory reaction that

leads to multiple organ failure. Severely ill patients hospitalised with COVID-19 exhibit increased levels of Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and tumor necrosis factor (TNF) [1,3,7–13].

So far, CSS recognition criteria have not been well established, and the term is used for critically ill patients with high levels of pro-inflammatory cytokines [3]. Increasing evidence suggests that Th17 cells play an important role in the pathogenesis of COVID-19, not only by activating cytokine cascade but also by inducing Th2 responses, inhibiting Th1 differentiation and suppressing Treg cells [14,15].

The present review focuses on a Th17 pathway in the course of the immune response in COVID-19, and explores plausible targets for therapeutic intervention.

## 2. Mechanisms of SARS-CoV-2 Invasion

There are four distinguishable structural proteins: the spike (S), the membrane (M), the nucleocapsid (N) and the envelope (E) protein in SARS-CoV-2 structure. Furthermore, in SARS-CoV-2 infection, the entry-point receptor on the host cell is also angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). Interaction of SARS-CoV-2 spike protein via the receptor-bind domains (RBDs) with the cell receptor ACE2 induces the endocytosis, and enables entry into many different types of cells, including type II alveolar epithelial cells, monocytes and macrophages. Priming and activation of S protein by the transmembrane serine protease (TMPRSS) 2, TMPRSS4, Factor Xa or by cathepsin is needed in order to facilitate cell surface entry, thus enabling the fusion of SARS-CoV-2 virus with the host cells and viral replication [16,17]. It has been shown that SARS-CoV-2 has 10–20 times higher binding affinity to ACE2 than SARS-CoV, which may result in more effective viral transmission through droplets from individuals with COVID-19. More efficacious transmission and a longer incubation period may explain a much greater number of cases infected than of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) [7,18,19].

The role of ACE2 is the conversion of angiotensin II (Ang II) into angiotensin<sub>(1–7)</sub> (Ang<sub>(1–7)</sub>), which shows cardiovascular protective function through its vasodilatory, anti-inflammatory and antiproliferative effects. SARS-CoV-2 infection causes a decrease in ACE2 expression, resulting in the inhibition of its regulatory and protective functions. Moreover, the downregulation of ACE2 causes an increase of Ang II concentrations in the serum, which in addition to being a vasoconstrictor, has proliferative and pro-inflammatory properties [7,20–23].

The ACE2 is expressed in most tissues, but the highest expression has been found in the endothelial cells of blood vessels and epithelial cells of the respiratory tract, gastrointestinal tract and kidneys. Therefore, there is a variety of cell lines susceptible to SARS-CoV-2 [7,20,21]. New evidence suggests that among these, the highest replication rate occurs in pulmonary and intestinal cell lines. Furthermore, significant replication occurs in the hepatic and renal cells lines [18].

## 3. T Cells Differentiation

Naïve CD4<sup>+</sup> T cells differentiate into several subgroups of effector cells, depending on their function and released cytokines. The main subsets are T helper type 1 (Th1), T helper type 2 (Th2), T helper type 17 (Th17) and regulatory T (Treg) cells [24].

Increased expression of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and T-box transcription factor 21 (TBX21) induce Th1 phenotype cells and production of interleukin 2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor (TNF). Th1 cells are responsible for the mediation of immune responses against intracellular pathogens by promoting the activation of macrophages, B cells, NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells. Even though Th1 cells are essential for the clearance of intracellular pathogens, exaggerated Th1 response have been associated with diseases such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis [25,26]. Recent studies in COVID-19 provided evidence for the beneficial role of Th1 responses directed against SARS-CoV-2 for the resolution of symptoms and infection

in convalescent individuals. In contrast, Th2 cells activated by the increased expression of STAT6 and GATA binding protein 3 (GATA3) produce IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, and are responsible for the mediation of immune responses against extracellular pathogens by promoting the activation of eosinophils, basophils and mast cells. Dysregulation of Th2 responses have been associated with the exacerbation of allergic reactions and autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus [25,27]. Th17 cells, induced by RAR-related orphan receptor (ROR)  $\gamma$ t, ROR $\alpha$  and STAT3, produce IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22, and have been suggested to be crucial for autoimmune inflammation [24]. In comparison to the Th1 immune responses, the antigen-specific Th2 or Th17 responses were not detected in a convalescent state, since they have been suggested to play a role in the immune-driven lung injury and contributed to the ARDS progression through facilitating neutrophil recruitment [28,29].

In contrast, Treg cells are essential for inhibiting immune responses by suppressing the activity of a variety of cells. Tregs are induced by forkhead box protein 3 (Foxp3), and produce anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$  and IL-10 [30,31].

The direction of differentiation depends on many factors, but the most important role is played by the cytokines present during activation. Cytokines promoting Th1 cell differentiation are mainly IL-12 and IFN- $\gamma$ , while IL-4 and IL-2 contribute to Th2 cell formation [24]. Many cytokines contribute to the differentiation of Th17 cells. Naïve CD4<sup>+</sup> cells differentiate into Th17 under the synergistic exposure to TGF- $\beta$  and IL-6. In addition, IL-21 and IL-23 contribute to the formation of pathogenic Th17 cells, while IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 inhibit the process [32].

#### 4. Th17 Lineage

In the immune system, Th17 cells have both a protective and pathogenic role. Therefore, the Th17 phenotype has been associated with chronic inflammation and autoimmune diseases. A wide array of cytokines, including IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-10 and IFN- $\gamma$  are produced by the Th17 subset [30,32,33].

IL-17 attracts neutrophils and monocytes to the infected tissue and induces production of cytokines like G-CSF and IL-6 that promote innate inflammation and chemokines such as the C-X-C motif chemokine ligand (CXCL) 1, CXCL2 and CXCL10, which recruit myeloid cells to the site of infection. IL-17 is produced mainly by CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and innate lymphoid cells (ILCs), but under certain circumstances may be also produced by neutrophils. Studies have shown increased levels of IL-17A in patients with diseases such as psoriasis, asthma, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis [34–36].

IL-21 plays an important role in the differentiation and function of T follicular helper (Tfh) and Th17 cells. Furthermore, IL-21 is responsible for differentiation of B cells into plasma cells and the enhancement of immunoglobulin production. IL-21 has been associated with diseases such as systemic lupus erythematosus, primary Sjogren's syndrome, type 1 diabetes and psoriasis [37–40].

In contrast, IL-22 promotes proliferation in non-hematopoietic epithelial cells and fibroblasts in many tissues, including skin, lungs and the gastrointestinal tract. In addition, IL-22 is involved in tissue regeneration and the regulation of defense mechanisms at barrier surfaces. Nonetheless, increased concentrations of IL-22 have been demonstrated in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Moreover, IL-22 is strongly linked to cancer in many sites, including the skin, lung and colon, by its contribution to tumor growth and malignancy [41–43].

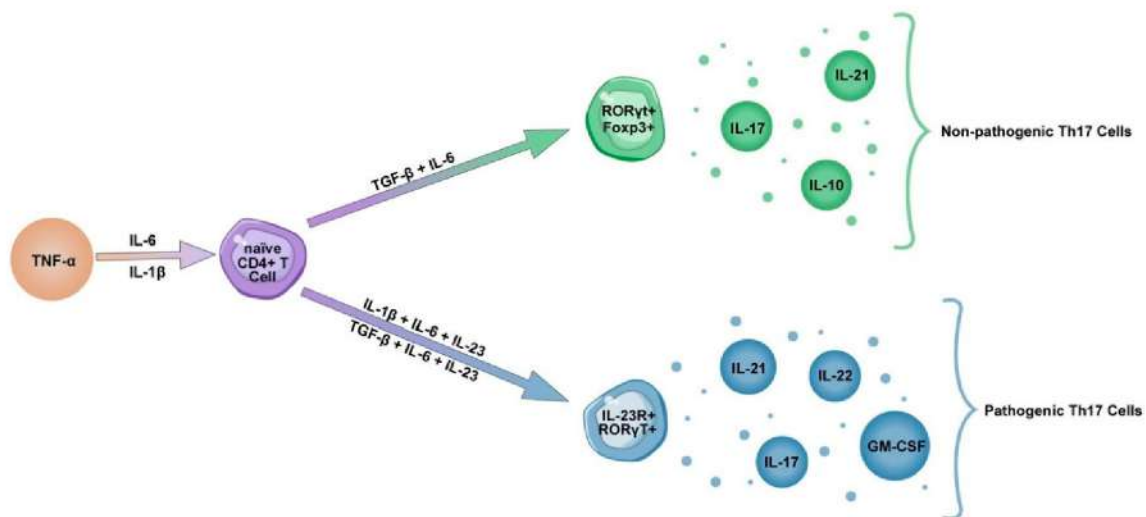
GM-CSF is produced at inflammation sites, and is involved in the proliferation of myeloid cells from progenitor cells. Furthermore, evidence shows its importance in managing functions of mature myeloid cells. Increased levels of GM-CSF have been found in patients with lung and colorectal cancer, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis [44–47].

IFN- $\gamma$  plays a crucial role in the clearance of virally infected cells through the promotion of cytotoxic T-cell responses. Additionally, IFN- $\gamma$  is responsible for the activation of

macrophages to produce a wide array of inflammatory mediators and increase tumoricidal activity of NK cells. Nevertheless, IFN- $\gamma$  has been associated with autoimmune diseases such as dermatomyositis, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [48–51].

### 5. IL-23 Influence on Th17 Pathogenicity

As previously mentioned, the synergistic influence of TGF- $\beta$  and IL-6, inducing transcription factor ROR $\gamma$ t, is needed for the development of Th17 cells. However, it has been demonstrated that exposure to IL-23 is essential for expansion of Th17 cells, and triggers their pathogenicity (Figure 1). IL-23 is a heterodimeric pro-inflammatory cytokine formed by a unique subunit p19, and shared with IL-12, subunit p40. IL-23 is produced by monocytes, macrophages and dendritic cells, as well as signals through transcriptional factors IL12-R $\beta$ 1 and IL-23R. In pathological states, excessive IL-23 signaling induces the production of pathogenic mediators, such as IL-17, IL-22, GM-CSF and TNF $\alpha$  promoting the recruitment of monocytes and granulocytes causing damage at the inflammation site, thus inducing chronic inflammation and the development of clinical symptoms [52–57].



**Figure 1.** Development of pathogenic Th17 cells. Synergistic exposure to TGF- $\beta$  and IL-6 induces transcription factors ROR $\gamma$ t and Foxp3 to produce IL-17, IL-21 and an anti-inflammatory cytokine IL-10. Another way of inducing Th17 cells is synergistic exposure to IL-6 and IL-1 $\beta$ , which are produced under influence of TNF $\alpha$ . However, exposure to IL-23 induces receptor IL-23R to produce IL-17, IL-21, IL-22 and GM-CSF, therefore making Th17 cells pathogenic. Furthermore, it has been shown that IL-23 reduces the concentrations of IL-10, additionally contributing to Th17 pathogenicity.

### 6. Th17 and Tc17 Cells in COVID-19

Increasing evidence suggests that the Th17 inflammatory response plays an important role in the pathogenesis of COVID-19 pneumonia. Exacerbation of the immune response occurs through the release of cytokines such as IL-17 and GM-CSF, the promotion of neutrophil migration and the downregulation of the Treg response. Unlike Th17 cells, Treg cells express anti-inflammatory mediators (IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ ) and play an important role in weakening overactive immune responses [35]. The Treg/Th17 cell ratio is decreased in patients with severe COVID-19 due to the decreased number of Treg cells, indicating the insufficient regulation of pro-inflammatory responses [58,59]. Furthermore, prior evidence shows that the Treg/Th17 balance is associated with the severity of uncontrolled systemic inflammation in Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) [60,61]. Therefore, the dysregulation of the Treg/Th17 cells ratio skewing towards the Th17 phenotype may contribute to the uncontrolled release of cytokine and chemokine cascades in COVID-19 patients, leading to aggravated inflammatory responses and tissue damage [35]. Several studies demonstrated increased levels of IL-17 and GM-CSF in peripheral blood and tears of patients with COVID-19, and a higher fraction of Th17

cells in bronchoalveolar lavage fluid of these patients [11,62–69]. Similarly, robust Th17 responses were observed in patients with MERS-CoV and SARS-CoV infections [70–72]. A strong Th17 response was also observed in H1N1 influenza virus infection [73]; moreover, prior evidence associated IL-17 with Acute Respiratory Distress Syndrome and Neonatal Respiratory Distress Syndrome (NRDS) [74,75]. Increased concentrations of IL-17 were found in plasma and alveolar fluid of patients with ARDS. In addition, when compared to survivors, significantly higher levels of IL-17 were found in a group of non-survivors. Furthermore, a negative correlation between the PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio and level of IL-17 was found in these patients [76]. Interestingly, it has been shown that in macaques infected with the simian immunodeficiency virus, the percentage of CD161<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tc17 cells producing IL-17 in lung tissue was four times higher than in peripheral blood. Additionally, these cells could secrete more IL-17 than those present in peripheral blood [77]. Thus, IL-17 might promote pulmonary inflammation, following the infection by neutrophil and monocyte migration to the lungs, and by activating other cytokine cascades (G-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) [11,78,79]. In addition, plasma from COVID-19 patients revealed a fourfold increase of the IFN- $\gamma$  levels, which activates macrophages to produce proinflammatory cytokines, indicating a Th1/Th17 response [11,80,81]. Elevated levels of IFN- $\gamma$  were also found in MERS-CoV infections [82]. Moreover, prior evidence shows that high concentrations of IFN- $\gamma$  in rapidly progressive interstitial lung disease associated with dermatomyositis positively correlated with the ground-glass opacity score (G-score) in CT [51].

Studies have shown increased levels of IL-21 and IL-22 in plasma of patients hospitalised with COVID-19 [83,84]. Moreover, prior evidence shows that IL-22 plays a crucial role in LPS-induced ALI [85]. Interestingly, higher concentrations of IL-21 and IFN- $\gamma$  have been also demonstrated in COVID-19 convalescent plasma [86].

Taken together, the evidence supports the involvement of a Th17 mediated response in the pathogenesis of pneumonia caused by SARS-CoV-2. Therefore, targeting the Th17 phenotype might be beneficial in patients with a dominant Th17 response.

## 7. Possible Treatment Strategy

Currently, there are several biological drugs targeting IL-17 (secukinab, brodalumab, ixekizumab) and IL-23 (guselkumab, gildrakizumab and risankizumab) approved for the treatment of rheumatologic and dermatologic diseases such as psoriasis. Furthermore, there are biological drugs that intervene in the cell differentiation towards Th17 phenotype through blocking STAT3, which seems to be crucial for the production of IL-17A cytokine. STAT3 activation is mediated by IL-6 and IL-23 through Janus kinase (JAK) 2 signaling pathway, and by IL-21 through the JAK1 and JAK3 signaling pathways. Since IL-23 triggers the pathogenicity of Th17 cells, blocking JAK signaling pathways may restrict the expansion of pathogenic Th17 cells [62]. Biologics can increase the risk of infection. However, there have been reports of psoriatic patients receiving biologic treatment with mild or asymptomatic COVID-19 manifestation, suggesting that IL-17 and IL-23 inhibitors may play a protective role in the setting of SARS-CoV-2 infection [87–89]. Decreased injury, such as pulmonary edema and leukocytes infiltration into alveoli, was demonstrated in the murine model of LPS-induced Acute Lung Injury after IL-17 antibody administration. Moreover, ALI mice showed decreased concentrations of TNF $\alpha$  and increased concentrations of anti-inflammatory IL-10 in plasma and alveolar fluid after the administration of the IL-17 blocking agent [76]. Evidence shows that the delivery of Th17 inhibiting therapy might prove effective in preventing lung tissue destruction. Therefore, more research is needed to assess the practicality of using this type of therapy in patients with COVID-19. There is currently a randomised phase II clinical trial to evaluate the efficacy and safety of secukinab, in addition to standard treatment for the management of novel coronavirus pneumonia registered in the Brazilian Clinical Trial Registry (RBR-5vpyh4). Another multicenter clinical trial investigating the use of ixekizumab in combination with anti-viral therapy in patients with severe COVID-19 infection has been registered in the Chinese Clinical Trial Registry (ChiCTR2000030703). In addition, there is a phase III randomised clinical

trial to evaluate the efficacy and safety of ixekizumab in combination with aldesleukin in patients with severe to critical COVID-19 (NCT04724629). Moreover, there are several clinical trials to evaluate JAK inhibitors. In the phase III multicenter clinical trial held in North and South America and Europe, ruxolitinib, a selective inhibitor of JAK1/JAK2, failed to reduce the number of COVID-19-hospitalised patients who experienced severe complications (RUXCOVID, NCT04362137). The German study on ruxolitinib in patients with COVID-19-induced ARDS (RuXoCoil, NCT04359290) is still under assessment. Another JAK inhibitor, baricitinib, has shown beneficial effects for COVID-19 treatment in combination with remdesivir in a global multicenter clinical study (NCT04401579). However, more research is needed to confirm its usefulness for the treatment of severe COVID-19 pneumonia.

## 8. Conclusions

Several pro-inflammatory mediators may promote the exacerbation of immune response causing hyperinflammation, and the current challenge is understanding how they modulate specific pathological situations to find suitable treatment. Patients with severe COVID-19 exhibit high levels of IL-17 and GM-CSF. Moreover, it has been shown that lung tissue destruction might be explained by recruitment of neutrophils mediated by Th17 cells. Thus, targeting Th17 response in the early stages of COVID-19 may alleviate the course of the disease and improve clinical outcomes.

