

## **Patienter med covid-19 infektion i behov av BIVA vård**

### ***Immunopatologiska mekanismer och medicinsk behandlingsplan***

*Baserad på en litteraturgenomgång av publicerade artiklar*

#### **Covid-19 (Coronavirus disease 2019)**

Covid-19 orsakas av viruset SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Virusinfektionen rapporterades från Wuhan, Kina december 2019 och klassades som pandemi 11 mars 2020 av WHO. SARS-CoV-2 är ett enkelsträngat RNA virus (single-stranded RNA, ssRNA) innehållande 14 gener som gör ca 27 proteiner, inkluderande enzymer (bl.a. RNA polymeraser, proteaser), spike-, envelope-, membran- och nucleocapsid- proteiner [1]. Spike-proteinerna skapar virusets coronaliknande utseende och gett upphov till dess namn. Spike-proteinets uppbyggnad på SARS-CoV-2 är unik och binder sig till angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) på cellernas yta. SARS-CoV-2 har ännu inte återfunnits på fladdermöss eller andra djurslag, varför dess härkomst fortfarande är oklar [2]. Ett beta-coronavirus som närmast liknar SARS-CoV-2 (96 % genöverensstämmelse) är fladdermössviruset, RaTG13, som används vid forskning på coronavirus vid Wuhan Institute of Virology i Kina [3]. Detta har lett till en fortsatt debatt om virusets härkomst och tillkomst samt lett till att president Biden, USA tillsatt en kommitté för att utreda frågan närmare.

Covid-19 ger i ca 80 % inga till milda symtom, i 20 % måttliga symtom, i 5 % blir patienterna svårt sjuka och kräver intensivvård. Mortaliteten uppskattas f.n. till ca 2,3 %, men är åldersberoende med högre dödlighet hos äldre. Mortaliteten hos intensivvårdade patienter som får "standardbehandling" inkluderande steroider ligger på ca 20-25 % enligt randomiserade kontrollerade studier.

För att kunna förstå varför vissa virus ger harmlösa luftvägsinfektion, men SARS-CoV-2 ger en potentiellt livshotande infektion bör man känna till hur SARS-CoV-2 skiljer sig från andra virus och hur viruset påverkar kroppens inflammatoriska och immunologiska försvarssystem.

Sammanställningen beskriver dessa mekanismer och avslutas med en behandlings- och handläggningsplan som vi försöker följa på patienter med covid-19 på BIVA/Lund och som utgår från de publicerade vetenskapliga artiklarna som ingår in denna litteraturgenomgång.

#### **Kroppens ospecifika immunförsvar**

Epitelceller och immunologiska celler (makrofager (AM) , dendritiska celler (DC) och T-celler), som är lokaliserade i luftvägen, infekteras när virus inandas. Olika virus binder sig till olika cellulära membranstrukturer när de tar sig in i cellerna, där ofarliga coronavirus (229E, NL63, OC43, HKU1) binder sig till dipeptidyl-peptidas och/eller amino-peptidas, rhinovirus till ICAM-1 receptorn, respiratory syncytial virus (RSV) och influensa A till nucleolin etc. [4]. SARS-CoV-2, binder sig till enzymet angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), som inaktiveras. Viruset tas upp via endocytos till vesiklar i cellen som kallas endosomer. Virusets proteaser och RNA frigörs i endosomen och cellen infekteras. De infekterade cellerna har förmåga att känna igen främmande patogener

(Patogen-Associated Molecular Pattern – PAMP) eller skadade egna celler (Damage-Associated Molecular Pattern – DAMP) via speciella receptorer s.k. pattern recognition receptors – (PRR). En viktig typ av PRR är Toll-Like Receptors (TLRs) som dels finns extracellulärt på cellernas yta (TLR 1,2,4-6, 10), dels intracellulärt i endosomerna (TLR 3,7,8, 9) [5, 6]. Extracellulära TLR reagerar på membranbundna komponenter från bakterier och svamp (hydrofoba proteiner, glykoproteiner och lipider). TLR i endosomerna reagerar på nukleinsyror (DNA/RNA). TLR 3 reagerar på dubbelsträngad RNA, TLR 9 på dubbelsträngad DNA och TLR7/TLR 8 på enkelsträngad RNA (single-stranded RNA, ssRNA) [5].

Två andra intracellulära cytoplasmatiske PRR är nucleotide-oligomerization domain (NOD)-liknande receptorer som känner av bakteriens peptidoglykaner och retinoid-liknande receptorer (RLRs) som känner av virala nukleinsyror. Olika RLRs, som utgörs av bl.a. RIG-I retinoic acid-inducible gene-1-, MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5), and LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) känner igen olika specifika virala RNA, men ingen reagerar säkert mot enkelsträngad RNA (ssRNA) och vid aktivering mot dubbelsträngad RNA ger de huvudsakligen ett Typ I interferonsvar [7, 8]. Således finns inga säkra fynd som stöder att intracellulära cytoplasmatiske PRR är aktiverade vid SARS-CoV-2 (ssRNA virus) utan att det sker via aktiveringen i endosomen.

### **SARS-CoV-2 aktivering av det ospecifika försvaret**

Både TLR7 och TLR 8 i endosomerna känner således igen ssRNA och triggar ett proinflammatoriskt cytokinsvar via transkriptionsfaktorn nuklear factor kappa beta ( $\text{NF}\kappa\beta$ ) och ett antiviralt svar i form av Typ I interferoner ( $\text{IFN } \alpha/\beta$ ) via transkriptionsfaktorn interferon regulator factor 7 (IRF7). Aktivering av dessa TLR ger dock olika svar vid stimulering. TLR 8 aktivering ger en 100-faldigt kraftigare cytokinfrisättning än TLR 7 aktivering och TLR 7 aktivering en kraftigare Typ 1 interferonfrisättning [9]. TLR8 aktiveringen hämmar dessutom TLR7 och TLR9 [10, 11]. Nyligen påvisades att SARS-CoV-2 som är ett ssRNA virus huvudsakligen aktiverar TLR8 i cellens endosomer [12]. Detta innebär följaktligen att TLR 7 triggningen hämmas. SARS-CoV-2 aktiveringen av TLR8 triggar således framförallt en kraftig proinflammatorisk cytokinbildningen via  $\text{NF}\kappa\beta$ , samtidigt som hämningen av TLR 7 ger ett hämmat interferonsvar [12].

### **Bildningen av transkriptionsfaktorn $\text{NF}\kappa\beta$**

Transkriptionsfaktorn  $\text{NF}\kappa\beta$  inducerar bildning av mRNA för flera cytokiner, kemokiner och andra proinflammatoriska ämnen. Vid SARS-CoV-2 (TLR 8) har man funnit att mRNA för bl.a. de proinflammatoriska cytokinerna  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IL-8, pro-IL-1 $\beta$  bildas, men endast  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 och IL-8 frisätts. Cytokinerna IL-1 $\beta$  och IL-18 bildas däremot endast som inaktiva pro-IL-1 $\beta$  och pro-IL-18 [13].

### **Bildningen av transkriptionsfaktorn IRF7**

Eftersom SARS-CoV-2 triggar TLR8 bildas en mindre mängd av transkriptionsfaktorn IRF7, vilket innebär att de infekterade cellerna bildar mindre Typ I interferoner. Det kan förklara att man hos de flesta patienterna med covid-19 noterar låga nivåer av  $\text{IFN}\alpha$  och ingen  $\text{IFN}\beta$  [13]. Däremot har

man visat att signaleringsvägen för typ I interferonerna är intakt och att signaleringsvägens genuttryck till och med är uppreglerad [13].

Typ I interferonerna IFN- $\alpha$  och IFN- $\beta$  har en antiviral effekt genom att hämma viruset nukleinsyre-replikering. En hämmad virusreplikation minskar virusets förmåga att ytterligare stimulera infektionsförsvaret via reinfektion från infekterade celler. SARS-CoV-2 viruset ger således en begränsad bildning av Typ 1 interferonerna och betydelsen och avsaknad av endogen antiviral effekt påvisas också av att man i drygt 10 % av individerna med svår covid-19 dessutom hittar autoantikroppar mot Typ I - interferoner [14].

Dessutom finns s.k. Typ 2 interferon som utgörs av interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) som bildas av aktiverade T-celler. IFN- $\gamma$  aktiverar makrofagernas bildning av ytreceptorn CD40 och ökar deras HLA aktivitet vid presentation av virusantigen. IFN $\gamma$  stimulerar Janus kinase (JAK) receptorer som via fosforylering aktiverar transkriptionsfaktorn STAT som ytterligare potentierar induktionen av bl.a CD40, IFN $\gamma$  inducerbart protein-10 (IP-10), IL-12 och nitric oxide synthase (iNOS), som bildar kväveoxid (NO), beroende på vilken celltyp som stimuleras [15]. Om induktionen av iNOS sker samtidigt med en NF $\kappa$ B medierad induktion av iNOS, kan man få en synergistisk stimulering med produktion av stora mängder NO vilket ger upphov till en cirkulatorisk refraktär chock [16].

### **Cathelicidin, D-vitamin och inaktiveringen av SARS-CoV-2 spike protein**

TLR 8 aktiveringen i endosomen inducerar också lokal bildning av den antimikrobiella peptiden, cathelicidin [17]. Cathelicidin binder sig till spike proteinet på SARS-CoV-2 och inhibera virusets förökning och leder till icke inflammatorisk autofagi (Chung) [18]. Detta sker genom att TLR 8 aktiverar cytochrome P450 enzymet, 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) som överför inaktiv 25-OH-Vitamin D till den biologisk aktiva 1,25-OH-Vitamin D. 1,25-OH-Vitamin D binder sig till VDR och transporteras till kärnan där det fungerar som en promotor för bildningen av cathelicidin. Via en mekanism som är medierad via cathelicidin elimineras sedan SARS-CoV-2 antigenet via autofagi [12, 17, 18]. Vid D-vitaminbrist elimineras inte SARS-CoV-2 antigenet via denna mekanism utan genom att binda sig till specifika IgG som ger en inflammatorisk elimination enligt nedan.

När specifika IgG produceras och således binder sig till kvarvarande SARS-CoV-2 antigen, bildas IgG-SARS-CoV-2-antigen komplex som kan binda sig till makrofagernas/monocyternas Fc-gamma receptorer (CD64). Makrofagernas/monocyternas frisätter då proinflammatoriska mediatorer som ytterligare bidrar till att potentiära hyperinflammationen [19] vid MISC (Multisystem inflammatory syndrom in children) eller MISA (Multisystem inflammatory syndrom in adult).

Aktivt vitamin D 1,25-OH-vitamin D har också visat sig inducera gener som kodar för andra antimikrobiella peptider, men särskilt cathelicidin kan i princip bildas i alla celltyper (epitelceller, makrofager/monocyter och neutrofiler) [20]. D-vitamin nivån har varit mycket låg till odetektbar hos alla MISC patienter som vårdats på BIVA/Lund. Orsaken kan vara att barnen haft en D-vitaminbrist före insjuknandet och att detta bidragit till oförmåga att eliminera SARS-CoV-2 antigenet eller att D-vitaminet konsumerats i samband med TLR 8 aktiveringen av 1 $\alpha$ -hydroxylaset. D-vitamin bör således kontrolleras på patienter med covid-19, MISC och MISA och vid behov substitueras.

### **CD80, CD86 och aktiveringen av T-cellernas CD40L**

TLR aktiveringen i endosomen inducerar och uttrycker dessutom de co-stimulerande ytreceptorerna CD80 och CD86 på infekterade epitelceller, AM och DC [21]. T-cellerna kan via sin ytreceptor CD28 binda sig till dessa CD80 och CD86 på de infekterade cellerna. Detta leder till att T-cellerna aktiveras och uttrycker liganden CD40L (även kallad CD154) på cellytan. De aktiva T-cellerna kan sedan med CD40L binda sig till andra celler som presenterar ytreceptorn CD40. CD40 finns på trombocyternas cellyta [22], men uppregleras också vid infektioner på AM, DC, B-celler, endotelceller och glatta muskelceller [23]. Detta innebär att aktiverade T-celler kan binda sig till alla dessa cellers CD40 och ge en bidirektionell aktivering som ytterligare stimulerar både T-cellerna, B-cellerna, monocyterna/AM, DC och endotelcellerna att uppreglera sin proinflammatoriska aktivitet.

CD80 och CD86 är således viktig för aktiveringen av T-cellerna, men också en förutsättning för T-cellernas via den bidirektionella aktiveringen skall svara på de presenterande immuncellernas HLA uttryck (se nedan) och bilda vissa cytokiner, bl.a. IL-2 [24].

### **CD40/CD40L medierad mikrotrombotisering**

Aktiverade T-celler binder sig med CD40L direkt till CD40 receptorn på trombocyterna som därigenom aktiveras [25-27]. Trombocyterna frisätter bl.a. CCL5 (RANTES) som attraherar ytterligare T-celler och leukocyter och löslig CD40L [27-30]. Löslig CD40L från trombocyterna interagerar med CD40 receptorer som presenteras på kärlets endotelceller. Detta leder till att endotelcellerna aktiveras med frisättning av proinflammatoriska mediatorer samtidigt som trombomodulin produktionen hämmas, och bildningen av tissue factor och plaminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) stimuleras. Trombocyterna är hyperaktiva vid covid-19 infektioner [31, 32]. Aktiverade monocyter, T-celler och trombocyter binder sig till endotelcellerna via CD40/CD40L och ger upphov till en heparinresistent trombosbildning i lungans mikrokärl. Prevalensen tromboseras hos covid-19 patienter med profylaktisk och terapeutisk heparinbehandling var 43 % i publicerad multicenter studie [33]. Denna immunologiskt baserade trombosbildning är experimentellt undersökt och är resistent mot heparin, protein C och hirudin, vilket överensstämmer med fynden vid covid-19. Trombosbildningen hämmas endast av antitrombin III tillförsel i experimentella försök, samt har visat sig vara angiotensin II beroende [33-36]. Detta antyder att hämning av trombin-bildningen kan och bör vara effektiv, vilket i preliminära rapporter visat sig vara fallet [37, 38]. Trombosbildningen är inte kopplad till förekomst av virusantigen eller virusreplikation utan förekommer i anslutning till immunopatologiska reaktioner, d.v.s. via CD40/CD40L aktivitetensökningen vid covid-19 [39]. Det är den immunopatologiska reaktionen och inte viruset i sig som ger upphov till den livshotande mikroangiopatin.

