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

Д-р Румен Стефанов Филев, ас.

Медицински университет София

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

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.

Съдържание на дисертацията

Съкращения 5
Съкращения на български език: 5
Съкращения на английски език: 6
Таблици 7
Графики 7
Фигури 8
Увод 9
Литературен обзор 18
1. SARS-CoV-2 18
- Произход и еволюция 18
- Наименование на вируса 21
- Структура на вируса 22
- Симптоми на вируса 25
- Начин на разпространение 26
- Рискови фактори, които водят до вирусната патогенеза 27
- ACE2 рецептора и ACE2 ензимите 28
- Специфични вирусни протеини и субединици 30
- Възпалителни цитокини при SARS-CoV-2 31
- Цитокинова буря 31

2. Хронично бъбречно заболяване 32
- Определение 33
- Епидемиология 33
- Резултати за ХБЗ в Европа 34

3. Бъбречно заболяване и Covid-19 34
- Имунологичен отговор на бъбречните структури 36
- Имунологичен отговор и ОБУ 37
- Имунологичен отговор и ХБЗ 37
- Обобщение на имунният отговор при ХБЗ и ОБН 38
- SARS-CoV-2 и измененията в бъбречните структури 38
- Патогенеза на бъбречната увреда при SARS-CoV-2 40

4. Лабораторни биомаркери 41
- Увод 41

- Какви биомаркери са изследвани? 42
- Уринен Interleukin – 18 (IL-18) 43
- Уринен Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) 44
- Уринен Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) 45
- Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2e) изследван от серум 47
- Interleukin-6 (IL-6) изследван от серум 47
- Serum amyloid A (SAA) изследван от серум 48

Цел, задачи, материали и методи на изследванията 50

1. Цел 50
2. Задачи 50
3. Материали и методи 51
    1. Клиничен материал 51
    2. Методи 55

Д. Допълнителни образни изследвания 59

Е. Статистически анализ на лабораторните резултати 59

Резултати 63

Демографски и общи данни за кохортата 63

Стандартна клинична лаборатория 65

Остра бъбречна недостатъчност и смъртност – рискови фактори 69

Терапия с ACEi или ARB в хода на инфекцията със SARS-CoV-2 74

Специфични биомаркери 80

Дискусия 96

Рискови фактори за смъртност и ОБУ 96

Приложение на RAAS-блокерна терапия (ARB/ACEi) 99

Специфични биомаркери от серум и урина 102

Изводи 110

Препоръки 111

Заключение 112

Приноси 114

Публикации 115

Библиография 117

Съкращения

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 Видове биомаркери 42
Таблица 2 Демографски анализ 53
Таблица 3 Стойности на бъбречната функция при всички групи 54
Таблица 4 Основни демографски данни за изследваната популация 64
Таблица 5 Сравнение на изходните данни между двете групи според биологичните параметри 65
Таблица 6 Сравнение на лабораторни резултати при Група 1 и Група 2 – при хоспитализация и в последствие при провеждане на контроли 68
Таблица 7 Логистичен регресионен модел за рискови фактори за смъртност. 70
Таблица 8 Рискови фактори за смъртност: Съотношение на шансовете 71
Таблица 9 Логистичен регресионен модел за остро бъбречно увреждане (ОБУ) 72
Таблица 10 Логистичен регресионен модел: Odds ratios остра бъбречна увреда (ОБУ) 73
Таблица 11 Демографски и други базови данни 75
Таблица 12 Влияние на използването на ACEI или ARB върху смъртността и ОБУ 76
Таблица 13 Пациенти с ARB/ACEI срещу пациенти без ARB/ACEI терапия 78
Таблица 14 Логистичен регресионен модел: Odds Ratios (Зависимост: Смъртност) 78
Таблица 15 Анализ на популацията 81
Таблица 16 Биомаркери по групи по стойности на медиана (диапазони). 82
Таблица 17 Сравняване на биомаркерите във всяка от подгрупите 84
Таблица 18 Обща корелация за биомаркерите при положителните пациенти с COVID-19 93

Графики

Графика 1 Съпоставяне според пол 54
Графика 2 Съпоставяне според бъбрената функция 55

Фигури

Фигура 1 Структура на вируса на SARS-CoV-2 23
Фигура 2 Логистична регресия за смъртност 71
Фигура 3 Odds ratio за остра бъбречна увреда (ОБУ) 73
Фигура 4 Съотношение на вероятността за смърт според определени показатели 79
Фигура 5 Сравняване на eGFR по групи 81
Фигура 6 Сравнение на стойностите на uNGAL по групи 85
Фигура 7 Сравнение на стойностите на uKIM-1 по групи 86
Фигура 8 Сравнение на стойностите на IL-6 по групи 86
Фигура 9 Сравнение на стойностите на IL-6 по групи 87
Фигура 10 Сравнение на стойностите на uIL-18 по групи 88
Фигура 11 Сравнение на стойностите на ACE2 ензима по групи 88
Фигура 12 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – NGAL 89
Фигура 13 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – KIM-1 90
Фигура 14 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – IL-6 90
Фигура 15 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – SAA. 91
Фигура 16 Сравнение на групите за стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУІ - L-18. 91
Фигура 17 Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – ACE2. 92
Фигура 18 Съотношение на шансовете за рисковите фактори за смърт, свързана с COVID-19 95

Увод

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. Въпреки това възникнаха разнопосочни публикации свързани с ролята на ACE2 ензима и взаимодействието с групата на ACEI/ARB – едни в полза на прилагане на терапията, а други против. В крайна сметка медицинското общество се изказа в полза на терапевтичния подход с приложението на ACEI/ARB, защото освен безспорния си антихипертензивен ефект, вероятното повишаване на нивата на ACE2 ензима в серума допринасят за по-голямо свързване на вирусните частици с разтворимата форма в серума, а от там това вероятно може да допринася и за по-лекото протичане на инфекцията. Не бива да пропускаме и факта, че в човешкото тяло има няколко органа, в които има най-голямо разпространение на рецептори на ACE2 ензима- бъбрека, сърцето, а също така е разпространен по чревния епител, където функционира като ко-рецептор за реабсорбцията на аминокиселините от чревно съдържимото. Всичко това показва, че бъбрекът може да има ключова роля за протичането на инфекцията.

От изключително значение остава пряката връзка между вирусната инфекция със SARS-CoV-2 и остро влошената бъбречна функция, което води до лоша прогноза за пациентите. Преди да погледнем и към другите фактори, които могат да доведат до вторично влошаване на бъбречната функция е необходимо да се отбележе, че има редица проучвания доказващи, че вирусът може да увреди бъбречната функция първично. Установи се, че безспорно подоцитите и клетките на проксималните тубули функционират като клетки гостоприемници на вируса. В подкрепа на това, освен проведените патоморфологични изследвания, говорят и параклиничните такива – до около ½ от пациентите с Ковид-19 и със засягане на бъбречната функция имат протеинурия. При пациентите с установена подобна патомофологична картина са имали остра бъбречна увреда в период от около 7 дена след доказването на инфекцията, което само по себе си показва, че вируса може да оказва влияние върху бъбречната функция. Това е още по важно при пациенти, които вече имат подлежащо хронично бъбречно заболяване, защото това би влошило прогнозата за преживяемост и би довело до по-

бърза прогресия на съществуващото ХБЗ до терминална бъбречна недостатъчност с необходимост от започване на бъбречна заместителна терапия.

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.

От гледна точка на изследователския подход бе крайно необходимо да бъдат обсъдени множеството аспекти на заболяването, не само изолираното влияние на болестния процес върху бъбрека като орган. Следователно бе необходимо подхода да бъде мултидисциплинарен и трябваше да бъдат разгледани няколко гледни точки:

- **Инфекциозна гледна точка** – заразата като основна заплаха за общото благосъстояние на държавата, начин на възникване и влияние на организма като цяло.

- **Клинично-лабораторно** – анализ на параклиниката и обсъждане на взаимовръзката между получените лабораторни резултати и клиничното състояние на дадения пациент.

- **Гледна точка на образната диагностика** – анализ на конкретното засягане на белодробния паренхим в контекста на тежестта на инфекцията.

- **Гледна точка на клиничния нефролог** – влиянието на вирусната функция върху бъбречната функция, както относно прогнозата за хода на заболяването, което може да бъде в контекста на хронична бъбречна болест.

В хода на обмисляне на подхода за създаване изследователския модел се забеляза, че в световното неврологичната общност започна широко обсъждане на влиянието на вируса и важността от неговото по-добро разбиране, което доведе и до генериране на нови идеи и предложения. Подходът за откриване и доказване на патомеханизма в световен мащаб бе разнообразен – от провеждане на единствено стандартни лабораторни изследвания и проследяване на пациентите, до провеждане на пукнционни бъбречни биопсии. Всички резултати загатват ключовата роля на бъбрека и неговите рецептори.

От проведените проучвания до момента се установи като краен резултат категорично очаквано: при протичане на заболяването има няколко ключови фактора, на които трябва да се отдаде важност и имат значение:

1. Хронично бъбречно заболяване

Бъбречната функция е жизнено важна за нормалното функциониране на човешкия организъм. В световен мащаб все повече хора, които страдат от хронично бъбречно заболяване. Това е ключов момент при определяне на прогнозата за един пациент особено при инфекция с Ковид-19, защото острата бъбречна увредена и подлежащата хроничната бъбречна болест са в тясна връзка и могат лесно да се потенциират взаимно – и двете причиняват спад в бъбречната функция, причиняват протеинурия, влияят на хемодинамиката и т.н. Съществува силна връзка между хроничното бъбречно заболяване и повишения риск от сърдечно-съдови инциденти, което е един от факторите за фаталния изход при някои от тежко протичащите случаи при пациенти с Covid-19. Адекватният хемодинамичен контрол и медикаментозно лечение, със съобразени дозови режими при медикаменти имащи нефротоксични ефекти, са фактори от решаващо значение за бъбречната функция и преживяемостта на пациент, които се лекува с една комплексна и по някога дори агресивна полимедикаментозна терапия.

2. Коморбидност (освен ХБЗ)

Коморбидността често е ключът към „Кутията на Пандора“. Придружаващите фактори са винаги сериозен момент при протичането на различните заболявания. При Ковид-19 инфекцията се оказва, че ситуацията въобще не е по-различна и именно пациентите с придружаващи заболявания като захарен диабет, артериална хипертония, както и с данни за сърдечно съдови заболявания са със значително по-висок риск за по-тежко протичане на заболяването. Наднорменото тегло е фактор, който заедно с някои демографски характеристика се показа като заболяване, което води до песимистична прогноза.

3. Демографска характеристика

Определено се забелязват някои характеристики, които показахват, че могат да участват в модел за даване на предположение как ще протече вирусната инфекция. Такива със сигурност се показаха полът и възрастта.

Имайки предвид тези няколко характеристики, както и знаейки вече за особеностите на патофизиология механизъм е редно да се обмисли самият изследователски модел, който би се използва. В основата на всичко се поставиха няколкото изследователски хипотези около, които се структурира цяла научна работа. Поставените хипотези са следните:

- Дали по-ниското ниво на ACE2-ензима води до по-тежко протичане поради това, че голяма част вирусите остават несвързани, а това води до последващо по-голямо сдвояване и навлизане в клетките? Приемът на медикаменти от групата на ACEI/ARB подпомагат ли за това нивото на ACE2 ензима в разтворимата си форма да е с по-висока концентрация. Това допринася ли за по-лекото протичане на заболяването?
- Дали по време на инфекцията със SARS-CoV-2 може да се докаже, че вирусът навлизайки в клетъчните структури на бъбреците води до патологични промени, които да обяснят острото или прогресиращото хронично влошаване на бъбречната функция в хода на инфекцията?
- Дали може да се установи ясна и права пропорционална връзка между изследваните биологични маркери, стандартната лаборатория и хода на заболяването?

Установени бяха кои стандартни и специфични лабораторни маркери да бъдат използвани. От стандартната лаборатория бяха избрани следните:

- Creatinine, от които да се изследва гломерулната филтрация по формулата „златен стандарт“ CKD-EPI
- Urea
- D-Dimer и Fibrinogen
- От кръвната картина – ниво на хемоглобин, левкоцити, лимфоцити и ниво на тромбоцитите
- Ниво на общия белтък и албумин
- Ниво на CRP
- Ниво на Ferritin
- Изследване от урина за протеинурия, хематурия, левкоцитурия и албуминурия
- Проследяване на нивото на сатурацията Sp02 %

Необходимо е да се отбележе, че част от „новите“ биомаркери са избрани поради стойността, която носят при направените изследвания в световен мащаб. Но други „класически“ носят своята информативна стойност. Например:

- Левкоцитурия – изследва се с цел отхвърляне на активна уроинфекция, която би изкривила получените резултати.
- Изследване на насищането с кислород на кръвта – за да се определи дали резултатите могат да бъдат изкривени от системната исхемия поради напредналата дифузна увреда на белодробния паренхим

За специфични биомаркери бяха избрани такива, които носят максимална информация, както за това, че има налични възпалителни промени, но и такива, които да дадат информация за това, в кои бъбречни структури има промени. Вече беше описана хипотетичната връзка между протичането и тежестта на инфекция с нивото на ACE2-ензима в серума, поради което именно това бе първият избран маркер, който да бъде изследван при пациентите с доказа инфекция със SARS-CoV-2, след което да се съпостави нивото на ензима спрямо изхода на заболяването и лабораторните резултати.

За доказване дали вируса има пряко влияние върху самите бъбреци се избра лабораторно изследване на следните биомаркери от прясна урина- KIM-1, NGAL, IL-18. Всеки от тях носи различна информативна стойност и са избрани заради следните им качества:

- **KIM-1 (Kidney injury molecule – от прясна урина**

KIM-1 е отличен маркер в дадената ситуация за проследяване и изследване в урина. Открива се много рано, още преди появата на т.нар. цилиндри в урината, които се образуват от тубулната система при заболяване на пикочо-половата система. Не само е специфичен маркер, защото никой друг орган освен бъбрека не показва такава експресия. Този маркер е ключов, защото тази му експресия е неизмерима при нормално състояние и при нормално състояние на клетките на проксималните тубули. Всичко това показва негова стойност като информативен маркер за клетъчна увреда в тубулната система.

- **NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin)** от прясна урина

При този маркер се поставя въпросът за съотношение на серумния и плазмения NGAL, защото самият бъбрек не се явява основен източник. NGAL протеинът в

кръвообращението произхожда и от други органи, като например черният дроб и белите дробове, а също и от активирани неутрофили, макрофаги и други клетки на имунната система. Освен това всяко намаление на степента на гломерулна филтрация намалява екскрецията на NGAL с последващо повишение в системното кръвообращение при пациенти с хронична бъбречна увреда. Въпреки това този маркер остава незаменим от гледна точна на прогностичните очаквания за влиянието на вирусната инфекция върху бъбрека поради натрупване в бъбречните тубули и урината след нефротоксични и исхемични инциденти и винаги се представя като ранен, чувствителен и неинвазивен биомаркер за остро бъбречно увреждане.

- **IL-18 (Interleukin 18) от прясна урина**

Уринният IL-18 чувствително се повишава още преди да се покачи серумния креатинин при пациенти с остър респираторен дистрес синдром, които впоследствие развиват остра бъбречна увреда, което е характерно при SARS-CoV-2. Ранните стойности на IL-18 в урината корелират с тежестта на острата бъбречна увреда и дори със смъртността. Като цяло IL-18 се оказва по-специфичен за исхемично остро бъбречно увреждане и до голяма степен не се повлиява от наличие на хронично бъбречно увреждане или инфекция на уринарния тракт, което го прави изключително подходящ за дадените изследвания.

За определяне на NGAL, KIM-1, IL-18, IL-6, SAA, както и на ACE2-ензима се предвижда използването на ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) тип „сандвич“. Методът на изследване е на пробите е следния като се спазват следните стъпки:

- Пробите ще бъдат поетапно пипетирани в ямките, покрити със специфични моноклонални антитела.
- След период на инкубация, съгласно инструкциите на производителя, анализът ще се свърже с антитялото.
- Следва отмиване на несвързан неспецифичен материал и добавяне на второ биотинизирано (детектиращо) антитяло, като по този начин ще се формира „сандвич“ комплекс.
- Добавянето на маркиран със стрептавидин ензим, той се свързва с биотинизирано антитяло.

- Следващата стъпка е добавянето на субстрат, вследствие на което се получава синя оцветка, интензивността на която зависи от концентрацията на аналита в пробата.
- Развитието на реакцията се стопира и се отчита абсорбция, пропорционална на концентрацията на измервания аналит.

В световен мащаб сериозно се обсъди и изследва значимостта на възпалителния процес при SARS-CoV-2 и лабораторните показатели, които биха донесли информация. Поради факта, че нивото на левкоцитите и нивото на CRP не са най-специфичните показатели се прецени, че е необходимо допълнително изследване на още два по-специфични маркери показващи активния възпалителен процес:

- **IL-6 (Interleukin 6) в серум**

IL-6 има ключова роля при възпалението, имунитета и болестите. IL-6 е цитокин с плейотропна активност - той индуцира синтеза на протеини на острата фаза като CRP, серумен амилоид А, фибриноген и хепсидин в хепатоцитите, докато инхибира производството на албумин. IL-6, който се произвежда бързо и преходно в отговор на инфекции и тъканни увреждания, допринася за защитата на гостоприемника чрез стимулиране на реакциите на острата фаза, хематопоезата и имунните реакции. Въпреки че експресията му се контролира стриктно от транскрипционни и посттранскрипционни механизми, нерегулираният непрекъснат синтез на IL-6 играе патологична роля за хроничното възпаление и автоимунитета.

- **Serum amyloid A (SAA) в серум**

Протеините на серумния амилоид А (SAA) са семейство аполипопротеини, свързани с липопротеините с висока плътност (HDL) в плазмата. Различните изоформи на SAA се експресират конститутивно (конститутивни SAA) на различни нива или в отговор на възпалителни стимули (SAA в острата фаза). Тези протеини се произвеждат предимно от черния дроб. Серумният амилоид А (SAA) също е маркер на острата фаза на възпалението, който реагира бързо. Подобно на CRP, нивата на SAA в острата възпалителна фаза се повишават в рамките на часове получения стимул, като степента на повишаване може да бъде по-голяма от тази на CRP. Сравнително незначителни възпалителни стимули могат да доведат до реакции на SAA.

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.

Литературен обзор

1. SARS-CoV-2

- Произход и еволюция

В световен мащаб за последните две години се проведоха изключително много и обемни проучвания, които бяха пряко свързани със SARS-CoV-2 относно влиянието и последствията, които има, както върху организма като цяло, така и на отделни органи и системи. Специално място се отделени на преживяемостта на пациентите, които имат бъбречно заболяване поради получените данни за по-висока честота на проява на остра бъбречна увреда, което от своя страна се оказа рисков фактор за фатално развитие на болестта.

Първото научно описание на клиничната проява при пациент заразен със SARS-CoV-2 е публикувано в началото на 2020 година (WHO, www.who.int, 2020). Касае се за пациент живеещ в Китай, провинция Хубей, град Ухан, който е хоспитализиран около края на месец декември 2019 година с белодробни оплаквания и доказани изменения по типа на вирусната пневмония. Тогава е проведен генетичен анализ по типа NGS и е взета проба от гърлото, която е изследвана чрез метода RT-PCR като по този начин се доказа наличието на нов вирус (Zhu N, 2020), който по-късно на 7 януари 2020 година беше кръстен от WHO като nCOV-19 (WHO, www.who.int, 2020).

Първичните анализи свързани с нововъзникналата вирусна инфекция са в ситуация на вече започнало световно разпространение на вируса с лавинообразна скорост. Още на 13 януари 2020 година беше оповестено, че има случаи извън Китай и първата засегната държава беше Тайланд (WHO, www.who.int, 2020). До края на януари месец през същата година са оповестени случаи на заразени с вируса в още 6 държави (ECDC, 2020). До средата на март месец 2020 година COVID-19 вече е засегнал 117 държави, което означаваше, че почти всички континенти имат огнища на вирусна инфекция със SARS-CoV-2, което наложи СЗО да обяви преминаване от епидемична обстановка към пандемична (WHO, WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 disease, 2020). В онзи момент най-тежко засегнатите държави са Китай, Южна Корея, Иран, а в Европа – Италия (Worldometer, 2020). От този момент нататък се забеляза невероятен скок при броя на заразените като според СЗО заразени

през март месец 2020 бяха около 74,386 случая, а починалите в света като бройка бяха 7,503 пациента (Worldometer, www.worldometer.info, 2020). До средата на месец април или за време дори по-малко от месец вече отчетения брой на новозаразените в света е 1,349,660 души, но по-притеснителното е, че смъртността нарасна 10 пъти или с точност – 74,816 смъртни случая (WHO, www.who.int, 2020), което само загатна за това, което предстоеше в хода на епидемията.

С нарастващата заболеваемост се съсредоточиха усилията в това да бъде разбран по-добре вируса от епидемиологична гледна точка, а също така и от клинична такава, с което да се подобри лечението и проектирането на усложненията от вирусната инфекция, но за да се постигне това бе необходимо да се започне от това, което вече бе известно на науката.

Коронавирусът е познато още от 60-те години на миналия век като още през 1975 година е установен като семейство ***Coronaviridae*** (Cowley JA, 2000). Това семейство е съставено от най-големите РНК-вируси. Самото семейство се поделя на четири подгрупи (Woo PC, 2007):

- ***Deltacoronavirus*** – срещан при птиците
- ***Gammacoronavirus*** - срещан при птиците
- ***Alphacoronavirus*** – срещан при бозайниците
- ***Betacoronavirus*** – срещан при бозайниците

Последната група, тази на ***Betacoronavirus***, носи потенциала да води до зоонози и да заразява прилепи, камили и хора. Именно тази подгрупа в исторически план вече е довела до две епидемии –SARS (SARS-CoV) епидемия възникнала в Китай през 2002 година в провинция Гуангдонг, а едно десетилетие по-късно възниква MERS (MERS-CoV), който протича в Саудитска Арабия и обхваща Мала Азия. В първият случай при проследяване на епидемиологичната връзка се установява, че първоизточника на заразата са миещите мечки и хималайските палмови цивети, но много сходен генетично вирус е доказан още тогава при прилепите (Li W, 2005) (Woo PC L. S., 2006). Във вторият случай са определени като първоизточници на заразата камилите и отново прилепите (Raj VS, 2014).

Въпреки, че до сега има проведени и публикувани редица изследвания, които имат за цел да докажат първоизточника на заразата, не се установи категорично от където

точно е началото на инфекцията. От проведения генетичен анализа на SARS-CoV-2 се установи, че има 96% прилика с този, който е открит при прилепите (Shaila R, 2020). Именно поради тази причина беше посочено, че вероятното начално огнище е бил пазара за добитък и морска храна в Ухан, където именно се продават и прилепи (Guo YR, 2020). Те са естествен гостоприемник на коронавирусите, но вероятно поради мутация настъпила при някои от вирусите е настъпила еволюция в самите прилепи, което пък от своя страна е довело до заразяване на хората (Cui Jm Li F, 2019). Все пак, въпреки редицата открития и иновации не може със сигурност да се определи от къде точно е възникнал вируса.

За известен период от време произхода и еволюцията на заразата са не само научна, но и политическа тема. Проведени са редица изследвания, чрез които се отхвърлиха две от най-известните теории – първата е, че института по вирусология в Ухан не спазва протоколите за безопасност и че не е възможно вируса „случайно“ да е изнесен от лабораторията (Labroots, 2020), но бе подчертано, че вероятността за подобна причина за начало на епидемията е възможна. Втората и може би по-важната е, че се отхвърли човешката намеса в мутацията на гена на вируса (Liu S-L, 2020). Именно работейки над втората теория учените в световен мащаб и най-вече в Китай доказаха и други интересни факти за вируса, които спомогнаха за неговото по-добро разбиране. Оповестени бяха две следи, които спомагат за разбиране на произхода:

1. Естествена селекция в гостоприемник от животинският свят преди зоонозата

Открити и потвърдени са приликите (до 96%) между SARS-CoV-2 и вече наличните и известни SARS-CoV-видове намерени в различни видове прилепи, но при не всички. Анализиран беше гликопротеиновия „шип“, но се оказа, че повече видове прилепи има различия с човешкия, което лежи в основата на вече добре познатата теория за ACE2-рецепторите, които се свързват именно с този „шип“ (Lan J, 2020).

В последствие при изследване на открит SARS-CoV-2 в нелегално внесени Малайски панголини (застрашен вид, широко използван в китайската медицина) се установи, че при този вид животни гликопротеиновия „шип“ има такава структура, която проявява афинитет именно към човешките ACE2-рецептори (Lan J, 2020).

Не може към момента да се докаже дали има някаква връзка между двата животински вида, но е настъпила еволютивна промяна в генома на вируса чрез мутация, делеция или дори инсерция. Същевременно прилепите са доказан резервоар за гостоприемник за вируса предшественик, което със сигурност има пряка връзка с промяната в генома и последвалата пандемия (Yamada Y, 2009).

2. Естествена селекция в гостоприемник от човешкия вид с последваща зооноза

Както вече е отбелязано предшественик на вируса е навлязъл в човек вероятно от прилеп или панголин, след което е настъпила еволюция на вируса. Проучванията доказват вероятно полибазово разцепване и настъпила и инсерция на генома по време на предаването на заразата от човек на човек (Zhou P, 2020). Това даде ход на редица други проучвания, които бяха основани на теорията, че вируса е пребивавал в човешкия вид преди да достигне еволюционните промени довели до епидемията и зоонозата (Huang C, 2020).