**Funding:** This work received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
ALI	Acute Lung Injury
ALT	Alanine transaminase
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AST	Aspartate transaminase
CRP	C-reactive protein
CSS	Cytokine Storm Syndrome
CXCL	The C-X-C motif chemokine ligand
GATA3	GATA binding protein 3
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GGO	Ground-glass opacity
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Foxp3	Forkhead box protein 3
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cell
JAK	Janus kinase
LDH	Lactate dehydrogenase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus
NRDS	Neonatal Respiratory Distress Syndrome
RBD	Receptor-bind domain
ROR	RAR-related orphan receptor

SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tbet	T-box transcription factor TBX21
TNF	Tumor necrosis factor

## References

- 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*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chan, J.F.W.; Yuan, S.; Kok, K.H.; To, K.K.W.; Chu, H.; Yang, J.; Xing, F.; Liu, J.; Yip, C.C.Y.; Poon, R.W.S.; et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: A study of a family cluster. *Lancet* **2020**, *395*, 514–523. [[CrossRef](#)]
- Tang, Y.; Liu, J.; Zhang, D.; Xu, Z.; Ji, J.; Wen, C. Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shen, B.; Yi, X.; Sun, Y.; Bi, X.; Du, J.; Zhang, C.; Quan, S.; Zhang, F.; Sun, R.; Qian, L.; et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell* **2020**, *182*, 59–72. [[CrossRef](#)]
- Akçay, Ş.; Özlü, T.; Yılmaz, A. Radiological approaches to COVID-19 pneumonia. *Turk. J. Med. Sci.* **2020**, *50*, 604–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hu, L.; Wang, C. Radiological role in the detection, diagnosis and monitoring for the coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2020**, *24*, 4523–4528.
- Hojyo, S.; Uchida, M.; Tanaka, K.; Hasebe, R.; Tanaka, Y.; Murakami, M.; Hirano, T. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm. Regen.* **2020**, *40*, 1–7. [[CrossRef](#)]
- Bordoni, V.; Sacchi, A.; Cimini, E.; Notari, S.; Grassi, G.; Tartaglia, E.; Casetti, R.; Giancola, M.L.; Bevilacqua, N.; Maeurer, M.; et al. An Inflammatory Profile Correlates with Decreased Frequency of Cytotoxic Cells in Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 2272–2275. [[CrossRef](#)]
- Li, H.; Liu, L.; Zhang, D.; Xu, J.; Dai, H.; Tang, N.; Su, X.; Cao, B. SARS-CoV-2 and viral sepsis: Observations and hypotheses. *Lancet* **2020**, *395*, 1517–1520. [[CrossRef](#)]
- Tay, M.Z.; Poh, C.M.; Rénia, L.; Macary, P.A.; Ng, L.F.P. The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 363–374. [[CrossRef](#)]
- De Biasi, S.; Meschiari, M.; Gibellini, L.; Bellinazzi, C.; Borella, R.; Fidanza, L.; Gozzi, L.; Iannone, A.; Tartaro, D.L.; Mattioli, M.; et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–17. [[CrossRef](#)]
- Schultheiß, C.; Paschold, L.; Simnica, D.; Mohme, M.; Willscher, E.; von Wenserski, L.; Scholz, R.; Wieters, I.; Dahlke, C.; Tolosa, E.; et al. Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19 Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. *Immunity* **2020**, *53*, 442–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ye, Q.; Wang, B.; Mao, J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19. *J. Infect.* **2020**, *80*, 607–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Toh, M.-L.; Kawashima, M.; Zrioual, S.; Hot, A.; Miossec, P.; Miossec, P. IL-17 inhibits human Th1 differentiation through IL-12Rβ2 downregulation. *Cytokine* **2009**, *48*, 226–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, Y.-H.; Liu, Y.-J. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20*, 697–702. [[CrossRef](#)]
- Costa, L.B.; Perez, L.G.; Palmeira, V.A.; E Cordeiro, T.M.; Ribeiro, V.T.; Lanza, K.; E Silva, A.C.S. Insights on SARS-CoV-2 Molecular Interactions with the Renin-Angiotensin System. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 559841. [[CrossRef](#)]
- Kreutzberger, A.J.B.; Sanyal, A.; Ojha, R.; Pyle, J.D.; Vapalahti, O.; Balistreri, G.; Kirchhausen, T. Synergistic inhibition of two host factors that facilitate entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
- Chu, H.; Chan, J.F.-W.; Yuen, T.T.-T.; Shuai, H.; Yuan, S.; Wang, Y.; Hu, B.; Yip, C.C.-Y.; Tsang, J.O.-L.; Huang, X.; et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: An observational study. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, e14–e23. [[CrossRef](#)]
- Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K.S.; Goldsmith, J.A.; Hsieh, C.-L.; Abiona, O.; Graham, B.S.; McLellan, J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **2020**, *367*, 1260–1263. [[CrossRef](#)]
- Anguiano, L.; Riera, M.; Pascual, J.; Soler, M.J. Circulating ACE2 in Cardiovascular and Kidney Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 3231–3241. [[CrossRef](#)]
- Touyz, R.M.; Montezano, A.C. Angiotensin-(1–7) and Vascular Function. *Hypertension* **2018**, *71*, 68–69. [[CrossRef](#)]
- Benigni, A.; Cassis, P.; Remuzzi, G. Angiotensin II revisited: New roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol. Med.* **2010**, *2*, 247–257. [[CrossRef](#)]

23. Chung, M.K.; Karnik, S.; Saef, J.; Bergmann, C.; Barnard, J.; Lederman, M.M.; Tilton, J.; Cheng, F.; Harding, C.V.; Young, J.B.; et al. SARS-CoV-2 and ACE2: The biology and clinical data settling the ARB and ACEI controversy. *EBioMedicine* **2020**, *58*, 102907. [[CrossRef](#)]
24. Murphy, K.M.; Ouyang, W.; Farrar, J.D.; Yang, J.; Ranganath, S.; Asnagli, H.; Afkarian, M.; Murphy, T.L. Signaling and Transcription in T Helper Development. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18*, 451–494. [[CrossRef](#)]
25. Luckheeram, R.V.; Zhou, R.; Verma, A.D.; Xia, B. CD4<sup>+</sup>T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 925135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dardalhon, V.; Korn, T.; Kuchroo, V.K.; Anderson, A.C. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2008**, *31*, 252–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Paul, W.E.; Zhu, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 225–235. [[CrossRef](#)]
28. Neidleman, J.; Luo, X.; Frouard, J.; Xie, G.; Gill, G.; Stein, E.S.; McGregor, M.; Ma, T.; George, A.F.; Kusters, A.; et al. SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential. *Cell Rep. Med.* **2020**, *1*, 6, 100081. [[CrossRef](#)]
29. Hotez, P.J.; Bottazzi, M.E.; Corry, D.B. The potential role of Th17 immune responses in coronavirus immunopathology and vaccine-induced immune enhancement. *Microbes Infect.* **2020**, *22*, 165–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lee, G.R. The balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 730. [[CrossRef](#)]
31. Ali, N.; Rosenblum, M.D. Regulatory T cells in skin. *Immunology* **2017**, *152*, 372–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bedoya, S.K.; Lam, B.; Lau, K.; Larkin, J. Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 986789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gaffen, S.L.; Jain, R.; Garg, A.V.; Cua, D.J. The IL-23–IL-17 immune axis: From mechanisms to therapeutic testing. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 585–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gu, C.; Wu, L.; Li, X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* **2013**, *64*, 477–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Muyayalo, K.P.; Huang, D.; Zhao, S.; Xie, T.; Mor, G.; Liao, A. COVID-19 and Treg/Th17 imbalance: Potential relationship to pregnancy outcomes. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2020**, *84*, e13304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. McGeachy, M.J.; Cua, D.J.; Gaffen, S.L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity* **2019**, *50*, 892–906. [[CrossRef](#)]
37. Liu, S.M.; King, C. IL-21–Producing Th Cells in Immunity and Autoimmunity. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 3501–3506. [[CrossRef](#)]
38. Spolski, R.; Leonard, W.J. Interleukin-21: A double-edged sword with therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 379–395. [[CrossRef](#)]
39. Long, D.; Chen, Y.; Wu, H.; Zhao, M.; Lu, Q. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2019**, *99*, 1–14. [[CrossRef](#)]
40. Tian, Y.; Zajac, A.J. IL-21 and T Cell Differentiation: Consider the Context. *Trends Immunol.* **2016**, *37*, 557–568. [[CrossRef](#)]
41. Dudakov, J.A.; Hanash, A.M.; Brink, M.R.V.D. Interleukin-22: Immunobiology and Pathology. *Annu. Rev. Immunol.* **2015**, *33*, 747–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Parks, O.B.; Pociask, D.A.; Hodzic, Z.; Kolls, J.K.; Good, M. Interleukin-22 Signaling in the Regulation of Intestinal Health and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *3*, 85. [[CrossRef](#)]
43. Eyerich, K.; DiMartino, V.; Cavani, A. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *Eur. J. Immunol.* **2017**, *47*, 607–614. [[CrossRef](#)]
44. Shiomi, A.; Usui, T.; Mimori, T. GM-CSF as a therapeutic target in autoimmune diseases. *Inflamm. Regen.* **2016**, *36*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Becher, B.; Tugues, S.; Greter, M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* **2016**, *45*, 963–973. [[CrossRef](#)]
46. Aliper, A.M.; Frieden-Korovkina, V.P.; Buzdin, A.; Roumiantsev, S.; Zhavoronkov, A. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 737–746. [[CrossRef](#)]
47. Avci, A.B.; Feist, E.; Burmester, G.-R. Targeting GM-CSF in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2016**, *34*, 39–44.
48. Tau, G.; Rothman, P.B. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy* **1999**, *54*, 1233–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ivashkiv, L.B. IFN $\gamma$ : Signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 545–558. [[CrossRef](#)]
50. Kak, G.; Raza, M.; Tiwari, B.K. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol. Concepts* **2018**, *9*, 64–79. [[CrossRef](#)]
51. Ishikawa, Y.; Iwata, S.; Hanami, K.; Nawata, A.; Zhang, M.; Yamagata, K.; Hirata, S.; Sakata, K.; Todoroki, Y.; Nakano, K.; et al. Relevance of interferon-gamma in pathogenesis of life-threatening rapidly progressive interstitial lung disease in patients with dermatomyositis. *Arthritis Res.* **2018**, *20*, 1–10. [[CrossRef](#)]
52. Bettelli, E.; Korn, T.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *453*, 1051–1057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. McGeachy, M.J.; Bak-Jensen, K.S.; Chen, Y.; Tato, C.M.; Blumenschein, W.M.; McClanahan, T.K.; Cua, D.J. TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 1390–1397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



54. Lee, Y.; Awasthi, A.; Yosef, N.; Quintana, F.J.; Xiao, S.; Peters, A.; Wu, C.; Kleinewietfeld, M.; Kunder, S.; Hafler, D.A.; et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 991–999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bettelli, E.; Korn, T.; Kuchroo, V.K. Th17: The third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* **2007**, *19*, 652–657. [[CrossRef](#)]
56. Tsukazaki, H.; Kaito, T. The Role of the IL-23/IL-17 Pathway in the Pathogenesis of Spondyloarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6401. [[CrossRef](#)]
57. Pastor-Fernández, G.; Mariblanca, I.R.; Navarro, M.N. Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. *Cells* **2020**, *9*, 2044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Qin, C.; Zhou, L.; Hu, Z.; Zhang, S.; Yang, S.; Tao, Y.; Xie, C.; Ma, K.; Shang, K.; Wang, W.; et al. Dysregulation of Immune Response in Patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 762–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Neurath, M.F. COVID-19 and immunomodulation in IBD. *Gut* **2020**, *69*, 1335–1342. [[CrossRef](#)]
60. Lin, S.; Wu, H.; Wang, C.; Xiao, Z.; Xu, F. Regulatory T Cells and Acute Lung Injury: Cytokines, Uncontrolled Inflammation, and Therapeutic Implications. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1545. [[CrossRef](#)]
61. Yu, Z.-X.; Ji, M.-S.; Yan, J.; Cai, Y.; Liu, J.; Yang, H.-F.; Li, Y.; Jin, Z.-C.; Zheng, J.-X. The ratio of Th17/Treg cells as a risk indicator in early acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care* **2015**, *19*, 82. [[CrossRef](#)]
62. Wu, D.; Yang, X.O. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: An emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2020**, *53*, 368–370. [[CrossRef](#)]
63. Burgos-Blasco, B.; Güemes-Villahoz, N.; Santiago, J.L.; Fernandez-Vigo, J.I.; Espino-Paisán, L.; Sarriá, B.; García-Feijoo, J.; Martínez-De-La-Casa, J.M. Hypercytokinemia in COVID-19: Tear cytokine profile in hospitalized COVID-19 patients. *Exp. Eye Res.* **2020**, *200*, 108253. [[CrossRef](#)]
64. Petrone, L.; Petruccioli, E.; Vanini, V.; Cuzzi, G.; Fard, S.N.; Alonzi, T.; Castilletti, C.; Palmieri, F.; Gualano, G.; Vittozzi, P.; et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 286.e7–286.e13. [[CrossRef](#)]
65. Ghazavi, A.; Ganji, A.; Keshavarzian, N.; Rabiemajd, S.; Mosayebi, G. Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. *Cytokine* **2021**, *137*, 155323. [[CrossRef](#)]
66. Weiskopf, D.; Schmitz, K.S.; Raadsen, M.P.; Grifoni, A.; Okba, N.M.A.; Endeman, H.; Akker, J.P.C.V.D.; Molenkamp, R.; Koopmans, M.P.G.; Van Gorp, E.C.M.; et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.* **2020**, *5*, eabd2071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Xu, Z.; Shi, L.; Wang, Y.; Zhang, J.; Huang, L.; Zhang, C.; Liu, S.; Zhao, P.; Liu, H.; Zhu, L.; et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* **2020**, *8*, 420–422. [[CrossRef](#)]
68. Pasrija, R.; Naime, M. The deregulated immune reaction and cytokines release storm (CRS) in COVID-19 disease. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *90*, 107225. [[CrossRef](#)]
69. Ronit, A.; Berg, R.M.; Bay, J.T.; Haugaard, A.K.; Ahlström, M.G.; Burgdorf, K.S.; Ullum, H.; Rørvig, S.B.; Tjelle, K.; Foss, N.B.; et al. Compartmental immunophenotyping in COVID-19 ARDS: A case series. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *147*, 81–91. [[CrossRef](#)]
70. Mahallawi, W.H.; Khabour, O.F.; Zhang, Q.; Makhdoum, H.M.; Suliman, B.A. MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokine profile. *Cytokine* **2018**, *104*, 8–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Faure, E.; Poissy, J.; Goffard, A.; Fournier, C.; Kipnis, E.; Titecat, M.; Bortolotti, P.; Martinez, L.; Dubucquoi, S.; Dessein, R.; et al. Distinct Immune Response in Two MERS-CoV-Infected Patients: Can We Go from Bench to Bedside? *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88716. [[CrossRef](#)]
72. Josset, L.; Menachery, V.D.; Gralinski, L.E.; Agnihothram, S.; Sova, P.; Carter, V.S.; Yount, B.L.; Graham, R.L.; Baric, R.S.; Katze, M.G. Cell Host Response to Infection with Novel Human Coronavirus EMC Predicts Potential Antivirals and Important Differences with SARS Coronavirus. *mBio* **2013**, *4*, e00165-13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Bermejo-Martin, J.F.; De Lejarazu, R.O.; Pumarola, T.; Rello, J.; Almansa, R.; Ramirez, P.; Martin-Loeches, I.; Varillas, D.; Gallegos, M.C.; Serón, C.; et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit. Care* **2009**, *13*, R201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Mikacenic, C.; Hansen, E.E.; Radella, F.; Gharib, S.A.; Stapleton, R.D.; Wurfel, M.M. Interleukin-17A Is Associated With Alveolar Inflammation and Poor Outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit. Care Med.* **2016**, *44*, 496–502. [[CrossRef](#)]
75. Zheng, L.-Y.; Sun, P.-C. Increased Expression of IL-23 and IL-17 in Serum of Patients with Neonatal Respiratory Distress Syndrome and its Clinical Significance. *Clin. Lab.* **2020**, *66*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Ding, Q.; Liu, G.-Q.; Zeng, Y.-Y.; Zhu, J.-J.; Liu, Z.-Y.; Zhang, X.; Huang, J.-A. Role of IL-17 in LPS-induced acute lung injury: An in vivo study. *Oncotarget* **2017**, *8*, 93704–93711. [[CrossRef](#)]
77. Rout, N. Enhanced Th1/Th17 Functions of CD161<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Cells in Mucosal Tissues of Rhesus Macaques. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. McCarthy, M.K.; Zhu, L.; Procaro, M.C.; Weinberg, J.B. IL-17 contributes to neutrophil recruitment but not to control of viral replication during acute mouse adenovirus type 1 respiratory infection. *Virology* **2014**, *456–457*, 259–267. [[CrossRef](#)]
79. Lindén, A.; Laan, M.; Anderson, G.P. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur. Respir. J.* **2005**, *25*, 159–172. [[CrossRef](#)]
80. Liu, J.; Li, S.; Liu, J.; Liang, B.; Wang, X.; Wang, H.; Li, W.; Tong, Q.; Yi, J.; Zhao, L.; et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* **2020**, *55*, 102763. [[CrossRef](#)]

81. Han, H.; Ma, Q.; Li, C.; Liu, R.; Zhao, L.; Wang, W.; Zhang, P.; Liu, X.; Gao, G.; Liu, F.; et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 1123–1130. [[CrossRef](#)]
82. Yao, Z.; Zheng, Z.; Wu, K.; Junhua, Z. Immune environment modulation in pneumonia patients caused by coronavirus: SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Aging* **2020**, *12*, 7639–7651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Croci, S.; Bonacini, M.; Dolci, G.; Massari, M.; Facciolongo, N.; Pignatti, E.; Pisciotta, A.; Carnevale, G.; Negro, A.; Cassone, G.; et al. Human Dental Pulp Stem Cells Modulate Cytokine Production in vitro by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Coronavirus Disease 2019 Patients. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 609204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Lucas, C.; Team, Y.L.; Wong, P.; Klein, J.; Castro, T.B.R.; Silva, J.; Sundaram, M.; Ellingson, M.K.; Mao, T.; Oh, J.E.; et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *584*, 463–469. [[CrossRef](#)]
85. Sakaguchi, R.; Chikuma, S.; Shichita, T.; Morita, R.; Sekiya, T.; Ouyang, W.; Ueda, T.; Seki, H.; Morisaki, H.; Yoshimura, A. Innate-like function of memory Th17 cells for enhancing endotoxin-induced acute lung inflammation through IL-22. *Int. Immunol.* **2015**, *28*, 233–243. [[CrossRef](#)]
86. Bonny, T.S.; Patel, E.U.; Zhu, X.; Bloch, E.M.; Grabowski, M.K.; Abraham, A.G.; Littlefield, K.; Shrestha, R.; E Benner, S.; Laeyendecker, O.; et al. Cytokine and Chemokine Levels in Coronavirus Disease 2019 Convalescent Plasma. *Open Forum Infect. Dis.* **2021**, *8*, ofaa574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Conti, A.; Lasagni, C.; Bigi, L.; Pellacani, G. Evolution of COVID-19 infection in four psoriatic patients treated with biological drugs. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2020**, *34*, e360–e361. [[CrossRef](#)]
88. Messina, F.; Piaserico, S. SARS-CoV-2 infection in a psoriatic patient treated with IL-23 inhibitor. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2020**, *34*, e254–e255. [[CrossRef](#)]
89. Balestri, R.; Rech, G.; Girardelli, C. SARS-CoV-2 infection in a psoriatic patient treated with IL-17 inhibitor. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2020**, *34*, e357–e358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

# Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Alessio Mazzoni,  
University of Florence, Italy

REVIEWED BY  
Maria Salagianni,  
Biomedical Research Foundation of the  
Academy of Athens (BRFAA), Greece  
Fabio Seiti Yamada Yoshikawa,  
Chiba University, Japan

\*CORRESPONDENCE  
Diana Martonik  
✉ [diana.martonik@umb.edu.pl](mailto:diana.martonik@umb.edu.pl)

RECEIVED 13 May 2023  
ACCEPTED 20 June 2023  
PUBLISHED 06 July 2023

CITATION  
Martonik D, Parfieniuk-Kowerda A,  
Starosz A, Grubczak K, Moniuszko M and  
Flisiak R (2023) Effect of antiviral and  
immunomodulatory treatment on a  
cytokine profile in patients with COVID-19.  
*Front. Immunol.* 14:1222170.  
doi: 10.3389/fimmu.2023.1222170

COPYRIGHT  
© 2023 Martonik, Parfieniuk-Kowerda,  
Starosz, Grubczak, Moniuszko and Flisiak.  
This is an open-access article distributed  
under the terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

Diana Martonik<sup>1\*</sup>, Anna Parfieniuk-Kowerda<sup>1</sup>,  
Aleksandra Starosz<sup>2</sup>, Kamil Grubczak<sup>2</sup>, Marcin Moniuszko<sup>2,3</sup>  
and Robert Flisiak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious Diseases and Hepatology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland,

<sup>2</sup>Department of Regenerative Medicine and Immune Regulation, Medical University of Białystok,

Białystok, Poland, <sup>3</sup>Department of Allergology and Internal Medicine, Medical University of Białystok,  
Białystok, Poland

**Background:** The severity of COVID-19 is associated with an elevated level of a variety of inflammatory mediators. Increasing evidence suggests that the Th17 response contributes to the severity of COVID-19 pneumonia, whereas Th22 response plays a regulatory role in SARS-CoV-2 infection. Two main types of available COVID-19 treatments are antivirals and immunomodulatory drugs; however, their effect on a cytokine profile is yet to be determined.

**Methods:** This study aim to analyse a cytokine profile in peripheral blood from patients with COVID-19 (n=44) undergoing antiviral or/and immunomodulatory treatment and healthy controls (n=20). Circulating CD4+ and CD8+ T cells and their intracellular expression of IL-17A and IL-22 were assessed by flow cytometry.

**Results:** Initial results showed an overexpression of IL-17F, IL-17A, CCL5/RANTES, GM-CSF, IL-4, IL-10, CXCL10/IP-10 and IL-6 in COVID-19 patients compared to healthy controls. Treatment with remdesivir resulted in a significant decline in concentrations of IL-6, IL-10, IFN-alpha and CXCL10/IP-10. Immunomodulatory treatment contributed to a significant downregulation of IL-10, IFN-alpha, CXCL10/IP-10 and B7-H3 as well as upregulation of IL-22 and IL-1 beta. A combination of an antiviral and immunomodulatory treatment resulted in a significant decrease in IL-17F, IL-10, IFN-alpha, CXCL10/IP-10 and B7-H3 levels as well as an increase in IL-17A and IL-1 beta. We found significantly higher percentage of both CD4+ and CD8+ T cells producing IL-17A and CD4+ T cells producing IL-22 in patients with COVID-19.

**Conclusion:** Administration of antiviral or/and immunomodulatory treatment resulted in a significant downregulation of pro-inflammatory cytokine expression and an upregulation of T cell absolute counts in most cases, thus showing effectiveness of treatment in COVID-19. SARS-CoV-2 infection induced cytokine overexpression in hospitalized patients with COVID-19 as well as lymphopenia,

particularly a decrease in CD4+ and CD8+ T cell counts. Moreover, despite the reduced counts of CD4+ and CD8+ T cells, both subsets showed overactivation and increased expression of IL-17A and IL-22, thus targeting Th17 response might alleviate inflammatory response in severe disease.

#### KEYWORDS

COVID-19, SARS-CoV-2, Th17 cells, CD4+ T cells, CD8+ T cells, cytokines, treatment

## 1 Introduction

At the end of 2019, an unprecedented epidemic of pneumonia caused by a novel beta coronavirus, termed SARS-CoV-2 afterward, emerged in Wuhan (China) (1). The rapid spread of the virus worldwide resulted in global pandemic of the subsequent disease COVID-19 announced by WHO on 11 March 2020. Most people infected with SARS-CoV-2 experience mild to moderate respiratory disease that resolves on its own. However, elderly people and those burdened with comorbidities such as chronic respiratory disease, cardiovascular disease, diabetes, and cancer are more likely to develop severe COVID-19 (2).

Cytokine release syndrome (CRS), which is an excessive response to the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, may be responsible for the severe course of the disease according to research. Unusually high release of cytokines triggering immunopathological reaction is described as “cytokine storm” (1, 2). Studies have shown that the severity of COVID-19 is associated with an elevated level of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor (TNF), CXC-chemokine ligand 10 (CXCL-10), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), interleukin (IL)-2, IL-6, IL-7, and IL-10. Elevated concentration of IL-6 has been shown to strongly correlate with COVID-19 mortality (3, 4). Aberrant release of pro-inflammatory mediators leads to apoptosis of lung epithelial and endothelial cells causing damage to the microvascular and alveolar epithelial cell barrier which leads to vascular leakage, alveolar oedema, and hypoxia (5). There is evidence that both Th17 and Th22 response can play an immunomodulatory role in some diseases, including viral infections. It has been shown that in some situations Th17 and Th22 can exert opposite immune effects. Increasing evidence suggests that the Th17 response contributes to the severity of COVID-19 pneumonia, whereas Th22 response plays a regulatory role in SARS-CoV-2 infection (6, 7).

There are two main types of available COVID-19 treatments – antivirals and immunomodulatory drugs. Remdesivir, an antiviral medication, has received significant recognition for its capacity to control and regulate the viral load and has been approved for the treatment of patients with COVID-19. It is a broad-spectrum nucleoside analogue that can target variety of single-stranded RNA viruses, including coronaviruses. Its primary mechanism of action is the inhibition of RNA-dependent RNA polymerase thus leading to the suppression of SARS-CoV-2 replication in respiratory-associated epithelial cells (8, 9). Immunomodulatory

agents modify the response of the immune system by activating, inhibiting, or modulating various immune system components. Tocilizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody that binds to IL-6 receptors to exert immunosuppressive effects and attenuate IL-6 activity. It was approved for treatment of the CRS in severe COVID-19 (9, 10). Glucocorticoids (GCs) are recommended for the treatment of oxygen-requiring patients with COVID-19. GCs exhibit pharmacologic effect through classic genomic mechanisms. Some immunosuppressive effects are based on the induction of gene transcription and synthesis of NF- $\kappa$ B protein inhibitors, resulting in inhibition of the synthesis of downstream proteins such as IL-1 and IL-6. GCs reduce the activation, proliferation, and survival of both T cells and macrophages. The dosage and timing of administration of GCs have a significant impact on the outcome of the critically ill patients. The initiation of the immune defense mechanism is inhibited by the premature administration of GCs, which raises the viral load and ultimately has negative consequences. Therefore, GCs are mainly used to treat critically ill patients with CRS (10, 11).

In this study, we performed an evaluation of immunological features of patients with COVID-19 hospitalized in the Department of Infectious Diseases and Hepatology at the Medical University of Bialystok Clinical Hospital, who were treated with tocilizumab, glucocorticoids and/or remdesivir. We aimed to assess the effect of treatment on a cytokine and T cell profiles, including the intracellular expression of IL-17A and IL-22. We showed that administration of antiviral or/and immunomodulatory treatment resulted in a significant downregulation of pro-inflammatory cytokine expression and an upregulation of T cell absolute counts in most cases, thus showing effectiveness of treatment in COVID-19.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study population

The study included 44 patients with COVID-19 hospitalized in the Department of Infectious Diseases and Hepatology at the Medical University of Bialystok Clinical Hospital in January to May 2021, who were treated with tocilizumab, glucocorticoids and/or remdesivir. SARS-CoV-2 infection was confirmed with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in a certified diagnostic facility before hospital admission. In addition, 20

volunteers vaccinated against SARS-CoV-2 with no inflammatory or autoimmune disease were enrolled as a control group.

Vital signs included in Modified Early Warning Score (MEWS) (oxygen saturation, heart rate, blood pressure, respiratory rate, body temperature, alertness, diuresis), full blood count, coagulation parameters, acute-phase proteins, and other tests necessary for proper care in accordance with good clinical practice were measured before and during treatment. MEWS score allows to stratify patients according to their clinical condition:

1. Asymptomatic or mild type
2. Stable patients with respiratory and/or systemic symptoms
3. Clinically unstable patients with respiratory failure
4. Patient in critical condition (acute respiratory distress syndrome)

Patients with asymptomatic/mild disease and patients in whom inflammatory changes in the lungs were not confirmed by imaging studies were excluded from the study. Additional exclusion criteria were the presence of autoimmune diseases, malignancy, and current immunomodulatory treatment for diseases other than COVID-19. Management and treatment followed current national recommendations for COVID-19 (12, 13).

Remdesivir was administered to patients admitted to the hospital during first week from the onset of symptoms, dexamethasone was given to patients receiving antiviral drug, who also required oxygen therapy and tocilizumab was administered to patients with IL-6 concentration above 100 pg/mL. Treatment was classified as follows: a) antiviral therapy – remdesivir; b) immunomodulatory therapy – tocilizumab or/and dexamethasone; c) mixed therapy – combination of antiviral and immunomodulatory treatment.

Patients with oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) of 90% or lower on room air who required high-flow oxygen therapy or non-invasive mechanical ventilation with bilevel positive airway pressure (BiPAP) mode to correct hypoxemia, were categorized as having severe COVID-19. Patients who did not meet the criteria for severe COVID-19 were

classified as moderate. Schematic diagram of the treatment regimen is presented in Figure 1 and Supplementary Figure 1.

## 2.2 Sample collection and the purification of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Blood samples were collected from each participant by venipuncture in a 7,5 ml S-Monovette tube with clot activator (Sarstedt, Germany) and 4,9 ml S-Monovette tube with EDTA (Sarstedt, Germany) on hospital admission before treatment administration and on the fifth day of treatment. The collected samples were centrifuged, and serum and plasma were frozen at -80 degrees Celsius. Density gradient centrifugation with Pancoll 1.077 g/l (PAN Biotech, Germany) was used for isolation of PBMCs, then the cells were washed twice in phosphate-buffered saline (Corning, VA, USA) and cryopreserved in fetal bovine serum (PAN Biotech, Germany) with 10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, MO, USA).

## 2.3 Immunoenzymatic assay (ELISA)

Enzyme-linked immunoabsorbent assays for the quantitative detection of human IL-17A, IL-17F, IL-22 and IL-23 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) were performed according to the manufacturer’s protocols and an absorbance level was read at 450 nm wavelength using BioTek EL800 microplate reader (Agilent Technologies, CA, USA). The level of each biomarker is expressed in pg/mL.

## 2.4 Multiplex assay

A 17-plex Luminex assay (R&D Systems, MN, USA) was used for quantification of serum biomarkers, including: B7-H3, CCL2,

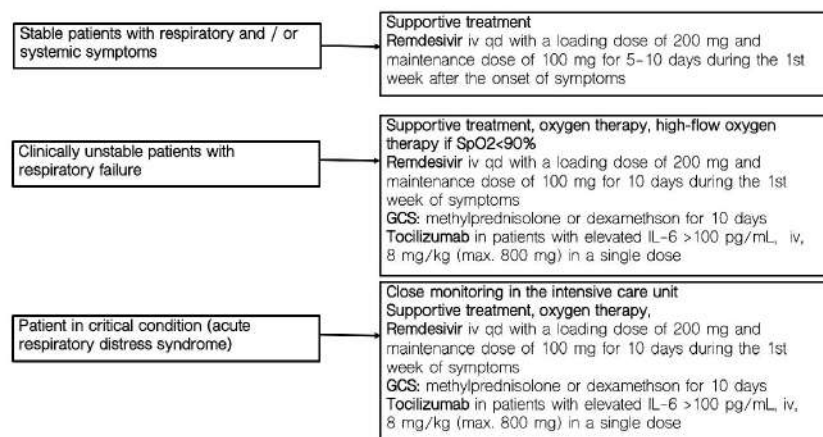


FIGURE 1  
Therapeutic recommendations for COVID-19 at the time of the study.

CCL5, CXCL10, IFN-alpha, IFN-gamma, IL-1 beta, IL-4, IL-6, IL-6R, IL-10, IL-13, IL-21, IL-28B, IL-33, GM-CSF, TIM-1. Measurements were performed according to the manufacturer's instruction on a Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). The level of each biomarker is expressed in pg/mL.

## 2.5 Flow cytometry

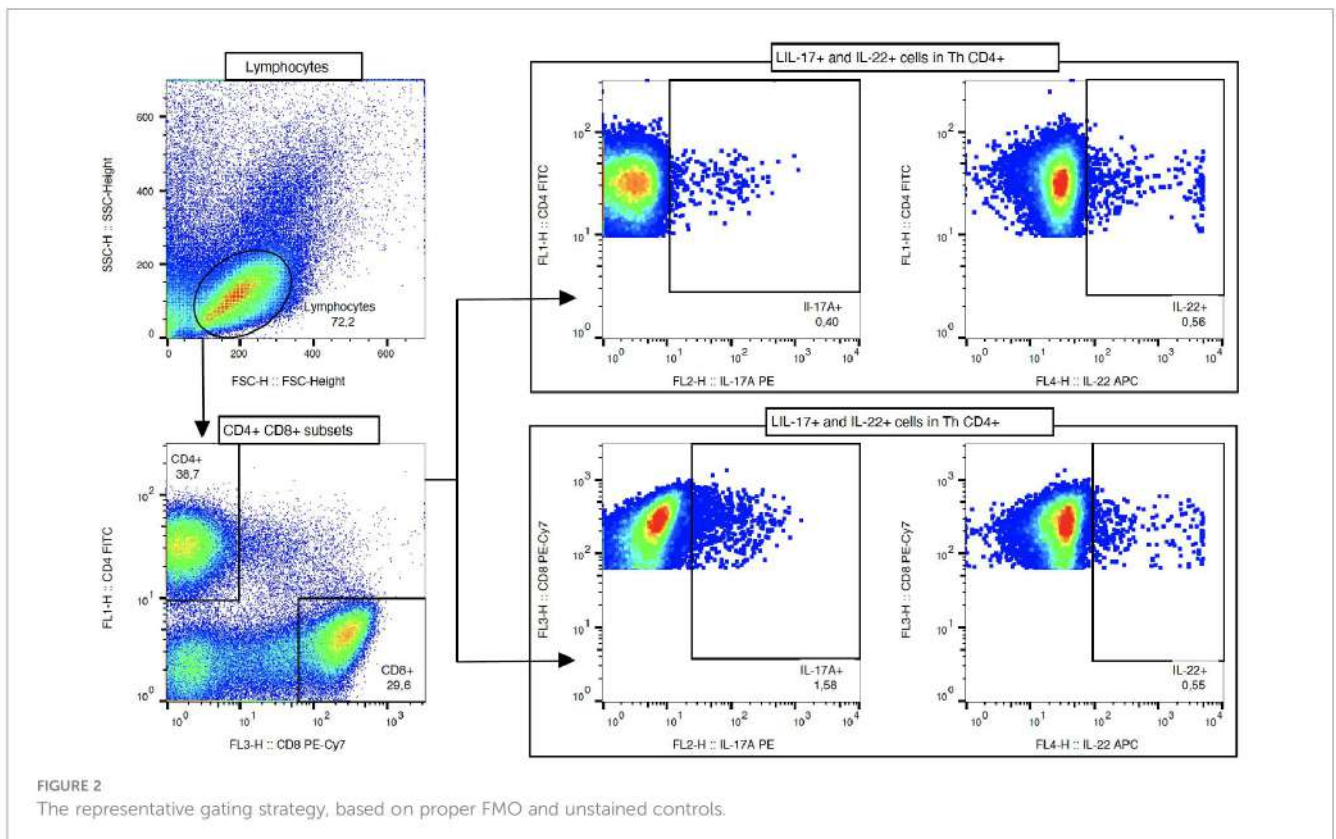
Thawing of cryopreserved PBMCs and resuspension in the complete culture medium (RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum (PAN Biotech, Germany)) was followed by counting and viability verification using 0.4% trypan blue solution (cells demonstrated viability of 95-100%). For the flow cytometric assessment of Th17 and Th22 cells, 500,000 cells were used. Intracellular detection of IL-17A and IL-22 was facilitated by 4-hour incubation at 37°C with Leukocyte Activation Cocktail with brefeldin A (BD Pharmingen; BD Bioscience, CA, USA). Initial extracellular staining with monoclonal antibodies conjugated with fluorochromes included: anti-CD4 FITC (clone RPA-T4) and anti-CD8 PE-Cy7 (clone RPA-T8) (BD Bioscience, CA, USA). Following 25 minutes of incubation at room temperature, in the dark, unbound antibodies were washed out with the phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (PBS; Corning, VA, USA). Subsequently, cells were permeabilized by Permeabilization Buffer 2 (BD Bioscience, CA, USA) for intracellular staining using: anti-IL-17A PE (clone SCPL1362) and anti-IL-22 Alexa Fluor 647 (clone MH22B2) (BD

Bioscience, CA, USA). After incubation and washing steps, cells were preserved using CellFix reagent (BD Bioscience, CA, USA) and stored at 4°C prior to data acquisition on the FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience, CA, USA). Flow cytometric analyses were performed using the FlowJo® software (Tree Star Inc., OR, USA).