### **HLA och aktiveringen av det specifika infektionsförsvaret**

Kroppens celler uttrycker även MHC (Major Histocompatibility gene-Complex). Hos människa kallas det "Human Leukocyte Antigen" (HLA) och kan skilja främmande från egna molekylstrukturer. HLA presenteras på cellernas yta och består av dels MHC klass I motsvarande

HLA-A, HLA-B, och HLA-C, dels av MHC klass II motsvarande HLA-DP, HLA-DR, och HLA-DQ. MHC klass I finns på alla celler och presenterar endogena peptider för de immunologiska cellerna som därigenom känner igen egna celler. Om MHC klass I presenterar främmande antigen tillsammans med det co-stimulerande proteinet CD86, aktiveras CD8 (T-celler) till cytotoxiska T-celler (CD8+) som sedan lyserar t.ex. virusangripna celler. MHC klass II finns huvudsakligen på immunologiskt aktiverade celler som via sina aktiverade CD40, CD80/86 presenterar antigenet för T-helper celler (CD4+). Hos alla SARS-CoV-2 infekterade patienter har man noterat att både CD4+ (T-helper celler) och CD8+ (cytotoxiska T-celler) uttrycker HLA-DR+ [13]. Virusantigenen presenteras således bundet till HLA molekyler inte bara för T-cellerna utan för olika immunologiska effektorceller, som t.ex. B-cellerna som bildar antikroppar. Härigenom aktiveras successivt kroppens infektionsförsvar och går över i det specifika infektionsförsvaret direkt riktat mot virusets antigena strukturer. Antikroppar bildas från 4 till 16 dagar efter symtomdebut vid SARS-CoV-2, med en serologisk konvertering i blodet i medeltal efter 12 dagar för IgM och 14 dagar för IgG [40-44]. Olika HLA konstitutioner presenterar antigen olika effektivt vilket kan bidra till att olika personer infektionsförsvar reagerar på olika sätt. HLA-grupperna kartläggs för att klargöra om någon specifik HLA-grupp är kopplad till svår covid-19 [45]. Man har statistiskt funnit att HLA-B\*07, HLA-B\*46, HLA-DRB1\*12 och HLA-Cw\*08 är mer känsliga för att utveckla svår covid-19 medan de som uttrycker HLA-DRB1\*03, HLA-A\*02, och HLA-Cw\*15 skyddas vid SARS-CoV infektioner [46]. Man har också noterat att personer med blodgrupp O är något mer skyddade mot svår covid-19 jämfört med blodgrupp A. Det finns ingen säker statistisk korrelation mellan blodgrupp (ABO-systemet) och HLA systemet.

### **Renin-angiotensin-aldosteron-systemet (RAAS)**

Vid luftvägsinfektioner aktiveras renin-angiotensin-aldosteron-systemet (RAAS) och bidrar till det primära infektionsförsvaret. Angiotensinogen som bildas i levern omvandlas av enzymet renin till angiotensin 1 (ANG I). ANG I omvandlas via enzymet angiotensin converting enzyme 1 (ACE 1), huvudsakligen lokaliserad i lungans kapillärer, till det kraftigt proinflammatoriska ämnet angiotensin 2 (ANG II). När ANG II nivån i lungan stiger stimuleras angiotensin 1 receptorn (AT-1rec), vilket bidrar till att potentiära lungans infektionsförsvar via flera proinflammatoriska funktioner som cytokin-bildning, CD40/CD40L-frisättning, kapillärläckage och ökad immunologisk cellaktivitet [47]. Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) bryter sedan ner ANG II till det vasodilaterande och antiinflammatoriska angiotensin 1-7 (ANG 1-7) [48, 49]. Vid SARS-CoV-2 infektionen inaktiveras ACE2, vilket bidrar till att ANGII nivån kvarstår hög [50, 51].

### **SARS-CoV-2 effekt på RAAS**

”Vanliga och ofarliga” corona-virus binder sig till de membranbundna enzymen, dipeptidyl-peptidas och/eller amino-peptidas och ger inga livshotande infektioner. SARS-CoV-2 som smittar via aerosoldroppar [52] binder sitt spike (S) proteinet till enzymet ACE2 på cellytan. S-proteinet delas sedan av proteaser i två steg, proteaset furin vid S1 delen och proteaset TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2) vid S2 delen varefter S-proteinets fusionsdel exponeras och viruset kommer in i cellen via endocytos tillsammans med ACE2 [53]. ACE2 finns på lungans typ 2 pneumocyter, tunntarmens enterocyter och i nässlemhinnans celler [51]. När virus binder sig till

ACE2 och tar sig in i epitelcellerna inaktiveras således membranbundet ACE2. SARS-CoV-2 inaktiverar inte bara membranbundet ACE2 utan ger också en kvarstående hämning av mRNA ACE2 produktionen i cellen sannolikt via viruset förmåga att hämma interferonproduktionen [54]. Detta innebär att nedbrytning av ANG II till ANG 1-7 begränsas och ANG II nivån kvarstår förhöjd vid covid-19. Bindningen och inaktiveringen av ACE2 skiljer sig således mellan ofarliga och farliga coronavirus och kan således ha en betydelse för att den proinflammatoriska processen fortskrider och potentiëras.

### **ACE2 betydelse vid covid-19**

ACE2 nivån är högre hos kvinnor före menopaus jämfört med män och hos yngre personer jämfört med äldre. Incidensen covid-19 är ca 15 % högre hos kvinnor jämfört med åldersmatchade män, men incidensen fatal covid-19 är ca 50 % högre hos män [55]. Höga ACE2 nivåer skulle kunna innebära att det blir lättare för SARS-CoV-2 att binda sig till cellerna och att ta sig in, vilket skulle kunna förklara en ökad infektionsincidens hos kvinnor. Låga ACE2 koncentrationer är associerad med svår covid-19, vilket skulle kunna förklara en högre incidens av svår covid-19 hos män och äldre [56, 57]. Estrogen inducerar och ökar ACE2 bildningen, vilket har varit en förklaring till en högre ACE2 koncentration hos kvinnor, samtidigt som man noterar en lägre kvinnlig mortalitet vid covid-19 [55, 58]. Tillskott med estradiol hos kvinnor > 50 år, som ökar ACE2 nivån, reducerade mortaliteten vid covid-19 med mer än 50 % [55]. Ökad mortalitet vid covid-19 är också associerad med låga halter av thyreoideahormoner [59] och låga vitamin D nivåer [60, 61], båda också kopplade till lägre bildningen av ACE2.

Vid låga nivåer och/eller inaktivering av enzymet ACE2 hämmas nedbrytningen av den kraftig proinflammatoriska ANGII molekylen till ANG 1-7. Höga ANG II koncentrationer med proinflammatorisk potentiering och hyperinflammation kan förklara kopplingen mellan ACE2 och ökad risk för svår covid-19 och ökad mortalitet. Analys av ANG II hos patienter med covid-19 visar att kvarstående förhöjda ANG II nivåer är korrelerade med lungskadans svårighetsgrad, och är korrelerade med ökande sjukdomsgrad och mortalitet [62-65]. Tillförsel av exogen löslig ACE2 sänker ANGII nivån och har i flera studier visat skyddande effekt vid inflammatoriska tillstånd, luftvägsinfektioner, ARDS och minskande cytokinnivåerna [66-68]. Behandling med AT-1rec blockad (Angiotensin receptor blockerare, ARB) är protektiv i epidemiologiska studier och randomiserad kontrollerad studie visar att den minskar mortaliteten signifikant vid covid-19 [69] och vid ARDS [57], vilket också indirekt antyder att den negativa effekten av låga ACE2 nivåer går via fördröjd nedbrytning av ANGII och ökad AT-1rec stimulering.

### **ANG II och lungskadan**

ANG II ger via AT-1rec upphov till kapillärläckage genom att kontrahera endotelcellerna via fosforylering av myosin-light-kinase [70, 71]. ANG II ger därigenom upphov till ett interstitiellt vätskeutträde och lungödem verifierat i humana, djurexperimentella och "in vitro" studier [70, 71]. ANGII ökningen är korrelerad med försämrad syresättning och liknar den initiala försämringsfasen vid covid-19 med liten påverkan på lungcompliance och god effekt av syrgastillförsel, tydande på en diffusionskada [72]. Kapillärläckaget kan hämmas eller blockeras

med de flesta ARB [68, 73]. ANG II har i flera studier visat sig ha en central roll vid lungskador och ARB som blockerar effekten av ANG II är protektiv vid lungskada både djurexperimentellt och hos människa. ARB minskar både sjukdomsgraden och mortaliteten vid influensa, pneumonier och covid-19 [69, 73, 74].

### **ANG II och lungfibros**

Lungfibros uppträder till följd av en förhöjd och förlängd AT-1rec stimulering via ANG II som kan blockeras av ARB [75, 76]. Således bör ARB alltid övervägas som profylax vid låga ACE2 nivåer med potentiellt förhöjda ANGII koncentrationer. Behandlingen är relativt riskfri, medan lungfibrosutveckling kan vara potentiellt livshotande. Individer som vårdas med ECMO kan utsättas för en ihållande långvarig AT-1rec stimulering och lungfibros kan således utvecklas [75, 77, 78]. Utveckling av lungfibrosen verkar medierad via PAK1 (serin/treonin proteinkinase 1) och kan förutom med ARB, experimentellt även profylaktiskt blockeras med bl.a. PTEN (phosphatase and tensin homolog), och melatonin [79].

### **ANG II och den proinflammatoriska potentieringen**

ANG II är kraftigt proinflammatorisk och potentierar aktiveringen av T-celler, makrofager/monocyter och endotelceller, bl.a. genom att öka frisättningen av proinflammatoriska kemokiner och cytokiner (IFN $\gamma$ , GM-CSF, IL2 och IL6) [71, 80-82]. ANG II verkar dessutom potentiera bildningen av ytreceptorerna CD40/CD40L i olika celler [83, 84].

### **ANG II proinflammatoriska effekt via ADAM17**

ANG II inducerar bildning av proteaset, ADAM17, som är ett enzym som klyver och frisätter flera proinflammatoriska cytokiner från cellytan bl.a. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13, IL-6R och EGFR (Epidermal Growth Factor receptor) [85, 86]. Frisättningen av dessa cytokiner från sitt cellmembran sprider den inflammatoriska reaktionen i kroppen och ADAM17 har därför kallats för ADAM17-sheddase. ADAM17 möjliggör synergistisk frisättning av TNF- $\alpha$  och IFN- $\gamma$ , vilket kan leda till vasodilatatorisk cirkulatorisk instabilitet [86]. Enzymet ADAM17 klyver och frisätter även ACE2 enzymet från cellmembranet [87].

### **ANG II och den heparinresistenta mikrotrombotiseringen vid covid-19**

Aktiverade T-celler aktiverar trombocyterna som frisätter lösligt CD40L som i sin tur aktiverar endotelcellerna. Endotelcellerna presenterar då ytreceptorn CD40, nedreglerar trombomodulin, uppreglerar tissue factor och PAI-1. Detta medför att monocyter och aktiverade T-celler kan binda sig till kärlväggens endotel samtidigt som endotelet blir kraftigt prokoagulant. [28, 88, 89]. ANGII potentierar den CD40/CD40L medierade trombogenesisen genom ökad trombin-aktivering [82, 83]. Experimentellt är det visat att denna typ av tromboser inte kan blockeras med protein C, heparin eller lågmolekylärt heparin, utan endast av antitrombin III [34], vilket stämmer överens med att "Trombosbildningen vid covid-19 är resistent mot både terapeutisk och profylaktisk heparinbehandling" [33, 90]. Således bör antitrombin III nivån alltid följas och korrigeras vid covid-19 för att förebygga och behandla trombosbildningen. ARB eller ACE inhibitorbehandling minskar

riskerna för trombos vilken också antyder att AT-1rec stimuleringen bidrar till trombosbildningen. Vid trombosbildning trots normalt-höga antitrombin III nivåer bör ställningstagande till insättning av trombin-hämning med argatroban övervägas [37, 38].

### ANG II och aldosteron

ANG II stimulerar produktion av aldosteron, som i sin tur aktiverar Angiotensin Converting Enzyme (ACE) att producera mer ANG II. Förhöjda aldosteronnivåer är associerad med svår covid-19 [91]. Aldosteron stimulerar bildning av PAI-1, möjligen via ANG II [92]. Hämning av Aldosteron kan därför indirekt minska bildningen av ANG II utöver sin effekt som kaliumsparande diuretikum [93].

### Covid-19 och cytokinfrisättningen

Flera cytokiner och kemokiner har detekterats i blod hos patienter med svår covid-19 [94]. Cytokinnivåerna som frisätts vid covid-19 är dock bara en bråkdel av den cytokinfrisättning som noteras vid ARDS, cytokine releasing syndrome (CRS) och septiska tillstånd [95]. Som jämförelse, så är IL-6 frisättningen vid covid-19 endast 1/10 - 1/1000 av nivåerna som detekteras vid dessa tillstånd. Även om det har ifrågasatts om cytokinaktiveringen har någon väsentlig betydelse vid covid-19 har en omfattande kartläggning av cytokin- och kemokinfrisättningen skett p.g.a. sjukdomens höga mortalitet. Ingen blockad av cytokiner har ännu i någon randomiserad, blind, kontrollerad studie kunnat påvisa en betryggande säkerställd effekt på mortaliteten, även om man sett effekt av cytokinblockad i retrospektiva studier där man jämfört med historiska kontroller. Frisättningen av cytokiner och kemokiner är ett indirekt mått på olika cellers proinflammatoriska aktivitetsnivå och infektionens profil. Flera cytokiner och kemokiner frisätts således till blodbanan från infektionens fokus, som vid covid-19 är lokaliserad till lungan och ger upphov till diverse symtom som kan uppträda vid svår covid-19 och MIS-C, såsom feber – IL-6 [96], gastrointestinala problem med smärtor, diarré, kräkningar – TNF $\alpha$  och IFN $\gamma$  [97-100], hudutslag - IFN- $\gamma$ , CXCL9, CXCL10, and CXCL11 [101, 102], cirkulatorisk instabilitet med viss myokardiell påverkan -TNF $\alpha$  och IFN $\gamma$  [16, 103].