Всичко това ни показва, че при вируса е протекла една тиха геномна еволюция. Самият глюкопротеин (CoV-2 S) намиращ се в вирусния „шип“ се е адаптирал към ACE-2 рецепторите на човешкия организъм, което е ключово за навлизането в клетките и в последствие за вътреклетъчно размножаване. Със сигурност и самият геном на вируса е пренареден и рекомбиниран, защото въпреки своята прилика с предшествениците от семейството на Coronaviridae се откриват ясни черти характерни само за SARS-CoV-2. На база на тази еволюция SARS-CoV-2 е по-съвършен и по-бързо размножаващ се вирус в сравнение с останалите от семейството на SARS-CoV, което води до по-голямо разпространение и по-голям леталитет при боледуващите (Zhang H, 2020).

- Наименование на вируса

На 7 януари 2020, след като вече е потвърдено, че се касае за вирусна инфекция с нов тип корона вирус е осъществен генетичен анализ на установените щамове, който показа близка връзка с вече известния SARS. Само около седмица по-късно световната организация за споделяща информация за подобен тип респираторни инфекции (GISAID) оповести първото наименование – 2019 *novel coronavirus* или *2019-nCoV*, което

е възприето и от WHO. С рязко покачващите се бройки на 11 февруари 2020 се състоя извънредно заседание на WHO, където е прието официалните наименования на вируса и на заболяването (Guo YR, 2020) (WHO, WHO, 2021):

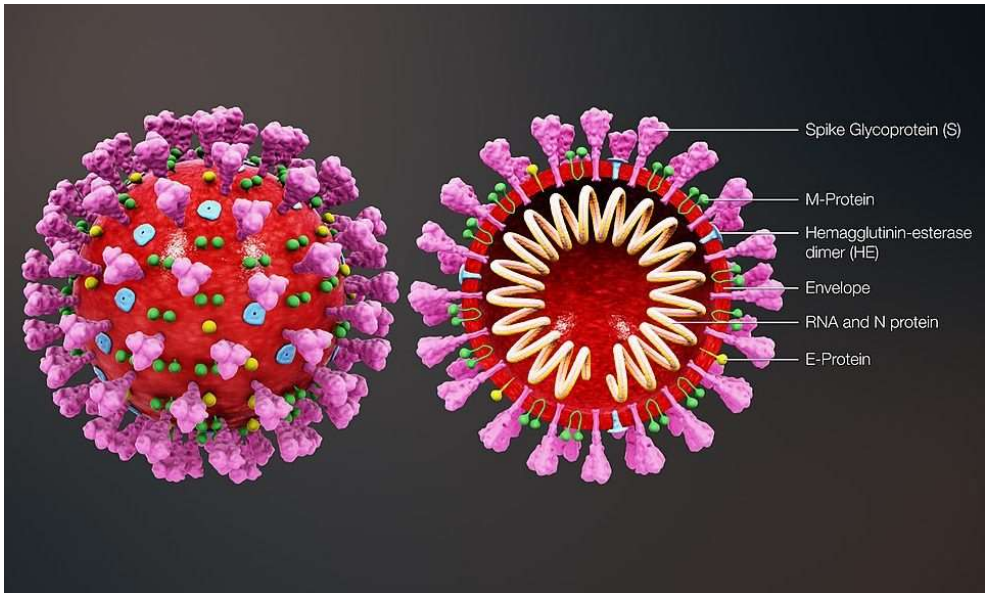
- **Заболяване** – COVID-19, което е съставено от ***„Co“*** за корона ***(corona)***, ***„Vi”*** за вирус ***(virus)***, а ***„d”*** за думата болест ***(disease)***, а ***19*** отразяваше годината на повявата на заболяването.
  Цялото наименование: ***Coronavirus disease 2019***
- **Вирус** – SARS-CoV-2
  Цялото наименование: ***Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2***

От 11 март 2020 година WHO обяви инфекцията за пандемична.

- Структура на вируса

Генетичният материал на SARS-CoV-2 действа като инфекциозен агент, съдържащ 5' метилова шапка и 3'-полиаденилна киселинна опашка. SARS-CoV-2 има обща геномна последователност от 29 811 нуклеотида, включваща 8 903 5 482, 5 852 и 9 574 азотни базови двойки, които са съответно аденозин, цитозин, гуанин и тимин (Sah R, 2020). Структурата на SARS-CoV-2 е съставена от различни структурни протеини, включително S гликопротеин намиращ се в т.нар. „шип“, мембранен протеин (M), протеин на обвивката (E) и ядрен протеин (NC). Оформеният като стик за голф S протеин е гъсто опакован M гликопротеини, които подпомагат прикрепването или сливането на вируса с клетките-гостоприемници (Wrapp D, 2020). Пентамерният малък интегрален протеин E има структурна роля и участва в патогенезата на вируса . Мембранният белтък M от своя страна се свързва с образуването на матрици. Протеинът в ядрото (NC) помага за капсулирането на генома, синтеза на протеини и РНК. Всички тези структурни протеини (S, M, E и NC) на SARS-CoV-2 могат да действат като антиген спрямо човешките клетки и стимулират производството на антитела като по този начин увеличат имунния отговор на Т-клетките (Shang W, 2020).

Фигура 1 Структура на вируса на SARS-CoV-2



Вече бе отбелязано, че вируса, който предизвиква заразяване при хората принадлежи към бетакоронавирусната подгрупа. Самата тя се подразделя на още 4 типа – A, B, C и D като разликите се основават на подредбата на аминокиселините. Въз основа на филогенетичния анализ на сто и шестдесет генома на SARS CoV-2 в световен мащаб се установи, че най-вече се срещата A, B и C. Сред тях вариант A прилича на коронавирусите срещани при на прилепите. Варианти A и C са открити в европейските и американските страни, както и геном B в страните от Източна Азия. Точно описания вариант A има съвпадаемост от 96.2% с установения тип при хората (Zhou P, 2020).

- *Филогенетичен анализ на гликопротеиновият ген на повърхностният „шип“ (S)*

Това е голям гликопротеин с маса около 180 kDa. Подразделя се на две поединици – S1 и S2. Свързващата област или т.нар. RBD (Receptor Binding Domain) е мястото, на което може да се осъществи свързване с ACE2 рецептора (Li F, 2005). При провеждане на компютърна симулация за структурата на S-протеина и при сравняването на неговата структура при SARS-CoV-2 и SARS-CoV е установена прилика от 77-80% (Xu Z, 2020) (Chan JF-W, 2020). Много е вероятно обаче тропизмът, който проявява вируса да се дължи именно на мутация в S-протеинът, което да е довело до покачване на вирулентността. Все пак има някои сериозни разлики между структурата на S-протеина при SARS-CoV-2 и SARS-CoV. При първият е доказано, че се съдържат някои остатъци от аминокиселини като F486, N501, Q492 и L455, които при по-обстойно изследване

показват, че увеличават взаимодействието между вируса и човешкия ACE2 рецептор (Ortega JT, 2020).

- *Филогенетичен анализ на гена на протеина на нуклеокапсида (NC)*

NC е водещият вирусен протеин в генома на SARS-CoV-2 и има ключова роля при вирусната репликация. Още повече, че нуклеокапсида действа и като „палто“ за вируса и има функцията да го предпазва от неблагоприятните влияния на околната среда. Същевременно има им имуногенетични функции, което е и причина да се разглежда като вариант, чрез който може да се създаде ефективна ваксина (Kandeel M, 2019).

Молекулната му маса е 50 kDa. Съдържа цели 422 аминокиселини. Направена е цялата геномна последователност на NC протеините и филогенетичната класификация на SARS-CoV-2 и други коронавируси въз основа на произхода на нуклеопротеиновия протеин. Структурата на NC белтъка на SARS-CoV-2 е подобна на последователността на коронавируса на прилепите и коронавирусите на панголините. Слабо сходство обаче е установено при коронавирусите на камилите, кучетата, говедата, човешките ентерални коронавируси и птичите коронавируси. Тази еволюционна таксономия на SARS-CoV-2 и други коронавируси беше допълнително защитена с цялата протеинова последователност чрез методите за многократно подравняване на последователностите. Еволюционният филогенетичен анализ на NC протеините разкри, че NC при SARS-CoV-2 отново е с твърде сходен със SARS-CoV и коронавирусите на прилепите (Zhou P, Discovery of a novel coronavirus associated withr the recent pneimonia outbreak in humans and its potential bat origin, 2020)

- *Филогенетичен анализ на гена на протеина на мембраната (M)*

Генът за мембранен протеин наскоро е документиран като структурен протеинов ген сред различните протеини в коронавирусите. Протеинът M е идентифициран за първи път във вируса на инфекциозния бронхит през 1990 г. (Smith AR, 1990) . Тогава му се дава названието „малък M протеин“. Този гликопротеин е структурен и има силно присъствие в коронавирусите. Състои се от 230 аминокиселини. Молекулното тегло на M протеина е от 20 до 38 kDa (Armstrong J, 1984). M протеините присъстват в димерна форма и помагат за извиването на мембраната и свързването в NC протеините (Neuman BW, 2011).

- *Филогенетичен анализ на протеин E (E - Envelope)*

Протеинът E не е с докрай изяснено значение за вируса на SARS-CoV-2. Той се състои от къс хидрофилен участък, хидрофобен спирален трансмембранен домейн и донякъде хидрофилен С-краен участък. При SARS-CoV и SARS-CoV-2 С-крайната област съдържа мотив за свързване с различни повърхностни клетъчни рецептори (Schoeman & Fielding, 2019). Тази характеристика изглежда е запазена само в групите на коронавирусите алфа и бета, но не и в групата на гама. Мембранната топология на E протеина е изследвана при редица коронавируси с противоречиви резултати; ориентацията на протеина (тропизмът) в мембраната може да бъде различна (Cao, et al., June 2021).

Проучванията на различните коронавируси са довели до различни заключения относно това дали E е от съществено значение за вирусната репликация. При някои коронавируси, включително MERS-CoV, E е от съществено значение (DeDiego, et al., 2014). При други, включително миши коронавирус (Kuo & Masters, 2003) и SARS-CoV, E не е от съществено значение, въпреки че липсата му намалява вирусния титър.

- Симптоми на вируса

Установено е, че инкубационният период на вирусната инфекция може да бъде до 14-тия ден, но най-често първите симптоми се проявяват още около 4-5 ден след заразяването (Guan W, 2020). В едно определено проучване се доказа, че при 97,5% от изследваните хора симптоматиката е била проявена до 11.5 дни след заразяването (Lauer SA, 2020). Както и при други заболявания клиничната картина може да има своята вариация, но въпреки това има определени болестни прояви, които са отчетени при хората заразили се с COVID-19:

- Фебрилитет и втрисане
- Задух
- Обща слабост
- Мускулни болки
- Главоболие
- Загуба на обоняние

- Горен диспептичен синдром
- Долен диспептичен синдром

Ако сравняваме различните групи от хора, които имат различна по тежест клинична картина бихме установили и различна степен на проява на определени симптоми. Например хората хоспитализирани в болнично заведение за провеждане на специфично лечение и проследяване най-често страдат от задух в сравнение с тези пациенти, които са били подходящи за амбулаторно лечение. Но е интересно установеното сравнение, че по-младите пациенти без придружаващи заболявания могат да проявят симптоми на заболяването доста по-рано в сравнение с по-възрастните пациенти, които са и коморбидни.

Със сигурност обаче най-честите оплаквания придружаващи тази вирусна инфекция са умора, главоболие и болки в мускулите. Най-рядко пациентите се оплакват от болки в гърлото или от ринитни прояви. Във втората половина от време, в което светът е в пандемия значително нарасна броя на пациентите с гастроинтестинални прояви, което се дължеше на вирусна еволюция и промяна (Pan L, 2020).

- Начин на разпространение

Епидемията, тежестта и продължителността на заболяванията зависят от начина на предаване на инфекцията с SARS-CoV-2. Този вирус се предава главно от заразени лица на здрави лица чрез малки респираторни капчици по време на кашляне или кихане (Wang C, 2020). По време на кашлица се отделят средно 3000 респираторни капчици, в които активната вирусна форма на SARS-CoV-2 може да се задържи в продължение на поне 3 часа. Когато SARS-CoV-2 навлезе в дихателните пътища по време на кашлица на заразени лица и се придвижва през дихателните пътища, особено през лигавицата на белодробните алвеоли. S протеинът на вируса се прикрепя с помощта на повърхностни рецептори върху клетките на пневмоцитите от тип II (Wang C, 2020). След свързването си вирусът навлиза в цитоплазмата чрез медиирана от рецепторите ендоцитоза. Лизозомните ензими разграждат липидния слой на вируса. Вирусът SARS-CoV-2 произвежда протеини в клетката гостоприемник, които ще започнат репликация с помощта на РНК-зависимата РНК-полимераза на гостоприемника. Също така се синтезират структурни протеини, например S, E, M и NC на вируса (Perrier A, 2019).

Алвеоларните клетки се увреждат след освобождаването на SARS-CoV-2 по време на т.нар. пъпкуване, при което има деструкция на белодробните структури. Това разрушаване на пневмоцитите активира провъзпалителни медиатори, напр. TNF-α, IL-1 и IL-6 (Jin Y, 2020). Острото възпаление се наблюдава чрез изява на фебрилитет именно поради освобождаването на IL-1 и IL-6. Освен това тези възпалителни медиатори разширяват и свиват гладката мускулатура на кръвоносните съдове, което води до увеличаване на пропускливостта на кръвоносните съдове. Това може да доведе до изтичане на плазма от кръвообращението, причинявайки оток в клетките на пневмоцитите тип II. След разрушаването на алвеоларните пневмоцитни клетки тип II може да спре производството на сърфактант, да се стигне до хипоксия, диспнея, задух и да се развие тежко състояние, т.е. остър респираторен дистрес синдром (ARDS).

- Рискови фактори, които водят до вирусната патогенеза

Фактори на гостоприемника на вируса, като рецептори, имунен статус, вредни навици, например тютюнопушене, и др., са важни за патогенезата (V., 2020). Някои от тях имат ключово значение за протичането на вирусната инфекция.

Може би най-важният фактор е възрастта (CDC, 2021). Според статистически анализ за 2020 година 9,5% от населението в световен мащаб са хора с възраст над 65 години (TUIK, 2021). Анализите за SARS-CoV-2 показват, че инфекцията завършва фатално в 80% от случаите при хора над 65 годишна възраст (CDC C. f., 2021).

Следващ важен фактор са придружаващите заболявания. За съжаление дори деца с хронични болести са също застрашени от развитие на тежки усложнения при SARS-CoV-2 инфекцията. Посочените заболявания (CDC C. f., 2021), които най-често съпътстват едно по-тежко заболяване или дори такова с фатален ход са следните:

- Онкологични заболявания
- Хронична бъбречна недостатъчност
- ХОББ
- Захарен диабет Тип 1
- Захарен диабет Тип 2
- Артериална хипертония

- Сърдечна недостатъчност
- Данни за сърдечно-съдови инциденти
- СПИН
- Чернодробна недостатъчност
- Бременност или постпарталният период до 42-ри ден
- Съдови инциденти в главният мозък
- Трансплантация на орган или стволови клетки
- Обезитет – според формулата за изчисление за BMI
- Пушене

Като класически описан образ на пациент, който има повишен риск за тежко протичане на вирусната инфекция се дава следният: мъж, между 45-65 годишна възраст, пушач или поне пушил в близкото минало, с обезитет (BMI над 30 кг/м^2), който има поне едно придружаващо заболяване (CDC C. f., 2021).

Според последните данни от проведените анализи и проучвания има и други рискови фактори за допринасящи за по-тежкото протичане на заболяването като на тях е необходимо да се отдели повече внимание. Те са:

- ACE2 ензимите и рецепторите на повърхността на клетките
- Специализираните вирусни субединици и протеини
- Възпалителните цитокини и последващата цитокиновата буря

- ACE2 рецептора и ACE2 ензимите

Сред тях ACE2 рецептора висока значимост. Той принадлежи към групата на цинковите металопротеази от семейството на ангиотензин-конвертиращия ензим. Човешкият ACE2 се състои от 805 аминокиселини, съдържащи каталитичен домейн в N-крайната страна и цитоплазмена опашка от C-крайната страна на пептидите (Hamming I, 2004). Карбоксипептидазата се разгражда в ACE2 на I и II. Човешкият ACE2 присъства в различни области, като например в лигавицата на носа, езика, устната лигавица, назофаринкса, гладката мускулатура в артериалната система, ендотелните клетки във венозната система, епителните клетки в трахеята и алвеолите, стратифицираните епителни клетки в хранопровода, илеума и дебелото черво. Присъства и в клетките на

миокарда, мозъка, уротелиалните клетки в пикочния мехур и проксималните бъбречни тубули. (Jiawei C, 2020). Екстензивната експресия на ACE2 в различни тъкани или органи се свързва с патогенезата, водеща до белодробно възпаление, загуба на вкус, неврит, артрит, пневмонит, дисфункция на имунната система и може да причини мултиорганна дисфункция по време на напредналия стадий на SARS-CoV-2 инфекцията (Huang C, 2020) Интересен факт е, че повишеният риск от тромбоза бе установен при всички пациенти, заразени с COVID-19. Въпреки това не е установена връзка между COVID-19 и дисеминираната интравазална коагулация (ДИК).

ACE2 е важен регулатор на системата ренин-ангиотензин (RAS). Ангиотензин I, който няма пряка биологична активност, съществува като прекурсор на ангиотензин II и се превръща в последния чрез отстраняване на два С-крайни остатъка от ACE2 главно в белия дроб, бъбреците, ендотелните клетки и мозъка. Ангиотензин II действа върху венозната и артериалната гладка мускулатура, за да предизвика вазоконстрикция и да увеличи развитието на ЦНС. Той също така стимулира секрецията на алдостерон. Оказва се, че освен че навлиза чрез ACE2, SARS-CoV-2 впоследствие понижава експресията на ACE2, което води до загуба на защитните му ефекти в различни органи, което от своя страна може да има значително влияние върху патогенезата на заболяването. Експресията на ACE2 намалява както при мъжете, така и при жените по време на стареенето. Многобройни изследвания върху животни обаче не показват свързани с пола промени в експресията на ACE2, особено при възрастни мишки (Xie X, 2006). И все пак епидемиологичните данни за новите варианти на коронавируса, т.е. SARS-CoV-2, съобщават, че полът и възрастта имат значителна стойност за податливостта към инфекция с SARS-CoV-2. Съществува силна връзка с различни детерминанти на гостоприемника, напр. мъжки пол, възрастна група, наличие на други хронични сърдечни и белодробни заболявания, които са най-засегнати по време на пандемията на COVID-19. Освен това данните показват, че смъртност се наблюдава в по-голяма степен при лицата над 60-годишна възраст с диабет, сърдечни и белодробни заболявания (Chen J, 2020).

- Специфични вирусни протеини и субединици

- **Heptat repeat 1 (HR1) и Heptat repeat 2 (HR2)**

Навлизането на SARS-CoV-2 в клетката на гостоприемника все още е напълно изяснено. Подобно на SARS-CoV, върху вирусната мембрана протеинът на шипа (S протеин) на SARS-CoV-2 се състои от субединици S1 и S2, както беше описано по-рано. В субединицата S2 се съдържат т.нар. фюжън пептид (FP), HR1, HR2, трансмембранен домейн (TM) и фюжън цитоплазмен домейн (CP), които са отговорни за интервенцията на вирусното сливане и влизане.

При заразяването в прицелната клетка се инжектира от FP на S2 субединицата. След инжектирането на FP за образуване на 6-спирален сноп се извършва експониране на HR1 и HR2 домейна, като клетъчните и вирусните липидни слоеве се намират в близост и започва процедурата по сливане на мембраните. Съществуват три различни състояния на S-протеина, когато се извършва процедурата за сливане на мембрани: начално състояние преди сливането, междинно състояние преди сливането и стабилно състояние след сливането. Субединицата S2 се разкрива чрез разграждане на субединицата S1, което се случва, когато S протеинът се свърже с рецептора. Това води до промяна на S протеинът и той навлиза в т.нар. междинно състояние. След това се създава структура от шест спирални снопа от три двойки HR1 и HR2 и ядрото на сливането придобива формата (F., 2016).

- **Main protease (Mpro)**

На 7 януари 2020 г. китайски учени екстрахираха SARS-CoV-2 и секвенираха генома на SARS-CoV-2. Лиу и съавтори (Liu CH, 2019)демонстрираха кристализираната форма на Mpro на COVID-19 и предполагат, че Mpro вероятно е потенциален протеин-мишена за лекарства за инхибиране на репликацията на SARS-CoV-2. Доказа се, че структурата ѝ е много подобна на тази Mpro като при SARS-CoV (Yang H, 2003). Mpro е съществен протеин, необходим за протеолитичното съзряване на вируса и за неговото правилно развитие и размножаване в последствие (Adem S, 2020).

- Възпалителни цитокини при SARS-CoV-2

Възпалителни цитокини в случай на SARS-CoV-2 играят важна роля в имунопатологията. Дисрегулираните и прекомерни имунни реакции причиняват увреждане на белите дробове и вероятно намаляват естествените сили на приспособимост и издръжливост. Наблюдава се повишаване на n IL-1b, IFN-c, IP-10, MCP-1, IL-4 и IL-10 при заразените с SARS-CoV-2 хора (Huang C, 2020). По-високи стойности на IL-6, IL-10 и TNF-a и по-малко CD4+ и CD8 Т-клетки са открити при пациенти, изискващи прием в интензивно отделение. Цитокиновият щурм намалява универсалната резистентност срещу болестта SARS-CoV, което се потвърждава от по-ранни проучвания върху животни (Channappanavar R, 2016). Инфекцията с SARS-CoV-2 се свързва с лимфопения поради нивата на серумните цитокини и изследването на конфигурацията на лимфоцитите след инфекцията. При тежката форма на COVID-19 се наблюдава свръхпроизводство на цитокини (IL-6, разтворим IL-2 рецептор [IL-2R], IL-10 и TNF-a), а експресията на IFN-y е намалена в CD4+ Т клетките. Тези наблюдения са ясна идентификация на тежестта на заболяването COVID-19. В умерените случаи на тежест на инфекцията количествата на IL-6, IL-2R, IL-10 и TNF-a са леко повишени или в обичайния диапазон, но в повечето от тежките клинични случаи на вирусната инфекция стойностите са значително повишени. Възпалителните макрофаги произвеждат тези цитокини, тъй като са засегнати от цитокиновата буря. При умерените случаи общият брой на лимфоцитите и по-точно на CD4+ Т-клетките и CD8+ Т-клетките е малко по-малък, а при тежките случаи е значително намален (Chen G, 2020).

- Цитокинова буря

Смята се, че тежестта на заболяването COVID-19 е пряко свързана с предизвиканите от вируса цитопатични ефекти в имунната система на гостоприемника (Prompetchara E, 2020) (Soheila Montazersaheb, 2022). При пациенти, страдащи от COVID-19, имунната система на гостоприемника може да предизвика т.нар. цитокинова буря (Channappanavar R P. S., 2017). Както разкрива наименованието, това е феномен на екстремна възпалителна реакция, при която възпалителните цитокини бързо се отделят в огромно количество в отговор на инфекциозните стимули. Основните механизми, които са отговорни за неудържимото освобождаване на възпалителни фактори все още са неясни, но съществуват няколко хипотези (Soheila Montazersaheb, 2022).

Първата от тях е свързана с репликацията на вируса, която води до апоптоза. При пациенти с COVID-19 има освобождаване на провъзпалителни цитокини и засяга функциите на макрофагите и лимфоцитите (Dennis McGonagle, 2020) (Yang, 2020), като причинява периферна лимфопения (Soheil Tavakolpour, 2020). На фона на възникналата вирусна инфекция макрофагите, дендритните клетки и неутрофилите започват имунния отговор като първа линия на защита на организма. В съответствие с това схващане, белодробните аутопсии на пациенти, починали от COVID-19, разкриват висока инфилтрация на макрофаги в бронхиалната лигавица (Lisa M Barton, 2020). Освен това последните проучвания показват, че прекомерното производство на някои цитокини, като IL-6, може да е водещата причина за възпалителния отговор при COVID-19 (Park, 2020).

Втората хипотеза е свързана с адаптивния имунитет и производството на неутрализиращи антитела срещу повърхностния антиген на вируса. Няколко проучвания върху животни декларират, че IgG може да се свърже с протеина S и да предизвика възпалителни каскади. Това свързване може да доведе до натрупване на провъзпалителни макрофаги и моноцити в белите дробове, което дава начало на едно по-тежко протичащо респираторно заболяване (Zhou P, A pneumonia outbreak associated with the new coronavirus of probable bat origin, 2020) (Dawei Wang, 2020).

Цитокиновата буря е абсолютно тясно свързана с тежкото протичане на вирусната инфекция със SARS-CoV-2 и е предразполагащ фактор за фаталния изход при критично тежките пациенти с COVID-19. Управлението на цитокиновата буря вероятно държи ключа за по-добрата успеваемост при лечението на тази група от пациенти независимо от придружаващите заболявания.

2. Хронично бъбречно заболяване

През последните десетилетия се наблюдава нарастващ интерес към епидемиологията на бъбречните заболявания, което е свързано с нарастващото разпространение на бъбречната недостатъчност. Глобализирането през последното десетилетие създаде насоки за оценка и поведение при остри и хронични бъбречни заболявания (ХБЗ) с консенсусни дефиниции, основани на широко използвани клинични мерки.

