

lekarz Marcin Kazberuk

Ocena stężenia kwasu hialuronowego w surowicy chorych z COVID-19

*Assessment of serum hyaluronic acid concentration in COVID-19
patients*

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Anatol Panasiuk

Oddział Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych z Ośrodkiem Diagnostyki i
Leczenia Endoskopowego Wojewódzkiego Szpitala Zespołonego im. J. Śniadeckiego w
Białymstoku

Zakład Medycyny Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Białystok, 2024

Spis Treści

I. Wstęp.....	8
1. Koronawirusy.....	8
1.1 Wirus SARS CoV-2.....	11
2. COVID-19.....	15
2.1 Postaci kliniczne.....	15
2.1.1 Zapalenie płuc.....	15
2.1.2 ARDS.....	16
2.1.3 Burza cytokinowa.....	18
2.1.4 Zaburzenia mikrobioty jelitowej.....	20
2.1.5 Uszkodzenie wątroby.....	21
2.1.6 Nadkrzepliwość.....	23
2.1.7 Uszkodzenie nerek.....	25
2.1.8 Powikłania kardiologiczne.....	27
2.1.9 Powikłania neurologiczne.....	29
2.1.10 Zmiany skórne.....	30
2.1.11 Post-Covid.....	33
2.2 Badania obrazowe płuc w COVID-19.....	34
2.3 Leki stosowane w COVID-19.....	35
3. Mechanizmy procesów włóknienia	36
3.1 Składniki macierzy pozakomórkowej.....	38
3.1.1 Kwas hialuronowy.....	38
3.1.2 Kolagen.....	42
3.1.3 Elastyna.....	45
3.1.4 Fibrylina.....	45
3.1.5 Fibronektyna.....	46
3.1.6 Laminina.....	46

3.1.7 Integryny.....	46
3.2. Degradacja składników macierzy pozakomórkowej.....	46
3.3. Włóknienie jako następstwo zakażenia SARS-CoV-2	48
3.4 Markery włóknienia w praktyce klinicznej.....	50
3.4.1 Bezpośrednie markery włóknienia tkankowego.....	50
II. Cele pracy.....	53
III. Materiał i Metody.....	54
1. Populacja badana i charakterystyka kliniczna.....	54
2. Badania laboratoryjne.....	56
3. Tomografia klatki piersiowej wysokiej rozdzielczości (HRCT).....	60
4. Analiza statystyczna.....	60
IV. Wyniki.....	61
V. Omówienie wyników i dyskusja.....	89
VI. Wnioski.....	105
VII. Streszczenie.....	106
VIII. Piśmiennictwo.....	110

Wykaz używanych skrótów

ACE-2 – enzym konwertujący angiotensynę II (*angiotensin converting enzyme 2*)

ALT – aminotransferaza alaninowa

AST – aminotransferaza asparaginowa

ARDS – zespół ostrej niewydolności oddechowej (*acute respiratory distress syndrome*)

ARFI – impuls mocy promieniowania akustycznego (*acoustic radiation force impulse*)

BAND-3 – błonowe białko prążka 3 erytrocyta

BE – niedobór zasad (*base excess*)

bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor*)

CK – kinaza kreatynowa (*creatinine kinase*)

COVAN – zapalenie nerek związane z COVID-19 (*COVID-19 associated nephritis*)

CRP – białko C-reaktywne (*C-reactive protein*)

CS - burza cytokinowa (*cytokine storm*)

CSF – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (*colony-stimulating factor*)

CT – tomografia komputerowa (*computer tomography*)

CTSS – skala ciężkości dla tomografii komputerowej (*computer tomography severity score*)

eGFR – szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej (*estimated glomerular filtration ratio*)

GGT – gamma-glutamylotransferaza

GKS – glikokortykosteroidy

GFAP – kwaśne białko włóknikowe gleju (*glial fibrillary acidic protein*)

ECM – macierz pozakomórkowa (*extracellular matrix*)

ECMO – zewnątrzustrojowe błonowe utlenowanie krwi (*extracorporeal membrane oxygenation*)

EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu (*epithelial growth factor*)

EMMPRIN – pozakomórkowe inhibitory metaloproteinaz (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*).

FSGS – ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków (*focal segmental glomerulosclerosis*)

HA – kwas hialuranowy (*hyaluronic acid*)

HABP – białko wiążące kwas hialuronowy (*hyaluronic acid binding protein*)

HAS-1 – syntaza kwasu hialuronowego-1 (*hyaluronic acid synthase*)

HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (*hepatitis C virus*)

HGB – hemoglobina

HFNO – wysokoprzepływowa donosowa tlenoterapia (*high flow nasal oxygenation*)

HR – czynność serca (*heart rate*)

IL – interleukina

INR – międzynarodowy współczynnik znormalizowany (*international normalised ratio*)

IPF – idiopatyczne włóknienie płuc (*idiopathic pulmonary fibrosis*)

JAK – kinaza janusowa (*janus activated kinases*)

LDH – dehydrogenaza mleczanowa (*lactate dehydrogenase*)

MERS – bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (*Middle East Respiratory Syndrome*)

MMP – metaloproteiny macierzy pozakomórkowej

MRI – rezonans magnetyczny (*magnetic resonance imaging*)

NET – zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe (*neutrophil extracellular traps*)

NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny lekkich łańcuchów kappa aktywowanych limfocytów B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NF-L – lekki polipeptyd neurofilamentów (*neurofilament light polipeptide*)

NOD – domena zdolna do wiązania nukleotydów i oligomeryzacji (*nucleotide-binding and oligomerization domain*)

pCO₂ – prężność dwutlenku węgla

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (*polymerase chain reaction*)

PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth hormone*)

PLT – płytki krwi (*platelets*)

pO₂ – prężność tlenu

PT – czas protrombinowy (*prothrombin time*)

RBC – liczba czerwonych krwinek (*red blood cells*)

RBD – receptor wiążący domeny (*receptor-binding domain*)

RR – ciśnienie tętnicze

SARS CoV-2 – koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego-2 (*severe acute respiratory distress syndrom coronavirus 2*)

SaO₂ – saturacja krwi tętniczej tlenem

TGF – transformujący czynnik wzrostu (*transforming growth factor*)

TIMP – tkankowe inhibitory metaloproteinaz (*tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TK – tomografia komputerowa

TLR – receptory toll-podobne (*toll-like receptors*)

USG – ultrasonografia

VEGF – nabłonkowo-śróbnokowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor*)

WBC – liczba białych krwinek (*white blood cells*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organisation*)

I. Wstęp

Od lat rozwój nowych metod badawczych, technologii medycznych oraz terapii sukcesywnie przesuwają horyzont medycyny jako dziedziny nauki. Zdarzają się jednak w historii nieliczne momenty, kiedy niespodziewanie objawia się zupełnie nowa, nieznana dotąd dziedzina wiedzy i stawia przed badaczami wyzwanie poznania tego, co nieznanne. Wyrwa ich z codzienności i uświadamia, że nastąpił nieodwracalny przełom i świat nie jest już taki sam.

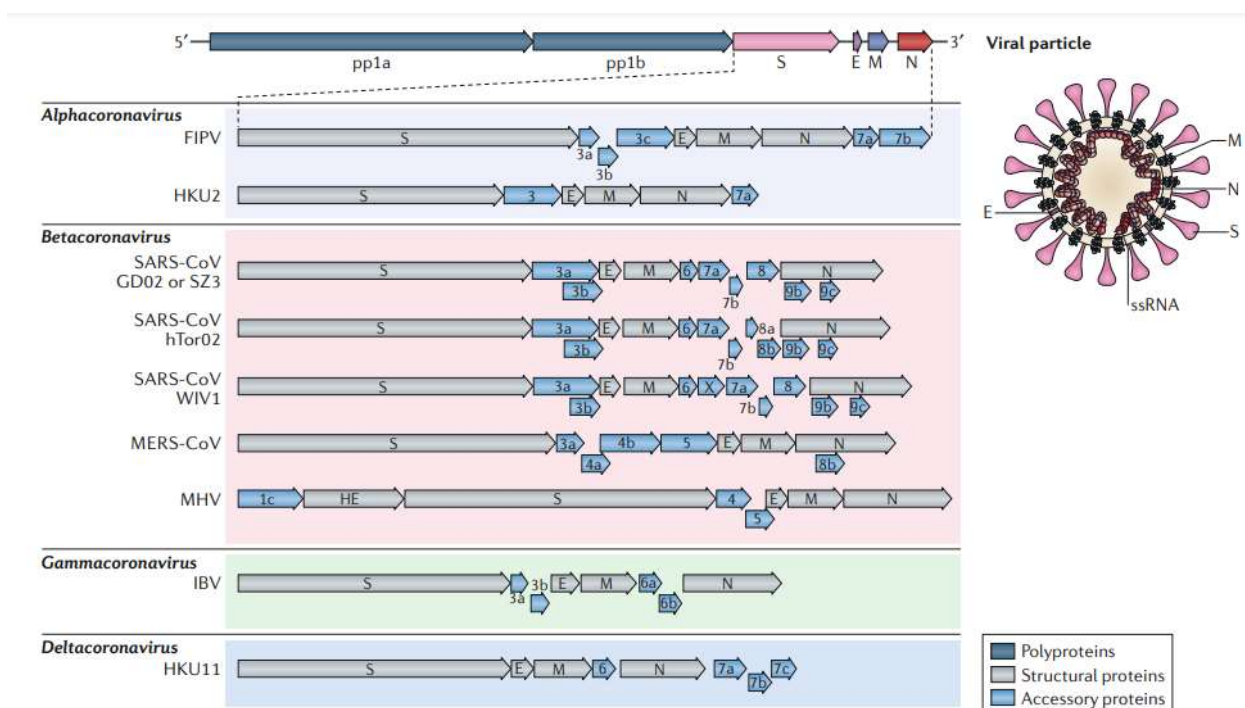
W grudniu 2019 roku w liczącym 8,4 mln mieszkańców mieście Wuhan, stolicy chińskiej prowincji Hubei zaobserwowano masowe zachorowania na nową, nieopisaną dotychczas chorobę, które szybko rozprzestrzeniły się na całe Chiny, a w przeciągu trzech miesięcy na cały niemal świat. Chorobę wywołał nieznany dotychczas wirus z grupy koronawirusów, nazwany SARS CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrom coronavirus 2*), charakteryzujący się bardzo wysoką zakaźnością (1). Dnia 11 marca 2020 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) ogłosiła po raz pierwszy w swojej historii stan pandemii wywołany patogenem z grupy koronawirusów (2).

1. Koronawirusy

Koronawirusy po raz pierwszy opisano w latach 60 XX wieku u osób z objawami przeziębienia. Izolowane są wśród wielu gatunków ptaków oraz ssaków, w tym ludzi, nietoperzy, wielbłądów, cywet, psów oraz myszy. Należą do rodziny *coronaviridae*, zbudowane są z jednoniciowego łańcucha RNA pozytywnego sensu, liczącego od 26 do 32 tysięcy zasad. Przyjmują trójwymiarowy kształt cząsteczki zbliżonej do sfery o średnicy 100-160nm. Na końcu 3' zakodowane są kluczowe białka strukturalne wirusa: kolca, otoczki, błony oraz nukleokapsydu. Nazwa koronawirus pochodzi od łacińskiego słowa *corona*, gdyż

oglądane w mikroskopie elektronowym wirusy z tej grupy posiadają widoczne białka kolca zakotwiczone w jego otoczce, dające charakterystyczny obraz przypominający koronę królewską. Białko kolca składa się z dwóch funkcjonalnych podjednostek, S1 odpowiedzialnej za wiązanie do receptora błony komórkowej gospodarza oraz S2, warunkującą fuzję otoczki wirusa z błoną komórkową gospodarza, co wspólnie umożliwia inkorporację genomu wirusa do wewnątrz komórki (**Rycina 1**) (3).

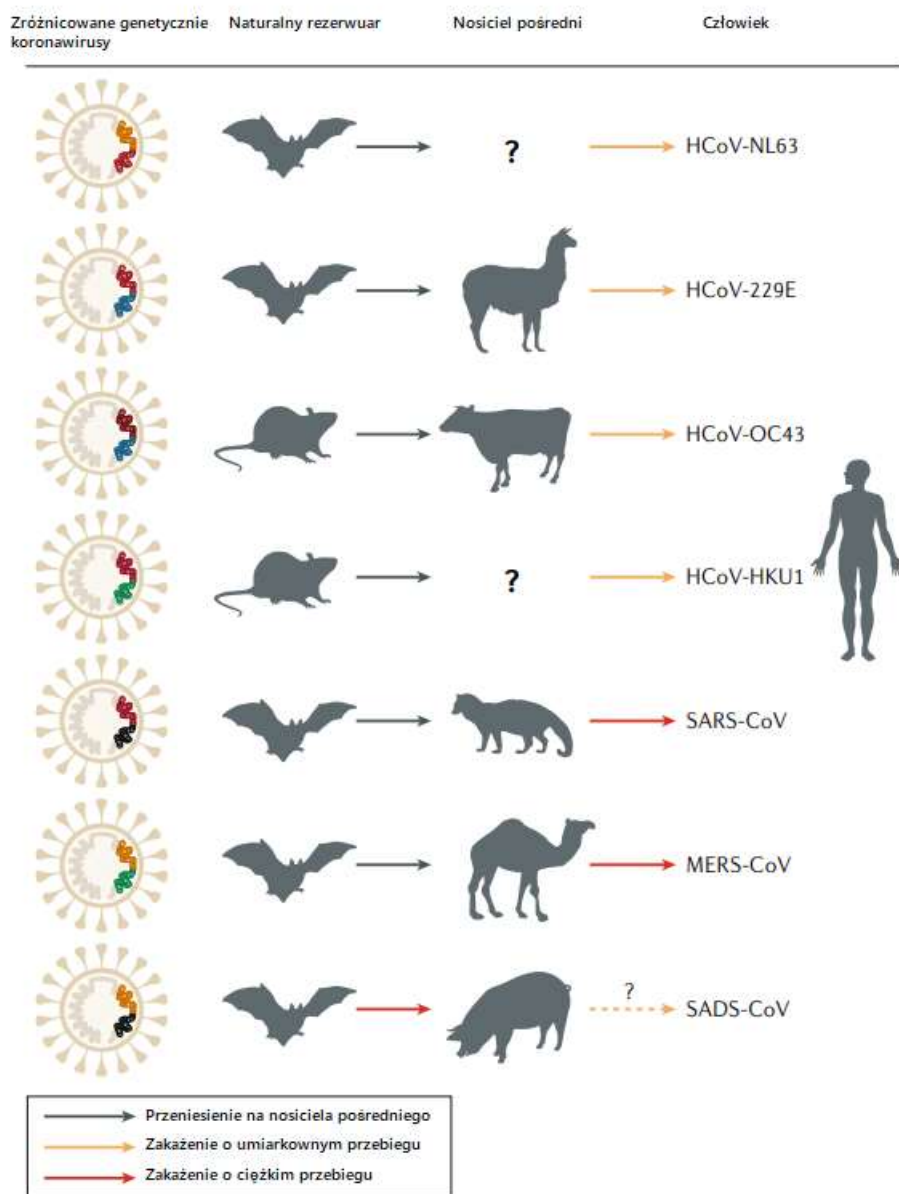
Rycina 1. Schemat budowy genomu koronawirusów (4).



Do 2002 roku patogeny z tej grupy nie uchodziły za istotny czynnik chorobotwórczy u ludzi. W tym właśnie roku w chińskiej prowincji Guandong odnotowano liczne zachorowania, szczególnie w populacji osób immunoniekompetyentnych, u części zakażonych prowadząc do zespołu ciężkiej niewydolności oddechowej. W materiale biologicznym pobranym od zakażonych izolowano RNA wirusa z grupy betakoronawirusów, któremu nadano nazwę

SARS-CoV (*severe acute respiratory syndrome coronavirus*). Sekwencjonowanie materiału genetycznego wykazało transmisję odzwierzęcą jako potencjalne źródło patogenu w populacji ludzi. U osób zakażonych SARS-CoV udokumentowano kontakt z dzikimi zwierzętami, szczególnie cywetami, którymi handlowano na lokalnym targowisku zwierząt. W toku przeprowadzonych badań wykazano, że cywety zostały zakażone w wyniku kontaktu z lokalnymi odmianami nietoperzy (rodzaj *Rhinolophus*), które były rezerwuarem patogenu (4).

W 2015 roku na Bliskim Wschodzie, głównie na półwyspie arabskim oraz w Jordanii, koronawirus wywołujący MERS (*middle east respiratory syndrome*) spowodował epidemię w wyniku podobnej dwuetapowej odzwierzęcej transmisji - początkowo z nietoperza na wielbłąda, następnie z wielbłąda na człowieka (**Rycina 2**). MERS ma szerokie spektrum objawów, w tym zagrażające życiu ciężkie powikłania, jak zespół ostrej niewydolności oddechowej, sepsę i ostrą niewydolność nerek. Na dzień 31 grudnia 2015 roku potwierdzono 1621 przypadków zachorowania, z czego 584 osoby zmarły (36%), czyniąc z niego jeden z najbardziej śmiertelnych wirusów znanych ludzkości. Inne rodzaje koronawirusów (HKU1, NL63, 229E, OC43, HKU1) charakteryzują się stosunkowo łagodnym przebiegiem infekcji, gorączką z towarzyszącymi objawami paragrypowymi (5).

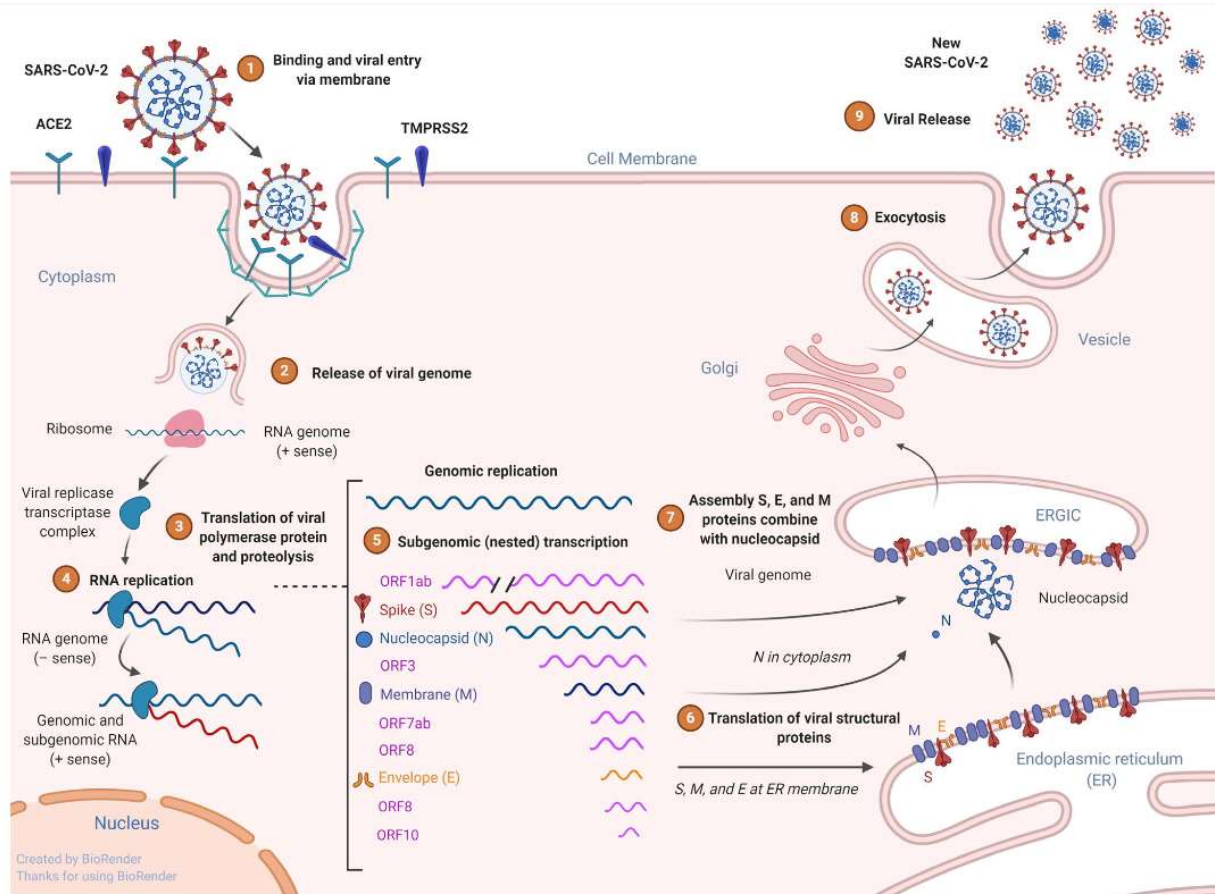


Rycina 2. Wektory transmisji odzwierzęcej wybranych przedstawicieli Coronaviridae (4).

1.1. Wirus SARS-CoV-2

Wirus SARS-CoV-2 jest nowym przedstawicielem betakoronawirusów, odpowiedzialnym za pandemiczną chorobę COVID-19. Genom wirusa składa się z materiału RNA pozytywnego sensu, kodującego przynajmniej 29 białek, w tym kolca, nukleokapsydu,

otoczki oraz białek dodatkowych (3a, 6, 7a, 7b, 8, 9b). Ważące około 600 kDa białko kolca (S) jest kluczowe dla procesu zakażenia. Białko S składa się z dwóch regionów: N-końcowej domeny S1 okrywającej C-końcową domenę S2. Domena S1 wiąże się z komórkowym receptorem enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE-2) poprzez receptor wiążący domeny (RBD). Białko S przed fuzją z komórką może występować w wielu różnych konformacjach, zaś białko RBD przyjmować może jedynie dwie konformacje – 'w górę' oraz 'w dół'. Miejsce wiązania do receptora ACE-2 jest eksponowane jedynie w przypadku konformacji 'w górę'. Wiązanie z nim jest poprzedzone rozszczepieniem białka kolca przez enzymy proteolityczne gospodarza (katepsyny L), wskutek czego jednostka S1 ulega rozszczepieniu, eksponując biorące w fuzji elementy S2 (3) Proces translacji genomowego gRNA wirusa zachodzi z wykorzystaniem subgenomicznej nici sgRNA. Synteza nici gRNA oraz sgRNA w komórce odbywa się wewnątrz pęcherzyków otoczonych podwójną błoną. Synteza sgRNA z pomocą kompleksu transkrypcyjnego rozpoczyna się na końcu 3' oryginalnego genomowego RNA i przełącza szablon w miejscach sekwencji regulatorowych transkrypcji wzdłuż całego łańcucha gRNA. Ilość kopii wirusowego sgRNA oraz gRNA syntetyzowanych w zakażonych komórkach zależy od lokalizacji i wydajności odczytu sekwencji regulujących transkrypcję (**Rycina 3**), (6, 7, 8).



Rycina 3. Proces replikacji wirusa SARS-CoV-2:

1) Wiązanie wirusa z receptorem ACE2 oraz proces internalizacji z udziałem przezłonowej proteazy TMPRSS2 2) Uwolnienie genomu wirusa wewnątrz zainfekowanej komórki, 3) Translacja wirusowej polimerazy RNA, 4) Replikacja genomu: synteza pełnej nici RNA negatywnego sensu i na jej bazie synteza nici genomicznego RNA pozytywnego sensu, 5) Transkrypcja subgenomiczna, 6) Translacja białek strukturalnych wirusa wewnątrz retikulum endoplazmatycznego oraz cytoplazmy, 7) Wytworzenie potomnych cząsteczek wirusa ze składowych w aparacie Golgiego, 8) Proces egzocytozy, 9) Uwolnienie z komórki nowowytworzonych kopii wirusa SARS-CoV-2 (9).

Wirus cechuje się wysokim powinowactwem do dróg oddechowych, w których następuje replikacja, a nowowytworzone kopie (wiriony) ulegają uwolnieniu i wydalaniu z organizmu. Wiodącą drogą transmisji z człowieka na człowieka jest droga powietrzna, poprzez wzbudzenie kropelek wydzieliny dróg oddechowych/wytworzenie aerozolu wskutek procesów fizjologicznych (oddychanie, kaszel, kichanie, mowa), a także poprzez procedury medyczne generujące aerozol, który może unosić się w odległości ponad 1.8 metra od osoby zakażonej podczas:

- gastrokopii
- bronchoskopii
- intubacji
- zabiegów stomatologicznych
- wysokoprzepływowej tlenoterapii donosowej
- odsysania wydzieliny z dróg oddechowych (9,10)

Metaanaliza 22 badań przeprowadzona przez Johnsona i wsp. wykazała również występowanie RNA wirusa w kale u około 48% zakażonych wirusem SARS CoV-2, 15% we krwi i sporadyczne przypadki występowania w innych płynach ustrojowych (12). Prawdopodobna jest więc również fekalno-oralna droga zakażenia, choć część badaczy sugeruje, że wydalany tą drogą wirus ma ograniczone możliwości replikacji. Ponadto nie wykazano związku wydalania wirusa z kałem, a obecnością objawów żołądkowo-jelitowych (13).

Czas inkubacji wirusa wynosi przeciętnie od około 2 do 7 dni, z medianą 4 dni, CDC (*Centers for Disease Control and Prevention of USA*) szacuje możliwy okres inkubacji od 2 do nawet 14 dni od narażenia (1, 14). U większości choroba trwa około tygodnia i jest samoograniczająca się.

2. COVID-19

COVID-19 (*Corona-Virus-Disease-2019*) jest uznana przez Światową Organizację Zdrowia nazwą choroby wywoływanej przez wirus SARS-CoV-2. Spektrum objawów jest bardzo szerokie i poza niecharakterystycznymi objawami grypopodobnymi wyróżniono kilka typowych postaci klinicznych mogących występować u osób zakażonych tym wirusem.

2.1 Postaci kliniczne choroby COVID-19

2.1.1 Zapalenie płuc

Zapalenie płuc jest jednym z najczęstszych powikłań zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Mechanizm jego powstawania jest złożony. Wirus wnika do pneumocytów poprzez licznie występujące na ich powierzchni receptory angiotensyny II (15). Wirus może powodować martwicę komórek nabłonka, obrzęk tkanek z infiltracją limfocytów i neutrofilii, uszkodzenie śródbłonka naczyń krwionośnych krążenia płucnego, a także wywoływać zatorowość i mikrozatorowość płucną (16). Zmiany te upośledzają zdolność płuc do prawidłowej wymiany gazowej. Zapalenie płuc w COVID-19 manifestuje się najczęściej gorączką, dusznością, kaszlem, bólem w klatce piersiowej i zmęczeniem (17). W badaniach obrazowych występują charakterystyczne zmiany zapalne, co szczegółowo opisano w rozdziale 2.2. Nieprawidłowości w obrębie mięszu płucnego mogą występować pomimo braku klinicznych objawów zapalenia płuc. U części pacjentów choroba rozwija się w zagrażający życiu ostry zespół niewydolności oddechowej.

2.1.2 ARDS

Ostry zespół niewydolności oddechowej - ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) jest ciężkim powikłaniem COVID-19. Jest efektem reakcji immunologicznej na obecność wirusa w układzie oddechowym lub wtórnego nadkażenia bakteryjnego. ARDS wiąże się z niewydolnością oddechową, hipoksemią oraz koniecznością stosowania metod wspomaganie wentylacji. Do czynników ryzyka wystąpienia ARDS zalicza się:

- podeszły wiek
- płeć męska
- nikotynizm
- otyłość
- obecność chorób współistniejących, takich jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, przewlekła choroba nerek, POChP, choroby układu sercowo-naczyniowego czy schorzenia neurologiczne

Badania autopsyjne osób zmarłych na ARDS wykazują obraz rozlanego uszkodzenia pęcherzyków płucnych. Wyróżnia się dwie fazy zmian płucnych:

I. faza wysiękowa:

- dominuje wewnątrzpęcherzykowy obrzęk bogatobiałkowy z pogrubieniem przestrzeni śródmiąższowych
- powstają błony hialinowe w pęcherzykach płucnych

II. faza organizacyjno-proliferacyjna

- wzmożona aktywność fibroblastów
- przerost pneumocytów typu 2
- metaplasja płaskonabłonkowa
- zanik błon hialinowych

U większości chorych w wyniku leczenia następuje stopniowa regresja zmian, jednak u części chorych rozwija się śródmiąższowe włóknienie z przebudową struktury tkanki płucnej, co skutkuje nieodwracalnym jej uszkodzeniem (18).

U chorych z ARDS w badaniach laboratoryjnych występują wysokie wartości parametrów ostrej fazy (białka C-reaktywnego, prokalcytoniny), parametrów biochemicznych (dehydrogenazy mleczanowej, bilirubiny, aminotransferaz, produktów przemiany azotowej, d-dimeru, kinazy kreatyninowej), a także zaburzenia hematologiczne (leukocytoza, trombocytopenia, neutrofilia, limfopenia) (19, 20, 21)

W badaniu retrospektywnym Gujskiego M. i wsp. spośród 116539 pacjentów hospitalizowanych w polskich szpitalach w okresie od marca do grudnia 2020 ARDS wystąpił u 4237 osób (3,6%), ze śmiertelnością wynoszącą 88,8% (19). Należy zaznaczyć, że u znacznej większości chorych w okresie badania nie były dostępne jeszcze celowane terapie, zaś śmiertelność w ARDS istotnie różniła się pomiędzy regionami z powodu różnic w organizacji i wydolności systemów opieki zdrowotnej. Metaanaliza Hasana z tego okresu uwidoczniła, że w Polsce śmiertelność w ARDS była najwyższa i wynosiła 73%, podczas gdy najniższą odnotowano w Niemczech z odsetkiem zgonów na poziomie 13%, co prawdopodobnie można wiązać z przeciążeniem systemu opieki zdrowotnej w Polsce (22). Inni autorzy potwierdzają bardzo wysoką śmiertelność, sięgającą 27-59% w grupie chorych o najcięższym przebiegu, poddawanych wentylacji mechanicznej (23, 24).

Po półtora roku trwania pandemii ogłoszono sukces w walce z tą wysoce śmiertelną chorobą. Dnia 23 sierpnia 2021 roku FDA zaaprobowało do użycia pierwszą szczepionkę przeciwko chorobie - BNT162b2 firmy Pfizer-BioNTech. W dużym badaniu obejmującym 43548 uczestników zaszczepionych schematem dwudawkowym w okresie 2 miesięcy *follow-up* wykazano 95% skuteczność w zapobieganiu objawowemu zakażeniu wirusem SARS-

CoV-2, w tym ARDS (25). Kolejne szczepionki, m.in. mRNA-1273, NVX-CoV2373, Ad26.COV2.S zmniejszyły globalnie skalę zachorowań oraz zgonów z powodu tej choroby. Badania immunologiczne u osób zaszczepionych wykazały konieczność stosowania przypominających dawek szczepionki (26). Pomimo nieco mniejszej efektywności względem nowych mutacji wirusa, w tym *Delta* i *Omicron*, w licznych badaniach klinicznych udowodniono utrzymywanie się wciąż zadowalającego ochronnego miana przeciwciał, szczególnie u osób zaszczepionych dawką przypominającą (*booster*) (27, 28, 29).

2.1.3 Burza cytokinowa

Zjawisko burza cytokinowej zostało po raz pierwszy opisane w 1993 roku przez Jamesa L. M. Ferrara podczas badania mechanizmów zachodzących w reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (*graft versus host disease*), (30). Definiowana jest jako niekontrolowany wyrzut cytokin prozapalnych skutkujący nadmierną aktywacją komórek układu odpornościowego. Wśród cytokin biorących udział w tej reakcji wymieniane są m.in. białka z grupy interferonów (interferony I oraz II), interleukin (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18), chemokin (w szczególności CXCR3, CXCR9, CXCL 10 oraz CXCL11), TNF (czynnik martwicy nowotworu) oraz CSF (czynniki stymulujące wzrost kolonii granulocytów), (31). Na skutek zachodzących zjawisk immunologicznych dochodzi do wzmożonej adhezji limfocytów i makrofagów do śródbłonka naczyń. Powoduje to uszkodzenie oraz zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń. W efekcie prowadzi do nasilenia migracji komórek zapalnych do tkanek, a ich aktywacja doprowadza do uszkodzeń narządowych. Zaburzenia te odgrywają rolę w patogenezie ARDS, zespołu niewydolności wielonarządowej, zaburzeń krzepnięcia (32, 33). Występowanie burzy cytokinowej zaobserwowano w przebiegu wielu chorób, m.in. limfocytocytomy hemofagowej, choroby Still'a, stwardnienia rozsianego, ostrego zapalenia trzustki, reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi a także zakażeniach

wirusami EBV, CMV, grypy, SARS-CoV, SARS-CoV-2 oraz ospy prawdziwej (34). Opisano również przypadek jatrogenego wywołania tej reakcji. Podczas badania klinicznego pierwszej fazy nad nową cząsteczką TGN1412, będącą agonistycznym przeciwciałem wiążącym się z receptorem anty-CD28 limfocytów T przypadkowo wywołano burzę cytokinową u poddanych badaniu osób. Wszystkich 6 badanych (młodych, zdrowych mężczyzn) po około 90 minut od podania leku rozwinęło objawy nasilonej reakcji immunologicznej, objawiającej się m.in bólem głowy, mięśni, biegunką, rumieniem, rozszerzeniem naczyń oraz hipotensją. W ciągu 12 do 16 godzin wszyscy uczestnicy badania znajdowali się w stanie krytycznym, z objawami niewydolności oddechowej, z rozsianymi zmianami naciekowymi w płucach, ostrą niewydolnością nerek, cechami zespołu rozsianego wewnątrznaczyniowego wykrzepiania i wymagali leczenia w oddziale intensywnej terapii. Badania laboratoryjne ujawniły typowe dla burzy cytokinowej nieprawidłowości, m.in wysokie stężenia TNF- α , interferonu- γ , IL-2, IL-6 oraz IL-10, limfopenię, monocytopenię oraz trombocytopenię (35).

Przyczyny występowania burzy cytokinowej w COVID-19 nie są w pełni poznane, jednak istnieje kilka hipotez wymagających potwierdzenia. Jedną z nich jest wywołana wniknięciem wirusa pyroptoza komórek gospodarza. Ten wysoce immunogeny sposób zaprogramowanej śmierci komórki powoduje wyrzut cytokin prozapalnych oraz wpływa na aktywność makrofagów oraz limfocytów (36). Efektem jest naciek zapalny zajętych tkanek, prowadzący do uszkodzenia i dysfunkcji. Burza cytokinowa i zapalenie odpowiadają za niewydolność oddechową pacjentów z ARDS, co potwierdzono m.in. w badaniach autopsyjnych chorych na COVID-19.