Cytokinerna och kemokiner bildas av celler som finns eller ansamlas i och omkring infektionsfokus (epitelceller, endotelceller, makrofager, dendritiska celler, monocyter, aktiverade T-celler (CD4+, CD8+). Cytokiner frisätts via exocytos och aktiveras sedan av bl.a. ADAM17 sheddaset [85, 104].

Följande cytokiner och kemokiner uppvisar förhöjda koncentrationer vid covid-19 (SARS-CoV-2) jämfört med normalvärden:

De Valle et al [105]	TNF- $\alpha$	IL-6						
Qin et al [106]	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8	IL-7	IL-2R	IL-10		
Huang et al [107]	TNF- $\alpha$	IL-2	G-CSF	IL-7	IFN- $\gamma$	IL-10	IP-10	MCP-1
Varchetta et al [108]		IL-6	IL-8			IL-10		
Gil-Etayo et al [109]	IL-2	IL-6	IL-15				IP-10	
Lodge et al [110]			IL-8	IL-7	IL-1RA	MIP-1A	IP-10	MCP-1



Zhao et al [111]	TNF- $\alpha$	IL-6	GM-CSF	IL-1RA	IFN- $\gamma$	IL-10	IP-10	MCP-1
Cheng et al [112]	TNF- $\alpha$	IL-6			IL-2R	IL-10		
Hadjadj et al [13]	TNF- $\alpha$	IL-6						
Övrigt [113]			IL-33	CCL5	MIP-1B	G-CSF	IP-10	

IL – interleukin-, TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ ), IP-10 (interferon- $\gamma$ -inducible protein 10, även kallat CXCL10), G-CSF (granulocyt - colony stimulating factor), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein -1 även kallat CCL2), MIP-1A (macrophage inflammatory protein 1 alpha), GM-CSF (granulocyt-makrofag colony stimulating factor), IL-1RA (IL-1 receptor antagonist), IFN- $\gamma$ . IL-2R (IL-2 receptor), CCL5 (RANTES). [114]

Av de proinflammatoriska mediatorerna TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4 och IFN- $\gamma$ , var det bara IFN- $\gamma$  som var statistiskt högre hos covid-19 patienter som avled jämfört med de som överlevde [115]. I en annan studie hos individer som levde noterade man att IL-6 och IL-10 var statistiskt högre hos svårt sjuka jämfört med de med lindrig covid-19. Flera av cytokinerna och kemokinerna attraherar ytterligare proinflammatoriska celler till infektionsområdet som T-celler, monocyter/makrofager och neutrofiler och ökar frisättning av IL-15, MCP-1, IP-10, MCP 1A, MCP 1B, GM-CSF och G-CSF.

### IL-1 $\beta$ och covid-19

Artikeln av Hadjadj et al. [13] är av speciellt intresse då den, liksom flera andra författare, visar att IL-1 $\beta$  nivån i blod är låga (<5 pg/mL) till odetekterbara vid covid-19, men att genen för pro-IL-1 $\beta$  induceras och pro-IL-1 $\beta$  mRNA bildas. Pro-IL-1 $\beta$  mRNA induceras av NF $\kappa$ B när viruset stimulerar TLR8 i endosomen. För att Pro-IL-1 $\beta$  och pro-IL-18 skall aktiveras till IL-1 $\beta$  och IL-18 krävs att ett enzym, caspase-1 aktiveras. Caspase-1 finns bundet som inaktivt procaspase-1 till en makromolekyl som kallas inflammasom [116]. För att procaspase-1 skall aktiveras krävs ytterligare en intracellulär stimulering [24]. D.v.s. för att IL-1 $\beta$  och IL-18 skall aktiveras och frisättas krävs både TLR 8 receptorstimulering i endosomen för att aktivera NF $\kappa$ B och sedan en sekundär stimulering för att aktivera inflammasomen. Det har diskuterats och publicerats experimentella fynd att en typ av inflammasomer (NLRP3) aktiveras via kaliumutflöde i cytosolen vid covid-19 [12], men eftersom IL-1 $\beta$  och IL-18 nivåerna är låga eller odetekterbara vid covid-19 [105, 111, 117, 118] trots att mRNA-pro-IL-1 $\beta$  detekteras, tyder det på att SARS-CoV-2 viruset ger en svag eller obefintlig aktivering av procaspase-1 i inflammasomen via denna mekanism [13, 119]. Eftersom TLR8 aktiveringen inducerar bildning av pro-IL-1 $\beta$  vid covid-19 via transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, förklarar det däremot varför celler från covid-19 patienter lätt frisätter IL-1 $\beta$  vid experimentellt "ex vivo" caspase-1 aktivering t.ex. vid endotoxinstimulering (LPS) utan att det sker "in vivo". TLR4 stimulering aktiverar nämligen NLRP3 inflammasomen. Tyvärr använder flera författare "ex vivo" försök som en intäkt för att IL-1 $\beta$  frisättning även sker vid covid-19 och att IL-1 $\beta$  blockad (Anakinra) skall ges. De antar således att SARS-CoV-2 aktiverar procaspase-1, trots att IL-1 $\beta$  inte kan detekteras i blodet hos covid-19 patienter [105, 106, 110]. Varken De Valle et al, Lodge et al, Hadjadj et al. kunde detektera IL-1 $\beta$ . Analyser av IL-1 $\beta$  vid covid -19 tyder således på att caspase-1 inte aktiveras vid SARS-CoV-2. Hos patienter som utvecklat sekundära bakteriella infektioner eller

uttalad celldöd kan man däremot förvänta sig att få en sekundär stimulering och aktivering av inflammationsvägen, med frisättning av IL-1 $\beta$  och IL-18 [120, 121].

IL-1 $\alpha$  är inte heller detekterbar [13]. Däremot är mRNA för IL-1RA (IL-1 receptor antagonist) inducerad och IL-1RA koncentrationen hög i blod talande för kraftig anti-IL-1 aktivitet vid svår covid-19 [13].

Förhöjda IL-1 $\beta$  nivåer är inget vanligt fynd varken vid svår covid-19 eller MISC.

### **IL-6 och TNF $\alpha$ vid covid-19**

IL-6 är anti-inflammatoriskt när det är bundet till cellen via sin receptor (R) (klassisk signalering). Om IL-6 och dess receptor R (IL-6R) frisätts till cirkulationen blir komplexet kraftigt proinflammatoriskt. Löslig IL6R binder sig till gp130 receptorer (transsignalering) på många cellslag och ger upphov till en generell aktivering av endotelcellerna och immunsystemet [122, 123]. D.v.s samtidigt som IL-6 kan bromsa upp infektionsförsvaret lokalt, så accentuerar IL-6 det om och när IL-6R frisätts, t.ex. av ADAM17 sheddaset som induceras av ANGII. Transsignalering medför att CD40, collagens III och IV, Tissue Factor och PAI-1 aktiveras och gör endotelcellerna prokoagulant [118, 123].

IL-6R kan kopplas till febern som covid-19 patienterna har, där frisatt IL-6R receptorer i hjärnan är kopplade till prostaglandin syntes som styr temperaturregleringen i hypothalamus [96].

IL-6/IL-6R blockad med sirukumab minskade induktionen av CD40, collagens III och IV, Tissue Factor och PAI-1, men blockad med tocilizumab hade ingen påverkan på induktionen av dessa mediatorer, vilket kan tyda på att olika IL-6/IL6R blockerare är olika effektiva [123].

IL-6 och TNF- $\alpha$  nivåerna är förhöjda i blodet vid SARS-CoV-2 infektionen, men de aktiverade cirkulerande monocyter visar inga tecken på att vara inducerade att bilda mRNA IL-6 eller mRNA TNF- $\alpha$ . Detta talar för att det är celler som är lokaliserade i lungan, mest sannolikt lungkärlens endotelceller, som producerar dessa cytokiner [13].

### **Lymfocytopeni:**

Covid-19 kännetecknas av en signifikant lymfocytopeni som är korrelerad till sjukdomsgraden. Cellanalyser visar lägre antal NK-celler (natural killer T-celler), CD3+ (utmognade T-celler), CD4+ (helper T-celler) och CD8+ (cytotoxiska T-celler) jämfört med friska, vilket kan orsakas av att de ansamlas i lungan. Monocyter (CD14+, CD16+) och B-lymfocyter är ökade i antal hos de svårast sjuka [13].

Monocyterna stimuleras bl.a. av förhöjda nivåer av MCP-1 och GM-CSF som genereras av aktiverade CD4+ celler.

### **Kliniskt förlopp vid covid-19**

Medel inkubationstiden mellan smitta och sjukdomssymtom är 5,2 dagar (95% konfidensintervall 4,1 – 7,0 dagar ) [124]. Vanliga symtom på en pågående luftvägsinfektion uppträder med feber (98-100 %), hosta (76 %), upphostningar och myalgi (44 %). Hos ett mindre antal individer (< 20 %) inträder en försämring i tillståndet omkring 7-12 dagar efter symtomdebut i form av dyspne, ökad

andningsfrekvens, och försämrad syresättning [13, 107, 117, 124]. Eftersom försämringen sker när virusantalet minskar och när det specifika humoral och cellförmedlade immunförsvaret aktiveras, misstänker man att en överaktivitet eller patologisk reaktion i det immunologiska och inflammatoriska försvaret bidrar till symtomen [107].

Försämringen har ett karakteristiskt förlopp som börjar med att lungans förmåga att syresätta blodet försämras vid luftandning. Patienten upplever dyspne. Extra syrgastillförsel, vilket höjer syrgasens partialtryck, förbättrar syresättningen, vilket tyder på en ren diffusionskada i lungan. Detta orsakas vid inflammatoriska tillstånd av interstitiell vätskeansamling i lungan. Detta utvecklas vid ett kapillär-läckage, när kontraktion i endotelets cytoskeletala arkitektur uppträder, vilket kan ske när ANGII, som bildas lokalt i lungan stimulerar AT-1rec [70, 71]. Lungans compliance (tänjbarhet) är relativt oförändrad. Ökning i kärlpermeabiliteten kan hämmas eller blockeras med läkemedel som hämmar AT-1 receptorn, inkluderande de flesta ARB [71]. När den inflammatoriska processen tilltar, med frisättning av cellattraherande cytokiner, kemokiner och endotelaktiverande receptorerna (CD40/CD40L), ansamlas trombocyter, monocyter, T-celler och neutrofiler i lungans kärl och alveoler. Lungcompliance sjunker (ökat lungstelhet), alveolära dead-space volym (VD<sub>alv</sub>) ökar och effekten av extra syrgas minskar (shuntfraktionen ökar) [72]. covid-19 kännetecknas av alveolär mikro-trombotisering som är 9 gånger mer utbredd än vid influensa orsakad ARDS och trombosbenägenheten är mycket svårbehandlad eftersom den inte svarar på profylaktisk eller terapeutisk heparinbehandling [33, 90, 125].

### **Immunopatologiska fynd vid obduktion av avlidna covid-19 patienter**

Obduktion med immunopatologisk analys hos patienter som avlidit i covid-19 visar att SARS-CoV-2-RNA kan påvisas i alla organ, mest i luftvägarna, men även i gastrointestinal kanal, hjärta, muskler, lever, njure, endokrina organ och övriga organ [39]. Virusets S-protein förekom huvudsakligen i epitelceller från luftvägarna och gastrointestinal kanalen och endast i begränsad mängd i makrofager och endotelceller. Högst förekomst finns i näsans slemhinnor och minskar ju längre ner i luftvägen man kommer, vilket också beskriver förekomsten av ACE2 [126]. I nedre luftvägen är virusfördelningen fläckvis fördelat, huvudsakligen i Typ 2 pneumocyterna, vilket antyder att virus sprider sig till andningsvägen, möjligen via mikroaspirationer från den övre luftvägen och inte är hematogent spridd [126].

Virusantalet eller virusspridningen i kroppen är inte korrelerat till mortaliteten. Trots SARS-CoV-2 förekomst och replikering i nästan alla kroppens organ kunde inflammatoriska reaktioner mot viruset endast påvisas i luftvägarna, mjälten och benmärg hos individer som avlidit med svår covid-19. Dorward et al. fann att en signifikant del av den immunmedierade patologiska processen i lungan förekom helt oberoende av virusförekomst. I lungan noteras att de inflammatoriska områdena, i form av diffusa alveolära skador med inflammatoriska celler, vaskulit förändringar och mikrotromboser, förekommer utan korrelation till förekomsten av viruspartiklar eller mRNA aktivitet som vid virusreplikering [39]. Samtidigt noteras områden med SARS-CoV-2 förekomst utan tecken på inflammatorisk reaktion. Inga inflammatoriska tecken kunde detekteras i njure, tarm eller lever trots förekomst av virus. Detta indikerar också att svår covid-19 inte orsakas av virusets direkta cytotoxiska effekter utan av en indirekt cellmedierad immunopatologisk reaktion [39].

