МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
ОТДЕЛЕНИЕ ПО НЕФРОЛОГИЯ
УМБАЛ „СВ.АННА“ АД

Д-р Румен Стефанов Филев

Клинико-лабораторни и прогностични маркери за бъбречна увреда при пациенти с Covid-19

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на научна степен „доктор“ по научна специалност 03.01.15 - Нефрология

София, 2023

Клинико-лабораторни и прогностични маркери за бъбречна увреда при пациенти с Covid-19

АВТОРЕФЕРАТ

изготвен от:

Д-р Румен Филев, ас.

Катедра „Вътрешни болести“
Медицински университет София
Отделение по нефрология
УМБАЛ „Св. Анна“ АД
София

Научни ръководители:

Доц. Мила Любомирова, д.м.

Проф. Лионел Ростен, д.м.

Дисертационният труд е представен на 125 стандартни печатни страници, онагледен е с 18 таблици, 2 графики и 18 фигури. В библиографията са включени 169 заглавия. Във връзка с дисертационния труд са осъществени общо 5 публикации, 3 участия на научни форуми и 1 участие в научен проект.

Процедурата за предварително обсъждане е проведена на заседание на Катедрен съвет на катедра по вътрешни болести на Медицински факултет, Медицински университет – София (извлечение от протокол №5/05.07.2023) и е насочен за защита пред научно жури в състав:

Членове:

1. Проф. Борис Богов, д.м. – Медицински университет – София (вътрешен член)
2. Проф. Боряна Делийска, д.м.н – Медицински университет – София (вътрешен член)
3. Доц. Велислава Димитрова, д.м. – Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Медицински факултет (външен член)
4. Доц. Едуард Тилкиян, д.м. – Медицински университет – Пловдив (външен член)
5. Проф. Емил Кумчев, д.м.н – Медицински университет – Пловдив (външен член)

Резервни членове:

1. Доц. Рая Иванова, д.м. – Медицински университет – София (вътрешен член)
2. Проф. Райна Робева, д.м.н (външен член)

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури, назначено от Ректора на Медицински университет – София на 17.11.2023 в лекционните зали на нефрологичната клиника в УМБАЛ „Св. Анна“ АД от 12:00 часа

Съдържание на автореферата

Съдържание на автореферата 6
Съкращения 7
Съкращения на български език: 8
Съкращения на английски език: 8
Таблици 10
Графики 11
Въведение 13
Цел 16
Задачи 16
Материали и методи 17
Резултати 19
Демографски и общи данни за кохортата 19
Стандартни лабораторни изследвания 21
Остра бъбречна недостатъчност и смъртност – рискови фактори 25
RAAS-блокерна терапия в хода на Covid-19 31
Специфични биомаркери 38
Обсъждане 58
Рискови фактори за ОБУ и смъртност 58
Приложение на RAAS-блокерна терапия (ARB/ACEi) 61
Специфични биомаркери от серум и урина 64

Заключение 70
Изводи 73
Препоръки 74
Приноси 75
Публикации свързани с докторантурата 76
Участия 78

Съкращения на български език:

- ИБВ – Изкуствена белодробна вентилация
- Ковид-19 – Коронавирусна инфекция 2019
- КТ – Компютърна томография
- ОБН – Остра бъбречна недостатъчност
- ОБУ – Остра бъбречна увреда
- СЗО – Световната здравна организация
- СПИН – Синдром на придобитата имунна недостатъчност
- ХБЗ – Хронично бъбречно заболяване
- ХОББ - Хронична обструктивна белодробна болест

Съкращения на английски език:

- ACE-2 – Angiotensin Converting Enzyme 2
- ACEI – Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor
- AKI – Acute Kidney Injury
- ARB – Angiotensin Receptor Blocking
- BMI – Body mass index
- CKD – Chronic Kidney Disease
- CoV-2 S – Coronavirus – 2 Spike protein
- Covid-19 – Coronavirus infection 2019
- CP – Fusion cytoplasmic domain
- CTCC - Chest-CT severity score
- DCs - Kidney resident dendritic cells
- ECMO – Extracorporeal membrane oxygenation
- FP – Fusion peptide
- GFR - Glomerular filtration rate
- HR1 - Heptat repeat 1
- HR2 - Heptat repeat 2
- IL-18 - Interleukin 18

- IL-6 - Interleukin 6
- IQR – Interquartile diapason
- KDIGO - Kidney Disease Improving Global Outcomes
- KIM-1 - Kidney injury molecule – 1
- MERS – Middle East Respiratory Syndrome
- MERS-CoV - Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
- Mpro – Main protease
- NC – Nucleocapsid
- nCOV-19 – novel coronavirus-2019
- NGAL - Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
- NGS – Next-generation sequence
- RAAS – Renin-angiotensin-aldosterone system
- RBD - Receptor Binding Domain
- RT-PCR – Real Time reverse transcription Polymerase Chain Reaction
- SAA - Serum amyloid A
- SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome
- SARS-CoV - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
- SARS-CoV-2 - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
- SCr – Serum Creatinine
- Sp02% - oxygen saturation measured in procents
- TM – Transmembrane domain
- TMPRSS - Transmembrane Serine Protease 2
- TRIBE-AKI - Translational Research Investigating Biomarker Endpoints in AKI
- WHO – World Health Organization
- eGFR – estimated Glomerular filtration rate

Таблици

Таблица 1 Основни демографски данни и информация за придружаващи заболявани 20
Таблица 2 Сравнение на изходните данни между двете групи според биологичните параметри....22
Таблица 3 Логистичен регресионен модел за рискови фактори за смъртност....27
Таблица 4 Рискови фактори за смъртност: Съотношение на шансовете 28
Таблица 5 Логистичен регресионен модел за остро бъбречно увреждане (ОБУ) 29
Таблица 6 Логистичен регресионен модел: Odds ratios остра бъбречна увреда (ОБУ)....30
Таблица 7 Влияние на използването на ACEi или ARB върху смъртността и ОБУ....33
Таблица 8 Пациенти с ARB/ACEi срещу пациенти без ARB/ACEi терапия 35
Таблица 9 Логистичен регресионен модел: Odds Ratios (Зависимост: Смъртност)....36
Таблица 10 Анализ на популацията....40
Таблица 11 Биомаркери по групи по стойности на медиана (диапазони)....42
Таблица 12 Сравняване на биомаркерите във всяка от подгрупите 43
Таблица 13 Обща корелация за биомаркерите при положителните пациенти с COVID-19 54

Графики

Фигура 1 Логистична регресия за смъртност 28
Фигура 2 Odds ratio за остра бъбречна увреда (ОБУ) 31
Фигура 3 Съотношение на вероятността за смърт според определени показатели 37
Фигура 4 Сравняване на eGFR по групи 41
Фигура 5 Сравнение на стойностите на uNGAL по групи 45
Фигура 6 Сравнение на стойностите на uKIM-1 по групи 45
Фигура 7 Сравнение на стойностите на IL-6 по групи 46
Фигура 8 Сравнение на стойностите на SAA по групи 47
Фигура 9 Сравнение на стойностите на IL-18 по групи ...48
Фигура 10 Сравнение на стойностите на ACE2 ензима по групи 48
Фигура 11 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – NGAL 49
Фигура 12 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – KIM-1 50
Фигура 13 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – IL-6 51
Фигура 14 Сравнение на групите според стойностите на биомаерите и проявата на ОБУ – SAA 51
Фигура 15 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – IL-18 52
Фигура 16 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – ACE2 53
Фигура 17 Съотношение на шансовете за рисковите фактори за смърт, свързана с COVID-19.....57

Въведение

През 2019 година светът записа поредна глава в историята на медицината и всички станахме свидетели, а и участници в пандемията, предизвикана от новооткрития вирус – SARS-CoV-2. В световен мащаб това не е първият случай на зараза с подобна мащабност и за съжаление няма да бъде последен. Познавайки историята на инфекциозните заболявания със световна значимост винаги си припомняме за поредицата от грипни пандемии или за холерните, които са цели 7 в световната история- нещо, което не бива да се случва с Ковид-19.

От самото начало на пандемията попаднахме в ситуация, в която има вирус с широко разпространение, който заразява милиони хора. Независимо от взетите мерки в световен мащаб разпространението е бързо и броят на заразените се покачваше постоянно. Лечение и медикаментозна превенция отсъстваха до създаването на ваксините, което ни ограничи в лечебен план, защото имахме възможност единствено да лекуваме и протектираме усложненията причинени от вирусната инфекцията.

От медицинска гледна точка кризата в България не беше толкова различна от тази в останалата част от света. Вече знаехме, че основната характеристика на SARS-CoV-2 е дифузното алвеоларно увреждане, но участието на други органи трябваше да бъде проучено

допълнително. Получените данните от изследванията в миналото за SARS-CoV отбелязват, че около 1 от 10 от пациентите са развили остро бъбречно увреждане и около 9 от 10 от тези пациенти с остра бъбречна увреда не са преживели инфекцията.

Механизмът на засягане при инфекция с Ковид-19 е подобен като при SARS-CoV. Засегнатата клетка има рецептор, който е гостоприемника за вируса – ACE2 рецептора, чрез своят „шип“ или т.нар. S-protein. При свързването и активирането на S-протеина настъпва разцепване от страна на клетъчната трансмембранна серинна протеаза (TMPRSS), което позволява на вируса да отдели пептиди спомагащи за сливане с клетъчната мембрана. Това показва, че ACE2 ензимът и TMPRSS са ключови за проникването на вируса.

Поради тази причина възникна въпросът кои са факторите предразполагащи свързването на вируса с ACE2 ензимът, а също така и кои са факторите водещи до ограничаване на този патологичен механизъм. В центъра на обсъжданията и проучванията се оказаха лекарствата от групата на ACEI/ARB, които са основно средство за справяне с хипертонията независимо от нейната генеза. Самата роля на тази лекарствена група, както и на самият ACE2 ензим е много сходна, а нивата на ензима в разтворимата му форма се повишават при терапия с дадените медикаменти, а това може да има ключово значение за предложените терапевтични иновации за лечение и защита от тежка инфекция със SARS-CoV-2.

Във връзка с последните данни за по-високо ниво на заболеваемост при SARS-CoV-2 и установената по-висока честота на остра бъбречна увреда подчерта необходимостта да се обърне сериозно внимание на отделителната система и да се проучат клинично-лабораторните възможности за установяване на патологичния механизъм чрез, който вируса въздейства на бъбречните структури и води до тези сериозни нарушения в бъбречната функция.

Очакваните приноси от това цялостно проучване са свързани с по-доброто разбиране на патологичната роля на вируса, неговите взаимовръзки и влияние върху организма като цяло. Това разбира се ще има отражение и върху идеята за създаването на т.нар. единен протокол за лечение на пациенти, заразени с Covid-19, с подчертан фокус върху бъбречното увреждане при тези пациенти.

Данните, събрани от направените изследвания ни показаха, че има ясна връзка между инфекцията Covid-19 и бъбречното увреждане с изява на остро бъбречно заболяване или влошаване на вече съществуващо хронично такова. На фона на тези доказателства се стигна до заключението, че трябва да се положат много усилия за подобряване или поне стабилизиране на бъбречната функция, защото това има пряка връзка с резултата от лечението и прогнозата за пациента.

Цел

Кои клинико-лабораторни маркери - неспецифични и специфични могат да донесат информация за степента на бъбречна увреда при пациенти с установен COVID-19?

Задачи

1. Да се оцени ролята на отделните стандартни лабораторни изследвания
2. Да се оценят придружаващите заболявания като рискови фактори за протичането на вирусната инфекция.
3. Да се оцени ролята на ХБЗ като рисков фактор за протичането на COVID-19
4. Да се оценят рисковите фактори, които са предпоставка за възникване на ОБУ.
5. Да се оценят рисковите фактори, които са предпоставка за фатален изход при протичането на заболяването.
6. Да се проучи влиянието на RAAS-блокерите в хода на инфекцията и да се прецени дали има противопоказания за приложение на лечение с тази група медикаменти.
7. Да се анализират специфичните биомаркера за бъбречна увреда (IL-6, IL-18, NGAL, KIM-1, SAA, ACE-2
8. Да се оцени кои резултати могат да бъдат полезни в ежедневната практика и могат да дадат информация за провеждане на рутинни изследвания

Материали и методи

Представен е проспективен анализ на 160 човека за период от 1 февруари 2021 до 30 април 2021. Всички участници са разделени в четири групи, както следва:

Първа група - 70 пациенти с (+) тест за COVID-19 и данни за доказано ХБЗ (>6 месеца).

Втора група - 50 пациенти с (+) тест за COVID-19, но без данни за ХБЗ.

Трета група - 20 пациенти с (-) тест за COVID-19, но с доказано ХБЗ (>6 месеца).

Четвърта група – 20 здрави контроли - отрицателен тест за COVID-19, без данни за придружаващи заболявания.

Всички пациенти са попълнили информирано съгласие преди провеждането на изследвания. Самите информирани съгласия, както и анкетната карта са създадени строго и единствено за проведеното проучване

Лабораторна диагностика:

- Стандартен лабораторен "COVID-19 пакет" е проведен при всички пациенти участвали в изследването.
- Изследване стойности на серумен креатинин при хоспитализацията
- Изчисляване на eGFR чрез CKD-EPI 2021.
- Изследвани урина и уринен седимент.
- Протеинурия

- Проведени контроли между 7 и 10 ден.
- Проведени изследвания на специфични биомаркери доказали се при други проучвания: NGAL, KIM-1, IL-6 и IL-18 като е използван ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) тип „сандвич“.
- Проведени изследвания на специфични биомаркери специфично насочени към възпалителния процес на COVID-19: SAA и ACE2 като е използван ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) тип „сандвич“.

Образни изследвания:

КТ на бял дроб - изчислен Severity Score Index - 0 до 5 точки.

Проведен статистически анализ:

SAS® package ver. 9.4 (SAS Institute Inc., SAS 9.4 Help and Documentation, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2015–2022)

Резултати

Демографски и общи данни за кохортата

От всичките 120 пациенти с потвърдена COVID-19 инфекция, 70 или 58,3% са с анамнеза за ХБЗ с давност над 6 месеца преди хоспитализацията. В контролната група всички 50 пациенти нямат анамнеза за ХБЗ. Общата средна възраст на пациентите е 61,3 години като съответно в първата група средната възраст се изчислява на 56,8 години, а във втората група е 65,9 години.

Средната продължителността на симптомите преди хоспитализацията е 6 дни. При всички пациенти се наблюдава вариация от минимум 1 ден и максимум 20 дни на проява на симптоми преди хоспитализацията. От всички 120 пациенти, около 35% са били с фебрилитет със стойност на телесната температура над 38 °C.

Включените съпътстващи заболявания са: артериална хипертония, диабет, затлъстяване, сърдечносъдово заболяване като в случая за нас не е от значение дали пациентът е с ХБЗ или без ХБЗ достига до 73,3%. Пациентите, които са имали поне едно съпътстващо заболяване се разпределят, както следва: затлъстяване-14,2%, хипертония-65,8%, диабет тип II-34,2% (нито един пациент не е имал диабет тип I) и сърдечносъдово заболяване-35,8%. Сравнението между демографските данни и изходните параметри е извършено и е представено в **Таблица 1**.