Dowiedziano, że istotną rolę w rozwoju burzy cytokinowej pełnią inflamasomy NLRP3 - receptory komórkowe z grupy NOD-podobnych. Aktywacja inflamasomów w

makrofagach, komórkach nabłonka i prawdopodobnie komórkach śródbłonka skutkuje uwolnieniem cytokin prozapalnych oraz interleukin (w tym IL-1 β , IL-6 oraz IL-18), (9). Innym z mechanizmów wzmożonego wytwarzania cytokin jest wpływ obecności wirusa na wewnątrzkomórkowe procesy transkrypcyjne. Pobudzenie przez wirusa receptorów TOLL-podobnych (TLR) – TLR3, TLR7, TLR8 oraz TLR13 powoduje aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który bezpośrednio przyczynia się do zwiększenia procesów transkrypcji genów kodujących białka pośredniczące w reakcji zapalnej (37).

Rokowanie chorych na COVID-19 z cechami burzy cytokinowej jest poważne, a śmiertelność sięga 23% (38). Poprawę rokowania uzyskano wprowadzając glikokortykosteroidoterapię oraz dopuszczenie do leczenia tocyilizumabu – przeciwciała monoklonalnego będącego inhibitorem IL-6 (39). Ponadto leczenie uwzględnia profilaktykę przeciwzakrzepową, tlenoterapię (bierną, wysokoprzepływową, respiratoroterapię, w skrajnych przypadkach ECMO – ciągłą zewnątrzustrojową oksygenację membranową), utrzymywanie diurezy oraz ciśnienia tętniczego. Znaczna część chorych z objawami burzy cytokinowej wymaga leczenia na oddziałach intensywnej terapii.

2.1.4 Zaburzenia mikrobioty jelitowej

Liczne badania wykazały wpływ tej choroby na zaburzenia mikrobioty jelitowej. W analizach Zuo i wsp. z wykorzystaniem metod sekwencjonowania metagenomicznego próbki kału osób zakażonych wirusem SARS CoV-2 udokumentowano obecność dysbiozy jelitowej ze zwiększoną populacją patogenów oportunistycznych, m.in. *Clostridium hathewayi*, *Actinomyces viscosus* oraz *Bacteroides nordii* względem osób zdrowych. Stwierdzono również, że zaburzenia mikrobioty utrzymują się długo po okresie eliminacji wirusa z organizmu (41, 42, 43). W badaniach innych autorów wykazano zmniejszenie zróżnicowania mikrobioty jelitowej, zredukowanie ilości pożytecznych bakterii symbiotycznych oraz

zwiększone stężenie cytokin prozapalnych w kale. Jednocześnie u osób, u których nie zidentyfikowano obecności wirusa SARS-CoV-2 lub była ona niewielka, występowała znacznie większa populacja bakterii produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (w tym kwas masłowy) - *Parabacteroides*, *Bacteroides* oraz *Lachnospiraceae*. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe pełnią istotną rolę w procesach immunologicznych organizmu, co może mieć wpływ na upośledzenie reakcji obronnej jelit na patogeny oraz promować rozwój mikrobioty oportunistycznej u osób zakażonych wirusem SARS CoV-2 (43,44). Podejrzewa się również, że infekcja COVID-19 może przyczyniać się do szpitalnych zakażeń o etiologii *Clostridioides difficile* (45,46).

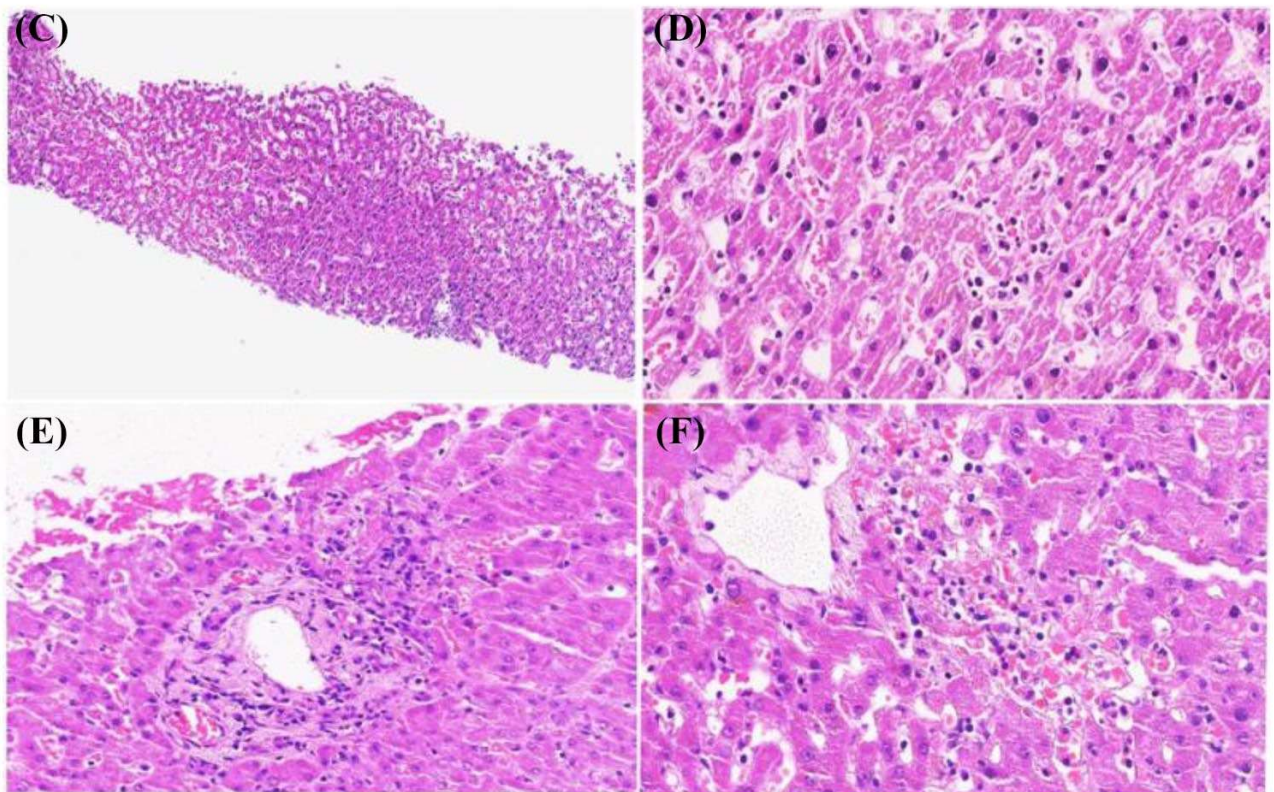
2.1.5 Uszkodzenie wątroby

U chorych z ciężką postacią COVID-19 cechy uszkodzenia wątroby występuje u 13-53% pacjentów. Uszkodzenie wątroby może wynikać z bezpośredniego wpływu wirusa na hepatocyty, do których wnika poprzez receptory ACE2. Uszkodzenie wątroby może być spowodowane ogólnoustrojową niekontrolowaną reakcją zapalną, sepsą, hipoksją oraz toksycznym działaniem leków m.in. remdesiviru, tocilizumabu, lopinawiru, glikokortykosteroisteroidów, czy antybiotyków (47, 48). Najczęściej stwierdzana jest podwyższona aktywność aminotransferaz, zazwyczaj nie przekraczająca 5-krotnie górnej granicy normy, u części chorych stwierdzano hiperbilirubinemię niewielkiego stopnia (49, 50, 51). Zwykle uszkodzenie wątroby ma charakter przejściowy i ustępuje po kilku tygodniach samoistnie. W rzadkich przypadkach opisywano pełnoobjawowe ostre uszkodzenie wątroby (47,52).

U części pacjentów z postępującym cholestatycznym uszkodzeniem wątroby stwierdzano przypadki cholangiopatii, jako późnego powikłania ciężkiego COVID-19. W badaniu obejmującym 2047 pacjentów hospitalizowanych z powodu COVID-19, 12

pacjentów rozwinęło cholangiopatię charakteryzującą się cholestazą i nieprawidłowościami strukturalnymi dróg żółciowych, podobnymi do tych obserwowanych we wtórnym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych (53).

W badaniach autopsyjnych u pacjentów zmarłych z powodu COVID-19 stwierdzano niespecyficzne zmiany histopatologiczne, takie jak umiarkowane poszerzenie zatok wątrobowych, nacieki limfocytarne miąższu wątroby, ogniska martwicy w okolicach okołowrotnych oraz centralnych zrazika (**Rycina 4**) (54).



Rycina 4. Obraz histopatologiczny tkanki wątrobowej u chorych na COVID-19: C- umiarkowane poszerzenie przestrzeni okołozatokowych z widocznym naciekiem limfocytarnym; D- naciek limfocytarny przestrzeni okołozatokowych; E – ogniskowa martwica przestrzeni okołowrotnych; F – ogniskowa martwica centralna zrazika (54).

2.1.6 Nadkrzepliwość

Wśród chorych na COVID-19 występuje szereg zaburzeń krzepnięcia, prowadzących do nadkrzepliwości i zwiększonej częstotliwości zdarzeń zatorowo-zakrzepowych. Opisywano zatory oraz mikrozatory m.in. płuc, kończyn dolnych, dłoni, mózgu, serca, wątroby, nerek i krezki (**Rycina 5**), (55, 56).



Rycina 5 - Przykłady zaburzeń mikrokrążenia oraz dystalnej mikrozatorowości kończyn u pacjentów chorych na COVID-19 (autor: M. Kazberuk)

W COVID-19 rozwija się klasyczna triada Virchova, tj. poza nadkrzepliwością występuje uszkodzenie śródbłonna naczyń oraz zaburzenie przepływu krwi. Wirus SARS-CoV-2 wnika do komórek śródbłonna poprzez receptor ACE2, doprowadzając do zwiększonej produkcji czynnika tkankowego, zapalenia i wewnątrznacyniowej aktywacji procesów krzepnięcia (57, 58). Obecność cytokin prozapalnych prowadzi również do wzmożonej ekspresji czynnika tkankowego na powierzchni obecnych we krwi komórek jednojądrzastych, głównie monocytów. Stan ten wywołuje przemianę protrombiny w trombinę, następnie fibrynogenu w fibrynę, stanowiącą bazę dla formujących się skrzeplin i zapoczątkowuje kolejne etapy kaskady krzepnięcia. Wewnątrznacyniowa aktywacja krzepnięcia występuje również w sepsie, w której także dochodzi do niekontrolowanej ogólnoustrojowej reakcji zapalnej. Sepsa jest jednocześnie jednym z powikłań COVID-19, dodatkowo przyczyniając się do wzrostu ryzyka zatorowo-zakrzepowego (59).

Innymi czynnikami nasilającymi nadkrzepliwość w COVID-19 są: podwyższone stężenie VIII czynnika krzepnięcia, antygeny czynnika von Willebranda oraz fibrynogenu, obecność zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NET) – zdekondensowanej chromatyny uwalnianej z rozpadających się neutrofilów (60, 61). Chorzy z ciężką postacią COVID-19 pozostając w pozycji leżącej mają zwolniony żylny przepływ krwi co sprzyja również zakrzepicy, zwłaszcza kończyn dolnych. Ponadto gorączka, pocenie się wraz z obniżonym pragnieniem i apetytem powodują odwodnienie chorego i zwiększoną lepkość krwi. Zagęszczenie krwi jest niezależnym czynnikiem prozakrzepowym oraz przyczynia się do uszkodzenia śródbłonna naczyń (62).

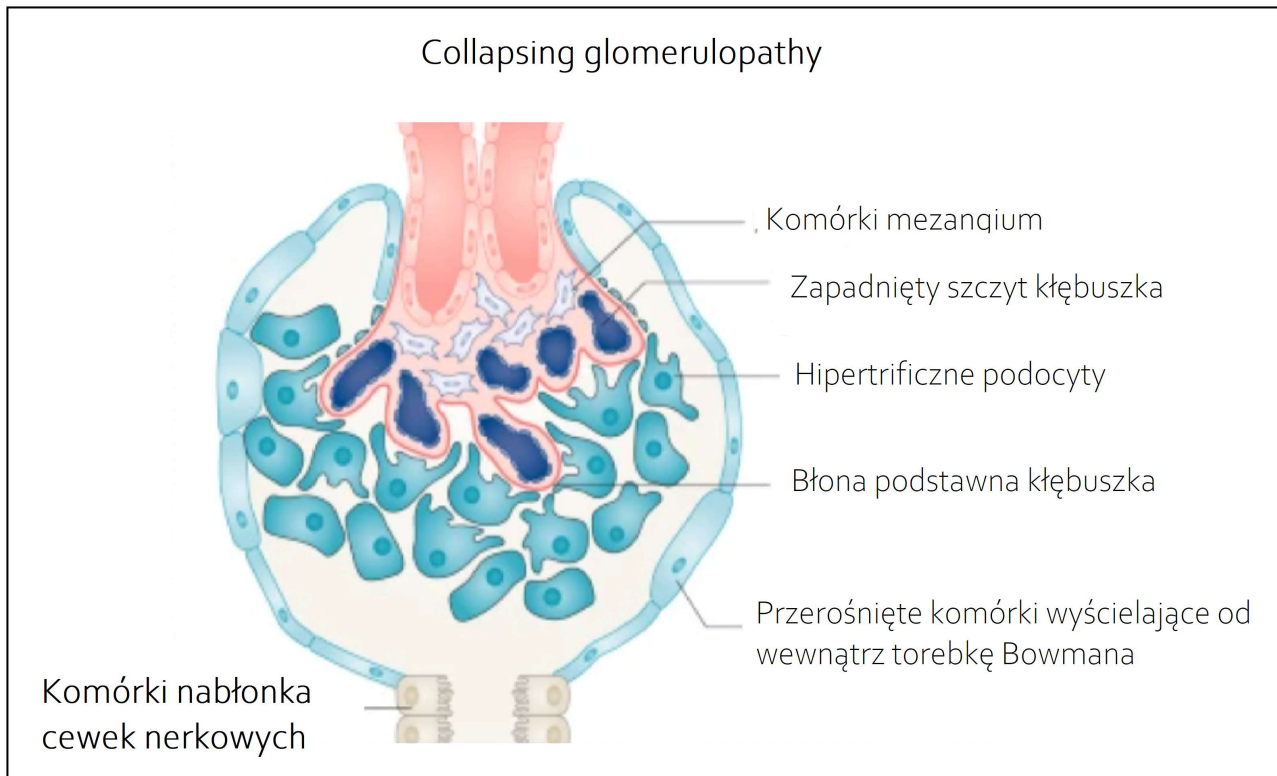
Aktualnie rekomendowana jest profilaktyka przeciwzakrzepowa u wszystkich hospitalizowanych chorych z potwierdzonym zakażeniem COVID-19, niezależnie od przyczyny hospitalizacji, z wyjątkiem istnienia silnych przeciwwskazań do takiej terapii (63).

2.1.7 Uszkodzenie nerek

Duża część chorych z COVID-19 o ciężkim przebiegu manifestuje cechy uszkodzenia nerek. Analizy chorych z Chin oraz USA wykazują dużą rozbieżność w częstotliwości występowania ostrego uszkodzenia nerek, szacowaną na 0,5%-37% (1, 20, 49, 64). Badanie Hirscha i wsp. wykazało obecność erytrocyturii u blisko połowy chorych (65). Inne badanie obserwacyjne obejmujące 257 pacjentów hospitalizowanych z powodu COVID-19 w oddziale intensywnej terapii w Nowym Yorku potwierdziło białkomocz u 87% pacjentów, zaś 31% pacjentów wymagało leczenia nerkozastępczego (66).

Podobnie jak w przypadku innych narządów, kluczowy dla wniknięcia do komórek nerek jest receptor konwertazy angiotensyny ACE-2, którego ekspresja jest około 100 razy wyższa niż w płucach. Receptory ACE-2 są obecne w podocytach, komórkach endotelium naczyń kłębuszka nerkowego, komórkach cewek proksymalnych, prawdopodobnie również w komórkach mezangium i nabłonku ściennym torebki Bowmana (67). W badaniach histopatologicznych tkanek pobranych od osób zmarłych stwierdzono uszkodzenie cewek nerkowych proksymalnych z zanikiem rąbka szczoteczkowego i zwyrodnienie wodniczkowe jego komórek, ostrą martwicę cewek, zaś mikroskopia elektronowa i metody immunohistochemiczne wykazały obecność cząsteczek wirusa wewnątrz komórek nerki (68, 69). W 2021 roku opublikowano wielośrodkowe retrospektywne badanie kohortowe Maya i wsp. obejmujące analizę bioptatów 240 nerek oraz 44 nerek przeszczepionych u osób zakażonych wirusem SARS-CoV-2. W materiałach biopsyjnych nerek najczęstszą dominującą zmianą (25.8%) było ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych z zapadnięciem pętli włócnikowych (*FSGS collapsing type*), zwany również COVAN (*COVID-19 associated nephropathy*), zaś w przypadku allograftów w 61.4% ujawniono cechy odrzucania (**Rycina 6**). W obu grupach, w większości bioptatów opisano

komponentę uszkodzenia cewek nerkowych, która niemal zawsze towarzyszyła innym zmianom histopatologicznym (70). Jednocześnie stwierdzono zwiększone ryzyko wystąpienia COVAN u osób z mutacją genu APOL1 (71).



Rycina 6. Ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych z zapadnięciem pętli włosniczkowych (FSGS collapsing type) - schemat zmian zachodzących w kłębuszkach nerkowych w COVAN (72).

Opisywane są również inne zaburzenia, takie jak nefropatia mioglobinowa, mikroangiopatia zakrzepowa, ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych bez zapadnięcia pętli włosniczkowych (FSGS, *noncollapsing type*), nefropatia błoniasta, nefropatia IgA oraz nefropatia łańcuchów lekkich (73, 74).

2.1.8 Powikłania kardiologiczne

Zakażenie SARS-CoV-2 może wielokierunkowo wpływać na układ krążenia.

Spektrum objawów choroby jest szerokie:

- bezobjawowe zakażenie (z niewielkimi zaburzeniami w badaniach laboratoryjnych, czynnościowych lub obrazowych)
- ostre uszkodzenie mięśnia sercowego
- niewydolność serca
- arytmie
- zapalenie mięśnia sercowego
- zawał mięśnia sercowego
- wstrząs kardiogeny
- nagła śmierć sercowa

Patogeneza wpływu zakażenia SARS-CoV-2 na układ sercowo-naczyniowy jest złożona. Receptor konwertazy angiotensyny 2 ma wysoką ekspresję zarówno w miocytach, fibroblastach, komórkach śródbłonna, jak i komórkach mięśni gładkich, co może sugerować bezpośredni wpływ wirusa na serca (75, 76). Inne patomechanizmy uszkodzenia układu sercowo-naczyniowego to:

- niedokrwienie mięśnia sercowego wywołane hipoksją
- dysfunkcja mikrokrażenia
- zapalenie małych naczyń związane z uszkodzeniem śródbłonna
- kardiomiopatia stresowa (Takotsubo) (77, 78, 79).

W przebiegu ARDS oraz zatorowości płucnej występują zaburzenia hemodynamiczne mogące objawiać się ostrą niewydolnością prawokomorową serca (80, 81).

W przebiegu COVID-19 występują podwyższone stężenia markerów uszkodzenia mięśnia sercowego, które mogą być efektem uszkodzenia myokardium, hipoksji, posocznicy lub wstrząsu. Infekcja wirusem SARS-CoV-2 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zawału mięśnia sercowego, zarówno typu 1 jak i 2 (82). U osób z wielochorobowością infekcja koronawirusem może zaostrzyć dotychczas skąpoobjawową lub bezobjawową chorobę niedokrwinną serca. W przypadku zawału mięśnia sercowego z uniesieniem ST u większości chorych zalecana jest strategia reperfuzyjna, zaś w zawały NSTEMI powinny być ocenione pod kątem ryzyka zawału typu 2 i leczone zachowawczo (83, 84)

Jedną z postaci COVID-19 z zajęciem serca jest kardiomiopatia stresowa, zwana również Takotsubo, wywołana najczęściej przez silny czynnik stresowy, ale również na skutek infekcji i niewydolności oddechowej. W przeciwieństwie do typowej kardiomiopatii Takotsubo, nie ma danych wskazujących na wyższe ryzyko wystąpienia tej choroby u kobiet zakażonych SARS CoV-2. Upośledzenie kurczliwości mięśnia sercowego ustępuje samoistnie i nie pozostawia trwałych zmian. Zakłada się, że w patogenezie kardiomiopatii Takotsubo odgrywają rolę: skurcz tętnic mikrokrążenia indukowany katecholaminami, stres metaboliczny, emocjonalny, mediatory stanu zapalnego, a także dysfunkcja śródbłonna naczyń wieńcowych wywołana SARS-CoV-2 (79, 85)

Liczne doniesienia wskazują na ryzyko zapalenia mięśnia sercowego wśród chorych na COVID-19 (86, 87, 88). W badaniu Eschera i wsp. opublikowanym w 2020 roku spośród 104 wykonanych biopsji endomiokardialnych z powodu podejrzenia zapalenia mięśnia sercowego lub niewydolności serca o nieustalonej etiologii w 5 przypadkach potwierdzono metodą RT-PCR obecność materiału genetycznego SARS-CoV-2 w tkance mięśnia sercowego. Badania immunohistochemiczne tkanki wykazały nacieki zapalne złożony z komórek T, makrofagów, limfocytów oraz komórek pamięci (CD45R0). Nacieki zapalne

zajmował ściany naczyń krwionośnych powodując ich uszkodzenie i zamknięcie, prowadząc do miejscowego niedokrwienia mięśnia sercowego (89).

2.1.9 Powikłania neurologiczne

Wysoka ekspresja receptorów ACE-2 występuje w neuronach oraz komórkach glejowych, co czyni je potencjalnie wrażliwymi na zakażenie wirusem SARS-CoV-2. Wcześniejsze badania nad SARS-CoV wykazały zdolność wirusa do uszkodzania komórek nerwowych u myszy. Wnikał on do OUN poprzez nabłonek węchowy oraz nerwy węchowe. Podobieństwo budowy tych dwóch typów wirusów pozwala wnioskować, że jest to możliwa droga szerzenia się infekcji na układ nerwowy u ludzi, jednak wymaga to dalszych badań z powodu ograniczonej aktualnej wiedzy w tym zakresie (90). Analiza Mao i wsp. obejmująca 214 chorych na ciężką postać COVID-19 w pierwotnym ognisku pandemii w chińskim Wuhan ujawniła objawy neurologiczne u 36% chorych. Były to zawroty oraz ból głowy, zaburzenia świadomości, ostre choroby mózgu i mózdzku, ataksji, drgawki, zespoły Guillain–Barré oraz cechy uszkodzenia nerwów obwodowych pod postacią upośledzenia smaku i węchu, zaburzeń widzenia oraz neuropatii (91). Wśród pacjentów chorych na COVID-19 z umiarkowanym oraz ciężkim przebiegiem choroby stwierdzono podwyższone stężenia markerów uszkodzenia astrocytów oraz aksonów - GFAP oraz NF-L, co potwierdza bezpośredni wpływ na destrukcję komórek układu nerwowego (92). Towarzysząca zakażeniu SARS-CoV-2 nadkrzepliwość zwiększa częstotliwość udarów niedokrwienych oraz uszkodzenia mózgu (93). Dodatkowo, niska prężność tlenu w tkankach może wywoływać objawy niedokrwienia OUN z objawami encefalopatii włącznie. Objawy neurologiczne mogą wynikać ze zmian zapalnych występujących w naczyniach krwionośnych OUN, w szczególności w obrębie śródbłonna (94). Uszkodzenie naczyń krwionośnych może stanowić jeden z efektów burzy cytokinowej odgrywających rolę w uszkodzeniu OUN. Sugeruje się, że

zapalenie naczyń mózgowych może wpływać na zwiększenie przepuszczalności bariery krew-mózg, wymaga to jednak potwierdzenia w dalszych badaniach naukowych (95).

2.1.10 Zmiany skórne

Przegląd systematyczny 46 publikacji opisujących manifestacje skórne u około 1000 osób zakażonych SARS-CoV-2 wykazał występowanie zmian:

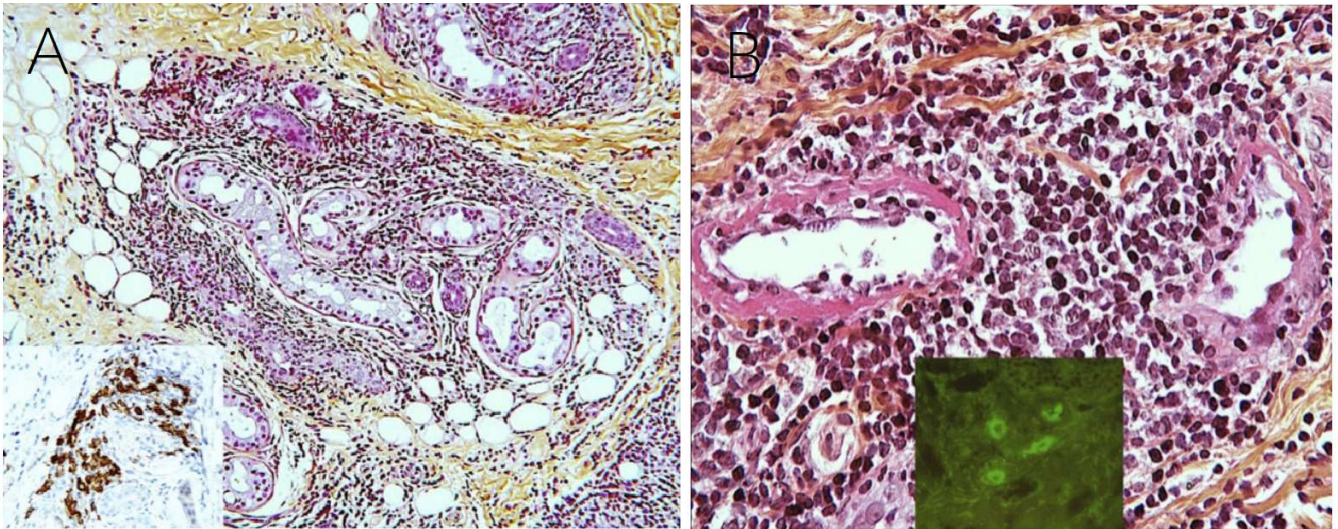
- odmrozinowych (40,2%)
- grudkowo-plamkowych (22,7%)
- pokrzywkowych (8,9%)
- pęcherzykowych (6,4%)
- *livedo reticularis* (siność siatkowata)
- oraz nekrotycznych (2,8%).

Zmiany odmrozinowe (zwane również palcami covidowymi, ang *chilblain-like lesions*) mają w chwili obecnej dobrze udokumentowany związek z zakażeniem SARS-CoV-2. Częściej stwierdza się je u młodszych pacjentów z lekką do umiarkowanej postacią choroby na dystalnych częściach kończyn, najczęściej palcach stóp. Początkowo zmiany mają charakter grudkowy z zaczerwienieniem skóry oraz pęcherzami, przypominając odmrożenia, następnie zmiany grudkowe ustępują, a skóra przybiera barwę siną (**Rycina 7**). Części chorych towarzyszy ból o umiarkowanym nasileniu (96).



Rycina 7. Zmiany odmrozinowe palców w przebiegu COVID-19 (96).

W patogenezie zmian odmrozinowych odgrywają zmiany w obrębie naczyń krwionośnych skóry właściwej (mikrozatory, zapalenie śródbłonna, wewnątrznacyniowe złoży fibryny, immunoglobulin i C3 dopełniacza), wynikające prawdopodobnie z dysregulacji układu immunologicznego w przebiegu zakażenia, a nie z bezpośredniego uszkodzenia komórek przez wirusa (**Rycina 8**), (97, 98).



Rycina 8. Obraz mikroskopowy zmian odmrozinowych. A – obfity naciek zapalny okolicy gruczołów potowych (hematoksylina-eozyna-szafran), w rogu – złogi CD303/BDCA-21 komórek dendrytycznych w pobliżu gruczołów potowych (immunoperoksydaza-diaminobenzydyna); B – Wewnątrznaczyniowe złogi fibryny w świetle drobnych naczyń żylnych skóry właściwej (hematoksylina-eozyna-szafran), u dołu – wewnątrznaczyniowe złogi immunoglobulin IgM (immunofluorescencja bezpośrednia) (97).

2.1.11 Post-COVID

Objawy pojawiające się w trakcie lub po przejściu ostrej fazy zakażenia wirusem SARS CoV-2, utrzymujące się powyżej 2 miesięcy i nie mające innej medycznej przyczyny określa się terminem post-COVID (99). Badania wykazują, że jeden lub więcej objawów może być obecny u przynajmniej 1/3 ozdowieńców, a dotknięte nimi osoby mają subiektywny spadek jakości życia. U większości osób hospitalizowanych z powodu COVID-19 objawy choroby utrzymują się zdecydowanie dłużej (100, 101, 102, 103). Analiza obejmująca 538 pacjentów z COVID-19 wypisanych ze szpitala wykazała utrzymywanie się dolegliwości przez ponad 3 miesiące (istotność statystyczna w porównaniu z grupą kontrolną $p < 0.05$), (104) Wśród dolegliwości utrzymujących się ponad 3 miesiące występowały m.in.:

- uczucie osłabienia/zmęczenie (28,3%)
- wzmożone pocenie (23,6%)
- przyspieszony oddech przy wysiłku (21,4%)
- zaburzenia snu (17,7%)
- dyskomfort w klatce piersiowej (14,1%)
- bóle w klatce piersiowej (12,3%)
- uczucie przyspieszonego bicia serca (11,2%)
- bóle stawów (7,6%)
- kaszel (7,1%)
- lęk/niepokój (6,5%)
- łysienie plackowate (28,6%) (104).

Po przejściu ostrej fazy choroby ozdrowieńcy często zmagają się z zaburzeniami lękowymi, depresją, zespołem stresu pourazowego, bezsennością, bólami głowy, upośledzeniem koncentracji i pamięci, określanymi również jako mgła covidowa (105, 106).

2.2 Badania obrazowe płuc w COVID-19

Infekcja dolnych dróg oddechowych w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2 najczęściej objawia się zapaleniem płuc o typie śródmiąższowym. W badaniach obrazowych (RTG, TK) najczęściej obserwowane są zmiany o typie matowej szyby, pogrubienie rysunku naczyniowego oraz konsolidacje zapalne. Zmiany zazwyczaj lokalizują się obwodowo w miąższu płucnym. Obraz TK klatki piersiowej u chorych z potwierdzonych testem PCR zakażeniem SARS-CoV-2 wykazuje 97% czułość w identyfikowaniu osób zakażonych (107). Chociaż specyficzność tej metody jest ograniczona z powodu możliwości występowania zmian o podobnym charakterze w innych chorobach, m.in. innych śródmiąższowych zapaleniach płuc, to w zestawieniu z charakterystycznym obrazem klinicznym oraz wywiadem epidemiologicznym stanowi ona skuteczne, dostępne i szybkie narzędzie diagnostyczne.

Ocena ilościowa zajęcia miąższu płucnego w tomografii komputerowej ma znaczenie prognostyczne dla ciężkości przebiegu choroby (108). Subiektywny charakter opisów badań radiologicznych wymusił usystematyzowanie sposobu oceny zmian płucnych i umożliwienie wiarygodnego porównania ich pomiędzy chorymi. Wśród zaproponowanych systemów oceny najszersze zastosowanie znalazła skala CTSS (*computer tomography severity score - skala ciężkości dla tomografii komputerowej*). Ta prosta, 25-punktowa skala opiera się na wykrywaniu zmian w obrębie każdego z pięciu płatów płucnych. W poszczególnym z regionów zaawansowanie zmian jest ocenione w skali 0-5 (0: brak zmian; 1: <5% zajęcia; 2: 5-25% zajęcia; 3: 26-49% zajęcia; 4: 50-75% zajęcia; 5: powyżej 75% zajęcia), (109, 110).

Dodatkową zaletą takiego rozwiązania jest możliwość automatyzacji pomiarów za pomocą algorytmów uczenia maszynowego AI do szybkiego, taniego i powtarzalnego generowania raportów z badania w sytuacji wywołanego pandemią przeciążenia systemu ochrony zdrowia (111).

2.3 Leki stosowane w COVID-19

Badania nad chorobą COVID-19 zaowocowały wyodrębnieniem grup leków skutecznych w leczeniu pacjentów z tą jednostką chorobową. Wśród środków o udokumentowanej skuteczności znajdują się zarówno leki przeciwzapalne (takie jak glikokortykosteroidy, inhibitory kinaz janusowych czy tocyilizumab), przeciwwirusowe (analogi nukleozydowe), leki przeciwkrzepliwe oraz przeciwciała monoklonalne przeciwko specyficznym białkom wirusa SARS-CoV-2. Poszczególne leki, ich mechanizm działania i zastosowanie przedstawia **Tabela 1**.

Tabela 1. Leki stosowane w COVID-19 (112-128)

Lek	Mechanizm działania	Zastosowanie
<i>Glikokortykosteroidy (GKS)</i>	Efekt przeciwzapalny poprzez wiązanie z sekcją promotorową genów kodujących IL-1, rekrutacja czynników transkrypcyjne genów kodujących cząsteczki o działaniu przeciwzapalnym, takie jak receptor II IL-1, lipokortyna 1, IL-10, α -2-makroglobulina	Lek I rzutu u pacjentów z COVID-19 i niewydolnością oddechową
<i>Tocyilizumab</i>	Humanizowane przeciwciało monoklonalne IgG1 wiążące się z receptorami dla interleukiny 6, blokując jej prozapalne działanie	Stosowany w skojarzeniu z GKS u pacjentów z narastającą niewydolnością oddechową oraz cechami nadmiernej odpowiedzi zapalnej
<i>Barycetynyb</i> <i>Tofacycetynyb</i>	Selektywne inhibitory kinaz janusowych JAK1 i JAK3 – pośredniczących w przekazywaniu informacji z receptorów błony	Doustne leki mogące być stosowane w skojarzeniu z GKS u pacjentów z niewydolnością oddechową i cechami rozwijającej

	komórkowej dla cytokin i czynników wzrostu do wnętrza komórki. W efekcie zmniejszają aktywność m.in. IL-2, IL-4, IL-15, IL-21	się burzy cytokinowej
<i>Remdesivir</i>	Lek przeciwwirusowy z grupy analogów nukleotydowych. Powoduje inhibicję polimerazy RNA zależnej od RNA	Zapobieganie rozwojowi ciężkiej postaci choroby z czynnikami ryzyka jej wystąpienia u pacjentów bez niewydolności oddechowej
<i>Molnupirawir</i>	Lek przeciwwirusowy z grupy analogów nukleotydowych. Częsteczka stanowi prolek metabolizowany do rybonukleotydu N-hydroksycytydyny, który następnie przez wirusową polimerazę RNA wprowadza błędy katastrofalnych tranzykcji, hamując proces replikacji	Zapobieganie rozwojowi ciężkiej postaci choroby z czynnikami ryzyka jej wystąpienia u pacjentów bez niewydolności oddechowej
<i>Tiksagewimab z cilgawimabem</i> <i>Regdanvimab</i> <i>Kazyrywymab z imdewymabem</i>	Przeciwciała monoklonalne neutralizujące cząsteczkę wirusa poprzez wiązanie się z jego białkami kolca	Profilaktyka rozwoju ciężkiej postaci COVID-19 (przed oraz poekspozycyjna) u pacjentów nieszczepionych lub niewytwarzających przeciwciał
<i>Heparyna drobnocząsteczkowa</i>	Efekt przeciwkrzepliwy w wyniku aktywacji antytrombiny, osoczowego czynnika hamującego działanie trombiny – czynnika Xa kaskady krzepnięcia	Profilaktyka powikłań zakrzepowozatorowych u wszystkich hospitalizowanych pacjentów z COVID-19 u których nie występują przeciwwskazania

3. Mechanizmy procesów włóknienia

Włóknienie jest procesem definiowanym jako zwiększenie ilości składników macierzy pozakomórkowej, w tym kolagenu oraz proteoglikanów. Następstwem jest przerost, zwapnienie i/lub bliznowacenie tkanek. Czynniki wyzwalające procesy włóknienia są bardzo zróżnicowane. Wśród nich wymienia się m.in.:

- uraz tkanek

- mechaniczny, fizyczny, chemiczny, niedokrwienny
- przewlekłe choroby zapalne niezależnie od etiologii
 - m.in. choroby autoimmunologiczne, wirusowe, bakteryjne
- toksyny
- alkohol
- leki
- promieniowanie
- czynniki genetyczne.