### **Lungkärslvaskulit med MRP8 positiva monocyter, CD4+ och CD8+ är ej korrelerad med virusförekomst**

I lungkärnen hos patienter med svår covid-19 noteras utbredda ojämnt spridda vaskulitförändringar med huvudsakligen infiltrerande monocyter som producerar myeloid response protein 8 (MRP8), omgivande av CD4+ (helper T-celler), färre antal CD8+ (cytotoxiska T-celler) och makrofager. Inte heller i vaskulitområdena kunde SARS-CoV-2 RNA eller S-antigen identifieras i inflammerat kärlendotel, vilket också talar mot direkt virusangrepp som orsak till vaskuliten [39]. MRP8/MRP14, kallas även calprotectin. Calprotectin attraherar immunologiska celler och stimulerar cytokinfrisättning. Calprotectin är direkt associerat med sjukdomsgrad vid covid-19. Patienter med svår covid-19 har visat sig frisätta ”massiva” mängder [127]. Calprotectin är också direkt associerad med dålig syresättning, förekomst av trombosor och i överensstämmelse med ovan som en markör för monocytinfiltrationen i lungan. Calprotectin föregår cytokinfrisättningen och ökar signifikant mest av förekommande biomarkörer vid svår covid-19, jämfört med IL-6, ferritin, D-dimerer. Calprotectin föreslås därför ingå i rutinproverna för att riskbedöma huruvida patienter med covid-19 kommer att försämrats [127-132]. Förekomst av stora mängder monocyter i lungkärnen och i bronkoalveolär vätska vid svår covid-19, tyder på att dessa celler verkar vara viktiga i den immunopatologiska processen [39, 133]. Monocyter interagerar synergistiskt med CD4+ (T-helper celler), CD8+ (T-cytotoxiska celler) och aktiverade trombocyter som frisätter CD40/CD40L [23]. Cellerna bidrar ytterligare till att aktivera och stimulera endotelcellerna att vidhäfta inflammatoriska celler och inducerar trombosbildning.

### **Lungkärslvaskuliten och den respiratoriska svikten**

”Progressiv respiratorisk svikt är den primära dödsorsaken vid covid-19 med uttalad endotelial lungkärslsskada, upplöst endotelmembran (splittrade intercellulära junction), monocytär kärnlinfiltration, mikroangiopati med utbredda trombbildningar i alveolära kapillärer samt en påtaglig angiogenes med nybildning av kärl” enligt Ackermann, N E J M [125].

### **Sammanfattning:**

SARS-CoV-2 viruset startar en proinflammatorisk cytokinfrisättning via TLR aktiveringen i endosomerna. Kroppens anti-virala försvar med interferon frisättning hämmas av SARS-CoV-2 viruset, samtidigt som det proinflammatoriska svaret potentieras via den kraftigt proinflammatoriska ANG II, när SARS-CoV-2 inaktiverar det i lungan membranbundna enzymet ACE2. Induktionen av ytreceptorer och aktivering av T-celler, monocyter och trombocyter med frisättningen av cytokiner attraherar MRP8 producerande monocytära celler, CD4+ och CD8+ celler till lungans kapillärbädd, via en CD40/CD40L medierad process. Mikroangiopatin utvecklas och mikrotrombotisering är heparinresistent. Den proinflammatoriska/immunopatologiska svaret potentieras ytterligare hos vissa individer, speciellt med låg ACE2 och höga ANG II vilket kan leda till en ARDS-lik bild och multipel organsvikt med fatal utgång.

Eftersom sjukdomsgraden vid covid-19 inte är korrelerad till virusantalet eller direkta skador av virusangreppet, talar allt för att det är den immunopatologiska aktivitetsökningen med

cellinfiltration i lungkärnen (lungkärnsvasculiten och trombogeniciteten) som är huvudorsaken till den deletära utvecklingen. Nivån av calprotectin, ferritin, löslig IL-2R, IL-6, andra cytokiner och kemokiner är indirekta tecken på graden av cellaktivitet och mikroangiopati.

### **Patofysiologisk inriktad behandlingsstrategi**

Allt tyder på att aktiverade T-celler och monocyter/makrofagerna som ansamlas på endotelcellerna är den väsentligaste komponenten som bidrar till den patoimmunologiska reaktiviteten med tilltagande cytokin-, kemokin frisättning och trombosbenägenheten. Teoretiskt är därför en immunosuppressiv behandling mot de aktiverade T-cellerna och monocytorna mer ändamålsenlig än att blockera cellernas sekundära respons, nämligen cytokinfrisättningen. Detta har föreslagits av flera författare [134-137].

Etoposide är en immunosuppressiv medicin som selektivt hämmar aktiverade T-celler och monocyter samt minskar cytokinfrisättningen. Etoposide behandling angriper således direkt den immunopatologiska problematiken vid covid-19. Det finns flera rapporter om att Etoposide använts vid covid-19 med goda resultat. Patienter med svår covid-19 med organpåverkan och tecken på hyperinflammation, som inte svarat på steroidbehandling och immunomodulerande behandling (tocilizumab eller anakinra) fick Etoposide. Redan efter en till två doser med 50 – 150 mg/m<sup>2</sup> Etoposide noterades en snabb förbättrad syresättning och >80% av patienterna kunde skrivas ut. Patienter som inte förbättrades fick tromboser och embolier, tydande på att behandling mot den heparinresistenta trombostendensen sannolikt inte var optimal. En randomiserad kontrollerad studie pågår - NCT04356690. [134, 136, 138].

Etoposide behandling har getts till barn vid hyperinflammatoriskt tillstånd som hemophagocytic lymphohistiocytosis med god effekt utan allvarliga biverkningar eller infektioner [139].

Eftersom behandling är lättillgänglig, relativt billig, biverkningarna få och behandling är direkt inriktad mot den livshotande immunopatologiska aktiviteten vid covid-19 (mortalitet 20-30 % vid intensivvårdskrävande tillstånd) rekommenderas att man vid behandlingssvikt tar ställning till Etoposide behandling. Även andra immunosuppressiva ämnen har föreslagits, men Etoposide verkar vara mer ändamålsenlig.

### **Allmän översikt och kommentarer till olika behandlingar och resultat.**

I princip alla studier, oavsett behandling, har visat positiva resultat när man jämfört med historiska kontroller, tydande på att inläringen och den systematiska handläggningen av patienter med covid-19 har större betydelse för resultatet än den specifika behandlingen. Detta innebär att huvudsakligen randomiserade, kontrollerade, helst blindade studier, där risken för störfaktorer "confounding factors" minimeras, är vetenskapligt tillförlitliga.

## Glucocorticoidbehandling

I kontrollerad randomiserad studie fann man att glukocorticoid behandling (dexametason) minskade 28 dagars mortaliteten från 25,7 % till 22,9 % ( $p < 0.001$ ) på respiratorvårdade patienter med covid-19 [140].

Glucocorticoider går in i cellen och binder sig till glucocorticoid receptorer som bildar ett komplex som translokeras in i cellkärnan. Komplexet binder sig till ett "glucocorticoid responsivt element" i promotor regionen och stimulerar induktion av anti-inflammatoriska molekyler (t.ex. lipocortin 1, annexin) s.k. transactivation, samtidigt som histon deacetylas aktiveras, vilket vid inflammatoriska tillstånd anses vara speciellt viktig eftersom detta hämmar NF $\kappa$ B bindning till DNA molekylen s.k. transrepression [141]. Detta inhiberar induktionen av flera proinflammatoriska cytokiner (pro-IL-1b, IL-6, IL-11, TNF-a, GM-CSF), kemokiner (MCP-1, eotaxin, IL-8, RANTES, MIP-1a), enzymer (iNOS, COX-2, fosfolipas A2) och adhesionsmolekylen ICAM-1 [141-143].

Glucocorticoidbehandling hämmar den generella proinflammatoriska aktiviteten med en signifikant mortalitetsänkning på ca 3 %. Det har medfört att behandlingen numera ingår som basal grundbehandling vid covid-19.

## IL-6 blockad

IL-6 blockad med tocilizumab, som är en monoklonal antikropp mot IL-6R, binder specifikt till både cellbundet IL-6 och löslig IL-6R.

I BACC Bay Tocilizumab Trial behandlades mindre svårt sjuka covid-19 patienter i en blind randomiserad studie och ingen skillnad noterades i behandlad vs kontrollgruppen [144]. I en randomiserad kontrollerad studie på svårt sjuka covid-19 patienter jämförande standardbehandling med standardbehandling och tocilizumab, fick studien avbrytas i förtid efter att 129 patienter inkluderats pga ökad mortalitet i gruppen som behandlades med tocilizumab [145].

REMAP CAP studien, där randomiseringsprocessen är svårbedömd, noterades ökad överlevnad hos svårt sjuka som fick tocilizumab, om behandling påbörjades inom 24 timmar från organsvikt [146].

I EMPACTA studien jämfördes standardbehandling och placebo med standardbehandling och tocilizumab och man fann ingen skillnad i mortalitet [147]. I COVACT studien, randomiserad, dubbel blind studie på 452 patienter noterade ingen skillnad i frekvens respiratorvård eller mortalitet [148].

Avsaknad av definitiv effekt vid IL-6 blockad talar för att IL-6 inte är avgörande för sjukdomsprocessen och mortaliteten [149].

IL-6/IL-6R blockad med sirukumab minskade induktionen av CD40, kollagens III och IV, Tissue Factor och PAI-1, men blockad med tocilizumab hade ingen påverkan på induktionen av dessa mediatorer, vilket kan tyda på att olika IL-6/IL6R blockerare är olika effektiva [123].

Resultat från pågående RCT (randomized controlled trials) med sirukumab inväntas.

## IL-1 $\beta$ blockad

Trots att IL-1 $\beta$  inte kan detekteras hos covid-19 patienter och att caspase-1 sannolikt inte aktiveras, samt att kraftig endogen antagonistisk IL-1 $\beta$  effekt redan föreligger via aktiverat IL-1RA,

så har IL-1  $\beta$  blockad getts vid covid-19. CORIMUNO-19 som är den första randomiserad kontrollerade studien visar ingen effekt av IL-1 $\beta$  blockad (Anakinra), på varken primära eller sekundära utfallsvariabler [150]. Även om tidigare icke kontrollerade studier med historiska kontroller visat effekt så tyder denna randomiserade studie på att IL-1 $\beta$  inte har någon avgörande betydelse för sjukdomsprocessen och mortaliteten vid covid-19.

### **TNF $\alpha$ blockad**

Resultat från RCT (randomized controlled trials) inväntas fortfarande.

### **Janus kinase blockad (JAK-blockad)**

Guimaraes et al. fann i en randomiserad och kontrollerad studie som jämförde tofacitinib (JAK-blockad) med placebo på sjukhusintagna patienter med pneumoni på basen av en covid-19, att tofacitinib minskade 28 dagars mortaliteten med ca 11 %, från 29 % i placebogrupper till 18,1 % i behandlingsgruppen ( $p = 0.04$ ). Det var lägre incidens av infektioner i tofacitinib gruppen än i placebogrupper 3,5 % vs 4,2 %. [151].

Icke randomiserade studier med anti-JAK behandling (Baricitinib eller Ruxolitinib) har publicerats med positiva resultat på förlopp och mortalitet [152-154].

JAK/STAT signaleringsvägar används av flera cytokiner (IL-2, IL-4, IL-15, IL-21, IL-6R/gp130 och IFN- $\gamma$ ) och AT-1rec, vilket resulterar i att receptorn fosforförloras och transkriptionsfaktorn STAT bildas som påverkar bildningen av proinflammatoriska mediatorer. Samtidigt stimulerar JAK differentieringen av T-helper cellerna (CD4+). JAK blockad hämmar således effekten av dessa cytokiner och differentieringen av CD4+.

Eftersom IFN $\gamma$  inducerar iNOS via JAK stimulering, så kan JAK blockad övervägas vid tecken på vasodilatation och refraktär vaskulär chock som finns beskriven vid covid-19 [16, 155].

### **INF $\gamma$ blockad**

IFN- $\gamma$  koncentrationer i blodet är signifikant högre hos patienter som avlider i covid-19 än de som överlever [115] till skillnad från både TNF $\alpha$  och IL-6R som inte är associerad med mortalitet, d.v.s. det är ingen skillnad i koncentrationerna mellan de som överlever och dör. P.g.a associationen mellan IFN- $\gamma$  och mortaliteten har man föreslagit behandling med INF- $\gamma$  blockad. Det kan göras med Emapalumab, som är en antikropp mot IFN- $\gamma$  som nyligen har blivit godkänd av FDA. Det finns inga resultat från kontrollerade studier publicerade med INF- $\gamma$  blockad. INF- $\gamma$  blockad hämmar INF- $\gamma$  signalvägen via JAK/STAT och induktionen av bl.a. iNOS som kan ge upphov till hemodynamisk instabilitet [16].

### **GM-CSF blockad (granulocyt, monocytt/makrofag – colony stimulating factor).**

Positiva resultat i en retrospektiva kontrollerad pilotstudie med GM-CSF blockad vid svår covid påvisade ingen mortalitet i behandlad grupp (0 %) jämfört med kontrollgruppen (27 %) [156]. Efter detta resultat har en multicenter, blindad, randomiserad placebo kontrollerad, prospektiv fas 2 studie påbörjats med monoklonal antikropp mot GM-CSF (Mavrilimumab). Frisättningen av GM-

CSF accelerera den inflammatoriska processen och ansamlar monocyter till lungan (CD14/CD16). Resultat från den randomiserade kontrollerade studien inväntas.

### **Angiotensin 1 receptor (AT-1REC) blockad med ARB (Angiotensin receptor blockare)**

Randomiserad kontrollerad multicenterstudie på covid-19 patienter där man jämför standardbehandling med standardbehandling och telmisartan (ARB) påvisar positiv effekt med sjunkande CRP och minskad 30 dagars mortalitet med nästan 18%, 22,54 % i kontrollgruppen och 4,29 % i telmisartan gruppen ( $p = 0,0023$ ) [69].

Blockeringen med ARB eller ACE hämmare har också visat sig vara skyddande mot lungskada, mot trombosbildningen och sänkt mortaliteten i tidigare coronavirus infektioner talande starkt för att ANGII och AT-1rec har en viktig roll vid SARS-CoV infektioner [157].

Studier och meta-analyser påvisar liknade resultat vid SARS-CoV-2 både kliniskt och experimentellt [86, 158-162].

Förhöjda nivåer av ANG II och AT-1rec stimulering leder också till lungfibros. Utvecklingen av lungfibros kan blockeras av ARB [75, 76]. Lungfibrosen orsakad av ANGII stimulering på AT-1rec är medierad via PAK1 (serin/treonin proteinkinas 1), vilken experimentellt kan blockeras med bl.a. melatonin.