<u>Таблица 1</u> Основни демографски данни и информация за придружаващи заболявани

		Без ХБЗ	***ХБЗ***	***P-value***
Брой пациенти		*50*	*70*	
Възраст на пациентите (години)	*Средна (SD)*	*56.8 (16.00)*	*65.9 (12.56)*	*0.0007*
Пол (n%)	*Жени*	*21 (42.0%)*	*39 (55,7%)*	*0.13*
	Мъже	*29 (58.0%)*	*31 (44,3%)*	
Раса (n%)	*Европейска*	*50 (100%)*	*70 (100%)*	*-*
Обезитет (n%)	*Не*	*49 (98.0%)*	*54 (77,1%)*	*0.001*
	Да	*1 (2.0%)*	*16 (22.9%)*	
Сърдечно-съдови заболявания (n%)	*Не*	*41 (82.0%)*	*36 (51.4%)*	*0.0006*
	Да	*9 (18.0%)*	*34 (48.6%)*	
Захарен диабет (тип II) (n%)	*Не*	*49 (98.0%)*	*30 (42.9%)*	*<.0001*
	Да	*1 (2.0%)*	*40 (57.1%)*	
Артериална хипертония (n%)	*Не*	*38 (76.0%)*	*3 (4.3%)*	*<.0001*
	Да	*12 (24.0%)*	*67 (95.7%)*	

От проведеният анализ сигнификантни стойности има за обезитет (P-value=0.001), сърдечно-съдовите заболявания (P-value=0.0006), захарният диабет тип 2 (P-value<0.0001), както и за артериалната хипертония (P-value<0.0001). При прякото сравнение на двете групи се установява, че захарният диабет, артериалната хипертония, затлъстяването и сърдечносъдовите заболявания са статистически по-разпространени в групата с хроничното бъбречно заболяване при сравнение с контролната групата.

Стандартни лабораторни изследвания

Първоначално се направи сравнение между всички изходни лабораторни стойности в Група 1 и Група 2, което е отразено в Таблица 2. Установиха се няколко значими разлики между двете групи при постъпването: разлики в стойностите на нивата на серумния креатинин, eGFR, урея, Д-димер, хемоглобин, както и в изследваните стойности с дипстик за протеинурия и хематурия (**виж Таблица 2**).

При постъпването 23 пациенти (19,1%) са с нормални нива на CRP, 66 пациенти (55%) са с нормален диапазон на серумния феритин, 36 пациенти (30%) са с нормални нива на D-dimer и 60 пациенти (50%) са с нормални нива на фибриногена.

Нивата на D-димер при постъпване са повишени и в двете групи (общо 72 % от пациентите), докато при провеждането на контролните изследвания по време на периода между 7-10 дни от хоспитализацията нивата на D-димер остават повишени по-малък процент пациенти - 46 %.

<u>Таблица 2</u> Сравнение на изходните данни между двете групи според биологичните параметри

Параметър	***Статистически анализ***	***Пациенти с ХБЗ***	***Пациенти без ХБЗ***	***P-value***
Брой пациенти	*N*	*70*	*50*	
Creatinine (□mol/L)	*Median (Ranges)*	*119 (57.0-930.0)*	*79* (50.0-1295.0)*	*<0.001*
eGFR (mL/min)	*Mean (SD)*	*49.5 (24.07)*	*82.3 (27.77)*	*<0.001*
Urea (mmol/L)	*Median (Ranges)*	*9.2 (2.7-75.2)*	*5.5* (3.0-82.3)*	*<0.001*
D-Dimer (mg/L FEU)	*Median (Ranges)*	*0.9 (0.3-10.7)*	*0.5 (0.3-8.1)*	*<0.001*
Fibrinogen (g/L)	*Mean (SD)*	*4.6 (1.58)*	*4.3 (1.52)*	*0.52*
Hemoglobin (g/L)	*Mean (SD)*	*133.7 (19.61)*	*142.5 (15.99)*	*0.01*
Leucocytes ($x10^3/mm^3$)	*Median (Ranges)*	*7.4 (2.5-21.2)*	*6.8 (2.9-35.3)*	*0.31*
Lymphocytes ($x10^3/mm^3$)	*Mean (SD)*	*1.3 (0.61)*	*1.4 (0.68)*	*0.71*
Platelet count ($x10^3/mm^3$)	*Mean (SD)*	*247.6 (107.31)*	*246.0 (85.14)*	*0.92*
Protein (g/L)	*Mean (SD)*	*62.7 (7.09)*	*64.1 (6.23)*	*0.09*
CRP (mg/L)	*Median (Ranges)*	*50.8 (0.5-320.6)*	*29.8 (0.1-217.6)*	*0.06*
Ferritin (□g/L)	*Median (Ranges)*	*712.2 (105.9-2511.0)*	*518.0 (27.8-2632.0)*	*0.11*

Лабораторно изследване на урина				
Параметър	***Статистически анализ***	***Пациенти с ХБЗ***	***Пациенти без ХБЗ***	***P-value***
Протеинурия (n%)				
1+	*n (%)*	*33 (47.1%*	*2 (4.0%)*	*<0.001*
2+	*n (%)*	*6 (8.6%*	*3 (6.0%)*	
3+	*n (%)*	*5 (7.1%*	*1 (2.0%)*	
Отр.	*n (%)*	*26 (37.1%*	*44 (88.0%)*	
Хематурия (n%)				
1+	*n (%)*	*12 (17.1%)*	*0 (0.0%)*	*0.005*
2+	*n (%)*	*4(5.7%)*	*1(2.0%)*	
3+	*n (%)*	*3(4.3%)*	*2(4.0%)*	
Отр.	*n (%)*	*51(72.9%)*	*47(94.0%)*	
Левкоцитурия (n%)				
1+	*n (%)*	*5 (7.1%)*	*0 (0.0%)*	*0.06*
2+	*n (%)*	*0 (0.0%)*	*2 (4.0%)*	
3+	*n (%)*	*2 (2.9%)*	*1 (2.0%)*	
Отр.	*n (%)*	*63 (90.0%)*	*47 (94.0%)*	

Стойностите на серумния креатинин (SCr) при постъпването са завишени при 58.3% от пациентите със SARS-CoV-2 положителен резултат. За нормални стойности, според референтните граници зададени от клиничната лаборатория, се приемат: за мъжете са 62-106 µmol/L, а за жените 44-80 µmol/L. Изчисли се, че eGFR е със стойности над 60 ml/min/1,73 m2 при 50% от пациентите. Средна стойност на eGFR е определена според формулата CKD-EPI 2021 и при постъпването е 82,3 mL/min/1,73m2 за групата без ХБЗ, докато за групата с ХБЗ установеният резултат е 49,5 mL/min/1,73m2 (p-стойност ≤

0,001). При направените проследявания на тези стойности по време на контролните лабораторни изследвания на 7-10 се установи, че има покачване на гломерулната филтрация: 92,2 ml/min/1,73m2 за групата без ХБЗ и 59,0 ml/min/1,73m2 за групата с установена предварително ХБЗ (р-стойност = 0,001). Освен това пациентите, които са имали повишено ниво на SCr в изходните данни са общо 58,3 %, докато при 7-10-дневното проследяване след хоспитализацията процентът е по-нисък - 40.8%.

Пробите от урина пациентите от Група 1 и Група 2 при постъпването показват, че 39 пациенти са дали положителен резултат за протеинурия като от тях 87,1% са имали 1+ протеинурия, а останалите са имали >1+. На 7-10 дни след постъпването броят на случаите на протеинурия е по-висок, отколкото при приемането: т.е. 83 пациенти, от които 69,8% са имали 1+ протеинурия, а останалите са имали >1+. Оценена е и лабораторната находка за хематурията: при постъпването има установени 22 случая, от които 54,5% са само с 1+ хематурия, докато на 7-10-ия ден след приемането са открити 37 случая, от които само 27% са с хематурия по-висока от 1+ (р-стойност = 0,05). При анализа се установи, че по-малко на брой пациенти са имали хематурия в сравнение с тези, които са проявили протеинурия. Честота на уретералната катетеризация е доста ниска (около 8,3%), което означава, че се очаква да има слабо влияние върху извършения анализ на урината.

Осъществени бяха вътрешногруповите сравнения на лабораторните резултати като се извърши анализ на първичните данни при постъпването и проведените контролни лабораторни изследвания. Резултатите показаха, че има сравнително значими промени между проследените резултати. При пациентите с ХБЗ се

наблюдава статистически значимо намаление на стойностите на серумния креатинин, D-димер, хемоглобина, общия белтък, албумин, CRP и феритина, докато за сметка на това се наблюдава статистически значимо увеличение на калкулацията на eGFR, както и на лабораторните стойности на левкоцитите, тромбоцитите и получения резултат за кислородното насищане от проведените кръвно-газови анализи. При пациентите без ХБЗ наблюдавахме много сходни резултати, както при първата група, но изключение направиха получените стойности на D-димер, албумин и феритин, чиито промени не бяха статистически значими.

Остра бъбречна недостатъчност и смъртност – рискови фактори

Поради факта, че ОБУ е често усложнение в хода на SARS-CoV-2 инфекцията се осъществи анализ на честотата, тежестта и рисковите фактори за ОБУ, а подобен анализ се осъществи и за самата смъртност.

ОБУ е често срещано усложнение в изследваната кохорта като се проявила при 38 пациента (31,6 %), от които 31 са били в групата с ХБЗ (44,3 % от пациентите с ХБЗ) (p-value=0,0006). Всички пациенти, които са имали ОБУ, могат да бъдат разделени на три групи според тежестта на проявата на усложнението според критериите на KDIGO. В контролната група има само 7 случая на ОБУ. В Група 1 31 пациенти са с доказана остро настъпила бъбречна увреда като при 42,8% от пациентите е класифицирана като 3-та степен според KDIGO. Като цяло, в рамките на нашата

кохорта от 120 пациенти вътреболничната смъртност е 19,1% (23 пациенти), а от тях 66,6% от пациентите са с проява на остра бъбречна недостатъчност (19 пациенти; p-value=0,0096). Всички пациенти, които не са преживели инфекцията с Covid-19, 100 % имат бъбречно заболяване (ХБЗ и/или ОБУ). Във втората група от гледна точка на ОБУ, то 17,2 % от групата са имали проява на такава. В хода на проследяване на бъбречната функция и в контекста на острата бъбречна увреда няма как да не се обърне внимание и на пациентите, при които е проведена бъбречно заместителна терапия - хемодиализа. Те са общо трима като двама от пациенти са от Група 1 и един от Група 2. И при тримата пациенти хемодиализата е била извършена в интензивното отделение.

Всички пациенти, които не са преживели инфекцията със SARS-CoV-2 са пациенти, които в някакъв момент от лечението се е наложило да бъдат преведени в реанимация за интензивно наблюдение и провеждане на ИБВ. Всички те са имали двустранна пневмония доказана чрез провеждане на КТ на гръден кош. Причината за смъртта е била напредналата пневмония с напреднала дихателна недостатъчност и при нито един от пациентите не е имало данни за какъвто и да е съдов инцидент.

Предвид получените резултати от проведените анализи се прецени, че е необходимо да се направи отделна оценка на всички предразполагащи фактори, както за смъртността сред пациентите болни от SARS-CoV-2, така и за проявите на остра бъбречна недостатъчност. Осъществи се подробен анализ на рисковите фактори, които може да са довели до смърт или остра бъбречна увреда. В Таблица 7 са показани резултатите от логистичната регресия за рисковите

фактори за смъртност. Статистически значими фактори за смъртност в нашата кохорта са мъжкият пол, ОБУ и това, че не са лекувани с ремдесивир. Тези резултати бяха потвърдени чрез оценка на съотношението на шансовете: резултатите могат да се видят в Таблица 4 и Фигура 1. Острата бъбречна увреда се разпозна като негативен прогностичен фактор при инфекция с Covid-19, т.е. той увеличава смъртността при пациентите (OR = 5,26 (95% CI: 1,15 - 24,05); P= 0,03).

Таблица 3 Логистичен регресионен модел за рискови фактори за смъртност

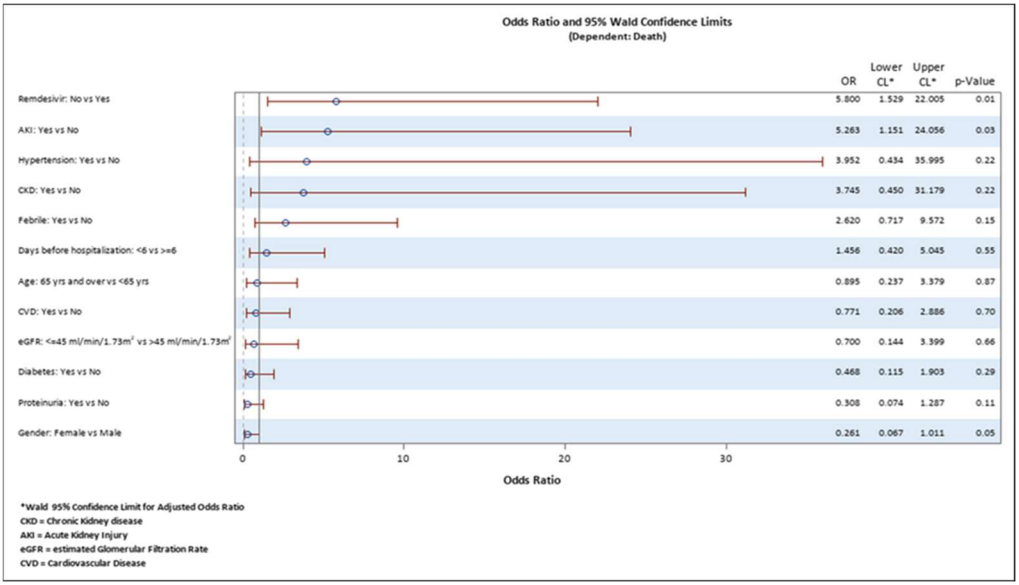
Parameter	Class value for OR estimate	OR estimate	Standard error	Wald chi-square	P-value	Exponentiation of OR estimate
Пресичане		-2.3598	0.5342	19.5132	<.0001	0.094
ХБЗ	ХБЗ	0.6602	0.5406	1.4914	0.22	1.935
ОБУ	Да	0.8303	0.3877	4.5873	0.03	2.294
Пол	Жени	-0.6721	0.3456	3.7815	0.05	0.511
eGFR	≤ 45 mL/min/1.73m^2	-0.1784	0.4032	0.1958	0.65	0.837
Възраст	65 год. и над	-0.0552	0.3387	0.0266	0.87	0.946
ССЗ	Да	-0.1303	0.3369	0.1497	0.69	0.878
Захарен диабет	Да	-0.3796	0.3577	1.1257	0.28	0.684
Артериална хипертония	Да	0.6872	0.5636	1.4868	0.22	1.988
Фебрилитет	Да	0.4816	0.3305	2.1225	0.14	1.619
Дни преди хоспитализацията	<6 дни	0.1877	0.3171	0.3503	0.55	1.206
Ремдесивир	Да	0.8789	0.3402	6.6759	0.009	2.408
Протеинурия	Да	-0.5885	0.3647	2.6047	0.10	0.555

Съкращения: ХБЗ = хронично бъбречно заболяване; ОБУ = остра бъбречна увреда; ССЗ = сърдечно-съдово заболяване; eGFR = изчислена гломерулна филтрация; год. = години

<u>Таблица 4</u> Рискови фактори за смъртност: Съотношение на шансовете

Ефект	Odds ratio	Lower CL*	Upper CL*	p-value
ХБЗ: Да vs. Не	3.745	0.450	31.179	0.22
ОБУ: Да vs. Не	5.263	1.151	24.056	0.03
Пол: Мъж vs. Жена	0.261	0.067	1.011	0.05
eGFR ≤45 mL/min/1.73m^2 vs. >45 mL/min/1.73m^2	0.700	0.144	3.399	0.65
Възраст: 65 год. и над vs. <65 год.	0.895	0.237	3.379	0.87
ССЗ: Да vs. Не	0.771	0.206	2.886	0.69
Захарен диабет: Да vs. Не	0.468	0.115	1.903	0.28
Артериална хипертония: Да vs. Не	3.952	0.434	35.995	0.22
Фебрилитет: Да vs. Не	2.620	0.717	9.572	0.14
Дни предни хоспитализацията: <6 vs. >=6	1.456	0.420	5.045	0.55
Ремдесивир: Да vs. Не	5.800	1.529	22.005	0.009
Протеинурия: Да vs. Не	0.308	0.074	1.287	0.10

Фигура 1 Логистична регресия за смъртност



Същият анализ е направен и за рисковите фактори за остра бъбречна увреда. **Таблица 5** показва логистичната регресия за рисковите фактори за ОБУ.