- Определение

През последните десетина години определението хронична бъбречната недостатъчност (ХБН) бе заменено от друго писващо по-добре болестният процес, а именно хронично бъбречно заболяване (ХБЗ).

ХБЗ е дефинирано като бъбречно увреждане с давност от поне три месеца, което се определя като структурна и/или функционална патологична проява на бъбреците, което в крайна сметка може да доведе до намаляване на eGFR, независимо от първоначалната причина водеща тези патологични изменения след себе си, а именно:

- Албуминурия над 30 мг/24 часа
- Намаляване на eGFR под 60 ml/min/1.72m^2
- Хистологични промени
- Промени в изследването на обикновена урина и уринния седимент

- Епидемиология

Получаването на точни и съпоставими оценки на тежестта на ХБЗ в различните региони на света е трудно по няколко причини. Идентифицирането на заболяването изисква изследване на показателите за бъбречно заболяване като серумен креатинин, цистатин С за изчисляване на eGFR, албумин в урината, количество белтък в 24-часова урина, които не се извършват напълно еднакво в различните лаборатории. Друг фактор са и различните популации, които дават изкривяване на резултатите при изследване за ХБЗ (Laura C Plantinga, 2008).

В Европа не съществуват данни от многонационални проучвания, поради което едно конкретно проучване комбинира данни от 19 други проучвания на общото население в 13 европейски държави, за да оцени коригираното за възрастта и пола разпространение на ХБЗ. Въпреки провеждането на анализ, при който има стратификация по определени критерий отново резултата показа неравностойно разпределени и крайно разнообразни данни при класификацията на KDIGO за ХБЗ. Именно поради разпространението на хроничното бъбречно заболяване не само в Европа, но и в световен мащаб това даде своето откражение при пациенти с ХБЗ и SARS-CoV-2 инфекция (GBD, 2017). Скорошно проучване показва, че пациентите с

диагностициран COVID-19, с придружаващо хронично бъбречно страдание, при които клиничната картина се представя с ОБУ, имат по-ниска преживяемост в сравнение с тези само с ОБУ или ХБЗ (Xu, et al., 2022).

- Резултати за ХБЗ в Европа

ХБЗ все повече се признава за основен приоритет на общественото здраве поради силната си връзка с неблагоприятните последици. В някои райони на света ХБЗ е една от петте основни причини за смърт (Collaborators, 2016). По-ниската GFR и по-високите нива на албуминурия водят до значително намаляване на очакваната продължителност на живота във всички възрасти (System, 2016).

Съществува засилен интерес към определянето на по-ранни резултати от прогресията на ХБЗ с цел подобряване на разработването на лекарства и клиничната превенция. По-ниският GFR се свързва и със съпътстващи костни, метаболитни, ендокринни и хематологични аномалии. Също така според класическите представи напредналата възраст (над 65 г.) се придружава от значителни структурни и функционални отклонения в бъбреците. Гломерулната филтрация намалява от около 120 ml/min в началото на четвъртото десетилетие на живота до приблизително 90 ml/min през шестото десетилетие. Според проучванията на Lindeman и сътрудници след 50-годишна възраст може да се приеме, че eGFR намалява с 1 ml/min годишно (Беловеждов, 2004).

3. Бъбречно заболяване и Covid-19

Вече беше обсъдено, че вирусната инфекция проявява своите патологични промени в различни тъкани и органи. При SARS-CoV-2 инфекцията в крайна сметка може да има бъбречна увреда. Резултатите в световен мащаб показват, че при пациенти с Covid-19 честотата на ОБУ в различните географски области варира като в определени проучвания са описани стойности от 3-20%. Статистическото проучване на всички пациенти от същите групи показва, че при повече от 2/3 от починалите пациенти е имало покачване с поне ¼ на нивата на азотните тела в серума, а от проведените КТ на абдомен има установени следи за възпалителни промени и оток (Naicker S, 2020).

Според последните клинични проучвания и анализи се установи, че смъртността при Covid-19 се повлиява от абнормена бъбречна функция, а пациентите с хронична бъбречна недостатъчност независимо от това кой стадий е тя според KDIGO, са група, която е силно застрашена за едно по-тежко протичане на вирусната инфекция. В едно от големите описани проучвания, което бе проведено в Китай бяха разгледани множество лабораторни показатели при 701 хоспитализирани пациенти с доказана Ковид-19 инфекция (Naicker S, 2020). От тях общият брой на починалите е бил изчислен на 113 (16.1%) като от гледна точна на лабораторните изследвания свързани с бъбречната функция са отчетени някои много важни резултати:

- 44% от починалите пациенти са имали доказана протеинурия
- 27% от починалите пациенти са имали доказана хематурия
- 14.4% от починалите пациенти са имали влошени стойности на уреята над горната референтна граница
- 13.1% от починалите пациенти са имали влошени стойности на серумния креатинин над горната референтна граница
- 13.1% от починалите пациенти са влошили бъбречната функция под eGFR 60 ml/min/1.73m2 в хода на престоя в болничното заведение
- 5% от починалите пациенти са развили ОБН като обаче почти всички пациенти развили ОБН са починали.

Точният механизъм, по който се увреждат бъбречните структури не е ясно изяснен и към момента. От специфично проведени проби е установено, че вирусни частици от SARS-CoV-2 се откриват в урината по време на заболяването на пациентът, а при провеждане на ПББ се установява наличието на същите такива и в бъбречната тъкан (Naicker S, 2020). За момента, както вече беше посочено в литературния обзор „основен заподозрян“ остава ACE2-рецептора, който както вече се отбеляза най-вероятно изпълнява ролята на гостоприемник.

Към момента от гледна точка на интереса на влиянието на ACE2 ензимите и рецепторите се обърна сериозно внимание на терапията свързана с RAAS-блокерите. Бяха развити различни теории и се посочваше, че медикаментите от групата на ACEi и ARB са възможни фактори за утежняване на вирусния товар и от там хода на протичането на вирусната инфекция. Именно поради тази причина бяха проведени множество изследвания и мета-анализ на различни данни като единодушно се заключи, че

инхибиторите на ренин-ангиотензин-алдостероновата система не повишават риска за хоспитализация или за по-тежко протичане при SARS-CoV-2 инфекцията. Същевременно не се откриха и разлики между ACE2 експресията при двата пола, възраст или раса (De Abajo FJ, 2020). За това и академичното общество се обедини около препоръките за продължаване на антихипертензивна терапия от групата на RAAS-блокерите поради тяхната полза за контрол на хемодинамиката и ренопротекцията.

- Имунологичен отговор на бъбречните структури

Бъбрекът остава основният орган във връзка филтрация и пречистване на кръвта. Отстраняването на циркулиращите цитокини също е фактор е също фактор за поддържане на имунната хомеостаза. Има редица проучвания насочени към ролята на бъбрека да лимитира възпалителния процес (Imig JD, 2013), както и очистването на бактериални компоненти и частици води до намаляване на активирането на имунните клетки (Tecklenborg J, 2018). В бъбрека и по-точно в гломерула се филтрират и реабсорбират 85% от течностите в проксималния тубул, докато в дисталната част от тубулните каналчета се филтрират антигени с ниска молекулна маса. Там са разположени т.нар. kidney resident dendritic cells (DCs), които заедно с макрофагите изграждат една обширна мрежа от вродени имунни клетки, които изпълняват функцията на стража и осигуряват на бъбрека имунна интелигентност. Гъстата мрежа от DCs абсорбират и представят антигените на Т-клетките в лимфните възли, които са разположени около бъбрека. Това е възможно, защото има дендритни клетки, които преминават от лимфните възли директно към лумена на тубулната система или най-общо казано – едно от най-директните представяния на антиген в човешкото тяло (Imig JD, 2013).

Имунната хомеостаза работи в полза на бъбрека, но при дисбаланс на системата има промени, които водят до свръхактивност на автоимунният отговор и тогава се проявяват определени хистологични промени, които могат да доведат до проявата на ХБЗ, а в последствие тези имунологични процеси могат да доведат до постепенна загуба на бъбречната функция. Важно е да се отбележи, че проучванията при ESRD показват загуба на тази имунна активност (Imig JD, 2013).

- Имунологичен отговор и ОБУ

Имунните клетки в бъбрека имат роля в патогенезата на ОБУ като имат, както протективна, така и деструктивна роля: макрофагите, DCs, NK-клетки, и B клетки. Макрофагите имат някои различни видове механизми в зависимост от вида и времето, в което пристигат в увредената тъкан (Rabb H, 2016). M1 макрофагите имат някои действия спрямо възпалението и увреждането на тъканите във фазата на увреждане; M2 макрофагите показват противовъзпалителен ефект в постисхемичните бъбреци и подпомагат регенерацията на бъбречните тубули във фазата на възстановяване. Локално произведените цитокини и хемокини имат каскада от възпалителни ефекторни клетки в увредената тъкан и насърчават повишаването на регулацията на адхезионните молекули върху ендотелните клетки, като междуклетъчна адхезионна молекула-1, P-селектин и E-селектин и тези адхезионни молекули са важни за набирането на възпалителни клетки, особено левкоцити, в зоните на увреждане.

Ендотелните, епителните и имунните клетки (около паренхимните структури и/или съдовете) имат правилно взаимодействие в бъбрека при физиологични условия. Когато бактерии или бактериални продукти, лекарствена токсичност или има засягане на бъбрека, епителните и ендотелните клетки некротизират или апоптозират, като се отделят продукти, които могат да активират имунните бъбречни клетки (Imig JD, 2013) (Singbartl K, 2019). Този механизъм насърчава производството на хемокини и провъзпалителни цитокини, които набират моноцити и неутрофили. Този механизъм води до производство на цитокини и изостряне на възпалителния процес, което в крайна сметка може да има своята патологична роля, както за една банална бактериална инфекция, така и за инфекция от рода на SARS-CoV-2.

- Имунологичен отговор и ХБЗ

Прогресирането на ХБЗ има някои механизми, като например сложно взаимодействие между хемодинамични, имунологични, метаболитни и възпалителни събития. Доказано е, че активирането на DCs повишава активността на CD8+ T-клетките, като по този начин води до гломерулно увреждане в два различни експериментални модела на прогресивно бъбречно заболяване (C., 2014) (MR, 2016). Инхибирането на

активирането на DCs или взаимодействието им с CD8+ Т-клетките поддържа бъбречната функция и намалява възпалението и фиброзата при подобен тип възпалителни промени. Също играе роля в бъбречното увреждане масивната инфилтрация от CD4+ Т-лимфоцити при напреднала IgA нефропатия.

Възпалението е обща черта между ОБУ и ХБЗ, а повишаването на активацията на имунната система е налице и при двете заболявания. Съставът на популацията от имунни клетки при двете състояния е различен. При ОБУ повечето от Th1/Th17 лимфоцитите и неутрофилите се събират около паренхимните структури и/или съдовете, докато при ХБЗ TH2 лимфоцитите и M2 макрофагите са най-многобройни (Syed-Ahmed M, 2019). Дендритните клетки, M1 макрофагите и CD8+ Т-клетките се наблюдават и при двете състояния. Епително- и/или ендотелно-мезенхимният преход, с пролиферация на фибробласти при ХБЗ, може да имат важна роля в развитието на възпалението и фиброзата.

- Обобщение на имунният отговор при ХБЗ и ОБН

Заболяванията на бъбреците, причинени от инфекции са изключително важни, тъй като времето за диагностициране и провеждане на лечение има пряко влияние върху степента на увреждане, което може да бъде предизвикано от микроорганизмите. Този процес има определен механизъм - директна инвазия или индиректно влияние чрез имунно-медиирани механизми, които се представят от постинфекциозен гломерулонефрит. Клиничните прояви могат да бъдат остри или хронични в зависимост от микроорганизмите, характеристиките, ендемичния/епидемичния характер, мястото и източника на инфекцията. Една остра вирусна инфекция като SARS-CoV-2 може да стимулира имунокомплексни промени и това да доведе до бъбречни увреждания чрез определени патогенетични механизми, като например директни цитопатични ефекти със засягане по типа на некроза на съдовия ендотел и клинично-хистологична изява на васкулит (Prasad N, 2018) (Wall NA, 2018).

- SARS-CoV-2 и измененията в бъбречните структури

Изключително интересно проучване установи, че малко под една трета от пациентите с COVID-19 в първия ден на хоспитализацията могат да имат масивна

албуминурия, а повече от 60% имат протеинурия по време на лечението си в болницата, което предполага тежка инфекция. Повишаване на азотните тела в кръвта се установява при около 30% общо и при повече от 60% от пациентите, при които е настъпил фатален изход. При тези пациенти от проведената компютърната томография на бъбреците може да покаже намаляване на плътността с признак на оток и възпаление (Li Z, 2020).

Нарушената бъбречна функция е свързана със смъртността при пациентите с COVID-19. Вече споменатото неотдавнашно кохортно проучване в Китай, което беше съставено от 701 пациенти с COVID-19, приети в болница през 2020 г., показва, че 113 (16,1 %) от тях са починали в болницата, като около 44 % от тях са имали протеинурия и хематурия при първото приемане. Честотата на повишение на серумния креатинин е 14,4%, а на повишението на нивото на уреята в кръвта - 13,1%. При 13,1 % от пациентите изчислената гломерулна филтрация е била под 60 ml/min/1,73 m². Според данните ОБУ е възникнал при 5,1% от пациентите (Naicker S, 2020). ОБУ остава важен рисков фактор за смъртността при хоспитализирани пациенти (според проучването RR: 2,10, 95% доверителен интервал: 1,36-3,26). По-нататъшният анализ показа, че стадий на AKI I според KDIGO (HR 1,90, 0,76-4,76), стадий на AKI II според KDIGO (HR 3,51, 1,49-8,26), стадий на AKI III според KDIGO (HR 4,38, 2,31-8,31), протеинурия 1+ (HR 1,80, 0,81-4. 00), 2+3+ (HR 4,84, 2,00-11,70) и хематурия 1+ (HR 2,99, 1,39-6,42), 2+ 3+ (HR 5,56,2,58-12,01). Причината да бъдат обобщени тези получени резултати е да покаже, че са рискови фактори за смъртта на пациента по време на болничното лечение (Cheng Y, 2020). В същата публикация се споменава, че протеинурията е възможна поради увеличената експресия на ACE2 ензима във филтрационната бариера на гломерула и поради вирусния тропизъм към ACE2.

Вече е доказано, че пациентите с COVID-19 имат някои органни нарушения-дихателната система, черния дроб, бъбреците и стомашно-чревния тракт, които са подобни на тези по време на протичането на SARS през 2003 г. Една от най-възможните причини за засягане на бъбреците при някои пациенти е анамнеза за ХБЗ като вече вероятните механизми са описани. Задвижването на тези процеси може да предизвика остро влошаване на съществуващо ХБЗ с бързо спадащ eGFR. Това обаче е е свързано с много висок риск за заболеваемост и смъртност. (Cheng Y, 2020).

- Патогенеза на бъбречната увреда при SARS-CoV-2

Абсолютно точният механизъм, по който възникват бъбречните нарушения при COVID-19 все още не е до край изяснен. Различните теории включват сепсис с директно клетъчно увреждане или синдром на т.нар. цитокинова буря, причинен от вируса. Както вече беше описано част от проучванията и теориите са насочени към това, че бъбречните тубулни клетки експресират ангиотензин-конвертиращия ензим (ACE) и дипептидил пептидаза (DPP). Те са добре познати като места за свързване на SARS-CoV и MERS-CoV. Вирусна РНК и при двете инфекции беше открита в бъбречната тъкан и урината. Именно поради това е важно да се отбележи, че неотдавна в лаборатория в Гуанджоу, Китай беше успешно изолиран SARS-CoV-2 в проба от урина на заразен пациент, което предполага, че COVID-19 е оказал въздействие върху бъбреците.

Разпространението на бъбречните заболявания при пациентите с COVID-19 се дължи на много фактори. Първо, SARS-CoV-2 може да предизвика цитопатични ефекти върху бъбречните клетки. Изследваните PCR фрагменти потвърждават това твърдение и доказват наличието на вируса в кръвта и урината при пациенти с COVID-19 (Su H, 2020). Вероятно ACE2 е използван от вируса като рецептор за влизане в клетките. Публикуваните данни от РНК-секвенцията на човешки тъкани показват, че експресията на ACE2 в пикочните пътища е почти 100 пъти по-висока, отколкото в дихателните пътища. Въз основа на тези данни най-вероятно коронавирусът навлиза в бъбречните клетки по ACE2-зависим път и може да причини някои бъбречни заболявания (Naicker S, 2020).

В световен мащаб нарушенията в бъбречните структури и патологичните механизми, по които възникват не са до край изяснени. Това обаче, което до момента е сигурно е, че съществува правопропорционална връзка между влошената бъбречна функция и повишената смъртност, което показва, че бъбречната имунопатология играе ключова роля.

4. Лабораторни биомаркери

- Увод

През последните две десетилетия се напредна изключително много в областта на молекулярния анализ, което доведе до идентифицирането на широк спектър от потенциални серумни и уринни биомаркери, които могат да оценят бъбречната функция, и да са информативни за степента и мястото на увреждане. Иновативното при използването на тези биомаркери е да успеем да осъществявим прогнозиране на развитието на бъбречното заболяване. Много от тези биомаркери са строго специфични, носят информация за определен анатомичен отдел или за влошаване на определен етап във физиологията на органа. Въпреки, че те са изключително обещаващи и вероятно ще имат своето клинично значение някои от тях не са докрай проучени.

Поради тази причина в нашето научно изследване за бъбречна увреда в условията на COVID-19 е изключително важно да бъдат подбрани правилните биомаркери, с които да може да се оцени бъбречната функция и да се установи дали има увреда в резултат на вирусната инфекция. Именно поради това е направен обширен анализ, тъй като в основата на темата се засягат пациенти с ХБЗ, а по време на престоя в болничното заведение се установи, че има сериозен брой случаи и на ОБУ. Това направи още по-сложен подборът на биомаркерите, защото при ХБЗ, за разлика от острата проява на бъбречна увреда времето, мястото и естеството на тъканната увреда са много трудни за оценка. Това на практика затрудни откриването на равносилни биомаркери, но в крайна сметка се прецени, че те трябва да отговарят на критерий сходни и за две състояния – ХБЗ и ОБУ. Прецени се, че е те трябва да предоставят информация за:

1) местоположението на увреждането
2) механизма на заболяването
3) прогноза за хода на заболяването

За специфичните маркери е необходимо да се посочи, че все пак стадия на заболяването и диагностиката свързана с бъбречната функция е проведена основно чрез стандартния и достъпен лабораторен маркер – серумният креатинин. Чрез него използвайки златния стандарт в нефрологията, а именно формулата CKD EPI 2021 се изчисли бъбречна филтрация в ml/min/1.73m^2 чрез получения eGFR. Добре известно е в

българската нефрологична общност, както и в световен мащаб, че серумният креатинин въпреки своите ползи има своите практически недостатъци и ненадежност. Въпреки, че е един евтин и достъпен биомаркер неговите нива са пряко повлияни от много фактори като пол, възраст, раса, мускулна маса, хигиенно-диетичен режим, физическа активност и прием на медикаменти.

Събраната информация за различни проучвания за серумният креатинин до момента ни показва следното:

I. Производството на креатинин и освобождаването му в кръвообращението варират значително в зависимост от възрастта, пола, мускулната маса, някои болестни състояния и в по-малка степен от диетата (J Kampmann, 1974).
II. Серумните концентрации на креатинина не са специфични за тубулно увреждане. Дори в случаите, когато нивото на серумния креатинин е повишено вследствие на пряко бъбречно увреждане, то не може да се използва за определяне на мястото на увреждането (Singer, 2011).
III. Предизвиканото от лекарствата намаляване на тубулната секреция на креатинин може да доведе до подценяване на бъбречната функция (M L Rocci Jr, 1984).
IV. Малките промени в нивата на серумния креатинин са обект на висока честота на фалшиво положителни резултати, като този ефект се засилва при лица с по-висок базов креатинин поради присъщата вариабилност на креатиновия анализ. По този начин пациентите с ХБЗ могат да бъдат погрешно класифицирани като пациенти с ОБУ само въз основа на малки промени в нивото на серумния креатинин (Jennie Lin, 2015).

- Какви биомаркери са изследвани?

Изследваните биомаркери са разделени на 2 групи поради различиният материал, от който се изследват – урина и серум.

Таблица 1 Видове биомаркери

УРИНА	**СЕРУМ**
IL-18	*IL-6*
KIM-1	*ACE2 Enzyme*
NGAL	*SAA*

- Уринен Interleukin – 18 (IL-18)

IL-18 е провъзпалителен цитокин с размер 18 kDa, който се произвежда от клетките на бъбречните тубули и макрофагите. Проучванията върху животни показват, че IL-18 е медиатор на остро тубулно увреждане, включващо както неутрофилна, така и моноцитна инфилтрация на бъбречния паренхим (Charles L Edelstein, 2007). Изключително важен показател за настъпваща некроза при една остра бъбречна увреда.

В човешкия бъбрек IL-18 се индуцира и разгражда главно в проксималните тубули и се освобождава в урината. Доказано е, че IL-18 участва в различни процеси на бъбречни увреждания, включително отхвърляне на трансплантиран бъбрек, инфекциозни прояви, автоимунни състояния и злокачествени заболявания.

Няколко проучвания показват полезността на IL-18 като биомаркер за откриване на ОБУ. Първоначално Parikh и сътрудници изследват група от 72 пациенти и съобщават, че нивата на IL-18 в урината са значително по-високи при пациенти с диагноза остра тубулна некроза, отколкото при пациенти с пренална азотемия или уринарна инфекция или при здрави контролни лица с нормална бъбречна функция (Chirag R Parikh, 2004).

Друго ключово проучване за IL-18 е Translational Research Investigating Biomarker Endpoints in AKI (TRIBE-AKI). В това проучване се измерва IL-18 при 1219 възрастни, претърпели сърдечна операция като в проучването целенасочено са подбрани лица с висок риск от следоперативен ОБУ. Анализите показват, че нивата на IL-18 се свързват с 6,8 пъти по-висок риск от ОБУ, което постоперативно и след определено време се дефинира като удвояване на нивото на серумния креатинин или дори подлагане хемодиализа. В педиатричната кохорта TRIBE-AKI (311 деца) резултатите са подобни като се съобщава дори за повишена честота от 9.4 пъти по-висок риск за развитие на ОБУ. В допълнително проведен анализ на TRIBE-AKI се установява, че IL-18 има предикторна способност особено при пациенти, които са с AKI Stage I според критерия на KDIGO, дали ще се влошат и ще преминат към Stage II или III (Koyner, 2012).

Важно е да се отбележи, че въпреки обещаващите резултати на това проучаване все пак съществуват и такива, които показват и не такава голяма надеждност на IL-18, тъй като при изследване на пациенти постъпили за лечение в интензивни отделения от изследвана урина не се установяват повишени нива на IL-18 при голяма част от пациентите въпреки, че в последствие се развива ОБУ (Edward D Siew, 2010). Тези

резултати вероятно се дължат на това, че при TRIBE-AKI все пак е имало доста критерий, които са довели до по-насочен подбор на пациенти.

Когато говорим за остри състояние и ролята на биомаркера няма как да не отбележим, че той носи своята важна роля и прогностична способност за пациенти с диагностицирано ХБЗ. Съществуват обещаващи данни за IL-18 при пациенти с хронично увредена бъбречна функция в контекста на диабетно бъбречно заболяване и протеинурия, то тогава нивата на IL-18 в бъбречните тубулни клетки са по-високи, отколкото при пациенти с недиабетно протеинурично заболяване (K Miyauchi, 2009). При проследяване на пациенти с ХБЗ и eGFR под 60 ml/min/1.73m^2 се установяват данни за повишаване на стойностите на IL-18 в отделената урина, а в последствие в рамките на около 3 години допълнително влошаване на бъбречната функция конкретно при изследваната група от пациенти (Michael G Shlipak, 2012).

- Уринен Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

NGAL е един от биомаркерите на ОБУ, който е широко изследван. Този лабораторен показател притежава много характеристики, които са необходими за един добър биомаркер на остро настъпващи промени в бъбречните структури при сравнение с измерването на серумния креатинин или отделената урина. Той е 25-kDa протеин със 178 аминокиселини. NGAL е гликопротеин, свързан с неутрофилите (M Haase, 2011). Той се експресира в различни тъкани в организма, като слюнчените жлези, простатата, матката, трахеята, белия дроб, стомаха и бъбреците (Sachin S Soni 1, 2010), а експресията му е подчертано индуцирана в увредени епителни клетки. Съществува в две форми – уринна и плазмена.

В проучването на Nickolas и научни сътрудници са изследвани пациенти, на които при постъпването в Спешно отделение е взета проба от урина за измерване на количество на NGAL и установените стойности са показали добра прогностична стойност във връзка с ОБУ (Thomas L Nickolas J. B., 2008). При 635 пациенти има чувствителност от 90 % и специфичност от 99,5 % за ОБУ (Thomas L Nickolas, 2012). В това проучване е доказано, че NGAL в урината също така е предиктор за бъдещата нужда от консултация с нефролог, постъпване в интензивно отделение и нужда от хемодиализно лечение. Доказано е, че стойностите на NGAL в урината се различават значително и се увеличават по

стъпаловиден начин при пациентите като следва следният ред: пациенти без ОБУ < ХБЗ < пренална ОБУ < ренална ОБУ.