### **Melatonin**

Melatonin förhindrar utveckling av lungfibros, är antiviral och fungerar som anti-oxidantia och rekommenderas vid covid-19 [163, 164].

### **Aldosteron blockad**

Som tidigare nämnts så är förhöjda aldosteronnivåer associerad med svår covid-19 [91].

Aldosteronhämmare har en potentiell skyddande roll vid covid-19, utöver sin effekt som kaliumsparande diuretikum genom att indirekt minska produktionen av ANG II [93]. ANG II stimulerar nämligen produktion av aldosteron, som i sin tur aktiverar angiotensin converting enzyme (ACE1) att producera mer ANG II.

Randomiserade kontrollerade studier vid covid-19 saknas.

### **D-vitamin substitution**

D-vitamin behövs tillsammans med cathelicidin för att eliminera SARS-CoV-2 spike-protein via autofagi [17, 18, 20]. Låga D-vitamin nivåer är korrelerad med sjukdomsgrad och mortalitet vid covid-19 [61]. D-vitamin tillförsel bidrar således till antigen eliminationen, men anses också kunna stimulera bildningen av ACE2, sänker därigenom ANG II nivån samt inhiberar renin frisättningen [60]. Låga D-vitamin nivåer bidrar således till ökad risk för IgG-SARS-Cov-2 komplex och utvecklingen av MISC. Svårigheten i vissa studier att korrelera låga nivåer av D-vitamin till covid-19 kan tala för att man får en konsumtion av D-vitamin vid eliminationen av SARS-CoV-2 antigenet, och att bristen uppkommer med sjukdomen.



### **C-vitamin substitution**

Studier har publicerats som beskriver snabbare tillfrisknande från svår covid-19 efter administrering av höga doser vitamin C. Vitamin C anrikas i binjuremärgen och är viktigt vid produktionen av stresshormoner. C-vitamin anses vara anti-inflammatoriskt, immunmodulerande, antitrombotiskt, antioxidant och anti-viralt i olika studier [165].

### **Convalescent plasma rik på IgG SARS-CoV-2**

Tillförsel av convalescent plasma från patienter som varit sjuka med SARS-CoV-2 visade ingen positiv effekt i en studie [166], men om det tillförs hos patienter som inte fått mekanisk ventilation minskar risken för mortalitet 22.3 %, vs 27,4 %. Ingen effekt noterades vid tillförsel till respiratorvårdade patienter med covid-19 [167].

### **Hydroxoklorokin behandling**

Behandling med Hydroxoklorokin har visat på negativa resultat och möjligen en ökad dödlighet i behandlingsgruppen, så det rekommenderas f.n. inte [168].

### **Antiviral behandling med Remsedivir**

Remsedivir behandling kunde inte påvisa någon signifikant förbättring i randomiserad dubbel-blind, placebo-kontrollerad studie till covid-19 patienter och WHO rekommendation är därför att man inte skall använda den vid behandlingen [169].

### **Ivermectin behandling**

Parasitmedel med antiviral effekt. Eftersom virusbördan inte är associerad med svår covid-19 är sannolikt behandlingen tveksam. Randomiserade kontrollerade studier pågår. Avråds från att användas av Europeiska läkemedelsmyndigheten.

### **Trombocythämmande behandling**

Aktiveringen av monocyter och T-celler sker via CD40/CD40L, vilka via CD40 receptorer också aktiverar trombocyterna. Aktiverade trombocyter frisätter proinflammatoriska mediatorer (bl.a. cytokiner, kemokiner, proteinaser, P-selektin, CD40L, RANTES) som potentierar endotelaktiveringen och den heparinresistenta trombostendens som karaktäriserar covid-19 med nedreglering av trombomodulin [28-30]. Trombocytaktiveringen bidrar även till ansamling av inflammatoriska celler i mikrocirkulationen. Trombocythämning kan hämma denna aktivering och mikroaggregeringen [32, 170]. Goda resultat har påvisats i preliminära studier och randomiserade kontrollerade studier inväntas [171].

### **Antikoagulation**

Den immunopatologiskt orsakade heparinresistenta prokoagulativa aktiviteten i kärldotelet som orkestreras via CD40/CD40L, trombocyter, monocyter och aktiva T-celler ger upphov till en mikroangiopati och mikrotromboser som experimentellt endast hämmas av antitrombin III tillförsel [34, 35]. Upprätthållande av antitrombin III nivån är därför av sannolikt avgörande betydelse för att tillsammans med annan anti-inflammatorisk behandling förhindra mikrotrombotiseringen. Då svår covid-19 även är förenlig med immobilisering bör även en allmän trombosprofylax ges, vilket dock också förutsätter adekvata antitrombin III nivåer. Randomiserade kontrollerade studier på covid-19 patienter saknas. Flera författare har också noterat att den heparinresistenta trombosbildningen vid relativt adekvata antitrombin nivåer kan stoppas med trombin hämmare – argatroban [37, 38].

### **IVIG behandling**

IVIG är f.n. inte aktuell vid den akuta covid-19 infektionen eftersom den immunopatologiska mekanismen sannolikt inte är IgG medierad.

Eftersom tidigare studier påvisat skyddande effekt av IVIG i högdos 2g/kg x 1 på kranskärlen vid Kawasakis sjukdom ingår det i behandlingen av barn med MISC alternativt Kawasaki liknande syndrom. Sannolikt beror den skyddande effekten på att IVIG blockera IgG-SARS-CoV-2-antigen komplexets effekt att stimulera makrofagernas/monocyternas vid stimulering av Fc gamma-receptorn (CD64). Därigenom blockeras den proinflammatoriska signalvägen i makrofagerna/monocyterna. IVIG hämmar också komplement aktiveringen och B-cellernas IgG produktion [172]. IVIG bör vid MISC ges tillsammans med steroider som då samtidigt bromsar NFκβ stimuleringen och frisättningen av proinflammatoriska mediatorer, vilket gör att man får en synergistisk effekt, även visat kliniskt [173]. Se PM – Patienter med MISC i behov av BIVA vård.

### **ECMO behandling**

Om covid-19 patienter försämras och utvecklar ett livshotande kardiorespiratoriskt kristillstånd är ECMO en möjlig behandling.

Orsaken till behov av ECMO kan vara tilltagande respiratorisk insufficiens med livshotande hypoxi och/eller cirkulatorisk chock som inte svarar på insatt behandling.

Den respiratoriska insufficiensen orsakas av en tilltagande ansamling av monocyter, aktiva T-celler och trombocyter i lungcirkulationen som skadar lungan. Det är samtidigt stor risk för trombosutveckling och utveckling av lungfibros. ECMO behandling bör därför kompletteras med aggressiv behandling av mikroangiopatin och cellansamlingen i lungan enligt tidigare kommentarer, antitrombotisk behandling med bl.a. antitrombin III (ev. argatroban) och profylax mot utveckling av lungfibros.

Vid behov kombineras ECMO behandlingen med dialys (CRRT). Vissa rekommenderar att detta kombineras med adsorptionsfilter som uppges kunna avlägsna cytokiner och endotoxiner:

I en randomiserad kontrollerad studie på covid-19 patienter i behov av ECMO jämförde man Cytosorb® filtret med placebo. Man noterade ingen effekt på IL-6 nivåerna och en överlevnad på 76 % i placebogruppern, jämfört med endast 13 % överlevnad i Cytosorb filter gruppen [174]. Fyndet innebär att användning av Cytosorb fileter bör ske inom ramen för randomiserade kontrollerade studier [175, 176].

Oxiris filtret (Baxter) är ett annat filter som visat sig minska på endotoxin och cytokiner vid sepsis och kan vara ett alternativ [177]. Randomiserade kontrollerade studier på covid-19 patienter inväntas.

Svårt sjuka patienter med hyperinflammation kan utveckla en kardiovaskulär svikt med vasoplegi som uttrycker sig som en behandlingsresistent chock, där vasopressor behandling med noradrenalin, vasopressin, och/eller adrenalin inte hjälper. Orsaken verkar vara en kraftig bildning av inducerbart nitric oxide syntase (iNOS) som ger en kraftfull kväveoxid (NO) produktion. NO stimulerar guanylat cyklas att bilda cGMP som i sin tur är vasodilaterande. Vid dessa tillstånd kan metylenblått blockera guanylat cyklas och öka blodtrycket [178], t.ex. i väntan på att etablera en ECMO behandling.

Nyligen har man noterat att både IFN $\gamma$  och TNF $\alpha$  behövs för att aktivera makrofager/monocyter att bilda stora mängder iNOS, NO och celldöd [16]. Aktiveringen av iNOS går via JAK/STAT1/IRF1 signaleringsvägen för IFN $\gamma$  och via NF $\kappa$ B för TNF $\alpha$  [179, 180]. Behandling med antikroppar mot TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  skyddar från mortalitet vid experimentell SARS-CoV-2 infektion [16, 103]. Dessa data talar också för att NO-inhalation sannolikt är skadligt [16]. IL-1 blockad påverkar däremot inte utfallet vid svår sepsis [181].

Några utvalda publicerade randomiserade kontrollerade studier som publicerats och som redogjort 28-30 dagars mortalitet och som ger en uppfattning om graden av protektion:

Behandling	Antal (n)	Placebo (Stand)	Beh grupp	Mortalitetssänkning 28-30 dagar	p-värde
ARB [69]	162	22,54 %	4,21 %	18,3 %	0,0023 *
JAK blockad [151]	289	29,0 %	18,1 %	10,9 %	0,04 *
Dexametason [140]	2104	25,7 %	22,9	2,8 %	<0,001 *
IL-6 blockad [148]	452	19,4 %	19,,7	-0,3 %	0,94
IL-1b blockad [150]	153	22 %	24 %	2 %	0,77

## Handläggnings- och behandlingsförslag för barn med covid-19:

### Andningsinsufficiensen:

Det huvudsakliga primära intensivvårdsproblemet är en tilltagande hypoxi (desaturation) med kvarstående elastiska lungor (hög lungcompliance). Detta orsakas av ett tilltagande interstiellt ödem som svarar på ökad syrgastillförsel (ren diffusionsskada). I senare fas tillkommer trombosbildning och ansamling av proinflammatoriska celler i lungan, sekretproblematik och möjligen brist på surfactant med tillkomst av atelektaser och ev. pneumoniska sekundär infektioner som gör lungan stel (sänker lungans compliance) och liknar den klassiska ARDS bilden:

### Andningsvård:

- O<sub>2</sub>-tillförsel (upptill 100 %) med befuktad syrgas kan ges till barn som har en SpO<sub>2</sub> alt SaO<sub>2</sub> < 90 % på luftandning.
- Höglödesbehandling rekommenderas för god befuktning. Syrgasnivån titreras in för att nå målet SpO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> > 92 %.
- På BIVA, kan man istället välja NIV på näsmask/ansiktsmask för att minska aerosolbildningen, men se upp med hyperventilation och stora tidalvolymmer som teoretiskt kan ge ett volutrauma på lungan.
- Ställningstagande till respiratorvård vid otillräcklig effekt enligt nedan. Observera att profylaktisk behandling med bl.a. ARB/ACE-inhibitor, fysiologisk steroidsubstitution, diuretika och spironolakton bör insättas tidigt för att förhindra denna utveckling.

### Några tänkbara indikationer för respiratorvård kan vara:

- Oacceptabelt andningsarbete. Uttalade indragningar. Nedsatt medvetandegrad.
- Bestående oacceptabel syresättning (SaO<sub>2</sub> < 85 %) trots 100 % syrgas.
- Oacceptabel koldioxidretention och tecken på inadekvat andning med acidotutveckling.
- Tecken på sviktande cirkulation med laktatstegring.
- En snabb progress i utvecklingen av den respiratoriska svikten innebär att individuell bedömning bör göras och att man inte väntar för länge med beslutet.

### Intubation - Läkemedel och utrustning enligt önskemål av ansvarig intubator:

- Förslagsvis: Ketamin, rocuronium, remifentanyl, noradrenalin, Albumin 5%.
- Förbered fortsatt sedering enligt rutin på BIVA med Ketogan/Dexdor/ev. midazolam - etc.
- Kontrollera att sugkatetrar finns, sug fungerar, virusfilter finns på suger, andningsmask, rätt tracheal-tubstorlek, magills tång, laryngoskop, ledare, ev. behov av videolaryngoskop.
- Skyddsklädseln är OK.

- Aktiv befuktning.
- Använd slutet sugsystem.
- Respiratorinställningar enligt ansvarig läkare och enligt sedvanliga riktlinjer för lungprotektiv ventilation.

#### Inhalationsbehandling:

SARS-CoV-2 pneumonit är känd för att ge segt sekret och ansamling av vita blodkroppar i luftvägen. Behov av inhalationsbehandling måste bedömas utifrån potentiell risk för ökande aerosolspridning.

- Pulmicort inhalation 0,25 mg/ml. 0,25 - 0,50 mg/dygn
- Pulmozyme behandling 2,5 mg (1 ml) x 1-2 inhalation/dygn enligt PM när så bedöms behövt.
- Ventoline inhalation 2,5 mg/ml, 0,08 ml/kg x 4-6.

#### Direktpåvisning av agens, antigen (PCR), odlingar och/eller serologi:

Förslagsvis 1-2 ggr per vecka.