Таблица 5 Логистичен регресионен модел за остро бъбречно увреждане (ОБУ)

Параметри	Class value for OR estimate	DF	OR estimate	Standard error	Wald chi-square	P-value
Пресичане		1	-0.7944	0.3821	4.3217	0.03
ХБЗ	ХБЗ	1	-0.0874	0.5024	0.0302	0.86
eGFR	≤45 mL/min/1.73m^2	1	1.3263	0.3251	16.6406	<.0001
Пол	Женски	1	-0.1210	0.2782	0.1892	0.66
Възраст	65 год. и над	1	-0.2291	0.2940	0.6071	0.43
ССЗ	Да	1	-0.2859	0.2934	0.9493	0.32
Захарен диабет	Да	1	-0.2551	0.3187	0.6408	0.42
Артериална хипертония	Да	1	0.4261	0.4946	0.7422	0.38
Фебрилитет	Да	1	0.5497	0.3080	3.1858	0.07
Дни преди хоспитализацията	<6 дни	1	0.5449	0.2824	3.7223	0.05
Ремдесивир	Да	1	0.6590	0.2758	5.7092	0.01
Протеинурия	Да	1	0.4496	0.2952	2.3206	0.12

Съкращения: ХБЗ = хронично бъбречно заболяване; ОБУ = остра бъбречна увреда; ССЗ = сърдечно-съдово заболяване; eGFR = изчислена гломерулна филтрация; год. = години.

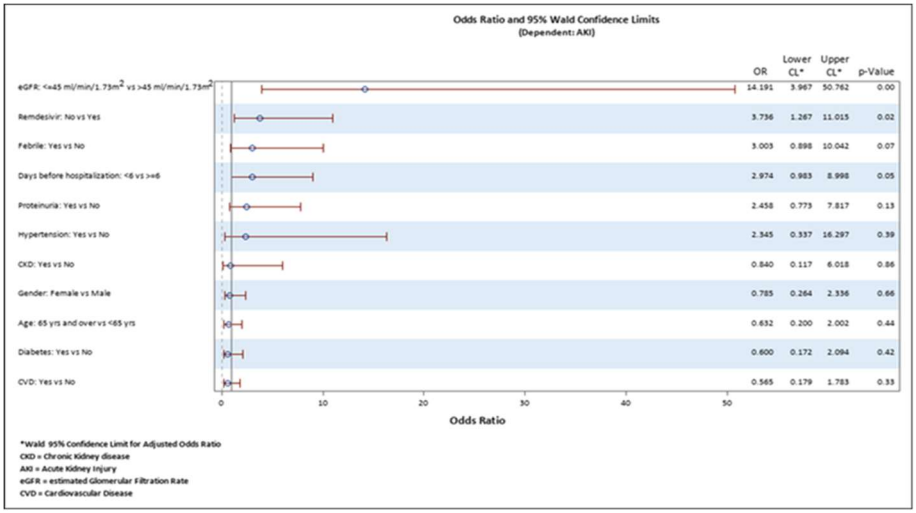
Статистически значимите фактори за честотата на ОБУ са наличието на изчислен eGFR в стойност равна или по-малка от 45 ml/min/1,73 m2, симптоми в продължение на 6 или повече дни преди хоспитализацията и отново като рисков фактор се доказа липсата на лечение с Ремдесивир. Същите повторни резултати са потвърдени с помощта на Odds Ratio, което е отразено като анализ в **Таблица 6** и **Фигура 3**.

***Таблица 6** Логистичен регресионен модел: Odds ratios остра бъбречна увреда (ОБУ).*

Ефект	Odds ratio	Lower CL*	Upper CL*	P-value
ХБЗ: Да vs. Не	0.840	0.117	6.018	0.86
eGFR ≤45 mL/min/1.73m^2 vs >45 mL/min/1.73m^2	14.191	3.967	50.762	<.0001
Пол: Жени vs. Мъже	0.785	0.264	2.336	0.66
Възраст: 65 год. и над vs. <65 yrs	0.632	0.200	2.002	0.43
ССЗ : Да vs. Не	0.565	0.179	1.783	0.32
Захарен диабет : Да vs. Не	0.600	0.172	2.094	0.42
Артериална хипертония : Да vs. Не	2.345	0.337	16.297	0.38
Фебрилитет : Да vs. Не	3.003	0.898	10.042	0.07
Дни преди хоспитализацията: <6 vs. >=6	2.974	0.983	8.998	0.05
Ремдесивир : Да vs. Не	3.736	1.267	11.015	0.01
Протеинурия : Да vs. Не	2.458	0.773	7.817	0.12

***Wald 95%**
Съкращения: доверителна граница за коригирано съотношение на коефициентите; ХБЗ = хронично бъбречно заболяване; ОБУ = остра бъбречна инфекция; ССЗ = сърдечно-съдово заболяване; eGFR = изчислена скорост на гломерулна филтрация; год. = години

<u>Фигура 2</u> Odds ratio за остра бъбречна увреда (ОБУ)



RAAS-блокерна терапия в хода на Covid-19

На изследваната кохорта се направи анализ във връзка с употребата на RAAS-блокери в хода на SARS-CoV-2 инфекцията като за целта се проведоха сходни анализи за смъртността и честотата на проявата на острата бъбречна увреда, но в контекста на приема на терапия от групата на RAAS-блокерите.

От всичките 120 пациента 30% (36/120 пациенти) са получавали терапия с ACEi или ARB - 21 жени (58,3%) и 15 мъже (41,7%). Останалите 84 пациенти не са получавали ACEi или ARB. Всички пациенти, които приемат ACEi/ARB, са имали предписана тази терапия преди да се

заразят с SARS-CoV-2 като на никой тях не е била предписана в хода на инфекцията със SARS-CoV-2.

Пациентите са сравнени по отношение на демографските им фактори и съпътстващи заболявания. При анализите на резултатите се установи, че пациентите които не получават терапия с ACEi/ARB имат значителни разлики в някои от получените резултати по отношение на артериалната хипертония, затлъстяването, ХБЗ и сърдечно-съдови заболявания в сравнение с тези, които получават ACEi/ARB. Съпътстващи заболявания като автоимунни заболявания, ХОББ/астма и хипотиреоидизъм, не са взети предвид, което може да бъде ограничение. Статистически значими резултати се установиха при сравняване на двете групи спрямо затлъстяването (p-value = 0.02), сърдечно-съдовите заболявания (p-value = 0.03), артериалната хипертония (p-value = 0.002) и ХБЗ (p-value = 0.04).

Осъщественият последващ анализ е с цел да се определи дали терапията с ACEi/ARB има влияние върху смъртността на първо място и второ, дали тя е била свързана с по-ниска честота на ОБУ. Смъртността сред всички COVID-19 пациенти (общо 120), както вече се отбеляза е 19,2 % (23/120 пациенти). Четирима от пациентите, които са починали, са от групата на ACEi/ARB, а останалите 19 пациенти са били от групата без ACEi/ARB терапия. Не е имало значителна разлика в двете групи по отношение на смъртността (p-value = 0.21). След постъпването всичките 23 пациенти, които са починали са приети в интензивно отделение/реанимация по време на тяхното лечение като всички са били интубирани и изкуствено вентилирани, т.е. резултатите от сравнителния анализ показват, че OR = 0,4276 (95 % доверителна

вероятност интервал: [0,0983, 1,4467]); P-стойност = 0.29). (Виж **Таблица 7**).

***Таблица 7** Влияние на използването на ACEi или ARB върху смъртността и ОБУ*

Параметър	Статистически метод	Без терапия с ACEi/ARB	Приемащи ACEi/ARB	P-value	RR (95% CI)
Смъртност					
Не	n%	65 (77.38%)	32 (88.89%)	0.21	0.49 (0.18; 1.34)
Да	n%	19 (22.62%)	4 (11.11%)		
Смъртност (Хипертония)					
Не	n%	31 (64.58%)	27 (87.10%)	0.04	0.36 (0.14;0.98)
Да	n%	17 (35.42%)	4 (12.90%)		
Смъртност (Захарен диабет)					
Не	n%	18 (69.23%)	14 (93.33%)	0.12	0.22 (0.03;1.57)
Да	n%	8 (30.77%)	1 (6.67%)		
Смъртност (Захарен диабет и хипертония)					
Не	n%	17 (68.00%)	14 (93.33%)	0.12	0.21 (0.03;1.51)
Да	n%	8 (32.00%)	1 (6.67%)		
Остра бъбречна увреда					
Не	n%	61 (72.62%)	22 (61.11%)	0.28	0.84 (0.63;1.13)
Да	n%	23 (27.38%)	14 (38.89%)		

За същите цели е проведено изследване и в подгрупите на пациентите, които имат хипертония и/или диабет, (т.е. съпътстващи заболявания, които са имали преди да бъдат диагностицирани със SARS-CoV-2 инфекция). Пациентите с артериална хипертония на RAAS-блокерна терапия имат значимо по-ниска смъртност в сравнения с пациентите, които са с доказана артериална хипертония, но без подобен тип терапия за контрол на артериалното налягане (p-value = 0.04). Не се установи значима статистическа разлика при пациентите със захарен диабет (p-value = 0.12) или хипертония и захарен диабет (p-value = 0.12) , така че не открихме полза от терапията с ACEi/ARB за тази група пациенти.

Влиянието на RAAS-блокерната терапия върху проявата и тежестта на ОБУ е изследвано по подобен начин. Общо има 37 пациенти с ОБУ (в който и да е стадий според KDIGO) от изследваните 120 пациенти. От тях 37,8% (14/37) са получавали ACEi/ABR. Сравнението между групите пациенти, приемащи ACEi/ABR и групата, която не приемали ACEi/ABR, не показа никакво въздействие - нито положително, нито отрицателно за тези от пациентите, които са развили ОБУ (p-value = 0.28).

Да се оцени дали употребата на ACEi/ABR е повлияла и/или подобрила стойностите на лабораторните параметри, ние сравнихме двете групи като се взеха лабораторните резултати в изходното ниво (Ден 0) и след това се проследиха стойностите при контролните изследвания. Проследиха се параметрите на eGFR (CKD-EPI 2021), D-димер, албумин и общ протеин (Виж **Таблица 8**). Анализа показва, че няма значимост между различните променливи с изключение на D-димер, който е бил значително по-нисък

при проследяването на пациентите, които са получавали ACEi/ABR като редовна терапия (p-values = 0.01).

<u>Таблица 8</u> Пациенти с ARB/ACEi срещу пациенти без ARB/ACEi терапия

Параметър	Статистика	Изходни стойности		Проследяване (7-10 ден)		Промяна		P-value
		ACEI/ARB	Без ACEI/ARB	ACEI/ARB	Без ACEI/ARB	ACEI/ARB	Без ACEI/ARB	
Брой пациенти	N	36	84	36	84	36	84	
eGFR	Mean (SD)	58.8 (27.56)	65.0 (31.34)	73.4 (27.05)	72.6 (33.70)	14.6 (15.71)	7.6 (20.18)	0.10
D-Dimer	Medium (Ranges)	0.8 (0.3-5.5)	0.6 (0.3-10.7)	0.8 (0.3-4.0)	0.5 (0.3-10.7)	-0.3 (-2.1- 0.4)	0.0 (-4.4 – 6.1)	0.01
Albumin	Medium (Ranges)	63.0 (46.0-71.0)	65.0 (50.0-89.0)	59.0 (46.0-70.0)	61.5 (42.0-72.0)	-2.0 (-14.0 – 18.0)	0.0 (-24.0 – 6.0)	0.60
Protein	Medium (Ranges)	35.0 (28.0-44.0)	37.0 (25.0-48.0)	34.0 (25.0-41.0)	34.0 (25.0-48.0)	-1.5 (-9.0 – 13.0)	0.0 (-16.0 – 8.0)	0.43

ACEI/ARB = Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor
ARB = Angiotensin Receptor Blocker
eGFR = estimated Glomerular Filtration Rate
SD = Standard Deviation

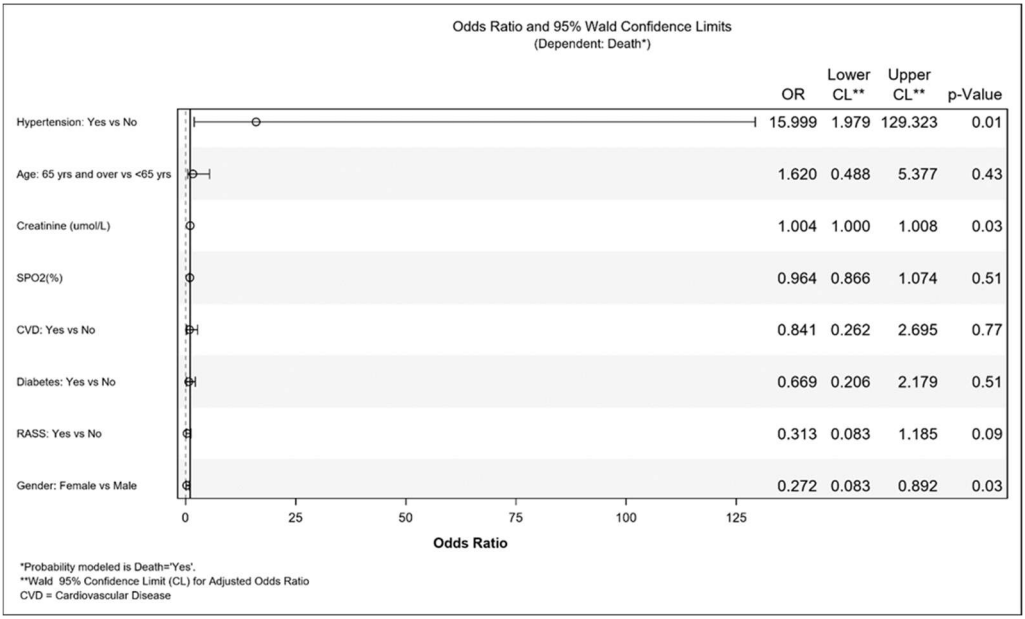
Анализирани са рисковите фактори, които може да са довели до смърт при пациентите с терапия с RAAS-блокери, както и при и тези без такава терапия. Резултатите отразени в **Таблица 9** показват логистичната регресия за смъртността и рискови фактори. Статистически значими независими рискови фактори за смъртност са били нивото на креатинина при постъпване- над изходно над нормалната референтна граница (при мъжете над 106 µmol/L и при жените над 80 µmol/L) [OR = 1,004 (1,000-1,008); P = 0.03] и наличието на артериална хипертония [OR

= 15,99 (1,97-129,32); P = 0.001]. Тези резултати бяха потвърдени чрез втори тип оценка и резултата може да се види на **Фигура 3**.