Włóknienie jest istotnym procesem w patogenezie wielu chorób przewlekłych. Jego rola jest kluczowa w patogenezie przewlekłej chorobie nerek, niewydolności serca, idiopatycznego włóknienia płuc, przewlekłych chorób wątroby, a także chorób autoimmunologicznych, m.in. twardziny układowej, reumatoidalnego zapalenia stawów, toczenia rumieniowego układowego, choroby Crohna czy mielofibrozy. Również naturalnym procesom starzenia towarzyszy szereg zmian wyzwalających procesy fibrotyczne (zmniejszenie zdolności regeneracyjnych organizmu, wzmożona aktywność zapalna, dysfunkcja mitochondriów). Zjawisko to opisano terminem *inflammaging* – zapalenie towarzyszące starzeniu, skutkujące zmianami ilościowymi i jakościowymi tkanki łącznej organizmu (129). Procesy włóknienia przebiegają dwuetapowo.

Etap I. Rekrutacja oraz aktywacja miofibroblastów

W etapie zachodzi hemotaksja oraz aktywacja miofibroblastów indukowana przez czynniki wzrostu (miejscowo wytwarzane przez uszkodzone komórki śródbłonka), makrofagi oraz inne komórki zapalne. Do najistotniejszych czynników biorących udział w tym procesie należą:

- PDGF - płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth hormone*)

- bFGF - zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor*)
- TGF- α - transformujący czynnik wzrostu α (*transforming growth hormone α*)
- EGF - nabłonkowy czynnik wzrostu (*epithelial growth factor*)
- IL-1
- TNF - czynnik martwicy nowotworu (*transforming growth factor*)

Etap II. Wytwarzanie składników macierzy pozakomórkowej ECM (*extracellular matrix*)

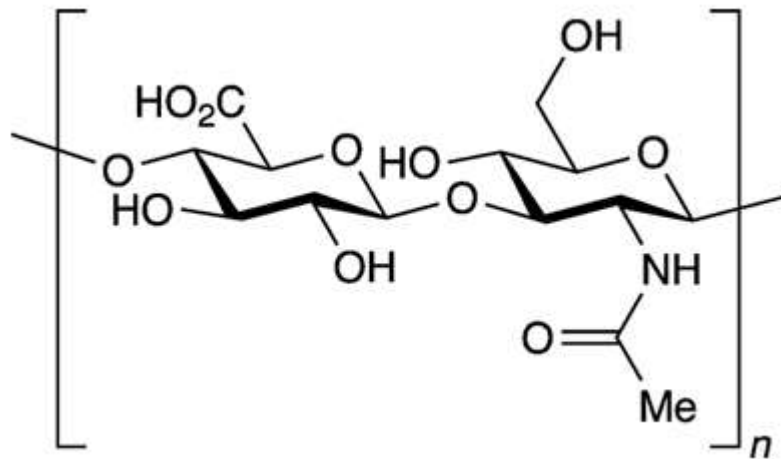
W drugiej fazie włóknienia miofibroblasty wytwarzają składniki macierzy pozakomórkowej, takie jak białka strukturalne, adhezyjne oraz cząsteczki wypełniające przestrzeń międzykomórkową. Przedłużona stymulacja miofibroblastów poprzez czynniki profibrotyczne, zaburzenia równowagi dynamicznej pomiędzy syntezą a degeneracją prawidłowych białek macierzy zewnątrzkomórkowej doprowadzają do kumulacji składników ECM i zmianą ich proporcji. Proces ten skutkuje zastępowaniem prawidłowej struktury tkankowej tkanką łączną. Efektem jest trwałe zaburzenie architektury narządów i wiążąca się z nim ich funkcjonalna i czynnościowa niewydolność (129, 130).

3.1 Składniki macierzy pozakomórkowej

Macierz pozakomórkowa to podlegający dynamicznym zmianom kompleks miejscowo syntetyzowanych makromolekuł wypełniających przestrzeń międzykomórkową. Odpowiada za utrzymanie turgoru oraz wytrzymałość tkanek. Umożliwia adhezję komórek oraz ich przemieszczanie się, wytwarza czynniki wzrostowe, pośredniczy w procesach sygnałowych i wypełnia przestrzeń międzykomórkową. Podstawę jej struktury stanowią włókna kolagenów i elastyny, cząsteczki proteoglikanów, glikozaminoglikanów oraz związana przez nie woda.

3.1.1 Kwas hialuronowy

Kwas hialuronowy (HA) to polisacharyd z grupy glikozaminoglikanów, będący polimerem kwasu D-glukoronowego i N-acetylo-D-glukozyminy (**Rycina 9**). W przeciwieństwie do innych przedstawicieli tej grupy nie wytwarza wiązań kowalencyjnych, nie łączy się z białkami w związku z czym nie wchodzi w skład proteoglikanów.



Rycina 9 – Struktura cząsteczkowa kwasu hialuronowego (131).

Oprócz organizmu człowieka występuje u innych kręgowców, a jego budowa zasadniczo nie różni się pomiędzy gatunkami. U dorosłego człowieka jego zawartość szacowana jest na około 15 gramów w postaci soli sodowej (132). Wytwarzany jest w błonie komórkowej poprzez związane z nią syntazy kwasu hialuronowego (typu 1, 2 oraz 3), a następnie uwalniany do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie stanowi ważny element macierzy pozakomórkowej. HA tworzy strukturę pojedynczego łańcucha polisacharydowego. Dzięki anionowej budowie łączy się z kationami (m.in. wapnia). Przekłada się to na oddziaływanie osmotyczne z cząsteczkami wody, co skutkuje związaniem ich w postaci żelu. Jedna cząsteczka HA jest w stanie związać jej tysiąckrotność w stosunku do masy własnej cząsteczki (133). W przestrzeni ECM kwas hialuronowy odpowiada za jej turgor,

proporcjonalny do ilości związanych cząsteczek wody. Właściwość ta nadaje tkankom elastyczność i odporność na ściskanie, chroniąc je przed uszkodzeniem. W organizmie ludzkim największa ilość HA występuje w skórze właściwej i stopniowo zmniejsza się z wiekiem, co przekłada się na jej mniejszą sprężystość. Pod względem zawartości HA przewyższa jedynie pępowina. HA pełni również ważną rolę w połączeniach stawowych, wchodząc w skład chrząstek i mazi stawowej, amortyzując działające obciążenia. Bierze udział w procesach formowania chrząstki poprzez wpływ regulatorowy na chondrocyty. Uwodniony kwas hialuronowy wraz z usieciowionym kolagenem odpowiadają za żelową konsystencję ciała szklonego, a pośrednio za utrzymanie kształtu i napięcia gałki ocznej. Jest również składnikiem wydzieliny gruczołów łzowych. W nerkach jego zawartość różni się w zależności od lokalizacji. Brodawki nerkowe wchodzące w skład jej rdzenia charakteryzują się wysoką zawartością HA, kora zaś jest w ten związek uboga. Uważa się, że międzywarstwowy gradient zawartości tej hydrofilnej cząsteczki przyczynia się do zachodzących w nerkach procesach resorpcji wody (134, 135). W płucach odpowiada za strukturę pęcherzyków płucnych, śródbłona naczyń włosowatych (w szczególności glikokaliksu), buduje błony podstawne oskrzelików oraz wchodzi w skład ich nabłonka (136). W warunkach fizjologicznych obecne w pęcherzykach płucnych makrofagi w otoczeniu długołańcuchowych cząsteczek HA pozostają z nim w oddziaływaniu poprzez receptor CD44. W takiej formie ich aktywność zapalna jest ograniczona, zaś ich funkcja to przede wszystkim fagocytoza mająca na celu oczyszczanie pęcherzyków płucnych. W przypadku stanu zapalnego płuc w ostrej fazie zawartość HA skokowo rośnie, co zbiega się w czasie z okresem największej infiltracji tkankowej przez migrujące leukocyty. Wnioskuje się, że HA przyczynia się do ich kumulacji w miejscu uszkodzenia tkanki (137). Kwas hialuronowy pełni zatem rolę regulatorową w immunologii i procesach sygnałowych stanu zapalnego.

Właściwość ta jest determinowana poprzez długość łańcucha polisacharydowego cząsteczki HA. Dowiedziono, że obecność długołańcuchowego kwasu hialuronowego zmniejsza nasilenie stanu zapalnego m.in. poprzez zmniejszenie w komórkach makrofagów ekspresji genów odpowiedzialnych za wytwarzanie cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6). Jednocześnie dominacja krótkołańcuchowego HA jest charakteryzowana przez działanie odwrotne, zwiększając wytwarzanie m.in. TGF- β 1, IL-10 czy IL-11 oraz hamując fagocytozę (138). W warunkach fizjologicznych HA w przeważającej ilości występuje w postaci wielkocząsteczkowego polimeru o masie powyżej 1000kDa o właściwościach przeciwzapalnych. W obecności bodźca uszkodzającego tkankę i stanu zapalnego obserwowane jest zjawisko wzmożonej fragmentacji HA, skutkujące zwiększeniem odsetka prozapalnych cząsteczek o krótszym łańcuchu i mniejszej masie cząsteczkowej (<500kDa). Za działanie to odpowiedzialne są m.in. zmiana ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę syntaz kwasu hialuronowego oraz hialuronidaz, a także bezpośredni wpływ oksydacyjny reaktywnych form tlenu na cząsteczki HA (139,140). Zjawisku temu przypisuje się m.in. rolę w inicjacji procesów gojenia i regeneracji tkankowej. Wyrzut cytokin prozapalnych mediowanych zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 oraz uwalnianie wolnych rodników przez neutrofile nagromadzone w tkance płucnej hamuje syntezę i nasila degradację długołańcuchowego HA, jednocześnie zwiększa powstawanie krótkołańcuchowego kwasu hialuronowego. Przekłada się to na dalszy niekontrolowany wyrzut cytokin, co może leżeć u podłoża zjawiska burzy cytokinowej obserwowanego w COVID-19 (141).

HA jest ważnym składnikiem tkanki łącznej, przez co ma swój udział w procesie regeneracji uszkodzenia tkanek oraz bezpośrednio wpływa na różnicowanie komórek macierzystych (142, 143, 144). W uszkodzonej tkance cząsteczki HA wiążą się za pomocą hialadhedryn z elementami macierzy pozakomórkowej, tworząc sprzyjające środowisko do jej

regeneracji. Po ustaniu ostrej fazy zapalenia, produkcja HA i innych składników ECM ulega zmniejszeniu, a na ich bazie w trakcie zdrowienia (remodelingu) odtwarzania jest prawidłowa tkanka. W przypadku przedłużania się procesu zapalnego podtrzymywana jest wzmożona synteza kwasu hialuronowego, migracja leukocytów oraz kumulacja składników ECM. W efekcie, aktywacja reakcji zapalnej jest pobudzana miejscowo wskutek zmiany fizjologicznej struktury tkanki, nie zaś przez bodziec zewnętrzny pierwotnie ją wywołujący. Stopniowo struktura zdrowej tkanki zastępowana jest tkanką łączną. Stanowi to podłoże większości przewlekłych chorób o etiologii zapalnej (m.in. płuc, jelit, tkanki łącznej, czy wątroby), wskutek czego z czasem obserwuje się włóknienie tkankowe i utratę prawidłowej funkcji zajętych narządów (145). Również w fizjologicznym procesie starzenia występuje zapalenie i procesy włóknienia, jednak o znacznie mniejszej dynamice.

3.1.2 Kolagen

Kolageny są najliczniej występującą grupą białek ludzkich. Stanowią około 30% całkowitej masy białka organizmu. Charakteryzują się obecnością przynajmniej jednej potrójnej helisy, formowanej z trzech skręconych nici powtarzalnych sekwencji trójpeptydów bogatych w prolinę Gly-X-Y. Na rodzinę kolagenów składa się z 28 różnych typów białek, różniących się budową, właściwościami i dystrybucją tkankową. Na podstawie ich struktury chemicznej i przestrzennej zostały podzielone na siedem głównych grup (**Tabela 2**).

Kolageny tworzące włókna: stanowią około 90% całkowitej zawartości kolagenu w organizmie. Zdolność do łączenia w wielocząsteczkowe agregaty o supracząsteczkowej strukturze włókien o średnicy 25 - 400nm. Taka budowa zapewnia im trwałość i odporność na rozrywanie, występują w tkankach o wysokiej odporności mechanicznej. Kolagen typu I stanowi 90% organicznej masy kości. Inne kolageny tej grupy odpowiadają m.in za

właściwości mechaniczne ścięgien, więzadeł, skóry, chrząstek oraz błon płodowych, występują również w większości innych tkanek i narządów.

Kolageny z grupy FACIT: cechują się przerywaną strukturą potrójnej helisy z eksponowanymi domenami zdolnymi do wytwarzania wiązań kowalencyjnych. Dzięki nim wiążą się z łańcuchami glikozaminoglikanów (należących do polisacharydów: siarczanami chondroityny, dermatanu, keratanu, heparanu), wspólnie tworząc proteoglikany. W tej postaci stanowią ważny składnik macierzy pozakomórkowej. Proteoglikany wykazują zdolność do wiązania kationów, tworzenia żelu i oddziaływania z innymi elementami ECM. Odpowiadają za utrzymanie hydratacji tkanek, ich struktury i odporności na ściskanie.

Mikrofibrylarny kolagen: reprezentowany przez kolagen typu VI. Tworzy czwartorzędową strukturę mikrofibryli - długich włókien będących polimerem cząsteczek potrójnej helisy. Występuje w większości tkanek łącznych, odgrywając ważną rolę w utrzymaniu ich integralności.

Kolageny tworzące heksagonalne układy sieciowe: krótkołańcuchowe kolageny VIII i X. Zawierają niekolagenowe domeny C1q, która pomagają w tworzeniu nadcząsteczkowej sieci heksagonalnej. Typ X obecny w chrząstce wzrostowej jest zaangażowany w proces kostnienia.

Kolagen tworzący włókna kotwiczące: reprezentowany przez kolagen typu VII. Posiada najdłuższy spośród wszystkich kolagenów region trójhelikalny. Buduje włókna kotwiczące, które łączą błony podstawne z otaczającym podścieliskiem. Ponadto stanowi rusztowanie w procesie gojenia i naprawy uszkodzonych tkanek.

Kolageny zawierające domeny przezbłonowe: zawierają strukturę potrójnej helisy z domenami transmembranalnymi. Mogą pełnić funkcje receptorów na powierzchni komórek bądź stanowić składnik błonowy.

Kolagen budujący błony podstawne: kolagen typu IV jest podstawowym budulcem błon podstawnych, przez co pełni kluczową rolę w organizmie. Ze względu na liczne wiązania z innymi składnikami błon podstawnych (m.in. lamininami oraz nidogenami) formułuje stabilną strukturę i nie rozpuszcza się w wodzie.

Multipleksyny: tworzą je kolageny typu XV, XVI oraz XVIII. Ich makrocząsteczki składają się z kilku domen kolagenowych oraz C-końcowych fragmentów o właściwościach antygenowych. Mogą pełnić rolę w stabilizacji struktur błonowych poprzez wytwarzanie wiązań kowalencyjnych z glukozaminoglikanami.

Tabela 2. Podział kolagenów oraz główne miejsca ich występowania (146).

Typ kolagenu	Występowanie
Kolageny tworzące włókna	
I	<i>kości, skóra, więzadła, ścięgna, rogówka</i>
II	<i>chrząstka, ciało szkliste, jądro miazdżyste</i>
III	<i>skóra, naczynia, włókna retikulino- naczyniowe narządów miękkich</i>
V	<i>pluca, rogówka, kości, błony płodowe,</i>
XI	<i>ciało szkliste</i>
Kolagen budujący błony podstawne	
IV	<i>błony podstawne</i>
Kolagen tworzący mikrofibryle	
VI	<i>skóra, chrząstka, łożysko, płuca, naczynia, krążek międzykręgowy</i>
Kolagen tworzący włókna kotwiczące	
VII	<i>skóra właściwa i połączenie skóry z naskórkiem, błony śluzowe</i>
Kolageny tworzące heksagonalne układy sieciowe	
VIII	<i>komórki śródłonka, błona Descemeta</i>
X	<i>chrząstka wzrostowa</i>
Kolageny FACIT	
IX	<i>chrząstka, ciało szkliste, rogówka</i>
XII	<i>ochrzęstna, ścięgna, więzadła</i>
XIV	<i>skóra, ścięgna, naczynia, łożysko, płuca, wątroba</i>

XIX	<i>rhabdomyosarcoma</i>
XX	<i>nabłonek rogówki, część chrzęstna mostka, ścięgna, skóra embrionalna</i>
XXI	<i>ściana naczyń krwionośnych</i>
Kolageny przezblonowe	
XIII	<i>naskórek, mieszki włosowe, endomysium, jelita, chondrocyty, płuca, wątroba</i>
XVII	<i>połączenie skóry z naskórkiem</i>
Multipleksyny	
XV	<i>fibroblasty, mięśnie gładkie, nerki, trzustka</i>
XVI	<i>fibroblasty, owodnia, keratynocyty</i>
XVIII	<i>płuca, wątroba</i>

3.1.2 Elastyna

Elastyna to wytwarzane przez fibroblasty hydrofobowe białko stanowiące główny składnik włókien elastycznych. Tworzy ultrastrukturę nieregularnej spirali, przez co jest podatna na rozciąganie. Odpowiada za sprężystość tkanek i pozwala tkance powracać do pierwotnego kształtu po odkształceniu. Pełni szczególnie istotną rolę w budowie ścian naczyń krwionośnych, które poddawane są nieustannemu rozciąganiu wskutek pulsacyjnych zmian ciśnienia (147).

3.1.4 Fibrylina

Fibrylina to glikoproteina będąca głównym składnikiem pozakomórkowych mikrofibryli, wraz z elastyną wchodzących w skład włókien sprężystych. Defekty syntezy spowodowane mutacją genu fibryliny-1 objawiają się chorobami układu kostnego i osłabieniem ścian naczyń krwionośnych (zespół Marfana), (148).

3.1.5 Fibronektyna

Fibronektyna to wielofunkcyjny duży heterodimer (450kD) związany z powierzchnią komórki, błoną podstawną oraz macierzą pozakomórkową. Przez receptor integrynowy wnika do komórki i wiąże się z białkami cytoszkieletu. Pełni rolę w przekazywaniu sygnałów do komórki oraz jej adhezji z macierzą pozakomórkową. Wpływa również na funkcjonowanie cytoszkieletu oraz procesy podziałów komórkowych. Występuje także w postaci niezwiązanej, jako wolne białko osocza (149).

3.1.6. Laminina

Laminina to wielkocząsteczkowa glikoproteina wytwarzana przez większość komórek nabłonka i śródbłonka. Stanowi wraz z kolagenem typu IV oraz siarczanem heparanu główny budulec błony podstawnej. Jej cząsteczki stabilizują ją poprzez oddziaływanie z innymi składnikami ECM, takimi jak proteoglikany, kolageny, fibronektyna czy siarczan heparanu (150). Pełni również funkcję w ich proliferacji, różnicowaniu i ruchomości (151).

3.1.7 Interyny

Interyny to rodzina przezbłonowych heterodimerycznych glikoprotein, zaliczanych do białek adhezyjnych. Pełnią funkcję receptorową w procesach sygnałowych zachodzącym między macierzą pozakomórkową a komórką. Wewnątrz komórki wiążą się z białkami cytoszkieletu, na zewnątrz zaś z lamininą, kolagenami oraz innymi składnikami ECM, integrując ze sobą te dwie struktury (152).

3.2. Degradacja składników macierzy pozakomórkowej

Macierz pozakomórkowa podlega ciągłym, równoległym zachodzącym procesom produkcji i degradacji jej elementów. Procesy odnowy są niezbędne dla zachowania jej fizycznych i chemicznych właściwości. Za degradowanie elementów ECM odpowiadają przede wszystkim metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP, *matrix*

metalloproteinases), elastaza neutrofilii, katepsyna G oraz ADAMTS – wydzielona z rodziny metaloproteinaz grupa białek zawierających w swojej budowie motyw trombospondyny.

Metaloproteinazy to grupa 28 enzymów proteolitycznych zawierających w swoim składzie atom cynku, pełniący rolę katalityczną. Są wytwarzane wewnątrzkomórkowo i wydzielane jako ziarna zymogenu do przestrzeni pozakomórkowej. Produkowane są przez wiele typów komórek, m.in. fibroblasty, makrofagi, keratynocyty, komórki śródbłonna, monocyty, limfocyty T, neutrofile, neurony, mioocyty oraz komórki nowotworowe. Biorą udział w procesach gojenia, przebudowy i wzrostu tkanek. Przyczyniają się do procesu apoptozy i angiogenezy. Rozkładają błony podstawne naczyń i białka macierzy międzykomórkowej, co ułatwia przemieszczanie się komórek. Przekłada się to na ułatwienie rozwoju nowotworów i powstawania przerzutów. Poza rozkładaniem składników macierzy pozakomórkowej metaloproteinazy aktywują prekursorów cytokin oraz czynników wzrostowych poprzez proteolizę ich prodomeń. Wyróżnia się sześć grup metaloproteinaz, ich właściwości omówiono poniżej (**Tabela 3**), (153).

Tabela 3. Podział metaloproteinaz (153).

Grupa	Przynależność	Główne substraty ECM
<i>Kolagenazy</i>	<i>MMP-1, 8, 13</i>	<i>kolagen I, II, III, VI, X</i>
<i>Żelatynazy</i>	<i>MMP-2, 9</i>	<i>żelatyna, kolagen III, IV, V, VII, X, fibronektyna, elastyna</i>
<i>Stromielizyny</i>	<i>MMP-3, 10, 11</i>	<i>aggrekan, laminina, fibronektyna, żelatyny, kolagen III, IV, V, IX, X</i>
<i>Matrylizyny</i>	<i>MMP-7, 26</i>	<i>fibronektyna, fibrynogen, laminina, kolagen IV, żelatyny</i>
<i>Metaloproteinazy typu przezłonowego</i>	<i>MMP-14-17, 25, 26</i>	<i>kolageny I, II, III, aggrekan, fibryna, żelatyna, laminina, aktywują inne metaloproteinazy</i>
<i>Pozostałe</i>	<i>MMP-12, 19, 20, 23, 27, 28</i>	<i>zróżnicowane</i>

Aktywność metaloproteinaz podlega ścisłej regulacji na różnych etapach: transkrypcji genów, wydzielania poza komórkę oraz aktywacji proenzymu w przestrzeni pozakomórkowej. Synteza i wydzielanie MMP jest stymulowane m.in. przez czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), TNF- α , Il-1, prostaglandyny oraz wytwarzane przez komórki nowotworowe pozakomórkowe inhibitory metaloproteinaz EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*) (154). Przeciwną funkcję pełnią tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs, *tissue inhibitor metalloproteinases*) oraz α 2-makroglobulina. Hamowanie aktywności MMP odbywa się poprzez wytwarzanie kompleksów z ich tkankowymi inhibitorami. Wzrost wytwarzania tkankowych inhibitorów metaloproteinaz przyczynia się do procesów włóknienia poprzez zmniejszenie aktywności proteolitycznej MMP. W efekcie dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy wytwarzaniem a proteolizą składników ECM i ich akumulacją (155).

3.3 Włóknienie jako następstwo zakażenia SARS-CoV-2

Wczesna faza zakażenia SARS-CoV-2 u znacznej części chorych wiąże się z występowaniem zmian radiologicznych w płucach o charakterze matowej szyby, typowych dla śródmiąższowego zapalenia płuc (156). Cechą wspólną chorób w których w obrębie płuc występują zmiany śródmiąższowe jest przewlekłe współistnienie procesów zapalenia i włóknienia oraz możliwej stopniowej progresji do włóknienia płuc (157). W badaniu tomografii komputerowej płuc przeprowadzonym przez Hana i wsp. na grupie 114 pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19, po 6 miesiącach od zachorowania wykazano u 35% zmiany o typie włóknienia płuc, a u 27% przetrwały zmiany o charakterze matowej szyby oraz obrzęku śródmiąższu płuc (158). Podobne wyniki uzyskano w analizie Morina i wsp., gdzie w grupie 171 pacjentów po 4 miesiącach od wypisu ze szpitala zmiany włókniste w płucach stwierdzano w TK klatki piersiowej u 19% pacjentów, z czego aż u 39% chorych u

których wystąpił ARDS (159). Przegląd systematyczny autorstwa Polaka i wsp. opublikowanych badań uwzględniających badania histopatologiczne płuc pacjentów na różnym etapie choroby COVID-19 wykazał, że procesy włóknienia mogą rozpoczynać się już w trzecim tygodniu choroby (160). Wśród hipotez przyczyn wzmożonego włóknienia wymienia się:

- profibrotyczny wpływ cytokin prozapalnych
- uszkodzenie śródbłonka
- aktywację dopełniacza
- prozakrzepowe zaburzenia hemostazy
- oraz aktywację płytek krwi (161).

Przeprowadzone przez Bass'a wsp. sekwencjonowanie komórkowego RNA uzyskanego w biopsjach narządów chorych na COVID-19 wykazało zwiększoną ekspresję genów inicjujących reakcję zapalną (IL-2, IL-6, IL-8, IL-17A oraz NF- κ B) oraz czynników promujących włóknienie (162).

W przebiegu COVID-19 może również dochodzić do włóknienia w obrębie mięśnia sercowego. Uszkodzenie kardiomyocytów przez SARS-CoV-2 jest silnym bodźcem pobudzającym procesy fibrogenyzy. Jego mechanizm opisano w rozdziale 2.1.8. Badanie bioptatów *miocardium* wykazało, że znaczna część chorych z ciężką postacią COVID-19 ma histopatologiczne wykładniki włóknienia (54, 163, 164).

3.4 Markery włóknienia w praktyce klinicznej

Zidentyfikowano dotychczas wiele markerów włóknienia, zarówno pośrednich (m.in. wynikających z aktualnego uszkodzenia tkanek) jak i bezpośrednich, związanych z procesami tworzenia i rozkładu składników macierzy pozakomórkowej.

Najlepiej zwalidowano markery włóknienia w populacji chorych na przewlekłe choroby wątroby, szczególnie wirusowe zapalenie wątroby typu C. Większość dostępnych badań pochodzi z okresu, w którym do określenia zaawansowania choroby wykonywano biopsję wątroby. Związana z tym duża dostępność danych histopatologicznych pozwoliła na odniesienie ich do poszczególnych składników osocza i identyfikację tych o największej korelacji ze zmianami tkankowymi i wyselekcjonowanie markerów włóknienia. Zaletą takiego rozwiązania jest wysoka powtarzalność oraz niski koszt badania. Wady nieinwazyjnych wskaźników włóknienia to: ograniczona specyficzność w identyfikowaniu procesu włóknienia ograniczonego do jednego specyficznego narządu, trudność w rozgraniczaniu poszczególnych etapów włóknienia, szczególnie na jego początkowych etapach oraz wpływ na wyniki innych stanów i schorzeń (hemoliza, zespół Gilberta, stan zapalny, niewydolność nerek, hemodializa). Aktualnie rola markerów włóknienia wątroby w praktyce klinicznej została ograniczona z powodu rozpowszechnienia metod elastografii (ARFI, USG, MRI), które cechują się większą czułością oraz specyficznością, nie wymagają pobrania krwi ani specyficznych odczynników, są powtarzalne oraz wynik uzyskiwany jest bezpośrednio w momencie badania, co skraca czas do postawienia diagnozy (165).

3.4.1 Bezpośrednie markery włóknienia tkankowego

W chorobach przebiegających z włóknieniem opisywane są liczne zmiany w składzie ECM, m.in. zaczynają w niej dominować włókna fibronektyny oraz kolagenów I, III oraz VI

o ścisłym utkaniu. Badania zmian osoczowych stężeń cząsteczek zaangażowanych w proces fibrogenyzy pozwoliły na wyłonienie spośród nich tych, które mogą mieć zastosowanie w diagnostyce chorób przebiegających z włóknieniem, stanowiąc ich marker (**Tabela 4**), (166)

Tabela 4. Bezpośrednie markery włóknienia tkankowego (167-209).

Marker	Właściwości
<i>Neoepitopy tworzenia i degeneracji kolagenu</i>	Oderwanie fragmentu peptydu w procesie degeneracji białek skutkuje powstaniem peptydu o nowej sekwencji N lub C-końcowej, tzw. neoepitopów. Pomiar stężeń poszczególnych neoepitopów degradacji kolagenu jest odzwierciedleniem zjawisk zachodzących w procesie fibrogenyzy. Znajduje on zastosowanie m.in. w ocenie dynamiki i zaawansowania procesów włóknienia w samoistnym włóknieniu płuc czy twardzinie układowej
<i>Białko D surfaktantu</i>	Białko z grupy kolektyn wytwarzane w płucach przez komórki pęcherzykowe typu 2, oskrzelikowe komórki maczugowate (komórki Clary) oraz makrofagi pęcherzykowe. Jego stężenie w surowicy koreluje z dynamiką procesów włóknienia w samoistnym włóknieniu płuc
<i>Kwas hialuronowy</i>	Przedstawiciel glikozaminoglikanów, jeden ze składników ECM wytwarzanych w nadmiarze w procesie włóknienia. Jego stężenie w surowicy koreluje z zaawansowaniem procesów włóknienia m.in. w alkoholowej chorobie wątroby, niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby, wirusowych zapaleniach wątroby oraz przewlekłej chorobie nerek
<i>Laminina</i>	Składnik błony podstawnej stanowiący użyteczny marker procesów włóknienia. Jego stężenie w surowicy koreluje z zaawansowaniem włóknienia wątroby niezależnie od jego przyczyny oraz z ryzykiem wystąpienia powikłań marskości wątroby
<i>YKL-40</i>	Chitynazo-podobna glikoproteina wytwarzana m.in. przez makrofagi, neutrofile, chondrocyty oraz komórki maziowe. Pełni rolę w procesach remodelingu i degradacji macierzy pozakomórkowej, bierze udział w T-zależnej reakcji immunologicznej. Jej stężenie w surowicy koreluje ze stopniem zaawansowania włóknienia wątroby, znajduje zastosowanie w ocenie skuteczności terapii przeciwwirusowych w HCV
<i>PDGF-BB (płytkopochodny czynnik wzrostu BB)</i>	Czynnik wzrostu podlegający ekspresji przez fibroblasty, płytki krwi, makrofagi, komórki tuczne oraz śródbłónka. Stymuluje komórki gwiaździste wątroby do proliferacji i migracji. Jego stężenie negatywnie koreluje z

	zaawansowaniem włóknienia wątroby
<i>TGF-α (transformujący czynnik wzrostu α)</i>	Cząsteczka będąca ligandem receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF-R). Czynnikiem mitogennym dla wielu tkanek i komórek organizmu. W wątrobie stymuluje przekształcanie komórek gwiaździstych w miofibroblasty. Pełni rolę w rozwoju raka wątrobowokomórkowego. Stężenie TGF-α pozytywnie koreluje z obecnością marskości wątroby oraz jej niewydolnością
<i>Białko MFAP4</i>	Pozakomórkowa glikoproteina biorąca udział w formowaniu struktury włókien elastycznych macierzy pozakomórkowej. Jest jednym z dokładniejszych surowiczych markerów identyfikujących obecność marskości wątroby. Jego stężenie pozytywnie koreluje z zaawansowaniem przewlekłej obturacyjnej choroby płuc
<i>Fragmenty cytokeratyny-18</i>	Cytokeratyny wchodzą w skład filamentów pośrednich tworzących cytoszkielet komórki. Indukowana kaspazą apoptoza hepatocytów przebiega z uwolnieniem rozszczepionych fragmentów cytokeratyny-18. Pomiar stężenia fragmentów cytokeratyny-18 w surowicy znalazł zastosowanie w rozróżnianiu niealkoholowej tłuszczycy wątroby oraz włóknienia wątroby, charakteryzuje się ograniczoną czułością.
<i>Karboksypeptyd prokolagenu typu I oraz aminopeptyd III prokolagenu</i>	Cząsteczki powstałe w procesie syntezy kolagenu poprzez rozszczepienie prokolagenu na końcach aminowym oraz karboksylowym przez C-peptydazę i N-peptydazę prokolagenu. Charakteryzuje się czułością 76-78% oraz specyficznością 71-81% w chorobach przebiegających z włóknieniem. Wykazano przydatność tego markera w stratyfikacji ryzyka chorób serca przebiegających z włóknieniem, m.in. kardiomiopatii
<i>Kolagen typu IV</i>	Typ kolagenu występujący naturalnie w wątrobie, w procesie włóknienia deponowany w nadmiarze w przestrzeni okołowrotnej. Pomiar jego stężenia pozwala wykryć proces włóknienia z czułością i specyficznością 88%
<i>Galektyna 3</i>	Białko z grupy lektyn, produkowane przez aktywowane makrofagi, komórki tuczne, eozynofile oraz komórki nabłonka przewodu pokarmowego i dróg oddechowych. Poprzez połączenie z lamininą, fibronektyną oraz integrzynami stymulują adhezję i proliferację komórek. Bierze również udział w procesie włóknienia i karcynogenezy. Liczne badania dowiodły roli galektyny w rozwoju niewydolności serca. Jej stężenie w surowicy jest dobrym markerem włóknienia mięśnia sercowego

II. Cel pracy

Cel główny:

Ocena stężenia kwasu hialuronowego w surowicy krwi chorych na COVID-19

Cele szczegółowe:

1. Ocena zależności stężenia kwasu hialuronowego w surowicy z:

- ciężkością przebiegu choroby
- stopniem niewydolności oddechowej
- zajęciem płuc w tomografii komputerowej
- obecnością burzy cytokinowej
- ryzykiem zgonu
- obecnością chorób współtowarzyszących
- stosowaniem glikokortykosteroidów
- statusem zaszczepienia przeciwko COVID-19

2. Zbadanie korelacji stężenia HA w surowicy chorych na COVID-19 z parametrami krwi obwodowej, ze szczególnym uwzględnieniem wykładników ostrej fazy, uszkodzenia wątroby, nerek, układu czerwonokrwinkowego oraz gazometrii krwi tętniczej

III. Materiał i metody

1. Populacja badana i charakterystyka kliniczna

Do analizy włączono 94 pacjentów chorych na COVID-19 hospitalizowanych w okresie od listopada 2021 do marca 2022 w Oddziale COVID oraz Oddziale Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych z Ośrodkiem Diagnostyki i Leczenia Endoskopowego (w okresie 1.11 - 31.12.2021 roku, przekształconego w oddział dedykowany leczeniu pacjentów zakażonych SARS-CoV-2) Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. J. Śniadeckiego w Białymstoku.