При анализ на резултати от няколко интензивни отделения в мултицентърно изследване се е установило, че NGAL в урината се представя по-добре при прогнозиране на ОБУ при постъпване в интензивно отделение при лица с по-високи изходни стойности на eGFR -от 90-120 ml/min спрямо при пациенти с eGFR < 60 ml/min (Zoltán H Endre, 2011).

При ХБЗ има все повече публикации, които сочат, че NGAL също може да бъде полезен маркер за хроничното бъбречното заболяване и неговата тежест. Mitsnefes и колектив доказват при 45 субекта с ХБЗ в резултат на бъбречна дисплазия, обструктивна уропатия и гломерулни и кистозни заболявания, плазмените концентрации на NGAL са обратно свързани с GFR (Mitsnefes M, 2008). Данните от проучванията показват, че при намаляването на бъбречната функция до <30 ml/min/1.73m^2 NGAL превъзхожда биомаркери като Cystatin C за предикция на бъбречната недостатъчност (Mitsnefes M, 2008). Друго проучване (Bolignano D, 2008) при лица с ХЗБ (всички пациенти са били с биопсично доказан гломерулонефрит) показва, че средните концентрации на NGAL в урината са по-високи при пациентите с ХЗБ спрямо контролната група. Освен това концентрациите на NGAL в урината са със значителна корелация със серумните концентрации на креатинина, както и с установената протеинурия.

- Уринен Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)

KIM-1 е отличен биомаркер, който се открива се много рано в урината. Никой друг орган освен бъбрека не отделя този биомаркер. Значението му е ключово, защото при нормално състояние и при нормално състояние на клетките на проксималните тубули не се измерва в урината. Важно е да се отбележи, че KIM-1 е значително експресиран в проксималните тубулни клетки при пациенти след исхемично увреждане. KIM-1 се е превърнал в утвърден маркер за проксимално тубулно увреждане, което е отличителен белег на почти всички протеинурични, токсични и исхемични бъбречни заболявания (T Ichimura, 1998).

За да се оцени информативността KIM-1 има проведени няколко многоцентрови големи проучвания. При вече описаното проучване TRIBE-AKI при възрастни и педиатрични пациенти подложени на сърдечни операции стойностите на KIM-1 в урината са били пряко свързани с повишен риск от ОБУ – до 6,2 пъти по-голям риск. (Steven G Coca, 2016)

Полезността на KIM-1 е доказана не само като уринен маркер, но и като средство за оценка на бъбречното увреждане в проби от бъбречна биопсия чрез имунохистохимични методи. Например Van Timmeren и сътрудници установяват, че нивото на експресия на протеина KIM-1 в клетките на проксималните тубули корелира с тубулоинтерстициалната фиброза и маркерите за възпаление в проби от бъбречна тъкан в проследената група от 102 пациенти, на които е направена бъбречна биопсия по повод на различни бъбречни заболявания (MM Van Timmeren, 2007). В подгрупа пациенти, чиято урина е събрана близо до момента на биопсията, нивата на KIM-1 в урината значително корелират с тъканната експресия на KIM-1 в биопсични проби от пациенти с влошаване на бъбречната функция и хистологични промени, свидетелстващи за тубулно увреждане. В биопсични проби от трансплантирани бъбреци повишено оцветяване на KIM-1 е наблюдавано при 100 % от пациентите с влошаване на бъбречната функция и патологични промени, показващи тубулно увреждане, при 92 % от пациентите с остро клетъчно отхвърляне и при 28 % от пациентите с нормални биопсични находки (P L Zhang, 2008).

KIM-1 също показва обещаващи качества като биомаркер за прогноза на прогресията на ХБЗ. Това беше демонстрирано в проучване съставено от 686 пациента проведено Gang Jee и научен колектив (Gang Jee Ko, 2010). При петгодишното проследяване на участниците, които имат eGFR под 60 ml/min/1.73m^2 или имат доказана ХБЗ 3 стадий се установява повишени нива на KIM-1 (почти двукратно при сравнение с другите пациенти), което се съпровожда и от сериозен спад на бъбречната функция до ХБЗ 5 стадий. Също така наскоро бе проведен мета-анализ на 5 големи проучвания свързани с ХБЗ и KIM-1, който показа няколко неща:

- Пушачите имат по-голяма експресия на KIM-1 в урината
- По-ниски стойности на KIM-1 в урината при пациенти приемащи RAAS – блокери
- Нивото на KIM-1 е винаги по-високо при пациенти с влошен eGFR и данни за албуминурия

Към момента се провеждат още изследвания с акцент върху прогностичната стойност на уринния, но и на серумния KIM-1, тъй като вторият се установява като повишен при ХБЗ и диабетна бъбречна болест, но за момента механизмът на навлизане на биомаркера в плазмата остава неясен (Steven G Coca G. N., 2017).

- Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2e) изследван от серум

Ангиотензин-конвертиращият ензим 2 (ACE2) е ензим, който може да бъде открит или прикрепен към мембраната на клетките (mACE2) в червата, бъбреците, тестисите, жлъчния мехур и сърцето, или да бъде открит в разтворима форма (sACE2) (Wikipedia, 2022).

Неотдавна беше съобщено, че пациенти с различни гломерулонефрити имат по-висока смъртност и риск от остро бъбречно увреждане свързани с инфекция с SARS-CoV-2 (Waldman M, 2021). Предположи се, че понижаване на регулацията на пътя ACE2/angiotensin 1-7 може да е причина за по-честите бъбречни усложнения при тези пациенти. В едно конкретно проучване се установи, че както експресията на мРНК, така и на протеин на ACE2 е намалена при модели на възпаление, насочени към гломерулите и тубулоинтерстициален нефрит в сравнение с нормален бъбрек (Gabriela E. Garcia Q, 13.09.2021). Тези данни показват, че по време на възпаление на бъбреците, понижаването на нивото на ACE2 може да потисне въздействието на ACE2/angiotensin 1-7 противовъзпалителен път, което води до влошаване на възпалението. Следователно пациентите с бъбречно възпаление могат да бъдат по-податливи на бъбречни усложнения от COVID-19, тъй като възпалението и предишно бъбречно заболяване предразполагат към наслагване на острото бъбречно увреждане, а това покачва и смъртността при тази група от пациенти. (Gabriela E. Garcia Q, 13.09.2021), (Murashima M, 2019).

- Interleukin-6 (IL-6) изследван от серум

Ако може да се даде определение за IL-6 то вероятно би било следното: IL-6 е цитокин, който контролира имунния отговор, както и клетъчната пролиферация и

диференциация. След активирането на IL-6 в началния етап на възпалението се отделят протеини на острата фаза. Тези протеини са С-реактивен протеин (CRP), серумен амилоид А (SAA), фибриноген, хаптоглобин и a1-антихимотрипсин, които се отделят от черния дроб. IL-6 е ключовата молекула на цитокиновата буря, която дирижира целият имунен отговор и нейното мониториране е много важно.

Интересен момент при пациентите с COVID-19 е цитокиновата буря (Hafize Seda Vatansever, 2020). Високи нива на възпалителни цитокини се наблюдават при пациенти с COVID-19 с по-тежко заболяване и са свързани с белодробно възпаление, белодробно увреждане и полиорганна недостатъчност (Channappanavar R P. S., 2017). Освен това пациентите с SARS-CoV-2 инфекция имат ниски нива на супресора на цитокиновата сигнализация, който регулира и стимулира механизма на отрицателна обратна връзка на IL-6 (Tamaki Okabayashi, 2006). По същата линия друго проучване съобщава, че нивата на IL-6 са по-високи при пациенти с тежка форма на COVID-19 и това може да се използва като една от основите за прогнозиране на прехода от лека към тежка инфекция (Fan Wang, 2020). Освен това последните проучвания показват, че по-високите нива на IL-6, CRP, а също и IL-10 са по-значими от другите цитокини в критичната група пациенти с COVID-19 (Fang Liu, 2020). Може да се предположи, че имунната дисрегулация е изключително важен момент и терапевтична цел при пациентите с COVID-19. Причините за големия мащаб на възпалителните цитокини не са ясни, но те биха могли да играят решаваща роля в клетъчната апоптоза, свързана с органното увреждане (Hafize Seda Vatansever, 2020).

- Serum amyloid A (SAA) изследван от серум

В началото на 2021 е публикуван изключително обширен мета-анализ, в който са включени 19 проучвания с общ брой на участници от 5617. Всички те са били с COVID-19 (Angelo Zinellu, 2021). Обобщените резултати показват, че концентрациите на SAA са значително по-високи при пациентите с тежко протичане на заболяването, от колкото при тези с по-лека форма на инфекцията.

В допълнение към потенциалната му роля в патогенезата на цитокиновата буря е публикувана информация, че SAA може да упражнява и прокоагулантни ефекти, които се медиират от увеличаването на фибриногена и едновременното активиране на

тромбоцитите, за да се генерира протромботично състояние (Page M.J., 2019). Следователно, острото повишаване на концентрациите на SAA може да представлява важен фактор, свързващ провъзпалителните и протромботичните пътища. Взаимодействието между възпалението и тромбозата е наблюдавано и при COVID-19 - състояние, което често се характеризира със значителни промени в коагулацията и протромботично състояние, особено при пациентите с по-тежката форма на заболяването (A., 2020).

В заключение може да се обобщи, че концентрациите на SAA са значимо и положително свързани със степента на тежест на изявата на клиничната картина при COVID-19, а това е пряко свързано с усложнения в хода на заболяването и по-висока смъртност.

Цел, задачи, материали и методи на изследванията

1. Цел

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

2. Задачи

Основни 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

3. Материали и методи

1. Клиничен материал

Включени са само пациенти, отговарящи на включващите критерии. Необходимо е да бъде отбелязано, че участието в клиничното проучване има противопоказания, които са стриктно следвани:

- Включени са само пациенти на възраст над 18 години.
- Пациенти с активна инфекция на отделителната система са изключени.
- Данни за хронично бъбречно заболяване с давност под 6 месеца.

Това е едноцентрово проучване и е проведено между 1 февруари 2021 г. и 31 март 2021 г. Включени са последователни пациенти, при които е потвърдена инфекция с COVID-19 и които са приети в болница след положителен PCR-тест за SARS-CoV-2. Работната програма е съставена изключително стриктно от задачи, които са планувани, така че да докажат основните цели на проучването. Клиничният материал е съставен от четири отделни групи, които са разпределни по пол, възраст и придружаващи заболявания. Съпътстващите заболявания включват артериална хипертония, затлъстяване (определено с индекс на телесна маса ≥30 kg/m2), захарен диабет (всички пациенти имаха само захарен диабет тип 2), съдови заболявания и хронично бъбречно заболяване, което е и основна цел за анализ на тази научна работа.

1.1 Пациенти с положителен тест за SARS-CoV-2 и данни за известно хронично бъбречно заболяване (Първа група).

В тази група са проучени общо 70 човека. Всички пациенти са с доказана инфекция за SARS-CoV-2 след PCR-тест като всички пациенти са с известна хронична бъбречна болест (представя се документация от най-малко 6 месеца преди хоспитализацията) като в тази група участват и пациенти, които са бъбречно трансплантирани. Класификацията на ХБЗ е осъществена според стандартите на KDIGO като няма нито един пациент в терминален стадий на бъбречно заболяване с нужда от провеждане на хрониодиализно лечение.

Разпределението на пациентите е между 19 и 70 годишна възраст като от тях 39 са от женски пол, а останалите 31 пациенти са от мъжки пол (Таблица 1). Всички са пролежавали в инфекциозно отделение за лечение на SARS-CoV-2, което беше

сформирано в условията на пандемия в УМБАЛ „Александровска“ ЕАД. Всички пациенти са от европеидната раса. В тази група стойностите на креатинина варираха от 57.0-930.0 mcmol/l (средна стойност 119.0 mcmol/l), което е показано в Таблица

2. Пациенти с положителен тест за SARS-CoV-2, но без данни за хронично бъбречно заболяване (Втора група).

В тази група са изследвани 50 човека. Всички те са без данни за бъбречно заболяване, както документални, така и по данни на пациентът.

Възрастта на пациентите е между 24 и 61 годишна възраст, като от тях 21 са от женски пол, а останалите 29 - са от мъжки пол (Таблица 1). Всички тези пациенти са пролежавали в инфекциозно отделение за лечение на SARS-CoV-2, което беше сформирано в условията на пандемия в УМБАЛ „Александровска“ ЕАД. Всички пациенти са от европеидната раса. В тази група стойностите на креатинина варираха от 50.0-1295.0 mcmol/l (средна стойност 79.0 mcmol/l), което е показано в Таблица 2.

1.2 Пациенти с отрицателен тест за SARS-CoV-2 и данни за хронично бъбречно заболяване (Трета група).

Третата група се състои от 20 човека, които са с отрицателен PCR тест за Covid-19, но са с хронична бъбречна болест.

Състава на групата е във възрастов интервал от 40 до 84 години, а разпределението по пол е 11 жени към 9 мъже (Таблица 1). Всички тези пациенти са заявили доброволно участие в научната работа като са пациенти проследявани от клиника по нефрология, която за периода на научната работа е първоначално базирана в УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, а в последствие в УМБАЛ „Св. Анна“ АД. Всички пациенти са от европеидната раса. В тази група стойностите на креатинина варираха от 62.0-188.0 mcmol/l (средна стойност 112.0 mcmol/l), което е показано в Таблица 2.

1.4 Пациенти с отрицателен тест за SARS-CoV-2, но без данни за хронично бъбречно заболяване, както и без данни за придружаващи заболявания.

Последната четвърта група е съставена от 20 човека, при които нямат данни за, хронично бъбречно заболяване, както и за други придружаващи заболявания. Участниците в тази група са с негативен PCR резултат за SARS-CoV-2 инфекция.

Състава на групата е във възрастов интервал от 24 до 49 години, а разпределението по пол е напълно равно - 10 жени и 10 мъже. Всички тези пациенти са заявили напълно доброволно участие в научната работа като включващият критерии е тази група да е съставена от напълно здрави индивиди. Именно тези два фактора са причината групата да е с най-ниската възрастова граница. Всички пациенти са от европеидната раса (Таблица 1). В тази група стойностите на креатинина варираха от 50.0-102.0 mcmol/l (средна стойност 65.5 mcmol/l), което е показано в Таблица 2.

Таблица 2 Демографски анализ

Типове групи		***Без данни за ХБЗ, но с положителен тест за SARS-Cov-2***	***С данни за ХБЗ и с положителен тест за SARS-Cov-2***	***С данни за ХБЗ и с отрицателен тест за SARS-Cov-2***	***Напълно здрави пациенти без придружаващи заболявания***
Брой пациенти		*50*	*70*	*20*	*20*
Възраст на пациентите (години)	*Mean (SD)*	*56.8 (16.00)*	*65.9 (12.56)*	*67.9 (10.31)*	*24.0 (7.61)*
Пол (n%)	*Жени*	*21 (42.0%)*	*39 (55,7%)*	*11 (55.0%)*	*10 (50.0%)*
	Мъже	*29 (58.0%)*	*31 (44,3%)*	*9 (45.0%)*	*10 (50.0%)*
Раса (n%)	*Европейдна*	*50 (100%)*	*70 (100%)*	*20 (100%)*	*20 (100%)*

Легенда: ХБЗ (Хронично бъбречно заболяване); SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2); SD (Standard deviation)

<u>Графика 1</u> Съпоставяне според пол



Таблица 3 Стойности на бъбречната функция при всички групи

Сравнявани стойности		*Изследвани групи при проучването*			
Лабораторен маркер	*Статистическа стойност*	*Група 1*	*Група 2*	*Група 3*	*Група 4*
Креатинин (µmol/L)	*Median (Ranges)*	*119.0 (57.0-930.0)*	*79.0 (50.0-1295.0)*	*112.0 (62.0-188.0)*	*65.5 (50.0-102.0)*
eGFR (mL/min)	*Mean (SD)*	*49.5 (24.07)*	*82.3 (27.77)*	*62.3 (22.63)*	*111.1 (12.95)*

Графика 2 Съпоставяне според бъбрената функция



2. Методи

А. Обща информация за лабораторния подход

Включени са последователни пациенти, при които е установена инфекция с COVID-19 и които са приети в болница след положителен PCR-тест за SARS-CoV-2. Всички случаи са потвърдени с помощта на обратна транскрипционно-полимеразна верижна реакция от комбинирани проби от гърло/нос.

Пациентите с доказана инфекция с Ковид-19 са общо 120 души: 70 от тях ИМАТ анамнеза за хронично бъбречно заболяване (според определението в KDIGO), като нито един от тях не е имал терминален стадий на бъбречно заболяване. Другите 50 пациенти съставляват контролната група: те НЯМАТ анамнеза за бъбречно заболяване и са С нормални нива на серумния креатинин назад във времето. За нормални стойности на креатинин за жени приемаме референтните лабораторни стойности от 44-80 µmol/L, а за мъже от 62 до 106 µmol/L, а изчислените стойности на eGFR чрез CKD-EPI 2021 са над 60 ml/min/1,73m^2.

Общото между тези групи е, че всички са изследвани в острата фаза на инфекцията, т.е. пробата е взета периода от постъпването в спешно отделение до 24 часа от началото на престоя в инфекциозно отделение, а в последствие между 7-10 ден от постъпването са проведени допълнителни лабораторни анализи за оценка на периода на проследяване.

Б. Изследователски техники и методи в клиничната лаборатория

Лабораторните данни, които са проследени при всички пациенти по време на първият етап от проведените изследвания са изцяло стандартни показатели заложен в т.нар. „Ковид-19 пакети“ към клиничната лаборатория, което е стандартен подход при този тип пациенти:

- Пълна кръвна картина с автоматично диференциално броене
- Серумен креатинин на база, на които ще се изчисли eGFR (CKD-EPI 2021) ***(за жени приемаме референтните лабораторни стойности от 44-80 µmol/L, а за мъже от 62 до 106 µmol/L)***
- Урея ***(за жени приемаме референтните лабораторни стойности от 2,6-7,2 µmol/L, а за мъже от 3,2-8,2 µmol/L)***
- Общ белтък ***(стойности от 60-85 g/l)***
- Серумен албумин ***(стойности от 35-55 g/l)***
- Д-димер ***(стойности под 500 ng/mL)***
- Фибриноген ***(стойности от 200 до 400 mg/dL или 2.0 до 4.0 g/L)***
- С-реактивен протеин ***(стойности под 6 mg/L)***
- Урина с дипстик с проследяване за хематурия, протеинурия и левкоцитурия ***(стойности измерване от отрицателен резултат то 4+)***
- Кръвно-газов анализ – достоверно проследяване на Sp02% ***(норма над 95%)***

Специфичните изследвания, които са допълнително проведени са за определяне на нивата на ACE2, NGAL, KIM-1, SAA, IL-6 и IL-18 като е използван ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) тип „сандвич“. *(виж в подточка аналитични методи)*

В. Стандартизиране на условията за взимане на биологичен материал

Уринни проби: при пациентите, постъпващи в инфекциозно отделение с доказана с PCR инфекция със SARS-Cov2, е взета първата спонтанно отделена порция урина или урина от катетъра при тези, при които се наложи трансуретрално катетризиране.

Урината е прехвърлена в полипропиленова епруветка с конично дъно и центруфугирана за 5 минути при 2000 rpm. Супернатантата е аликвотирана в идентифицирани вторични полипропиленови епруветки тип Eppendorf, надлежно идентифицирана и замразена на -70◦C.

Кръвен серум: кръвта е взета при постъпване в инфекциозно отделение посредством флеботомия на кубиталната вена в епруветка със сепариращ гел. След престой от 30 мин. на стайна температура за постигане на ретракция на съсирека, епруветките са центрофугирани за 10 минути при 3500 rpm. С помощта на пипета с пластмасов накрайник за еднократно ползване серумът е аликвотиран във вторична полипропиленова епруветка тип Eppendorf, надлежно идентифицирана, при стриктно спазване на изискванията за отсъствие на хемолиза, и замразена на -70◦C.

Г. Аналитични методи

За определяне на ACE2, NGAL, KIM-1, SAA, IL-6 и IL-18 се използва ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) тип „сандвич“. При ELISA тип "сандвич" антигените се определят количествено между два слоя антитела (т.е. улавящо и откриващо антитяло). Антигенът, който трябва да бъде измерен, трябва да съдържа поне два антигенни епитопа, способни да се свържат с антитяло, тъй като в сандвича действат поне две антитела. Моноклонални или поликлонални антитела могат да се използват като антитела за улавяне и откриване в системите ELISA тип "Сандвич". Моноклоналните антитела разпознават един-единствен епитоп, който позволява фино откриване и количествено определяне на малки разлики в антигена. Поликлоналното антитяло често се използва като улавящо антитяло, за да се изтегли възможно най-голяма част от антигена. Предимството на сандвич ELISA е, че пробата не трябва да се пречиства преди анализа и анализът може да бъде много чувствителен (до 2 до 5 пъти по-чувствителен от директната или индиректната ELISA), но по-нисък от ELISpot.

Процедурите на сандвич ELISA могат да бъдат трудни за оптимизиране и трябва да се използват тествани двойки антитела. Това гарантира, че антителата откриват различни епитопи на целевия протеин, така че да не пречат на свързването на другото антитяло.

Стъпките за провеждане на ELISA тип „сандвич“ са следните:

1. Подготвя се повърхност, към която е свързано известно количество улавящо антитяло.

2. Блокират се всички неспецифични места за свързване върху повърхността.

3. Нанася се съдържащата антиген проба върху плаката.

4. Измива се плаката, така че да се отстрани несвързаният антиген.

5. Добавя се специфично антитяло, което се свързва с антигена (оттук иидва и термина "сандвич": антиген е залепен между две антитела).

6. Прилагат се вторични антитела, свързани с ензими, като антитела за откриване, които също се свързват специфично с Fc областта на антитялото (неспецифични).

7. Измива се плаката, така че да се отстранят несвързаните антитела-ензимни конюгати.

8. Прилага се химикал, който се превръща от ензима в цветен или флуоресцентен, или електрохимичен сигнал.

1. Измерва се абсорбцията или флуоресценцията, или електрохимичния сигнал (напр. ток) на ямките на плаката, за да определите наличието и количеството на антигена.

За да приложим горепосочените стъпи в реални лабораторни условия, се подходи първоначално към поетапно размразяване на пробите и пипетиране в ямките, покрити със специфичните моноклонални антитела. След период на инкубация, съгласно инструкциите на производителя на китовете за искането лабораторно изследване, аналитът се свързва с антитялото. Следва отмиване на несвързан неспецифичен материал и добавяне на второ биотинизирано (детектиращо) антитяло, е формиран „сандвич“ комплекс. При добавянето на маркиран със стрептавидин ензим, той се свързва с биотинизираното антитяло. Следващата стъпка е добавянето на субстрат, вследствие на което се получава синя оцветка, интензивността на която зависи от концентрацията на аналита в пробата. Развитието на реакцията се стопира и се отчита абсорбция, пропорционална на концентрацията на измервания аналит.

Причината да се избере тип „сандвич“ за това проучване е, че методът има някои сериозни предимства в сравнение с другите. Например:

1) Висока чувствителност - 2-5 пъти по-чувствителна от директната или индиректната ELISA
2) Висока специфичност - две антитела участват в улавянето и откриването
3) Гъвкавост - може да се използва както директно, така и индиректно откриване
4) Най-добър за: анализ на сложни проби, тъй като не е необходимо антигенът да се пречиства преди измерването.

Като недостатък на метода може да се отбележи, че оптимизацията на антителата може да бъде трудна, поради което може да възникне кръстосана реактивност между улавящите и откриващите антитела. Поради това е крайно необходим стандартизиран ELISA комплект или тествана двойка антитела.

Д. Допълнителни образни изследвания

Степента на белодробно засягане е определена с помощта на компютърна томография, а резултатът е анализиран чрез Severity Score Index - точкова система, която оценява белодробните промени и засягането с COVID-19 въз основа на приблизителна оценка на засегнатите белодробни области.

Е. Статистически анализ на лабораторните резултати

Получените резултати в последствие са насочени към специалист за осъществяване на статистически анализ, за да покаже каква информативна стойност може да ни донесат получените резултати в острата фаза.

Категоричните параметри са анализирани за абсолютни и относителни (процентни) честоти. Непрекъснатите параметри са анализирани за средна аритметична стойност и стандартно отклонение (SD) и медиана, минимални и максимални стойности. Разпределението на непрекъснатите параметри е проверено за нормалност с помощта на теста на Шапиро-Уилк.

Методи за проверка на постхок хипотезите:

- За сравняване на непрекъснати параметри в две свързани (сдвоени) групи е приложен тестът на Уилкоксън за две извадки, а за определяне на статистическата значимост е използвана апроксимация на t-статистиката на Стюдънс (t-апроксимация) с корекция за непрекъснатост от 0,5. Освен това, където е уместно, е използван знаков тест.
- Сравненията между независими (несвързани) групи (CKD срещу без CKD) са направени след корекция за изходните разлики. Непрекъснатите променливи са анализирани с помощта на общ линеен модел с изходна стойност като ковариатив и група като фактор. За сравняване на групите за категорични променливи е използвана статистиката на Кохран-Мантел-Хаенцел.

Метод, използван за моделиране на данните:

Използваните методи за осъществяване на статистическия анализ и моделиране при обработката на получените резултати са, както следват:

а) За качествените параметри, измервани по неметрична скала са дадени: абсолютна (брой) и относителна (%) честота.

б) За количествените параметри, измервани по метрична скала са дадени: брой на случаите, средна аритметична, стандартно отклонение, минимална, максимална стойности.