Lymphocytes were initially distinguished on the basis of their morphology: relative size (FSC; forward scatter) and granularity (SSC; side scatter). Next, the detection of the helper (Th) CD4+ and cytotoxic (Tc) CD8+ T cell subsets was performed. Furthermore, the intracellular expression of IL-17A and IL-22 was assessed within mentioned subsets of lymphocytes. Implemented processing of the flow cytometric data allowed for determining the studied T cell populations frequencies and absolute cell numbers. The representative gating strategy, based on proper FMO and unstained controls, is presented in Figure 2.

## 2.6 Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad (Prism Software, CA, USA). Comparative analysis between groups according to the distribution was carried out by t-test or Mann-Whitney U test for continuous data and chi-square for categorical data. For comparison between groups before and during the treatment, paired t-test and Wilcoxon matched pairs signed rank test were applied followed by two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli. To assess the panoramic profile of



serum biomarkers and absolute counts of immune cells in peripheral blood, data was normalized with log transformation. The correlation between analyzed parameters was assessed with Spearman correlation test. The differences were considered statistically significant if  $p < 0.05$ .

## 3 Results

### 3.1 General characteristics

General characteristics of patients ( $n=44$ ) and controls ( $n=20$ ) are presented in **Table 1**. Among patients, majority were male (72.7%) with a median age of 63 years, whereas among controls majority were female (55.0%) with a median age of 57. Among severe COVID-19, all patients were male with a median age of 67 years (**Supplementary Table 1**). The most frequently occurring comorbidities both in patients and controls were hypertension (56.8% and 20.0% respectively) and dyslipidaemia (18.2% and 10.0% respectively). The median time from onset of symptoms to hospitalization was 7.0 days. On hospital admission, the median of the lung involvement in CT scan was 40.0%, whereas the median of oxygen saturation was 90.0%. Lung involvement in CT scan showed significant negative correlation with oxygen saturation ( $r = -0.487$ ,  $p = 0.002$ ) and lymphocytes percentage ( $r = -0.407$ ,  $p = 0.010$ ), and positive correlation with LDH level ( $r = 0.425$ ,  $p = 0.011$ ). Heatmap of Spearman's correlation of laboratory findings and general characteristics is presented in **Figure 3**.

### 3.2 Laboratory findings

On admission 65.9% of patients showed lymphocytopenia, while leukocyte counts were normal. Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and D-dimer levels were significantly higher in patients than in controls ( $p = 0.006$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.001$  respectively). Detailed analysis of laboratory findings in patients and controls is presented in **Table 2**. LDH levels were significantly higher in patients with severe COVID-19, compared to patients with moderate disease ( $p = 0.040$ ) (**Supplementary Table 2**). Lymphocytes percentage correlated negatively with CRP ( $r = -0.730$ ,  $p < 0.001$ ), fibrinogen ( $r = -0.555$ ,  $p < 0.001$ ), LDH ( $r = -0.473$ ,  $p < 0.001$ ), and D-dimers ( $r = -0.428$ ,  $p < 0.001$ ). Additionally, lymphocytes percentage showed strong positive correlation with  $SpO_2$  ( $r = 0.655$ ,  $p < 0.001$ ).

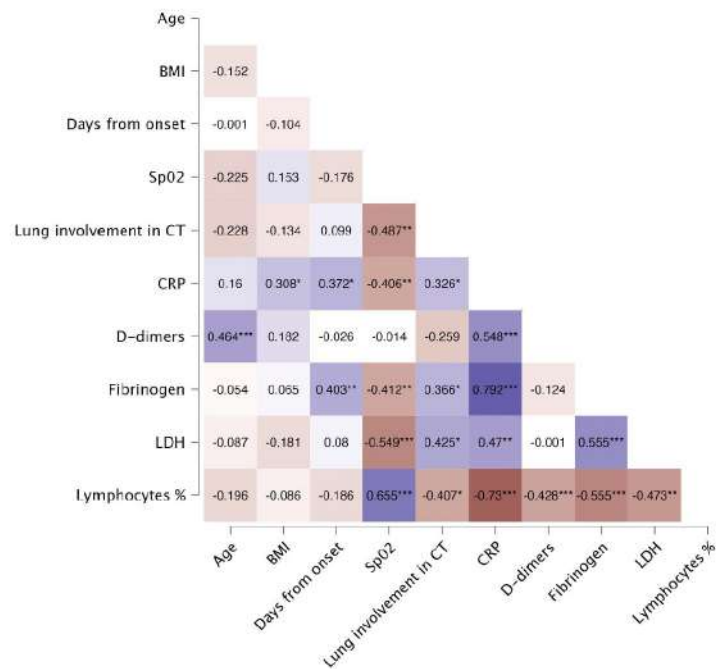
### 3.3 Immunological features before the treatment

Serum concentrations of IL-17F ( $p < 0.001$ ), IL-17A ( $p = 0.018$ ), CCL5/RANTES ( $p < 0.001$ ), GM-CSF ( $p < 0.001$ ), IL-4 ( $p < 0.001$ ), IL-10 ( $p < 0.001$ ), CXCL10/IP-10 ( $p < 0.001$ ) and IL-6 ( $p < 0.001$ ) were significantly upregulated in patients, comparing to healthy controls (**Figure 4A**). Furthermore, IL-10 and CXCL10/IP-10 were significantly higher in patients with severe COVID-19 ( $p = 0.018$  and  $p = 0.004$  respectively) (**Figure 4A**). Whereas analysis of circulating immune cell subsets demonstrated significant decrease

TABLE 1 General characteristics of COVID-19 patients and control group.

Variables	Patients (n=44)	Healthy controls (n=20)	p
Age, y	63.0 (51.5-70.5)	57.0 (51.5-63.0)	0.087
Gender, male	32 (72.7%)	9 (45.0%)	0.032*
BMI, kg/m <sup>2</sup>	29.7 (27.7-33.9)	26.0 (24.2-30.7)	0.010*
SpO <sub>2</sub> , %	90.0 (84.5-94.0)	-	-
Time from onset, days	7.0 (5.0-9.0)	-	-
<b>Disease severity</b>			
Moderate, n (%)	35 (79.5%)	-	-
Severe, n (%)	9 (20.5%)	-	-
<b>Comorbidities</b>			
Hypertension, n (%)	25 (56.8%)	4 (20.0%)	0.010*
Diabetes, n (%)	7 (16.0%)	0 (0.0%)	0.059
Asthma, n (%)	3 (6.8%)	1 (5.0%)	0.937
Dyslipidaemia, n (%)	8 (18.2%)	2 (10.0%)	0.403
<b>Symptoms</b>			
Fever, n (%)	32 (72.7%)	-	-
Cough, n (%)	28 (63.6%)	-	-
Dyspnoea, n (%)	24 (54.6%)	-	-
Fatigue, n (%)	23 (52.3%)	-	-
Lung involvement in CT scan on admission, %	40.0 (40.0-60.0)	-	-

Data represented as number or median (IQR). BMI, body mass index; SpO<sub>2</sub>, oxygen saturation; \*, statistical significance.



**FIGURE 3** Spearman's correlation of laboratory findings and general characteristics of patients on the day of hospital admission. Heatmap demonstrates exact values of Spearman's  $r$ . BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; CT, computed tomography; LDH, lactate dehydrogenase; Lymphocytes %, percentage of lymphocytes; SpO<sub>2</sub>, oxygen saturation. The levels of significance were indicated as: \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ .

**TABLE 2** Laboratory findings in COVID-19 patients and control group.

Variables	Normal range	Patients (n=44)	Healthy controls (n=20)	p
ALT, IU/L	<31.0	46.0 (23.0-62.0)	24.5 (20.0-30.0)	0.006*
AST, IU/L	<32.0	53.0 (44.0-74.0)	22.0 (19.0-29.0)	<.001*
CRP, mg/dL	<5.0	93.6 (58.9-132.3)	1.1 (0.6-2.4)	<.001*
PCT, ng/mL	<0.05	0.09 (0.05-0.16)	-	-
D-dimers, ng/mL	<500.0	892.0 (638.0-1439.0)	250.0 (182.0-382.0)	<.001*
Fibrinogen, mg/dL	200.0-400.0	645.0 (527.0-758.0)	-	-
LDH, U/l	135.0-214.0	476.0 (345.3-615.5)	-	-
Leukocyte count, $\times 10^9/L$	4.0-10.0	5.6 (4.7-8.7)	5.8 (5.0-7.3)	0.902
Neutrophil count, $\times 10^9/L$	1.6-7.2	4.3 (3.1-7.3)	3.1 (2.5-4.1)	0.018*
Lymphocyte count, $\times 10^9/L$	0.8-4.7	0.8 (0.7-1.2)	2.0 (1.6-2.5)	<.001*

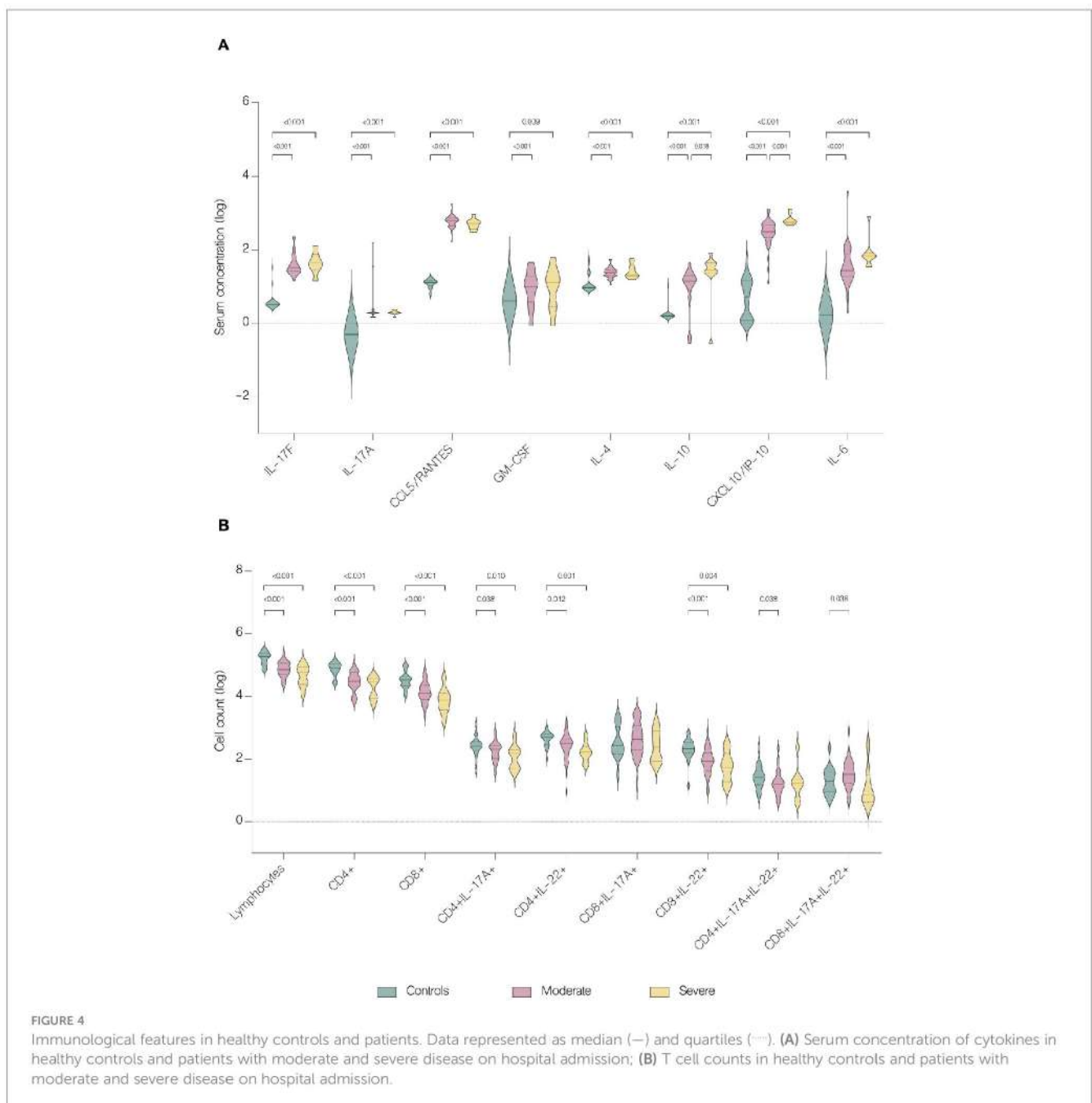
(Continued)



TABLE 2 Continued

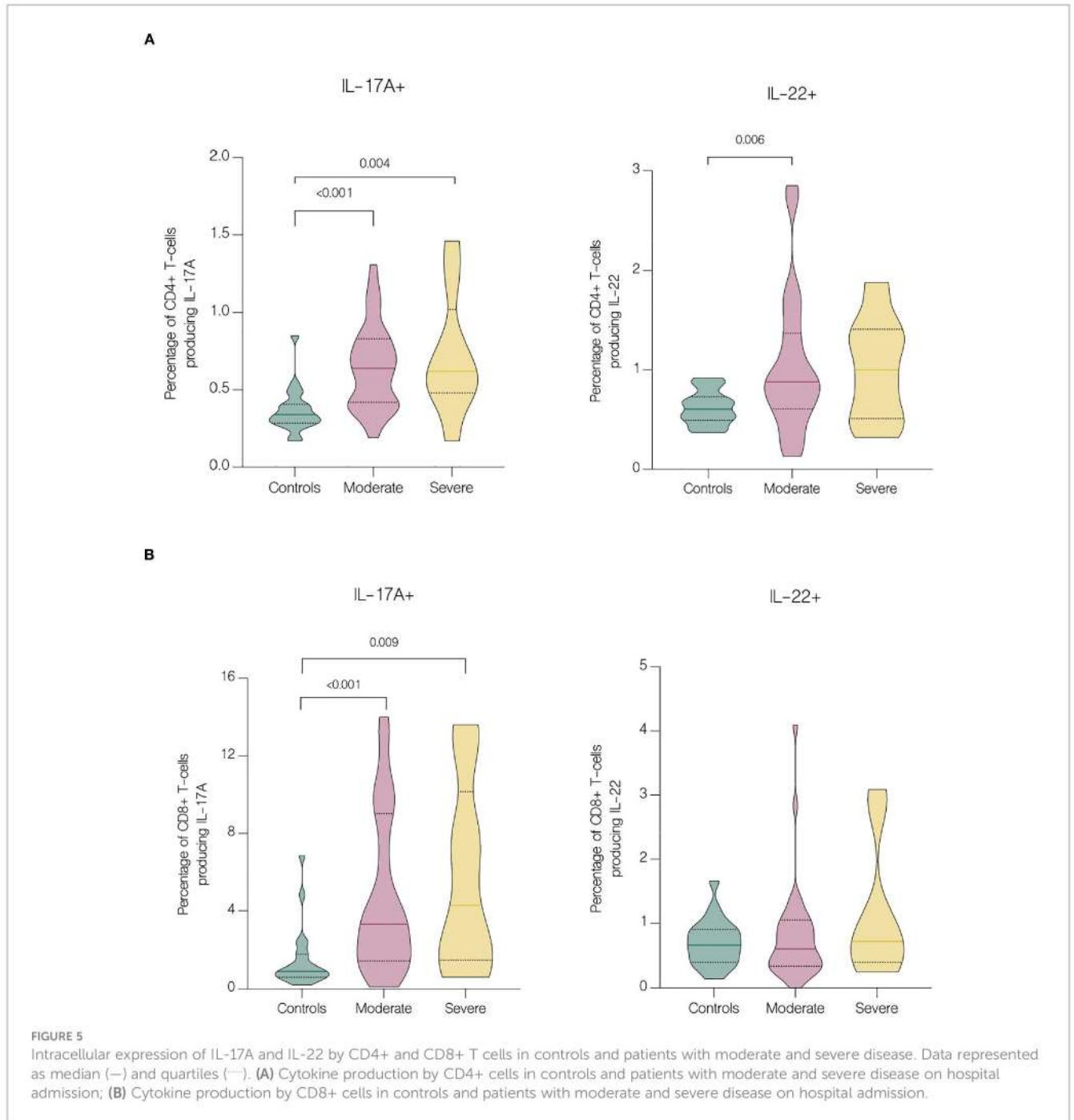
Variables	Normal range	Patients (n=44)	Healthy controls (n=20)	p
Lymphocytes, %	18.0-48.0	12.8 (8.8-20.1)	32.4 (28.4-36.9)	<.001*
Haemoglobin, g/dL	12.0-16.0	14.8 (13.3-15.4)	14.4 (13.6-15.3)	0.848
Platelet count, x10 <sup>9</sup> /L	130.0-350.0	183.0 (139.0-261.5)	233.0 (207.0-294.0)	0.015*
INR	0.8-1.2	1.2 (1.1-1.2)	1.0 (1.0-1.1)	<.001*