<u>Таблица 9</u> Логистичен регресионен модел: Odds Ratios (Зависимост: Смъртност)

Ефект	Odds Ratio	Lower CL**	Upper CL**	p-Value
Хипертония: Да срещу Не	15.999	1.979	129.323	0.0093
Възраст: 65 години и повече срещу <65 години	1.620	0.488	5.377	0.4306
Креатинин (mcмол/L)	1.004	1.000	1.008	0.0281
SPO2(%)	0.964	0.866	1.074	0.5117
ССЗ: Да срещу Не	0.841	0.262	2.695	0.7705
Диабет: Да срещу Не	0.669	0.206	2.179	0.5052
RAAS-блокер: Да срещу Не	0.313	0.083	1.185	0.0873
Пол: Жена срещу мъж	0.272	0.083	0.892	0.0316

<u>Фигура 3</u> Съотношение на вероятността за смърт според определени показатели



Поради важността на използването на ACEi/ARB за протекция на бъбречната функция, е направен статистически анализ на стойността на промяната на бъбречна функция(т.е. при постъпване в болничното заведение) спрямо стойността на SCr преди заразяването с SARS-CoV-2 (поне месец давност на резултата) и след това резултатите бяха сравнени с получените контролни изследвания на 7-10 ден в хода на пролежаването. Сравняваните параметри са креатинин (нормален диапазон за жените 44-80 μmol/L, за мъжете 62-106μmol/L) и eGFR е изчислена с помощта на CKD-EPI 2021 формулата. Резултатите показват, че eGFR (P-стойност = 0.66) и SCr (P-

стойност = 0.17) не се различават статистически въпреки първоначалния спад на бъбречната функция в хода на SARS-CoV-2 инфекцията, т.е. след острата фаза на инфекцията е последвало подобрение на бъбречната функция и възстановяване на нивата на серумния креатинин и eGFR до стойности, които близки до тези, които пациентите са имали преди заразяването със SARS-CoV-2 инфекцията.

Специфични биомаркери

Проведе се изследване на четирите групи с вече описаните специфични биомаркери. След получаване на вече изложените резултати на това проспективно, неинтервенционално, едноцентрово проучване, се прецени, че е необходимо да се оценят различни плазмени и уринни биомаркери на бъбречно увреждане. Избраните биомаркери са (neutrophil gelatinase-associated Lipocain [NGAL], kidney-injury molecule-1 [KIM-1], and interleukin-18 [IL-18]); inflammation (IL-6, C-reactive protein[CRP]); plus angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). Изследваните са всички 120 пациенти с COVID-19 доказан инфекция (от които 70 са имали хронично бъбречно заболяване при постъпване в спешното отделение, а при останалите 50 няма данни за ХБЗ, а единствено доказа COVID-19 инфекция). Нашата цел е да съпоставим специфичните биомаркери с резултатите за смъртност, остро бъбречно увреждане и да определим дали някой от биомаркерите би имал по-висока информативна стойност. Именно поради това биомаркерите са оценени и при здрави доброволци (20 на брой) и при пациенти с ХБЗ (20 на брой), които имат

отрицателен тест за SARS-CoV-2. Общият брой на всички пациенти в тази част от анализа е 160 човека.

От общо 160 лица при 75% е потвърдена болестта COVID-19 (120 пациенти), от които 70 (58,3%) са имали анамнеза за ХБЗ. Останалите 40 лица (25%), които не са имали анамнеза за COVID-19, са използвани като контроли и са разделени на две отделни групи (вече определени като трета и четвърта група). Средната възраст на пациентите с ХБЗ, които са имали положителен тест за COVID-19 е 56,8 години, докато при пациентите с COVID-19, които не са с ХБЗ, тя е 65,9 години. Съотношението на половете е 50:50. За пациентите с ХБЗ без COVID-19 средната възраст е 66,1 години; съотношението между половете е 11 жени (55%) и 10 мъже (45%). При контролната група от здрави хора средната възраст е 36,8 години, а съотношението между половете е равно: 10 мъже и 10 жени.

Средната стойност на eGFR при постъпването е 80,4 ml/min/1,73m2 за пациентите с COVID-19 и без ХБЗ, докато при пациентите с ХБЗ и COVID-19 тя е 47,9 mL/min/1,73 m2 (p-values < 0,0001). За пациентите с ХБЗ без COVID-19 eGFR е 62,3 ml/min/1,73m2 , докато eGFR е 111,1 ml/min/1,73m2 за контролната група на напълно здравите пациенти. Данните са показани в **Таблица 10** и **Фигура 4**.

Съществуват значими статистически разлики (p-values<0,0001) между стойностите на CRP при сравнението между четирите групи. Всички пациенти с COVID-19 са имали повишени нива на CRP: 75,7 mg/L (SD = 73,7) в Група 1 и 53,9 mg/L (SD = 59,5) във Група 2. При COVID-19 отрицателните пациенти, CRP е бил 7,0 mg/L (SD = 6,7) в Група 3 и 1,7 mg/L (SD = 1,6) в Група 4. Референтната

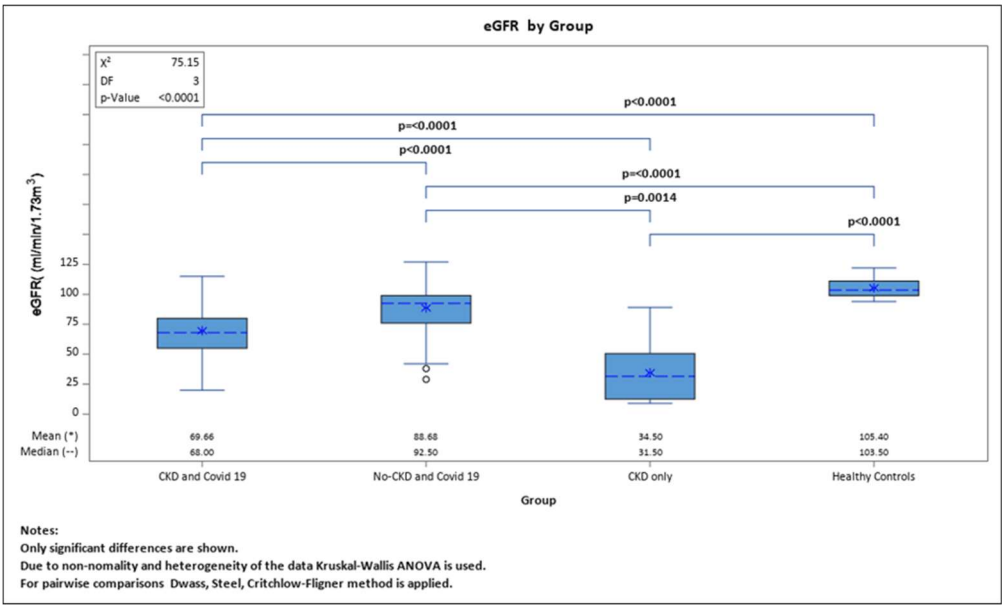
граница CRP е до 5 mg/L според данните на лабораторията провела изследванията.

<u>Таблица 10</u> Анализ на популацията

Група	Брой пациенти	Пол	Средна възраст Mean (SD)	Раса (n%)	Креатинин (mcmol/l) Mean SD	eGFR ml/min/1.73m^2 Mean (SD)	CRP (mmol/l) Mean (SD)
С данни за ХБЗ и пол. (+) за Covid-19	70	Female: 21 (42.0%) Male: 29 (58.0%)	56.8 (16.0)	Caucasians 100%	171.4 (156.4)	47.9 (23.0)	75.7 (73.7)
Без данни за ХБЗ, но пол. (+) за Covid-19	50	Female: 39 (55,7%) Male: 31 (44,3%)	65.9 (12.6)	Caucasians 100%	120.8 (176.9)	80.4 (28.9)	53.9 (59.5)
ХБЗ без данни за Covid-19	20	Female: 11 (55%) Male: 9 (45%)	66.1 (11.8)	Caucasians 100%	109.1 (31.8)	62.3 (22.6)	7.0 (6.7)
Напълно здрави пациенти	20	Female: 10 (50%) Male: 10 (50%)	36.8 (7.8)	Caucasians 100%	68.8 (15.6)	111.1 (13.0)	1.7 (1.6)
***P*-values**		0.49	<0.0001	NA	0.0229	<0.0001	<0.0001

ХБЗ – хронично бъбречно заболяване
CRP – С- реактивен протеин
eGFR – Гломерулна филтрация
SD – Стандартно отклонение

<u>Фигура 4</u> Сравняване на eGFR по групи



При направения статистически анализ се установи, че шестте биомаркера имат значими разлики и в четирите групи. (виж **Таблица 11**).

Това наложи да се проведе допълнителен анализ - сравнения между всяка подгрупа, като се използва сдвоен анализ на Kruskal-Wallis. Установихме следните статистически значими промени:

- **<u>Наличие на ХБЗ и на COVID-19 спрямо здравите контроли</u>**: значителни промени за IL-6, ензима SAA, ACE2, NGAL и IL-18.

- **Без ХБЗ, но с наличие на COVID-19 спрямо здравите контроли**: значими промени за SAA, IL-6, NGAL и IL-18.

- **Наличие само на ХБЗ спрямо здравите контроли**: значими промени за SAA, IL-6, ACE2 и IL-18

- **Наличие на ХБЗ и на COVID-19 спрямо групата само с ХБЗ**: значими промени за ензима ACE2 и NGAL.

***Таблица 11** Биомаркери по групи по стойности на медиана (диапазони)*

Маркери / Група	IL-6 *Median (Ranges)*	ACE-2 *Median (Ranges)*	uKIM-1 *Median (Ranges)*	uNGAL *Median (Ranges)*	uIL-18 *Median (Ranges)*	SAA *Median (Ranges)*
ХБЗ + COVID-19	9.45 (0.22-120.0)	8.30 (0.09-24.0)	1.89 (1.38-6.00)	195.96 (7.80-359.79)	58.97 (12.50-436.35)	98.95 (6.13–300)
Без ХБЗ + COVID-19	8.15 (0.28-120.0)	7.98 (0.14-24.00)	1.84 (1.10-3.79)	214.75 (15.21-349.60)	66.35 (28.17-269.19)	268.95 (3.31-300)
ХБЗ без COVID-19	20.62 (1.75-120.0)	2.54 (0.06-21.02)	1.75 (0.25-2.20)	49.75 (5.66-76.69)	64.96 (16.72-248.81)	75.34 (9.63-300)
Здрави контроли	2.52 (0.2–10.6)	0.95 (0.04-16.35)	1.87 (0.036-16.35)	40.73 (21.17-48.45)	57.78 (27.66-189.76)	5.71 (1.55-23.8)
Chi-square DF *p*-values	17.743 0.0005	35.583 <0.0001	6.533 0.0884	75.163 <.0001	15.733 0.0013	105.113 <.0001

Съкращения: ХБЗ - хронично бъбречно заболяване; DF - степен на свобода; IL- интерлевкин; u - урина; ACE2 - ангиотензин-конвертиращ ензим 2; KIM1 - молекула на бъбречното увреждане-1; NGAL - неутрофил-желатиназа-асоцииран липокалин; SAA – серумен амилоид А

Тези резултати могат да се видят в **Таблица 12** и **Фигури 5-10.**

Таблица 12 Сравняване на биомаркерите във всяка от подгрупите

Биомаркер	Сравнение по двойки	Статистика*	*P*-value
IL-6 (pg/mL)	*ХБЗ и Covid 19 vs. Без ХБЗ и Covid 19*	0.1958	0.99
	ХБЗ и Covid 19 vs. само ХБЗ	2.8622	0.17
	ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	4.4681	0.008
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Само ХБЗ	2.7306	0.21
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	4.0085	0.02
	Само ХБЗ vs. Здрави контроли	6.0071	0.0001
ACE2 (ng/mL)	*ХБЗ и Covid 19 vs. Без ХБЗ и Covid 19*	0.4837	0.98
	ХБЗ и Covid 19 vs. само ХБЗ	4.6668	0.005
	ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	7.6153	<0.0001
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Само ХБЗ	3.3897	0.07
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	6.2270	<0.0001
	Само ХБЗ vs. Здрави контроли	4.2662	0.01
uKIM-1 (ng/mL)	*ХБЗ и Covid 19 vs. Без ХБЗ и Covid 19*	2.2850	0.36
	ХБЗ и Covid 19 vs. само ХБЗ	3.1093	0.12
	ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	1.5512	0.69
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Само ХБЗ	1.8297	0.56
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	0.2023	0.99
	Само ХБЗ vs. Здрави контроли	1.8957	0.53
uNGAL (ng/mL)	*ХБЗ и Covid 19 vs. Без ХБЗ и Covid 19*	2.2998	0.36
	ХБЗ и Covid 19 vs. само ХБЗ	8.1940	<0.0001
	ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	8.3175	<0.0001
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Само ХБЗ	8.8986	<0.0001
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави онтроли	8.8251	<0.0001
	Само ХБЗ vs. Здрави контроли	1.6832	0.63

uIL-18 (pg/mL)	*ХБЗ и Covid 19 vs. Без ХБЗ и Covid 19*	0.1858	0.89
	ХБЗ и Covid 19 vs. само ХБЗ	2.9322	0.18
	ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	4.4732	0.009
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Само ХБЗ	2.9208	0.23
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	4.3205	0.03
	Само ХБЗ vs. Здрави контроли	6.3278	0.0003
SAA (>g/mL)	*ХБЗ и Covid 19 vs. Без ХБЗ и Covid 19*	0.4601	0.9881
	ХБЗ и Covid 19 vs. само ХБЗ	1.3217	0.7862
	ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	9.3514	<.0001
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Само ХБЗ	1.5833	0.6775
	Без ХБЗ и Covid 19 vs. Здрави контроли	8.2575	<.0001
	Само ХБЗ vs. Здрави контроли	7.3901	<.0001