Методи за проверка на нормалността на разпределението хомогенност на дисперсията

Използването на параметрични модели за проверка на хипотези предполага наличието на няколко предварителни условия. Най-важните са дали разпределението е нормално и дали извадките идват от хомогенни популации, т.е. дали дисперсиите са равни.

а) нормалност на разпределението. Непараметричният метод на Шапиро-Уилк е използват за да се провери доколко данните се отклоняват от нормалното разпределение. Оценката е направена при ниво на значимост 5%.

б) хомогенност на дисперсията. Хипотезата, че всички извадки идват от хомогенни популации е проверявана с теста на Бартлет, който предполага, че всички дисперсии са равни. Тази хипотеза е проверявана при ниво на значимост от 5%.

Методи за проверка на хипотези

а) Две независими групи (извадки).

1. Метрични параметри

- При изпълнението на условието за нормалност и хомогенност е използван класическият t-тест на Стюдънт с ниво на значимост 5%.

- При липсата на тези условия е използван знаково-ранговият тест на Уилкоксън за две независими извадки.

2. Неметрични параметри

Хи-квадрат критерия с точната вероятност на Фишер е прилаган в тази ситуация.

б) Две свързани групи

1. Метрични параметри. е използван t-тестът на Стъдънт за две звързани групи

2. Неметрични параметри. Хи-квадрат теста на МакНемар е използван за проверката на хипотези.

в) Повече от две групи.

1. Метрични параметри. Моделът на дисперсионен анализ е използван за сравнянане на средните при повече от две групи, като се отчитат и началните междугрупови разлики (baseline adjustment).

2. Неметрични параметри. Сравненията между групите, отчитайки изходното състояние се проверяваше с помощта на теста на Кохран-Мантел-Ханцел.

Моделиране на данните

Моделирането на връзката между смъртност и някои важни фактори, както и между остра бъбречна инфекция и някои фактори е основано на използването на OR (odds ratio). За надеждната оценка на OR при различните вляящи фактори е приложен модел на двойчната логистична регресия.

Допълнително за визуализация на данните е използван т.нар. Forest plot.

Навсякъде при оценката на статистическата значимост на резултатите се приемаше ниво на значимост 5%.

Всички статистически изчисления, моделиране и графични представяния са направени със статистическия пакет SAS® 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 120-те 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 4**.

Таблица 4 Основни демографски данни за изследваната популация

		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%)*	

Съкращения: ХБЗ - хронично бъбречно заболяване;

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.

Стандартна клинична лаборатория

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 5)**.

Таблица 5 *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%)*	

Съкращения: ХБЗ - хронично бъбречно заболяване; eGFR - оценена скорост на гломерулна филтрация; CRP - С-реактивен протеин; Neg. - отрицателен; SD - стандартно отклонение.

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 %.

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 m^2 при 50% от пациентите. Средна стойност на eGFR е определена според формулата CKD-EPI 2021 и при постъпването е 82,3 mL/min/1,73m^2 за групата без ХБЗ, докато за групата с ХБЗ установеният резултат е 49,5 mL/min/1,73m^2 (*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/1,73m^2 за групата без ХБЗ и 59,0 ml/min/1,73m^2 за групата с установена предварително ХБЗ (*p*-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 на 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+ (p-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 са вътрешногруповите сравнения на лабораторните резултати като се извърши анализ на първичните данни при постъпването и проведените контролни лабораторни изследвания. Резултатите показват, 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 има много сходни резултати, както при първата група, но изключение направиха получените стойности на D-димер, албумин и феритин, чиито промени не са статистически значими. (**виж таблица №6**)

Таблица 6 *Сравнение на лабораторни резултати при Група 1 и Група 2 – при хоспитализация и в последствие при провеждане на контроли*

Лабораторни параметри	**Статистичен анализ**	**Групи ХБЗ (n=70) Без ХБЗ (n=50)**	**Резултати при прием**	**Контролни изследвания**	**Промяна**	***p*-value**
Creatinine (□mol/L)	*Median (ranges)*	CKD	119 (57.0 - 930.0)	100.0 (56.0 – 716.0)	-17.5 (-331.0 – 451.0)	0.006
		Non-CKD	79.0 (50 – 1295.0)	65.0 (46.0 – 900.0)	-13.5 (-395.0 – 81.0)	*<0.001*
eGFR (mL/min/1.73m²)	*Mean (SD)*	CKD	49.5(24.07)	59.0(27.35)	9.5(20.88)	0.01
		Non-CKD	82.3(27.77)	92.2(27.12)	10.0(16.67)	*<0.001*
Urea (mmol/L)	*Median (ranges)*	CKD	9.2 (2.7 – 75.2)	8.9 (2.3 – 60.9)	0.0 (-41.0 – 44.0)	0.16
		Non-CKD	5.5 (3.0 – 82.3)	6.0 (3.5 – 56.9)	0.0 (-25.4 – 3.4)	0.49
D-Dimer (mg/L FEU)	*Median (ranges)*	CKD	0.9 (0.3 – 10.7)	0.8 (0.3 – 10.7)	- 0.2 (-4.4 – 6.1)	0.006
		Non-CKD	0.5 (0.3 -8.1)	0.4 (0.3 – 6.1)	- 0.1 (-3.4 – 0.7)	0.11
Fibrinogen (g/L)	*Median (ranges)*	CKD	4.1 (0.5- 12)	4.1 (0.5 – 7.8)	0.0 (-5.8 – 3.8)	0.31
		Non-CKD	4.1 (2.0 – 7.8)	4.0 (2.9 – 11.1)	0.0 (-3.5 – 3.8)	0.24
Hemoglobin (g/L)	*Mean (SD)*	CKD	133.7(19.61)	125.8(24.17)	-7.9(17.37)	0.0001
		Non-CKD	142.5(15.99)	136.1(18.64)	-6.4(12.09)	0.01
Leukocytes ($10^3/mm^3$)	*Median (ranges)*	CKD	7.4 (2.5 – 21.2)	10.4 (1.0 – 26.0)	1.0 (-8.4 – 20.6)	0.002
		Non-CKD	6.8 (2.9 – 35.3)	9.9 (2.9 – 26.0)	0.7 (-9.3 – 18.4)	0.03
Lymphocytes ($10^3/mm^3$)	*Mean (SD)*	CKD	1.3(0.61)	1.3(0.90)	-0.1(0.76)	0.03
		Non-CKD	1.4(0.68)	1.2(0.73)	0.2(0.75)	0.04
Platelets ($10^3/mm^3$)	*Mean (SD)*	CKD	247.6(107.31)	271.6(138.37)	23.9(112.36)	0.03
		Non-CKD	246.0(85.14)	291.5(105.10)	45.5(137.81)	0.03
Protein (g/L)	*Mean (SD)*	CKD	62.7(7.09)	59.2(6.49)	-3.5(6.09)	*<0.001*
		Non-CKD	64.1(6.23)	62.2(7.56)	-2.0(5.96)	0.03
Albumin (g/L)	Mean (SD)	CKD	36.0(4.68)	33.5(4.69)	-2.5(4.47)	0.0001
		Non-CKD	37.4(4.91)	36.0(5.62)	-1.5(4.81)	0.19
CRP (mg/L)	Median *(ranges)*	CKD	50.8 (0.5 – 320.6)	17.0 (0.3 – 242.0)	-26.7 (-227.4 – 131.0)	0.0006
		Non-CKD	29.8 (0.1 – 217.6)	4.0 (0.1 – 186.1)	-21.0 (-215.3 – 186.0)	0.04
Ferritin (□g/L)	Median *(ranges)*	CKD	712.8 (105.9 – 2511.0)	852.6 (189.2 – 3028.3)	96.2 (-989.9 – 2068.7)	0.0007
		Non-CKD	518.0 (27.8 – 2632.0)	811.9 (27.8 – 2535.0)	57.0 (-1085.0 – 1428.7)	0.28
Sp02 (%)	Mean (SD)	CKD	92.9(5.43)	93.8(3.01)	0.9(4.67)	0.0002
		Non-CKD	93.8(6.02)	95.0(3.18)	1.2(5.42)	0.003

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 прояви 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 имат 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, 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 са преведени в реанимация за интензивно наблюдение и провеждане на ИБВ. Всички 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 8** и **Фигура 2**. 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 7 *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

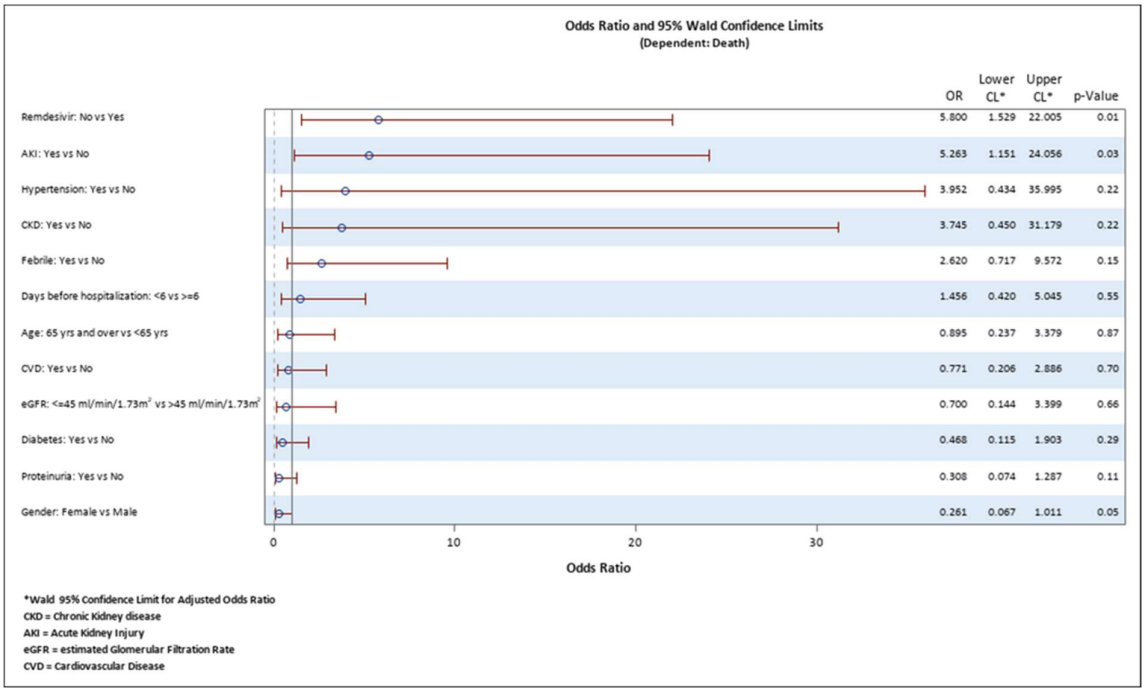
Съкращения: ХБЗ = хронично бъбречно заболяване; ОБУ = остра бъбречна увреда; ССЗ = сърдечно-съдово заболяване; eGFR = изчислена гломерулна филтрация; год. = години

Таблица 8 *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

***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

Фигура 2 *Логистична регресия за смъртност*



Същият анализ е направен и за рисковите фактори за остра бъбречна увреда. **Таблица 9** показва логистичната регресия за рисковите фактори за ОБУ. 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 10** и **Фигура 3**.

Таблица 9 *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

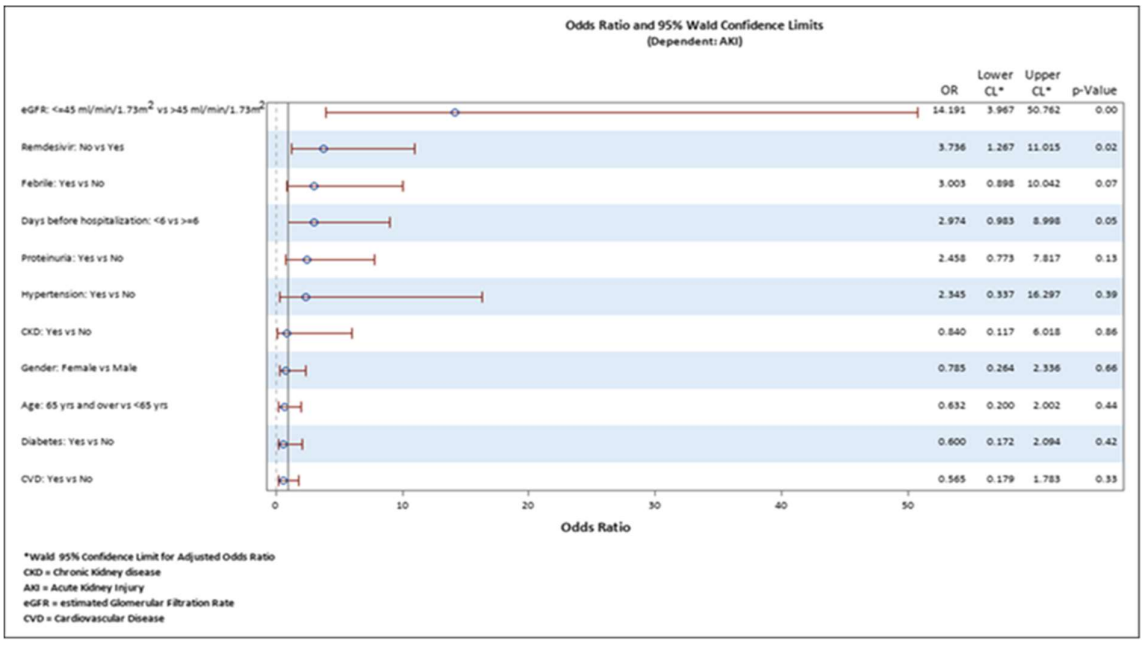
Съкращения: ХБЗ = хронично бъбречно заболяване; ОБУ = остра бъбречна увреда; ССЗ = сърдечно-съдово заболяване; eGFR = изчислена гломерулна филтрация; год. = години

Таблица 10 *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**

Фигура 3 *Odds ratio за остра бъбречна увреда (ОБУ)*



Терапия с ACEi или ARB в хода на инфекцията със SARS-CoV-2

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 имали 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). Резултатите са представени в **Таблица 11**.

Таблица 11 *Демографски и други базови данни*

Демография и съпътстващи заболявания	**Статистически метод**	**Без терапия с ACEI/ARB**	**Терапия с ACEI/ARB**	**P-value**
Брой на пациенти	n	84	36	
Възраст	Median (Ranges)	65.5 (19-88)	65.5 (42-80)	0.09
Пол	n%	Жени – 39 (46.4%)	Жени – 21 (58.3%)	0.23
		Мъж – 45 (53.6%)	Мъже – 15 (41.7%)	
Раса	n%	100% Европейци	100% Европейци	
Затлъстяване	n%	Не – 76 (90.5%)	Не – 27 (75.0%)	0.02
		Да – 8 (9.5%)	Да – 9 (25.0%)	
Сърдечносъдови Заболявания	n%	Не – 59 (70.2%)	Не – 18 (50.0%)	0.03
		Да – 25 (29.8%)	Да – 18 (50.0%)	
Диабет	n%	Не – 58 (69.0%)	Не – 21 (58.3%)	0.25
		Да – 26 (31.0%)	Да – 15 (41.7%)	
Хипертония	n%	Не – 36 (42.9%)	Не – 5 (13.9%)	0.002
		Да – 48 (57.1%)	Да – 31 (86.1%)	
Хронична бъбречна болест	n%	Не – 40 (47.6%)	Не – 10 (27.8%)	0.04
		Да – 44 (52.4%)	Да – 26 (72.2%)	

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 12**)

Таблица 12 *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 13**). 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).

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 14** 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 4**.

Таблица 13 *Пациенти с ARB/ACEi срещу пациенти без ARB/ACEi терапия*

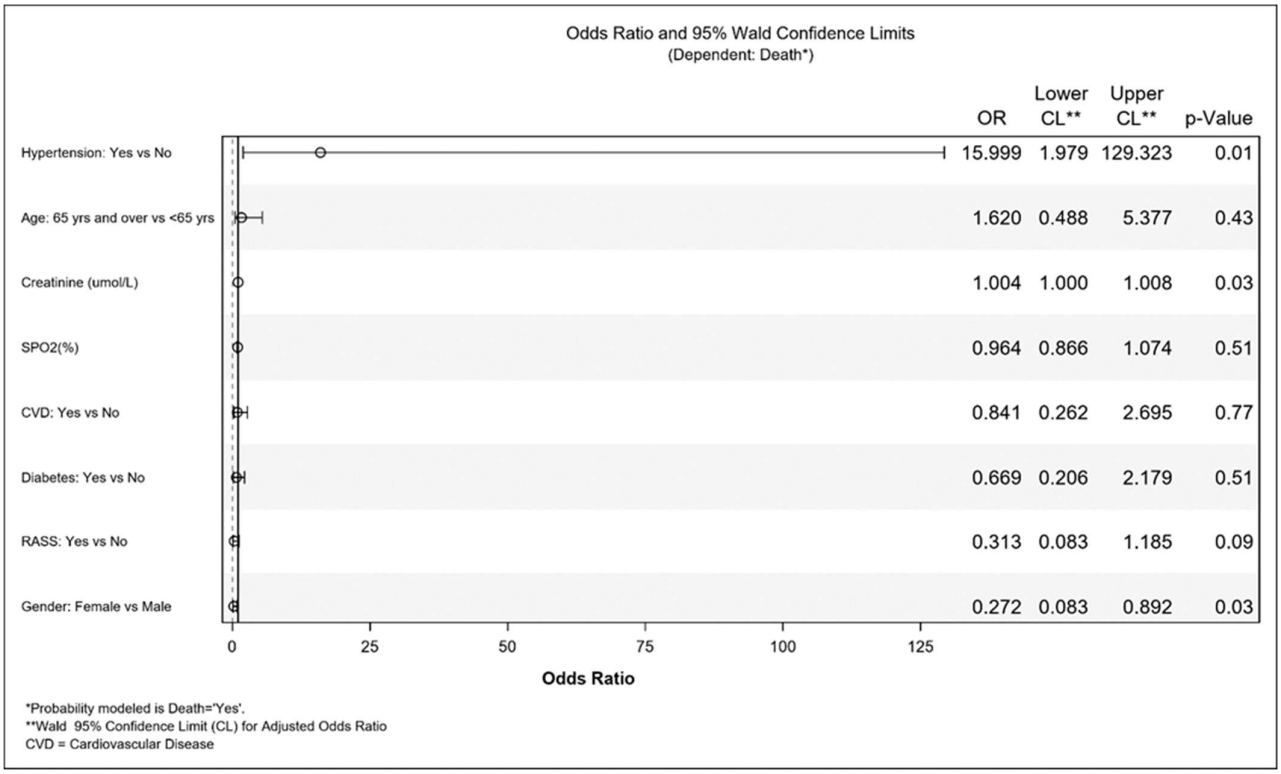
Параметър	Статистика	Изходни стойности		Проследяване (7-10 ден)		Промяна		P-value
		ACEI/ARB	Без ACEI/ARB	ACEI/ARB	Без ACEI/ARB	ACEI/ARB	Без ACEI/ARB	
Брой пациенти	N	36	84	36	84	36	84	
eGFR	Mean (SD)	58.8 (27.56)	65.0 (31.34)	73.4 (27.05)	72.6 (33.70)	14.6 (15.71)	7.6 (20.18)	0.10
D-Dimer	Medium (Ranges)	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

Таблица 14 *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 (мсмол/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

Фигура 4 *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. Обшият 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.

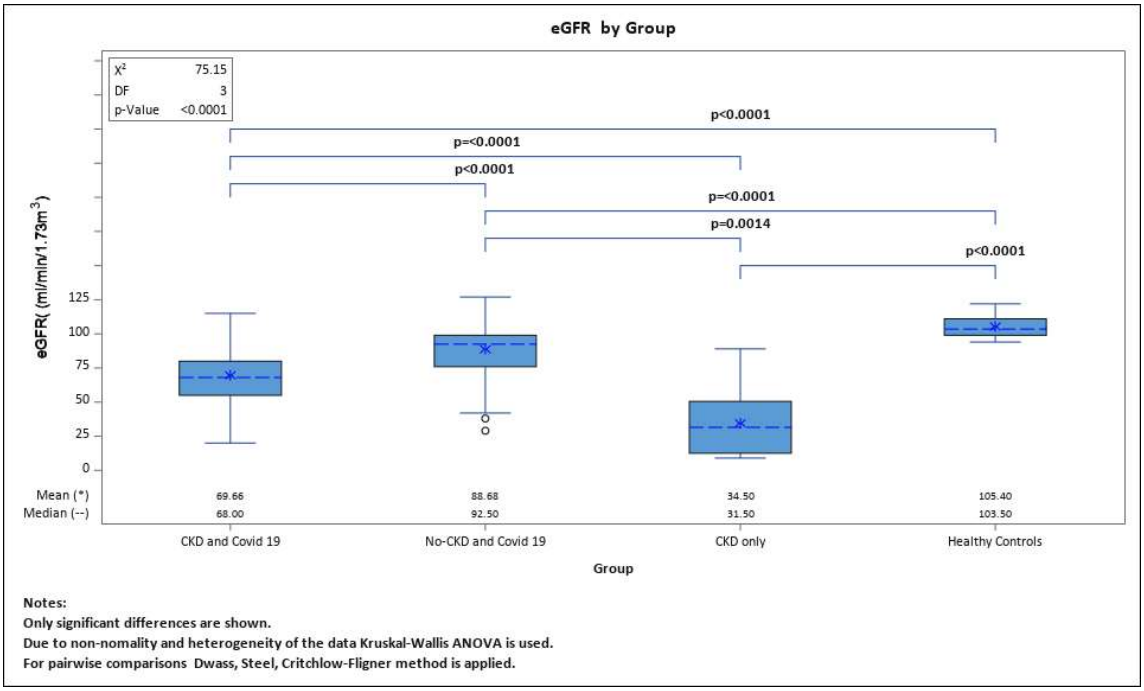
Средната стойност на eGFR при постъпването е 80,4 ml/min/1,73m^2 за пациентите с COVID-19 и без ХБЗ, докато при пациентите с ХБЗ и COVID-19 тя е 47,9 mL/min/1,73 m^2 (*p*-values < 0,0001). За пациентите с ХБЗ без COVID-19 eGFR е 62,3 ml/min/1,73m^2 , докато eGFR е 111,1 ml/min/1,73m^2 за контролната група на напълно здравите пациенти. Данните са показани в **Таблица 15 и Фигура 5**.

Таблица 15 *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

Фигура 5 *Сравняване на eGFR по групи*



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.

При направения статистически анализ се установи, че шестте биомаркера имат значими разлики и в четирите групи. (виж **Таблица 16**)

Таблица 16 *Биомаркери по групи по стойности на медиана (диапазони).*

Биомаркер / **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	17.74	35.58	6.53	75.16	15.73	105.11
DF	3	3	3	3	3	3
***p*-values**	0.0005	<0.0001	0.0884	<.0001	0.0013	<.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;

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

- Наличие на ХБЗ и на COVID-19 спрямо здравите контроли: 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.

Тези резултати могат да се видят в **Таблица 17** и **Фигури 6-11**.

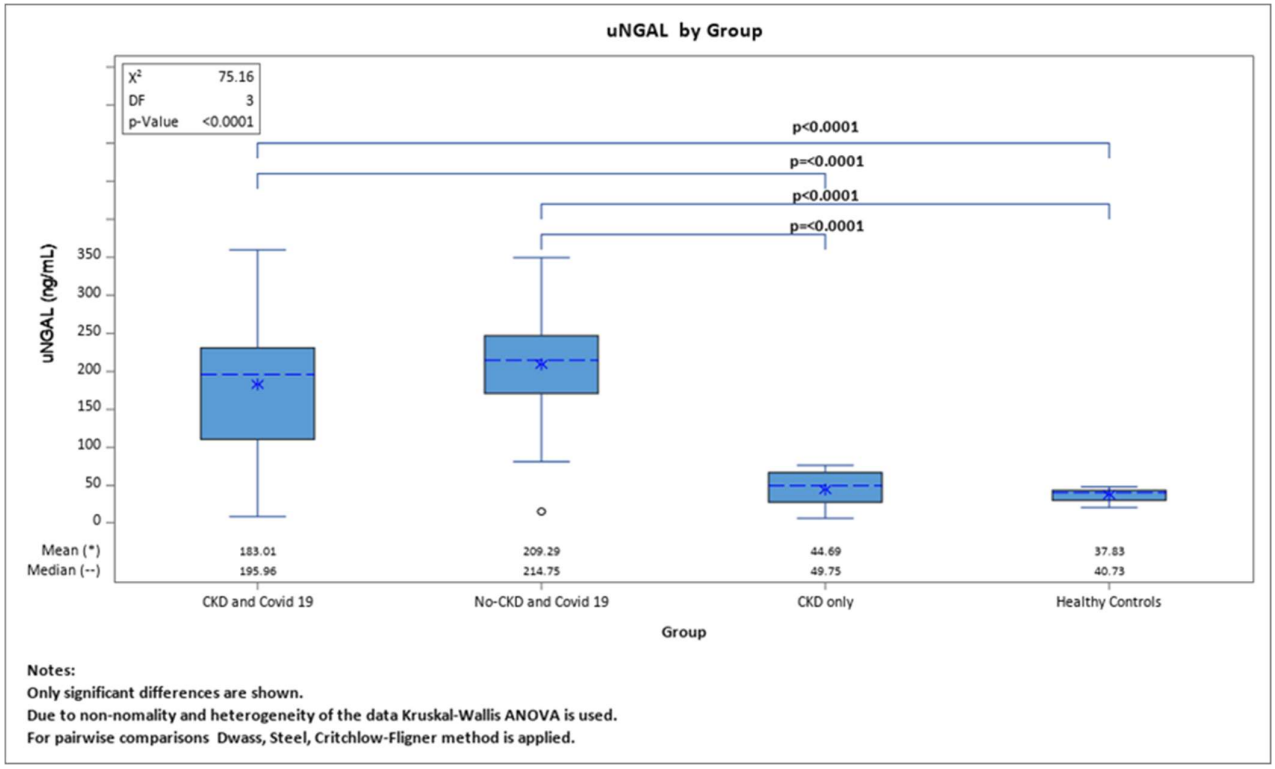
Таблица 17 *Сравняване на биомаркерите във всяка от подгрупите*

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 контроли	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 6** 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.