W oparciu o wywiad lekarski i dostępną dokumentację medyczną zgromadzono informacje dotyczące osób badanych: wiek, status zaszczepienia, obecność chorób współistniejących. W grupie osób hospitalizowanych w oparciu o zlecenia lekarskie wyszczególniono pacjentów otrzymujących tlenoterapię oraz leki w terapii COVID-19: deksametazon, remdesivir, tocyilizumab oraz barycytynib.

U wszystkich chorych rozpoznanie zakażenia SARS CoV-2 potwierdzano za pomocą testu RT-PCR lub płytkowego testu antygenowego z materiału wymazowego pobieranego z nosogardła. Średnia wieku w populacji osób badanych wyniosła 59,2 lata (zakres 22-89), w tym 38 kobiet ($x=58,4$; zakres 23-89 lat) oraz 56 mężczyzn ($x=58,4$; zakres 22-85 lat). 29 chorych było zaszczepionych przeciwko COVID-19, z tego 3 dawki szczepionki przyjęło jedynie 8 pacjentów, 2 dawki – 13 pacjentów oraz 1 dawkę – 8 pacjentów. 61 osoby nie były zaszczepione, zaś w przypadku czterech osób nie uzyskano informacji na temat statusu zaszczepienia. 66 osób w grupie badanej posiadało choroby współtowarzyszące, wśród najczęstszych występowały: nadciśnienie tętnicze (33 osoby), cukrzyca (18 osób) oraz marskość wątroby (8 osób) oraz inne.

Ze względu na przebieg infekcji, pacjentów podzielono na trzy grupy ciężkości przebiegu choroby:

- *umiarkowany (U)* – osoby wymagające tlenoterapii niskoprzepływowej lub hospitalizowane, niewymagające tlenoterapii
- *ciężki (C)* – osoby wymagające tlenoterapii wysokoprzepływowej
- *krytyczny (K)* – wszystkie osoby leczone respiratoroterapią lub rozwijające niewydolność wielonarządową niezależnie od sposobu tlenoterapii

62 osoby miały umiarkowany przebieg choroby, 14 ciężki, 16 krytyczny, dwie zaś zakwalifikowano jako ciężki/krytyczny ze względu na rozwój niewydolności wielonarządowej w ciągu 48 godzin i brak respiratoroterapii. U 23 chorych hospitalizacja zakończyła się zgonem. 9 pacjentów w grupie badanej w trakcie hospitalizacji przekazano na oddział intensywnej terapii, z czego 8 zmarło. Leczenie przeciwwirusowe - remdesivir- stosowano u 11 chorych. Remdesivir (Veklury) podawano dożylnie w dawce 200mg/d w pierwszej dobie oraz 100mg/d w kolejnych czterech dobach. U 3 chorych z tlenoterapią bierną i obecnymi czynnikami ryzyka ciężkiego przebiegu choroby podawano barycetynyb (Olumiant) w dawce 4mg p.o. na dobę przez 10 dni. Deksametazon w dawce co najmniej 4mg/dobę i.v. otrzymało 37 chorych. Burzę cytokinową, rozpoznawaną przy stężeniu interleukiny 6 powyżej 100pg/ml, stwierdzono u 34 pacjentów. U 20 pacjentów ze stężeniem IL-6 powyżej 100pg/ml zastosowano tocyliczumab (RoActemra) w pojedynczej dawce 400mg iv.

Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych osób w przedziale wiekowym 21 - 84 lata, z czego 15 osób stanowiły kobiety, a 15 mężczyźni. Czynne zakażenie wykluczono uzyskaniem ujemnym wynikiem trójgenowego testu PCR SARS-CoV-2.

Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na udział w badaniu klinicznym i uzyskano akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Nr APK.002.497.2021).

2. Badania laboratoryjne

Badania laboratoryjne u wszystkich pacjentów wykonywane były przy przyjęciu pacjenta na Oddział (pobranie B1, n=94), dodatkowo wśród osób pozostających na Oddziale wykonano drugie pobranie krwi w 10 dobie hospitalizacji (\pm 24h) (pobranie B2, n=40). W analizie uwzględniono rutynowe badania krwi (morfologia, układ krzepnięcia, wybrane parametry biochemiczne), gazometrię krwi tętniczej, a także stężenia: kwasu hialuronowego, prokalcytoniny oraz interleukiny 6.

Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy krwi oznaczano metodą aglutynacji lateksowej za pomocą zestawu odczynnikowego Hyaluronic acid LT (Fujifilm Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Niemcy) na analizatorze biochemicznym Cobas 6000 c501 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy). Metoda oznaczenia polega na powstawaniu kompleksów antygen-przeciwciało, gdzie antygenem jest ludzki kwas hialuronowy związany z białkiem specyficznym HABP (ang. *hyaluronic acid binding protein*) zawartym w zestawie odczynnikowym a przeciwciałem, którym jest monoklonalne przeciwciało mysie skierowane przeciwko białku HABP opłaszczony na cząsteczkach lateksu. Powstałe kompleksy prowadzą do zmętnienia roztworu. Miarą stężenia kwasu hialuronowego jest stopień zmętnienia próbki. Wartości oczekiwane stężenia kwasu hialuronowego wynoszą 23 ± 17 ng/ml. Liniowość metody wynosi do 1000 ng/ml, a próg detekcji – 5,8 ng/ml (210).

Pozostałe parametry laboratoryjne zostały oznaczone przy użyciu powszechnie stosowanych metod. Metodologię pomiarów oraz zakresy referencyjne zebrano w **Tabeli 5**.

Tabela 5. Analizowane parametry laboratoryjne, metody oznaczenia oraz zakresy referencyjne

<i>Badanie</i>	<i>Nazwa firmowa testu</i>	<i>Aparat, nazwa własna, firma, miasto, państwo</i>	<i>Metoda oznaczenia</i>	<i>Zakres referencyjny</i>
<i>Kwas hialuronowy</i>	<i>HA</i>	<i>Odczynnik FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Mannheim, Niemcy Analityzator COBAS 6000 moduł c501, Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Szwajcaria</i>	<i>Aglutynacja lateksowa</i>	<i>23±17ng/ml</i>
<i>Prokalcytonina</i>	<i>PCTX</i>	<i>Cobas e-411 cobas 8000, moduł e-801, Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Szwajcaria</i>	<i>Elektrochemiluminescencyjna 'ECLIA'</i>	<i><0,046 ng/ml</i>
<i>Interleukina 6</i>	<i>Elecsys IL-6</i>	<i>COBAS e-411 cobas 8000, moduł-e 801, jw</i>	<i>Elektrochemiluminescencyjna 'ECLIA'</i>	<i><7 pg/ml</i>
<i>CRP</i>	<i>CRP4</i>	<i>COBAS 6000 moduł c501, Roche Diagnostics</i>	<i>Immunoturbidymetria wzmacniona cząstkami</i>	<i>< 5 mg/l</i>

		<i>International Ltd, Rotkreuz, Szwajcaria</i>	<i>lateksu</i>	
<i>Ferrytyna</i>	<i>FERR4</i>	<i>COBAS 6000 moduł c501, jw</i>	<i>Test immunoturbidymetryczny ze wzmocnieniem cząstkami lateksu</i>	<i>Mężczyźni 30-400 µg/L Kobiety 15-150 µg/l</i>
<i>Kreatynina</i>	<i>CREJ2</i>	<i>COBAS 6000 moduł c501, jw</i>	<i>Kinetyczny test kolorymetryczny oparty na metodzie Jaffégo</i>	<i>Kobiety: 0,5-0,9 mg/dl Mężczyźni: 0,70-1,20 mg/dl</i>
<i>CK</i>	<i>CK</i>	<i>COBAS 6000 moduł c501, jw</i>	<i>Test UV</i>	<i>Kobiety: 26-192 U/l Mężczyźni: 39-308 U/l</i>
<i>AST</i>	<i>ASTL</i>	<i>COBAS 6000 moduł c501, jw</i>	<i>Optymalizowana, modyfikowana metoda oparta na zaleceniach Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC), bez aktywacji</i>	<i>Kobiety: <32 U/l (Mężczyźni: <40 U/l</i>
<i>ALT</i>	<i>ALTL</i>	<i>COBAS 6000 moduł c501, jw</i>	<i>Optymalizowana, modyfikowana metoda oparta na zaleceniach Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC), bez aktywacji</i>	<i>Kobiety: <33 U/l Mężczyźni: <41 U/l</i>
<i>GGT</i>	<i>GGT-2</i>	<i>COBAS 6000 moduł c501, jw</i>	<i>enzymatyczno-kolorymetryczna wg IFCC</i>	<i>Kobiety: 6-42 UI/l Mężczyźni: 10-71 UI/l</i>
<i>LDH</i>	<i>LDHI2</i>	<i>COBAS 6000 moduł c501, jw</i>	<i>Test UV, wg IFCC</i>	<i>Kobiety: 135-</i>

				214 U/l Mężczyźni: 135-225 U/l
Glukoza	GLUC3	COBAS 6000 moduł c501, jw	Referencyjna metoda enzymatyczna z heksokinazą	74-106 mg/dl
Bilirubina całkowita	BILT3	COBAS 6000 moduł c501, jw	Test kolorymetryczny z wykorzystaniem metody diazowej	< 1,2 mg/dl
Morfologia krwi	CBC+DIFF + RET	XN 1000 WPC XN 550 [DIFF]BF Sysmex Corp. , Kobe, Japonia	WBC - Metoda cytofluorymetryczna RBC - Metoda impedancyjna optyczna HGB - Metoda spektrofotometryczna PLT - Metoda impedancyjna, optyczna, cytofluorymetryczna	RBC 4,0 - 5,0 $\times 10^3/\mu\text{l}$ (K), 4,5 - 6,0 $\times 10^3/\mu\text{l}$ (M) HGB 12,0 - 16,0g/dl (K), 14,0 - 18,0 g/dl (M) HCT 37,0 - 47,0% (K), 40 - 54% (M) MCV 81,0 - 99,0 fl (K), 80,0 - 94,0 fl (M) PLT 130 - 350 $\times 10^3/\mu\text{l}$
Krzepnięcie	RecombiPlas-Tin 2G	ACL ELITE PRO, Instrumentation Laboratory Company, Lexington, USA	Pomiar absorpcji / rozproszenia światła na skrzeplinie	PT < 21,6 s INR < 1,3 Fibrynogen 308- 613mg/dl
Gazometria	ABL 90 FLEX solution pack SC 90 300/30	ABL 90 FLEX PLUS, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Denmark	Potencjometryczna, amperometryczna	pH 7,35 - 7,45 pCO ₂ 35 - 45 mmHg pO ₂ 83 -

	BG/LYT/ME T/OX/+Q C			108 mmHg SaO ₂ 95 - 99%
--	---------------------------	--	--	---

3 . Tomografia klatki piersiowej wysokiej rozdzielczości (HRCT)

Pacjenci w grupie badanej przy przyjęciu na Oddział mieli wykonywane badanie tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości klatki piersiowej. Ocenie zajęcia płuc w 25-punktowej skali CTSS poddano 66 pacjentów w grupie badanej. Pozostałe osoby posiadały nieprawidłowości w badaniach obrazowych uniemożliwiające jednoznaczną ocenę (odma, płyn w jamach opłucnowych, niecharakterystyczny obraz zmian, nakładanie się zmian o innym charakterze), w związku z powyższym nie wykonano oceny wg skali CTSS. Skalę i sposób oceny zajęcia płuc opisano szczegółowo w rozdziale 2.2.

4. Analiza statystyczna

Obliczeń wykonano za pomocą programu Statistica w wersji 13. Wartości przedstawiono jako wartość mediany, dolnego oraz górnego percentyla oraz zakres wartości minimalnych oraz maksymalnych. Istotność statystyczną analizowanych parametrów pomiędzy grupą badaną a kontrolną oceniono za pomocą testu U Mann-Whitney'a. Korelacja parametrów klinicznych ze stężeniem kwasu hialuronowego została oceniona z wykorzystaniem testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa z analizą *post hoc* dla porównań dwustronnych. Analizę zależności między zmianą stężenia kwasu hialuronowego a pozostałymi wynikami laboratoryjnymi oraz parametrami życiowymi wykonano z wykorzystaniem współczynnika korelacji Spearmana. Za statystycznie istotne uznano wartości $p < 0,005$.

IV. Wyniki

4.1. Charakterystyka grupy badanej

Kliniczno-laboratoryjną charakterystykę grupy badanej przedstawiono w **Tabelach 6 i 7**, zaś grupy kontrolnej w **Tabeli 8**. Ponieważ zdecydowana większość testów nie wykazywała rozkładu normalnego ($p < 0,05$ w teście Shapiro-Wilka) charakterystykę przedstawiono jako mediany, zakresy i rozstępny kwartylowe. Parametrami o rozkładzie normalnym wartości były: hemoglobina Hb, RBC, MCV, PLT pO₂ i RR rozkurczowe.

Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej w pierwszej dobie hospitalizacji (pobranie B1).

Zmienna	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartył	Górny kwartył	Odchylenie standardowe
Parametry gazometryczne							
pH	7,449	7,451	7,263	7,54	7,421	7,484	0,054
pO ₂ , [mmHg]	84,89	83,62	24,60	191,00	64,00	107,07	32,54
pCO ₂ , [mmHg]	37,06	36,07	20,10	60,30	33,95	39,70	5,98
SaO ₂ , [mmHg]	90,83	94,79	66,30	99,90	89,00	98,01	14,88
BE [mmol/l]	2,04	2,51	-15,58	10,49	-0,69	4,897	4,51
Parametry ostrej fazy							
IL-6, [pg/ml]	127,73	42,08	1,90	990,00	19,42	126,96	226,86
Prokalcytonina, [ng/ml]	0,75	0,14	0,02	15,3	0,06	0,44	2,06
CRP, [mg/l]	76,61	41,0	3,20	452	18,2	109,1	83,03
WBC, [tys/ μ l]	9,90	7,22	2,60	40,40	4,86	9,19	18,80
PLT, [tys/ μ l]	216,88	205,52	27,00	532,00	163,05	269,95	90,64
Parametry uszkodzenia wątroby							
Bilirubina, [mg/dl]	1,28	0,52	0,15	15,37	0,36	0,73	2,79
INR	1,33	1,14	0,86	7,35	1,05	1,36	0,77
PT, [s]	16,00	13,70	10,40	90,00	12,60	16,29	9,42
ALT, [UI/l]	43,18	30,79	8,00	244,50	15,30	56,00	42,79
AST, [UI/l]	60,99	42,03	10,50	334,00	23,75	70,95	57,41
GGT, [UI/l]	121,74	52,02	12,00	904,00	26,00	113,85	183,51
LDH, [UI/l]	328,27	268,49	114,00	1306,00	203,90	398,90	199,60

Parametry układu czerwonokrwinkowego							
HGB, [g/dl]	12,62	12,96	7,80	17,40	11,25	13,95	2,04
HCT, [%]	37,03	38,42	0,50	52,40	33,40	41,30	6,81
RBC, [tys/ μ l]	4,18	4,272	2,31	5,56	3,69	4,64	0,70
MCV, [fL]	90,05	89,21	72,40	107,90	85,50	94,05	7,01
Inne parametry biochemiczne							
Kreatynina, [mg/dl]	1,07	0,86	0,28	5,53	0,72	1,23	0,77
eGFR, [ml/min/1,73m ²]	92,79	82,97	10,70	323,30	56,95	111,25	54,01
Glukoza, [mg/dl]	129,42	109,07	50,00	402,00	92,15	134,05	69,11
Cholesterol, [mg/dl]	145,48	141,66	41,90	313,20	110,35	172,90	53,59
Fibrynogen, [mg/dl]	470,80	431,04	30,00	1108,00	308,00	612,95	236,64
Trójglicerydy, [mg/dl]	155,29	137,62	37,30	425,10	98,25	174,15	78,27
CK, [U/l]	291,03	91,03	12,00	4391,00	45,60	192,55	773,12
Parametry życiowe							
RR skurczowe, [mmHg]	131,05	139,80	77,00	230,00	115,50	145,40	27,13
RR rozkurczowe, [mmHg]	79,89	78,96	42,00	119,00	68,95	91,90	16,22
HR, [min]	84,45	83,08	52,00	150,00	73,00	91,95	16,54

Tabela 7. Charakterystyka grupy badanej w dziesiątej dobie hospitalizacji (pobranie B2).

Zmienna	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
Parametry gazometryczne							
pH	7,454	7,459	7,194	7,603	7,436	7,488	0,07
pO ₂ , [mmHg]	85,12	82,60	20,60	163,00	65,70	107,00	31,04
pCO ₂ , [mmHg]	38,40	38,50	23,30	78,20	34,90	41,30	9,01
SaO ₂ , [mmHg]	93,70	96,70	36,80	99,70	94,90	98,10	10,98
BE, [mmHg]	5,02	3,25	-15,60	11,20	1,20	5,30	15,68
Parametry ostrej fazy							
IL-6, [pg/ml]	128,75	24,60	3,00	1970,00	12,80	65,90	327,76
Prokalcytonina, [ng/ml]	0,86	0,08	0,025	14,8	0,044	0,36	2,25
CRP, [mg/l]	33,92	12,2	0,80	241,2	4,00	36,9	49,39
WBC, [tys/ μ l]	9,48	6,95	2,45	47,90	5,175	9,90	8,47

PLT, [tys/ μ l]	263,91	254,00	2,44	632,00	158,00	345,00	139,10
<i>Parametry uszkodzenia wątroby</i>							
Bilirubina, [mg/dl]	1,53	0,447	0,15	12,44	0,254	0,88	2,57
INR	1,37	1,18	0,97	3,51	1,09	1,44	0,53
PT, [s]	16,28	14,00	11,60	42,60	13,00	16,70	6,42
ALT, [UI/l]	51,94	35,00	5,00	415,50	22,00	62,00	54,91
AST, [UI/l]	41,58	33,30	9,60	176,70	20,15	50,35	29,86
GGT, [UI/l]	171,59	75,00	14,00	1506,00	31,00	150,00	300,60
LDH, [UI/l]	232,11	182,00	110,00	892,00	161,00	253,50	144,95
<i>Parametry układu czerwonokrwinkowego</i>							
HGB, [g/dl]	12,39	12,60	8,30	17,00	11,00	13,80	2,15
HCT, [%]	37,11	37,60	25,40	53,30	33,50	40,80	6,51
RBC, [tys/ μ l]	4,15	4,130	2,60	6,150	3,755	4,61	0,78
MCV, [fL]	90,01	89,55	76,00	106,50	85,70	93,25	6,23
<i>Inne parametry biochemiczne</i>							
Kreatynina, [mg/dl]	0,95	0,77	0,22	3,96	0,60	0,95	0,71
eGFR, [ml/min/1,73 m ²]	112,46	103,1	15,30	462,60	71,40	128,80	70,69
Glukoza, [mg/dl]	114,13	103,10	59,00	285,00	90,00	129,30	44,66
Cholesterol, [mg/dl]	157,16	140,70	57,30	291,10	119,15	191,55	56,67
Fibrynogen, [mg/dl]	296,25	315,50	75,00	479,00	179,50	413,00	168,40
Trójglicerydy, [mg/dl]	179,65	164,35	53,40	637,00	107,05	213,55	102,18
CK, [UI/l]	58,31	32,00	8,00	348,00	23,00	66,00	69,32
<i>Parametry życiowe</i>							
RR skurczowe, [mmHg]	126,43	124,00	89,00	173,00	111,00	139,00	18,37
RR rozkurczowe, [mmHg]	76,64	75,50	49,00	114,00	68,00	85,50	12,79
HR, [/min]	84,46	82,00	41,00	140,00	73,00	92,00	19,18

Tabela 8. Charakterystyka grupy kontrolnej.

Zmienna	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
Parametry gazometryczne							
pH, [mmHg]	7,40	7,405	7,356	7,440	7,375	7,425	0,028
pO ₂ , [mmHg]	96,60	97,00	88,00	103,00	93,00	101,00	4,68
pCO ₂ , [mmHg]	39,43	39,00	36,00	43,00	37,00	41,00	2,34
SaO ₂ , [mmHg]	97,40	97,00	96,00	99,00	97,00	99,00	0,97
BE, [mmHg]	0,13	0,33	-1,68	1,77	-0,90	1,15	1,15
Parametry ostrej fazy							
IL-6, [pg/ml]	1,96	1,50	1,50	7,72	1,50	1,82	1,27
Prokalcytonina, [ng/ml]	0,03	0,03	0,02	0,07	0,02	0,03	0,01
CRP, [mg/l]	1,07	0,64	0,60	4,99	0,60	1,19	0,82
WBC, [tys/ μ l]	6,49	6,49	3,57	9,84	5,52	7,26	1,30
PLT, [tys/ μ l]	245,44	247,50	174,00	314,00	213,50	271,00	39,48
Parametry uszkodzenia wątroby							
Bilirubina, [mg/dl]	0,51	0,47	0,15	1,80	0,35	0,58	0,27
INR	0,99	0,97	0,90	1,10	0,94	1,03	0,06
PT, [s]	12,62	12,40	11,70	13,80	12,15	13,15	0,60
ALT, [U/l]	11,94	10,10	5,00	37,80	7,75	14,60	6,14
AST, [U/l]	21,42	19,85	7,20	49,70	17,15	23,30	7,86
GGT, [U/l]	16,23	14,00	5,00	52,00	10,00	20,00	8,91
LDH, [U/l]	160,52	155,00	105,00	245,00	139,00	180,50	30,99
Parametry układu czerwono krwinkowego							
HGB, [tys/ μ l]	14,00	13,70	12,50	16,10	13,20	14,80	1,02
HCT, [%]	40,10	39,15	35,50	48,10	37,10	42,35	3,53
RBC, [tys/ μ l]	4,65	4,59	4,16	5,37	4,32	4,93	0,35
MCV, [fL]	85,84	85,65	80,20	92,50	83,50	88,40	3,23
Inne parametry biochemiczne							
Kreatynina, [mg/dl]	0,86	0,86	0,65	1,15	0,76	0,94	0,12
eGFR, [ml/min/1,73 m ²]	113,97	117,50	96,00	129,00	102,50	123,50	10,66
Glukoza, [mg/dl]	85,82	86,40	64,50	121,60	78,80	91,20	9,97
Cholesterol, [mg/dl]	198,45	196,60	115,40	336,40	168,30	224,80	43,95
Fibrynogen, [mg/dl]	297,31	294,00	215,00	382,00	256,00	342,00	50,49
Trójglicerydy, [mg/dl]	113,29	88,30	43,80	726,00	68,20	115,90	93,83

CK, [U/l]	100,76	89,00	37,00	200,00	67,00	138,00	47,59
<i>Parametry życiowe</i>							
RR skurczowe, [mmHg]	124,22	124,00	120,00	128,00	123,00	126,00	2,13
RR rozkurczowe, [mmHg]	82,06	82,00	81,00	84,00	81,00	83,00	0,95
HR, [/min]	83,11	84,00	68,00	96,00	77,00	90,00	8,02

U chorych z COVID-19 **przy przyjęciu** (B1) stwierdzono **znamiennie wyższe wartości** następujących parametrów **względem grupy kontrolnej**: pH, SaO₂, BE, CRP, IL-6, prokalcytonina, fibrynogen, ALT, AST, GGT, LDH, glukoza, MCV, INR, PT i TG. Natomiast istotnie **niższe względem grupy kontrolnej** były wartości: pO₂, pCO₂, HbG, HCT, RBC, cholesterol, eGFR, RR skurczowe, RR rozkurczowe oraz HR.

Po 10 dniach hospitalizacji (pobranie B2) wykazano **wyższe niż w grupie kontrolnej** wartości następujących badań: pH, SaO₂, BE, IL-6, prokalcytonina, CRP, AST, ALT, GGT, LDH, glukoza, MCV, INR i PT, **natomiast niższe**: pO₂, pCO₂, kreatynina, eGFR, CK, HbG, HCT, RBC, cholesterol, TG, RR skurczowe, RR rozkurczowe oraz HR.

Przy przyjęciu (pobranie B1) **wyższe** wartości względem **pobrania w 10 dobie** (B2) wykazały: CRP, kreatynina, WBC, CK, AST, LDH.

W przypadku MCV i PLT stwierdzono **wyższe** wartości w **pobranu B2 względem B1 (Tabela 9)**.

Tabela 9. Porównanie wyników grupy badanej w pobraniach B1 i B2 do grupy kontrolnej oraz pomiędzy pobraniami B1 i B2.

Zmienna	B1 vs K	B2 vs K	B2 vs B1
<i>Parametry gazometryczne</i>			
pH	<0,001	<0,001	0,467
pO ₂ *	0,008	0,007	0,316
pCO ₂	0,002	0,241	0,058
SatO ₂	0,209	0,079	0,841
BE	0,002	<0,001	0,020

Parametry ostrej fazy			
IL6	<0,001	<0,001	0,252
Prokalcytonina	<0,001	<0,001	0,131
CRP	<0,001	<0,001	<0,001
WBC	0,201	0,203	0,047
PLT *	0,086	0,463	0,002
Parametry uszkodzenia wątroby			
Bilirubina	0,271	0,843	0,224
INR	<0,001	<0,001	0,842
PT	<0,001	<0,001	0,851
ALT	<0,001	<0,001	0,072
AST	<0,001	<0,001	0,005
GGT	<0,001	<0,001	0,861
LDH	<0,001	<0,001	<0,001
Parametry układu czerwonego			
HGB *	<0,001	<0,001	0,894
HCT	0,029	0,010	0,569
RBC *	<0,001	<0,001	0,896
MCV *	0,001	<0,001	0,042
Inne parametry biochemiczne			
Kreatynina	0,506	0,009	0,001
eGFR	<0,001	0,081	0,002
Glukoza	<0,001	<0,001	0,964
Cholesterol	<0,001	<0,001	0,175
Fibrynogen	<0,001	0,723	0,464
Trójglicerydy	<0,001	<0,001	0,566
Parametry życiowe			
RR skurczowe	0,291	0,740	0,275
RR rozkurczowe *	0,072	0,002	0,028
HR	0,890	0,964	0,926

W tabeli podano wartość p w teście T -Studenta dla testów o rozkładzie zgodnym z rozkładem normalnym (oznaczone symbolem *) i wartość p w teście U Manna-Whitney dla testów o innym rozkładzie.

4.2. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy

Wyniki stężenia HA w surowicy w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono w **Tabeli 10** oraz na **Rycinie 10**. Wzajemne porównania wyników w obrębie grup przedstawia **Tabela 11**. Stężenie HA było istotnie wyższe u chorych na COVID-19 w pobraniach B1 i B2 w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,001$) (**Tabela 11, Rycina 10**).

Stężenie HA było niemal 2-krotnie wyższe u chorych po 10 dniach hospitalizacji względem przyjęcia (258,41 vs 430,31 ng/ml), jednak bez istotności statystycznej ($p = 0,149$) (**Tabela 10, 11**).

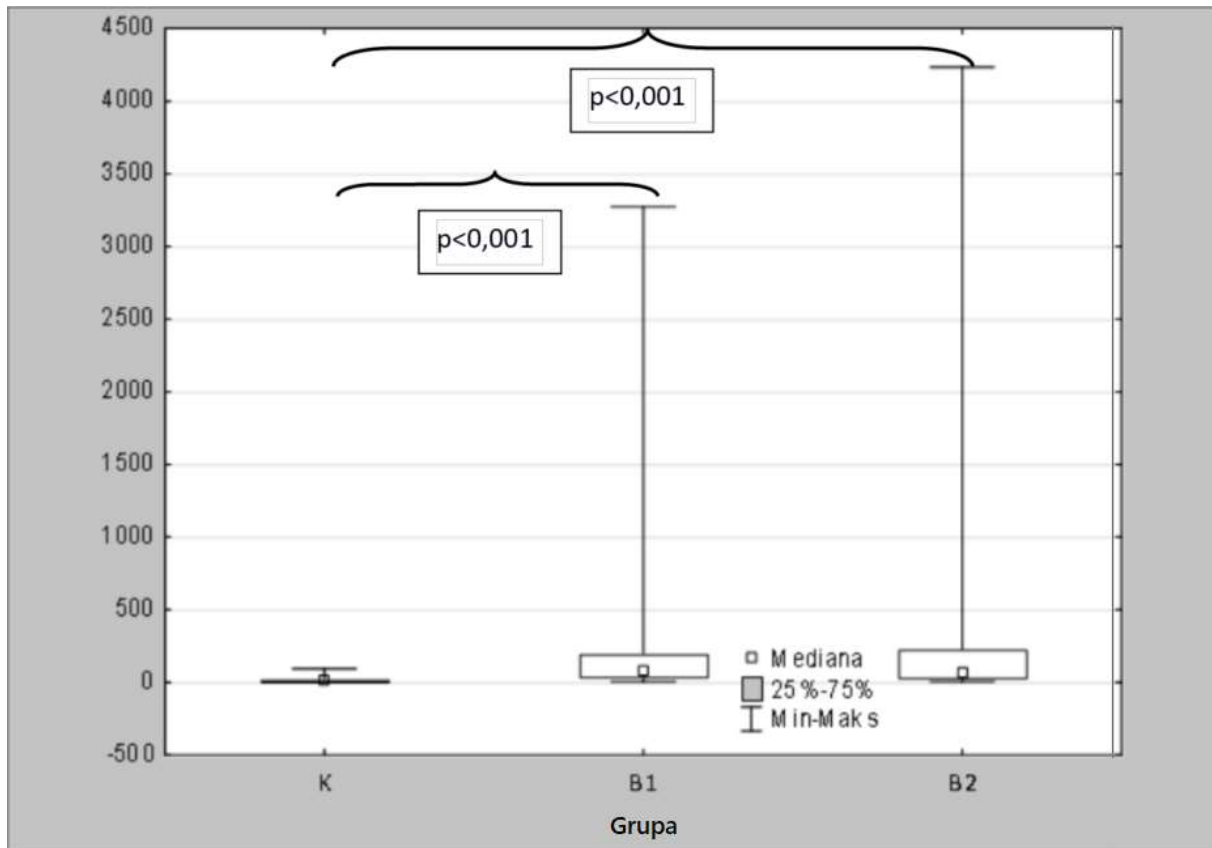
Tabela 10. Stężenie kwasu hialuronowego (ng/ml) w grupie badanej przy przyjęciu oraz w 10 dobie hospitalizacji (pobrania B1, B2) oraz w grupie kontrolnej.

Grupa	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartył	Górny Kwartył	Odchylenie standardowe
B1	258,41	83,24	5,80	3271,45	36,94	194,72	557,80
B2	430,31	67,61	5,80	4233,15	31,76	225,21	973,42
Kontrolna	16,78	13,66	5,80	93,43	5,80	19,68	16,26

Tabela 11. Porównanie wyników kwasu hialuronowego w grupie badanej (pobrania B1 i B2) do grupy kontrolnej oraz wzajemne porównanie pobrań B1 i B2 grupy badanej.

Zmienna	B1 vs K	B2 vs K	B2 vs B1
Kwas hialuronowy	<0,001	<0,001	0,149

p – poziom prawdopodobieństwa w teście U Mann-Whitney'a dla porównań z grupą kontrolną i pomiędzy grupami badanymi (test Wilcoxon)



Rycina 10 - Stężenia kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) w grupach badanej (pobranie B1 oraz B2) i kontrolnej (K).

4.3. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy według stopnia ciężkości choroby

Stężenia kwasu hialuronowego w surowicy różniły się pomiędzy grupami pacjentów o różnej ciężkości przebiegu COVID-19, co przedstawiono w **Tabeli 12**. Stężenie HA zależało od ciężkości przebiegu choroby w grupie badanej w pobraniu B1 (test ANOVA rang Kruskala-Wallis: $H=20,21$, $p=0,002$). Było ono przy przyjęciu (B1) istotnie wyższe u chorych o krytycznym przebiegu choroby w stosunku do przebiegu umiarkowanego w

pobraniu ($p < 0,001$) (Tabela 13, Rycina 11). U chorych w 10 dobie hospitalizacji stężenia HA nie wykazywały różnic istotnych statystycznie w zależności od stopnia ciężkości choroby ($p = 0,1$), (Tabele 14, 15).

Tabela 12. Analiza statystyczna stężenia kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) z uwzględnieniem stopnia ciężkości choroby.

Stopień ciężkości choroby	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartył	Górny Kwartył	Odchylenie standardowe
U	108,51	57,49	5,80	1532,45	30,21	119,08	202,82
C	246,14	137,73	5,80	896,60	19,12	304,79	292,8
C/K	552,21	552,21	417,51	686,91	417,51	686,91	190,49
K	971,75	281,08	48,8	3271,45	139,92	1786,27	1192,25

U - umiarkowany, C – ciężki, C/K – graniczny umiarkowany/krytyczny), K - krytyczny.

Tabela 13. Analiza statystyczna stężenia kwasu hialuronowego w surowicy przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) pomiędzy poszczególnymi stopniami ciężkości choroby.

Wartość p dla porównań dwustronnych HA-stopień ciężkości choroby; Zmienna niezależna (grupująca): Stopień ciężkości infekcji (U-umiarkowany, C-ciężki, K-krytyczny). Test Kruskala-Wallisa: $H = 20,21163$ $p = 0,002$				
Zależna: HA	C R:49,731	U R:36,794	K R:68,083	C/K R:78,500
C		0,564220	0,417135	0,802397
U	0,564220		0,000539	0,129630
K	0,417135	0,000539		1,000000
C/K	0,802397	0,129630	1,000000	

Tabela 14. Analiza statystyczna stężenia kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) w dziesiątej dobie hospitalizacji (pobranie B2) z uwzględnieniem stopnia ciężkości choroby.