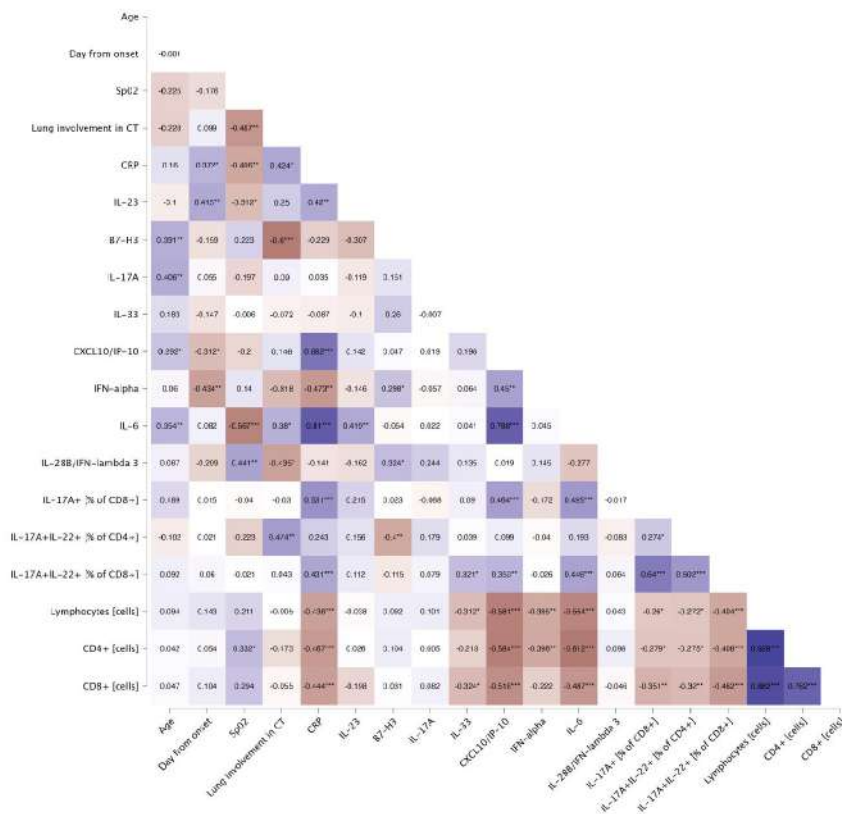
Data represented as number or median (IQR). ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CRP, C-reactive protein; INR, international normalized ratio; LDH, lactate dehydrogenase; PCT, procalcitonin; \*, statistical significance.



of absolute numbers of total lymphocytes, as well as both CD4+ and CD8+ T cells (Figure 4B). Nevertheless, both the percentages of CD4+ and CD8+ T cells expressing IL-17A were higher in patients with moderate ( $p<.001$  and  $p<.001$  respectively) and severe disease ( $p=0.004$  and  $p=0.009$  respectively) than in controls. In addition, patients with moderate disease had higher percentage of CD4+ T cells expressing IL-22 ( $p=0.006$ ) compared to controls (Figure 5). Lung involvement in CT scan correlated positively with percentage of CD4+ T cells producing both IL-17A and IL-22 ( $r=0.474$ ,  $p=0.005$ ) and

negatively with IFN-lambda 3 ( $r=-0.435$ ,  $p=0.010$ ). In contrast, SpO2 correlated positively with IFN-lambda 3 ( $r=0.441$ ,  $p=0.007$ ) and negatively with IL-6 ( $r=-0.567$ ,  $p=0.007$ ). CRP correlated positively with percentage of CD8+ producing IL-17A ( $r=0.531$ ,  $p<.001$ ) and percentage of CD8+ producing both IL-17A and IL-22 ( $r=0.431$ ,  $p<.001$ ). Moreover, CRP correlated negatively with lymphocytes count ( $r=-0.438$ ,  $p<.001$ ) as well as CD4+ ( $r=-0.467$ ,  $p<.001$ ) and CD8+ ( $r=-0.444$ ,  $p<.001$ ). Time from onset correlated positively with IL-23 ( $r=0.415$ ,  $p=0.009$ ) (Figure 6).





**FIGURE 6** Spearman's correlation of general characteristics and immunological features of patients on the day of hospital admission. Heatmap demonstrates exact values of Spearman's *r*. CRP, C-reactive protein; CT, computed tomography; SpO<sub>2</sub>, oxygen saturation. The levels of significance were indicated as: \* = *p* < .05, \*\* = *p* < .01, \*\*\* = *p* < .001.

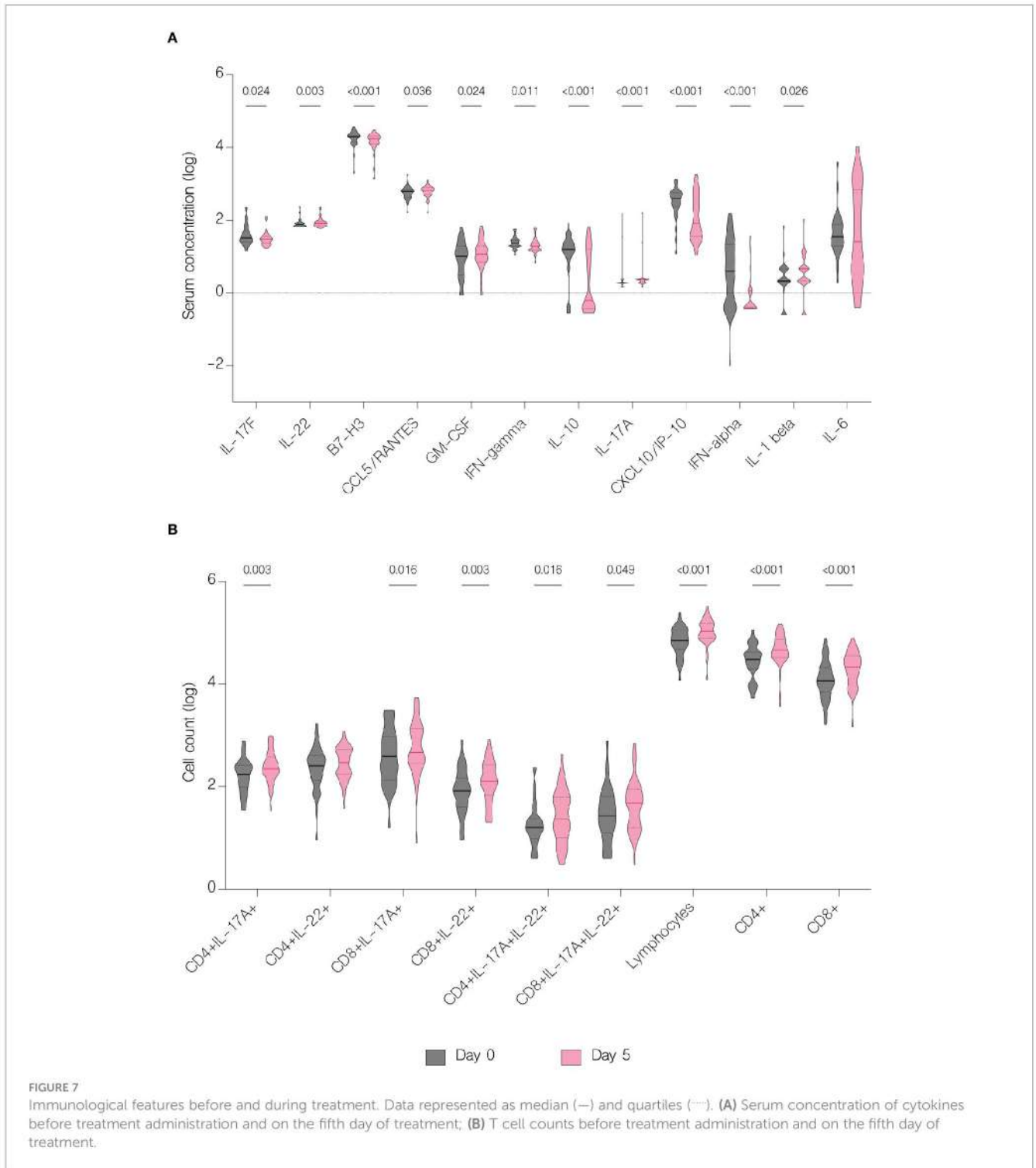
### 3.4 Effect of treatment on immunological features of patients

On the fifth day of treatment, the overall level of IL-17A (*p* < .001), IL-22 (*p* = 0.003), IL-1 beta (*p* = 0.026), CCL5/RANTES (*p* = 0.036) and GM-CSF (*p* = 0.024) significantly increased. Whereas the level of IL-17F (*p* = 0.024), IL-10 (*p* < .001), IFN-gamma (*p* = 0.011), IFN-alpha (*p* < .001), CXCL10/IP-10 (*p* < .001) and B7-H3 (*p* < .001) significantly decreased (Figure 7A). However, compared to patients with moderate COVID-19, the overall serum levels of IL-10 (*p* < .001), IFN-gamma (*p* = 0.037), CCL2/MCP-1 (*p* = 0.008), CXCL10/IP-10 (*p* < .001) and IL-6 (*p* = 0.001) were significantly upregulated in severe patients on fifth day of treatment (Figure 8).

IL-6 concentration decreased significantly with antiviral treatment (*p* = 0.047) but increased in patients in other treatment groups, although without statistical significance (*p* = 0.067) (Figure 9). Moreover, there was a statistically significant increase of IL-6 in patients with severe COVID-19 (*p* = 0.016) compared to patients with moderate disease (Figure 10). Compared to other therapies, only patients with immunomodulatory treatment showed an increase of IL-22 level (*p* = 0.031), whereas combination of immunomodulatory

and antiviral treatments resulted in a significant increase of IL-17A (*p* = 0.046) and a decrease of IL-17F (*p* = 0.027) in these patients (Figure 9). Concentration of IL-1 beta increased significantly in both groups treated with immunomodulatory drugs (*p* = 0.030) and a combination of immunomodulatory and antiviral drugs (*p* = 0.030) (Figure 9). In contrast to the group with severe COVID-19, in patients with moderate disease IL-1 beta levels were significantly reduced (*p* = 0.022) on fifth day of treatment, suggesting its contribution to worse clinical outcomes (Figure 10).

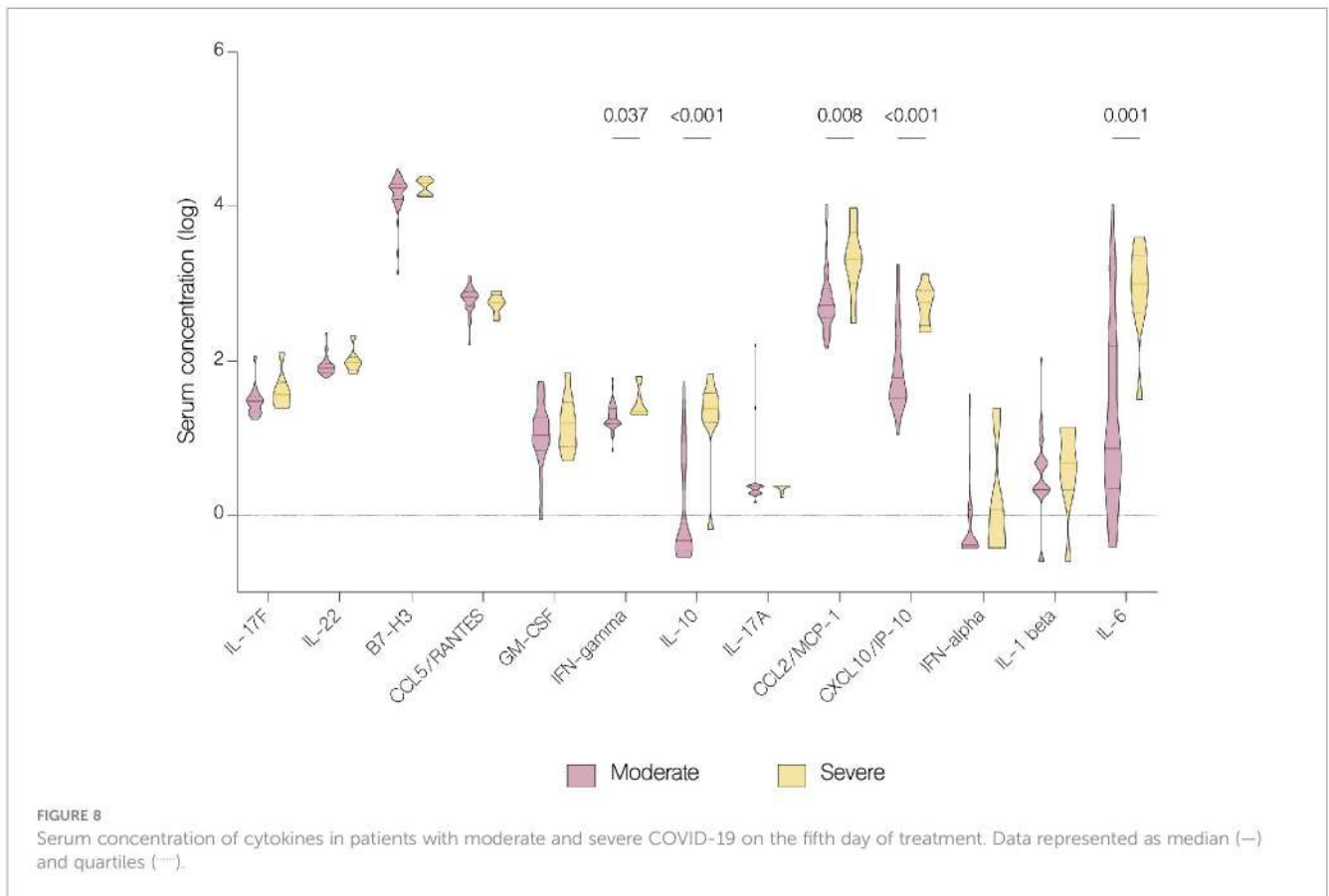
The overall number of lymphocytes, and both CD4+ and CD8+ T cell subsets significantly increased with treatment (*p* < .001), including CD4+ and CD8+ producing IL-17A (*p* = 0.003 and *p* = 0.016 respectively) (Figure 7B). However, patients with moderate disease demonstrated immune response to treatment with a significant increase in both CD4+ and CD8+ T cell counts (*p* < .001 and *p* = 0.002 respectively), while in patients with severe disease there was no significant difference in any subset (*p* = 0.126 and *p* = 0.152 respectively) (Figure 11). There were no statistically significant differences of T cell counts between the different treatment groups, however the percentage of IL-22 producing CD4+ T cells was markedly lower in patients treated with immunomodulatory drugs (*p* = 0.035) (Figure 12).



## 4 Discussion

Laboratory parameters have potential value in risk assessment and COVID-19 outcomes prediction, as early recognition of disease progression is essential for effective management and intervention. Several biomarkers were proposed as potential predictors of the COVID-19 outcome based on the hyperinflammatory state and hypercoagulability involved in pathophysiology of severe disease,

such as CRP, PCT, IL-6, D-dimers and LDH (14). Many studies reported that elevated levels of ALT, AST, CRP, PCT, IL-6, D-dimers and LDH, and depressed counts of lymphocytes and platelets in patients with COVID-19 were associated with disease severity (14–19). Consistently with previous findings, in our study patients had significantly higher levels of ALT, AST, CRP and D-dimers and lower counts of lymphocytes and platelets compared to controls. In addition, patients had elevated levels of PCT, fibrinogen



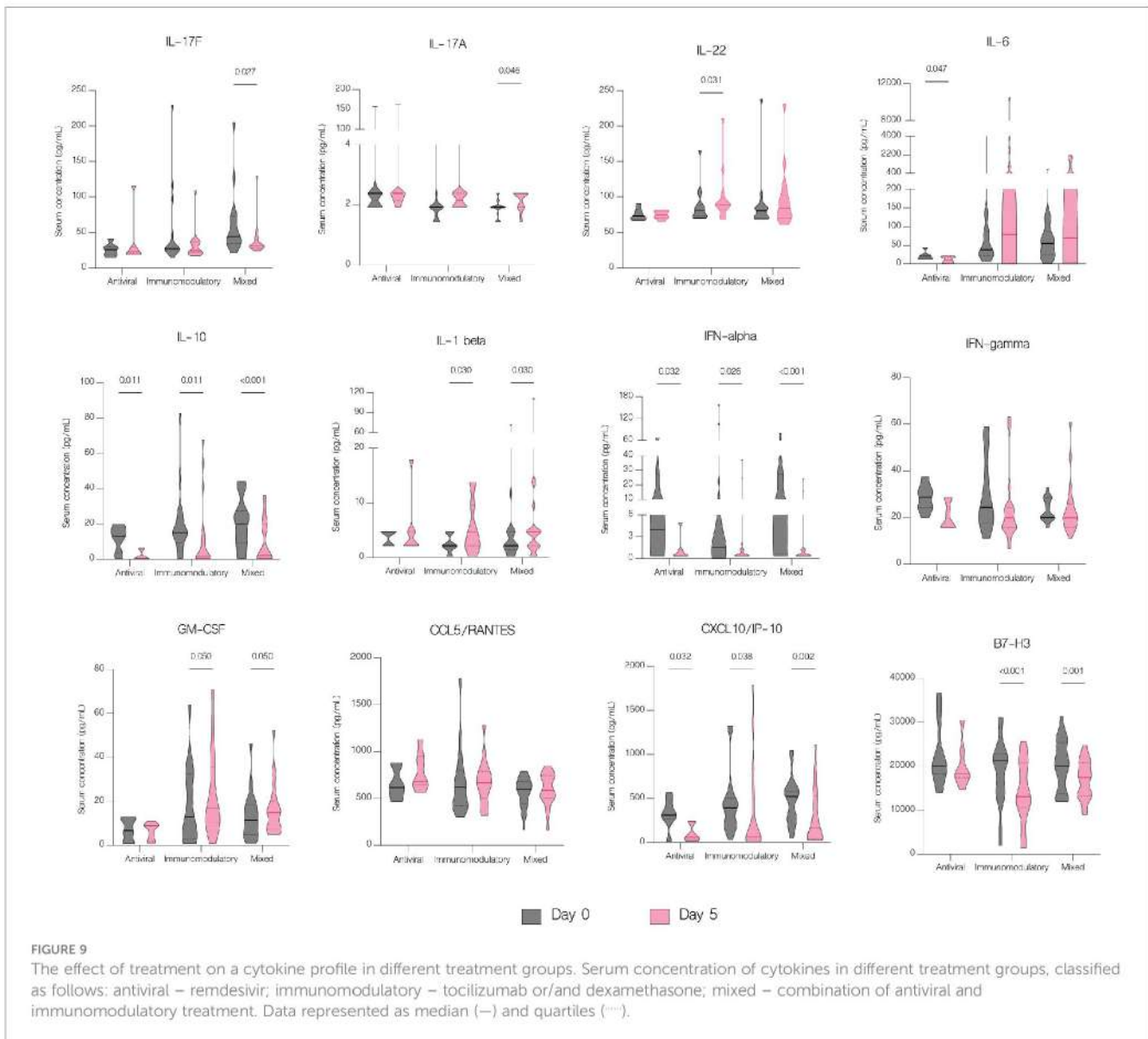
and LDH. Moreover, patients with severe disease had significantly higher level of LDH, while there was no statistical difference in other laboratory parameters.