- Bakterie-odlingar: blod, urin, NPH alternativt trachealtub
- Svampodling, Beta-d-glucan – (svampantigen i serum), Aspergillus – galactomannan
- Odling "Atypiska bakterier"
- Utvidgat luftvägsblock – inklusive SARS-CoV-2 (ev. bestämning av Ct-värdet)
- SARS-CoV-2 serologi
- Ev. PCR - EBV, CMV, Parvovirus, Enterovirus

## Cirkulation och koagulation:

AT-1-receptor blockering med angiotensin receptorblockerar (ARB) bör övervägas redan vid inkomst och när diagnosen verifierats. AT-1-receptorstimulering via ANG II ökar den proinflammatoriska aktiviteten och bidra till endoteldysfunktionen, ödem-utvecklingen, trombosbildningen. ARB behandling väljs i första hand då man anser att den i lungan bildade ANG II i viss mån kan omvandlas till ANG 1-7, trots ACE2 brist. ANG 1-7 stimulerar AT-2receptorn som är anti-inflammatorisk, minskar lungfibros, förbättra hjärt- och njurfunktionen. ACE-inhibition kan vara effektivare för att blockera PAI-1 aktiviteten än vissa ARB, men ger biverkningar p.g.a. utebliven inhibering av substance P och bradykinin, som kan vara kopplat till ökad kärlpermeabilitet i lungan:

### ARB behandling:

- Losartan 1:a dagen: 0,25 mg/kg x 2, 2:a dagen: 0,5 mg/kg x 2 och om blodtrycket och kreatinin tillåter, 1 mg/kg x2.
- Telmisatran 1:a dagen: 0,25 mg/kg x 2, 2:a dagen: 0,5 mg/kg x 2 och om blodtrycket tillåter, 1 mg/kg x2.  
(Telmisatran är mer lipofil och har längre halveringstid än Losartan. Telmisatran användes i RCT med 18 % mortalitetssänkning vid covid-19 och kan vara att föredra [69].)

Eftersom mikrotrombotiseringen, som är medierad via CD40/CD40L aktivering, vid covid-19 är heparinresistent och endast svarar på antitrombin behandling föreslås att nivån på Antitrombin III hålls  $\geq 1$  kIE/L. Följ antitrombin III dagligen i början av vårdförloppet.

### Antikoagulation och trombocythämning:

- Antitrombin III: - Atenativ 50 -100 E/kg i.v.
- Inj Fragmin 60 E/kg x 2 sc.
- Vid påverkad perifer cirkulation – ev heparininfusion – startdos 10E/kg/tim.

Vid trombosbildning trots ovan:

- Argatroban (Novastan) **Startdos:** 0,75 mcg/kg/min som kontinuerlig infusion. Höj/sänk med 0,25 mcg/kg/min om leversvikt  $\frac{1}{4}$  -  $\frac{1}{2}$  av ordinarie dos. (FDA rekommendation för pediatrikt bruk).
- Heparin/Fragmin/LMWA behandlingen avbryts. APTT 1,5 - 3 ggr förlängning men alltid  $< 100$  s. APTT kontrolleras efter 2 timmars infusion.
- Mixtur ASA, T. Trombyl: 2-5 mg/kg x 1 Preliminära studier talar för positiv effekt vid covid-19 [171].
- Vid behov kan infusion Flolan (prostacyclin) 2 ng/kg/min ges vid CRRT eller ECMO enligt särskilt PM på BIVA.

## UKG

- Kammarkontraktilitet.
- Tecken på pulmonell hypertension (TI VTI>3 m/s).
- Shuntflödets riktning om sådana finns.
- Tecken på hyperkinetisk cirkulation och/eller hypovolemi.

## Upprätthåll blodvolymen:

- Ge ev. SAG för att optimera Hb, speciellt vid låg SaO<sub>2</sub>. Vid SaO<sub>2</sub> < 85 %, bör Hb nivån sannolikt ligga ≥ 130 g/L för optimal syretillförsel till vävnaden och acceptabelt SvO<sub>2</sub> (erfarenhetsmässigt från barn med cyanotisk hjärtfel).
- Ge ev. Albumin för att optimera kolloidosmotiska trycket och för att minimera ödembildningen generellt och i lungorna.
- Ge ev. Addex-NaCl för att upprätthåll kristalloidosmotiska trycket, håll förslagsvis S-Na > 136 mmol/L.

## Optimera kammarkontraktilitet:

- Milrinon 0,5-0,7 µg/kg/min vid tecken på nedsatt kontraktilitet, volyms- eller tryckbelastad höger kammare.
- Addera inotropa medel med β-stimulerande effekt för synergistisk effekt med milrinon. Förslagsvis dopamin 5-10 µg/kg/min alternativt adrenalin 0.05-0,2 µg/kg/min.

## Upprätthåll blodtrycket:

- Medelartärblodtryck (MAP) ≥ 40 mmHg på neonatala barn (SAP ≥ 50 mm Hg). Om hypovolemi inte föreligger, och behov av att höja blodtrycket föreligger vasokonstringera med noradrenalin 0,01 - 0,2 µg/kg/min och/eller vasopressin 0,0003-0,001 E/kg/min. Sätt inte ut anti-inflammatoriska behandling med ARB. Blodtrycksänkning orsakad av ARB tyder på hypovolemi. Vid refraktär vasoplegi tas individuellt ställningstagande.
- OBS! En viktig mekanism vid refraktär hypotension vid hyperinflammation är medierad via iNOS med kraftig NO produktion orsakad av TNFα + INFγ. Metylen blått hämmar guanylat cyklas och den NO medierade vasodilatationen – kan ges som rescue-behandling inför ställningstagande till ECMO. Se upp för pulmonell hypertension och HK svikt.
- Metylenblått: (Mehylthioninum chloride Proveblue 10 mg/ml). 1-2 mg/kg iv under 10-20 min följd av en infusion 0,1-0,5 mg/kg/tim.

## Njurfunktion och diures:

Upprätthåll diuresen och dehydrera inte patienten initialt:

### Diuretica:

- Furosemid förslagsvis 0,5 mg/kg x 2-4 iv., ev Furosemid infusion 0,1 – 1 mg/kg/tim.
- Metolazon 0,05 – 0,1 mg/kg p.o/p.s
- HANP (Carperitide) 25 – 50 ng/kg/min (hämmar ANG II orsakad hypersekretion av aldosteron och resulterande hyponatremi)

Aldosteron ökar PAI-1 och därigenom risken för trombosbildning. Aldosteron stimulerar ACE1 och ökar ANG II. Obs! kan interagera med ACE/ARB och ge hyperkalemi – följ kaliumnivåerna.

### Aldosteronhämmning:

- T. Spironolakton: 2 mg/kg/dygn p.o/p.s alternativ Soldactone 2 mg/kg/dygn iv.

### Upprätthåll Magnesium och kalium:

- Magnesium sulfat: 0,1-0,2 mmol/kg under 3-5 tim, vilket kan upprepas.
- Kalium: 0,1-0,5 mmol/kg/tim po/ps/iv.

### CRRT:

- Vid behov av dialys välj gärna ST-60 eller större filter om adsorptionsfilter planeras ingå i behandlingen. (Antikoagulation med heparin 10E/kg/tim + Flolan 2 ng/kg/min) – Se PM)
- F.n. finns två adsorptionsfilter för adsorption av endotoxin och cytokiner att välja på Cytosorb respektive Oxiris filter. Indikationen och effekten oklar.

## Hyperinflammation och infektionsproblematiken:

### Steroidbehandling:

- Lågdos behandling insättes profylaktiskt:  
SoluCortef som vid kapillärläckage (halveringstid 1,5 tim): 2 mg/kg x 4 i.v.  
Alternativt  
Dexametason (halveringstid 3.5 tim): 0.1 mg/kg x 2 (i.v. eller p.o.).



Vid kraftig hyperinflammation eller MIS-C övervägs högre doser (3 alternativ) :

- Methylprednisolon 30 mg/kg/d i 3 dygn – därefter 1mg/kg x 2 i 5-7 dagar – följt av Prednisolon 2 mg/kg/d som trappas ut under 2-3 veckor.
- Dexametason 2,5 mg/kg x 2 i 3 dygn – därefter 0,1 mg/kg x 2 i 5-7 dag dagar – följt av Prednisolon 2 mg/kg/d som trappas ut under 2-3 veckor.
- Hydrocortison 30mg/kg x 4 i 3 dygn – därefter 1mg/kg x 4 i 5-7 dagar – följt av Prednisolon 2 mg/kg/d som trappas ut under 2-3 veckor.

Vitamin D, Vitamin C, Thiamin och Melatonin:

- Vitamin D tillskott rekommenderas. Detremin
  - Ålder <1 år: 1 droppe dagligen eller 7 droppar en gång i veckan.
  - Ålder 1-10 år: 1-2 droppar dagligen eller 7-14 droppar en gång i veckan.
  - Ålder > 10 år: 1-5 droppar dagligen eller 7-35 droppar en gång i veckan.
- Vitamin C: 20 mg/kg x 4, ges på 40 min [165].
- Thiamine: 2,5 mg/kg x 2 ges på 30 min (kan ges outspätt 50 mg/ml).
- Melatonin 0,2 mg/kg x 2 po/ps.

Profylaktisk antibiotikaskydd rekommenderas:

- Cefotaxim 100 mg/kg/d uppdelat på 3 doser (sedvanlig rutin)

Vid oklar sepsis – eller om antiinflammatorisk behandling ges utöver fysiologisk steroidbehandling bör bredare antibiotika behandling övervägas:

- Meropenem 20 mg/kg \*4 iv, alt 60 mg(6ml)/kg/dygn = 2,5mg (0,25 ml)/kg/h infusion /Vancocin Laddningsdos IV 20 mg/kg (4 ml/kg) på 1 h därefter kontinuerlig infusion med (Vancocin 5 mg/ml) startdos 30mg (6ml)/kg/dygn = 1,25 mg (0,25 ml)/kg/h.  
Alternativt
- Piperacillin/Tazobactam: 80 mg piperacillin/10 mg tazobaktam per kg kroppsvikt/var 6:e timme.
- Diflucan profylax 6 mg/kg\*1 (1:a dos) därefter 3 mg/kg \* 1 dagligen.
- Azitromycin har använts enligt vissa författare: 10 mg/kg första dagen i engångsdos, därefter 5 mg/kg i engångsdos.

För att öka ventrikelpassagen (tarmmotilitets- stimulerande medel):

- Azitromycin 2-3 mg/kg x 1; alternativt Erytromycin 2 mg/kg x3



## • Immunomodulerande behandling:

Om tecken på en tilltagande hyperinflammation trots antiinflammatorisk behandling enligt ovan, ANGIO-blockad, aldosteronhämning (RAAS), antibiotika, trombocythämning, antikoagulation och vitaminstitution kan det finnas indikation för mer aktiv immunomodulerande behandling. Vi har på BIVA hittills hämmat utvecklingen av covid-19 med den ovan beskrivna profylaktiska behandlingen och inte behövt sätta in immunomodulerande behandling på något barn.

Stigande kalprotektin koncentrationer, feber, stigande IL-6, löslig IL2-rec, ferritin och LD nivåer med sjunkande lymfocyter ( $<0,8 \times 10^9/L$ ) och klinisk försämring med behov av respiratorvård, lunginfiltrat och kardiovaskulär påverkan är aggraverande tecken som indikerar att kraftfullare behandling bör övervägas. Kalprotektin- och ferritin- ökningen antyder ansamling av kalprotektin frisättande monocyter i lungcirkulationen och cytokinökningen påvisar att de immunologiska cellerna (monocyterna, CD4+, CD8+) och endotelcellerna aktiverats samtidigt som det är den mest plausibla patofysiologiska förklaringen till försämringen. Ansamlingen av de aktiverade proinflammatoriska immunologiska cellerna i lungan bör hämmas för att minska aggregationen och därigenom minska cytokin- och kemokin frisättningen. Etoposid behandlingen är effektivt och i preliminära studier utan att öka infektionsrisken. [136, 138]

- Etoposide 100 mg/m<sup>2</sup>/dygn 2-5 dygn som långsam intravenös dos på 30-60 min. Kontroll av vita, trombocyter och Hb.

Alternativet är JAK-inhibition som i randomiserad kontrollerad studie visat kunna minska mortaliteten vid covid-19:

- Toficitinib (Xeljanz<sup>®</sup>) p.o.
  - 3 - 4 kg - 0,75 mg x 2, 5 - 6 kg – 1 mg x 2, 7 – 9 kg – 1,5 mg x 2, 10- 12 kg - 2 mg x 2, 13 – 15 kg - 2,5 mg x 2, 16 – 19 kg - 3 mg x 2, 20 – 22 kg - 3,5 mg x 2, 23 – 26 kg - 4 mg x 2, 27 – 29 kg – 4,5 mg x 2, > 30 kg – 5 mg x 2 gives upptill 14 dagar p.o eller till utskrivning från BIVA. Pediatrisk dosering enligt Ruperto. [151, 182]

Behandling med IL-6 och IL-1 $\beta$  blockerare har inte påvisat sig ha någon effekt på mortaliteten i randomiserade (blindade) kontrollerade studier:

- Tocilizumab (RoActerna<sup>®</sup>) som blockerar IL-6/IL-6R [147, 148] .
- Anakinra (Kineret<sup>®</sup>) som blockerar IL-1 $\beta$  [150].

Resultat vid behandling med TNF $\alpha$  blockad - inväntas.

- 
- Infliximab (Remicade) Startdos 2,5 mg/kg x 2 iv. under 3 dagar därefter 1-1,5 mg/kg, extrapolerad från behandling till vuxna.

Resultat vid behandling med GM-CSF blockad – inväntas.

## Provtagning:

Inkomstprover – Se PM BIVA

+

Kalprotektin, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , löslig IL-2rec, IL-6, ferritin, TG, Troponin, Pro BNP, Thyreoidea prover (TSH, T3, T4), 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D), Antitrombin III (koagulationsstatus), CRP/PCT, LD.

Förslag på startbehandling vid covid-19:

### Sedering vid respiratorvård:

Inf Ketogan 10-20  $\mu$ g/kg/tim

Inf Dexmedetomidine 0 – 1,5  $\mu$ g/kg/tim

### Antiinflammatorisk behandling:

Inj Solu-cortef 2 mg/kg x 4 i.v.

Mixtur ASA, T. Trombyl: 2-5 mg/kg x 1 po/ps

Vitamin C: 20 mg/kg x 4 i.v.

Thiamine: 2,5 mg/kg x 2 i.v.

Vitamin D Detremin 1-5 drp po/ps – Dosering efter ålder och brist – se s 26

Melatonin 0,2 mg/kg x 2 po/ps

T. Losartan: 1:a dagen: 0,25 mg/kg x 2, 2:a dagen: 0,5 mg/kg x 2, 1 mg/kg x2. po/ps. Se alt Telmisatran (s 23).

T. Spironolakton: 2 mg/kg/dygn p.o/p.s alternativ Soldactone 2 mg/kg/dygn iv.

### Antikoagulation:

Inj Fragmin 60 E/kg x 2 sc.