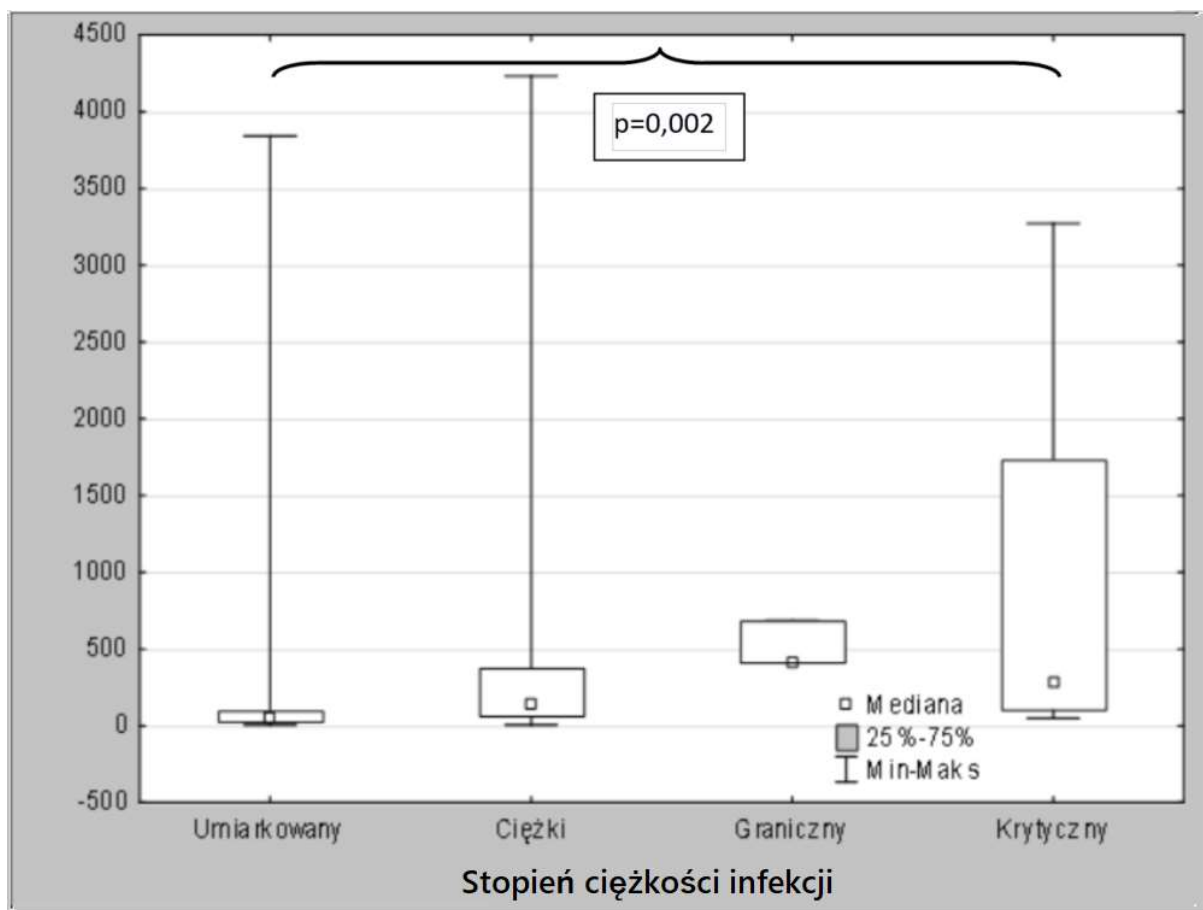
Stopień ciężkości choroby	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartył	Górny Kwartył	Odchylenie standardowe
U	335,48	62,27	5,80	3841,60	30,20	24,71	867,36

C	738,11	245,91	5,80	4233,15	19,12	504,35	1427,64
C/K	413,02	413,02	413,02	413,02	417,51	413,02	-
K	582,74	582,74	56,23	1109,25	139,92	1109,25	744,59

U - umiarkowany, C – ciężki, C/K – graniczny umiarkowany/krytyczny, K - krytyczny.

Tabela 15. Analiza statystyczna stężenia kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) w dziesiątej dobie hospitalizacji (pobranie B2) pomiędzy poszczególnymi stopniami ciężkości choroby.

Wartość p dla porównań dwustronnych HA-stopień ciężkości choroby; Zmienna niezależna (grupująca): Stopień ciężkości infekcji (U-umiarkowany, C-ciężki, K-krytyczny) Test Kruskala-Wallis: $H=6,023238$ $p=0,1109$				
Zależna: HA	C R:27,375	U R:17,795	K R:25,500	C/K R:34,000
C		0,240783	1,000000	1,000000
U	0,240783		1,000000	1,000000
K	1,000000	1,000000		1,000000
C/K	1,000000	1,000000	1,000000	



Rycina 11 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od ciężkości przebiegu infekcji.

4.4. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy w zależności od obecności burzy cytokinowej

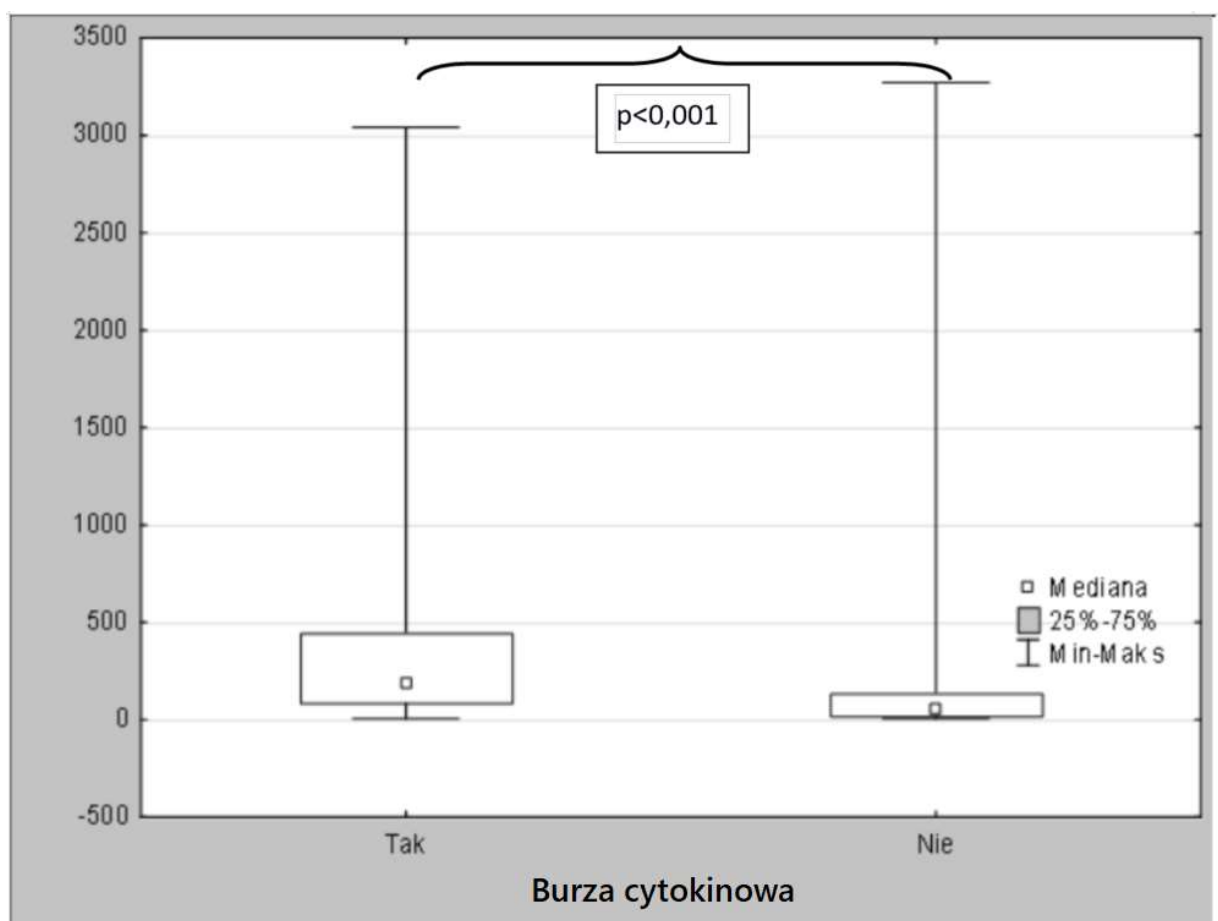
Stężenie kwasu hialuronowego u chorych z COVID-19 przy przyjęciu (B1) było istotnie wyższe u pacjentów z burzą cytokinową w porównaniu do chorych ze stężeniem IL-6 <100ng/ml (test U Manna-Whitney'a: $Z=3,718$, $p<0,001$) (Tabela 16, Rycina 12). Stężenie HA w grupie badanej w pobraniu B2 było również wyższe w przypadku wystąpienia burzy cytokinowej, jednak w tej grupie nie uzyskano kryterium istotności statystycznej ($Z=1,816$, $p=0,069$) (Tabela 17).

Tabela 16. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (B1) w zależności od obecności burzy cytokinowej.

Burza cytokinowa (IL-6>100ng/ml)	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
Tak	445,51	186,97	5,80	3041,3	87,31	446,29	685,66
Nie	169,55	56,86	5,80	3271,45	20,48	136,64	466,3840

Tabela 17. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 w 10 dobie hospitalizacji (B2) w zależności od obecności burzy cytokinowej.

Burza cytokinowa (IL-6>100ng/ml)	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
Tak	597,31	123,88	5,80	4233,15	56,23	413,02	1163,79
Nie	330,11	62,27	5,80	3841,60	24,73	82,62	849,55



Rycina 12 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od obecności burzy cytokinowej.

4.5. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy w zależności od stosowanej tlenoterapii

Analiza wykazała wpływ intensywności tlenoterapii na wzrost stężenia kwasu hialuronowego (test ANOVA rang Kruskala-Wallisa: $H=13,41$, $p=0,0038$) u chorych przy przyjęciu (B1). Stężenie HA było istotnie wyższe w grupie pacjentów z respiratoterapią w porównaniu do chorych bez tlenoterapii ($p=0,002$), (Tabela 18, 19, Rycina 13). Stężenie HA u chorych w 10 dobie hospitalizacji (B2) nie zależało istotnie od rodzaju tlenoterapii ($Z=3,731$, $p=0,292$) (Tabela 20, 21).

Tabela 18. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od rodzaju tlenoterapii.

Tlenoterapia/ respiratoterapia	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
N	231,16	89,83	5,80	3271,45	33,22	194,68	563,55
W	325,24	100,33	5,80	1840,35	41,79	304,80	529,73
R	761,84	417,51	48,80	3041,30	172,67	686,91	1029,99
B	62,13	50,88	5,80	264,14	16,75	74,11	61,70

Tlenoterapia: N: $\leq 18l/min$, W: $>18l/min$, R: respiratoterapia, B: bez tlenoterapii

Tabela 19. Analiza statystyczna stężenia kwasu hialuronowego w surowicy chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) pomiędzy formami stosowanej tlenoterapii.

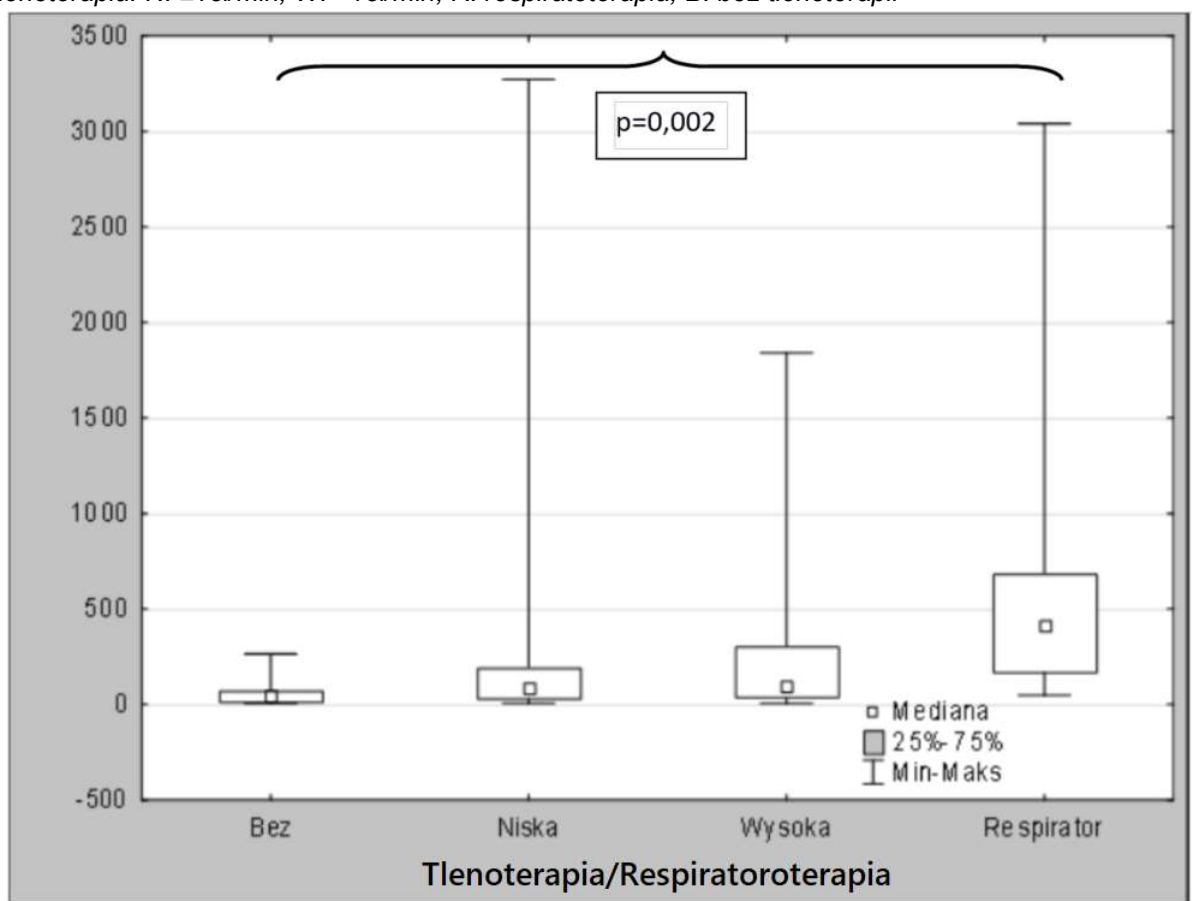
Wartość p dla porównań dwustonnych stężenia kwasu hialuronowego w surowicy ze stosowaną tlenoterapią jako zmienną grupującą: (Tlenoterapia: N: $\leq 18l/min$, W: $>18l/min$, R: respiratoterapia, B: bez tlenoterapii). Test Kruskala-Wallisa: $H = 13,41496$ $p = 0,0039$				
Zależna: HA	N R:44,203	W R:47,795	R R:69,571	B R:30,475
N		1,000000	0,087812	0,294092
W	1,000000		0,281745	0,158713
R	0,087812	0,281745		0,002546

B	0,294092	0,158713	0,002546	
---	----------	----------	----------	--

Tabela 20. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 w dziesiątej dobie hospitalizacji (pobranie B2) w zależności od rodzaju tlenoterapii.

Tlenoterapia/ respiratoroterapia	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
N	381,11	66,13	5,80	3841,60	24,69	97,29	909,11
W	614,86	66,59	5,80	4233,15	37,46	367,95	1372,55
R	761,13	761,02	413,02	1109,25	413,02	1109,25	492,31
B	1,72	95,01	19,12	131,15	19,13	131,16	57,21

Tlenoterapia: N: $\leq 18l/min$, W: $>18l/min$, R: respiratoroterapia, B: bez tlenoterapii



Rycina 13 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od stosowanej tlenoterapii.

Tabela 21. Analiza statystyczna stężenia kwasu hialuronowego w surowicy chorych na COVID-19 w dziesiątej dobie hospitalizacji (pobranie B2) pomiędzy formami stosowanej tlenoterapii

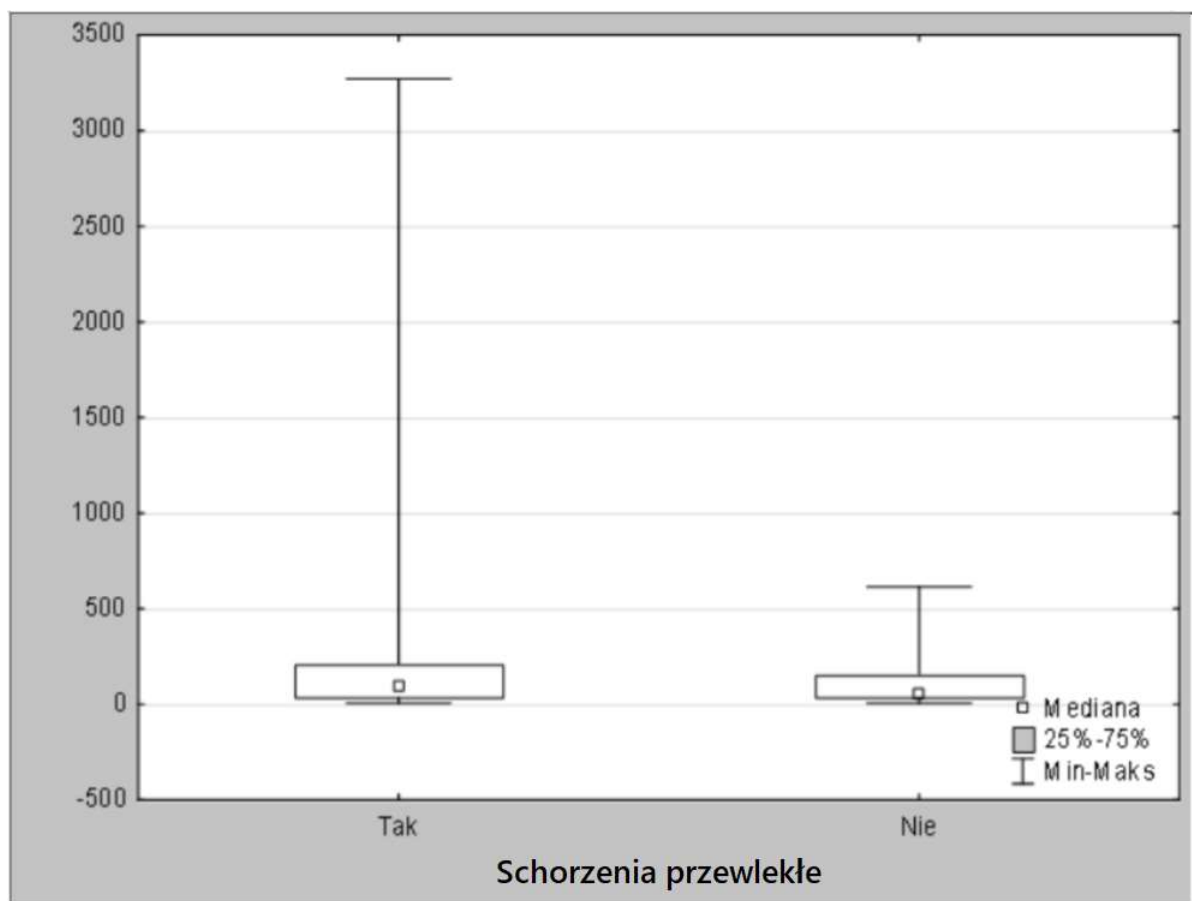
Zależna: HA	Wartość p dla porównań dwustronnych stężenia kwasu hialuronowego w surowicy z rodzajem tlenoterapii jako zmienną grupującą: (N: ≤18l/min W: >18l/min, R: respiratoterapia, B: bez tlenoterapii). Test Kruskala-Wallis: H=3,731113 p =0,2924			
	N R:18,848	W R:21,889	R R:35,000	B R:21,000
N		1,000000	0,358278	1,000000
W	1,000000		0,908309	1,000000
R	0,358278	0,908309		1,000000
B	1,000000	1,000000	1,000000	

4.6. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy a obecność chorób przewlekłych

Stężenie kwasu hialuronowego u chorych przy przyjęciu (pobranie B1 – wartości średnie, mediana oraz wartości maksymalne) były wyższe u chorych na COVID-19 z obecnymi chorobami współtowarzyszącymi, jednak analiza statystyczna nie wykazała istotności statystycznej (test U Manna-Whitney’a: $Z=1,409$, $p=0,160$), (Tabela 22, Rycina 14). Z powodu dużego zróżnicowania chorób współistniejących w grupie badanej analizie poddano obecność chorób współistniejących jako zmienną grupującą, nie analizowano poszczególnych chorób na stężenie HA.

Tabela 22. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 (pobranie B1) w zależności od obecności chorób współistniejących.

Choroba przewlekła	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
Obecne	334,09	97,75	5,80	3271,45	36,96	209,69	671,27
Nieobecne	114,46	54,10	5,80	613,27	36,97	154,03	140,44



Rycina 14 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od obecności chorób przewlekłych (test U Manna-Whitney'a: $Z=1,409$, $p=0,160$).

4.7. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy w zależności od statusu zaszczepienia

Analiza nie wykazała różnic istotnych statystycznie stężenia kwasu hialuronowego w grupie badanej w pobraniu B1 w zależności od szczepienia pacjentów (test U Manna-Whitney'a: $Z=-0,389$, $p=0,700$), (Tabela 23, Rycina 15), jak i w zależności od liczby szczepień (test ANOVA rang Kruskala-Wallisa: $H=1,59$, $p=0,661$), (Tabela 24, 25).

Tabela 23. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od statusu zaszczepienia pacjentów.

Szczepienie	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartył	Górny kwartył	Odchylenie standardowe
Tak	272,29	99,11	5,80	3271,45	48,9	179,2	641,88
Nie	254,61	62,49	5,80	3041,3	32,88	193,73	530,17

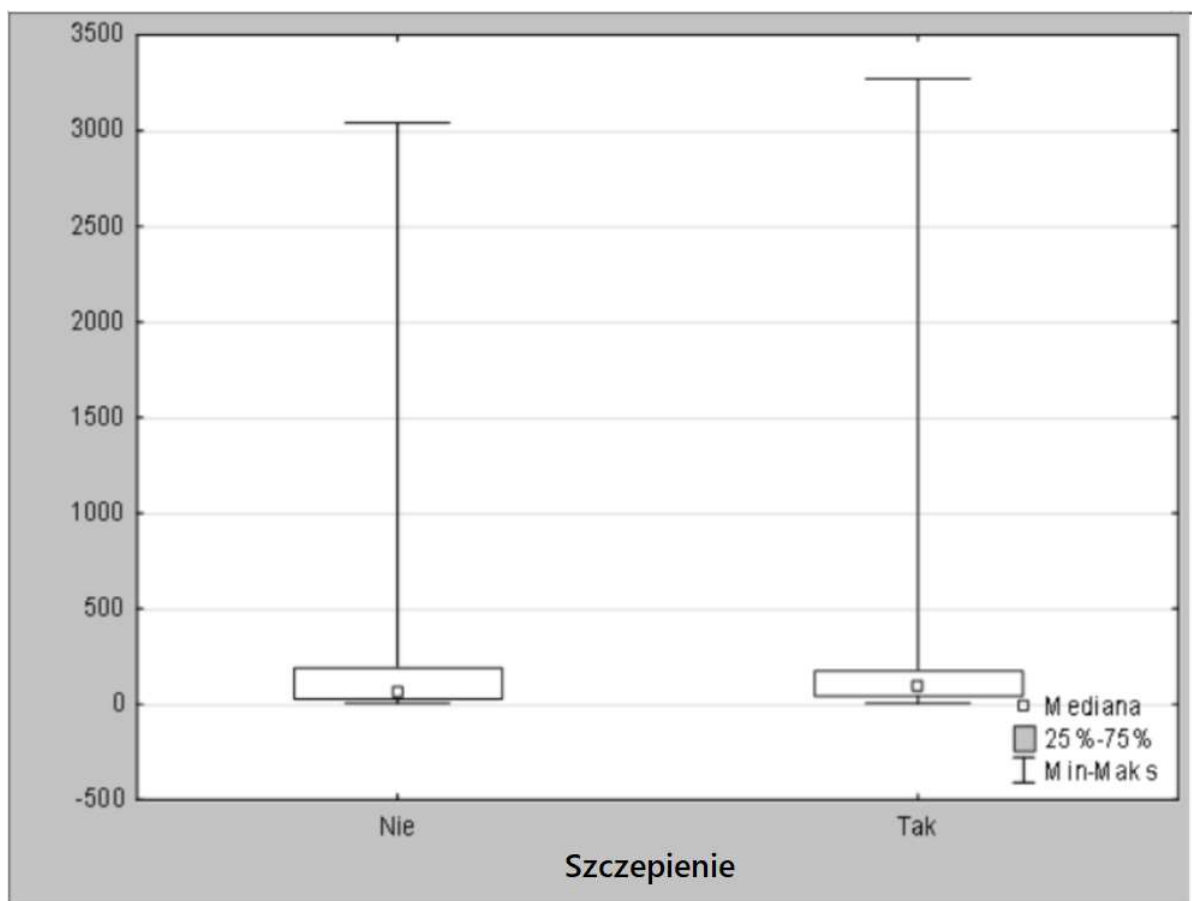
Tabela 24. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od liczby przyjętych dawek szczepionki przeciwko COVID-19.

Liczba dawek	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartył	Górny kwartył	Odchylenie standardowe
0	254,62	62,53	5,80	3041,30	32,81	193,75	530,13
1	75,06	61,36	5,80	179,20	14,73	131,63	68,10
2	379,81	119,11	5,80	3271,45	50,34	209,51	914,47
3	289,92	89,11	5,80	1532,45	54,30	247,12	511,63

Tabela 25. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od liczby dawek szczepionki przeciwko COVID-19 oraz rodzaju stosowanej tlenoterapii.

Zależna: HA	Wartość p dla porównań dwustronnych stężenia kwasu hialuronowego w surowicy z ilością dawek szczepionki jako zmienną grupującą: Test Kruskala-Wallis: H=1,599311 p =0,6613			
	N R:41,600	W R:33,813	R R:46,500	B R:46,183
0		1,000000	1,000000	1,000000
1	1,000000		1,000000	1,000000
2	1,000000	1,000000		1,000000
3	1,000000	1,000000	1,000000	

Tlenoterapia: N: ≤18l/min, W: >18l/min, R: respiratoroterapia, B: bez tlenoterapii



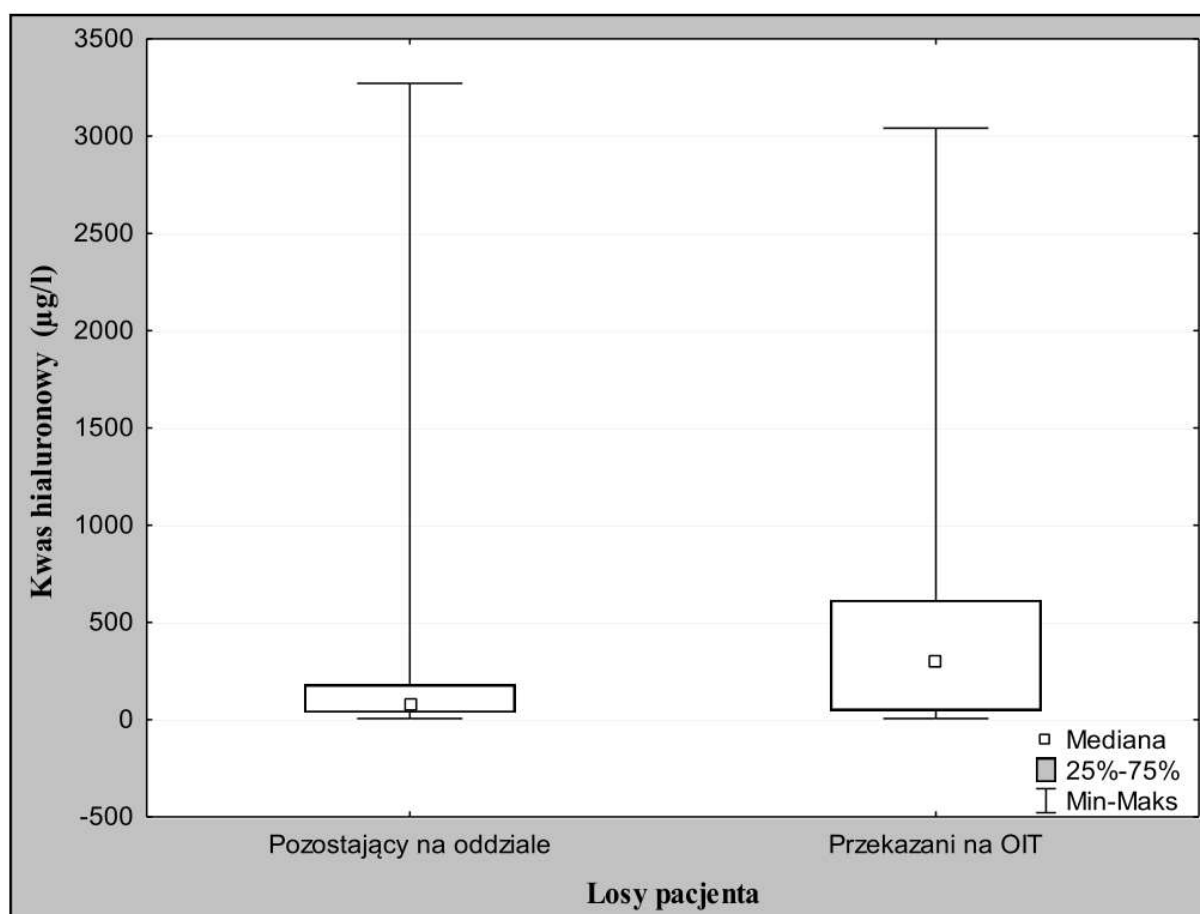
Rycina 15 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od statusu zaszczepienia pacjentów (test U Manna-Whitney'a: $Z=-0,389$, $p=0,700$).

4.8. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy w zależności od przebiegu COVID-19

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w stężeniu HA przy przyjęciu (B1) pomiędzy pacjentami, którzy w trakcie hospitalizacji byli leczeni w Oddziale Intensywnej Terapii (OIT), a osobami których nie przekazano na ten oddział (test U Manna-Whitney'a: $Z=-1,463$, $p=0,143$) (Tabela 26, Rycina 16).

Tabela 26. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od leczenia Oddziale Intensywnej Terapii (OIT).

Leczenie w OIT (pobranie B1)	Średnia±SD	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny Kwartyl
Nie	221±489	82,4	5,80	3271	37	178
Tak	582±955	305	5,80	3041	49	613



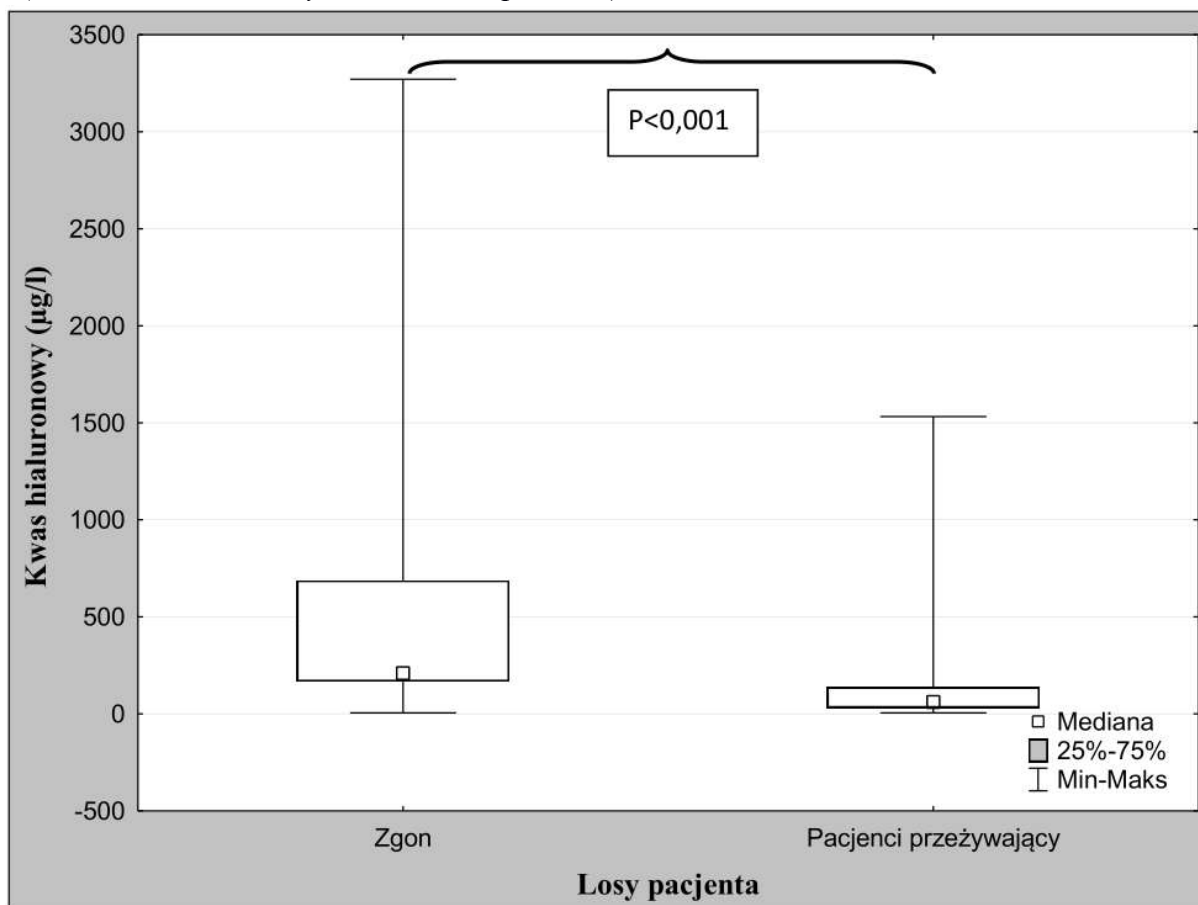
Rycina 16 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (B1) w zależności od leczenia w Oddziale Intensywnej Terapii (OIT) w trakcie hospitalizacji (test U Manna-Whitney'a: $Z = -1,463$, $p = 0,143$).

Pacjenci którzy zmarli na COVID-19 przy przyjęciu (pobranie B1) mieli istotnie wyższe stężenie HA w surowicy względem pacjentów którzy przeżyli (test U Manna-Whitney'a: $Z = 3,436$, $p < 0,001$) (Tabela 27, Rycina 17).

Tabela 27. Stężenia kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od przebiegu choroby.

Losy pacjenta (pobranie B1)	Średnia±SD	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny Kwartyl
Wypisani do domu	139±235	61,1	5,80	1532	32,8	235
Zgon	750±1055	210	5,80	3271	169	687

Rycina 17 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) w zależności od przebiegu choroby (wypis do domu/zgon) - (test U Manna-Whitney'a: $Z = 3,436$, $p < 0,001$).