Impairment of immune responses resulting in an excessive inflammation is a hallmark of COVID-19. In addition to the virus-induced direct lung injury, excessive activation of immune system in response to SARS-CoV-2 invasion triggers immune cells to release both pro- and anti-inflammatory cytokines, such as IL-1 beta, IL-6, IL-10, IL-17, TNF and CCL2/MCP-1 (20). We have demonstrated that concentrations of several cytokines, including CCL5/RANTES, GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-10 and CXCL10/IP-10, were significantly upregulated in patients with COVID-19 versus healthy controls. Moreover, upon admission patients with severe disease had higher concentration of IL-10 and CXCL10/IP-10 than patients with moderate disease. These results are in accordance with the studies reporting an elevation of IL-1 beta, IL-6, IL-10, GM-CSF, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES and IFN-gamma in the blood samples of COVID-19 patients (21–23). Furthermore, Huang et al. observed higher concentration of IL-10, CXCL10/IP-10 and CCL2/MCP-1 in intensive care COVID-19 patients versus non intensive care patients (21).

Several studies reported decrease in CD4+ and CD8+ T cells counts in patients with COVID-19 (23–27). Hence, it has been suggested that the counts of CD4+ and CD8+ T cells can be a diagnostic marker of COVID-19 activity and predictor of disease severity (25). Patients in our study had significantly reduced both CD4+ and CD8+ absolute counts, but without significance between

moderate and severe disease. However, on fifth day of hospitalization patients with severe disease had lower lymphocytes, CD4+ and CD8+ T cells count, which may be explained by the fact that in majority of severe cases, the disease progressed during hospitalization. In contrast to the group with severe COVID-19, patients with moderate disease showed clinical response to treatment, with a significant increase in both CD4+ and CD8+ T cells count. Similar results were obtained by Wang et al. showing an increase in CD8+ T cells and B-cells in response to treatment in patients with COVID-19. Moreover, authors indicated that the decrease of these cell subsets might serve as an independent predictor of poor treatment response (26). In our study, despite the depleted absolute numbers of CD4+ and CD8+ T cells, these cells showed overactivation and increased expression of IL-17A and IL-22. We found significantly higher percentage of both CD4+ and CD8+ T cells producing IL-17A and CD4+ T cells producing IL-22 in patients with COVID-19. These results correspond to the study of De Biasi et al. that reported an increase in percentages of T cell subsets producing IL-17A (22). Similarly, Cagan et al. reported increased numbers of CD4+ and CD8+ T cells producing IL-22 and CD8+ T cells producing IL-17A (7).

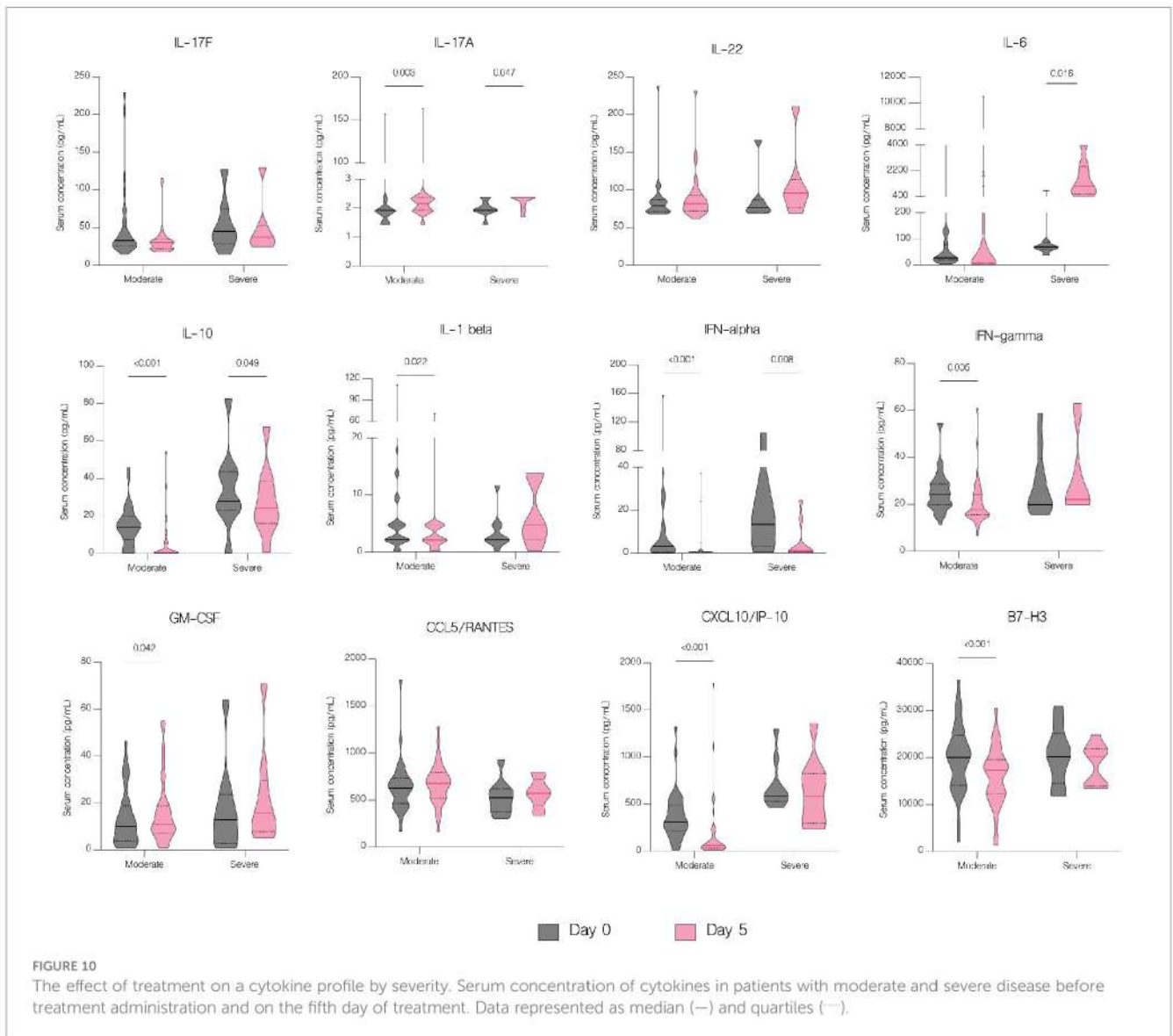
The production of IL-17A, a cytokine with both protective and pathogenic role, is the hallmark of the Th17 response. IL-17A has the ability to activate a wide range of inflammatory pathways, which can cause tissue damage and illness aggravation. Several indicators pointed to the likely role of IL-17A in COVID-19 clinical outcomes prompting considerations of using this cytokine as a marker of disease severity (20, 28–30). Previous study noted significantly



upregulated IL-17A and IL-17F in patients with COVID-19 (23). Likewise, patients with COVID-19 in our study had significantly greater level of IL-17A and IL-17F than controls, but without significance between patients with moderate and severe disease. This observation is in accordance with the study of Huang et al. that reported significantly higher concentration of IL-17A in ICU patients compared to healthy controls but without significance between ICU and non-ICU care (21). Similarly, Mostafa et al. also noted upregulated levels of IL-17A in paediatric patients with COVID-19, however no association with disease outcome was found (31). In contrast, Liu et al. demonstrated significantly higher level of IL-17 in patients with severe COVID-19 compared to patients with mild disease. Moreover, IL-17 has been shown to positively correlate with Murray score, an indicator of lung injury severity (32). Another study showed an increase of IL-17 both in plasma and saliva of patients with severe COVID-19 compared to mild and asymptomatic patients. In addition, elevated levels of IL-

17 were reported in nasal swabs and lung autopsies of COVID-19 patients and were associated with higher concentrations of other proinflammatory cytokines, including IL-1 beta, IL-6, IL-8, and IL-23 (33).

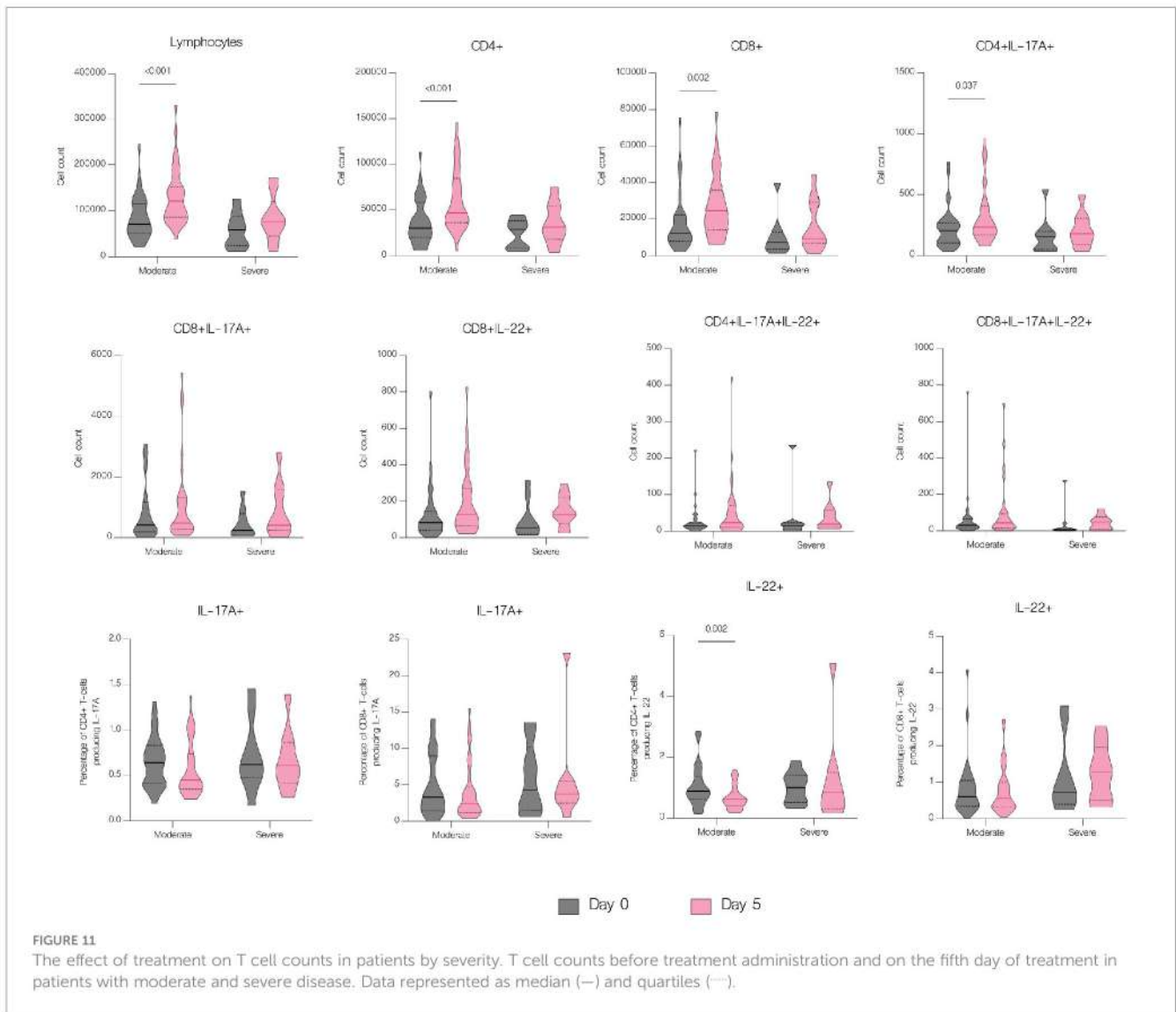
Another cytokine associated with Th17 response with both protective and pathogenic role is IL-22. It regulates host defense at barrier surfaces and promotes tissue regeneration yet has been linked to several diseases characterized by inflammatory tissue pathology (34). However, recent study of Das et al. reported potent immune boosting and antiviral properties of IL-22 in respiratory syncytial virus (RSV) infection and since COVID-19 have pathological characteristics like other viral respiratory infections it is reasonable to speculate that IL-22 may also limit the severity of SARS-CoV-2 infection (34, 35). We found elevated levels of IL-22 in patients on admission. In addition, concentrations of IL-22 in our patients significantly increased during hospitalization. Likewise, previous studies showed upregulated



levels of IL-22 in both paediatric and adult patients with COVID-19, however no association with disease outcome or severity was found (23, 31). During inflammation, group 3 innate lymphoid cells (ILC3s) produce IL-17 and IL-22 upon stimulation with IL-1 beta and IL-23. In our study, despite no significant increase in T cell subsets in patients with severe disease there was an increase in IL-17A and IL-22 concentration which might be associated with ILC3s. In addition, it has been shown that lower abundance of ILCs in the blood was associated with longer hospitalization in individuals with COVID-19, hence there might be a correlation between decreased ILCs in the blood and severe disease (36, 37).

The number of available studies on the effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19 is scarce, hence the impact of treatment on the immune response is still unclear. In our study, treatment with remdesivir (RDV) resulted in a significant decline in concentrations of IL-6, IL-10, IFN-alpha and CXCL10/IP-10. Moreover, IFN-gamma and IL-1 beta were markedly decreased in patients treated with RDV, although

without statistical significance. We were unable to find another study to which to compare our findings, however our results suggest attenuation of an excessive immune response in patients receiving antiviral treatment. Immunomodulatory treatment resulted in a significant downregulation of IL-10, IFN-alpha, CXCL10/IP-10 and B7-H3 as well as upregulation of IL-22 and IL-1 beta. The report of Ponthieux et al. showed an increase in IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p70, IL-18 and IL-6R levels in patients with COVID-19 treated with tocilizumab achieving maximal values two to four days after drug administration. The authors of the study attributed these findings to an anti-inflammatory effect of IL-6, which was previously observed by other researchers (38, 39). However, in an experimental model of oleic acid-induced acute lung injury (ALI) both tocilizumab (TCZ) and dexamethasone (DEX) significantly reduced the expression of IL-1 beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha (40). Furthermore, DEX significantly reduced IL-8 levels in tracheal aspirates of mechanically ventilated children with RSV infection (41). In addition, DEX inhibited the secretion of IL-6 and CXCL8 in



human lung fibroblasts (42). Another study with an oleic acid-induced ALI demonstrated that DEX inhibits the expression of IL-6, TNF-alpha and VEGF while promoting the expression of IL-10 (43). Immunomodulatory treatment inhibits the expression of proinflammatory cytokines and promotes the expression of anti-inflammatory cytokines, hence alleviating tissue damage during infections. In our study, a combination of an antiviral and immunomodulatory treatment resulted in a significant decrease in IL-17F, IL-10, IFN-alpha, CXCL10/IP-10 and B7-H3 levels as well as an increase in IL-17A and IL-1 beta. However, an upregulation of proinflammatory cytokines, such as IL-17A and IL-1 beta, might be associated with higher number of severe cases and deaths in this group, if untreated. In fact, IL-1 beta was significantly lower in patients with moderate disease and markedly higher in patients with severe disease, although without statistical significance. Lastly, patients treated with antiviral drug, immunomodulatory drug or both demonstrated clinical response to treatment with an increase in lymphocyte, CD4+ and CD8+ counts, without difference between the treatment groups.

## 5 Conclusions

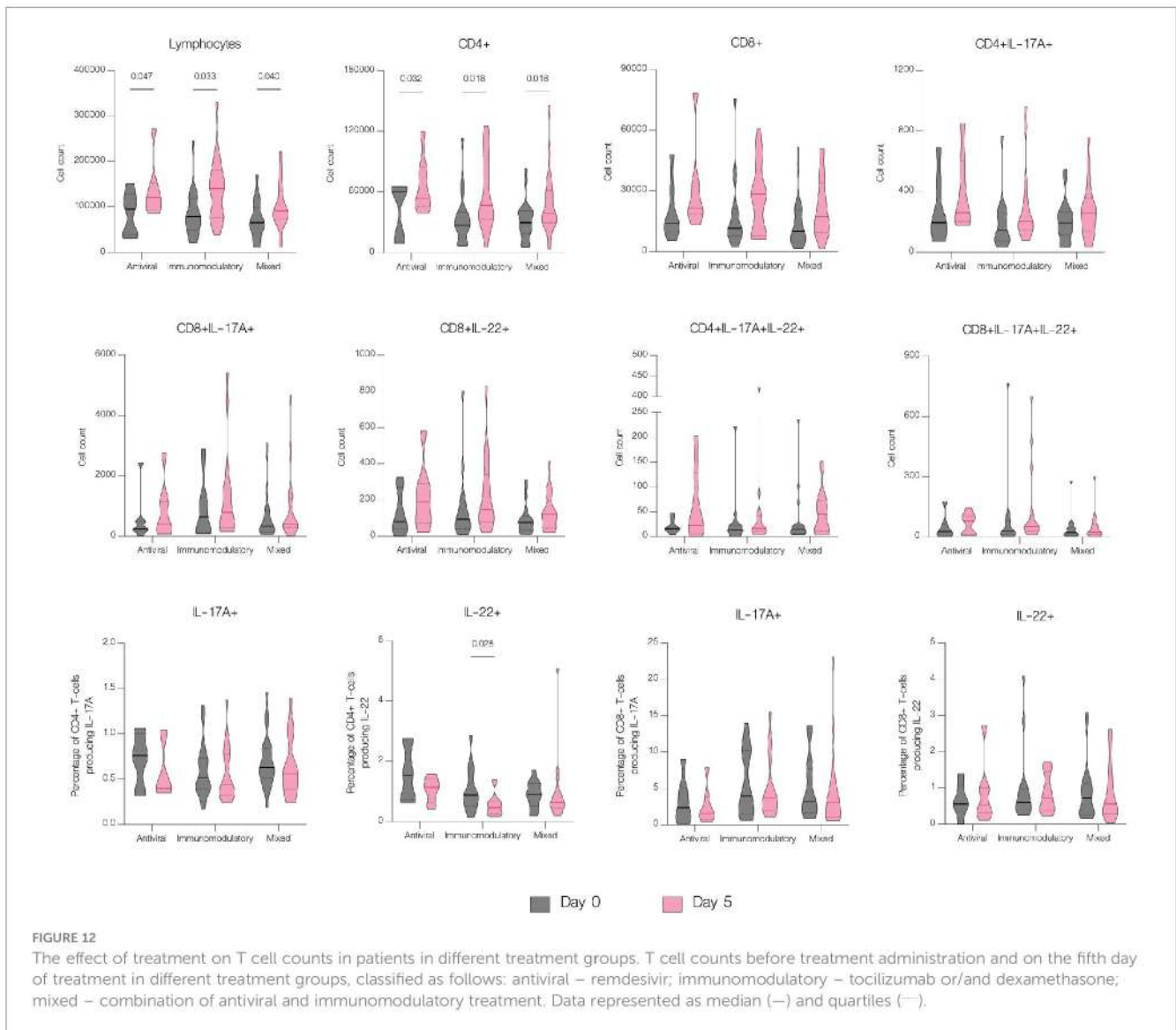
SARS-CoV-2 infection induced cytokine overexpression in hospitalized patients with COVID-19 as well as lymphopenia, particularly a decrease in CD4+ and CD8+ T cell counts. Moreover, despite the reduced counts of CD4+ and CD8+ T cells, both subsets showed overactivation and increased expression of IL-17A and IL-22, thus targeting Th17 response might alleviate inflammatory response in severe disease.