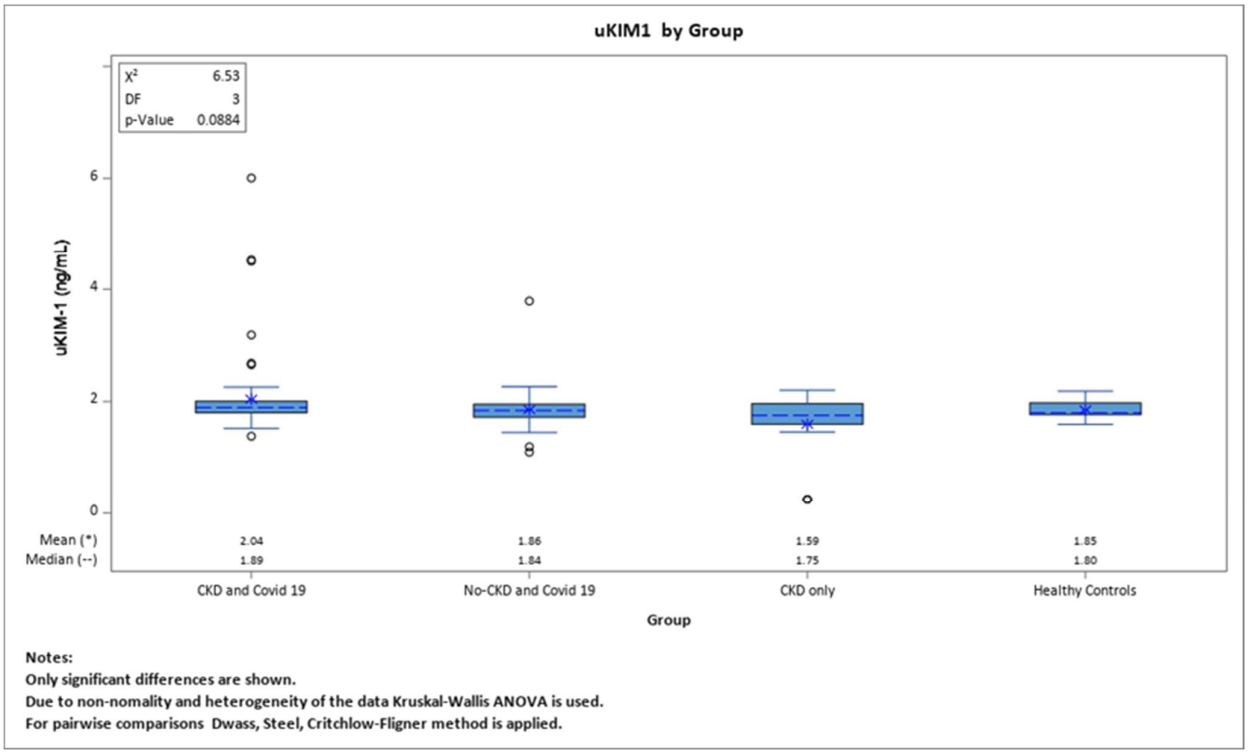
Фигура 6 *Сравнение на стойностите на uNGAL по групи*



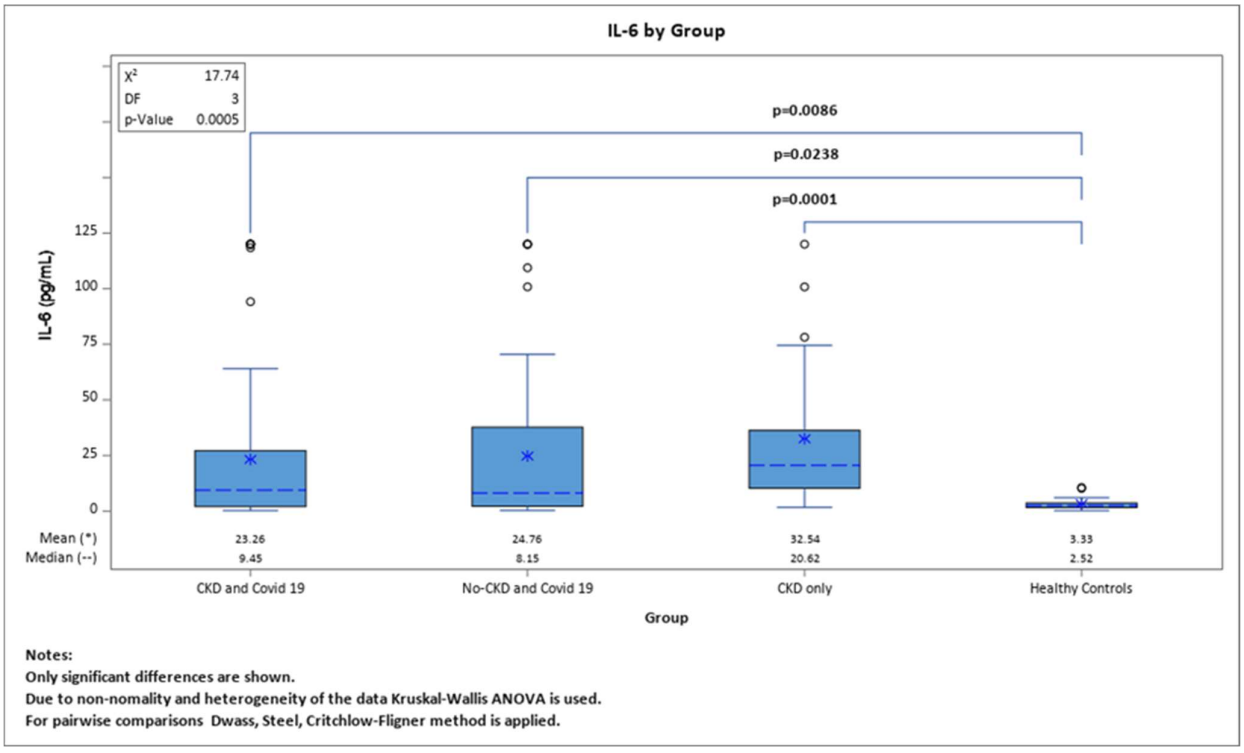
На **Фигура 7** са показани стойностите на KIM-1 измерени в урина при междугруповото сравнение като резултата е абсолютно противоположен спрямо получения за предходния биомаркер. Проведения анализ показва, че за нито една от групите стойностите не са имали сигнификантна разлика в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

На **Фигура 8** 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.

Фигура 7 *Сравнение на стойностите на uKIM-1 по групи*

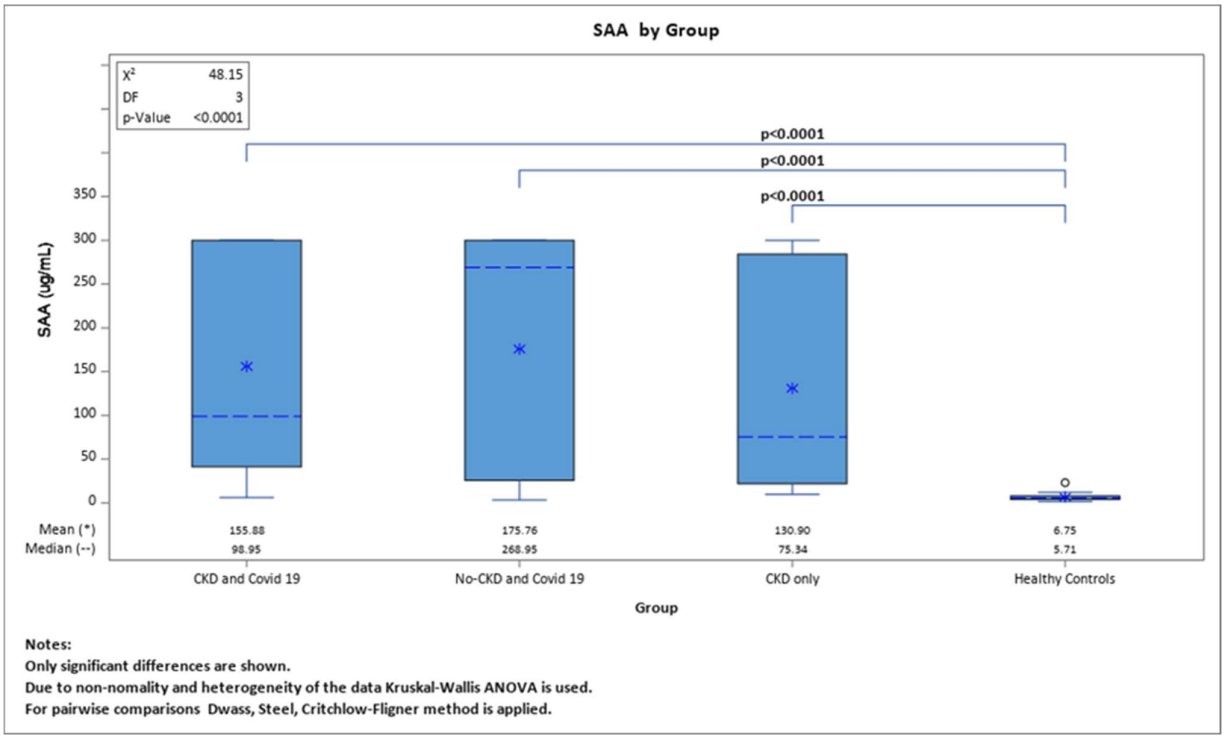


Фигура 8 *Сравнение на стойностите на IL-6 по групи*



На **Фигура 9** 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.

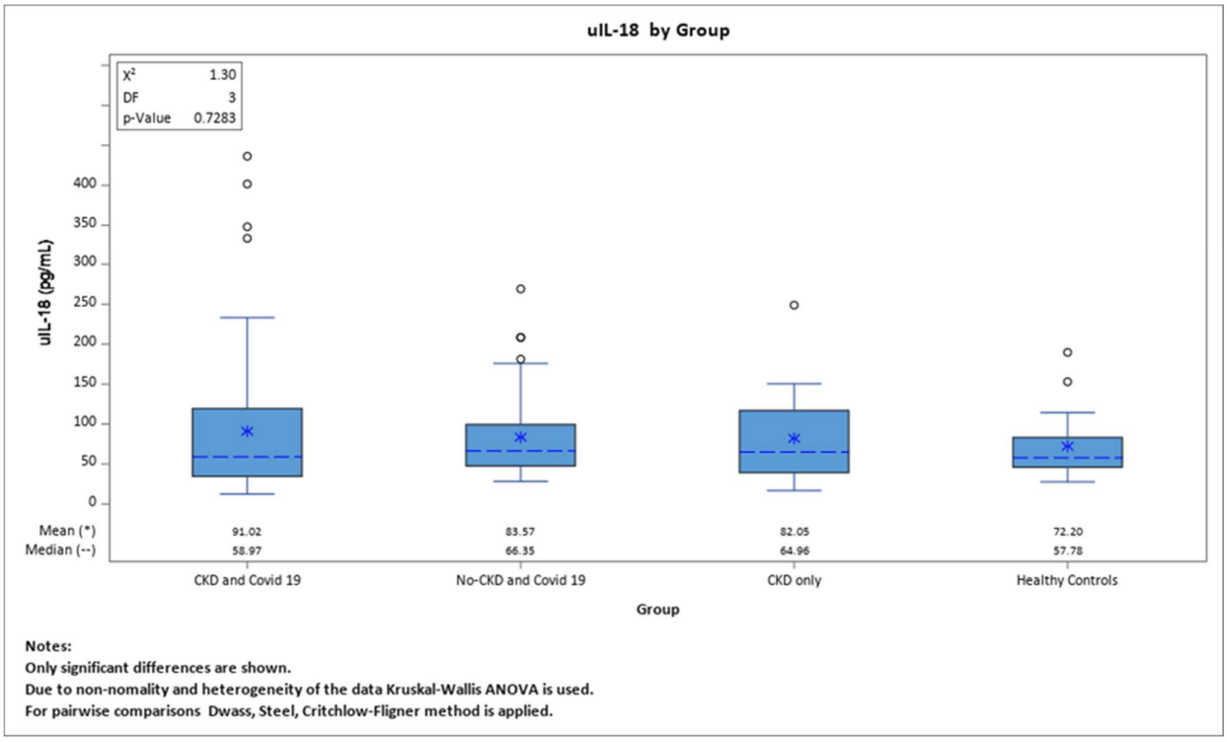
Фигура 9 *Сравнение на стойностите на SAA по групи*



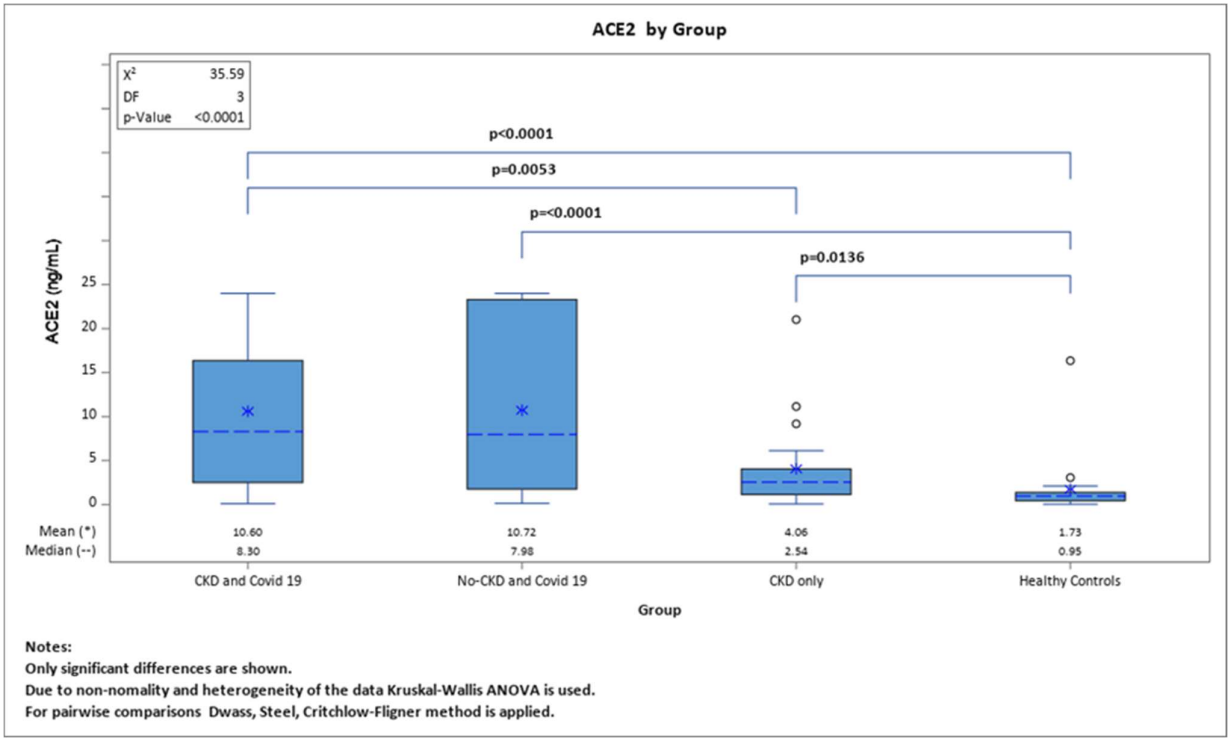
На **Фигура 10** са показани стойностите на IL-18, които са измерени в урина при междугруповото сравнение. Проведения анализ показва, че за нито една от групите стойностите не са имали сигнификантна разлика в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

На **Фигура 11** 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.

Фигура 10 *Сравнение на стойностите на uIL-18 по групи*



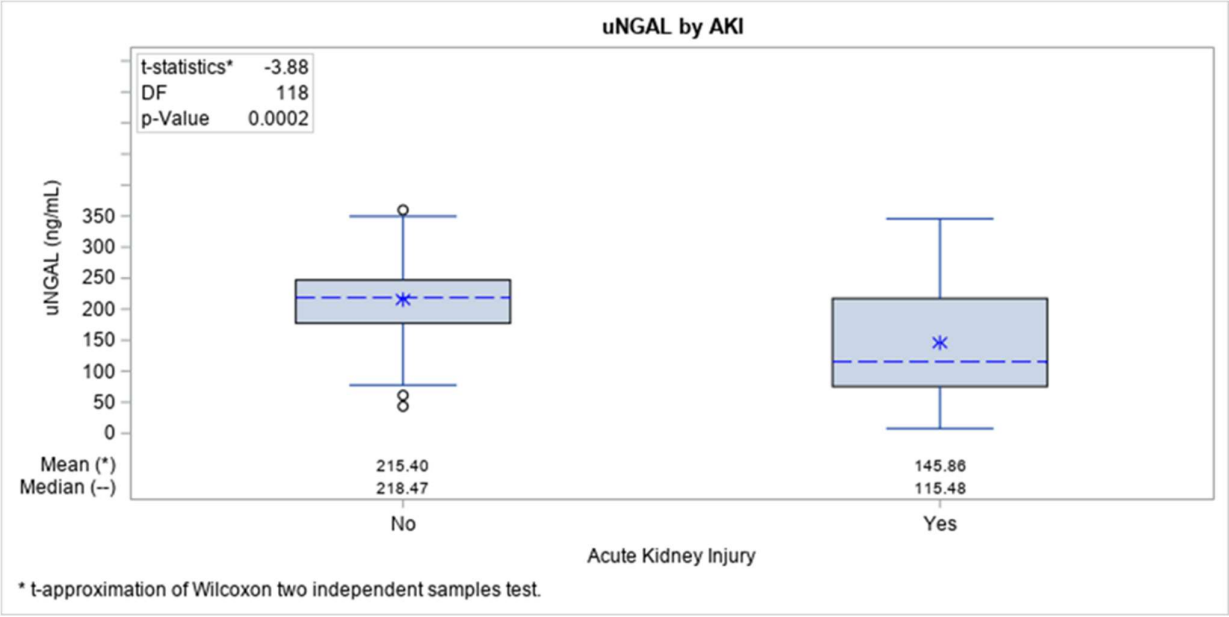
Фигура 11 *Сравнение на стойностите на ACE2 ензима по групи*



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 12-17**.

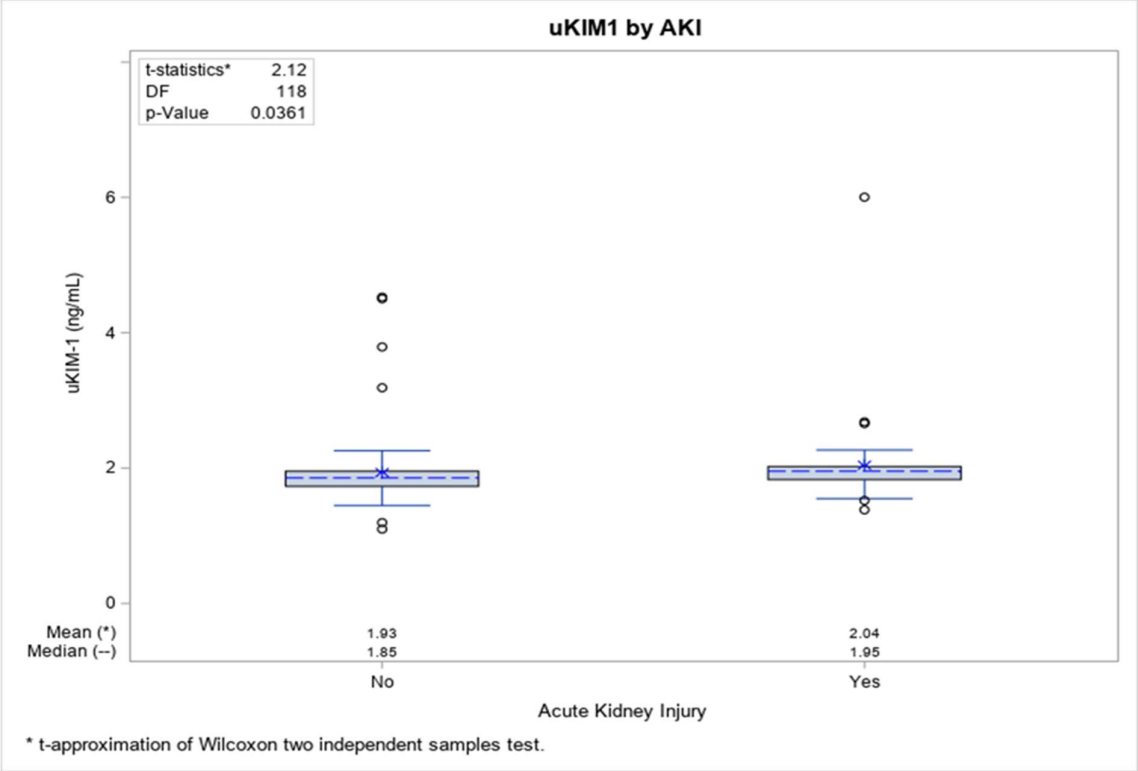
В последващите представени фигури е проведен анализ между всички 160 пациенти в кохортата като са разделени на 2 групи – пациенти с доказана ОБУ и такива, които нямат проява на остро влошаване на бъбречната функция. На **Фигура 12** е показано сравнение между двете групи при анализ на уринните стойности на NGAL, които се показаха сигнификантно по-високи при пациенти без ОБУ в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

Фигура 12 *Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – NGAL*



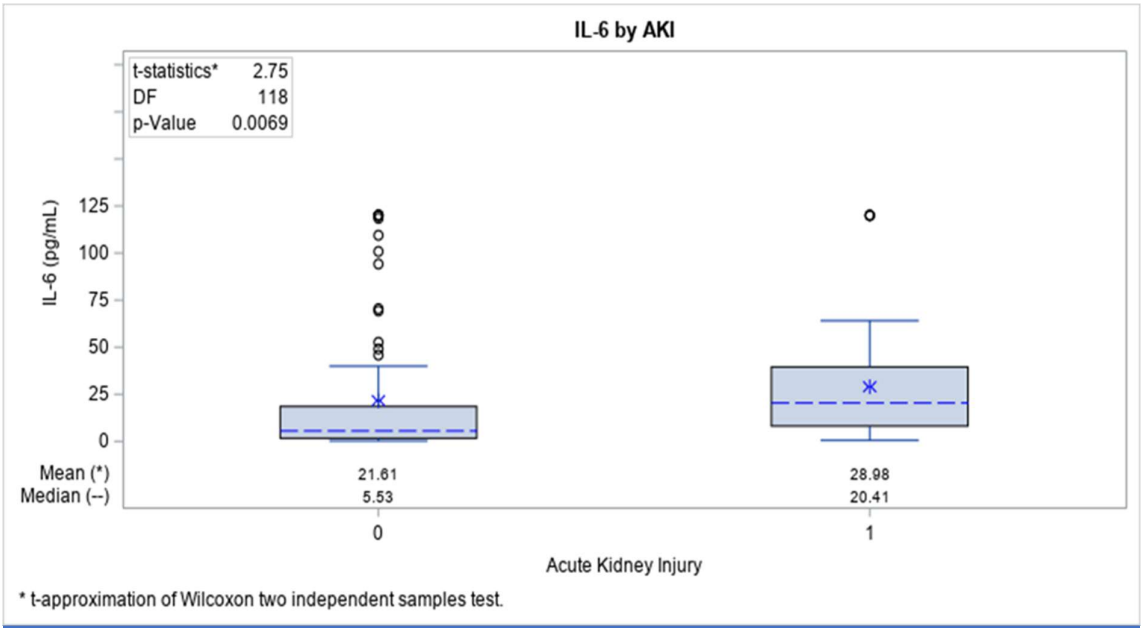
На **Фигура 13** е показано сравнение между двете групи при анализ на уринните стойности на KIM-1, които се показаха сигнификантно по-високи при пациенти с ОБУ в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