4.9 Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy w zależności od stopnia nasilenia zmian zapalnych w płucach w tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości klatki piersiowej wg skali CTSS

Ocenę zajęcia płuc w tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości przy przyjęciu w skali ciężkości dla komputerowej tomografii (CTSS) wykonano u 66 pacjentów w grupie badanej. U pozostałych 28 osób spośród grupy badanej w badaniach obrazowych klatki piersiowej istniały nieprawidłowości uniemożliwiające jednoznaczną ocenę (odma, płyn w jamach opłucnowych, niecharakterystyczny obraz zmian. U wszystkich 66 pacjentów oznaczono stężenie HA w surowicy przy przyjęciu (B1), dodatkowo u 34 z nich wykonano drugie oznaczenie w 10 dobie hospitalizacji (B2). Spośród 66 pacjentów punktacja CTSS wyniosła: 0-9 pkt. - 35 osób, 10-19 pkt. - 27 osób, 20-25 pkt. - 4 osoby. Wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację stężenia HA w surowicy przy przyjęciu (B1) ze stopniem zajęcia płuc w skali CTSS ($p < 0,001$), (Tabela 28). Analizy korelacji dokonano testem Spearmana.

Tabela 28. Korelacja (R) stężenia kwasu hialuronowego w surowicy z punktacją w skali ciężkości dla tomografii komputerowej (CTSS) w pobraniu B1 i B2 u chorych na COVID-19 (test Spearmana).

Zmienna	Pobranie B1 (n=66)		Pobranie B2 (n=34)	
	R	p	R	p
HA	0,465	<0,001	0,112	0,528

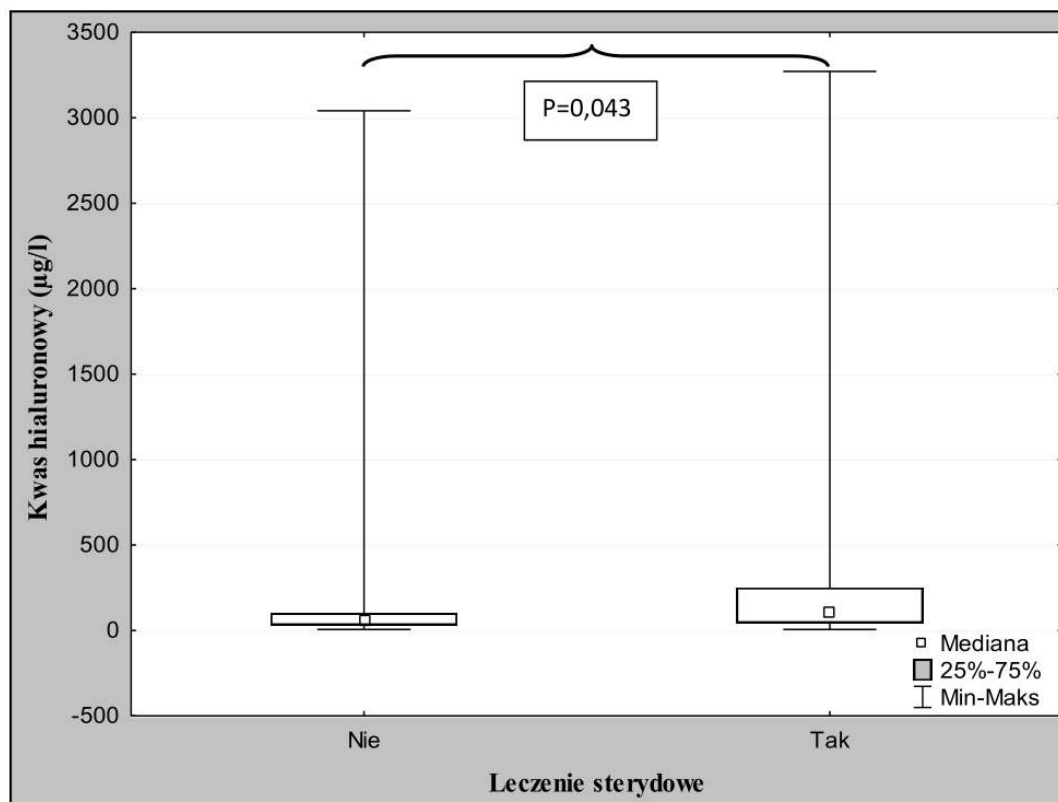
4.10 Stężenie HA w surowicy w zależności od stosowania glikokortykosteroidów (GKS)

Pacjenci z COVID-19, którzy wymagali terapii glikokortykosteroidami w trakcie hospitalizacji, przy przyjęciu charakteryzowali się istotnie wyższym stężeniem HA w surowicy wobec osób u których nie stosowano takiej terapii (test U Manna-Whitney'a: $Z = -2,018$, $p = 0,043$), (Tabela 29, Rycina 18).

Tabela 29. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) a stosowanie glikokortykosteroidów w trakcie hospitalizacji.

Terapia glikokortykosteroidami	Średnia±SD	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartył	Górny Kwartył
NIE	173±486	57	5,80	3041	34	100
TAK	316±587	108	5,80	3271	45	249

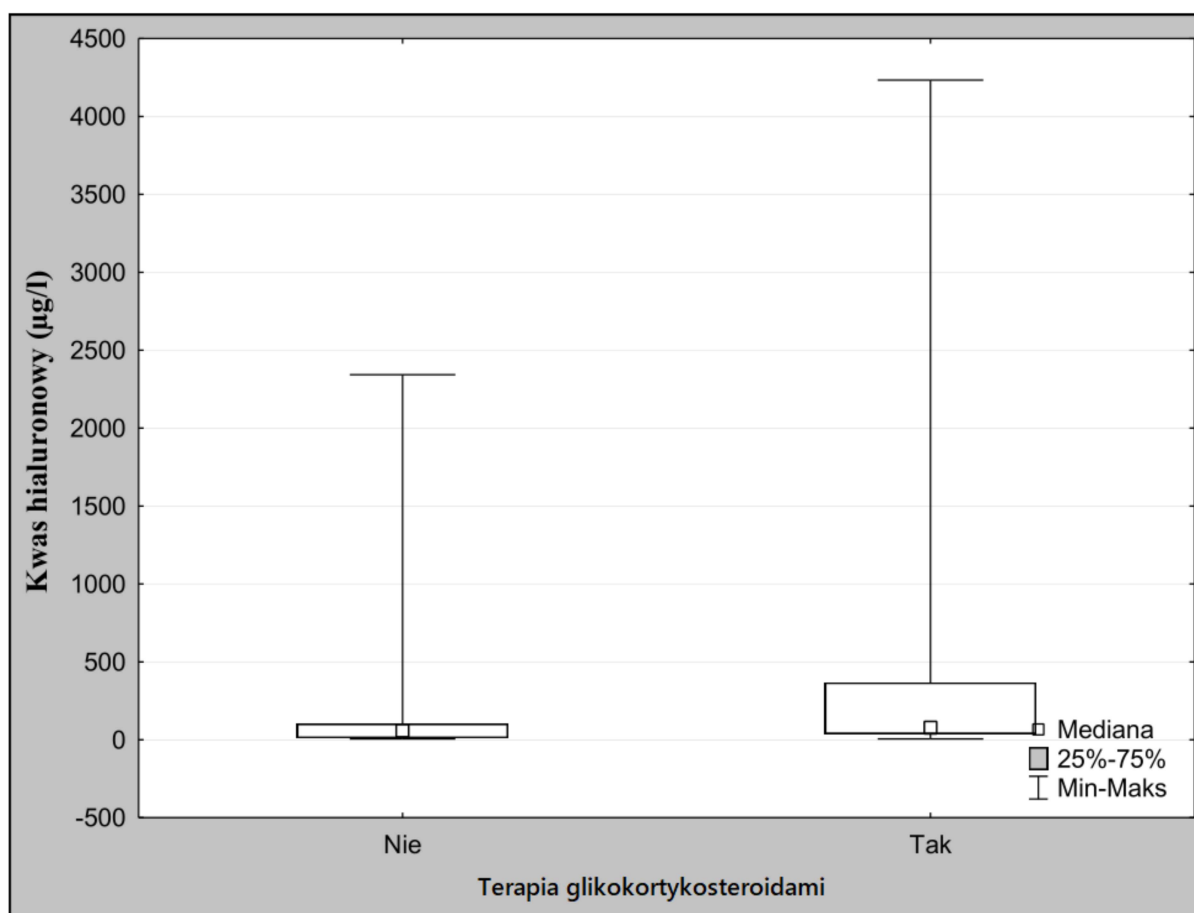
Rycina 18 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 przy przyjęciu do szpitala (pobranie B1) a konieczność stosowania glikokortykosteroidów w trakcie hospitalizacji (test U Manna-Whitney'a: $Z = -2,018$, $p = 0,043$).



Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie w stężeniu HA w surowicy pomiędzy pacjentami w dziesiątej dobie hospitalizacji u których stosowano kortykosteroidoterapię względem tych u których nie stosowano takiego leczenia (test U Manna-Whitney'a: $Z = -1,584$, $p = 0,113$), (Tabela 30, Rycina 19).

Tabela 30. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) chorych na COVID-19 w 10 dobie hospitalizacji (pobranie B2) a stosowanie glikokortykosteroidów w trakcie hospitalizacji.

Terapia glikokortykosteroidami	Średnia±OS	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny Kwartyl
NIE	215±576	59	5,80	2343	11	103
TAK	513	77	5,80	4233	37	368

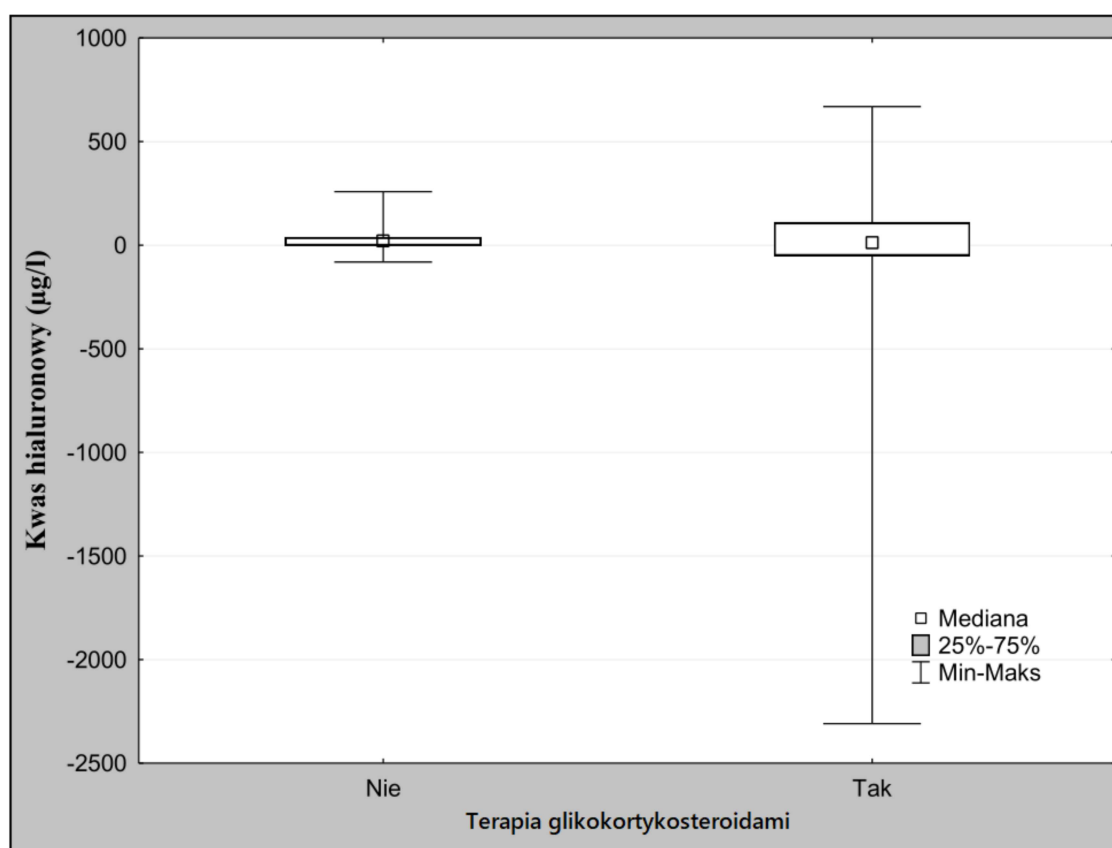


Rycina 18 - Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy chorych na COVID-19 w dziesiątej dobie hospitalizacji (pobranie B2) w zależności od stosowania glikokortykosteroidów (test U Manna-Whitney'a: $Z = -1,584$, $p = 0,113$).

W grupie pacjentów, u których wykonano dwa pobrania krwi obliczono indywidualne różnice w stężeniu HA w surowicy pomiędzy przyjęciem do szpitala (B1) a 10 dobą hospitalizacji (B2). Wykazano, że w grupie pacjentów leczonych w trakcie hospitalizacji GKS średnie stężenie HA w surowicy uległo zmniejszeniu (-133ng/ml $\text{SD}\pm 654$), zaś w grupie bez takiej terapii – zwiększeniu ($+27\text{ng/ml}$ $\text{SD}\pm 73$). Nie wykazano jednak istotności statystycznej dla tej zależności (test U Manna-Whitney’a: $Z = 0,356$, $p = 0,722$), (Tabela 31, Rycina 19).

Tabela 31. Zmiana stężenia kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) pomiędzy pierwszą (B1) a dziesiątą dobą hospitalizacji (B2) w grupie pacjentów chorych na COVID-19 leczonych oraz nieleczonych glikokortykosteroidami.

Terapia glikokortykosteroidami	N	Średnia \pm SD	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl
TAK	22	-133 ± 654	12,8	-2309	669	-50	107
NIE	15	$+27\pm 73$	20,9	-81	258	0	36,3



Rycina 19 – Zmiana stężenia kwasu hialuronowego w surowicy (ng/ml) pomiędzy pierwszą (B1) a dziesiątą dobą hospitalizacji (B2) w grupie pacjentów chorych na COVID-19

leczonych oraz nieleczonych glikokortykosteroidami (test *U Manna-Whitney'a*: $Z = 0,356$, $p = 0,722$).

4.11 Analiza korelacji stężenia kwasu hialuronowego w surowicy z wybranymi parametrami biochemicznymi, morfologicznymi, gazometrycznymi oraz życiowymi

Oceny stopnia korelacji dokonano testem Spearmana i Pearsona. Wyniki przedstawiono w Tabeli 32. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy **przy przyjęciu (B1)** istotnie **dodatnio** korelowało z:

- wykładnikami stanu zapalnego (IL-6)
- parametrami niewydolności nerek (kreatynina)
- stopniem uszkodzenia wątroby (AST, GGT, LDH, bilirubina, PT, INR)
- oraz innymi (glukoza, MCV).

Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy **przy przyjęciu (B1)** istotnie **ujemnie** korelowało z:

- stopniem utlenowania krwi tętniczej (SaO_2)
- wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej (eGFR)
- parametrami morfotycznymi (RBC i PLT)

Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy **w dziesiątej dobie hospitalizacji (B2)** istotnie **dodatnio** korelowało z:

- wykładnikami stanu zapalnego (prokalcytonina)
- stopniem uszkodzenia wątroby (AST, LDH, bilirubina)
- oraz innymi (MCV)

Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy **w dziesiątej dobie hospitalizacji (B2)** istotnie **ujemnie** korelowało z:

- stopniem utlenowania krwi tętniczej (SaO₂)
- parametrami morfotycznymi (RBC i PLT)

Tabela 32. Ocena korelacji (R) stężenia kwasu hialuronowego w surowicy u chorych na COVID-19 przy przyjęciu (B1) i w 10 dobie hospitalizacji (B2).

Zmienna	Pierwsza doba hospitalizacji (B1)		Dziesiąta doba hospitalizacji (B2)	
	R	p	R	p
<i>Parametry ostrej fazy</i>				
Prokalcytonina	0,439	<0,001	0,523	<0,001
CRP	0,168	0,120	0,290	0,077
Il-6	0,462	<0,001	0,200	0,336
WBC	0,065	0,548	0,138	0,402
PLT*	-0,355	0,001	-0,458	0,003
<i>Parametry uszkodzenia wątroby</i>				
Bilirubina	0,219	0,043	0,549	<0,001
INR	0,281	0,011	0,445	0,073
PT	0,282	0,011	0,517	0,033
LDH	0,414	<0,001	0,408	0,009
GGTP	0,225	0,040	0,133	0,415
AST	0,367	<0,001	0,529	<0,001
ALT	0,062	0,570	0,177	0,275

<i>Parametry układu czerwonokrwinkowego</i>				
RBC*	-0,262	0,014	-0,336	0,037
HGB*	-0,129	0,234	-0,251	0,124
HCT	-0,100	0,355	-0,141	0,390
MCV*	0,314	0,003	0,352	0,028
<i>Parametry gazometryczne</i>				
pH	0,033	0,763	0,187	0,255
pO ₂ *	-0,144	0,208	-0,204	0,213
pCO ₂	-0,032	0,772	-0,027	0,871
SaO ₂	-0,217	0,047	-0,367	0,021
BE	-0,025	0,823	0,037	0,824
<i>Inne parametry biochemiczne</i>				
Kreatynina	0,239	0,026	0,196	0,224
eGFR	-0,270	0,011	-0,258	0,129
Glukoza	0,267	0,014	0,221	0,171
Cholesterol	-0,161	0,136	-0,317	0,046
Trójglicerydy	-0,007	0,949	-0,365	0,020
Fibrynogen	-0,062	0,594	-	-
CK	0,068	0,539	0,009	0,956
<i>Parametry życiowe</i>				
RR skurczowe	0,015	0,891	0,056	0,735
RR rozkurczowe*	-0,062	0,587	0,190	0,248
Czynność serca	0,051	0,640	0,209	0,196

*- korelacja Pearsona

V. Omówienie wyników i dyskusja

W badaniu analizie poddano wpływ choroby COVID-19 na stężenie kwasu hialuronowego w surowicy w zależności od przebiegu klinicznego oraz wybranych parametrów krwi. Kwas hialuronowy jest polisacharydem z grupy glikozaminoglikanów. Odpowiada m.in. za wiązanie wody w postaci biożelu oraz utrzymanie elastyczności tkanek. Wynika to z jego ekstremalnej hydrofilności, skutkującej zdolnością do wiązania wody w ilości tysiąckrotnie przekraczającej masę jego cząsteczki. W płucach stanowi kluczowy element składowy błony podstawnej oskrzeli, oskrzelików, tkanki pęcherzyków płucnych oraz glikokaliksu kapilar płucnych. Wraz z postępem procesów włóknienia w organizmie dochodzi do wzmożonej depozycji składników macierzy pozakomórkowej (ECM), takich jak kolageny, fibronektyna, czy kwas hialuronowy (133). Transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β) jest jedną z głównych cytokin profibrotycznych, która sprzyja włóknieniu poprzez nieprawidłową regulację ECM. TGF- β w szczególności pobudza syntezę kwasu hialuronowego, przez co jego rola w procesach fibrotycznych staje się coraz większym punktem zainteresowania naukowców. Poza rolę w procesach syntezy przypisywany jest mu również efekt regulatorowy poprzez promowanie migracji i aktywację leukocytów. Aktywowane komórki układu odpornościowego oraz wydzielane czynniki wzrostu aktywują fibroblasty, które są głównym efektem w procesie fibrogenyzy (211). W 1989 roku Bjermer i wsp. porównali stężenia HA w płynie uzyskanym w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc w odniesieniu do osób zdrowych. Dowiedziono wówczas pięciokrotnie wyższe stężenie HA u osób dotkniętych chorobą względem grupy kontrolnej. Dodatkowo wykazano korelację pomiędzy stężeniem HA a ilością neutrofilów i

limfocytów w aspiracie, jak również z ciężkością choroby (212). Zapoczątkowało to dalsze badania nad HA w kontekście chorób zapalnych oraz przebiegających z włóknieniem. Dotychczas wiele analiz wykazało zwiększoną depozycję HA w zapalnych chorobach wątroby, ze zwiększeniem jego stężenia w surowicy. W rezultacie zaproponowano by poziom krążącego HA traktować jako biomarker marskości wątroby, monitorowania czynności wątroby, czy oceny zwłóknienia wątroby (213, 214, 215). Wzrost stężenia HA obserwowany jest również m.in. u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit, astmą, idiopatycznym nadciśnieniem płucnym, chorobami reumatycznymi czy przewlekłą chorobą nerek (216-220). Dowiedziono również pozytywną korelację stężenia HA w surowicy z progresją włóknienia w śródmiąższowej chorobie płuc (221).

Zainteresowanie autora kwasem hialuronowym w tej pracy w kontekście udziału w procesach włóknienia wiąże się z rosnącą wiedzą o COVID-19 oraz jego powikłaniach. Istnieją liczne publikacje opisujące włóknienie narządowe w konsekwencji zakażenia wirusem SARS CoV-2. Najwięcej publikacji dotyczy włóknienia płuc, lecz zjawisko to odnotowano również w mięśniu sercowym, czy wątrobie (158, 159, 222, 223, 224). Potencjalnie procesy włóknienia w odpowiedzi na reakcję zapalną wywołaną infekcją mogą występować w pozostałych narządach, co wymaga dalszych badań. Wirus SARS-CoV-2 może infekować wiele innych tkanek w których występuje ekspresja receptora ACE2 (naczynia krwionośne, jelita, nerki, nabłonek węchowy, mózg, skóra) (225). Odpowiedź zapalna na zakażenie SARS-CoV-2 jest jednocześnie bodźcem profibrotycznym oraz hamującym procesy fibrolizy. W efekcie dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy wytwarzaniem a degradacją tkanki łącznej, skutkując jej

wzmocnionym odkładaniem. Istnieją doniesienia o nadprodukcji kwasu hialuronowego w pęcherzykach płucnych i przestrzeni śródmiąższowej jako potencjalnej przyczynie występowania ARDS. W badaniu autopsyjnym u pacjentów zmarłych na ARDS w przebiegu COVID-19 wykryto wzmożoną depozycję kwasu hialuronowego w przestrzeni śródmiąższowej płuc oraz w pęcherzykach płucnych względem prawidłowej tkanki płucnej. Makroskopowo płuca wypełniała galaretowata substancja utworzona przez uwodniony kwas hialuronowy, stanowiąc barierę dla skutecznej wymiany gazowej (226).

W literaturze naukowej wielokrotnie poruszano temat potencjału zastosowania leków antyfibrotycznych (m.in. nintendamibu czy pirfenidonu) w COVID-19. Największym problemem jest wytypowanie pacjentów, którzy mogą uzyskać korzyść z takiego leczenia (227). Leki te dotychczas z powodzeniem stosowane były u pacjentów chorujących na idiopatyczne włóknienie płuc, spowalniając progresję choroby i poprawiając parametry czynnościowe płuc (228, 229). Jednak zastosowanie leku u pacjenta, u którego stwierdzono już dokonane procesy włóknienia niesie potencjalnie niewielkie korzyści (230, 231). Poznanie dynamiki zmian stężenia kwasu hialuronowego (HA) w organizmie w przebiegu infekcji mogłoby przyczynić się do wykorzystania tego parametru jako wczesnego markera włóknienia u chorych. To zaś pozwoliłoby na wczesne zastosowanie leków antyfibrotycznych przed rozwinięciem pełnoobjawowego włóknienia płuc.

Przeprowadzone przez nas badanie to miało na celu ocenę surowiczego stężenia kwasu hialuronowego u chorych na COVID-19, pośrednio odzwierciedlającą dynamikę obrotu składników macierzy pozakomórkowej u chorych na COVID-19 w zależności od wybranych parametrów. Wzięto pod uwagę wydolność oddechową, parametry

gazometryczne, obecność burzy cytokinowej oraz niewydolność wielonarządową, jako obiektywne wykładniki przebiegu choroby. Do badania włączono 94 pacjentów chorych na COVID-19 hospitalizowanych w okresie od listopada 2021 do marca 2022, zaś grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych osób u których wykluczono zakażenie wirusem SARS-CoV-2. U każdej z osób przy przyjęciu (B1) pobrano gazometrię krwi tętniczej oraz krew żylną do oznaczenia morfologii i parametrów biochemicznych. U 40 osób z grupy badanej dodatkowo wykonano drugie pobranie krwi w dziesiątej dobie hospitalizacji (B2). U pozostałych 54 osób nie wykonano drugiego pobrania z niezależnych przyczyn (zgon/przeniesienie na inny oddział/wcześniejszy wypis/brak zgody na drugie pobranie).

W 2004 roku podczas epidemii SARS chińscy badacze zauważyli zwiększenie surowiczych stężeń kwasu hialuronowego w ostrej fazie choroby w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku ciężkiego przebiegu choroby wysokie stężenia HA utrzymywały się także w fazie zdrowienia (232). Znając zależności zmian jego stężenia w innych chorobach i rolę im przypisywaną postanowiono ocenić, jak wpływa na nie zakażenie nowym wariantem koronawirusa.

W badaniach własnych wykazano istotnie wyższe ($p < 0,001$) stężenia kwasu hialuronowego w pobraniach B1 i B2 względem grupy kontrolnej. Mediana w grupie kontrolnej była 6-krotnie niższa niż w B1 oraz pięciokrotnie niższa niż w B2. Różnica stężeń między pobraniami (B1 vs B2) nie była istotna statystycznie ($p = 0,149$). Wykazano istotny wzrost stężenia HA u chorych na COVID-19, co może wynikać ze zwiększonego obrotu tego związku w organizmie. Inni autorzy, poza wzmożoną produkcją HA rozważają również jego uwalnianie w wyniku procesów degeneracji glikokaliksu, zachodzącej w wyniku uszkodzenia endotelium kapilar płucnych (233).

W badaniu własnym oceniono dynamikę stężenia HA w zależności od ciężkości choroby. Zaobserwowano wzrost stężenia kwasu hialuronowego wraz z cięższym przebiegiem klinicznym w pierwszej dobie hospitalizacji, z istotną statystycznie różnicą ($p < 0,001$) pomiędzy przebiegiem umiarkowanym a krytycznym. Dla pobrania B2 nie uzyskano istotnych statystycznie różnic, co wynika prawdopodobnie z mniejszej grupy badawczej oraz wysokich odchyłeń standardowych. Wykazana dodatnia korelacja stężenia kwasu hialuronowego z ciężkością przebiegu klinicznego może potwierdzać jego związek ze stopniem wydolności oddechowej. Zatem stężenie HA może stanowić surowiczy marker ryzyka wystąpienia niewydolności oddechowej. W 2022 roku zespół włoskich naukowców zbadał korelację stanu klinicznego ze stężeniem HA w surowicy, nie uzyskując istotnej zależności. Wykazano za to predykcyjną wartość stężenia tkankowego inhibitora metaloproteinaz 1 (TIMP-1) dla ciężkości przebiegu COVID-19. Do oceny przebiegu COVID-19 autorzy zastosowali skalę WHO, punkt odcięcia ustanowiono na 5 kategorii ciężkości. Przełożyło się to na porównanie grupy pacjentów nieleczonych tlenoterapią/leczonych tlenoterapią niskoprzepływową (1 – 5 pkt. w skali WHO) z pacjentami leczonymi zaawansowanymi metodami wsparcia tlenowego (6 - 10 pkt. w skali WHO). Pomimo zastosowania podobnych metod badawczych brak istotności statystycznej może wynikać z wynikającej z tak szerokiej stratyfikacji, większej niejednorodności porównywanych grup, skutkującej brakiem możliwości zestawienia pacjentów z najłagodniejszym przebiegiem do chorych z przebiegiem ciężkim/krytycznym. Dodatkowo w przytaczanym badaniu nie uwzględniono niewydolności wielonarządowej jako kryterium ciężkości choroby, co może mieć istotne znaczenie dla obserwowanych wyników (235, 236).

Badania własne sugerują, iż w początkowej fazie COVID-19 może występować wzmożona fibrogeneza. Zależność ta może mieć również znaczenie w kontekście występowania włóknienia płuc jako jego konsekwencji. Metaanaliza autorstwa Amina i wsp. z 2022 roku wykazała silny związek pomiędzy uszkodzeniem mięszu płucnego w ostrej fazie choroby, a występowaniem w dalszej obserwacji cech włóknienia płuc (237). Uzyskane dowody wykazujące korelację stężenia HA zarówno z ciężkością przebiegu ostrej fazy COVID-19, jak i z postępem włóknienia w innych chorobach nasuwa się pytanie czy HA może stanowić wczesny marker włóknienia płuc w COVID-19. W tym celu potrzeba dalszych badań długookresowych oceniających pacjentów pod kątem wystąpienia cech włóknienia płuc.

Kolejnym poddanym analizie zagadnieniem był wpływ burzy cytokinowej (CS) na stężenie HA w surowicy. Coraz więcej wiadomo o roli jaką HA pełni w patomechanizmie CS. Dowiedziono (także w tym badaniu) że infekcja wirusowa może promować syntezę HA. Interleukina 13 jest znanym aktywatorem syntazy kwasu hialuronowego 1 (HAS-1). W badaniu Donlana i wsp. Wykazano, że jej stężenie znacząco rośnie w COVID-19 i koreluje z ciężkością przebiegu klinicznego (238). Powstała w tym mechanizmie akumulacja HA podtrzymuje migrację komórek układu immunologicznego do płuc. Zrekrutowane neutrofile wytwarzają hialuronidazy, które wraz z reaktywnymi formami tlenu degradują wielkocząsteczkowy kwas hialuronowy, który przejawia działanie homeostatyczne, przeciwzapalne oraz antyoksydacyjne. Wytwarzanie fragmentów małocząsteczkowego kwasu hialuronowego zostało powiązane z nasileniem stanu zapalnego w wielu mechanizmach. Indukują one uwalnianie cytokin zapalnych (IL-6, IL-8, IL-10, interferon- α), chemokin (IP-10, MCP1) oraz czynników wzrostu przez m.in.

komórki nabłonka pęcherzyków płucnych (239, 240). Te prozapalne fragmenty małowcząsteczkowego kwasu hialuronowego mogą wzmacniać efekt obserwowanej w COVID-19 burzy cytokinowej, stymulując uwalnianie większej puli cytokin z komórek odpornościowych oraz pęcherzykowych płuc, co prowadzi do zespołu hiperzapalnego. Bezpośrednio również zwiększają przepuszczalność bariery śródłonkowej w mechanizmie zależnym od CD44 i kinazy Rho (ROCK), (233). Rozregulowana synteza i degradacja HA przebiega w sposób niekontrolowany, co prowadzi do gromadzenia się HA w pęcherzykach płucnych, a w konsekwencji do niedotlenienia i ARDS. Podejrzenie związku między HA a CS znalazło odzwierciedlenie w wynikach przeprowadzonej przez autora analizy. Mediana stężenia HA była trzykrotnie wyższa u pacjentów spełniających kryteria burzy cytokinowej w pobraniu B1 ($p < 0,001$) oraz dwukrotnie wyższa po 10 dniach hospitalizacji (pobranie B2, $p = 0,069$). Brak istotności statystycznej między HA a CS dla drugiego pobrania autor wiąże z mniejszą liczebnością tej grupy oraz wyższym odchyleniem standardowym stężeń HA. Rola jaką przypisuje się małowcząsteczkowemu HA w indukowaniu reakcji zapalnej skłoniła naukowców do wykorzystania jej potencjalnego punktu uchwytu w leczeniu COVID-19. Pierwsze badania hymekromonu (będącego inhibitorem syntaz kwasu hialuronowego 2 oraz 3) na małej populacji chorych na COVID-19 dały obiecujące wyniki, wykazując redukcję zmian zapalnych w płucach oraz limfocytozy po zastosowaniu leku (234).

Wobec nieznannej roli jaką HA pełni w mechanizmie ARDS w przebiegu COVID-19 postanowiono zweryfikować zależność stężenia kwasu hialuronowego w surowicy z wydolnością oddechową pacjentów. Grupę badaną podzielono na podgrupy w zależności od konieczności suplementacji tlenu, niezbędnego do zapewnienia optymalnego

utlenowania krwi: bez tlenoterapii, tlenoterapia niskoprzepływowa (do 15 litów/minutę), tlenoterapia wysokoprzepływowa (15-60 litrów/minutę) oraz respiratoroterapia. Żaden spośród pacjentów grupy badanej nie był leczony pozaustrojowym utlenowaniem krwi (ECMO). Zgodnie z zakładaną hipotezą obserwowano wzrost stężenia kwasu hialuronowego wraz z rosnącą intensywnością stosowanej tlenoterapii (test ANOVA rang Kruskala-Wallisa: $H=13,41$, $p=0,0039$). Mediana stężenia HA w pierwszej dobie hospitalizacji (B1) wyniosła 50,9 ng/ml bez tlenoterapii, 89,75ng/ml przy niskoprzepływowej tlenoterapii, 100,33ng/ml przy wysokoprzepływowej tlenoterapii oraz 417ng/ml przy respiratoroterapii. Stężenie kwasu hialuronowego było istotnie niższe w grupie bez tlenoterapii względem pacjentów poddawanych wentylacji mechanicznej. Ponadto wykazano ujemną korelację stężenia kwasu hialuronowego z wartością saturacji tlenem krwi tętniczej w badaniu gazometrycznym, zarówno w pierwszym ($p=0,047$), jak i drugim ($p=0,021$) pobraniu krwi. Wykazano zatem istotny związek stężenia HA w surowicy z wydolnością oddechową chorych na COVID-19.

W diagnostyce pacjentów chorych na COVID-19 tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości klatki piersiowej (HRCT) znalazła szerokie zastosowanie jako skuteczne, dostępne i szybkie narzędzie diagnostyczne. Charakterystyczne zmiany pozwoliły identyfikować pacjentów z podejrzanym zakażeniem, jak również ocenić zaawansowanie zmian w miąższu płucnym. Do oceny stopnia zajęcia płuc wykorzystywana jest 25-punktowa skala CTSS (*computer tomography severity score*) w której określane jest zaawansowanie zmian w obrębie 5 płatów płucnych (3 płaty płuca prawego oraz 2 płaty płuca lewego). Metaanaliza autorstwa Prakash'a i wsp. z 2023 roku obejmująca 2788 pacjentów wykazała predykcyjną wartość tego wskaźnika dla ciężkości

przebiegu choroby oraz ryzyka zgonu (109). W związku z powyższym postanowiono ocenić jego związek ze stężeniem HA w surowicy.

W badaniach własnych ocenie w skali CTSS poddano 66 pacjentów. Pozostałe osoby posiadały nieprawidłowości w badaniach obrazowych uniemożliwiające jednoznaczną ocenę (odma, płyn w jamach opłucnowych, niecharakterystyczny obraz zmian, nakładanie się zmian o innym charakterze). Wykazano istotną dodatnią korelację obrazowanego w TK zajęcia płuc w skali CTSS ze stężeniem HA w surowicy, co dodatkowo dowodzi jego prognostycznej wartości dla przebiegu choroby.