Administration of antiviral or/and immunomodulatory treatment resulted in a significant downregulation of pro-inflammatory cytokine expression and an upregulation of T cell absolute counts in most cases, thus showing effectiveness of treatment in COVID-19.

## 6 Limitations of the study

This study has some limitation. Firstly, small number of participants due to not meeting the inclusion criteria, as well as prompt initiation of therapy not allowing for sampling prior to the





treatment. Secondly, with the limited number of participants, it is difficult to evaluate risk factors for severity and mortality with multivariable-adjusted models. Finally, statistical results and p-values should be interpreted cautiously, as non-significant p-values do not necessarily rule out the difference between patients with moderate and severe disease.

### Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

### Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethical Committee at the Medical University of

Bialystok - APK.002.6.2021. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

### Author contributions

DM, AP-K, and KG contributed to conception and design of the study. DM, AS, and KG have performed the experiments, acquired and analyzed the data. DM, AP-K, KG, MM, and RF prepared the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

### Funding

This research was funded with subventions of Medical University of Bialystok SUB/1/DN/21/001/1156 and SUB/1/DN/21/003/1156.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1222170/full#supplementary-material>

## References

- Kaur S, Bansal R, Kollimuttathuillam S, Gowda AM, Singh B, Mehta D, et al. The looming storm: blood and cytokines in COVID-19. *Blood Rev* (2021) 46:100743. doi: 10.1016/j.blre.2020.100743
- Darif D, Hammi I, Kihel A, El Idrissi Saik I, Guessous F, Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: what goes wrong? *Microb Pathog* (2021) 153:104799. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104799
- Yongzhi X. COVID-19-associated cytokine storm syndrome and diagnostic principles: an old and new issue. *Emerg Microbes Infect* (2021) 10(1):266–76. doi: 10.1080/22221751.2021.1884503
- Hasanvand A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. *Inflammopharmacology* (2022) 30(3):789–98. doi: 10.1007/s10787-022-00992-2
- Sun X, Wang T, Cai D, Hu Z, Chen J, Liao H, et al. Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. *Cytokine Growth Factor Rev* (2020) 53:38–42. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.04.002
- Gong J, Zhan H, Liang Y, He Q, Cui D. Role of Th22 cells in human viral diseases. *Front Med (Lausanne)* (2021) 8:708140. doi: 10.3389/fmed.2021.708140
- Cagan E, Tezcan G, Simsek A, Kizmaz MA, Dombaz F, Asan A, et al. The age-dependent role of Th22, Tc22, and Tc17 cells in the severity of pneumonia in COVID-19 immunopathogenesis. *Viral Immunol* (2022) 35(4):318–27. doi: 10.1089/vim.2021.0132
- Rehman SU, Yoo HH. COVID-19 challenges and its therapeutics. *BioMed Pharmacother* (2021) 142:112015. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112015
- Fernandes Q, Inchakalody VP, Merhi M, Mestiri S, Taib N, Moustafa Abo El-Ella D, et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Ann Med* (2022) 54(1):524–40. doi: 10.1080/07853890.2022.2031274
- Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Ji J, Wen C. Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Front Immunol* (2020) 11:1708. doi: 10.3389/fimmu.2020.01708
- Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine storm' in COVID-19. *J Infect* (2020) 80(6):607–13. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.037
- Flisiak R, Horban A, Jaroszewicz J, Kozielowicz D, Pawlowska M, Parczewski M, et al. Management of SARS-CoV-2 infection: recommendations of the polish association of epidemiologists and infectiologists as of march 31, 2020. *Pol Arch Intern Med* (2020) 130(4):352–7. doi: 10.20452/pamw.15424
- Flisiak R, Horban A, Jaroszewicz J, Kozielowicz D, Mastalerz-Migas A, Owczuk R, et al. Management of SARS-CoV-2 infection: recommendations of the polish association of epidemiologists and infectiologists as of April 26, 2021. *Pol Arch Intern Med* (2021) 131(5):487–96. doi: 10.20452/pamw.15979
- Hariyanto TI, Japar KV, Kwenandar F, Damay V, Siregar JJ, Lugito NPH, et al. Inflammatory and hematologic markers as predictors of severe outcomes in COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Emerg Med* (2021) 41:110–9. doi: 10.1016/j.ajem.2020.12.076
- Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol* (2020) 95(7):834–47. doi: 10.1002/ajh.25829
- Malik P, Patel U, Mehta D, Patel N, Kelkar R, Akrmah M, et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid Based Med* (2021) 26(3):107–8. doi: 10.1136/bmjebm-2020-111536
- Battaglini D, Lopes-Pacheco M, Castro-Faria-Neto HC, Pelosi P, Rocco PRM. Laboratory biomarkers for diagnosis and prognosis in COVID-19. *Front Immunol* (2022) 13:857573. doi: 10.3389/fimmu.2022.857573
- Topp G, Bouyeya M, Cochran-Caggiano N, Ata A, Torres P, Jacob J, et al. Biomarkers predictive of extubation and survival of COVID-19 patients. *Cureus* (2021) 13(6):e15462. doi: 10.7759/cureus.15462
- Iwamura APD, Tavares da Silva MR, Hümmelgen AL, Soeiro Pereira PV, Falcai A, Grumach AS, et al. Immunity and inflammatory biomarkers in COVID-19: a systematic review. *Rev Med Virol* (2021) 31(4):e2199. doi: 10.1002/rmv.2199
- Martonik D, Parfieniuk-Kowarda A, Rogalska M, Flisiak R. The role of Th17 response in COVID-19. *Cells* (2021) 10(6). doi: 10.3390/cells10061550
- 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) 395(10223):497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- De Biasi S, Meschiari M, Gibellini L, Bellinazzi C, Borella R, Fidanza L, et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun* (2020) 11(1):3434. doi: 10.1038/s41467-020-17292-4
- Song JW, Zhang C, Fan X, Meng FP, Xu Z, Xia P, et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nat Commun* (2020) 11(1):3410. doi: 10.1038/s41467-020-17240-2
- Liu Z, Long W, Tu M, Chen S, Huang Y, Wang S, et al. Lymphocyte subset (CD4+, CD8+) counts reflect the severity of infection and predict the clinical outcomes in patients with COVID-19. *J Infect* (2020) 81(2):318–56. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.054
- Jiang M, Guo Y, Luo Q, Huang Z, Zhao R, Liu S, et al. T Cell subset counts in peripheral blood can be used as discriminatory biomarkers for diagnosis and severity prediction of coronavirus disease 2019. *J Infect Dis* (2020) 222(2):198–202. doi: 10.1093/infdis/jiaa252
- Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis* (2020) 221(11):1762–9. doi: 10.1093/infdis/jiaa150
- Huang L, Shi Y, Gong B, Jiang L, Zhang Z, Liu X, et al. Dynamic blood single-cell immune responses in patients with COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* (2021) 6(1):110. doi: 10.1038/s41392-021-00526-2
- Orlov M, Wander PL, Morrell ED, Mikacenic C, Wurfel MM. A case for targeting Th17 cells and IL-17A in SARS-CoV-2 infections. *J Immunol* (2020) 205(4):892–8. doi: 10.4049/jimmunol.2000554
- Parackova Z, Bloomfield M, Klocperk A, Sediva A. Neutrophils mediate Th17 promotion in COVID-19 patients. *J Leukoc Biol* (2021) 109(1):73–6. doi: 10.1002/JLB.4COVCRA0820-481RRR
- Hotez PJ, Bottazzi ME, Corry DB. The potential role of Th17 immune responses in coronavirus immunopathology and vaccine-induced immune enhancement. *Microbes Infect* (2020) 22(4-5):165–7. doi: 10.1016/j.micinf.2020.04.005
- Ahmed Mostafa G, Mohamed Ibrahim H, Al Sayed Shehab A, Mohamed Magdy S, AboAbdoun Soliman N, Fathy El-Sherif D. Up-regulated serum levels of interleukin (IL)-17A and IL-22 in Egyptian pediatric patients with COVID-19 and MIS-c: relation to the disease outcome. *Cytokine* (2022) 154:155870. doi: 10.1016/j.cyto.2022.155870
- Liu Y, Zhang C, Huang F, Yang Y, Wang F, Yuan J, et al. Elevated plasma levels of selective cytokines in COVID-19 patients reflect viral load and lung injury. *Natl Sci Rev* (2020) 7(6):1003–11. doi: 10.1093/nsr/nwaa037
- Sharif-Askari FS, Sharif-Askari NS, Hafezi S, Mdkhana B, Alsayed HAH, Ansari AW, et al. Interleukin-17, a salivary biomarker for COVID-19 severity. *PLoS One* (2022) 17(9):e0274841. doi: 10.1371/journal.pone.0274841
- Fang S, Ju D, Lin Y, Chen W. The role of interleukin-22 in lung health and its therapeutic potential for COVID-19. *Front Immunol* (2022) 13:951107. doi: 10.3389/fimmu.2022.951107
- Das S, St Croix C, Good M, Chen J, Zhao J, Hu S, et al. Interleukin-22 inhibits respiratory syncytial virus production by blocking virus-mediated subversion of cellular autophagy. *iScience* (2020) 23(7):101256. doi: 10.1016/j.isci.2020.101256
- Hoffmann JP, Kolls JK, McCombs JE. Regulation and function of ILC3s in pulmonary infections. *Front Immunol* (2021) 12:672523. doi: 10.3389/fimmu.2021.672523

37. Silverstein NJ, Wang Y, Manickas-Hill Z, Carbone C, Dauphin A, Boribong BP, et al. Innate lymphoid cells and COVID-19 severity in SARS-CoV-2 infection. *Elife* (2022) 11. doi: 10.7554/eLife.74681
38. Ponthieux F, Dauby N, Maillart E, Fils JF, Smet J, Claus M, et al. Tocilizumab-induced unexpected increase of several inflammatory cytokines in critically ill COVID-19 patients: the anti-inflammatory side of IL-6. *Viral Immunol* (2022) 35(1):60–70. doi: 10.1089/vim.2021.0111
39. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* (2011) 1813(5):878–88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
40. Terzi F, Demirci B, Çınar İ, Alhilal M, Erol HS. Effects of tocilizumab and dexamethasone on the downregulation of proinflammatory cytokines and upregulation of antioxidants in the lungs in oleic acid-induced ARDS. *Respir Res* (2022) 23(1):249. doi: 10.1186/s12931-022-02172-w
41. van Woensel JB, Lutter R, Biezeveld M, Dekker T, Nijhuis M, van Aalderen WM, et al. Effect of dexamethasone on tracheal viral load and interleukin-8 tracheal concentration in children with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* (2003) 22(8):721–6. doi: 10.1097/01.inf.0000078165.62923.15
42. Higham A, Singh D. Dexamethasone and p38 MAPK inhibition of cytokine production from human lung fibroblasts. *Fundam Clin Pharmacol* (2021) 35(4):714–24. doi: 10.1111/fcp.12627
43. Qin M, Qiu Z. Changes in TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and VEGF in rats with ARDS and the effects of dexamethasone. *Exp Ther Med* (2019) 17(1):383–7. doi: 10.3892/etm.2018.6926

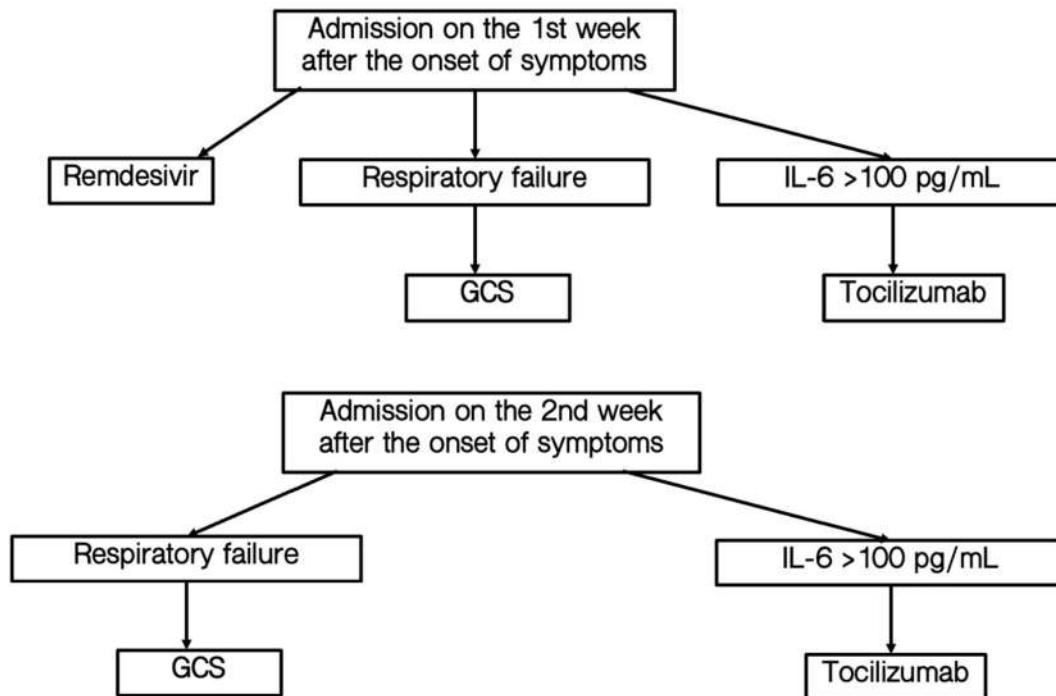
## Supplementary Material

### Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19.

Diana Martonik, Anna Parfieniuk-Kowerda, Aleksandra Starosz, Kamil Grubczak, Marcin Moniuszko, Robert Flisiak

\* Correspondence: Diana Martonik, [diana.martonik@umb.edu.pl](mailto:diana.martonik@umb.edu.pl)

#### 1 Supplementary Figures and Tables



Supplementary Figure 1. Simplified therapeutic management with the reference to the time of patients admission from the onset of the symptoms.

Variables	Moderate cases (n=35)	Severe cases (n=9)	<i>p</i>
Age, y	60.0 (50.0–68.5)	67.0 (57.0–73.0)	0.354
Gender, male	23 (65.7%)	9 (100.0%)	0.002*
BMI, kg/m <sup>2</sup>	30.5 (27.6–34.9)	29.0 (24.8–32.1)	0.476
SpO <sub>2</sub> , %	92.0 (86.5–94.0)	82.0 (78.0–88.0)	0.004*
Time from onset, days	7.0 (5.5–10.0)	7.0 (5.0–9.0)	0.481
Comorbidities			
Hypertension, n (%)	20 (57.1%)	5 (55.6%)	0.932
Diabetes, n (%)	4 (11.4%)	3 (33.3%)	0.109
Asthma, n (%)	2 (5.7%)	0 (0.0%)	0.463
Dyslipidaemia, n (%)	7 (20.0%)	1 (11.1%)	0.537
Symptoms			
Fever, n (%)	27 (77.1%)	5 (55.5%)	0.195
Cough, n (%)	23 (65.7%)	5 (55.5%)	0.572
Dyspnoea, n (%)	19 (54.2%)	5 (55.5%)	0.946
Fatigue, n (%)	19 (54.2%)	5 (55.5%)	0.946
Lung involvement in CT scan on admission, %	40.0 (30.0–60.0)	50.0 (40.0–80.0)	0.196

Data represented as number or median (IQR). BMI = body mass index, SpO<sub>2</sub> = oxygen saturation, \* = statistical significance

Supplementary Table 1. General characteristics of moderate and severe cases.