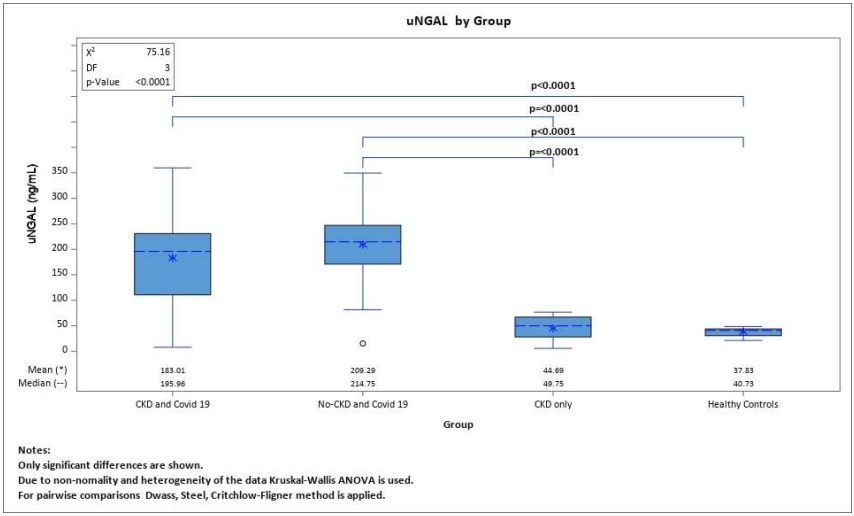
Съкращения: ACE2: ангиотензин-конвертиращ ензим 2; ХБЗ: хронично бъбречно заболяване; IL-6: интерлевкин - 6; uIL-18: интерлевкин - 18 в урината; uKIM-1: молекула на бъбречното увреждане в урината; uNGAL: липокалин, свързан с неутрофилната желатиназа в урината. SAA – серумен амилоид А
***За сравненията по двойки: използван е методът на Dwass, Steel, Critchlow-Fligner.**

От проведените анализи резултатите са представени в следващите фигури, за да могат да бъдат по добре показани значителните резултати. На **Фигура 5** са показани стойностите на NGAL измерени в урина при междугруповото сравнение като резултата показва, че за всяка една от групите стойностите са имали значителна разлика.

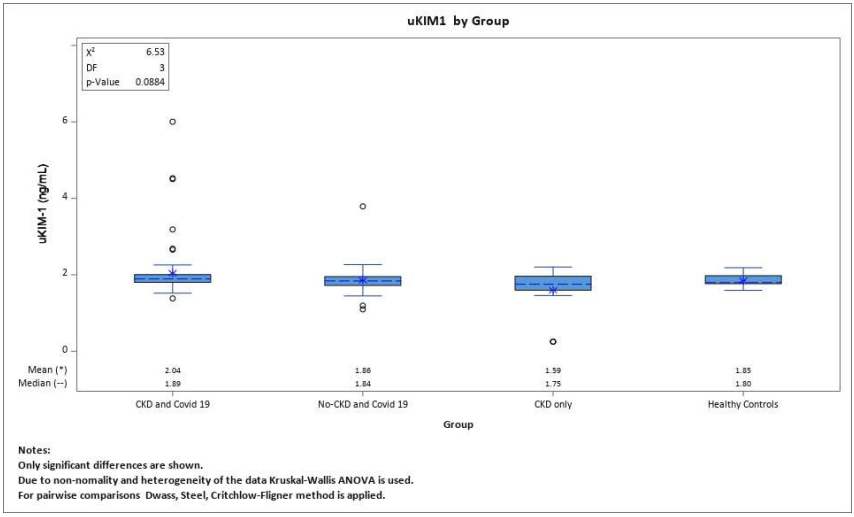
На **Фигура 6** са показани стойностите на KIM-1 измерени в урина при междугруповото сравнение като резултата е абсолютно противоположен спрямо получения за предходния биомаркер. Проведения анализ показва, че за

нито една от групите стойностите не са имали сигнификантна разлика в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

***Фигура 5** Сравнение на стойностите на uNGAL по групи*

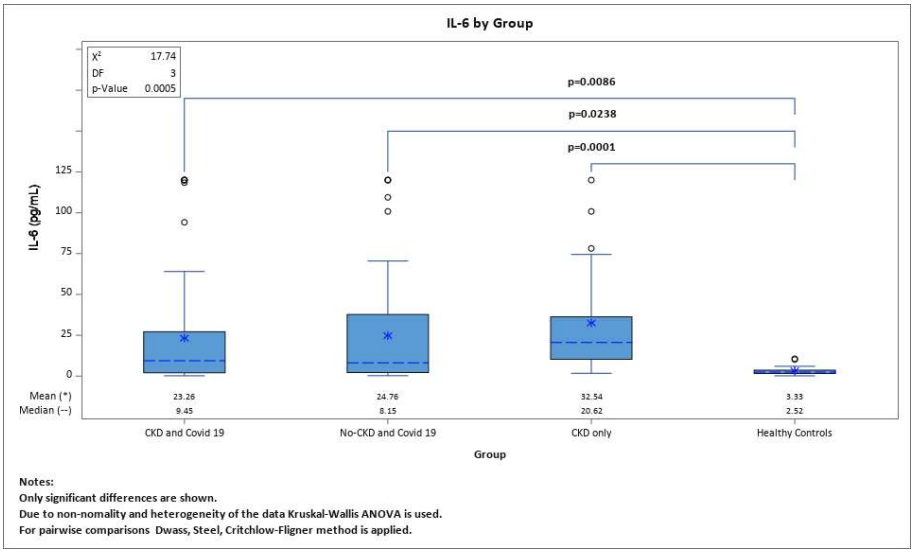


***Фигура 6** Сравнение на стойностите на uKIM-1 по групи*



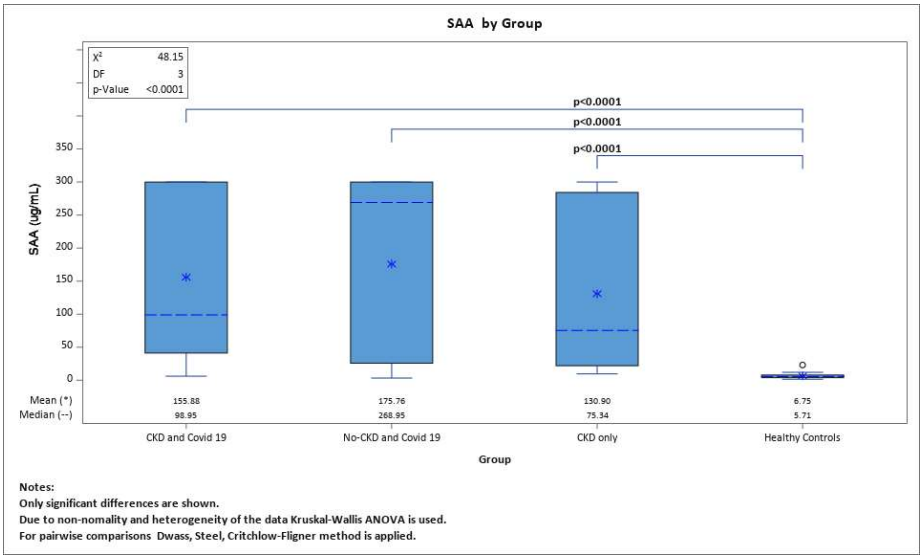
На **Фигура 7** са показани стойностите на IL-6 измерени в серум при междугруповото сравнение като резултата показва сигнификантни промени в три от проведените 4 изследвания. Резултата е статистически значим при поотделното сравняване на всяка от групите с напълно здравите пациенти от Група 4.

<u>Фигура 7</u> Сравнение на стойностите на IL-6 по групи



На **Фигура 8** са показани стойностите на SAA измерени в серум при междугруповото сравнение като резултата също показва сигнификантни промени в три от проведените 4 изследвания. Резултата е статистически значим при поотделното сравняване на всяка от групите с напълно здравите пациенти от Група 4.

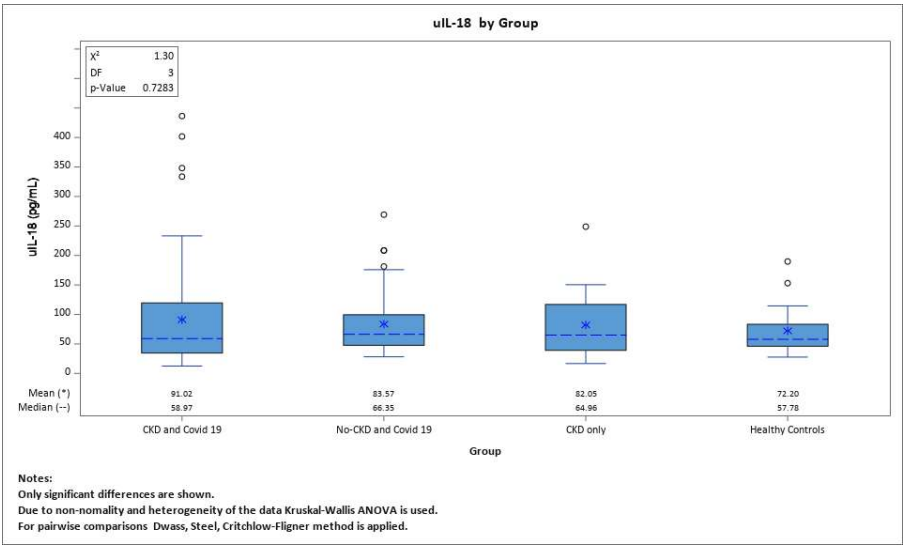
<u>Фигура 8</u> Сравнение на стойностите на SAA по групи



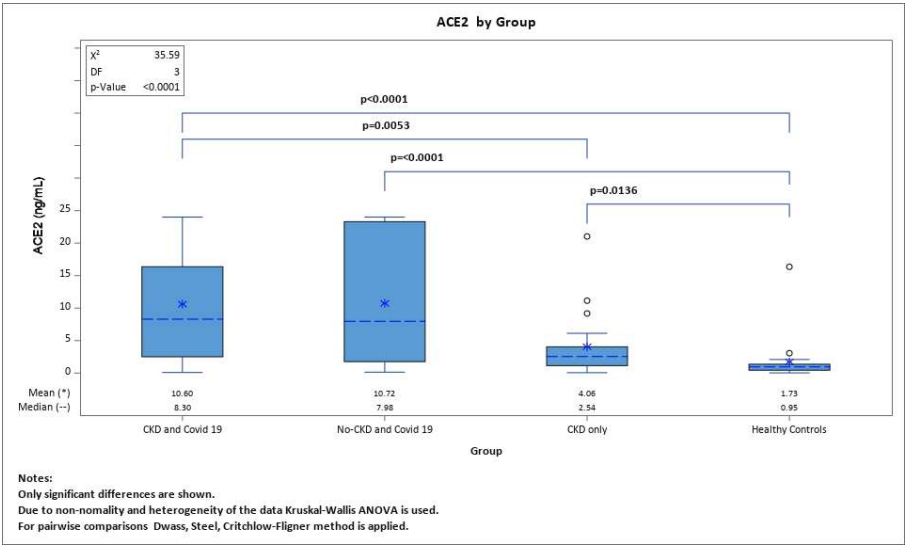
На **Фигура 9** са показани стойностите на IL-18, които са измерени в урина при междугруповото сравнение. Проведения анализ показва, че за нито една от групите стойностите не са имали сигнификантна разлика в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

На **Фигура 10** са показани стойностите на ACE2 ензима, които са измерени в серум при междугруповото сравнение като резултата показва сигнификантни промени в три от проведените 4 изследвания. Резултата е статистически значим при поотделното сравняване на всяка от групите с напълно здравите пациенти от Група 4.

<u>Фигура 9</u> Сравнение на стойностите на IL-18 по групи



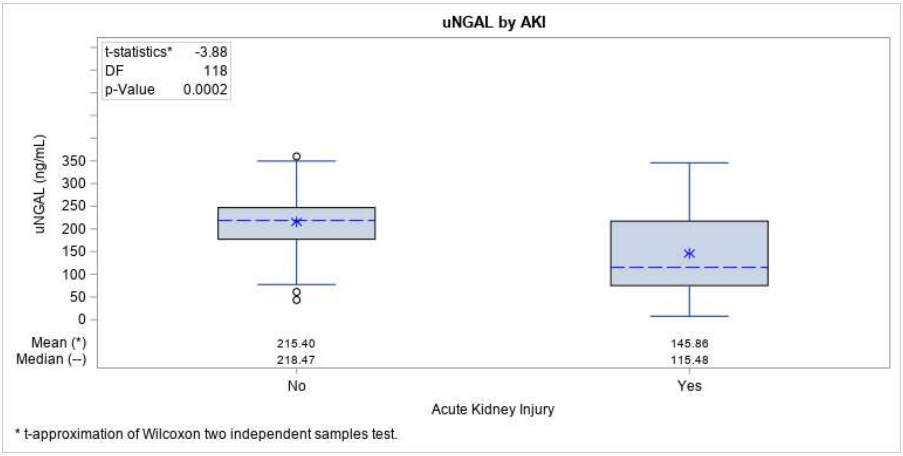
<u>Фигура 10</u> Сравнение на стойностите на ACE2 ензима по групи



Направи се анализ на корелациите между биомаркерите и честотата на ОБУ във всяка от четирите групи. Резултатите показаха, че нивата на IL-6 (p-value = 0,006), SAA (p-value = 0,02) и uKIM-1 (p-value = 0,03) са значително по-високи при тези пациенти, при които е доказано ОБУ, докато резултатите за uNGAL са значително по-ниски (p-values = 0,0002). За останалите два биомаркера – ACE2 и uIL-18 не се наблюдава значимост: ACE2 (p = 0,62) и uIL-18 (p = 0,38). Въпреки това се установи, че нито един от биомаркерите не е в състояние да предскаже ОБУ. Сравнение между групите е показано от **Фигури 11-16**.