Kolejnym krokiem w analizie wpływu stężenia kwasu hialuronowego na ciężkość przebiegu choroby była ocena losów pacjenta w trakcie trwania badania. Wykazaliśmy, że w populacji badanej stężenie kwasu hialuronowego w surowicy jest predykcyjne dla ryzyka zgonu w trakcie hospitalizacji. Pacjenci, u których choroba zakończyła się zgonem mieli istotnie wyższe stężenie HA przy przyjęciu niż ci, którzy przeżyli (test U Manna-Whitney'a: $Z = 3,436$, $p < 0,001$). Nie wykazano zależności pomiędzy HA a ryzykiem przekazania na Oddział Intensywnej Terapii (test U Manna-Whitney'a: $Z = -1,463$, $p = 0,143$). Należy jednak zaznaczyć, że jedynie 9 pacjentów w grupie badanej zostało przekazanych na Oddział Intensywnej Terapii, z czego 8 zmarło. Część pacjentów z ciężką niewydolnością oddechową była leczona w oddziale macierzystym z powodu ograniczonej dostępności miejsc lub ciężkich chorób przewlekłych dyskwalifikujących z leczenia w OIT. Wymienione istotne czynniki dystrykcyjne powodują, że wniosek ten należy uznawać za niejednoznaczny i wymagający dalszych badań.

Liczne badania wykazały istotny związek obecności chorób współtowarzyszących z cięższym przebiegiem infekcji SARS-CoV-2. Badanie autorstwa Guana i wsp. wykazało

ścisły związek chorób takich jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, POChP czy nowotwór z większym ryzykiem wentylacji mechanicznej, koniecznością leczenia w Oddziale Intensywnej Terapii oraz zgonu (241). W innych badaniach wykazano podobną zależność dla przewlekłych chorób wątroby, nerek, śródmiąższowych chorób płuc, czy wrodzonych niedoborów odporności (242, 243, 244, 245). Wiedząc, że występowanie chorób przewlekłych wiąże się z cięższym przebiegiem zakażenia, autor postanowił ocenić czy ich obecność przełoży się również na wzrost stężenia HA. Analiza korelacji nie wykazała różnic w pobraniu B1 pomiędzy chorymi bez i z chorobami współtowarzyszącymi ($p=0,160$). Na tej podstawie można wnioskować, że zarówno stężenie HA w surowicy jak i obecność chorób współistniejących stanowią niezależne od siebie czynniki prognostyczne ciężkości przebiegu COVID-19.

Przełomem w pandemii SARS-CoV2 stanowiło wynalezienie szczepionki przeciwko wirusowi. Dowiedziono wysoką (sięgającą powyżej 90%) skuteczność w zapobieganiu ciężkiemu przebiegowi choroby. Ponadto udowodniono utrzymywanie się dobrego efektu szczepionek przypominających wraz z pojawieniem się nowych wariantów wirusa (246). Brak jest dotychczas wiedzy na temat wpływu szczepienia przeciwko COVID-19 na stężenie HA w surowicy.

W naszym badaniu postanowiliśmy porównać pacjentów szczepionych z nieszczepionymi oraz ocenić wpływ liczby dawek szczepionki na stężenie HA w surowicy. Nie wykazano istotnej różnicy w stężeniach HA pomiędzy grupą zaszczepioną a niezaszczepioną (test U Manna-Whitney'a: $Z=-0,389$, $p=0,700$). Nie wykazano również zależności z liczbą przyjętych dawek szczepionki (test ANOVA rang Kruskala-Wallisa: $H=1,59$, $p=0,661$). Wyniki takie mogą wydawać się zaskakujące, gdyż spodziewano się,

że ochronny wpływ szczepienia będzie wiązał się również z niższym stężeniem kwasu hialuronowego. Uzyskany wynik może jednak wynikać z metodologii badania, a nie braku istnienia takiej zależności *per se*. Analizie poddano osoby hospitalizowane, a więc takie u których rozwinęła się objawowa choroba i jej powikłania. Pomimo szczepienia osoby te znalazły się w szpitalu z powodu COVID-19. Można więc wnioskować, że w badaniu nie wzięła udział część społeczeństwa, która na szczepienie odpowiedziała optymalnie i chorobę przeszła bez- lub skąpoobjawowo w warunkach domowych. Dodatkowo ważnym czynnikiem zaburzającym wyniki jest powszechne w momencie prowadzenia badania kupowanie fałszywych certyfikatów szczepień. Wskutek tego osoby deklarujące się jako zaszczepione mogły w rzeczywistości nie być poddane szczepieniu. By wyciągnąć konstruktywne wnioski należałoby zaplanować badanie prospektywne uwzględniające szerszy przekrój populacji, zaś status zaszczepienia powinien zostać zweryfikowany oznaczeniem przeciwciał anty-SARS CoV-2.

W populacji przez nas badanej najczęściej stosowaną w leczeniu COVID-19 grupą leków były glikokortykosteroidy (GKS). 37 pacjentów otrzymało taką terapię, zaś 57 osób nie było leczonych GKS. Chorzy którym podawano glikokortykosteroidy mieli istotnie wyższe stężenie HA przy przyjęciu, niż ci, którym ich nie podawano (test U Manna-Whitney'a: $Z = -2,018$, $p = 0,043$). Pośrednio, jest to dodatkowe potwierdzenie, że wyższe stężenie HA w surowicy częściej wiązało się z niewydolnością oddechową uzasadniającą zastosowanie GKS. Nie wykazano wpływu tych leków na istotną zmianę stężenia HA w surowicy pomiędzy pobraniem krwi przy przyjęciu do szpitala a 10 dobą hospitalizacji (test U Manna-Whitney'a: $Z = 0,356$, $p = 0,722$). Glikokortykosteroidy osiągają swój efekt przeciwzapalny poprzez wpływ na produkcję cytokin prozapalnych. Wiążą się z sekcją

promotorową genów kodujących syntezę IL-1, zmniejszając jej wytwarzanie (247). Ponadto rekrutują czynniki transkrypcyjne genów kodujących cząsteczki o działaniu przeciwzapalnym, takie jak receptor II interleukiny 1, lipokortyna 1, interleukina 10, α -2-makroglobulina (248). Działanie to blokuje wytwarzanie jednego z ważnych czynników stymulujących produkcję kwasu hialuronowego – IL-1. Brak istotnego zmniejszenia stężenia kwasu hialuronowego po zastosowaniu GKS może wynikać z braku wpływu tych leków na pozostałe aktywatory syntaz kwasu hialuronowego, m.in. TGF- β , TNF- α czy IL-6. Potwierdzenie tej hipotezy można znaleźć w badaniu Jamila i wsp. w którym badano wpływ 14-dniowej doustnej glikokortykosteroidoterapii na produkcję czynników profibrotycznych. Analiza nie wykazała wpływu GKS na zmniejszenie ekspresji TGF- β oraz syntezę składników macierzy pozakomórkowej (249).

Kolejnym poddanym analizie aspektem była ocena zależności stężenia HA w surowicy z wybranymi parametrami krwi (biochemicznymi, morfologicznymi, gazometrią krwi tętniczej) oraz życiowymi (ciśnienie tętnicze, czynność serca). Względem grupy kontrolnej w pobraniu B1 wykazano istotnie wyższe wartości parametrów gazometrycznych (pH, SaO₂, BE), wykładników ostrej fazy (CRP, IL-6, prokalcytonina), parametrów uszkodzenia wątroby (ALT, AST, GGTP, LDH, INR, PT) oraz innych (glukoza, MCV, trójglicerydy, fibrynogen). Istotnemu obniżeniu w pobraniu B1 względem grupy kontrolnej uległy niektóre parametry gazometryczne (pO₂, pCO₂), parametry układu czerwonokrwinkowego (HGB, HCT, RBC), oraz inne (cholesterol, eGFR, ciśnienie skurczowe, ciśnienie rozkurczowe, czynność serca). Podwyższone pH, niedobór zasad przy obniżonym pO₂ i pCO₂ mogą wynikać z zasadowicy oddechowej na tle indukowanego niedotlenieniem *tachypnoe*. Wysokie wartości SaO₂ w grupie chorych

mogą odzwierciedlać skutecznie prowadzoną tlenoterapię. Jednocześnie należy zauważyć ograniczenie tego parametru do oceny wydolności oddechowej w tej grupie pacjentów. Saturacja tlenem stanowi odsetek utlenowanej frakcji hemoglobiny w stosunku do hemoglobiny całkowitej. Dokładność tego parametru jest więc ograniczona u osób z współistniejącą anemią. W efekcie pomimo wysokiej saturacji hemoglobiny tlenem całkowity zasób tlenowy krwi może być niewystarczający. Jak już wcześniej odnotowano, populacja badana charakteryzowała się istotnie niższymi parametrami czerwonokrwinkowymi względem grupy kontrolnej. Obserwowano również mikrocytozę - obniżenie MCV; podwyższenie aktywności LDH, miana wskaźnika INR, czasu protrombinowego oraz stężeń wykładników stanu zapalnego. Częstsze występowanie anemii w grupie chorych prawdopodobnie ma podłoże zapalne. Zjawisko to jest bardzo dobrze poznane i obserwowane w większości chorób o etiologii zapalnej. Odpowiada za nie przede wszystkim wychwytywanie krążącego żelaza przez makrofagi z jednoczesnym zmniejszonym wchłanianiem jelitowym (250). Dodatkowymi czynnikami przyczyniającymi się do tego zjawiska są: inhibicja erytropoezy przez cytokiny, skrócony czas życia erythrocyta oraz zmniejszenie biologicznej aktywności erythropoetyny. Skutkiem tego jest pozorny niedobór żelaza oraz niedokrwistość mikrocytarna (251). W badaniu Bellmanna-Weiler'a i wsp. z 2020 roku u niemal 25% pacjentów hospitalizowanych z powodu COVID-19 przy przyjęciu do szpitala stwierdzono anemię. Jednocześnie większość spośród chorych (68.8%) spełniała kryteria niedokrwistości wywołanej stanem zapalnym (252). Inną przyczyną anemii w COVID-19 może być hemoliza wywołana wytworzeniem auto-przeciwciał przeciwko czerwonym krwinkom. Wniknięcie wirusa wywołuje również bezpośrednie uszkodzenie erythrocyta poprzez aktywację receptora

CD147 lub w mechanizmie związanym z błonowym białkiem prążka 3 (BAND-3) erytrocyta. (253).

Nasze badania nie zakładały szczegółowej analizy zjawiska niedokrwistości, w związku z czym nie uwzględniono parametrów dedykowanych dla diagnostyki różnicowej jej przyczyn (takich jak haptoglobina, ferrytyna, transferyna, TIBC, UIBC, rozmaz mikroskopowy i inne), więc brak jest możliwości ich pełnej analizy. W związku z istotnie wyższą aktywnością LDH w grupie badanej można podejrzewać, że zjawisko hemolizy mogło występować u tych chorych, jednak wskaźnik ten charakteryzuje się ograniczoną swoistością.

U chorych z COVID-19 wykazaliśmy podwyższone parametry uszkodzenia wątroby (AST, ALT, GGT, INR, PT, LDH). Brak randomizacji uniemożliwia jednoznacznie wykluczenie podłoża chorób współistniejących jako czynnika przyczyniającego się uzyskanych wyników. Są one jednak zbieżne z obserwacjami innych naukowców.

Pierwsze istotne informacje o uszkodzeniu wątroby pochodzą z publikacji obejmującej 417 przypadków COVID-19 w Shenzhen z przełomu stycznia i lutego 2020 roku. Wykazała ona nieprawidłowe wyniki laboratoryjnych parametrów wątrobowych u 76.3% badanych, dodatkowo 21.5% pacjentów rozwinęło cechy uszkodzenia wątroby w trakcie hospitalizacji (254). W kwietniu 2020 ukazała się metaanaliza obejmująca łącznie 11245 pacjentów chorych na COVID-19. Blisko 25% pacjentów wykazywało podwyższoną aktywność enzymów wskaźnikowych uszkodzenia wątroby. W grupie chorych o ciężkim przebiegu COVID-19 było to już 45.5% (255). Patogeneza tego zjawiska wydaje się złożona. Wśród mechanizmów hepatopatii w COVID-19 wymienia

się bezpośrednio uszkodzenie wywołane wniknięciem wirusa do hepatocytów (czemu sprzyja duża ekspresja receptora ACE-2 na ich powierzchni, bogate unaczynienie miąższu wątroby oraz możliwa transmisja wirusa z przewodu pokarmowego za pośrednictwem krążenia wrotnego), burzę cytokinową (wyrzut cytokin, czynników wzrostowych, aktywacja komórek zapalnych, zaburzenia osi RAA oraz hemostazy, zaburzenia funkcji śródbłonka), indukowane hipoksją niedotlenienie hepatocytów oraz uszkodzenie wątroby indukowane lekami stosowanymi w terapii (256-259).

W badaniach własnych w dziesiątej dobie hospitalizacji (B2) uzyskano obniżone względem przyjęcia (B1) wartości białka C-reaktywnego, WBC, kreatyniny, CK, LDH oraz AST, co wynika ze zwiększonej aktywności zapalnej w ostrej fazie choroby, może również świadczyć o uszkodzeniu komórek mięśniowych. W literaturze zjawisko to przypisywane jest indukowanej angiotensyną II supresją szlaku IGF-1-AKT-mTOR, skutkującą wzmożeniem apoptozy w komórkach mięśniowych (260).

Analizowano zależność stężenia HA w surowicy z parametrami krwi. Analizę wykonano testem Spearmana i Pearsona. W przy przyjęciu (B1) HA istotnie dodatnio korelował z parametrami stanu zapalnego (IL-6), wykładnikami uszkodzenia wątroby (ALT, GGTP, LDH, bilirubina, PT, INR) oraz nerek (kreatyna), zaś istotnie ujemnie z saturacją krwi tętniczej tlenem (SaO_2), funkcją filtracyjną nerek (eGFR) oraz parametrami morfotycznymi krwi (RBC, PLT). W dziesiątej dobie hospitalizacji (B2) stężenie kwasu hialuronowego istotnie dodatnio korelowało z parametrami stanu zapalnego (prokalcytonina), wykładnikami uszkodzenia wątroby (AST, LDH, bilirubina) oraz istotnie ujemnie z saturacją krwi tętniczej tlenem (SaO_2) oraz parametrami morfotycznymi krwi (RBC, PLT). Można na tej podstawie wyciągnąć wnioski, że HA może być uznany

za jeden z wykładników stanu zapalnego u chorych na COVID-19. Ponadto dodatnia korelacja HA z wartościami ALT, GGT, LDH, bilirubiną, PT oraz INR wskazuje że wzrost stężenia kwasu hialuronowego w surowicy może być surogatem uszkodzenia wątroby w COVID-19.

Podsumowując na podstawie wykonanych przez autora badań dowiedziono, że w COVID-19 dochodzi do zwiększenia stężenia kwasu hialuronowego w surowicy. Stężenie to dodatkowo koreluje zarówno z ciężkością stanu ogólnego, jak i ze stopniem niewydolności oddechowej co sprawia, że jego oznaczenie może mieć zastosowanie rokownicze. Potwierdzenie tej tezy znaleziono również analizując losy chorych, gdzie przy przyjęciu stwierdzono istotnie wyższe stężenie kwasu hialuronowego w surowicy u pacjentów, u których hospitalizacja zakończyła się zgonem. Jednocześnie zestawiając uzyskane wyniki z wiedzą na temat kwasu hialuronowego w innych chorobach autor wysnuwa wniosek, że HA powinien zostać oceniony jako potencjalny marker prognostyczny w włóknieniu płuc związanym z COVID-19, co jednak wymaga dalszych badań. Jego stężenie było wyższe przy obecności chorób przewlekłych, choć nie uzyskano istotności statystycznej dla tej cechy. Zauważono ścisły związek między obecnością burzy cytokinowej a wzrostem krążącego hialuronianu. Dotychczasowa wiedza o roli małocząsteczkowego HA w indukcji stanu zapalnego sugeruje możliwość zastosowania inhibitorów syntazy kwasu hialuronowego (jak np. himekromon) do opanowania objawów burzy cytokinowej. Wbrew oczekiwaniom autora szczepienie przeciwko COVID-19 nie wpływało na zmniejszenie stężenia HA w surowicy. Może to jednak wynikać z porównania osób szczepionych z nieszczepionymi jedynie w grupie osób hospitalizowanych, więc potencjalnie wyselekcjonowanej populacji osób, które na

szczepienie odpowiedziały najslabiej i pomimo to ciężko zachorowały lub też mogły się fałszywie deklarować jako osoby zaszczepione. Aby zweryfikować te informacje potrzebne są dalsze badania. Zauważono korelację pomiędzy stężeniem HA w surowicy a parametrami ostrej fazy (IL-6 w pierwszej dobie, prokalcytonina w dziesiątej dobie), więc HA może być zaproponowany jako wykładnik stanu zapalnego w COVID-19. Udowodniono ścisłą korelacją z większością parametrów uszkodzenia i wydolności wątroby w obu pobraniach krwi, na tej podstawie można stwierdzić, że kwas hialuronowy jest surogatem uszkodzenia wątroby w COVID-19.

VI. Wnioski

1. Kwas hialuronowy może być wczesnym wskaźnikiem predykcyjnym ciężkiego przebiegu COVID-19, stopnia zajęcia płuc, niewydolności oddechowej, uszkodzenia wątroby oraz zwiększonego ryzyka zgonu
2. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy nie wykazało związku z obecnością chorób współtowarzyszących co dowodzi, że są to niezależne czynniki prognostyczne ciężkiego przebiegu COVID-19
3. Stosowanie glikokortykosteroidoterapii nie wpływa istotnie na stężenie kwasu hialuronowego w surowicy krwi chorych na COVID-19
4. Nie wykazano wpływu szczepienia przeciwko COVID-19 na stężenie kwasu hialuronowego w surowicy krwi chorych na COVID-19
5. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy może być jednym z wykładników stanu zapalnego w COVID-19, a jego wzrost jest istotnie związany z występowaniem burzy cytokinowej

VII. Streszczenie

W grudniu 2020 roku w chińskim mieście Wuhan zaobserwowano masowe zachorowania na nową jednostkę chorobową wywołaną nową odmianą wirusa z grupy koronawirusów – SARS-CoV-2, wkrótce odpowiedzialnego za pandemię wywoływaną przez niego choroby - COVID-19. W szerokim spektrum objawów wymienia się zapalenie płuc, niewydolność oddechową, zaburzenia krzepnięcia, uszkodzenie serca, wątroby, nerek, zaburzenia neurologiczne, mogące skutkować uszkodzeniem narządowym utrzymującym się po ustąpieniu zakażenia. Szczególnie dobrze udokumentowanym przykładem takiego powikłania jest włóknienie płuc po przebiegu COVID-19 o ciężkim przebiegu.

Kwas hialuronowy (HA) jest wielkocząsteczkowym składnikiem macierzy pozakomórkowej, pełniącym istotną rolę w procesach włóknienia, a także odpowiedzi zapalnej. Dotychczas badanie jego stężenia znalazło zastosowanie w ocenie procesów włóknienia m.in. w śródmiąższowych chorobach płuc oraz przewlekłych chorobach wątroby. Autor za cel badania postawił analizę stężenia kwasu hialuronowego w surowicy w zależności od wybranych czynników u pacjentów zakażonym wirusem SARS-CoV-2. Badanie miało charakter obserwacyjny prospektywny.

Do analizy włączono 94 pacjentów chorych z COVID-19 hospitalizowanych w okresie od listopada 2021 do marca 2022 roku w Oddziale COVID oraz Oddziale Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych Wojewódzkiego Szpitala Zespólnego im. J. Śniadeckiego w Białymstoku. Średnia wieku w populacji osób badanych wyniosła 59,2 lata (zakres 22-89), w tym 38 kobiet ($x=58,4$; zakres 23-89 lat) oraz 56 mężczyzn ($x=58,4$; zakres 22-85 lat). 30 chorych było zaszczepionych przeciwko COVID-19. 66 osób w grupie badanej posiadało choroby współtowarzyszące, wśród najczęstszych występowały: nadciśnienie tętnicze (21 osób), cukrzyca (15 osób) oraz marskość wątroby (8 osób) oraz inne. 62 osoby przeszły chorobę w sposób umiarkowany, 14 ciężki, 16 krytyczny, dwie zaś zakwalifikowano jako ciężki/krytyczny. U 23 chorych (24,5%) hospitalizacja zakończyła się zgonem. U chorych wykonano badanie krwi tętniczej przy przyjęciu pacjenta do Oddziału oraz w 10 dobie hospitalizacji ($\pm 24h$). Oznaczono parametry gazometryczne, biochemiczne, morfologię krwi, układ krzepnięcia, stężenia kwasu hialuronowego, prokalcytoniny oraz interleukiny 6. Wykonano również pomiar ciśnienia tętniczego oraz czynności serca.

Dodatkowo 66 pacjentów miało tomografię komputerową klatki piersiowej wysokiej rozdzielczości z oceną zajęcia płuc w skali CTSS (*computer tomography severity score*). Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych osób w przedziale wiekowym 21-84 lata, z czego 15 osób stanowiły kobiety, a 15 mężczyźni. U uczestników grupy kontrolnej czynne zakażenie wirusem SARS-CoV-2 wykluczono trójgenowym testem PCR wymazu z nosogardła.

Wykazano istotne zwiększenie stężenia kwasu hialuronowego (HA) w surowicy chorych z COVID-19 względem grupy kontrolnej ($p < 0,001$) zarówno w pierwszej jak i w dziesiątej dobie hospitalizacji. Wykazano również związek stężenia HA z ciężkością przebiegu choroby. Osoby z przebiegiem krytycznym charakteryzowały się wyższym stężeniem HA przy przyjęciu do szpitala (średnia $971,7 \text{ ng/ml}$ $\text{SD} \pm 1192,2$; $p < 0,001$) względem przebiegu umiarkowanego (średnia $108,51 \text{ ng/ml}$ $\text{SD} \pm 202,8$). Zajęcie miąższu płuc w badaniu tomografii komputerowej oceniane wg skali CTSS istotnie dodatnio korelowało ze stężeniem HA przy przyjęciu ($p < 0,001$). Obecność burzy cytokinowej skutkowała istotnym wzrostem stężenia HA w surowicy wśród chorych (średnia $445,5 \text{ ng/ml}$ $\text{SD} \pm 685,6$ vs. średnia $169,5 \text{ ng/ml}$ $\text{SD} \pm 466,4$, $p < 0,001$). Zastosowanie glikokortykosteroidów nie wpływało istotnie na zmianę stężenia HA w grupie badanej. Pacjenci, u których hospitalizacja zakończyła się zgonem przy przyjęciu mieli istotnie wyższe stężenie HA względem pacjentów przeżywających ($p < 0,001$). Nie wykazano związku szczepienia przeciwko COVID-19 ($p = 0,660$) oraz obecności chorób przewlekłych ($p = 0,159$) ze stężeniem HA w grupie badanej. HA wykazał pozytywną korelację z parametrami uszkodzenia wątroby (bilirubina, INR, PT, LDH, GGT, AST) oraz ostrej fazy (prokalcytonina, IL-6, PLT), ujemnie zaś korelował z SaO_2 . Na podstawie przeprowadzonych badań można wysunąć wnioski, że w COVID-19 dochodzi do zwiększonego stężenia kwasu hialuronowego. HA może stanowić parametr rokowniczy u tych chorych. Wyższe stężenia HA rokują cięższy przebieg choroby, większy stopień zajęcia płuc, niewydolności oddechowej oraz wyższe ryzyko zgonu. Burza cytokinowa towarzysząca COVID-19 jest ściśle związana ze zwiększeniem stężenia kwasu hialuronowego w surowicy. Stężenie HA jest również skorelowane z biochemicznymi wykładnikami uszkodzenia wątroby i może być zaproponowana jako jego marker w COVID-19.

ABSTRACT

In December of 2020 in Chinese town of Wuhan emerged a massive spread of new disease caused by novel coronavirus type – SARS-CoV-2. It soon became responsible for a global pandemic of disease it caused - COVID-19. It consisted of wide spectrum of symptoms, including pneumonia, respiratory distress, coagulopathy, heart, kidney and liver injury, neurological disorders. Disease may eventually lead to organ damage persisting after acute illness resolves. Lung fibrosis is an example that has been especially well documented in literature.

Hyaluronic acid (HA) is a major compound of extracellular matrix, contributing to process of fibrosis and immunological response. It has been proved to be a good marker of fibrosis in interstitial lung diseases and chronic liver diseases. Aim of this study is to assess the hyaluronic acid serum concentrations among the SARS CoV-2 infected patients, and its correlation with different factors. Study has prospective, observational character. 94 patients with confirmed SARS CoV-2 infection, hospitalized in Voivodeship Hospital of Białystok between November 2021 and March 2022 has been enrolled. Mean age in this population was 59,2 years (range 22-89). Group consisted of 38 women and 56 men. 30 of 94 patients were vaccinated against COVID-19. 66 individuals had comorbidities, the most common were hypertension (21 cases), diabetes mellitus (15 cases), liver cirrhosis (8 cases) and others. 62 patients had moderate course of disease, 14 severe and 16 critical. Two patients were categorized as severe/critical. 23 death cases have occurred during hospitalization (24,5% mortality).

The arterial blood samples were collected on admission and on the 10th day of hospitalization (± 24 h). Samples analysis consisted of gasometrical, morphological, biochemical tests and measurement of procalcitonin, interleukin-6 and hyaluronic acid concentration. The arterial blood pressure and heart rate were also measured. 66 patients underwent high resolution computer tomography with lung infiltration assessment in CTSS scale (computer tomography

severity score). Control group consisted of 30 healthy individuals in age range of 21-81 years, 15 of them were woman and 15 were man. All the participants of this group had excluded active SARS CoV-2 infection by negative result of triple-gene PCR SARS-CoV-2 swab from nasopharynx. Significant elevation of serum hyaluronic acid concentration was observed among COVID-19 group in comparison with control group ($p < 0,001$) both during admission and in 10 day of hospitalization. Serum hyaluronic acid concentration was related to disease severity. Patients with critical course of disease were characterized by higher serum hyaluronic acid concentration on admission in comparison to the ones with mild course (mean 971,75ng/ml $SD \pm 1192,2$ vs 108,51ng/ml $SD \pm 202,8$; $p < 0,001$). Lungs infiltration in computer tomography assessed by CTSS scale had positive correlation with serum HA concentration on admission ($p < 0,001$). HA serum concentration was positively related to the presence of cytokine storm ($p < 0,001$). Use of glucocorticosteroid therapy did not translate into change in serum HA concentrations. Patients whose hospitalization ended in death, on admission had significantly higher HA concentrations compared to surviving patients ($p < 0,001$). No relation between serum HA concentration and COVID-19 vaccination status ($p = 0,660$) nor existing comorbidities ($p = 0,159$) were observed. Serum HA concentration showed positive correlation with liver injury indicators (bilirubin, INR, PT, LDH, GGT, AST), acute phase parameters (procalcitonin, IL-6, PLT) and negative correlation with arterial blood oxygen saturation.

Concluding, serum HA concentration is elevated in COVID-19. Serum HA concentration has prognostic value in COVID-19. Higher HA concentrations translates to more serious course of disease, higher lung infiltration in computer tomography, increased severity of respiratory failure and risk of death. Cytokine storm presence results in a significant increase in the concentration of HA. Serum HA concentration is closely related to the liver injury indicators and acute phase parameters, so it can be proposed as novel marker of liver injury and inflammation in COVID-19.

VIII. Piśmiennictwo

1. Guan W, Ni Z. et al., Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China, *N Engl J Med* 2020; 10.1056/NEJMoa2002032
2. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic, *Acta Biomed* 2020; 10.23750/abm.v91i1.9397
3. Belouzard S, Chu V. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009; 10.1073/pnas.0809524106
4. Cui J, Li F. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses, *Nature Reviews Microbiology* 2019, 10.1038/s41579-018-0118-9
5. Shuo S, Wong G. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016; 10.1016/j.tim.2016.03.003
6. Brant A, Tian W. et al. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication, *Cell Biosci.* 2021; 10.1186/s13578-021-00643-z
7. Yao H, Song Y. et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus, *Cell* 2022; 10.1016/j.cell.2020.09.018
8. Henderson R, Edwards R et al. Controlling the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Conformation, *bioRxiv* 2020; 10.1101/2020.05.18.102087
9. Azkur AK, Akdis M. et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19, *Allergy* 2020; 10.1111/all.14364

10. Cowling B, Leung G. Epidemiological research priorities for public health control of the ongoing global novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak, *Euro Surveill* 2020, 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000110
11. Repici A, Maselli R et al. Coronavirus (COVID-19) outbreak: what the department of endoscopy should know, *Gastrointestinal Endoscopy* 2020, 10.1016/j.gie.2020.03.019
12. Johnson H, Garg M. COVID-19 (SARS-CoV-2) in Non-Airborne body fluids: A systematic review & Meta-analysis, *Turk J Urol* 2021, 10.5152/tud.2021.20586
13. Cerrada-Romero C, BerasteguiCabrera J. et al. Excretion and viability of SARSCoV2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID19, *Scientific Reports* 2022, 10.1038/s41598-022-11439-7
14. Centers for Disease Control and Prevention of USA (CDC). Symptoms of Coronavirus (COVID-19). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>(CDC US 2020)
15. Zou X, Chen K. et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection, *Front Med* 2020; 10.1007/s11684-020-0754-0
16. Zhang J, Tecson K. et al. Endothelial dysfunction contributes to COVID-19-associated vascular inflammation and coagulopathy, *Rev Cardiovasc Med* 2020, 10.31083/j.rcm.2020.03.126
17. Pagliano P, Sellitto C. et al. Characteristics of viral pneumonia in the COVID-19 era: an update, *Infection* 2021; 10.1007/s15010-021-01603-y
18. Montero-Fernandez M, Pardo-Garcia R. Histopathology features of the lung in COVID-19 patients. *Diag Histopathol (Oxf)* 2021, 10.1016/j.mpdhp.2020.11.009

19. Gujski M., Jankowski M. The Prevalence of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and Outcomes in Hospitalized Patients with COVID-19—A Study Based on Data from the Polish National Hospital Register. *Viruses* 2022, 10.3390/v14010076
20. Wu C, Chen X. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020, 10.1001/jamainternmed.2020.0994
21. Seo J, Kim S. et al. Risk Factors and a Scoring System to Predict ARDS in Patients with COVID-19 Pneumonia in Korea: A Multicenter Cohort Study. *Dis Markers.* 2021, 10.1155/2021/8821697
22. Hasan S, Capstick T. Mortality in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome and corticosteroids use: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Respir Med.* 2020, 10.1080/17476348.2020.1804365
23. Tzotzos S., Fischer B. et al. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. *Crit Care* 2020, 10.1186/s13054-020-03240-7
24. Krishnan J., Rajan M. et al. Assessing mortality differences across acute respiratory failure management strategies in Covid-19. *J. Crit Care* 2022, 10.1016/j.jcrc.2022.154045
25. Polack F., Thomas S. et al., Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine, *N Eng J Med* 2020, 10.1056/NEJMoa2034577
26. <https://www.cdc.gov/media/releases/2021/s1208-16-17-booster.html>
27. Accorsi E., Britton A. et al. Vaccine and Symptomatic Infection Caused by the SARS-CoV-2 Omicron and Delta Variants. *JAMA* 2022, 10.1001/jama.2022.0470
28. Thompson M., Natarajan K., et al. Effectiveness of a Third Dose of mRNA Vaccines Against COVID-19-Associated Emergency Department and Urgent Care Encounters and Hospitalizations Among Adults During Periods of Delta and Omicron Variant Predominance -

- VISION Network, 10 States, August 2021-January 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2022, 10.15585/mmwr.mm7104e3
29. Altarawneh H., Chemaitelly H. et al. Effects of Previous Infection and Vaccination on Symptomatic Omicron Infections. *N En J Med*. 2022, 10.1056/NEJMoa2203965
30. Ferrara J L, Abhyankar S. et al. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc*. 1993, 25, 1216–1217
31. Tisonick J. R., Korth M. J. et al. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbil Mol Biol Rev* 2012; 10.1128/MMBR.05015-11
32. Tian S., Hu W. et al. Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *J Thoracic Oncol* 2020; 10.1016/j.jtho.2020.02.010
33. Xu Z., Shi L. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 2020; 10.1016/S2213-2600(20)30076-X
34. Jarczak M., Nierhaus A. Cytokine Storm—Definition, Causes, and Implications. *Int J Mol Sci* 2022; 10.3390/ijms231911740
35. Suntharalingam G., Perry M. R. et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Eng J Med* 2006, 10.1056/NEJMoa063842
36. Wang M., Chang W. Pyroptotic cell death in SARS-CoV-2 infection: revealing its roles during the immunopathogenesis of COVID-19. *Int J Biol Sci* 2022; 10.7150/ijbs.77561
37. Conti-P, Ronconi G et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV- 2): anti-inflammatory strategies. *J Biol Regul Homeost Agents* 2020; 10.23812/CONTI-E

38. Ramatillah D. L., Gan S. H. et al. Impact of cytokine storm on severity of COVID-19 disease in a private hospital in West Jakarta prior to vaccination. *PloS One* 2022; 10.1371/journal.pone.0262438
39. Hermine O., Mariette X. et al. Tocilizumab plus dexamethasone versus dexamethasone in patients with moderate-to-severe COVID-19 pneumonia: A randomised clinical trial from the CORIMUNO-19 study group. *EClinicalMedicine* 2022; 10.1016/j.eclinm.2022.101362
40. Zuo T., Hang F. et al. Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. *Gastroenterology* 2020, 10.1053/j.gastro.2020.05.048
41. Zuo T., Zhan Hui et al. Alterations in fecal fungal microbiome of patients with COVID-19 during time of hospitalization until discharge. *Gastroenterology* 2020, 10.1053/j.gastro.2020.06.048
42. Zuo T., Liu Q. et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut* 2021, 10.1136/gutjnl-2020-322294
43. Gu S., Chen Y. Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis.* 2020, 10.1093/cid/ciaa709
44. Tao W, Zhang G. Analysis of the intestinal microbiota in COVID-19 patients and its correlation with the inflammatory factor IL-18. *Med Microecol.* 2020, 10.1016/j.medmic.2020.100023
45. Bentivegna E., Alessio G. et al. Impact of COVID-19 prevention measures on risk of health care-associated *Clostridium difficile* infection. *Am J Infect Control.* 2021; 10.1016/j.ajic.2020.09.010