Atenativ 50 -100 E/kg i.v.

### Antibiotika

Cefotaxim 100 mg/kg/d uppdelat på 3 doser i.v.

### Inhalationsbehandling efter behov

Ventoline enligt BIVA PM

Pulmicort enligt BIVA PM

Pulmozyme enligt BIVA PM

### Diuretika efter behov

Furosemid 0,5 mg/kg x 2-4 iv. ev Furosemid infusion 0,1 – 1 mg/kg/tim.

Metolazon 0,05 – 0,1 mg/kg p.o/p.s

HANP (Carperitide) 25 – 50 ng/kg/min

Magnesium sulfat: 0,1-0,2 mmol/kg

Kalium: 0,1-0,5 mmol/kg/tim po/ps/iv

Inotropi, vasopressorer efter behov

Milrinon 0,5-0,75  $\mu$ g/kg/min

Noradrenalin 0,01 – 0,2  $\mu$ g/kg/min, Vasopressin 0,0003 – 0,001 E/kg/min, Adrenalin

Lars Lindberg Öl, BIVA, Skånes Universitetsjukhuset i Lund

## Referenslista:

1. Huang, Y., et al., *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19*. Acta Pharmacol Sin, 2020. **41**(9): p. 1141-1149.
2. Jaimes, J.A., et al., *Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop*. J Mol Biol, 2020. **432**(10): p. 3309-3325.
3. Burki, T., *The origin of SARS-CoV-2*. Lancet Infect Dis, 2020. **20**(9): p. 1018-1019.
4. Mastrangelo, P., et al., *Identification of RSV Fusion Protein Interaction Domains on the Virus Receptor, Nucleolin*. Viruses, 2021. **13**(2).
5. Khanmohammadi, S. and N. Rezaei, *Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19*. J Med Virol, 2021. **93**(5): p. 2735-2739.
6. Root-Bernstein, R., *Innate Receptor Activation Patterns Involving TLR and NLR Synergisms in COVID-19, ALI/ARDS and Sepsis Cytokine Storms: A Review and Model Making Novel Predictions and Therapeutic Suggestions*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(4).
7. Kouwaki, T., et al., *RIG-I-Like Receptor-Mediated Recognition of Viral Genomic RNA of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 and Viral Escape From the Host Innate Immune Responses*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 700926.
8. Matsumiya, T. and D.M. Stafforini, *Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-1*. Crit Rev Immunol, 2010. **30**(6): p. 489-513.
9. Gordon, K.B., et al., *Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1259-68.
10. Wang, J., et al., *The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9*. J Biol Chem, 2006. **281**(49): p. 37427-34.
11. Cervantes, J.L., et al., *TLR8: the forgotten relative revindicated*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(6): p. 434-8.
12. Campbell, G.R., et al., *SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway*. iScience, 2021. **24**(4): p. 102295.
13. Hadjadj, J., et al., *Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients*. Science, 2020. **369**(6504): p. 718-724.
14. Bastard, P., et al., *Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19*. Science, 2020. **370**(6515).
15. Delgado, M., *Inhibition of interferon (IFN) gamma-induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide: inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27620-9.
16. Karki, R., et al., *Synergism of TNF-alpha and IFN-gamma Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes*. Cell, 2021. **184**(1): p. 149-168 e17.
17. Campbell, G.R. and S.A. Spector, *Toll-like receptor 8 ligands activate a vitamin D mediated autophagic response that inhibits human immunodeficiency virus type 1*. PLoS Pathog, 2012. **8**(11): p. e1003017.
18. Wang, C., et al., *Human Cathelicidin Inhibits SARS-CoV-2 Infection: Killing Two Birds with One Stone*. ACS Infect Dis, 2021.



19. Hoepel, W., et al., *High titers and low fucosylation of early human anti-SARS-CoV-2 IgG promote inflammation by alveolar macrophages*. *Sci Transl Med*, 2021. **13**(596).
20. White, J.H., *Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010. **121**(1-2): p. 234-8.
21. Sansom, D.M., C.N. Manzotti, and Y. Zheng, *What's the difference between CD80 and CD86?* *Trends Immunol*, 2003. **24**(6): p. 314-9.
22. Danese, S., et al., *Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification*. *J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2011-5.
23. Tang, T., et al., *Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint*. *Pharmacol Ther*, 2021. **219**: p. 107709.
24. Thompson, M.R., et al., *Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection*. *Viruses*, 2011. **3**(6): p. 920-40.
25. Gavins, F.N., et al., *Microvascular thrombosis and CD40/CD40L signaling*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(3): p. 574-81.
26. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. *Nature*, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
27. Aloui, C., et al., *The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(12): p. 22342-64.
28. Danese, S. and C. Fiocchi, *Platelet activation and the CD40/CD40 ligand pathway: mechanisms and implications for human disease*. *Crit Rev Immunol*, 2005. **25**(2): p. 103-21.
29. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2004. **53**(7): p. 1035-43.
30. Dewitte, A., et al., *New frontiers for platelet CD154*. *Exp Hematol Oncol*, 2015. **4**: p. 6.
31. Comer, S.P., et al., *COVID-19 induces a hyperactive phenotype in circulating platelets*. *PLoS Biol*, 2021. **19**(2): p. e3001109.
32. Canzano, P., et al., *Platelet and Endothelial Activation as Potential Mechanisms Behind the Thrombotic Complications of COVID-19 Patients*. *JACC Basic Transl Sci*, 2021. **6**(3): p. 202-218.
33. Helms, J., et al., *High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study*. *Intensive Care Med*, 2020.
34. Senchenkova, E.Y., et al., *Roles of Coagulation and fibrinolysis in angiotensin II-enhanced microvascular thrombosis*. *Microcirculation*, 2014. **21**(5): p. 401-7.
35. Senchenkova, E.Y., et al., *A critical role for both CD40 and VLA5 in angiotensin II-mediated thrombosis and inflammation*. *FASEB J*, 2018. **32**(6): p. 3448-3456.
36. Lax, S.F., et al., *Pulmonary Arterial Thrombosis in COVID-19 With Fatal Outcome : Results From a Prospective, Single-Center, Clinicopathologic Case Series*. *Ann Intern Med*, 2020. **173**(5): p. 350-361.
37. Arachchillage, D.J., et al., *Anticoagulation with argatroban in patients with acute antithrombin deficiency in severe COVID-19*. *Br J Haematol*, 2020. **190**(5): p. e286-e288.
38. Seshadri, M., J. Ahamed, and J. Laurence, *Intervention in COVID-19 linked hypercoagulable states characterized by circuit thrombosis utilizing a direct thrombin inhibitor*. *Thrombosis Update*, 2020. **1**(December).
39. Dorward, D.A., et al., *Tissue-Specific Immunopathology in Fatal COVID-19*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021. **203**(2): p. 192-201.

40. Chvatal-Medina, M., et al., *Antibody Responses in COVID-19: A Review*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 633184.
41. Siracusano, G., C. Pastori, and L. Lopalco, *Humoral Immune Responses in COVID-19 Patients: A Window on the State of the Art*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1049.
42. Huang, A.T., et al., *A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4704.
43. Huang, M., et al., *Temporal antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of coronavirus disease 2019*. Cell Discov, 2020. **6**: p. 64.
44. Zhao, J., et al., *Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019*. Clin Infect Dis, 2020. **71**(16): p. 2027-2034.
45. Tavasolian, F., et al., *HLA, Immune Response, and Susceptibility to COVID-19*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 601886.
46. Mohamed Khosroshahi, L., et al., *Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; an overview*. Int Immunopharmacol, 2021. **93**: p. 107364.
47. Rieder, M., et al., *Serum ACE-2, angiotensin II, and aldosterone levels are unchanged in patients with COVID-19*. Am J Hypertens, 2020.
48. Kreutz, R., et al., *Hypertension, the renin-angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19*. Cardiovasc Res, 2020.
49. Ingraham, N.E., et al., *Understanding the renin-angiotensin-aldosterone-SARS-CoV axis: a comprehensive review*. Eur Respir J, 2020. **56**(1).
50. Hrenak, J. and F. Simko, *Renin-Angiotensin System: An Important Player in the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
51. Ziegler, C.G.K., et al., *SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues*. Cell, 2020.
52. Zhong, J., et al., *The immunology of COVID-19: is immune modulation an option for treatment?* Lancet Rheumatol, 2020. **2**(7): p. e428-e436.
53. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor*. Cell, 2020. **181**(2): p. 271-280 e8.
54. Walls, A.C., et al., *Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein*. Cell, 2020. **183**(6): p. 1735.
55. Seeland, U., et al., *Evidence for treatment with estradiol for women with SARS-CoV-2 infection*. BMC Med, 2020. **18**(1): p. 369.
56. Chen, J., et al., *Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation*. Aging Cell, 2020. **19**(7).
57. Cheng, H., Y. Wang, and G.Q. Wang, *Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19*. J Med Virol, 2020.
58. Stilhano, R.S., et al., *SARS-CoV-2 and the possible connection to ERs, ACE2, and RAGE: Focus on susceptibility factors*. FASEB J, 2020. **34**(11): p. 14103-14119.
59. Kumari, K., G.B.N. Chainy, and U. Subudhi, *Prospective role of thyroid disorders in monitoring COVID-19 pandemic*. Heliyon, 2020. **6**(12): p. e05712.



60. Malek Mahdavi, A., *A brief review of interplay between vitamin D and angiotensin-converting enzyme 2: Implications for a potential treatment for COVID-19*. Rev Med Virol, 2020. **30**(5): p. e2119.
61. De Smet, D., et al., *Serum 25(OH)D Level on Hospital Admission Associated With COVID-19 Stage and Mortality*. Am J Clin Pathol, 2020.
62. Huang, F., et al., *Angiotensin II plasma levels are linked to disease severity and predict fatal outcomes in H7N9-infected patients*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3595.
63. Liu, Y., et al., *Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury*. Sci China Life Sci, 2020. **63**(3): p. 364-374.
64. Liu, N.H., Y. Chen, R-G. Zhu, H-M., *High rate of increased level of plasma angiotensin II and its gender difference in ccovid-19: An analysis of 55 hospitalized patients with covid-19 in a single hospital, wuhan, China*. J Clin Toxicol, 2021. **11**(S16): p. 6.
65. Wu, Z., et al., *Elevation of plasma angiotensin II level is a potential pathogenesis for the critically ill COVID-19 patients*. Crit Care, 2020. **24**(1): p. 290.
66. Zhang, H. and A. Baker, *Recombinant human ACE2: acing out angiotensin II in ARDS therapy*. Crit Care, 2017. **21**(1): p. 305.
67. Zoufaly, A., et al., *Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19*. Lancet Respir Med, 2020. **8**(11): p. 1154-1158.
68. Kuba, K., et al., *A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury*. Nat Med, 2005. **11**(8): p. 875-9.
69. Duarte, M., et al., *Telmisartan for treatment of Covid-19 patients: An open multicenter randomized clinical trial*. EClinicalMedicine, 2021. **37**: p. 100962.
70. Bodor, C., et al., *Angiotensin II increases the permeability and PV-1 expression of endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(1): p. C267-76.
71. Parikh, S.M., et al., *Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans*. PLoS Med, 2006. **3**(3): p. e46.
72. Gattinoni, L., et al., *COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes?* Intensive Care Med, 2020.
73. Yan, Y., et al., *Angiotensin II receptor blocker as a novel therapy in acute lung injury induced by avian influenza A H5N1 virus infection in mouse*. Sci China Life Sci, 2015. **58**(2): p. 208-11.
74. Mortensen, E.M., et al., *Population-based study of statins, angiotensin II receptor blockers, and angiotensin-converting enzyme inhibitors on pneumonia-related outcomes*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(11): p. 1466-73.
75. Wang, J., et al., *Chronic Activation of the Renin-Angiotensin System Induces Lung Fibrosis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 15561.
76. Uhal, B.D., et al., *Angiotensin signalling in pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(3): p. 465-8.
77. Huang, Z., et al., *Inhibitors of the renin-angiotensin system: The potential role in the pathogenesis of COVID-19*. Cardiol J, 2020. **27**(2): p. 171-174.
78. Lu, S., et al., *PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) Protects Against Ang II (Angiotensin II)-Induced Pathological Vascular Fibrosis and Remodeling-Brief Report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(2): p. 394-403.
79. Maruta, H. and H. He, *PAK1-blockers: Potential Therapeutics against COVID-19*. Med Drug Discov, 2020. **6**: p. 100039.