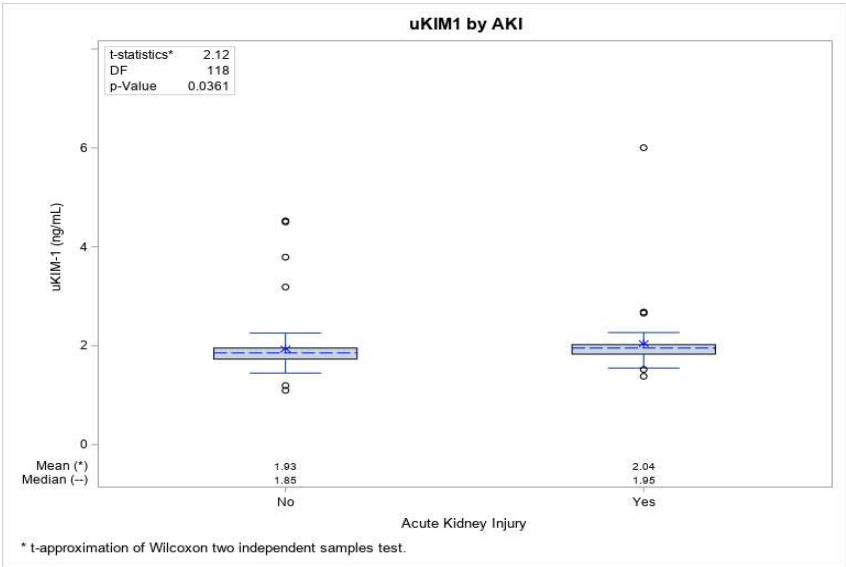
В последващите представени фигури е проведен анализ между всички 160 пациенти в кохортата като са разделени на 2 групи – пациенти с доказана ОБУ и такива, които нямат проява на остро влошаване на бъбречната функция. На **Фигура 11** е показано сравнение между двете групи при анализ на уринните стойности на NGAL, които се показаха сигнификантно по-високи при пациенти без ОБУ в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

<u>Фигура 11</u> Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – NGAL



На **Фигура 12** е показано сравнение между двете групи при анализ на уринните стойности на KIM-1, които се показаха сигнификантно по-високи при пациенти с ОБУ в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

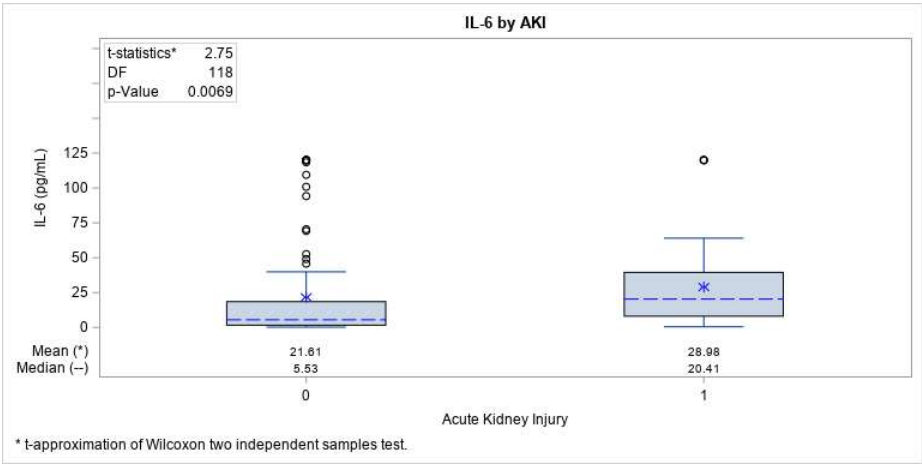
<u>Фигура 12</u> Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – KIM-1



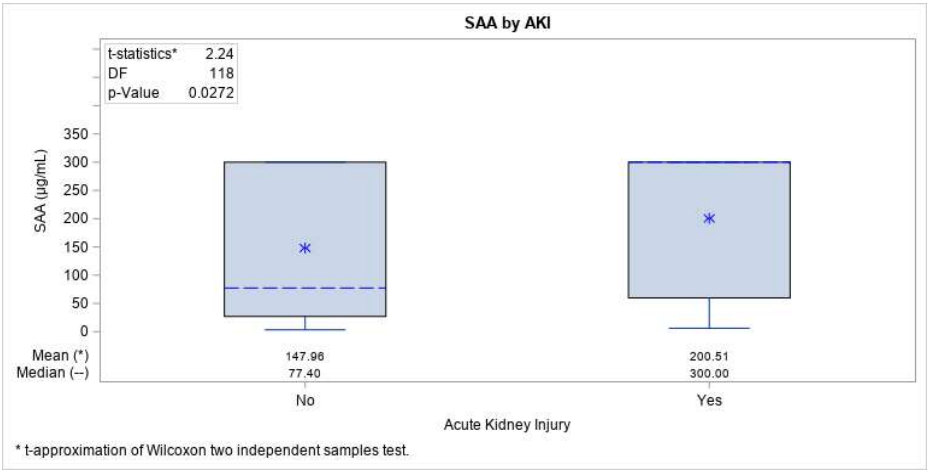
На **Фигура 13** е показано сравнение между двете групи при анализ на серумните стойности на IL-6, които се показаха сигнификантно по-високи при пациенти с ОБУ в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

На **Фигура 14** е показано сравнение между двете групи при анализ на серумните стойности на SAA, които се показаха сигнификантно по-високи при пациенти с ОБУ в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

<u>Фигура 13</u> Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – IL-6

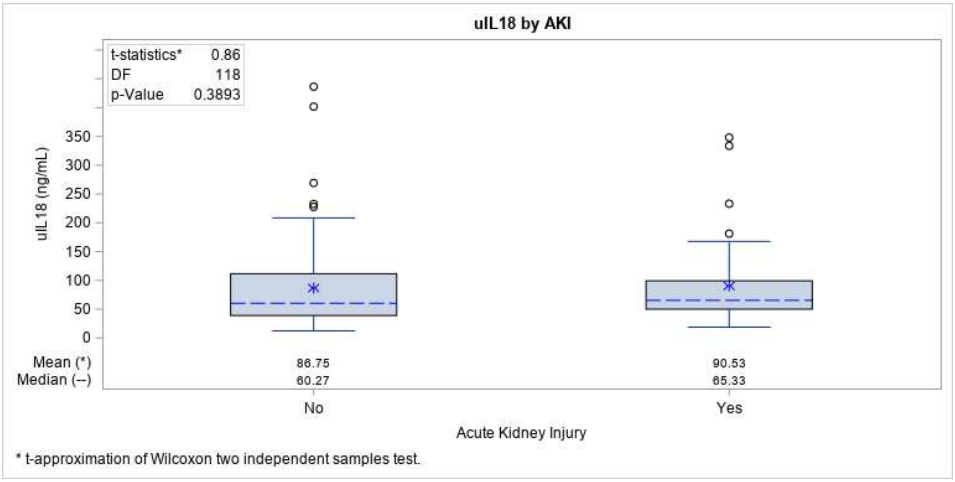


<u>Фигура 14</u> Сравнение на групите според стойностите на биомаерите и проявата на ОБУ – SAA



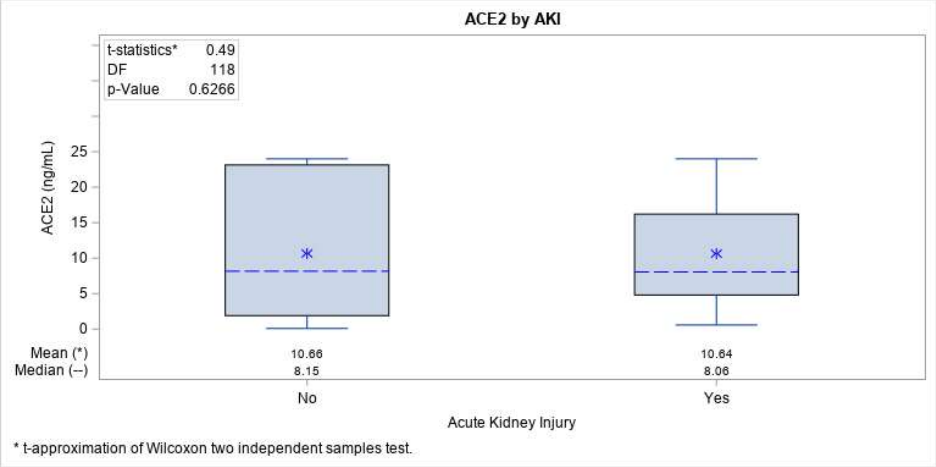
На **Фигура 15** е показано сравнение между двете групи при анализ на уринните стойности на IL-18, които не показаха сигнификантно различни стойности при нито една от двете групи в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

<u>Фигура 15</u> Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – IL-18



На **Фигура 16** е показано сравнение между двете групи при анализ на серумните стойности на ACE2 ензима, които не показаха сигнификантно различни стойности при нито една от двете групи в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

<u>Фигура 16</u> Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – ACE2



Допълнителни корелационни анализи бяха извършени между всичките шест биомаркера и лабораторните маркери за възпалението, както и със степента на засягане на белия дроб, което се доказа с провеждане на КТ на бял дроб. Този допълнителен анализ има за цел да се определи дали някой от тези критерии е свързан с фатален изход на заболяването и дали може да има допълнителна прогностична стойност, което да подпомогне диагностичния подход. Резултатите са показани в **Таблица 13**.

Всички пациенти с COVID-19 са получили компютърна томография на гръдния кош при постъпването си. Всеки резултат е бил оценен според степента на тежест (CT-Scan SCORE 0-5). За нашите пациенти резултатите варираха между 0-4 като са групирани в две категории: 0-2 резултата (n = 102) и 3-4 (n = 18).

<u>Таблица 13</u> Обща корелация за биомаркерите при положителните пациенти с COVID-19

Биомаркер	IL-6	ACE2	uKIM1	uNGAL	uIL-18	SAA
Leucocytes*	0.18728	0.09133	0.02098	-0.08798	0.06030	0.12048
p-values	0.04	0.32	0.82	0.33	0.51	0.01
Neutrophils*	0.35128	0.12588	0.03270	0.01535	0.19583	0.28128
p-values	<.0001	0.17	0.72	0.86	0.03	<.0001
CRP	0.01911	0.14288	0.23489	-0.03957	0.03148	0.24486
p-values	0.83	0.11	0.009	0.66	0.73	0.04
КТ **	0.32857	0.06040	0.11729	0.19401	0.29355	0.35843
p-values	0.0003	0.51	0.20	0.03	0.001	0.0002
ИБВ**	0.27175	-0.08364	0.11117	-0.10127	0.14656	0.27195
p-values	0.002	0.36	0.22	0.27	0.11	0.005
Смъртност**	0.27175	-0.08364	0.11117	-0.10127	0.14656	0.32457
p-values	0.002	0.36	0.22	0.27	0.11	0.001

Съкращения: КТ-сканиране, компютърна томография; CRP, С-реактивен протеин; u-урина; ACE2, ангиотензин конвертиращ ензим 2; KIM1, молекула-1 на бъбречното увреждане; NGAL, неутрофилен липокалин, свързан с желатиназата; SAA – серумен амилоид А

*** Pearson's coefficients.** Spearman's coefficients. *** Point bi-serial coefficients.**

Най-съществени корелационни резултати са установени при IL-6 и SAA, които корелират с броя на левкоцити и неутрофили, както и със степента на засягане на белия дроб (оценена чрез тежестта на заболяването според Severity Score, вентилацията и смъртността). Не се доказа съществена корелация за IL-6 единствено при с CRP, но от друга страна там се доказа сигнификантна корелация между CRP и SAA. Биомаркерите KIM-1 и CRP също показват значима корелация, докато IL-18 показа връзка при две от проведените сравнения - с броя на неутрофилите и степента на белодробно засягане.

Анализа показа, че високите изходни нива на IL-6 са свързани с последваща необходимост от изкуствена белодробна вентилация. Пациентите, при които е била вентилация, са имали IL-6 вариращи между 25 и 120 pg/ml (медиана 45,2 pg/ml) като в целият анализ има и два отклоняващи се резултата със стойности под 25 pg/mL. Сред всички пациентите със SARS-CoV-2 инфекция 27 са имали резултат за IL-6 >25 pg/ml и по-късно при 19 от тях е имало нужда от механична вентилация (70,4%). От тук се доказа още една статистическа връзка - всички тези пациенти не са преживели инфекцията със SARS-CoV-2 и са починали от напреднало засягане на белодробните структури в хода на пневмония. Нито един от тези пациенти не е имал анамнеза за сърдечно-съдов инцидент по време на престоя в интензивното отделение.

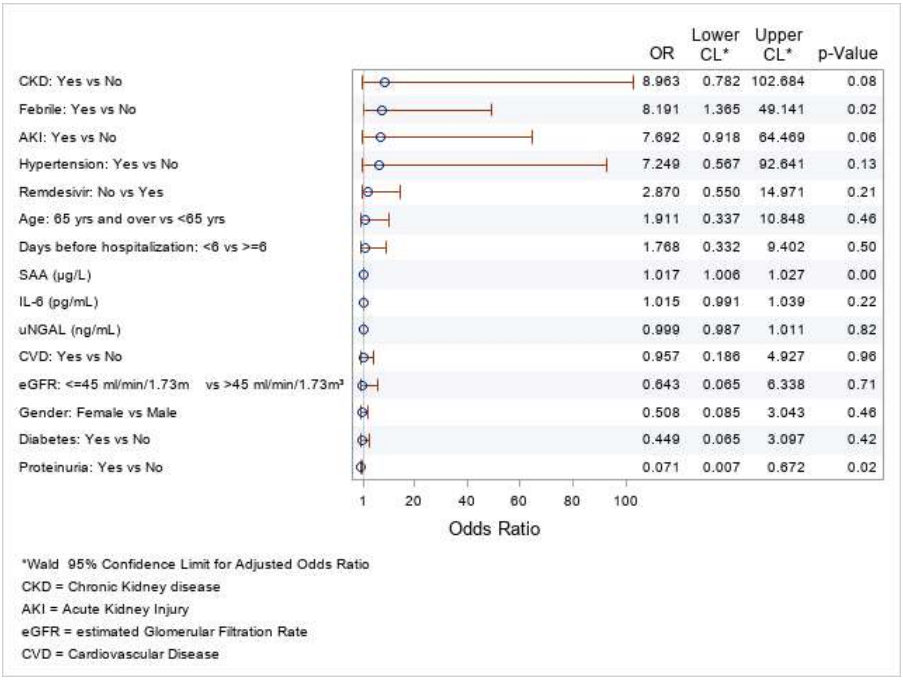
Проведен е подробен анализ на рисковите фактори, които е възможно да са довели до смърт при пациентите в условията на вирусната инфекция като е използван метода Odds Ratio. Включени са следните фактори в логистичния регресионен модел: пол, възраст, артериална хипертония, ХБЗ, ОБУ, лечение с Remdesivir, фебрилитет, захарен

диабет и протеинурия, CRP, както и установените статистически значими биомаркери – SAA, uNGAL, uKIM-1, IL-6. Логистичната регресия за рисковите фактори за смъртност показва, че статистически значими фактори са ОБУ, нивата на IL-6, SAA и това, че не са лекувани с Ремдесивир. ОБУ е отрицателен прогностичен фактор за инфекция с COVID-19, т.е. той е увеличава смъртността [OR = 5,246 (95% CI: 1,279-21,508); p = 0,02], както и нелекуването с Ремдесевир [OR = 4,319 (95% CI: 1,104-16,904); p = 0,04] и наличието на повишени нива на IL-6 [OR = 1,023 (95% CI: 1,002-1,045); p = 0,03].