Фигура 13 *Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – KIM-1*



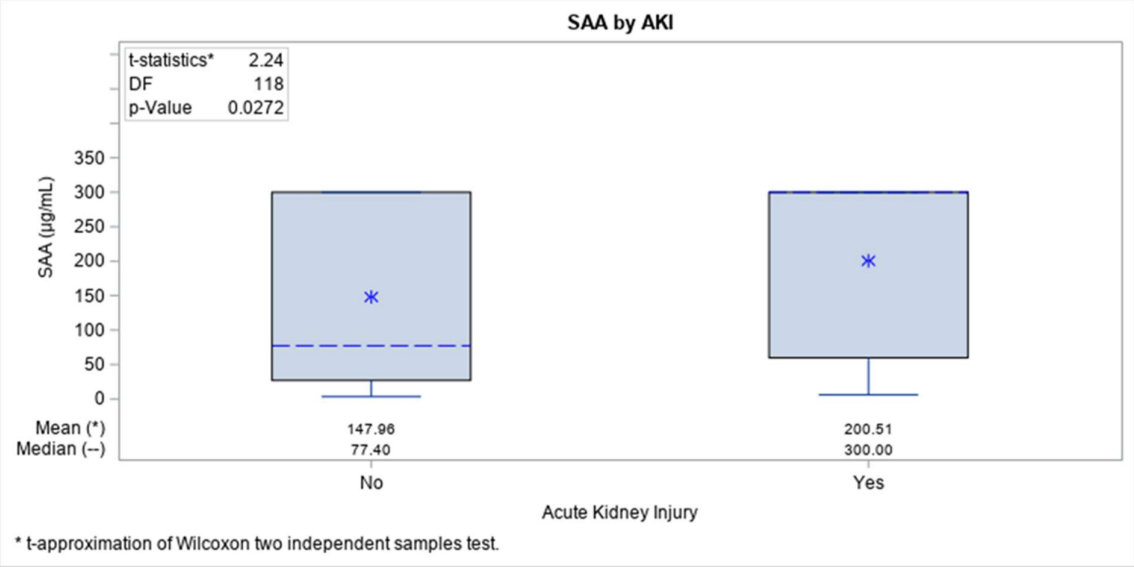
На **Фигура 14** е показано сравнение между двете групи при анализ на серумните стойности на IL-6, които се показаха сигнификантно по-високи при пациенти с ОБУ в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

Фигура 14 *Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – IL-6*



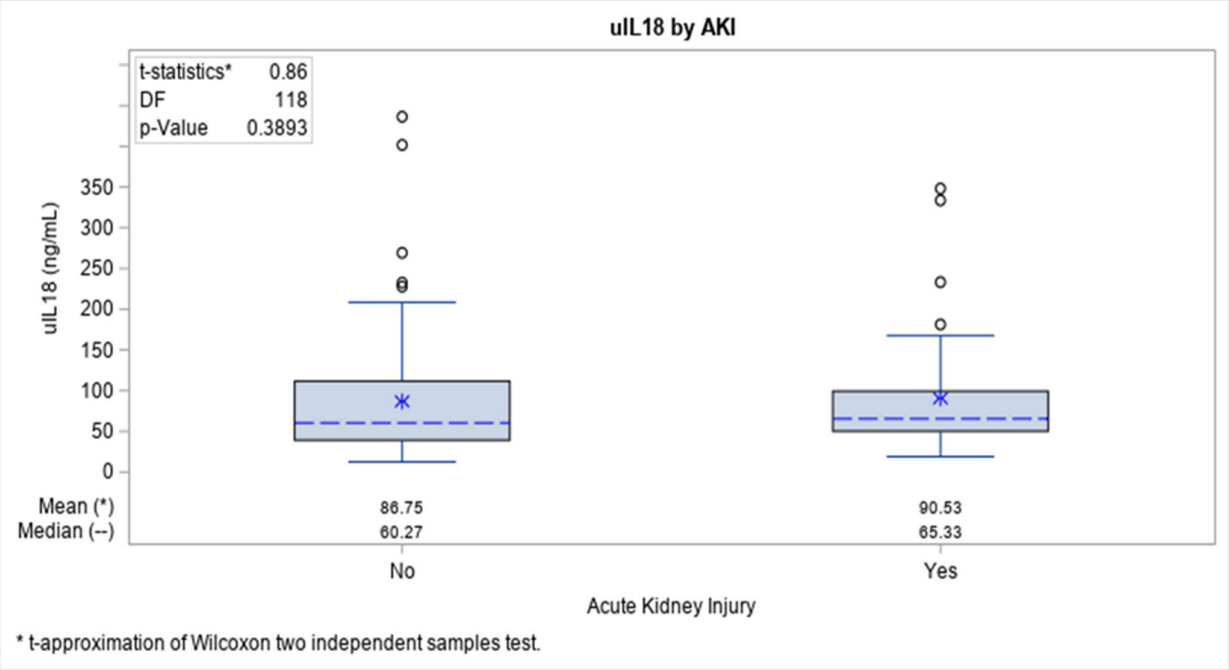
На **Фигура 15** е показано сравнение между двете групи при анализ на серумните стойности на SAA, които се показаха сигнификантно по-високи при пациенти с ОБУ в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

Фигура 15 *Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – SAA.*



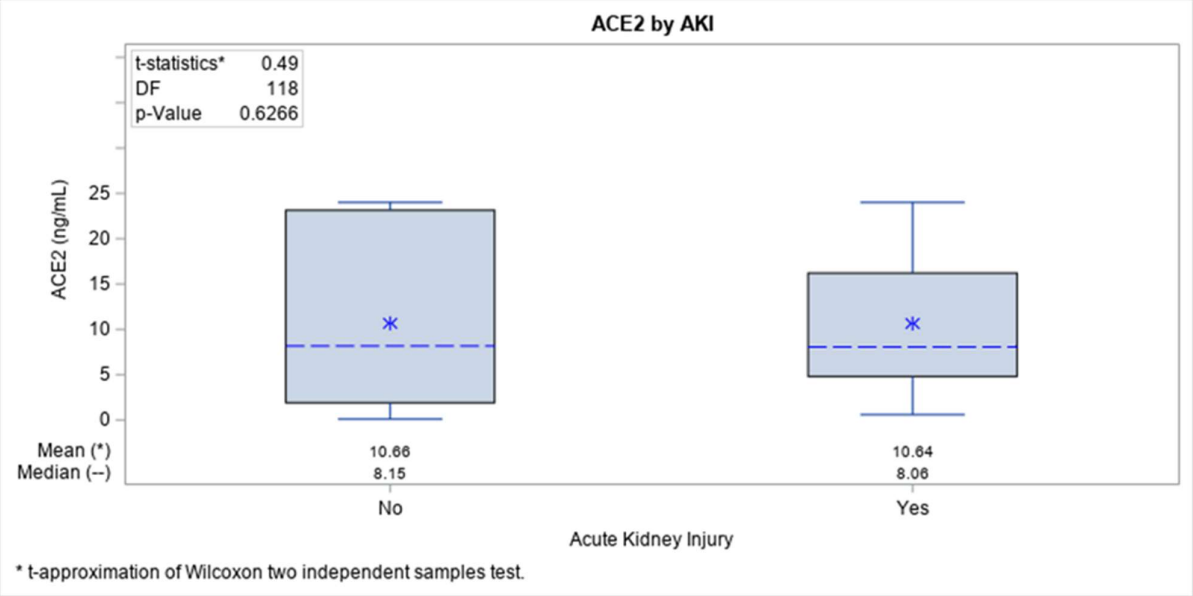
На **Фигура 16** е показано сравнение между двете групи при анализ на уринните стойности на IL-18, които не показаха сигнификантно различни стойности при нито една от двете групи в хода на SARS-CoV-2 инфекцията.

Фигура 16 Сравнение на групите за стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУІ - L-18.



На **Фигура 17** 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.

Фигура 17 *Сравнение на групите според стойностите на биомаркерите и проявата на ОБУ – ACE2.*



Допълнителни корелационни анализи са 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 18**.

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).

Таблица 18 *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.

Анализът 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

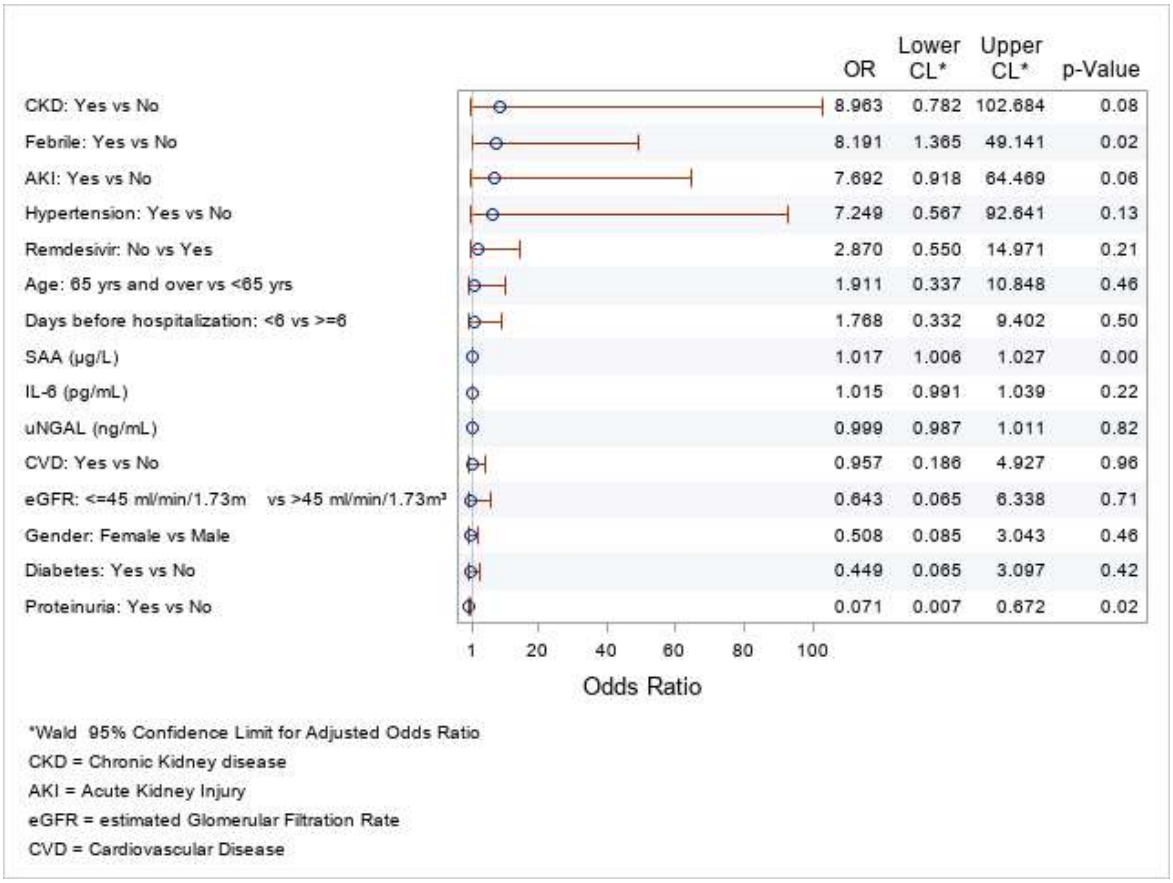
pg/ml и по-късно при 19 от тях е имало нужда от механична вентилация (70,4%). От тук се доказа още една статистическа връзка - всички тези пациенти не са преживели инфекцията със SARS-CoV-2 и са починали от напреднало засягане на белодробните структури в хода на пневмония. Нито един от тези пациенти 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 се доказа SAA, който се показа добър 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 18**)

Фигура 18 *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

Дискусия

Рискови фактори за смъртност и ОБУ

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.

Добре известно е от множеството проведени проучвания, че смъртността, която е свързана с COVID-19 има пряка зависимост от пола: т.е. пациентите от мъжки пол с COVID-19 имат значително по-висока смъртност от пациентите жени с COVID-19, което е описано в няколко ключови публикации на тази тема (Jin, и др., 2020, 8) (Niessen, Teirlinck, McDonald, van der Hoek, & van Gageldonk-Lafeber, 2022). Всички тези обширни и подробни анализи показват една тенденция - жените са по-малко склонни към

развитието на тежки форми на заболяването и смъртността при тях е по-ниска, отколкото при мъжете. Това би могло да се обясни с ролята на женските хормони в модулацията на възпалението може да е причина за тази разлика между половете (Fidecicchi, Fruzzetti, Lete Lasa, & Calaf, 2022). От проведеният анализ на изследваната от нас кохорта се потвърди именно това - наблюдаваме, че мъжкият пол е независим рисков фактор за свързаната с COVID-19 смъртност.

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). Не много отдавна Gur и сътрудници наблюдават в своите изследвания, че въпреки различната тежест на заболяването при клиничното представяне на заболяването, самите пациенти с COVID-19, които имат и ХБЗ имат значително повече случаи на остро влошавне на бъбречната функция върху хронично съществуваща бъбречна болест и се нуждаят по-често от бъбречнозаместителна терапия по време на хоспитализацията в сравнение с контролната група - пациенти с COVID-19, но без ХБЗ. Така съотношението на шансовете за ОБУ е 5,8 пъти повече (95%CI 3,8-8,7; p < 0,001) в групата с ХБЗ спрямо контролната група (Gur, и др., 2022). В неотдавнашен мета-анализ Cai и сътрудници е установено, че хроничното бъбречно заболяване е независим рисков фактор за развитие на ОБУ при хоспитализирани пациенти с COVID-19, т.е. OR = 4,56 (Cai, Wu, Zhang, & Yang, 2021).

Неотдавнашно проучване от Съединените щати (САЩ) показва, че от изследвана кохорта от 306 061 пациенти с доказана COVID-19 инфекция, 41% (126 478/306 061) са имали ОБУ. Пациентите с остро влошаване на бъбречната функция са имали по-висока смъртност в сравнение с тези без такава проява. Важно е да се отбележе, че това проучване показва, че честотата на ОБУ е била най-висока в началото на пандемията (49,3 %), но по-късно намалява (40,6 %). Тежестта на ОБУ е доказано, че е била пряко свързана със смъртността (Masthead, et al., 2022). В нашето проучване установихме, че

ОБУ независимо увеличава с повече от 5 пъти (OR 5,246 (95%CI 1,279-21,508); p = 0,02) риска от смърт, свързана с COVID-19.

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. Това предполага, че при хоспитализацията е необходимо да се спре приема на потенциално нефротоксична терапия, но също така и избягване на употребата на потенциални нефротоксични медикаменти по време на болничния престой. Ако трябва да се използват такъв вид нефротоксични лекарства, дозировката трябва да бъде съобразена с бъбречната функция, а също така трябва да се осъществява кръвен лекарствен мониторинг.

Приложение на RAAS-блокерна терапия (ARB/ACEi)

Това е анализ на неголяма група от пациенти, но е първият по рода си и никога досега не е правен за такава група пациенти в България като е и първият в света за съставен само от хора от европеидната раса.

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.

В началото на пандемията имаше противоположни мнения относно лечението с инхибитори на RAAS по време на заразяване със SARS-CoV-2, тъй като инхибиторите на RAAS повишават нивата на ангиотензин конвертиращия ензим 2, който е функционален рецептор за SARS-CoV-2, което беше силно засегнато в няколко научни труда на Wan и сътрудници в началото на пандемията (Wan Y, 2020). Оттогава насам обаче има рандомизирани контролирани проучвания при пациенти с COVID-19 на инхибитори на RAAS, при които се има за цел да се установи дали има наистина такъв ефект. RAAS-блокерите са били поддържани или преустановени за целта на тези проучвания и те показват, че резултатите (постъпване в интензивно отделение, смъртност) не са повлияни от това, каква е стратегията на инхибиторите на PAAC по време на инфекцията с SARS-CoV-2 (Lopes RD, 2021) (Bauer A, 2021).

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).

В едно от големите проучвания проведено от Bae и колектив изследват кохорта от 1374 пациенти с хипертония с COVID-19, от които 1076 (78,3%) са приемали редовно RAAS-блокери и 298 (21,7%), които никога не са употребявали инхибитори на RAAS-блокери. Основният изход при пациентите е бил съставен от постъпване в интензивно

отделение, инвазивна механична вентилация, продължителна бъбречнозаместителна терапия, екстракорпорална мембранна оксигенация (ECMO) и смърт от COVID-19. Те са установили, че употребяващите инхибитори на RAAS не са свързани с риска от първичния резултат и дори напротив- рискът от приемане в интензивно отделение е бил значително по-нисък при употребяващите, отколкото при никога не употребявалите (aOR, 0,44; 95% CI: 0,24 до 0,84), особено при пациентите, които не са се нуждаели от инвазивна механична вентилация (Bae JH, 2021). Наистина, ние установихме, че в сравнение с нелекуваните с инхибитори на RAAS пациенти, лекувани с инхибитори на ACEi/ARB, вероятността за последващо приемане в интензивно отделение е била с 50% по-малка (т.е, 11% срещу 22,6%), въпреки, че разликата не е статистически значима. Подобно изследване е на Banwait и сътрудници, което показва в голяма кохорта от 2726 пациенти с COVID-19 от 178 болници в САЩ, че приемът на ACEi/ARB преди постъпването в болнично заведение при пациенти с COVID-19 е независимо свързан с намалена нужда от механична вентилация и болнична смъртност.

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 това проучване включващо пациенти с или без ХБЗ, ние оценихме информативността на биомаркерите в кръвта и урината, които бяха количествено измерени и оценени от взетите проби при постъпването в болница. Това е с цел да се определи дали те имат достатъчна информативна стойност и дали могат да спомогнат за прогноза във връзка с риска от последваща смърт и/или ОБУ. Тези биомаркери включват NGAL, KIM-1, IL-18 в урината и IL-6, CRP и ACE2 в серума.

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).

Има голямо проучване проведено от Wang и сътрудниците му във връзка с IL-6, от което резултатите са показват, че нивото на IL-6 има значителна положителна корелация със серумния креатинин и урея в кръвта (Wang, и др., 2021). В едно от другите проучвания с принос в сферата проведено от Joseph и научни сътрудници при пациенти с COVID-19 е установено, че серумните нива на IL-6 са повишени при пациенти с доказана ОБУ (Joseph, Zafrani, Mabrouki, Azoulay, & Darmon, 2020). Също така пилотно проучване проведено от италианският научен екип на Villa доказва, че серумните нива на IL-6 могат да предскажат и клиничните резултати за ОБУ (Villa, и др., 2020). Нива на IL-6 със стойност >25 pg/ml могат да показват повишен риск от дихателна недостатъчност в контекста на инфекция с COVID-19 (Herold, и др., 2020).

Тук ние потвърждаваме този резултат, т.е. от 27 пациенти с COVID-19, при които резултатите за IL-6 са били >25 pg/mL при постъпването, по-късно 19 (70,4%) от тях са се нуждаели от механична вентилация. Също така установихме, че нивата на IL-6 са значително по-високи при пациентите с COVID-19, както и при пациентите с ХБЗ без COVID-19 в сравнение със здравите доброволци. Също така всички пациенти с потвърдена COVID-19 инфекция, които са имали ОБУ са имали значително по-високи нива на IL-6 в сравнение с тези, които не са имали доказано остро влошаване на бъбречната функция (20,4 срещу 5,53 pg/ml).

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 проучване проведено от Schrezenmeier и сътрудници е установено, че експресията на KIM-1 в урина (uKIM-1) е драстично повишена при увреждане на бъбреците след исхемия/реперфузия при плъхове, както и при модели на ОБУ, които са предизвикани от лекарства, отново изследвани при гризачи. Експресията му се повишава главно в клетките на проксималните тубули, както при гризачи, така и при хора. KIM-1 играе важна роля при възстановяването на бъбреците и регенерацията на тубулите (Schrezenmeier, Barasch, Budde, Westhoff, & Schmidt-Ott, 2017, 219). В проспективно проучване са оценени 19 уринарни биомаркера за прогнозиране на остро влошаване на бъбречната функция при пациенти с COVID-19; сред тях са установени двойно по-високи нива на NGAL (HR, 1,34 [95% CI, 1,14-1,57]), моноцитен хемоатрактант протеин (MCP-1) (HR, 1,42 [95% CI, 1. 09-1,84]) и KIM-1 (HR, 2,03 [95% CI, 1,38-2,99]) като именно тези три биомаркера са свързани с прогнозиране в най-висока степен риска от проява на ОБУ (отново е използван критерия на KDIGO). Пациентите, които са показали най-достоверни резултати са били в Стадий 3 на ОБУ (KDIGO), с необходимост от провеждане на хемодиализа и някой от тях са починали в рамките на 60 дни от приемането в болница (Sabaghian, и др., 2022). Отделните биомаркери обаче осигуряват умерена степен на прогноза за предстоящо влошаване на бъбречната функция, а комбинациите от няколко биомаркери увеличава шанса за прогноза.

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 контекста на инфекция с COVID-19 Xu и сътрудници имат проведено проспективно кохортно наблюдателно проучване, състоящо се от 444 последователни пациенти, което оценява количеството на уринния NGAL (uNGAL) при постъпване в болница. Те установяват, че нивата на uNGAL са пряко са свързани с възможността за поставяне на диагнозата ОБУ, както и за прогнозиране на стадия според критерия на KDIGO (267 ± 301 срещу 96 ± 139 ng/mL, $p < 0,0001$). Нивата на uNGAL >150 ng/mL имат 80% специфичност и 75% чувствителност за диагностициране на ОБУ в Стадий 2 или 3. При постъпване нивото на uNGAL е количествено свързано с продължително ОБУ, диализа, шок, продължителна хоспитализация и болнична смърт, дори когато нивото на серумния креатинин при постъпване не е повишено (Xu, et al., 2021). Обратно, ниските нива на uNGAL при постъпване изключват стадий 2-3 на ОБУ (отрицателна прогностична стойност: 0,95, 95% CI: 0,92-0,97) и необходимостта от хемодиализа (отрицателна прогностична стойност: 0,98, 95% CI: 0,96-0,99).

За разлика от тях, в изследваната кохорта от 153 пациенти с COVID-19, Menez и сътрудници оценяват полезността на уринни биомаркери като NGAL, KIM1, MCP1 за прогнозиране на ОБУ. Те наблюдават, че отделните биомаркери осигуряват умерена способност за прогнозиране на настъпването на остро влошаване на бъбречната функция и по-скоро показват, че няма такава специфичност при самостоятелното използване на един биомаркер. Те подчертават, че комбинациите от биомаркери подобряват прогнозата за настъпване на ОБУ за първичния резултат и подчертават, че самостоятелно няма биомаркер, който да има такава ясно подчертана и категорична точност (Menez, и др., 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. Изненадващо е обаче, че uNGAL е бил значително по-нисък при тези, които са развили ОБУ в хода на проведено лечение, в сравнение с тези, които нямат данни за остро влошаване на бъбречната функция ОБУ (115,48 срещу 218,47 ng/mL; p = 0,0002). Няма ясна логична връзка на получения резултат, но той по-скоро е в подкрепа на неспецифичността на NGAL и за това, че единствен биомаркер не е с достатъчна прогностична способност в контекста на ОБУ без значение дали има подлежащо ХБЗ или не.

Сериозно внимание се отдели на SAA като маркер, който е способен да предскаже хода на вирусната инфекция предизвикана от SARS-CoV-2. В научната работа на Li Huan и научен колектив проведе проучване, в което бяха събрани общо 132 пациенти с потвърден COVID-19, които са били приети в специализирана болница за лечение на COVID-19 в Ухан, Китай като пациентите са постъпили за болнично лечение в периода от 18 януари 2020 г. до 26 февруари 2020 г. От проведения анализ за серумните стойности на SAA има установени няколко много важни резултата:

- Нивото на SAA и CRP значително се повишава при пациентите с COVID-19
- С напредването на заболяването от леко до критично тежко SAA и CRP постепенно се увеличават.
- SAA е ценен за прогнозиране на тежестта на заболяването и за разграничаване на критично болните пациенти от леко болните.
- Пациентите с по-висок начален SAA е по-вероятно да имат лошо КТ изображение

Пациентите в това проучване са разделение на 3 групи (според тежестта на белодробното засягане) като се установява, че колкото по-голямо е засягане на белодробния паренхим, толкова по-високи са стойностите на SAA (Huan Li, 2020).

В друго проучване, което е проведено от Abbas и научен колектив при 102 пациенти с потвърдена COVID-19 ифекция, които са приети в болница King Fahd General Hospital, град Джеда, Саудитска Арабия, в периода от 1 юли 2021 г. до 5 август 2021 г, SAA е посочен като чувствителен индикатор за определяне на тежестта на заболяването. Същевременно е доказан като маркер със сериозна стойност при прогноза за клиничния развой на заболяването при сравнение с други от използваните биомаркери при пациенти с COVID-19. Освен това комбинираната прогнозна вероятност при използване на нивата

на SAA и CRP , в допълнение към SAA и броя на левкоцитите и в частност на неутрофилите и лимфоцитите при постъпване, може значително да подобри чувствителността и специфичността на прогнозата за тежестта на заболяването (Amal A. Abbas, Volume 2022).

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 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). Valk и сътрудници установиха, че въпреки лошата прогностична способност CTSS е силно свързан със смъртността в интензивното отделение (Valk, и др., 2022). Almasi Nokiani и сътрудници от своя страна доказаха, че CTSS е отличен инструмент за триаж и прогнозиране при пациенти с COVID-19 на възраст ≥65 години, но е с ограничена прогностична способност при по-млади пациенти (Almasi Nokiani, и др., 2022). Същевременно някои проучвания (Colombi и стр.; Gervaise и стр.) установяват положителна корелация между степента на засягане на белите дробове с КТ и краткосрочната смъртност, т.е. CTSS е оценен като такъв с добра прогностична способност (Colombi, и др., 2020) (Gervaise, Bouzad, Peroux, & Helissey, 2020). Освен това е установена значима, правопропорционална връзка между висок CTSS и постъпването в болница, постъпването в интензивно отделение, както и 30-дневната смъртност (Lieveld, и др., 159).

В нашето проучване 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.

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.

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.

Приноси

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

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

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

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

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

Публикации

• **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

Библиография

A., A.-S. H. (2020). COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood*, 489-500.

Adem S, E. V. (2020). Identification of Potent COVID-19 Main Protease (Mpro) Inhibitors from Natural Polyphenols: An in Silico Strategy Unveils a Hope against CORONA. *0*.