Variables	Normal range	Moderate cases (n=35)	Severe cases (n=9)	<i>p</i>
ALT, IU/L	<31.0	38.0 (23.3–59.8)	48.0 (37.0–86.0)	0.289
AST, IU/L	<32.0	51.0 (44.3–66.0)	78.0 (44.3–135.5)	0.157
CRP, mg/dL	<5.0	84.7 (51.5–127.1)	106.7 (88.0–175.9)	0.111
PCT, mg/dL	<0.05	0.08 (0.05–0.13)	0.14 (0.09–0.54)	0.097
D-dimers, ng/mL	<500.0	853.0 (638.0–1377.0)	1272.0 (814.0–1495.0)	0.503
Fibrinogen, mg/dL	200.0–400.0	623.0 (527.0–758.0)	695.5 (629.0–780.3)	0.401
LDH, U/l	135.0–214.0	447.0 (338.3–580.5)	635.0 (498.3–777.3)	0.040*
Leukocyte count, x10 <sup>9</sup> /L	4.0–10.0	5.5 (4.7–8.4)	6.0 (4.4–8.7)	0.673
Neutrophil count, x10 <sup>9</sup> /L	1.6–7.2	4.2 (3.1–7.4)	4.4 (3.2–7.3)	0.846
Lymphocyte count, x10 <sup>9</sup> /L	0.8–4.7	0.9 (0.7–1.2)	0.8 (0.5–0.8)	0.054
Lymphocytes, %	18.0–48.0	13.4 (9.8–23.9)	12.4 (8.8–15.5)	0.429
Haemoglobin, g/dL	12.0–16.0	14.9 (13.4–15.4)	14.7 (13.7–15.4)	0.964
Platelet count, x10 <sup>9</sup> /L	130.0–350.0	188.0 (156.0–268.5)	145.0 (119.0–194.0)	0.244
INR	0.8–1.2	1.2 (1.1–1.2)	1.1 (1.1–1.2)	0.570

Data represented as number or median (IQR). ALT = alanine aminotransferase, AST = aspartate aminotransferase, CRP = C-reactive protein, INR = international normalized ratio, LDH = lactate dehydrogenase, PCT = procalcitonin, \* = statistical significance

**Supplementary Table 2. Laboratory findings in moderate and severe cases.**

## 10. Streszczenie w języku polskim

Cytokiny odgrywają ważną rolę w immunopatologii zakażeń wirusowych. Szybka i dobrze skoordynowana odpowiedź układu immunologicznego stanowi pierwszą linię obrony w infekcji wirusowej. Jednakże zaburzona, nadmierna odpowiedź immunologiczna może powodować efekt odwrotny od zamierzonego, powodując uszkodzenie organizmu. Zjawisko „burzy cytokinowej” jest patologiczną reakcją układu immunologicznego charakteryzującą się szybką proliferacją i hiperaktywacją limfocytów T, makrofagów oraz komórek NK, a także nadprodukcją cytokin prozapalnych i mediatorów chemicznych uwalnianych w wyniku immunologicznej i nieimmunologicznej odpowiedzi organizmu. Coraz więcej badań sugeruje, że odpowiedź Th17 odgrywa ważną rolę w patogenezie zapalenia płuc wywołanego przez COVID-19. Zaostrzenie odpowiedzi immunologicznej następuje poprzez uwalnianie cytokin, takich jak IL-17 i GM-CSF, promowanie migracji neutrofilów i osłabienie odpowiedzi Treg. Zahamowanie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej poprzez terminowe podanie GKS we wczesnym stadium „burzy cytokinowej” skutecznie zapobiega ostrej niewydolności oddechowej, chroniąc funkcje życiowe pacjentów.

Celem pracy była analiza wpływu leczenia na przebieg „burzy cytokinowej” u pacjentów z COVID-19, ze szczególnym uwzględnieniem leczenia immunomodulującego oraz ocena wybranych subpopulacji limfocytów T i profilu cytokin wydzielanych podczas zakażenia SARS-CoV-2 oraz ich korelacja z ciężkością przebiegu choroby.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że stężenia CCL5/RANTES, GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-10 i CXCL10/IP-10 były znacząco podwyższone u pacjentów z COVID-19 w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami. Co więcej, przy przyjęciu pacjenci z ciężką chorobą mieli istotnie wyższe stężenie IL-10 i CXCL10/IP-10 niż pacjenci z umiarkowaną chorobą. Zastosowane leczenie przeciwwirusowe spowodowało znaczny spadek stężenia IL-6, IL-10, IFN-alfa i CXCL10/IP-10, a zastosowane leczenie immunomodulujące przyczyniło się do znacznego zmniejszenia stężenia IL-10, IFN-alfa, CXCL10/IP-10 i B7-H3, a także do zwiększenia stężenia IL-22 i IL-1 beta. Natomiast połączenie leczenia przeciwwirusowego i immunomodulującego spowodowało znaczny spadek poziomów IL-17F, IL-10, IFN-alfa, CXCL10/IP-10 i B7-H3, a także wzrost IL-17A i IL-1 beta. U pacjentów z COVID-19 stwierdzono również istotnie wyższy odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> wytwarzających IL-17A oraz limfocytów T CD4<sup>+</sup> wytwarzających IL-22.

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Zastosowanie leczenia przeciwwirusowego i/lub immunomodulującego spowodowało znaczące obniżenie ekspresji cytokin prozapalnych i zwiększenie bezwzględnej liczby komórek T.
2. Zakażenie SARS-CoV-2 powoduje zwiększoną ekspresję cytokin u hospitalizowanych pacjentów z COVID-19, a także limfopenię, w szczególności spadek liczby limfocytów T CD4+ i CD8+.
3. Pomimo zmniejszonej liczby limfocytów T CD4+ i CD8+, obie podgrupy wykazywały nadmierną aktywację i zwiększoną ekspresję IL-17A i IL-22, a zatem ukierunkowanie leczenia na odpowiedź typu Th17 może złagodzić reakcję zapalną u pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby.



## 11. Streszczenie w języku angielskim

Cytokines play an important role in the immunopathology of viral infections. A rapid and well-coordinated immune system response is the first line of defence in a viral infection. However, a disturbed, over-activated immune response can be counterproductive, causing damage to the organism. The 'cytokine storm' phenomenon is a pathological response of the immune system characterised by rapid proliferation and hyperactivation of T lymphocytes, macrophages, and NK cells, as well as overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemical mediators released by the body's immune and non-immune responses. A growing number of studies suggests that the Th17 response plays an important role in the pathogenesis of COVID-19-induced pneumonia. The immune response is exacerbated by releasing cytokines such as IL-17 and GM-CSF, promoting neutrophil migration and attenuating the Treg response. Suppression of the excessive immune response by timely administration of GCS in the early stages of the 'cytokine storm' effectively prevents acute respiratory failure, protecting patients' vital functions.

The aim of this study was analysis of the effect of treatment on the course of the 'cytokine storm' in patients with COVID-19, with emphasis on immunomodulatory treatment, and evaluation of selected subpopulations of lymphocytes T and cytokine profile released during SARS-CoV-2 infection and their correlation with the severity of the disease.

The study showed that CCL5/RANTES, GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-10 and CXCL10/IP-10 levels were significantly elevated in COVID-19 patients compared to healthy volunteers. Furthermore, on admission, patients with severe disease had significantly higher levels of IL-10 and CXCL10/IP-10 than patients with moderate disease. The administration of antiviral treatment resulted in a significant decrease in IL-6, IL-10, IFN-alpha and CXCL10/IP-10, while the administration of the immunomodulatory treatment contributed to a significant decrease in IL-10, IFN-alpha, CXCL10/IP-10 and B7-H3, as well as an increase in IL-22 and IL-1 beta. Whereas the combination of antiviral and immunomodulatory treatment resulted in a significant decrease in levels of IL-17F, IL-10, IFN-alpha, CXCL10/IP-10 and B7-H3, and an increase in IL-17A and IL-1 beta. COVID-19 patients also had a significantly higher proportion of IL-17A-producing CD4+ and CD8+ T cells and IL-22-producing CD4+ T cells.

The following conclusions were drawn from the study:

1. The administration of antiviral and/or immunomodulatory treatment resulted in a significant reduction in pro-inflammatory cytokine expression and an increase in absolute T-cell count.
2. SARS-CoV-2 infection causes increased cytokine expression in hospitalised COVID-19 patients, as well as lymphopenia, in particular a decrease in CD4+ and CD8+ T-cell counts.
3. Despite reduced CD4+ and CD8+ T-cell counts, both subgroups showed over-activation and increased expression of IL-17A and IL-22, thus targeting Th17 response may alleviate the inflammatory response in patients with severe disease.

## 12. Piśmiennictwo

1. Mahmudpour M, Roozbeh J, Keshavarz M, Farrokhi S, Nabipour I. COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. *Cytokine*. 2020;133:155151. Epub 20200530. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155151. PubMed PMID: 32544563; PubMed Central PMCID: PMC7260598.
2. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book: Elsevier Health Sciences; 2014.
3. Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020;395(10223):514-23. Epub 2020/01/24. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9. PubMed PMID: 31986261; PubMed Central PMCID: PMC7159286.
4. Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Ji J, Wen C. Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Front Immunol*. 2020;11:1708. Epub 20200710. doi: 10.3389/fimmu.2020.01708. PubMed PMID: 32754163; PubMed Central PMCID: PMC7365923.
5. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect*. 2020;80(6):607-13. Epub 2020/04/10. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.037. PubMed PMID: 32283152; PubMed Central PMCID: PMC7194613.
6. Sun X, Wang T, Cai D, Hu Z, Chen J, Liao H, et al. Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;53:38-42. Epub 20200425. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.04.002. PubMed PMID: 32360420; PubMed Central PMCID: PMC7182527.
7. Hojyo S, Uchida M, Tanaka K, Hasebe R, Tanaka Y, Murakami M, et al. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen*. 2020;40:37. Epub 2020/10/01. doi: 10.1186/s41232-020-00146-3. PubMed PMID: 33014208; PubMed Central PMCID: PMC7527296.
8. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, et al. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:451-94. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.451. PubMed PMID: 10837066.
9. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135. Epub 2012/03/14. doi: 10.1155/2012/925135. PubMed PMID: 22474485; PubMed Central PMCID: PMC3312336.

10. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008;31(3):252-6. Epub 2008/05/27. doi: 10.1016/j.jaut.2008.04.017. PubMed PMID: 18502610; PubMed Central PMCID: PMC3178062.
11. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol.* 2010;10(4):225-35. doi: 10.1038/nri2735. PubMed PMID: 20336151; PubMed Central PMCID: PMC3496776.
12. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3). Epub 2018/03/03. doi: 10.3390/ijms19030730. PubMed PMID: 29510522; PubMed Central PMCID: PMC5877591.
13. Ali N, Rosenblum MD. Regulatory T cells in skin. *Immunology.* 2017;152(3):372-81. Epub 2017/08/04. doi: 10.1111/imm.12791. PubMed PMID: 28699278; PubMed Central PMCID: PMC5629423.
14. Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:986789. Epub 2013/12/26. doi: 10.1155/2013/986789. PubMed PMID: 24454481; PubMed Central PMCID: PMC3886602.
15. Muyayalo KP, Huang DH, Zhao SJ, Xie T, Mor G, Liao AH. COVID-19 and Treg/Th17 imbalance: Potential relationship to pregnancy outcomes. *Am J Reprod Immunol.* 2020;84(5):e13304. Epub 2020/07/31. doi: 10.1111/aji.13304. PubMed PMID: 32662111; PubMed Central PMCID: PMC7404618.
16. Flisiak R, Horban A, Jaroszewicz J, Kozielowicz D, Pawłowska M, Parczewski M, et al. Management of SARS-CoV-2 infection: recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of March 31, 2020. *Pol Arch Intern Med.* 2020;130(4):352-7. Epub 20200331. doi: 10.20452/pamw.15270. PubMed PMID: 32231173.
17. Flisiak R, Horban A, Jaroszewicz J, Kozielowicz D, Mastalerz-Migas A, Owczuk R, et al. Management of SARS-CoV-2 infection: recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of April 26, 2021. *Pol Arch Intern Med.* 2021;131(5):487-96. Epub 20210428. doi: 10.20452/pamw.15979. PubMed PMID: 33908727.

## 13. Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań

**KOMISJA BIOETYCZNA**  
**PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**  
ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok  
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08  
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

---

Białystok, 28.01.2021 r.

Uchwała nr: APK.002.6.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty ( t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” przez mgr Dianę Martonik wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 28.01.2021 r. do 02.2022 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab.  Otylia Kowal-Bielecka

*Pouczenie:*

1. *Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:*

1) *wnioskodawca;*

2) *kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;*

3) *komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.*

2. *Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.*

#### 14. Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu

Tytuł pracy: The Role of Th17 Response in COVID-19. Cells. 2021; 10(6):1550. doi: 10.3390/cells10061550.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant mgr Diana Martonik	Zebranie i opracowanie danych literaturowych, przygotowanie i zredagowanie manuskryptu, zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	80%
dr hab. Anna Parfieniuk-Kowerda	Analiza danych, ocena merytoryczna pracy, korekta manuskrypt i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	15%
dr Magdalena Rogalska	Ocena merytoryczna pracy i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	2%
prof. dr hab. Robert Flisiak	Ocena merytoryczna pracy, redakcja manuskryptu i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	3%

Białystok, 01.08.2023

dr hab. n. med. Anna Parfieniuk-Kowerda  
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „The role of Th17 response in COVID-19” autorstwa mgr Diany Martonik, dr hab. Anny Parfieniuk-Kowedy, dr Magdaleny Rogalskiej oraz prof. dr hab. Roberta Flisiaka opublikowanej w Cells, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” wynoszący 15% polegał na analizie danych, ocenie merytorycznej pracy, korekcie manuskryptu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Dianę Martonik publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Białystok, 01.08.2023

dr n. med. Magdalena Rogalska  
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „The role of Th17 response in COVID-19” autorstwa mgr Diany Martonik, dr hab. Anny Parfieniuk-Kowerty, dr Magdaleny Rogalskiej oraz prof. dr hab. Roberta Flisiaka opublikowanej w Cells, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” wynoszący 2% polegał na ocenie merytorycznej pracy i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Dianę Martonik publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

*Magdalena Rogalska*



Białystok, 01.08.2023

prof. dr hab. n. med. Robert Flisiak  
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „The role of Th17 response in COVID-19” autorstwa mgr Diany Martonik, dr hab. Anny Parfieniuk-Kowerdy, dr Magdaleny Rogalskiej oraz prof. dr hab. Roberta Flisiaka opublikowanej w Cells, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” wynoszący 3% polegał na ocenie merytorycznej pracy, redakcji manuskryptu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Dianę Martonik publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

  
Prof. dr hab. Robert Flisiak  
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii UMB  
UNIWERSYTECKI SZPITAL KLINICZNY  
15-540, Białystok, ul. Żurawia 14  
tel/fax +48 85 747 89 21

Tytuł pracy: Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19. *Front. Immunol.* 2023; 14:1222170. doi: 10.3389/fimmu.2023.1222170.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant mgr Diana Martonik	Zebranie i opracowanie danych, przeprowadzenie badań, przygotowanie i zredagowanie manuskryptu, zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	70%
dr hab. Anna Parfieniuk-Kowerda	Analiza wyników, ocena merytoryczna, korekta manuskryptu i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	10%
mgr Aleksandra Starosz	Pomoc w przeprowadzeniu badań i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	8%
dr hab. Kamil Grubczak	Pomoc w przeprowadzeniu badań i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	8%
prof. dr hab. Marcin Moniuszko	Ocena merytoryczna pracy i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	2%
prof. dr hab. Robert Flisiak	Ocena merytoryczna pracy, redakcja manuskryptu i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji	2%

dr hab. n. med. Anna Parfieniuk-Kowerda  
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19.” autorstwa mgr Diany Martonik, dr hab. Anny Parfieniuk-Kowery, mgr Aleksandry Starosz, dr hab. Kamila Grubczaka, prof. dr hab. Marcina Moniuszko oraz prof. dr hab. Roberta Flisiaka opublikowanej w *Frontiers in Immunology*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” wynoszący 10% polegał na analizie wyników, ocenie merytorycznej pracy, korekcie manuskryptu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Dianę Martonik publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Białystok, 01.08.2023

mgr Aleksandra Starosz  
Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19.” autorstwa mgr Diany Martonik, dr hab. Anny Parfieniuk-Kowerdy, mgr Aleksandry Starosz, dr hab. Kamila Grubczaka, prof. dr hab. Marcina Moniuszko oraz prof. dr hab. Roberta Flisiaka opublikowanej w *Frontiers in Immunology*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” wynoszący 8% polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Dianę Martonik publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Aleksandra  
Starosz

Białystok, 01.08.2023

dr hab. n. med. Kamil Grubczak  
Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19.” autorstwa mgr Diany Martonik, dr hab. Anny Parfieniuk-Kowerdy, mgr Aleksandry Starosz, dr hab. Kamila Grubczaka, prof. dr hab. Marcina Moniuszko oraz prof. dr hab. Roberta Flisiaka opublikowanej w *Frontiers in Immunology*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” wynoszący 8% polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Dianę Martonik publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Białystok, 01.08.2023

prof. dr hab. n. med. Marcin Moniuszko  
Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19.” autorstwa mgr Diany Martonik, dr hab. Anny Parfieniuk-Kowerdy, mgr Aleksandry Starosz, dr hab. Kamila Grubczaka, prof. dr hab. Marcina Moniuszko oraz prof. dr hab. Roberta Flisiaka opublikowanej w *Frontiers in Immunology*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” wynoszący 2% polegał na ocenie merytorycznej pracy i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Dianę Martonik publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

  
PROREKTOR  
ds. Nauki i Rozwoju  
prof. dr hab. Marcin Moniuszko

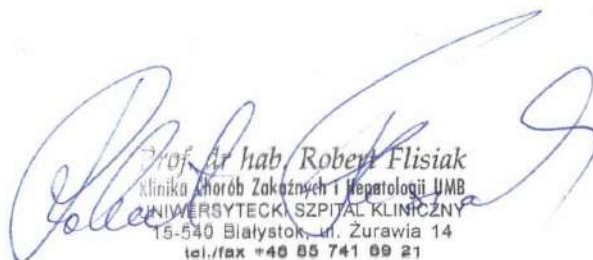
Białystok, 01.08.2023

prof. dr hab. n. med. Robert Flisiak  
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19.” autorstwa mgr Diany Martonik, dr hab. Anny Parfieniuk-Kowerdy, mgr Aleksandry Starosz, dr hab. Kamila Grubczaka, prof. dr hab. Marcina Moniuszko oraz prof. dr hab. Roberta Flisiaka opublikowanej w *Frontiers in Immunology*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19” wynoszący 2% polegał na ocenie merytorycznej pracy, redakcji manuskryptu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Dianę Martonik publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

  
Prof. dr hab. Robert Flisiak  
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii UMB  
UNIWERSYTECKI SZPITAL KLINICZNY  
15-540 Białystok, ul. Żurawia 14  
tel./fax \*40 85 741 09 21