Като много важен показател беше доказан SAA, който се показа като напълно сигурен прогностичен показател за изхода на заболяването. Всички пациенти, които са имали измерени стойности над 200 pg/ml са имали нужда от изкуствена белодробна вентилация и за съжаление починали в хода на своето болнично лечение. От всички 23-ма починали пациенти 82.6% (19/23) са имали нива отчетени като стойност >300 pg/ml. Всички SARS-CoV-2 положителни пациенти, които са преживяли инфекцията в хода на болничното си лечение имат установени стойности на SAA под 200 pg/ml.

Другите биомаркери (KIM-1 и NGAL), които са включени в модела, нямат информативна стойност за прогнозирането на протичането на заболяването. (Виж **Фигура 17**)

<u>Фигура 17</u> Съотношение на шансовете за рисковите фактори за смърт, свързана с COVID-19



*Wald 95% Confidence Limit for Adjusted Odds Ratio
CKD = Chronic Kidney disease
AKI = Acute Kidney Injury
eGFR = estimated Glomerular Filtration Rate
CVD = Cardiovascular Disease

Обсъждане

Рискови фактори за ОБУ и смъртност

В нашето проучване установихме, че във изследваната кохорта мъжкият пол, доказаната ОБУ и това, че не е провеждано лечение с Ремдесивир, са независими рискови фактори за смъртност, която е предизвикана от COVID-19. Що се отнася до риска от ОБУ, установихме, че наличието на симптоми, свързани с COVID-19 за повече от 6 дни преди постъпването в болница, наличието на ХБЗ и липсата на терапия с Ремдесивир са независими прогностични фактори за развитие на ОБУ след постъпване в болничното заведение за провеждане на лечение, което е свързано с вирусна инфекция причинена от COVID-19.

Установихме, че Ремдесивир е независим фактор срещу смъртност, свързана с COVID-19, както и за ОБУ в контекста на COVID-19. Това е противовирусно лекарство с доказано добър ефект при лечението на това заболяване. Проучването PINETREE описва, че сред нехоспитализирани пациенти с COVID-19, които са били с висок риск от прогресия на COVID-19, 3-дневен курс на лечение с Ремдесивир е има добър профил на безопасност и води до 87% по-нисък риск от хоспитализация или смърт в сравнение с плацебо групата участвала в това проучване (Gottlieb, и др., 2022, 386). Проучването DisCoVeRy обаче не съобщава за клинична полза от употребата на Ремдесивир, който е прилаган при пациенти, приети в болница за COVID-19, които са имали симптоми повече от 7 дни и са се нуждаели от кислородна терапия (Ader, и др.,

2022). В неотдавнашен мета-анализ се посочва, че Ремдесивир все още може да бъде ефективен за ранно клинично подобрение; намаляване на ранната смъртност и избягване на провеждане на лечение с кислород с висок дебит, както и инвазивна механична вентилация сред хоспитализираните пациенти с COVID-19, което на практика беше потвърдено и в този научен труд.

Множеството анализи показаха също, че ОБУ често съпътства развитието на вирусната инфекция. Същевременно установихме, че свързаната с COVID-19 смъртност е повлияна от ОБУ и това е един независим рисков фактор, които има влияние върху смъртността. Всъщност едно ключово проучване проведено от Ng J.H. и сътрудници ни показа, че в кохорта от 9657 пациенти приети с доказана COVID-19 инфекция, честотата на ОБУ е 38,4/1000 пациенти (Ng, и др., 2021). Честотата на вътреболничната смъртност сред пациентите без данни за ОБУ, с доказана ОБУ, при които не се налага диализа (стадий на ОБУ 1-3 според KDIGO) и при тези с ОБУ, при които се налага диализа, честотата е съответно 10,8/1000, 31,1/1000 и 37,5/1000. В описаното проучване е проведен допълнителен анализ, при който след коригиране за демографски данни, съпътстващи състояния и тежест на заболяването рискът от смърт остава по-висок сред лицата с ОБУ стадии 1-3 според KDIGO (коригиран HR, 3,4 (95% CI, 3,0-3,9) (Ng, и др., 2021). Според Alfano и сътрудници свързаната ОБУ с COVID-19 е също силно свързана с болнична смърт (съотношение на риска (HR) = 4,82; CI 95%, 1,36-17,08) в сравнение с пациентите, които са без данни за ОБУ (Alfano, и др., 2021, 25).

Поради това, че ОБУ е много разпространена проява сред хоспитализираните с COVID-19 пациенти им редица

анализи насочени към рисковите фактори довели до самото остро влошаване на бъбречната функция. Ето защо Jewell и сътрудници осъществяват подробен анализ на кохорта от 1248 хоспитализирани пациенти в Обединеното кралство с доказана COVID-19 инфекция, за да установят защо 487 от пациентите (39%) са имали ОБУ (51% стадий 1, 13% стадий 2 и 36% стадий 3 според KDIGO) (Jewell, et al., 2021). Що се отнася до рисковите фактори за ОБУ в нашето проучване, установихме, че Ремдесивир е бил значително свързан с намален риск от ОБУ при пациентите с COVID-19 (OR 3,73, CI 1,26-11,01; p = 0,01). Действително е доказано, че пациентите с доказана SARS-CoV-2 инфекция, които са лекувани със стероиди и Ремдесивир са с доказано намален риск от ОБУ. Това е подчертано като резултат от проведения анализ от Kuno и сътрудници (съответно 17,5% смъртност при пациенти с лечение с Ремдесивир срещу 23,4% за пациенти без такова лечение, p = 0,001) (Kuno, и др., 2021). В проведеното проучване от нас има особеност, че терапията с Ремдесивир е била прилагана по не при всички пациенти поради фактори, които не са били зависими от нас. Все пак това е проучване е проведено в реални условия и тъй като в определен момент в България има недостиг на Ремдесивир е решено той да се прилага само на най-сериозно засегнатите пациенти или при тези, които имат най-висок риск за по-тежкото протичане (пол, възраст, придружаващи заболявания като фактори).

От проведения анализ на получените резултати установихме, че наличието на симптоми, свързани с COVID-19, преди постъпването с давност повече от 6 дни е значителен рисков фактор за развитие на ОБУ (OR: 2,97, CI 0,98-8,99, p = 0,053). Diebold и сътрудници показват, че ОБУ се развива след средна продължителност от 9 дни

(интерквартилен диапазон (IQR) 5-12) след първите симптоми и медиана от 1 ден (IQR 0-5) след приемането в болницата (Diebold, Schaub, Landmann, Steiger, & Dickenmann, 2021).

В нашето проучване за пациенти с COVID-19 в България има няколко много важни точки. На първо място, колкото по-кратък е периодът със симптоми, свързани с COVID-19 преди постъпването, толкова по-малък е рискът от развитие на ОБУ. Второ - установихме, че терапията с Ремдесивир е в състояние да намали значително смъртността и честотата на ОБУ, които са свързани с COVID-19, които обикновено се проявяват след постъпване в болница. Това може да се обясни с факта, че в страна, в която процентът на ваксинация срещу COVID-19 е най-нисък в ЕС, пациентите предварително изграден имунитет и ранното прилагане на антивирусна терапия е ефикасно. На трето място установихме, че тъй като ОБУ е значително свързана проява със смъртността в резултат на COVID-19, то от изключителна важност е да се повлияе на факторите предразполагащи за ОБУ, като вниманието трябва да е насочено особено при тези пациенти, които вече имат доказано ХБЗ.

Приложение на RAAS-блокерна терапия (ARB/ACEi)

В това проучване установихме, че пациентите, заразени с COVID-19, които при постъпването си в спешното отделение вече са провеждали редовна терапия с ARB или ACEi, са имали същия ход на

заболяването според повечето показатели, както за тези, които не са провеждали тези терапии. Например честота на ОБУ, независимо дали са имали или не са имали установено ХБЗ няма промяна. Също така няма особено влияние при анализ на данни във връзка със смъртността като цяло, но терапията има и своят положителен аспект - пациентите с хипертония, лекувани с RAAS-блокер, са имали значително по-ниска смъртност и по-малка честота на постъпване в интензивно отделение в сравнение с хипертониците, които са приемали друг клас антихипертензивни медикаменти. Също така резултатите показаха по-малко приети пациенти в интензивно отделение, ако има прием на ARB/ACEi, макар че резултатът не е статистически значим.

При всички наши пациенти с COVID-19 ние запазихме терапията с инхибитори на RAAS, а и самата терапия е редовно приемана още преди постъпването. Резултатите, които ние получихме са съпоставени с 2 мета-анализа и получените данни са напълно сходни и подкрепящи основните световни схващания за терапията с блокери на RAAS: Kaur и сътрудници наскоро установиха, че блокерите на RAAS не са свързани с повишена смъртност при пациенти с COVID-19 и трябва да продължат да се прилагат при хипертоници (Kaur U, 2021) , а неотдавна Singh и научен колектив съобщиха, че употребата на ACEi/ARB не оказва значително влияние нито върху смъртността (OR = 1. 16 95% CI: 0,94-1,44, P = .15, I2 = 93,2%) нито тежест на протичането на заболяването (OR = 1,18, 95% CI: 0,94-1,48, P = .15, I2 = 91,1%) в

сравнение с направено с пациенти, които не приемат медикаменти от класа на ACEi/ARB в хода на COVID-19 инфекцията (Singh R, 2022).

Вече беше дискутирано, че при пациентите, заразени с COVID-19 наблюдаваме по-голяма вероятност за развитие на ОБУ след постъпване в болница и е независим рисков фактор за смъртност (Filev, и др., 2022). От нефрологична гледна точка е много важно да се проучи дали пациентите, лекувани с блокери на RAAS в хода на COVID-19 имат някаква полза или вреда от лечението с този клас антихипертензивни лекарства. В ранните етапи на пандемията с SARS-CoV-2 Oussalah и сътрудници установиха в кохорта от 149 пациенти с положителен тест за COVID-19, че 30% (44/149) са лекувани с ACEi/ARB и че употребата на тези медикаменти е независимо свързана с ОБУ в стадий ≥ 1 (OR, 3. 28, 95% CI: 2,17, I2 = 4,94) (Oussalah A, 2020). В систематичен преглед и мета-анализ през 2021 г. Lee установява, че употребата на блокада на RAAS е значително свързана с инцидента на ОБУ при хоспитализирани пациенти с COVID-19 (Lee SA, 2021). Нашето изследване е почти в същия размер като това на Oussalah, което е цитирано, но въпреки това установихме, че терапията с ACEi/ARB преди постъпването и поддържането на тази терапия след постъпването не оказва влияние върху изхода от SARS-CoV-2 инфекцията, включително не повишава риска от ОБУ.

В мета-анализ, включващ общо 1808 пациенти с артериална хипертония, диагностицирани с COVID-19

в 6 проучвания, Xue и сътрудници установяват, че лечението с ACEi/ARB лекарства има положителен ефект върху намаляването на стойностите на D-dimer и броя на хората с повишена температура; то обаче няма значителен ефект върху други лабораторни тестове (Xue Y, 2020). Всъщност в нашето проучване също наблюдавахме, че пациентите с COVID-19, които са били на терапия с блокада на RAAS преди и по време на хоспитализацията, са имали намален D-dimer. Ние също не наблюдавахме, че терапията с RAAS блокада няма значим ефект върху други лабораторни тестове при пациентите с COVID-19.

Специфични биомаркери от серум и урина

В нашето проучване потърсихме ранни биомаркери, които биха могли да предскажат ОБУ в хода на вирусна инфекция причинена от COVID-19. Уринният интерлевкин-18 (uIL-18), както и ACE2 ензима, който изследвахме от серум не показаха статистическа значимост, т.е. не показаха качества на предиктори, което вероятно се дължи и на бройката изследвани пациенти, както и на хетерогенността на кохортата. В неотдавнашен систематичен преглед на Qin и сътрудници беше оценена стойността на uIL-18 за прогнозиране на ОБУ. Резултатите показаха чувствителност и специфичност на uIL-18 за диагностициране на ОБУ съответно 0,64 (95% доверителен интервал (CI): 0,54-0,73) и 0,77 (95%CI: 0,71-0,83). В последствие е проведено разширено проучване, което са добавени пациенти на възраст под 18 години и анализът на подгрупите показва, че uIL-18 при педиатрични пациенти е

по-ефективен при прогнозиране на ОБУ, отколкото при възрастни (Qin, и др., 2022). Saygili и неговите сътрудници оценяват uIL-18 при 71 деца, при които има доказана COVID-19 инфекция, от които 12 са имали ОБУ. В сравнение със здравите контролни деца uIL-18 е значително повишен, въпреки това при само 4 от 12-те деца с доказано остро влошаване на бъбречната функция са имали повишени нива на uIL-18 (Saygili, и др., 2022).

От получените резултати единствено нивото на IL-6 е независимо свързано със смъртта. Неотдавнашен систематичен преглед и мета-анализ показа, че IL-6 значително увеличава риска от тежест на протичане на COVID-19 инфекцията (коригиран OR = 1,0284; 95% CI 1,0130-1,0441; p = 0,0003), което е пряко свързано със смъртността (aOR = 1,0076; 95% CI 1,0004-1,0148; p = 0,04. Коригирано съотношение на риска според Halim и колектив е (aHR) = 1,0036; 95% CI 1,0010-1,0061; p = 0,006) (Halim, Mirza, & Sari, 2022). Друг проведен систематичен преглед на 147 проучвания показва, че починалите пациенти с COVID-19 са имали 42,1 пъти по-високи средни концентрации на IL-6 в сравнение с оцелелите пациенти. Това именно показва за пореден път, че нивото на IL-6 е било значително повишено при починалите (MD: 42,11; p < 0,001; 95% CI: 36,86, 47,36) (Jafrin, Aziz, & Islam, 2022).

Действието на ACE2 ензима е да се противопоставя на това на системата ренин-ангиотензин-алдостерон. Рецепторът за клетъчно проникване на SARS-CoV-2 същевременно е ACE2. В проучването на Nath е доказано е, че бъбречната експресия на ACE2 е намалена при ОБУ, която е с исхемична увреда (Nath, и др., 2021). Установихме, че нивата на ACE2 в кръвта са значително по-високи при пациентите с COVID-19 в сравнение с пациентите без

установена COVID-19 инфекция, както и при напълно здравите доброволци. Освен това сред пациентите с ХБЗ нивата на ACE2 бяха значително по-високи в COVID-19 позитивната група в сравнение с COVID-19-негативните пациенти. Установените нива на ензима и изследването на пациентите с ОБУ не показаха статистическа зависимост, поради което ACE2 ензима не показа прогностична стойност.

В нашето проучване открихме, че uKIM1 при пациентите болни от COVID-19 е значително по-висок при тези, при които сме доказали ОБУ, в сравнение с всички останали в изследваната кохорта. Абсолютната разлика обаче е много малка при статистическото изследване (1,95 срещу 1,85 ng/mL p = 0,03), което може би се дължи на броя изследвани пациенти при провеждане на сравнение с други проучвания в същата област.