Ader, F., Bouscambert-Duchamp, M., Hites, M., Peiffer-Smadja, N., Poissy, J., Belhadi, D., . . . al., e. (2022). Remdesivir plus standard of care versus standard of care alone for the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19 (DisCoVeRy): A phase 3, randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect. Dis.* , 209–221.

Albert, C., Zapf, A., Haase, M., Röver, C., Pickering, J., Albert, A., . . . al., e. (2020). eutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Measured on Clinical Laboratory Platforms for the Prediction of Acute Kidney Injury and the Associated Need for Dialysis Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. . *Am. J. Kidney Dis.* , 76, 826–841.e1.

Alfano, G., Ferrari, A., Fontana, F., Mori, G., Magistroni, R., Meschiari, M., . . . al., e. (2021, 25). Incidence, risk factors and outcome of acute kidney injury (AKI) in patients with COVID-19. *Clin. Exp. Nephrol.* , 1203–1214.

Almasi Nokiani, A., Shahnazari, R., Abbasi, M., Divsalar, F., Bayazidi, M., & Sadatnaseri, A. (2022). CT-severity score in COVID-19 patients: For whom is it applicable best? . *Caspian J. Intern. Med.* , 13 (Suppl. S3), 228–235.

Amal A. Abbas, A. A. (Volume 2022). Role of Serum Amyloid A as a Biomarker for Predicting the Severity and Prognosis of COVID-19. *Jour. of Imun. Research*, Article ID 6336556 .

Angelo Zinellu, P. P. (2021). Serum amyloid A concentrations, COVID-19 severity and mortality: An updated systematic review and meta-analysis. *Int Jour of Inf Diseases*, 668-674.

Armstrong J, N. H. (1984). Siquence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from coronavirus. *Nature*, 751-2.

Bae JH, C. S. (2021). Use of Renin-Angiotensin-Aldosterone system inhibitors and severe COVID-19 outcomes in patients with hypertension: a nationwide cohort study. *Diabetes Metab J.* , 430–438.

Bauer A, S. M. (2021). Discontinuation versus continuation of renin-angiotensin-system inhibitors in COVID-19 (ACEI-COVID): a prospective, parallel group, randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Respir Med.* , 863–872.

Bolignano D, C. G. (2008). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transpl.*, 414-416.

C., L. L. (2014). A review of chronic kidney disease and the immune system: A special form of immunosenesence. *J Gerontol Geriatr Res*.

Cai, X., Wu, G., Zhang, J., & Yang, L. (2021). Risk Factors for Acute Kidney Injury in Adult Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Med.*, 8, 719472.

Cao, Y., Yang, R., Lee, I., Zhang, W., Sun, J., Wang, W., & Meng, X. (June 2021). Characterization of the SARS-CoV -2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Science*, 1114–1130.

CDC, C. f. (12 07 2021 r.). *People with Certain Medical Conditions* . Извлечено от https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html.

CDC, C. f. (13 05 2021 r.). *Underlying Medical Conditions Associated with High Risk for Severe COVID-19: Information for Health Care Providers*. Извлечено от https://www.cdc.gov./coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/underlyingconditions.html.

Chan JF-W, Y. S.-H. (2020). A familial cluster of pneumonia associated wit the 2019 novel coronavirus indication person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*, 514-23.

Channappanavar R, F. A. (2016). Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host Microbe*, 181-93.

Channappanavar R, P. S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin. Immunopathol*, 529–539.

Charles L Edelstein, T. S. (2007). Proximal tubules from caspase-1-deficient mice are protected against hypoxia-induced membrane injury. *Nephrol Dial Transplant*, 1052-1061.

Chen G, W. D. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*, 2620-9.

Chen J, J. Q. (2020). Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation . *Aging Cells* , 19.

Cheng Y, L. R. (2020). Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19 . *Kidney international*.

Chirag R Parikh, A. J. (2004). Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis*, 405-414.

Collaborators, G. 2. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 1459-1544.

Cowley JA, D. C. (2000). Gill-associated virus of Penaeus monodon prawns: an inverteble virus with ORF1a and ORF1b genes related too arter- and coronaviruses. *J Gen Virol*, 1473-83.

Cui Jm Li F, S. Z. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* , 181-92.

Dawei Wang, B. H. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 1061–1069.

De Abajo FJ, R. M.-A.-L. (2020). MED-ACE2-COVID19 study group. Use of renin-angiotensin-aldosteron system inhibitors and risk of COVID-19 requiring admission to hospital: a case-population study. *Lancet*, 1705-1714.

DeDiego, M. L., Nieto-Torres, J. L., Jimenez-Guardeño, J. M., Regla-Nava, J. A., Castaño-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., . . . Enjuanes, L. (2014). Coronavirus virulence genes with main focus on SARS-CoV envelope gene. *Virus research*, 124-137.

Dennis McGonagle, K. S. (2020). The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev.*, 19(6):102537.

Diebold, M., Schaub, S., Landmann, E., Steiger, J., & Dickenmann, M. (2021). Acute kidney injury in patients with COVID-19: A retrospective cohort study from Switzerland. *Swiss Med. Wkly.* , 151.

ECDC. (2020). *www.ecdc.europa.eu*. Извлечено от www.ecdc.europa.eu: http://www.ecdc.europa.eu/en/geographic aldistribution-2019-ncov-cases

Edward D Siew, T. A. (2010). Elevated urinary IL-18 levels at the time of ICU admission predict adverse clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1497-1505.

F., L. (2016). Structure, function and evolution of the coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol*, 237-61.

Fan Wang, J. N. (2020). Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *Journal of inf dis of Oxford*, 1762–1769.

Fang Liu, L. L. (2020). Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *Journal of Clinical Virology*.

Fidecicchi, T., Fruzzetti, F., Lete Lasa, L., & Calaf, J. (2022). COVID-19, gender and estroprogestins, what do we know? *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care* , 27, 67–74 .

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

Gabriela E. Garcia Q, L. D. (13.09.2021). Angiotensin-converting enzyme 2 decreased expression during kidney inflammatory diseases. *Kidney International* .

Gang Jee Ko, D. N. (2010). Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 1472-1483.

GBD. (2017). Chronic Kidney Disease Collaboration Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Ланцет*, 709–733.

Gervaise, A., Bouzad, C., Peroux, E., & Helissey, C. (2020). Acute pulmonary embolism in non-hospitalized COVID-19 patients referred to CTPA by emergency department. *Eur. Radiol.* , 30, 6170–6177.

Gottlieb, R., Vaca, C., Paredes, R., Mera, J., Webb, B., Perez, G., . . . Brown, M. (2022, 386). Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe COVID-19 in Outpatients. *N. Engl. J. Med.* , 305–315.

Guan W, N. Z. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease in China. *The New England Journal of Medicine*, 1708-1720.

Guo YR, C. Q. (2020). The origin, transmission and linical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on status. *Military Medical Research*, 7.

Gur, E., Levy, D., Topaz, G., Naser, R., Wand, O., Kitay-Cohen, Y., . . . Cohen-Hagai, K. (2022). Disease severity and renal outcomes of patients with chronic kidney disease infected with COVID-19. *Clin. Exp. Nephrol, 26*, 445–452.

Hafize Seda Vatansever, E. B. (2020). Relationship between IL-6 and COVID-19: to be considered during treatment. *Future Virology*, Vol.15, No 12.

Hamming I, T. W. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein. First step of undertanding SARS-CoV-2 . *Journal of pathology* , 631-7.

Herold, T., Jurinovic, V., Arnreich, C., Lipworth, B., Hellmuth, J., von Bergwelt-Baildon, M., . . . Weinberger, T. (2020). Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol.* , 128–136.e4.

Huan Li, X. X. (2020). Serum Amyloid A is a biomarker of severe Coronavirus Disease and poor prognosis. *Journal of Infection*, Vol.80, 6, 646-655,.

Huang C, W. Y. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus infection in Wuhan, China. *Lancet*, 497-506.

Imig JD, R. M. (2013). Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol.*, 957-976.

J Kampmann, K. S.-N. (1974). Rapid evaluation of creatinine clearance. *Kidney international*, 517-520.

Jafrin, S., Aziz, A., & Islam, M. (2022). Elevated Levels of Pleiotropic Interleukin-6 (IL-6) and Interleukin-10 (IL-10) are Critically Involved With the Severity and Mortality of COVID-19: An Updated Longitudinal Meta-Analysis and Systematic Review on 147 Studie. *Biomark. Insights* , 17, 11772719221106600.

Jennie Lin, H. F. (2015). False-positive rate of AKI using consensus creatinine-based criteria. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1723-1731.

Jewell, P., Bramham, K., Galloway, J., Post, F., Norton, S., Teo, J., . . . al., e. (2021). COVID-19-related acute kidney injury; incidence, risk factors and outcomes in a large UK cohort. *BMC Nephrol.*, 22, 359.

Jiawei C, Q. J. (2020). Individual variation of SARS-CoV-2 eceptor ACE 2 gene expression and regulation . *Biomed Journal of Science* , 27 .

Jin Y, Y. H. (2020). Virology, epidemiology, pathogenesis and control of Covid-19. . *Viruses* , 372.

Jin, J., Bai, P., He, W., Wu, F., Liu, X., Han, D., . . . Yang, J. (2020, 8). Gender differences in patients with COVID-19: Focus on severity and mortality. *Front. Public Health* , 152.

Joseph, A., Zafrani, L., Mabrouki, A., Azoulay, E., & Darmon, M. (2020). Acute kidney injury in patients with SARS-CoV-2 infection. *Ann. Intensive Care.*, 117. .

K Miyauchi, Y. T. (2009). Upregulated IL-18 expression in type 2 diabetic subjects with nephropathy: TGF-beta1 enhanced IL-18 expression in human renal proximaltubular epithelial cells. *Diabetes Res Clin Pract*, 83-93.

Kandeel M, E. K.-D. (2019). Spicies specifity and host affinity rather than tissue tropism controls codon usage pattern in respiratory mycoplasmosis . *J Camel Preact Res* , 29-40.

Kaur U, C. S. (2021). Renin-angiotensin-aldosterone system blockers and region-specific variations in COVID-19 outcomes: findings from a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Drug Saf.* , 12:20420986211011345.

Koyner, J. (2012). Biomarkers predict progression of acute kidney injury after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol*.

Kuno, T., Miyamoto, Y., Iwagami, M., Ishimaru, M., Takahashi, M., & Egorova, N. (2021). The association of remdesivir and in-hospital outcomes for COVID-19 patients treated with steroids. *Antimicrob. Chemother.* , 2690–2696.

Kuo, L., & Masters, P. S. (2003). The Small Envelope Protein E Is Not Essential for Murine Coronavirus Replication. *Journal of Virology*, 4597–4608.

Labroots. (2020). *www.labroots.com*. Извлечено от www.labroots.com: http;//www.labroots.com/trending/genetics-and-genomics/17521/conspiracy-theores-surrounding-origins-sars-cov-2

Lan J, G. J. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 receptor binging domain bound to the ACE2 receptor . *Nature*, 215-20.

Lauer SA, G. K. (2020). The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicity reported confirmed cases: Estimation and applications. *Annals of Internal Medicine*, 577-582.

Laura C Plantinga, L. E. (2008). Patient awareness of chronic kidney disease: trends and predictors. *Arch Intern Med.* , 2268-2275.

Lee SA, P. R. (2021). Increased risk of acute kidney injury in coronavirus disease patients with renin-angiotensin-aldosterone-system blockade use: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* , 11:13588.

Li F, L. W. (2005). Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*, 1864-8.

Li W, S. Z. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses in bats. *Science*, 676-9.

Li Z, W. M. (2020). Caution on kidney disfunctions of 2019-nCoV patients . *MedRxiv*.

Lieveld, A., Azijli, K., Teunissen, B., van Haaften, R., Kootte, R., Van Den Berk, I., . . . Nanayakkara, P. (159). Chest CT in COVID-19 at the ED: Validation of the COVID-19 Reporting and Data System (CO-RADS) and CT Severity Score: A Prospective, Multicenter, Observational Study. *Chest 2021*, 1126–1135.

Lisa M Barton, E. J. (2020). COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. *Am J Clin Pathol.*, 725–733.

Liu CH, J. A. (2019). Antiviral activities of silymarin and derivates. *Molecules*, 1-15.

Liu S-L, S. L. (2020). No credible evidence supporting claims of laboratory engineering of SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infec*, 505-7.

Lopes RD, M. A. (2021). Effect of discontinuing vs continuing angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers on days alive and out of the hospital in patients admitted with COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA*, 325; 254–264.

M Haase, A. H.-F. (2011). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Crit Care*, 18.

M L Rocci Jr, P. H. (1984). Creatinine serum concentrations and H2-receptor antagonists. *Clinical Nephrology*, 214-215.

Marakala, V. (2022). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in kidney injury—A systematic review. *Clin. Chim. Acta*, 536, 135–141.

Masthead, Yoo, Y., Wilkins, K., Alakwaa, F., Liu, F., Torre-Healy, L., . . . al., e. (2022). COVID-19-associated AKI in hospitalized US patients: Incidence, temporal trends, geographical distribution, risk factors and mortality . *medRxiv* .

Menez, S., Moledina, D., Thiessen-Philbrook, H., Wilson, F., Obeid, W., Simonov, M., . . . al., e. (2022). Prognostic Significance of Urinary Biomarkers in Patients Hospitalized With COVID-19. *Am. J. Kidney Dis.* , 79, 257–267.e1. .

Michael G Shlipak, R. S. (2012). Urinary markers of kidney injury and kidney function decline in HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 565-573.

Mitsnefes M, K. T. (2008). Serum NGAL as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.*, 101-108.

MM Van Timmeren, M. V. (2007). Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1)in human renal disease. . *J Pathol*, 212-219.

MR, T. (2016). Immunity and chronic kidney disease. *Imminopahtol Persa*, 16.

Murashima M, N. M. (2019). Inflammation as a predictor of acute kidney injury and mediator of higher mortality after acute kidney injury in non-cardiac surgery. *Sci Rep.*, 9:20260.

Naicker S, Y. C. (2020). The novel coronavirus 2019 epidemic and kidneys. *Kidney Int.*, 824-8.

Nath, K., Singh, R., Grande, J., Garovic, V., Croatt, A., Ackerman, A., . . . Agarwal, A. (2021). Expression of ACE2 in the Intact and Acutely Injured Kidney. *Kidney360* , 1095–1106.

Neuman BW, K. G. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol* , 11-22.

Ng, J., Hirsch, J., Hazzan, A., Wanchoo, R., Shah, H., Malieckal, D., . . . al., e. (2021). Northwell Nephrology COVID-19 Research Consortium. Outcomes among Patients Hospitalized With COVID-19 and Acute Kidney . *Am. J. Kidney Dis.* , 77, 204–215.

Niessen, A., Teirlinck, A., McDonald, S., van der Hoek, W., & van Gageldonk-Lafeber, R. (2022). RIVM COVID-19 epidemiology, surveillance group, Knol MJ. Sex differences in COVID-19 mortality in the Netherlands. *Infection*, 50, 709–717.

Ortega JT, S. M. (2020). Role of the changes in SARS-CoV-2 spike protein in the interaction with the human ACE2 receptor. *EXCLI J*, 410,7.

Oussalah A, G. S. (2020). Long-term ACE inhibitor/ARB use is associated with severe renal dysfunction and acute kidney injury in patients with severe COVID-19: results from a referral center cohort in the Northeast of France. *Clin Infect Dis.* , 71:2447–56.

P L Zhang, L. I. (2008). Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int. 73* , 608-614 .

Page M.J., T. G. (2019). Serum amyloid A binds to fibrin(ogen), promoting fibrin amyloid formation. *Sci Rep.* .

Pan L, M. M. (2020). Clinical characteristics of COVID-19 patients with digestive symptoms in Hubei, China: A descriptive, cross-sectional, multicenter study. *American Journal of Gastroenterology* , 766-773.

Park, M. D. (2020). Macrophages: a Trojan horse in COVID-19? *Nat Rev Immunol.* , 351–351.

Perrier A, B. A. (2019). The C-terminal domain of the MERS Coronavirus M protein contains a trans-Golgi network localization signal . *Journal og Biological Chemistry*, 14406-21.

Prasad N, P. M. (2018). Infection-induced kidney diseases. *Front Med*, 1-11.

Prompetchara E, K. C. (2020). Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: lessons learned from SARS and MERS epidemic. . *Asian Pac J Allergy Immunol*, 1-9.

Qin, Z., Li, H., Jiao, P., Jiang, L., Geng, J., Yang, Q., . . . Su, B. (2022). The value of urinary interleukin-18 in predicting acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Ren. Fail.* , 1717–1731.

Rabb H, G. M. (2016). Inflammation in AKI: Current understanding, key question and knowledge gaps. *J Soc Nephrol*, 371-379.

Raj VS, O. A. (2014). MERS: emergence of novel human coronavirus . *Curr Opin Virol* , 58-62.

Robert J Anderberg, R. L. (2015). Serum amyloid A and inflammation in diabetic kidney disease and podocytes. *Laboratory Investigation* , Vol. 95, p. 250–262 .

Sabaghian, T., Kharazmi, A., Ansari, A., Omidi, F., Kazemi, S., Hajikhani, B., . . . al., e. (2022). COVID-19 and Acute Kidney Injury: A Systematic Review. *Front. Med.*, 9, 705908.

Sachin S Soni 1, D. C. (2010). NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol*, 142-151.

Sah R, R.-M. A. (2020). Complete genome siquence of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) strain isolated in Nepal. *Microbiol Resour Announc*, 9-11.

Saygili, S., Canpolat, N., Cicek, R., Agbas, A., Yilmaz, E., Sakalli, A., . . . al., e. (2022). Clinical and subclinical acute kidney injury in children with mild-to-moderate COVID-19. *Pediatr. Res., 7* , 1–7.

Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virulogy Journal*.

Schrezenmeier, E., Barasch, J., Budde, K., Westhoff, T., & Schmidt-Ott, K. (2017, 219). Biomarkers in acute kidney injury—Pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol.* , 556–574.

Shaila R, T. B. (2020). COVID-19: The new threat. *Int J Infect*, 7e102184.

Shang W, Y. Y. (2020). The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines . *Vaccines (Basel)*, 1-3.

Singbartl K, F. C. (2019). Kidney-immune system crosstalk in AKI. *Semin Nephrol.*, 96-106.

Singer, E. (2011). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. *Kidney International*.

Singh R, R. S. (2022). Mortality and severity in COVID-19 patients on ACEIs and ARBs-A systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis. *Front Med (Lausanne)* , 8:703661.

Smith AR, B. M. (1990). Identification of a new membrane associated polupetide specified by coronavirus infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* , 3-11.

Soheil Tavakolpour, T. R. (2020). Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. *Immunol Lett.* , 225-231.

Soheila Montazersaheb, S. M. (2022). COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virology Journal*.

Steven G Coca, G. N. (2017). Plasma Biomarkers and Kidney Function Decline in Early and Established Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* , 2786-2793.

Steven G Coca, G. N.-P.-A. (2016). First Post-Operative Urinary Kidney Injury Biomarkers and Association with the Duration of AKI in the TRIBE-AKI Cohort. *PLoS ONE*, 11 (8):e0161098.

Su H, Y. M. (2020). Renal histopathological analysis og 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China . *Kidney international*, 219-27.

Syed-Ahmed M, N. M. (2019). Immune dysfunction and risk of infection in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 8-15.

System, U. S. (2016). USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. *Bethesda*.

T Ichimura, J. V. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem.*, 4135-4142.

Tamaki Okabayashi, H. K.-i. (2006). Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. *J. Med. Virol.*, 417-424.

Tecklenborg J, C. D. (2018). The role of the immune system in kidney disease . *Clin Exp Immunol.*, 142-150.

Thomas L Nickolas, C. S.-D. (2012). NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 718-722.

Thomas L Nickolas, J. B. (2008). Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 127-132.

TUIK, T. I. (28 06 2021 r.). *Seniors with Statistics 2021*. Извлечено от https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Istatistiklerle-Yaslilar-2020-37227.

V., N. (2020). The agent and the host factor s in Covid-19: exploring the pathogenesis and theraupetic implications.

Valk, C., Zimatore, C., Mazzinari, G., Pierrakos, C., Sivakorn, C., Dechsanga, J., . . . al., e. (2022). The RALE Score Versus the CT Severity Score in Invasively Ventilated COVID-19 Patients—A Retrospective Study Comparing Their Prognostic Capacities. *Diagnostics* , 12, 2072.

Villa, G., Romagnoli, S., De Rosa, S., Greco, M., Resta, M., Montin, D., . . . al., e. (2020). Blood purification therapy with a hemodiafilter featuring enhanced adsorptive properties for cytokine removal in patients presenting COVID-19. A pilot study. *Crit. Care*, 605.

Waldman M, S. M.-C. (2021). Results from the IRoc-GN international registry of patients with COVID-19 and glomerular disease suggest close monitoring. *Kidney Int.* , 227–237.

Wall NA, C. D.-M. (2018). Humoral immunity to memory antigens and pathogens is maintainded in patients with chronic kidney disease. *PLoS One*, 1-17.

Wan Y, S. J. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. . *J Virol.*, 94:e00127–20.

Wang C, H. P. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* , 470-3 .

Wang, J., Yang, X., Li, Y., Huang, J.-A., Jiang, J., & Su, N. (2021). Specific cytokines in the inflammatory cytokine storm of patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome and extrapulmonary multiple-organ dysfunction. *Virol. J.*, 18, 117.

WHO. (2020). *Clinical managment fo severe acute respiratory infection when Novel coronavirus (nCoV) infection is suspected: interm guidance*. Извлечено от www.who.int: www.who.int/internal-publication-detail/clinical-managment-of-severe-acure-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected

WHO. (2020). *WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 disease.* WHO.

WHO. (02 02 2020 r.). *www.who.int*. Извлечено от http://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situationreport/20200202-sitrep-13

WHO. (21 01 2020 r.). *www.who.int*. Извлечено от www.who.int: http://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov

WHO. (08 10 2021 r.). *WHO*. Извлечено от https://covid19.who.int/.

Wikipedia. (16 08 2022 r.). *https://en.wikipedia.org/wiki/Angiotensin-converting_enzyme_2*. Извлечено от Wikipedia: https://en.wikipedia.org/wiki/Angiotensin-converting_enzyme_2

Woo PC, L. S. (2006). Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*, 180-7.

Woo PC, W. M. (2007). Comperative analysis fo twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J Virol* , 1574-85.

Worldometer. (2020). *www.worldometer.info*. Извлечено от http://www.worldometer.info/coronavirus/

Worldometer. (2020). *www.worldometers.info.* Извлечено от http://www.worldometers.info

Wrapp D, W. N. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in prefusion conformation . *Science*, 1260-1263.

Xie X, C. J. (2006). Age and gender related differences of ACE2 expression in rat lung. *Life Science*, 2166-71.

Xu Z, S. L. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acure respiratory disstress syndrome. *Lancet Respir Med*, 420-2.

Xu, K., Shang, N., Levitman, A., Corker, A., Kudose, S., Yaeh, A., . . . al., e. (2021). Elevated Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Associated With the Severity of Kidney Injury and Poor Prognosis of Patiets with Covid-19. *Kidney Int. Rep.* , 6, 2979–2992.

Xu, Z., Zhang, Y., Zhang, C., Xiong, F., Zhang, J., & Xiong. (2022). J. Clinical Features and Outcomes of COVID-19 Patients with Acute Kidney Injury and Acute Kidney Injury on Chronic Kidney Disease. *Aging Dis* , 884-898.

Xue Y, S. S. (2020). Effects of ACEI and ARB on COVID-19 patients: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 21:1470320320981321.

Yamada Y, L. D. (2009). Proteolitic activation of the spike protein at a novel RRRR/S motif in implicated in furin-dependent entry, syncitium formation and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells. *J Virol*, 8744-58.

Yang H, Y. M. (2003). The cristal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease naf its complec with an ihibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 13190-5.

Yang, M. (2020). Cell Pyroptosis, a Potential Pathogenic Mechanism of 2019-nCoV Infection. *SSRN J.* .

Zhang H, P. J. (2020). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*, 586-90.

Zhou P, Y. X.-L.-G. (2020). A pneumonia outbreak associated with the new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 270-3 .

Zhou P, Y. X.-L.-G. (2020). Discovery of a novel coronavirus associated withr the recent pneimonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*.

Zhu N, Z. D. (2020). China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China 2019. *New English Medical Journal*, 727-733.

Zoltán H Endre, J. W. (2011). Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function. *Kidney Int*, 1119-1130.

Беловеждов, Н. (01 11 2004 г.). *Бъбречни болести в напреднала възраст*. Извлечено от GP News: https://gpnews.bg/%D0%B3%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F/%D0%B1%D1

%8A%D0%B1%D1%80%D0%B5%D1%87%D0%BD%D0%B8-%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B8-%D0%B2-%D0%BD%D0%B0%D0%BF%D1%80%D0%B5%D0%B

Halim, C., Mirza, A., & Sari, M. (2022). The Association between TNF-α, IL-6, and Vitamin D Levels and COVID-19 Severity and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens* , 195.

Colombi, D., Bodini, F., Petrini, M., Maffi, G., Morelli, N., Milanese, G., . . . Michieletti, E. (2020). Well-aerated Lung on Admitting Chest CT to Predict Adverse Outcome in COVID-19 Pneumonia. *Radiology* , 296, E86–E96.