80. Forrester, S.J., et al., *Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2018. **98**(3): p. 1627-1738.
81. Seltzer, S., *Linking ACE2 and angiotensin II to pulmonary immunovascular dysregulation in SARS-CoV-2 infection*. *Int J Infect Dis*, 2020. **101**: p. 42-45.
82. Zhou, Y.F., B., *Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patents*. *Natl Sci Rev*, 2020. **7**(6): p. 5.
83. Hausding, M., et al., *CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction*. *Basic Res Cardiol*, 2013. **108**(6): p. 386.
84. Steven, S., et al., *CD40L controls obesity-associated vascular inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in high fat diet-treated and db/db mice*. *Cardiovasc Res*, 2018. **114**(2): p. 312-323.
85. de Queiroz, T.M., N. Lakkappa, and E. Lazartigues, *ADAM17-Mediated Shedding of Inflammatory Cytokines in Hypertension*. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 1154.
86. Zipeto, D., et al., *ACE2/ADAM17/TMPRSS2 Interplay May Be the Main Risk Factor for COVID-19*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 576745.
87. Jia, H., *Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and Inflammatory Lung Disease*. *Shock*, 2016. **46**(3): p. 239-48.
88. Miller, D.L., R. Yaron, and M.J. Yellin, *CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression*. *J Leukoc Biol*, 1998. **63**(3): p. 373-9.
89. Slupsky, J.R., et al., *Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40*. *Thromb Haemost*, 1998. **80**(6): p. 1008-14.
90. Litijos, J.F., et al., *High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients*. *J Thromb Haemost*, 2020. **18**(7): p. 1743-1746.
91. Villard, O., et al., *The Plasmatic Aldosterone and C-Reactive Protein Levels, and the Severity of Covid-19: The Dyhor-19 Study*. *J Clin Med*, 2020. **9**(7).
92. Brown, N.J., et al., *Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo*. *Kidney Int*, 2000. **58**(3): p. 1219-27.
93. Stoll, D., et al., *Both aldosterone and spironolactone can modulate the intracellular ACE/ANG II/AT1 and ACE2/ANG (1-7)/MAS receptor axes in human mesangial cells*. *Physiol Rep*, 2019. **7**(11): p. e14105.
94. Liu, B.M., et al., *Clinical significance of measuring serum cytokine levels as inflammatory biomarkers in adult and pediatric COVID-19 cases: A review*. *Cytokine*, 2021. **142**: p. 155478.
95. Sinha, P., M.A. Matthay, and C.S. Calfee, *Is a "Cytokine Storm" Relevant to COVID-19?* *JAMA Intern Med*, 2020. **180**(9): p. 1152-1154.
96. Eskilsson, A., et al., *Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis*. *J Neurosci*, 2014. **34**(48): p. 15957-61.
97. Eriguchi, Y., et al., *Essential role of IFN-gamma in T cell-associated intestinal inflammation*. *JCI Insight*, 2018. **3**(18).
98. Obermeier, F., et al., *Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Clin Exp Immunol*, 1999. **116**(2): p. 238-45.
99. Ojetti, V., et al., *COVID-19 and intestinal inflammation: Role of fecal calprotectin*. *Dig Liver Dis*, 2020. **52**(11): p. 1231-1233.



100. Wang, F., et al., *IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction*. Gastroenterology, 2006. **131**(4): p. 1153-63.
101. Han, J.H., et al., *Elevated circulating levels of the interferon-gamma-induced chemokines are associated with disease activity and cutaneous manifestations in adult-onset Still's disease*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 46652.
102. Galvan Casas, C., et al., *Classification of the cutaneous manifestations of COVID-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases*. Br J Dermatol, 2020. **183**(1): p. 71-77.
103. Salim, T., C.L. Sershen, and E.E. May, *Investigating the Role of TNF-alpha and IFN-gamma Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0153289.
104. Dusterhoft, S., J. Lokau, and C. Garbers, *The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer*. Pathol Res Pract, 2019. **215**(6): p. 152410.
105. Del Valle, D.M., et al., *An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival*. Nat Med, 2020. **26**(10): p. 1636-1643.
106. Qin, C., et al., *Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China*. Clin Infect Dis, 2020. **71**(15): p. 762-768.
107. Huang, C., et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. Lancet, 2020. **395**(10223): p. 497-506.
108. Varchetta, S., et al., *Unique immunological profile in patients with COVID-19*. Cell Mol Immunol, 2021. **18**(3): p. 604-612.
109. Gil-Etayo, F.J., et al., *T-Helper Cell Subset Response Is a Determining Factor in COVID-19 Progression*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 624483.
110. Lodge, S., et al., *NMR Spectroscopic Windows on the Systemic Effects of SARS-CoV-2 Infection on Plasma Lipoproteins and Metabolites in Relation to Circulating Cytokines*. J Proteome Res, 2021. **20**(2): p. 1382-1396.
111. Zhao, Y., et al., *Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease*. JCI Insight, 2020. **5**(13).
112. Chen, J., et al., *The clinical and immunological features of pediatric COVID-19 patients in China*. Genes Dis, 2020. **7**(4): p. 535-541.
113. Zizzo, G. and P.L. Cohen, *Imperfect storm: is interleukin-33 the Achilles heel of COVID-19?* Lancet Rheumatol, 2020. **2**(12): p. e779-e790.
114. Fajgenbaum, D.C. and C.H. June, *Cytokine Storm*. N Engl J Med, 2020. **383**(23): p. 2255-2273.
115. Gadotti, A.C., et al., *IFN-gamma is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection*. Virus Res, 2020. **289**: p. 198171.
116. Kelley, N., et al., *The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).
117. Chen, G., et al., *Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019*. J Clin Invest, 2020. **130**(5): p. 2620-2629.
118. Kang, S., et al., *IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(36): p. 22351-22356.
119. Christgen, S., D.E. Place, and T.D. Kanneganti, *Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation*. Cell Res, 2020. **30**(4): p. 315-327.

120. Freeman, T.L. and T.H. Swartz, *Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1518.
121. Sami, R., et al., *Characterizing the immune responses of those who survived or succumbed to COVID-19: Can immunological signatures predict outcome?* *Cytokine*, 2021. **140**: p. 155439.
122. Rose-John, S., *The Soluble Interleukin 6 Receptor: Advanced Therapeutic Options in Inflammation*. *Clin Pharmacol Ther*, 2017. **102**(4): p. 591-598.
123. Kang, S., et al., *Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic*. *Immunity*, 2019. **50**(4): p. 1007-1023.
124. Li, Q., et al., *Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(13): p. 1199-1207.
125. Ackermann, M., et al., *Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19*. *N Engl J Med*, 2020.
126. Hou, Y.J., et al., *SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract*. *Cell*, 2020. **182**(2): p. 429-446 e14.
127. Silvin, A., et al., *Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19*. *Cell*, 2020. **182**(6): p. 1401-1418 e18.
128. Kaya, T., et al., *Serum calprotectin as a novel biomarker for severity of COVID-19 disease*. *Ir J Med Sci*, 2021.
129. Luis Garcia de Gadiana, R., et al., *Circulating levels of GDF-15 and calprotectin for prediction of in-hospital mortality in COVID-19 patients: A case series*. *J Infect*, 2021. **82**(2): p. e40-e42.
130. Mahler, M., et al., *Circulating Calprotectin as a Biomarker of COVID-19 Severity*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2021: p. 1-13.
131. Shi, H., et al., *Neutrophil calprotectin identifies severe pulmonary disease in COVID-19*. *J Leukoc Biol*, 2021. **109**(1): p. 67-72.
132. Udeh, R., et al., *Calprotectin, an Emerging Biomarker of Interest in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *J Clin Med*, 2021. **10**(4).
133. Liao, M., et al., *Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19*. *Nat Med*, 2020. **26**(6): p. 842-844.
134. M, M.B., et al., *Etoposide treatment adjunctive to immunosuppressants for critically ill COVID-19 patients*. *J Infect*, 2020. **81**(3): p. 452-482.
135. Hamizi, K., S. Aouidane, and G. Belaaloui, *Etoposide-based therapy for severe forms of COVID-19*. *Med Hypotheses*, 2020. **142**: p. 109826.
136. Patel, M., et al., *Etoposide as Salvage Therapy for Cytokine Storm Due to Coronavirus Disease 2019*. *Chest*, 2021. **159**(1): p. e7-e11.
137. Takami, A., *Possible role of low-dose etoposide therapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis by COVID-19*. *Int J Hematol*, 2020. **112**(1): p. 122-124.
138. Delgado-Lopez, P.D., et al., *Etoposide for Cytokine Storm Because of Coronavirus Disease 2019*. *Chest*, 2021. **159**(4): p. 1678-1679.
139. Bergsten, E., et al., *Confirmed efficacy of etoposide and dexamethasone in HLH treatment: long-term results of the cooperative HLH-2004 study*. *Blood*, 2017. **130**(25): p. 2728-2738.
140. Group, R.C., et al., *Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 - Preliminary Report*. *N Engl J Med*, 2020.
141. Williams, D.M., *Clinical Pharmacology of Corticosteroids*. *Respir Care*, 2018. **63**(6): p. 655-670.

142. van der Velden, V.H., *Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma*. Mediators Inflamm, 1998. **7**(4): p. 229-37.
143. Xavier, A.M., et al., *Gene Expression Control by Glucocorticoid Receptors during Innate Immune Responses*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 31.
144. Stone, J.H., et al., *Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19*. N Engl J Med, 2020. **383**(24): p. 2333-2344.
145. Veiga, V.C., et al., *Effect of tocilizumab on clinical outcomes at 15 days in patients with severe or critical coronavirus disease 2019: randomised controlled trial*. BMJ, 2021. **372**: p. n84.
146. Gordon, A.C., *Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. The REMAP-CAP Investigators*. MedRxiv, 2020.
147. Salama, C., et al., *Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia*. N Engl J Med, 2021. **384**(1): p. 20-30.
148. Rosas, I.O., *Tocilizumab in Hospitalized Patients With COVID-19 Pneumonia*. MedRxiv, 2020.
149. McCreary, E.K. and N.J. Meyer, *Covid-19 controversies: the tocilizumab chapter*. BMJ, 2021. **372**: p. n244.
150. group, C.-C., *Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial*. Lancet Respir Med, 2021.
151. Guimaraes, P.O., et al., *Tofacitinib in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia*. N Engl J Med, 2021.
152. Gozzetti, A., E. Capochiani, and M. Bocchia, *The Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in COVID-19*. Leukemia, 2020. **34**(10): p. 2815-2816.
153. La Rosee, F., et al., *The Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in COVID-19 with severe systemic hyperinflammation*. Leukemia, 2020. **34**(7): p. 1805-1815.
154. Stebbing, J., et al., *JAK inhibition reduces SARS-CoV-2 liver infectivity and modulates inflammatory responses to reduce morbidity and mortality*. Sci Adv, 2020.
155. Hollenberg, S.M., et al., *Hemodynamic Profiles of Shock in Patients With COVID-19*. Am J Cardiol, 2021.
156. De Luca, G., et al., *GM-CSF blockade with mavrilimumab in severe COVID-19 pneumonia and systemic hyperinflammation: a single-centre, prospective cohort study*. Lancet Rheumatol, 2020. **2**(8): p. e465-e473.
157. Lumpuy-Castillo, J., et al., *Cardiovascular Damage in COVID-19: Therapeutic Approaches Targeting the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(18).
158. Guo, J., et al., *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Cardiovascular Disease: A Viewpoint on the Potential Influence of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers on Onset and Severity of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection*. J Am Heart Assoc, 2020. **9**(7): p. e016219.
159. Hrenak, J., S. Zorad, and F. Simko, *Renin-angiotensin system and SARS-CoV-2 interaction: underlying mechanisms and potential clinical implications*. Gen Physiol Biophys, 2020. **39**(3): p. 203-204.
160. Baral, R., M. White, and V.S. Vassiliou, *Effect of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with COVID-19: a Systematic Review and Meta-analysis of 28,872 Patients*. Curr Atheroscler Rep, 2020. **22**(10): p. 61.

161. Pranata, R., et al., *The use of renin angiotensin system inhibitor on mortality in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis*. Diabetes Metab Syndr, 2020. **14**(5): p. 983-990.
162. Wang, Y., et al., *The use of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) inhibitors is associated with a lower risk of mortality in hypertensive COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis*. J Med Virol, 2020.
163. Zhao, X., et al., *Melatonin Protects against Lung Fibrosis by Regulating the Hippo/YAP Pathway*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
164. Shneider, A., A. Kudriavtsev, and A. Vakhrusheva, *Can melatonin reduce the severity of COVID-19 pandemic?* Int Rev Immunol, 2020. **39**(4): p. 153-162.
165. Holford, P., et al., *Vitamin C-An Adjunctive Therapy for Respiratory Infection, Sepsis and COVID-19*. Nutrients, 2020. **12**(12).
166. Simonovich, V.A., et al., *A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia*. N Engl J Med, 2020.
167. Joyner, M.J., et al., *Effect of Convalescent Plasma on Mortality among Hospitalized Patients with COVID-19: Initial Three-Month Experience*. New Engl J Med, 2021.
168. Lee, Z., et al., *The Rise and Fall of Hydroxychloroquine for the Treatment and Prevention of COVID-19*. Am J Trop Med Hyg, 2021. **104**(1): p. 35-38.
169. Wang, Y., et al., *Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial*. Lancet, 2020. **395**(10236): p. 1569-1578.
170. Godino, C., et al., *Antithrombotic therapy in patients with COVID-19? -Rationale and Evidence*. Int J Cardiol, 2020.
171. Viecca, M., et al., *Enhanced platelet inhibition treatment improves hypoxemia in patients with severe Covid-19 and hypercoagulability. A case control, proof of concept study*. Pharmacol Res, 2020. **158**: p. 104950.
172. Lo, M.S. and J.W. Newburger, *Role of intravenous immunoglobulin in the treatment of Kawasaki disease*. Int J Rheum Dis, 2018. **21**(1): p. 64-69.
173. Ouldali, N., et al., *Association of Intravenous Immunoglobulins Plus Methylprednisolone vs Immunoglobulins Alone With Course of Fever in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children*. JAMA, 2021.
174. Supady, A., et al., *Cytokine adsorption in patients with severe COVID-19 pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation (CYCOV): a single centre, open-label, randomised, controlled trial*. Lancet Respir Med, 2021. **9**(7): p. 755-762.
175. Rieder, M., et al., *Cytokine adsorption in patients with severe COVID-19 pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation: protocol for a randomised, controlled, open-label intervention, multicentre trial*. BMJ Open, 2021. **11**(1): p. e043345.
176. Supady, A., *Cytokine adsorption and ECMO in patients with COVID-19 - Author's reply*. Lancet Respir Med, 2021.
177. Broman, M.E., et al., *Endotoxin and cytokine reducing properties of the oXiris membrane in patients with septic shock: A randomized crossover double-blind study*. PLoS One, 2019. **14**(8): p. e0220444.
178. Kwok, E.S. and D. Howes, *Use of methylene blue in sepsis: a systematic review*. J Intensive Care Med, 2006. **21**(6): p. 359-63.
179. Marrero, M.B., et al., *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 247-50.



180. Schieffer, B., et al., *Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction*. *Circ Res*, 2000. **87**(12): p. 1195-201.
181. Opal, S.M., et al., *Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial*. *The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group*. *Crit Care Med*, 1997. **25**(7): p. 1115-24.
182. Ruperto, N., et al., *Pharmacokinetic and safety profile of tofacitinib in children with polyarticular course juvenile idiopathic arthritis: results of a phase I, open-label, multicenter study*. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2017. **15**(1): p. 86.