Концентрациите на неутрофил-желатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) в урината или плазмата могат да идентифицират пациенти с висок риск от ОБУ в клиничните изследвания и практиката, което е най-добре показано в научната работа Albert и научни сътрудници (Albert, и др., 2020). Неотдавнашния систематичен преглед показа, че NGAL изглежда има прогностична стойност независимо от възрастта - от новородено до 78 години. Нивата на NGAL могат точно да предскажат изхода и тежестта на ОБУ, възникваща при няколко различни болестни процеса, включително ОБУ, което е предизвикано от контрастна материя по време на сърдечна операция, остро отхвърляне на бъбречен трансплантат, при хронична сърдечна недостатъчност или при системно възпаление при критично болни пациенти, въпреки че значението на NGAL е много различно според различните

проучвания (Marakala, 2022). В нашето проучване установихме, че uNGAL при здрави контроли и при пациенти без COVID-19 е много сходен; той обаче е почти пет пъти по-висок от при тези пациенти, които са с доказана COVID-19 инфекция.

Сериозно внимание се отдели на SAA като маркер, който е способен да предскаже хода на вирусната инфекция предизвикана от SARS-CoV-2. В нашето проучване установихме, че нивата на SAA също имаха силна корелация с прогнозата за изхода от заболяването. Установи се, че всички пациенти, които са положителни за COVID-19 и са имали стойности на SAA над 200 pg/ml са имали фатален изход на заболяването като е важно да се подчертае, че от всички починали пациенти 82.6% (19/23 пациенти) са имали стойности > 300 pg/ml (p-value = 0.001). Същевременно всички пациенти със стойност на SAA < 200 pg/ml са с благополучен изход и са изписани от болничното заведение. Отново беше потвърдена силно изразената корелация между стойностите на CRP (p-value = 0.04), левкоцитите (p-value = 0.01) и неутрофилите (p-value = <.0001) със измерените стойности на SAA. Същевременно измерените стойности на специфичния биомаркер корелират силно, както с находката от КТ на бял дроб и гръден кош (p-value = 0.0002), така и със повишения риск от ИБВ (p-value = 0.005). Също така ние установихме, че има много ясно изразена корелация между SAA и IL-6 в серумна като последния от своя страна силно корелира със стойностите на левкоцитите и неутрофилите, както и със степента на засягане на белите дробове. Това на практика доказа, че използването на SAA, IL-6, CRP, стойностите на левкоцитите и неутрофилите може да създаде скор, който да има много добра прогностична стойност.

Изключително важен принос на нашето проучване е изследването на стойностите на SAA в контекста на ОБУ. До момента има няколко проведени проучвания, основно експериментални, като има няколко които са насочени към човешката популация и са основно към ХБЗ предизвикано от захарен диабет и установена диабетна нефропатия като са изследвани стойностите на SAA и са правени корелации с различни стойности на серумния креатинин (Robert J Anderberg, 2015). Същевременно до момента стойности на SAA в контекста на SARS-CoV-2, ХБЗ и ОБУ няма публикувани.

Ние установихме, че SAA е изключително надежден биомаркер в изследваната от нас кохорта за прогнозиране на проявата на ОБУ в хода на острата възпалителна активност. В изследваната от нас кохорта ОБУ е често срещано събитие, т.е. възниква при 31,6 % (38/120 пациенти), (p-value = 0,0006). При всички тези пациенти, при които има регистрирана остра бъбречна увреда стойностите измерени като медиана са 300 pg/ml, докато същите измерени при пациенти без регистрирана ОБУ са 77.40 pg/ml. По този начин доказахме, че SAA има много сериозна прогностична стойност в изследваната кохорта като ясно предсказва вероятният изход от заболяването, а същевременно корелира с вероятността за проява на ОБУ.

Резултатите на всички биомаркери бяха проучени дали и до колко са свързани с оценката на тежестта на засягането на белите дробове в хода на вирусната инфкеция като за целта се използва Chest-CT severity score (CTSS - 0-5 точки). Ние установихме, че пациентите с COVID-19 при постъпване с резултат CTSS -между три и четири точки са имали смъртност от 88,9 %, в сравнение със само 11.1 % при тези, при които CTSS е бил -между нула и две точки (p-

стойност < 0,0001). Освен това установихме, че някои биомаркери са значително свързани с оценката на CTSS и това са: SAA, uIL-18, uNGAL и серумния IL-6. В литературата не успяхме да открием други такива корелации. Herold и сътрудници съобщават, че максималното ниво на IL-6, последвано от нивото на CRP, е силно предсказващо за необходимостта от механична вентилация, но тези пациенти не са имали компютърна томография на гръдния кош при постъпването (Herold, et al., 2020). Следователно, като взехме предвид всички наши резултати, установихме, че пациентите, които са имали по-високи нива на IL-6 при постъпването и са имали КТ на гръдния кош с оценка на тежестта >3, са имали много по-голям риск от нужда от механична вентилация. Същата прогностична стойности има и SAA като всички резултати над 200 pg/ml са имали CTSS между 3 и 4 точки, която е довело до механична вентилация. За съжаление, всички механично вентилирани пациенти от нашата група починаха.

Заключение

Проведеното проучване е насочено изцяло към това SARS-CoV-2 да бъде по-добре разбран от нефрологична точка. Осъществените изследвания са фокусирани към това да се постигне по-добра диагностика, прогноза и лечение. Това проучване се осъществи по време на втората вълна, когато имаше много неизвестни относно начина на протичане на заболяването, кои точно рискови групи засяга, а самото лечение беше насочено основно към проследяване и контролиране на усложнения, които се проявяват в хода на заболяването.

В световен мащаб хроничното заболяване е прогресиращо състояние, което засяга >10% от населението на Земята, което възлиза на около 846 милиона души. Най-честото усложнение в хода на Ковид инфекция при пациенти, които имат подлежаща хронична бъбречна болест е острата бъбречна увреда. Именно поради тази причина нашето проучване е насочено към това първо да оценим влиянието на ХБЗ върху изследваната кохорта в хода на COVID-19 инфекция, а след това и честотата на ОБУ в контекста на съществуващо хронично бъбречно заболяване, след което ролята на ОБУ и ХБЗ като рискови фактори за смъртността.

От проведените анализи се установи, че ХБЗ само по себе си не е рисков фактор, който да влошава прогнозата относно хода на заболяването, но обратното може да бъде казано в пълна сила за пациентите, при които е настъпило остро влошаване на бъбречната функция, защото това е категорично фактор влошаващ прогнозата за крайният изход от заболяването. Следователно е необходимо при провеждането на лечението да се осъществява добро

проследяване на бъбречната функция и да се намалят рисковите фактори, които могат да доведат до ОБУ. Важно е да се отбележи, че тук има ключова роля и протокола, по който се е провежда лечението.

Биомаркерите са много важни за медицината като цяло и те са част от нашето професионално ежедневие. Всъщност са много важна част от лечебно-диагностичния процес, защото проследяването им показва въздействието върху организма. В много проучвания, в които се използват биомаркери не се доказва ми пълния информативен потенциал поради неспазване на определени правила, чрез които се съобразяват определени променливи, които повлияват на резултатите, което е и причина понякога за разнородни резултати. Именно поради тази причина в конкретното проучване всеки един от избраните биомаркери имаше предварително обследване и планиране с цел получаване на максимално много информация, която същевременно е достатъчно информативна и с високо качество. Най-общо казано, всеки един от биомаркерите има роля на прогнозен показател, който се използва за определяне не тежестта на клиничното протичане на заболяването и неговия изход.

Използвайки този модел, ние установихме категорична връзка на два от биомаркерите с хода и тежестта на заболяването, както и с вероятността за проява на различни усложнения, а именно SAA и IL-6. Основното предимство, което се получава от направеното изследване, е че към проведените стандартни лабораторни и образни изследвания могат да бъдат добавени SAA и IL-6. Това в крайна сметка ще даде по-точна прогноза за хода на заболяването и може да даде мотив за интерференции в терапевтичните протоколи.

Необходимо е да се отбележи, че проучването е направено в условията на заразени пациенти основно с вариант делта, който имаше изключително тежък ход на протичане при голяма част от пациентите, което бе съпроводено и от висока смъртност. Към момента на публикация на този труд хода на протичане е значително по-лек и в голяма степен с много по-малък леталитет сред пациентите независимо от възрастовите групи. Въпреки това тази научна работа има своето място в нашите познания за COVID-19 поради факта, че вирусът вероятно ще остане част от нашето ежедневие и никой от нас не може да е сигурен дали ще се проява сезонно или ще има нова мутация, която ще доведе до нови тежко протичащи клинични картини.

Днес познанието ни е много по-задълбочено и многопластово. Надаваме се, че сме по-подготвени в сравнение с първите етапи на пандемията, но микросветът е възможно да крие нови изненади поради, което трябва винаги да се стараем да бъдем една стъпка пред причинителя на инфекцията и да продължим да развиваме нашите познания.

Изводи

1. Лабораторните резултати показа категорични разлики между отделните групи.
2. Придружаващите заболявания са утежняващ фактор в хода на заболяването (АХ, ССЗ, ЗД, Обезитет) но се установи, че и възрастта и мъжкият пол също са предиктори за по-тежко протичане на Covid-19.
3. ХБЗ не допринася за по-тежкото протичане на covid-19 като самостоятелен фактор, но е предпоставка за възникване на ОБУ, което е основен фактор при оценката за смъртност на пациентите с Covid-19.
4. След проведения анализ се установи, че факторите за обу са – ХБЗ (GFP < 45 ml/min/1.73m2), симптоми ≥ 6 дни и липса на специфично лечение по протокол.
5. Рискови фактори за смъртност са – ОБУ, мъжки пол и липса на специфично лечение по протокол.
6. RAAS-блокерите имат категорична полза при пациенти с Covid-19 .
7. След проведения анализ на биомаркерите се установи, че KIM-1 и категорична стойност при оценка на ОБУ, а IL-6 и SAA имат много силна прогностична стойност при оценка на пациентите за ОБУ, степен на увреда на белодробния паренхим и смъртността.
8. Към стандартните лабораторни пакети може да бъде добавено изследването на IL-6 и SAA, което ще донесе по-висока информативна стойност.

Препоръки

1. Необходимо е да се проведе насочено търсене за ОБУ като целта е превенцията на този сериозен рисков фактор за фаталното протичане на инфекцията.

2. При Covid-19 е необходимо е да се изследват стойностите на Il-6 и SAA като маркери с прогностична стойности по отношение на засягането на белодробния паренхим, честотата на ОБУ и смъртността в хода на острия възпалителен процес.

3. Необходимо е да се продължи изследването на различни биомаркери, защото те носят информативна стойност. Трябва да се открие най-доброто приложение в практиката, както и правилният момент за използване.

Приноси

1. Първото проучване в България, с фокус върху бъбречната функция като рисков фактор за протичването на COVID-19.

2. Потвърждаване на значението на специфичните биомаркери и информативната стойност, която носят за протичането на заболяването.

3. Единственото изследване на RAAS-блокерният ефект в хода на инфекция с COVID-19, при която е изследвана изцяло от бяла раса.

4. Проучването е проведено при строги критерии за подбор на пациентите с цел постигане на максимално точни резултати.

5. Проучването е без външна модификация на популацията, т.е. без ваксинация на пациентите за COVID-19. Резултатите са изцяло нативни.

Публикации свързани с докторантурата

- Filev, R.; Rostaing, L.; Lyubomirova, M.; Bogov, B.; Kalinov, K.; Svinarov, D. COVID-19 Infection in Chronic Kidney Disease Patients in Bulgaria: Risk Factors for Death and Acute Kidney Injury. J. Pers. Med. 2022, 12, 1676

- Filev, Rumen MDa,b; Rostaing, Lionel MD, PhDc,d,*; Lyubomirova, Mila MD, PhDa,b.Bogov, Boris MD, PhDa,b; Kalinov, Krassimir PhDe; Svinarov, Dobrin MD, PhDb,f. Renin-angiotensin-aldosterone system blockers in Bulgarian COVID-19 patients with or without chronic kidney disease. Medicine 101(48):p e31988, December 02, 2022.

- Filev, Rumen MDa,b; Rostaing, Lionel MD, PhDc,d,*; Lyubomirova, Mila MD, PhDa,b.Bogov, Boris MD, PhDa,b; Kalinov, Krassimir PhDe; Svinarov, Dobrin MD, PhDb,f. j.Hristova; Serum and urinary biomarkers in COVID-19 patients with or Without Baseline chronic kindey disease; J. Pers. Med. 2023, 13, 382

- Р. Филев, М. Любомирова, Б. Богов, Т. Томов. Клинико-лабораторни маркери за прогноза при известна бъбречна увреда при пациенти с COVID-19. Нефрология, диализа и трансплантация, Брой 3, 2021 година (36-37 стр.)

- Filev, Rumen MDa,b; Rostaing, Lionel MD, PhDc,d,*; Lyubomirova, Mila MD, PhDa,b.Bogov, Boris MD, PhDa,b; Kalinov, Krassimir PhDe; Svinarov, Dobrin MD, PhDb,f. j.Hristova; SERUM AMYLOID A AS PROGNOSTIC MARKER FOR CKD AND NON-CKD COVID-19 PATIENTS ADMITTED TO THE EMERGENCY ROOM, Nephrology Dialysis Transplantation, Volume 38, Issue Supplement_1, June 2023, gfad063d_3750

- Filev, Rumen MDa,b; Rostaing, Lionel MD, PhDc,d,*; Lyubomirova, Mila MD, PhDa,b.Bogov, Boris MD, PhDa,b; Kalinov, Krassimir PhDe; Svinarov, Dobrin MD, PhDb,f. j.Hristova; WCN23-0183 ACUTE KINDEY INJURY OVER EXISTING CHRONIC KIDNEY DISEASE IN PATIENTS WITH SARS-CoV-2 INFECTION,, Kidney International Reports, Elsevier; March 2023

IMPACT FACTOR:

- Journal of Personal Medicine (MDPI) – *3.508*

- Medicine Baltimore – *1.807*

- Nephrology, dialysis and transplantation (NDT) – *7.186*

- Kidney Reports (ISN) – *6.234*

Участия

Постери:

1. СРАВНЕНИЕ НА ЛАБОРАТОРНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС SARS-COV-2 И ХРОНИЧНО БЪБРЕЧНО ЗАБОЛЯВАНЕ
Участие на националния конгрес по нефрология 2022 - I място

2. Acute kidney injury over existing chronic kidney disease in patients with SARS-CoV-2 infection
Участие на световния конкрес по нефрология 2023 - Банкок, Тайланд

3. Serum Amyloid A as prognostic marker for CKD and non-CKD patients with Covid-19 in the Emergency Room
Участие на европейския конгрес по нефрология 2023 - Милано, Италия

Проекти:

1. Грант 2022 кум МУ София - одобрение на проекта и финансиране – Договор №182/14.06.2022