46. Lewandowski K., Rosołowski M. et al. Clostridioides difficile infection in coronavirus disease 2019 (COVID-19): an underestimated problem?. Pol Arch Intern Med 2021; 10.20452/pamw.15715
47. Zhang Ch., Shi L. Liver injury in COVID-19: management and challenges. Lancet Gastroenterol Hepatol 2020; 10.1016/S2468-1253(20)30057-1
48. Jothimani D., Venugopal R. COVID-19 and the liver. J. Hepatol 2020; 10.1016/j.jhep.2020.06.006
49. Zhou F., Yu T. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet 2020; 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
50. Arentz M., Yim E.. Characteristics and Outcomes of 21 Critically Ill Patients With COVID-19 in Washington State. JAMA 2020; 10.1001/jama.2020.4326
51. Bhatraju P., Ghassemieh B. et al. Covid-19 in Critically Ill Patients in the Seattle Region - Case Series. N Eng J Med 2020; 10.1056/NEJMoa2004500
52. Wander P., Epstein M. et al. COVID-19 Presenting as Acute Hepatitis. Am. J Gastroenterol 2020; 10.14309/ajg.0000000000000660
53. Faruqui S., Okoli F. et al. Cholangiopathy After Severe COVID-19: Clinical Features and Prognostic Implications. Am J Gastroenterol 2021; 10.14309/ajg.0000000000001264
54. Tian S., Xiong Y.. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. Mod Pathol 2020; 10.1038/s41379-020-0536-x
55. Zhang Y., Xiao M. et al. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19. N Eng J Med 2020, 10.1056/NEJMc2007575

56. Xiang-Hua Y., Le-Min W. Severe acute respiratory syndrome and venous thromboembolism in multiple organs. *AM J Respir Cirt Care Med* 2020, 10.1164/ajrccm.182.3.436
57. Semple J., Italiano J. et al. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011, 10.1038/nri2956
58. Merad M., Martin J. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2020, 10.1038/s41577-020-0331-4
59. Poll T., Veerdonk F. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2017, 10.1038/nri.2017.36
60. Panigada M., Bottino N. et al.. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J Thromb Haemost* 2020, 10.1111/jth.14850
61. Ranucci M., Ballotta A. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *J Thromb Haemost* 2020, 10.1111/jth.14854
62. Maier Ch., Truong A. et al.. COVID-19-associated hyperviscosity: a link between inflammation and thrombophilia?. *Lancet* 2020, 10.1016/S0140-6736(20)31209-5
63. Kolanko E., Senderek T. et al.. Thromboprophylaxis in hospitalized COVID-19 patients: the efficacy and safety of the approved hospital protocol. *Pol Arch Intern Med* 2021, 10.20452/pamw.16102
64. Cheng Y., Luo R et al.. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int* 2020, 10.1016/j.kint.2020.03.005
65. Hirsch J., Ng J et al.. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int* 2020, 10.1016/j.kint.2020.05.006

66. Cummings M., Baldwin M. et al.. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet* 2020, 10.1016/S0140-6736(20)31189-2
67. Martínez-Rojas M.A., Vega-Vega O. et al.. Is the kidney a target of SARS-CoV-2?. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2020, 10.1152/ajprenal.00160.2020
68. Soleimani M., Acute kidney injury in SARS-CoV-2 infection: direct effect of virus on kidney proximal tubule cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 10.3390/ijms21093275
69. Farkash E.A., Wilson A.M. et. al.. Ultrastructural evidence for direct renal infection with SARS-CoV-2. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2020, 10.1681/ASN.2020040432
70. May R. M., Cassol C. et al.. A multi-center retrospective cohort study defines the spectrum of kidney pathology in Coronavirus 2019 Disease (COVID-19). *Kidney Int.* 2021, 10.1016/j.kint.2021.07.015
71. Wu H., Larsen Ch. et al.. AKI and Collapsing Glomerulopathy Associated with COVID-19 and APOL1 High-Risk Genotype. *JASN* 2020, 10.1681/ASN.2020050558
72. Velez J. C., Caza T. et al.. COVAN is the new HIVAN: the re-emergence of collapsing glomerulopathy with COVID-19. *Nat Rev Nephrol* 2020, 10.1038/s41581-020-0332-3
73. Sharma P., Uppal N.N. et al.. COVID-19-associated kidney injury: a case series of kidney biopsy findings. *J Am Soc Nephrol* 2020, 10.1681/ASN.2020050699
74. Ferlicot S., Jamme M. et al.. The spectrum of kidney biopsies in hospitalized patients with COVID-19, acute kidney injury, and/or proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2021, 10.1093/ndt/gfab042
75. Hamming I., Timens W. et al.. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004, 10.1002/path.1570

76. Gallagher P., Ferrario C. et al.. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, 10.1152/ajpheart.00426.2008
77. Fox S., Lameira F. et al.. Cardiac Endotheliitis and Multisystem Inflammatory Syndrome After COVID-19. *Ann Intern Med* 2020, 10.7326/L20-0882
78. Varga Z., Flammer A.J. et al.. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 2020, 10.1016/S0140-6736(20)30937-5
79. Giustino G., Croft L. et al.. Takotsubo Cardiomyopathy in COVID-19. *J Am Col Cardiol* 2020, 10.1016/j.jacc.2020.05.068
80. Repessé X., Vieillard-Baron A., Right heart function during acute respiratory distress syndrome. *Ann Transl Med* 2017, 10.21037/atm.2017.06.66
81. Ullah W., Saeed R. et al.. COVID-19 Complicated by Acute Pulmonary Embolism and Right-Sided Heart Failure. *JACC Casa Rep* 2020, 10.1016/j.jaccas.2020.04.008
82. Modin D., Claggett B., Acute COVID-19 and the Incidence of Ischemic Stroke and Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2020, 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050809
83. Ranard L. S., Ahmad Y. et al.. Clinical Pathway for Management of Suspected or Positive Novel Coronavirus-19 Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Crit Pathw Cardiol* 2020, 10.1097/HPC.0000000000000223
84. Wang D., Hu B. et al.. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020, 10.1001/jama.2020.1585
85. Tsao C. W., Strom J. B. et al.. COVID-19 Associated Stress (Takotsubo) Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Imaging* 2020, 10.1161/CIRCIMAGING.120.011222
86. Zeng J., Liu Y. et al.. First case of COVID-19 complicated with fulminant myocarditis: a case report and insights. *Infection* 2020, 10.1007/s15010-020-01424-5

87. Hu H., Ma F. et al.. Coronavirus fulminant myocarditis treated with glucocorticoid and human immunoglobulin. *Eur Heart J* 2021, 10.1093/eurheartj/ehaa190
88. Tavazzi G., Pellegrini C. et al.. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail* 2020, 10.1002/ejhf.1828
89. Escher F., Pietsch H. et al.. Detection of viral SARS-CoV-2 genomes and histopathological changes in endomyocardial biopsies. *ESC Heart Fail* 2020, 10.1002/ehf2.12805
90. Netland J., Meyerholz D. K. et al.. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Causes Neuronal Death in the Absence of Encephalitis in Mice Transgenic for Human ACE2. *J Virol* 2008, 10.1128/JVI.00737-08
91. Mao L., Jin H. et al.. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* 2020, 10.1001/jamaneurol.2020.1127
92. Kanberg N., Ashton N. J. et al.. Neurochemical evidence of astrocytic and neuronal injury commonly found in COVID-19. *Neurology* 2020, 10.1212/WNL.0000000000010111
93. Tsai L., Hsieh S. et al.. Neurological manifestations in severe acute respiratory syndrome. *Acta Neurol Taiwan* 2005, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16252612/>
94. Pugin D., Vargas M. I. et al.. COVID-19-related encephalopathy responsive to high-dose glucocorticoids. *Neurology* 2020, 10.1212/WNL.0000000000010354
95. Fotuhi M., Mian A. et al.. Neurobiology of COVID-19. *J. Alzheimers Dis* 2020, 10.3233/JAD-200581
96. Landa N., Mendieta-Eckert M. et al.. Chilblain-like lesions on feet and hands during the COVID-19 Pandemic. *Int J Dermatol* 2020, 10.1111/ijd.14937

97. Kanitakis J., Lesort C., et al.. Chilblain-like acral lesions during the COVID-19 pandemic ("COVID toes"): Histologic, immunofluorescence, and immunohistochemical study of 17 cases. *J Am Acad Dermatol*, 10.1016/j.jaad.2020.05.145
98. Piccolo V., Neri I. et al.. Chilblain-like lesions during COVID-19 epidemic: a preliminary study on 63 patients. *J Eur Dermatol Venerol* 2020, 10.1111/jdv.16526
99. Soriano J. B., Murthy S., A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. *Lancet Infect Dis* 2022, 10.1016/S1473-3099(21)00703-9
100. Carfi A., Bernabei R. et al.. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA* 2020, 10.1001/jama.2020.12603
101. Hall J., Myall K. et al.. Identifying patients at risk of post-discharge complications related to COVID-19 infection. *Thorax* 2021, 10.1136/thoraxjnl-2020-215861
102. Halpin S. J., McIvor C. et al.. Postdischarge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: A cross-sectional evaluation. *J Med Virol* 2021, 10.1002/jmv.26368
103. Huang Ch., Huang L.. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet* 2021, 10.1016/S0140-6736(20)32656-8
104. Xiong Q., Xu M. et al.. Clinical sequelae of COVID-19 survivors in Wuhan, China: a single-centre longitudinal study. *Clin Microbiol Infect* 2021, 10.1016/j.cmi.2020.09.023
105. Rogers J. P., Chesney E.. Psychiatric and neuropsychiatric presentations associated with severe coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis with comparison to the COVID-19 pandemic. *Lancet Psychiatry* 2020, 10.1016/S2215-0366(20)30203-0
106. Havervall S., Rosell A. et al.. Symptoms and Functional Impairment Assessed 8 Months After Mild COVID-19 Among Health Care Workers. *JAMA* 2021, 10.1001/jama.2021.5612

107. Ai T., Yang Z. et al.. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology* 2020, 10.1148/radiol.2020200642
108. Guillo E., Gomez I. B. et al.. COVID-19 pneumonia: Diagnostic and prognostic role of CT based on a retrospective analysis of 214 consecutive patients from Paris, France. *Eur J Radiol* 2020, 10.1016/j.ejrad.2020.109209
109. Prakash J., Kumar N. et al.. Computed tomography severity score as a predictor of disease severity and mortality in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *J Med Imaging Radiat Sci* 2023, 10.1016/j.jmir.2023.02.003
110. Li K., Wu J. et al.. The Clinical and Chest CT Features Associated With Severe and Critical COVID-19 Pneumonia. *Invest Radiol* 2020, 10.1097/RLI.0000000000000672
111. Lessmann N., Sanchez C. I. et al.. Automated Assessment of CO-RADS and Chest CT Severity Scores in Patients with Suspected COVID-19 Using Artificial Intelligence. *Radiology* 2020, 10.1148/radiol.2020202439
112. Horby P., Lim W. S. et al.. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021, 10.1056/NEJMoa2021436
113. Sterne J. A., Murthy S. et al.. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. *Jama* 2020, 10.1001/jama.2020.17023
114. RECOVERY Collaborative Group, Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* 2021, 10.1016/S0140-6736(21)00676-0
115. COVID-19 Treatment Guidelines [Internet]. Hospitalized Adults: Therapeutic Management | COVID-19 Treatment Guidelines. [cytowane 17 marca 2024]. Dostępny w: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/management/clinical-management-of-adults/hospitalized-adults--therapeutic-management/>
116. Guimarães P. O., Quirk D. et al.. Tofacitinib in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med* 2021, 10.1056/NEJMoa2101643

117. Beigel J. H., Tomashek K. M. et al.. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Eng J Med* 2020, 10.1056/NEJMoa2007764
118. Pan H. Peteo R et al.. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 - Interim WHO Solidarity Trial Results. *N Eng J Med* 2021, 10.1056/NEJMoa2023184
119. Siemieniuk R. A., Bartoszko J. J. et al.. Drug treatments for covid-19: living systematic review and network meta-analysis. *BMJ* 2020, 10.1136/bmj.m2980
120. Bernal A. J., Gomes da Silva M. M. et al.. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Eng J Med* 2022, 10.1056/NEJMoa2116044
121. Levin M. J., Ustianowski A. et al.. LB5. PROVENT: Phase 3 Study of Efficacy and Safety of AZD7442 (Tixagevimab/Cilgavimab) for Pre-exposure Prophylaxis of COVID-19 in Adults. *Open Forum Infect Dis* 2021, 10.1093/ofid/ofab466.1646
122. Syed Y. Y., Regdanvimab: First Approval. *Drugs* 2021, 10.1007/s40265-021-01626-7
123. Razonable R. R., Pawlowski C. et al.. Casirivimab-Imdevimab treatment is associated with reduced rates of hospitalization among high-risk patients with mild to moderate coronavirus disease-19. *EclinicalMedicine* 2021, 10.1016/j.eclinm.2021.101102
124. Tang N., Bai H. et al.. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost* 2020, 10.1111/jth.14817
125. Lopes R. D., Barros E Silva P. G. M. et al.. Therapeutic versus prophylactic anticoagulation for patients admitted to hospital with COVID-19 and elevated D-dimer concentration (ACTION): an open-label, multicentre, randomised, controlled trial. *Lancet* 2021, 10.1016/S0140-6736(21)01203-4
126. Spyropoulos A. C., Goldin M. et al.. Efficacy and Safety of Therapeutic-Dose Heparin vs Standard Prophylactic or Intermediate-Dose Heparins for Thromboprophylaxis in High-risk Hospitalized Patients With COVID-19: The HEP-COVID Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med* 2021, 10.1001/jamainternmed.2021.6203
127. Schulman S., Sholzberg M. et al.. ISTH guidelines for antithrombotic treatment in COVID-19. *J Thromb Haemost* 2022, 10.1111/jth.15808
128. Kontzias A., Kotlyar A. et al.. Jakinibs: A New Class of Kinase Inhibitors in Cancer and Autoimmune Disease. *Curr Opin Pharmacol* 2012, 10.1016/j.coph.2012.06.008
129. Murtha L. A., Morten M. et al.. The Role of Pathological Aging in Cardiac and Pulmonary Fibrosis. *Aging Dis* 2019, 10.14336/AD.2018.0601

130. Kumar V., Cotran R. S., Robbins S. L.. Robbins Patologia, wydanie I polskie s.74-83, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2005
131. American Hemical Society 2018 [Internet] [cytowane 03 marca 2024]. Dostępny w: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/h/hyaluronic-acid.html>
132. Volpi N., Schiller J. et al.. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem* 2009, 10.2174/092986709788186138
133. Toole B. P.. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004, 10.1038/nrc1391
134. Fraser J. R., Laurent T.C. et al.. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997, 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x
135. Rügheimer L.. Hyaluronan: A matrix component. *Proc AIP Conf* 2008, 10.1063/1.2998008
136. Johnson P., Arif A. A. et al.. Hyaluronan and Its Interactions With Immune Cells in the Healthy and Inflamed Lung. *Front Immunol* 2018, 10.3389/fimmu.2018.02787
137. Poon G.F., Dong Y. et al.. Hyaluronan binding identifies a functionally distinct alveolar macrophagelike population in bone marrow-derived dendritic cell cultures. *J Immunol* 2015, 10.4049/jimmunol.1402506
138. Lee B.M., Park S. J. et al.. The effects of the molecular weights of hyaluronic acid on the immune responses. *Biomater Res* 2021, 10.1186/s40824-021-00228-4
139. Panasyuk A., Frati E. et al.. Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans. *Free Radic Biol Med* 1994. 10.1016/0891-5849(94)90139-2

140. Moseley R., Waddington R. J. et al.. Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1997, 10.1016/s0925-4439(97)00083-5
141. Ontong P., Prachayasittikul V.. Unraveled roles of hyaluronan in severe COVID-19. *EXCLI J* 2021, 10.17179/excli2020-3215
142. Nilsson S. K., Haylock D. N. et al.. Hyaluronan is synthesized by primitive hemopoietic cells, participates in their lodgment at the endosteum following transplantation, and is involved in the regulation of their proliferation and differentiation in vitro. *Blood* 2003, 10.1182/blood-2002-05-1344
143. Calabro A., Oken M. M. et al.. Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. *Blood* 2002, 10.1182/blood-2002-01-0030
144. Zhu H., Mitsuhashi N. et al.. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells* 2006, 10.1634/stemcells.2005-0186
145. Noble P. W., Liang J. et al.. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiol Rev* 2011, 10.1152/physrev.00052.2009
146. Gelse K., Poschl E. et al.. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *ADV Drug Rev* 2003, 10.1016/j.addr.2003.08.002
147. Debelle L., Tamburro A. M.. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 10.1016/s1357-2725(98)00098-3
148. Whiteman P., Hutchinson S. et al.. Fibrillin-1 misfolding and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006, 10.1089/ars.2006.8.338

149. Zollinger A., Smith M. L.. Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol* 2017, 10.1016/j.matbio.2016.07.011
150. Odenthal U., Haehn S. et al.. Molecular analysis of laminin N-terminal domains mediating self-interactions. *J Biol Chem* 2004, 10.1074/jbc.M402455200
151. Colognato H., Yurchenco P. D.. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 2000, 10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<213::AID-DVDY1>3.0.CO;2-R
152. Bachmann M., Kukkurainen S. et al.. Cell Adhesion by Integrins. *Physiol Rev* 2019, 10.1152/physrev.00036.2018
153. Pangfei L., Takai K.. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Prospect Biol* 2011, 10.1101/cshperspect.a005058
154. Somerville R. P., Oblander S. et al.. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003, 10.1186/gb-2003-4-6-216
155. Brew K, Dinakarpanian D. et al.. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000, 10.1016/s0167-4838(99)00279-4
156. Inui S., Fujikawa A. et al., Chest CT Findings in Cases from the Cruise Ship Diamond Princess with Coronavirus Disease (COVID-19). *Radiol Cardiothoracic Imaging* 2020, 10.1148/ryct.2020200110
157. Crystal R. G., Bitterman P. B. et al.. Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (first of two parts). *N Engl J Med* 1984, 10.1056/NEJM198401193100304
158. Han X., Fan Y. et al.. Six-month Follow-up Chest CT Findings after Severe COVID-19 Pneumonia. *Radiology* 2021, 10.1148/radiol.2021203153
159. Morin L., Laurent S. et al.. Four-Month Clinical Status of a Cohort of Patients After Hospitalization for COVID-19. *JAMA* 2021, 10.1001/jama.2021.3331

160. Polak S. B., Gool I. C. et al.. A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression. *Med Pathol* 2020, 10.1038/s41379-020-0603-3
161. Crook H., Raza S. et al.. Long covid-mechanisms, risk factors, and management. *BMJ* 2021, 10.1136/bmj.n1648
162. Bass A., Liu Y. et al.. Single-Cell and Bulk RNASeq Profiling of COVID-19 Patients Reveal Immune and Inflammatory Mechanisms of Infection-Induced Organ Damage. *Viruses* 2021, 10.3390/v13122418
163. Weckbach L. T., Curta A. et al.. Myocardial Inflammation and Dysfunction in COVID-19-Associated Myocardial Injury. *Circ Cardiovasc Imaging* 2021, 10.1161/CIRCIMAGING.120.011713
164. Vitiello A., Ferrara F.. Pharmacological agents to therapeutic treatment of cardiac injury caused by Covid-19. *Life Sci* 2020, 10.1016/j.lfs.2020.118510
165. Castera L.. Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. *Gastroenterology* 2012, 10.1053/j.gastro.2012.02.017
166. Herrera J., Henke C. A. et al.. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J Clin Invest* 2018, 10.1172/JCI93557
167. Mort-J. S., Buttle D. J.. The use of cleavage site specific antibodies to delineate protein processing and breakdown pathways. *Mol Pathol* 1999, 10.1136/mp.52.1.11
168. Jenkins R. G., Simpson J. K. et al.. Longitudinal change in collagen degradation biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the prospective, multicentre PROFILE study. *Lancet Respir Med* 2015, 10.1016/S2213-2600(15)00048-X

169. Organ L. A., Duggan A. M., et al.. Biomarkers of collagen synthesis predict progression in the PROFILE idiopathic pulmonary fibrosis cohort. *Respir Res* 2019, 10.1186/s12931-019-1118-7
170. Kristensen J. H., Larsen L. et al.. Levels of circulating MMP-7 degraded elastin are elevated in pulmonary disorders. *Clin Biochem* 2015, 10.1016/j.clinbiochem.2015.07.009
171. Leeming D. J., Sand J. M. et al.. Serological investigation of the collagen degradation profile of patients with chronic obstructive pulmonary disease or idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomark Insights* 2012, 10.4137/BMI.S9415
172. Juhl P., Bay-Jensen A. C. et al.. Serum biomarkers of collagen turnover as potential diagnostic tools in diffuse systemic sclerosis: A cross-sectional study. *PloS One* 2018, 10.1371/journal.pone.0207324
173. Wright J. R.. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 2005, 10.1038/nri1528
174. Voorhout W. F., Veenendaal T. et al.. Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992, 10.1177/40.10.1527377
175. Maher M. T., Oballa E. et al.. An epithelial biomarker signature for idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the multicentre PROFILE cohort study. *Lancet Respir Med* 2017, 10.1016/S2213-2600(17)30430-7
176. Tran A., Hastier P. et al.. Non invasive prediction of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2000 Jun-Jul;24(6-7):626-30
177. Kaur N., Goyal G. et al.. Potential role of noninvasive biomarkers during liver fibrosis. *World J Hepatol* 2021, 10.4254/wjh.v13.i12.1919

178. Naveau S., Raynard B. et al.. Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005, 10.1016/s1542-3565(04)00625-1
179. Pares A., Deulofeu R. et al.. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996, 10.1002/hep.510240615
180. Saitou Y., Shiraki K. et al.. Noninvasive estimation of liver fibrosis and response to interferon therapy by a serum fibrogenesis marker, YKL-40, in patients with HCV-associated liver disease. *World J Gastroenterol* 2005, 10.3748/wjg.v11.i4.476
181. Geramizadeh B., Janfeshan K. et al.. Serum Hyaluronic Acid as a Noninvasive Marker of Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis B. *Saudi J Gastroenterol* 2008, 10.4103/1319-3767.43274
182. Lydatakis H., Hager I. P. et al.. Non-invasive markers to predict the liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006, 10.1111/j.1478-3231.2006.01312.x
183. Nyberg A., Lindqvist U. et al.. Serum hyaluronan and aminoterminal propeptide of type III procollagen in primary biliary cirrhosis: relation to clinical symptoms, liver histopathology and outcome. *J Intern Med* 1992, 10.1111/j.1365-2796.1992.tb00964.x
184. Davut A., Sehmus O.. Hyaluronic Acid as New Biomarker to Differentiate Acute Kidney Injury From Chronic Kidney Disease. *Iran J Kidney Dis* 2017, Nov;11(6):409-413
185. Guechot J., Poupon R. E. et al.. Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J Hepatol* 1994, 10.1016/s0168-8278(94)80013-8
186. Walsh K. M., Fletcher A. et al.. Basement membrane peptides as markers of liver disease in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000, 10.1016/s0168-8278(00)80079-3

187. Korner T., Kropf J. et al.. Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value. *J Hepatol* 1996, 10.1016/s0168-8278(96)80239-x
188. Volck B., Price P. A. et al.. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicans* 1998 Jul-Aug;110(4):351-60
189. Johansen J. S., Stoltenberg M. et al.. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology* 1999, 10.1093/rheumatology/38.7.618
190. Olsson B., Lautner R et al.. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2016, 10.1016/S1474-4422(16)00070-3
191. Johansen J. S., Jensen B. V. et al.. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, 10.1158/1055-9965.EPI-05-0011
192. Zhou J., Deng Y.. Serum platelet-derived growth factor BB levels: a potential biomarker for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2016, 10.1016/j.ijid.2016.06.004
193. Yoshida Sh., Ikenaga N. et al.. Extrahepatic platelet-derived growth factor- β , delivered by platelets, promotes activation of hepatic stellate cells and biliary fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2014, 10.1053/j.gastro.2014.08.038
194. Pinzani M., Marra F.. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001, 10.1055/s-2001-17554
195. Harada K., Shiota G. et al.. Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver* 1999, 10.1111/j.1478-3231.1999.tb00056.x

196. Pilecki B., Holm A. T. et al.. Characterization of Microfibrillar-associated Protein 4 (MFAP4) as a Tropoelastin- and Fibrillin-binding Protein Involved in Elastic Fiber Formation. *J Biol Chem* 2016, 10.1074/jbc.M115.681775
197. Mölleken Ch., Sitek B. et al.. Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis. *Hepatology* 2009, 10.1002/hep.22764
198. Galuz R., Włodarski K.. Znaczenie cytokeratyn w rozpoznawaniu chorób nowotworowych. *Pol. Merkuriusz Lek.*, 2007, 23 (135): 209-211.
199. Shi Y., Sun S. et al.. Keratin 18 phosphorylation as a progression marker of chronic hepatitis B. *Virology* 2010, 10.1186/1743-422X-7-70
200. Chu P. G., Weiss L. M.. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002, 10.1046/j.1365-2559.2002.01387.x
201. Kwok R., Tse Y. K. et al.. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease - the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther* 2014, 10.1111/apt.12569
202. Cusi K., Chang Z. et al.. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2014, 10.1016/j.jhep.2013.07.042
203. Nielsen M. J., Kazankov K. et al.. Markers of Collagen Remodeling Detect Clinically Significant Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients. *PLoS One* 2015, 10.1371/journal.pone.0137302. eCollection 2015
204. Gressner O. A., Weiskirchen et al.. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 2007, 10.1016/j.cca.2007.02.038

205. Jarcuska P., Janicko M. et al.. Circulating markers of liver fibrosis progression. *Clin Chim Acta* 2010, 0.1016/j.cca.2010.04.009
206. Ding Y., Wang Y. et al.. Roles of Biomarkers in Myocardial Fibrosis. *Aging Dis* 2020, 10.14336/AD.2020.0604
207. Nallagangula K. S., Nagaraj Sh. K. et al.. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Sci OA* 2017, 10.4155/fsoa-2017-0083
208. Boer R. A., Veldhuisen D. J. et al.. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med* 2012, 10.1111/j.1365-2796.2011.02476.x
209. Sun J.. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells. *J Signal Transduct* 2010, 10.1155/2010/985132
210. Frébourg T., Delpech B. et al.. Serum hyaluronate in liver diseases: study by enzymeimmunoassay. *Hepatology* 1986, 10.1002/hep.1840060310
211. Kuipers H. F., Rieck M. et al.. Hyaluronan synthesis is necessary for autoreactive T-cell trafficking, activation, and Th1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, 10.1073/pnas.1525086113
212. Bjermer L., Lundgren R. et al.. Hyaluronan and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1989, 10.1136/thx.44.2.126
213. Guéchet J., Loria A. et al.. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of alpha-interferon therapy. *J Hepatol* 1995, 10.1016/0168-8278(95)80255-x

214. Orasan O. H., Ciulei G. et al.. Hyaluronic acid as a biomarker of fibrosis in chronic liver diseases of different etiologies. *Clujul Med* 2016, 10.15386/cjmed-554
215. Geramizeadeh B., Janefashan K. et al.. Serum Hyaluronic Acid as a Noninvasive Marker of Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis B. *Saugi J Gastroenterol* 2008, 10.4103/1319-3767.43274
216. Liang J., Jiang D. et al.. Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in human asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 10.1016/j.jaci.2011.04.006
217. Aytekin M., Comhair S. A. A., et al.. High levels of hyaluronan in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 10.1152/ajplung.90306.2008
218. Kessler S., Rho H. et al.. Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clin Transl Sci* 2008, 10.1111/j.1752-8062.2008.00025.x
219. Cylwik B., E. Gruszewska et al.. Comparison of hyaluronic acid in patients with rheumatoid arthritis, systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Biochem Med (Zagreb)* 2021, 10.11613/BM.2021.020701
220. Atkin D, Ozmen S. et al.. Hyaluronic Acid as a New Biomarker to Differentiate Acute Kidney Injury From Chronic Kidney Disease. *Iran J Kidney Dis* 2017 Nov;11(6):409-413.
221. Su Y., Gu H. et al.. Association of serum levels of laminin, type IV collagen, procollagen III N-terminal peptide, and hyaluronic acid with the progression of interstitial lung disease. *Medicine (Baltimore)* 2017, 10.1097/MD.00000000000006617
222. Rajpal S., Tong M. S. et al.. Cardiovascular Magnetic Resonance Findings in Competitive Athletes Recovering From COVID-19 Infection. *JAMA Cardiol.* 2021, 10.1001/jamacardio.2020.4916

223. Huang L, Zhao P. et al.. Cardiac Involvement in Patients Recovered From COVID-2019 Identified Using Magnetic Resonance Imaging. *JACC Cardiovasc Imaging* 2020, 10.1016/j.jcmg.2020.05.004
224. Kolesova O., Vanaga I. et al.. Intriguing findings of liver fibrosis following COVID-19. *BMC Gastroenterol.* 2021, 10.1186/s12876-021-01939-7
225. Salamanna-F., Maglio M. et al.. Body Localization of ACE-2: On the Trail of the Keyhole of SARS-CoV-2. *Front Med (Lausanne)* 2020, 10.3389/fmed.2020.594495
226. Hellman U., Karlsson M. G. et al.. Presence of hyaluronan in lung alveoli in severe Covid-19: An opening for new treatment options?. *J Biol Chem* 2020, 10.1074/jbc.AC120.015967
227. Al-Kuraishy H. M., Batiha G. et al.. Pirfenidone and post-Covid-19 pulmonary fibrosis: invoked again for realistic goals. *Inflammopharmacology* 2022, 10.1007/s10787-022-01027-6
228. Youwei B., Rekić D. et al.. A disease progression model of longitudinal lung function decline in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2021, 10.1007/s10928-020-09718-9
229. Taniguchi H., Ebina M. et al.. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2010, 10.1183/09031936.00005209
230. Salvi S. S., Ghorpade D. et al.. Role of antifibrotic drugs in the management of post-COVID-19 interstitial lung disease: A review of literature and report from an expert working group. *Lung India* 2022, 10.4103/lungindia.lungindia_659_21
231. George P., Wells A. et al.. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. *Lancet Respir Med* 2020, 10.1016/S2213-2600(20)30225-3
232. Shi Y. L., Deng X. L. et al., The relationship of lung fibrosis with serum level of HA, P III NP of SARS. *Chin J Microbiol* 2004, 24(6):467-469
233. Queisser-K. A., Mellema R. A., et al.. COVID-19 generates hyaluronan fragments that directly induce endothelial barrier dysfunction. *JCI Insight* 2021, 10.1172/jci.insight.147472
234. Yang S., Ling Y. et al.. Hymecromone: a clinical prescription hyaluronan inhibitor for efficiently blocking COVID-19 progression. *Signal Transduct Target Ther* 2022, 10.1038/s41392-022-00952-w
235. Brusa S., Terracciano D. et al.. Circulating tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) at COVID-19 onset predicts severity status. *Front Med (Lausanne)* 2022, 10.3389/fmed.2022.1034288
236. Rubio-Rivas M., Mora-Laujan J. M. et al.. WHO Ordinal Scale and Inflammation Risk Categories in COVID-19. Comparative Study of the Severity Scales, *J Gen Intern Med* 2022, 10.1007/s11606-022-07511-7
237. Amin B. J., Kakamad F. H. et al.. Post COVID-19 pulmonary fibrosis; a meta-analysis study. *Ann Med Surg(Lond)* 2022, 10.1016/j.amsu.2022.103590

238. Donlan A. N., Sutherland T. E., et al.. IL-13 is a driver of COVID-19 severity. *JCI Insight* 2021, 10.1172/jci.insight.150107
239. Tay M. Z., Poh C. M. et al.. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020, 10.1038/s41577-020-0311-8
240. Sun Y., Dong Y. et al.. Characteristics and prognostic factors of disease severity in patients with COVID-19: The Beijing experience. *J Autoimmun* 2020, 10.1016/j.jaut.2020.102473
241. Guan W.J., Liang W. H. et al.. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J* 2020, 10.1183/13993003.00547-2020
242. Singh Sh., Khan A.. Clinical Characteristics and Outcomes of Coronavirus Disease 2019 Among Patients With Preexisting Liver Disease in the United States: A Multicenter Research Network Study. *Gastroenterology* 2020, 10.1053/j.gastro.2020.04.064
243. Ng J. H., Hirsch J. S., et al.. Outcomes of patients with end-stage kidney disease hospitalized with COVID-19. *Kidney Int* 2020, 10.1016/j.kint.2020.07.030
244. Southern B.. Patients with interstitial lung disease and pulmonary sarcoidosis are at high risk for severe illness related to COVID-19. *Cleve Clin J Med* 2020, 10.3949/ccjm.87a.ccc026
245. Meyts I., Buccioli G. et al.. Coronavirus disease 2019 in patients with inborn errors of immunity: An international study. *J Allergy Clin Immunol* 2021, 10.1016/j.jaci.2020.09.010
246. Bernal J., Andrews N. et al.. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *NEJM* 2021, 10.1056/NEJMoa2108891
247. Zhang G., Zhang L et al.. A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (nGRE) in the human interleukin-1beta gene. *DNA Cell Biol* 1997, 10.1089/dna.1997.16.145
248. Almawi W. Y., Beyhum H. N. et al.. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 1996, 10.1002/jlb.60.5.563
249. Chakir J., Shannon J. et al.. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 10.1067/mai.2003.1557
250. Lanser L., Fuchs D. et al.. Physiology and Inflammation Driven Pathophysiology of Iron Homeostasis-Mechanistic Insights into Anemia of Inflammation and Its Treatment. *Nutrients* 2021, 10.3390/nu13113732

251. Weiss G., Ganz T. et al.. Anemia of inflammation. *Blood* 2019, 10.1182/blood-2018-06-856500
252. Bellmann-Weiler R., Lancer L. et al.. Prevalence and Predictive Value of Anemia and Dysregulated Iron Homeostasis in Patients with COVID-19 Infection. *J Clin Med*, 10.3390/jcm9082429
253. Al-Kuraishy H. M., Al-Gareeb A. I. et al.. Hemolytic anemia in COVID-19. *Ann Hematol* 2022, 10.1007/s00277-022-04907-7
254. Cai Q., Huang D., Yu H. et al.. COVID-19: Abnormal liver function tests. *J Hepatol* 2020, 10.1016/j.jhep.2020.04.006
255. Wijarnpreecha K., Ungprasert P. et al.. COVID-19 and liver injury: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepato* 2021,10.1097/MEG.0000000000001817
256. Zhang X., Yu Y., Zhang C. et al.. Mechanism of SARS-CoV-2 Invasion into the Liver and Hepatic Injury in Patients with COVID-19. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2022, 10.4084/MJHID.2022.003
257. Anirvan P., Narain S. et al.. Cytokine-induced liver injury in coronavirus disease-2019 (COVID-19): untangling the knots. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2021, 10.1097/MEG.0000000000002034
258. Cai Y., Ye L. P. et al.. Liver injury in COVID-19: Detection, pathogenesis, and treatment. *World J Gastroenterol* 2021 10.3748/wjg.v27.i22.3022
259. Zhai G., Le M. et al.. Drug-Induced Liver Disturbance During the Treatment of COVID-19. *Front Pharmacol* 2021, 10.3389/fphar.2021.719308
260. Awad M, Al-Hussaniy H. A. et al.. The role of COVID-19 in myopathy: incidence, causes, treatment, and prevention. *J Med Life* 2022, 10.25122/jml-2022-0167