

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Sütő Renáta

**Új laboratóriumi biomarkerek prognosztikai szerepének vizsgálata
súlyos COVID-19 betegségben**

**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2025**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Új laboratóriumi biomarkerek prognosztikai szerepének vizsgálata
súlyos COVID-19 betegségben**

Dr. Sütő Renáta

Témavezető: Dr. Nagy Béla



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	1
2	Bevezetés	4
3	Irodalmi áttekintés	7
3.1	A COVID-19 betegség etiológiája, tünettana, rizikófaktorai és laboratóriumi diagnózisa ...	7
3.2	A COVID-19 betegség klinikai manifesztációja	9
3.3	A SARS-CoV-2 fertőzés molekuláris patomechanizmusa	11
3.4	Az ACE2 szerepe a COVID-19 betegség lezajlásában	13
3.5	A HE4 protein mérésének lehetséges szerepe COVID-19 kórképben	16
3.6	Az endothelsejt diszfunkció kialakulása és molekuláris karakterisztikája súlyos COVID-19 betegségben	17
3.7	Az LDH izoenzimek aktivitásának lehetséges eltérése COVID-19 betegségben	19
4	Célkitűzések	20
4.1	A szolubilis ACE2 aktivitás változásának vizsgálata súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek kimenetelével összefüggésben	20
4.2	A pulmonális gyulladásos biomarker HE4 szérumszintjének vizsgálata eltérő súlyosságú COVID-19 pneumoniában szenvedő betegekben	21
4.3	Endothelsejt diszfunkciót és a vérlemezke aktivációt jellemző biomarkerek koncentrációjának vizsgálata súlyos COVID-19-ben	21
4.4	Az LDH egyes izoenzimjeinek vizsgálata enyhe/közepesen súlyos és súlyos COVID-19 betegségben	22
5	Anyagok és módszerek	23
5.1	Betegek és kontrollok	23
5.2	Vizsgálati módszerek	25
5.3	Statisztikai számítások	27
6	Eredmények	28
6.1	A szolubilis ACE2 aktivitás súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegekben jól korrelál a kórkép súlyosságával, valamint képes előrejelezni a várható kimenetelt	28
6.1.1	A vizsgálatban résztvevő súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek demográfiai és anamnesztikus jellemzői	28
6.1.2	A kórházi felvételnél mért ACE2 szérumszint és a COVID-19 betegség súlyossága közötti kapcsolat	30
6.1.3	Az ACE2 szint változása a kórházi kezelés alatt a kritikus állapotú és a súlyos COVID-19 betegségben szenvedők körében	31
6.1.4	Az összefüggés keresése a szolubilis ACE2 és a COVID-19 betegség kimenetele között	32
6.1.5	A kiindulási szolubilis ACE2 aktivitás elemzése a COVID-19 betegség klinikai manifesztációjának súlyosságának és a betegség kimenetelének előrejelzésére	33
6.1.6	A kóros Horowitz-index és szérumszint ACE2 szint relációja súlyos COVID-19 betegségben	34

6.1.7	<i>A 30 napos mortalitás előrejelzése a kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegekben a kiindulási ACE2 szérumaktivitása alapján</i>	35
6.2	<i>A HE4 megemelkedett szérumszintje képes előrejelezni a COVID-19 tünetek súlyosságát és a betegség mortalitását</i>	37
6.2.1	<i>A klinikai vizsgálatba bevont betegcsoportok legfontosabb demográfiai jellemzői</i>	37
6.2.2	<i>A magas kiindulási szérum HE4 szint erős korrelációt mutat a COVID-19 súlyos klinikai manifesztációival</i>	39
6.2.3	<i>A HE4 szérumszint változása kedvező és kedvezőtlen kimenetelt mutató COVID-19 betegek esetében</i>	42
6.2.4	<i>A kiindulási HE4 szint hatékonyan prediktálja a kimenetelt és a klinikai tünetek várható súlyosságát COVID-19 betegségben</i>	42
6.2.5	<i>A magas kiindulási HE4 szérumszint alkalmazása COVID-19 kórképben szenvedő betegek 30 napon belüli mortalitás valószínűségének meghatározásában</i>	44
6.3	<i>Az endothelsejt diszfunkcióval és thrombocyta aktivációval jellemzésére alkalmas biomarkerek szérumszint vizsgálata súlyos COVID-19 betegekben</i>	45
6.3.1	<i>Az endothelsejt biomarker-vizsgálatban résztvevő COVID-19 betegek demográfiai és klinikai jellemzése</i>	46
6.3.2	<i>A magas kiindulási VCAM-1, ACE2 és az endothelsejt diszfunkció mértékének kapcsolata súlyos COVID-19 betegségben</i>	47
6.3.3	<i>Alkalmas lehet-e a kórházi kezelést megelőzően mért szolubilis VCAM-1, E-selectin és ACE2 szérumszint a kedvezőtlen kimenetellel fenyegető COVID-19 betegség korai felismerésére?</i>	49
6.3.4	<i>A 30 napon belüli mortalitás előrejelzése az emelkedett kiindulási VCAM-1 és ACE2 szérumszintek alapján súlyos COVID-19 kórképben szenvedő betegek esetében</i>	50
6.4	<i>Az LDH izoenzimek vizsgálata COVID-19 betegségben</i>	51
6.4.1	<i>A vizsgálatba beválogatott betegek klinikai jellemzői</i>	51
6.4.2	<i>A szérum össz LDH aktivitás és a rutin laboratóriumi markerek szintjének változása súlyos és enyhe/közepesen súlyos COVID-19 betegekben</i>	52
6.4.3	<i>Az egyes LDH izoenzimek aktivitás mintázata COVID-19 betegség okozta pneumóniában</i>	54
7	<i>Megbeszélés</i>	56
8	<i>Összefoglalás</i>	68
9	<i>Summary</i>	69
10	<i>Irodalomjegyzék</i>	71

1 Rövidítések jegyzéke

ACCP	American College of Chest Physicians
ACE	Angiotensin-converting enzyme (Angiotenzin konvertáló enzim)
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2 (Angiotenzin konvertáló enzim 2)
ADAM17	A disintegrin and metalloproteinase 17
ADH	Antidiuretic hormone (Antidiuretikus hormon)
Ang 1-7	Angiotensin 1-7 (Angiotenzin 1-7)
Ang 1-9	Angiotensin 1-9 (Angiotenzin 1-9)
A-IPC	Absolute immature platelet count (Éretlen vérlemezke abszolút szám)
ALT	Alanine aminotransferase (Alanin-aminotranszferáz)
APACHE II-score	„Acute physiology and chronic health evaluation” pontrendszer
AST	Aspartate transferase (Aszpartát-transzferáz)
Ang I	Angiotensin I (Angiotenzin I)
Ang II	Angiotensin II (Angiotenzin II)
AT1R	Angiotensin type 1 receptor (Angiotenzin receptor 1)
AT2R	Angiotensin type 2 receptor (Angiotenzin receptor 2)
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AUC	Area under the curve (Görbe alatti terület)
BAL	Bronchoalveolar lavage
BAU	Binding antibody unit (Kötődő antitest egység)
BKB1R	Bradykinin Receptor B1
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CK	Creatinine kinase (Kreatinin-kináz)
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
COVID-19	Coronavirus Disease-19

CRP	C-reactive protein (C-reaktív protein)
cTnT/I	Cardiac troponin T/I (Kardiális troponin T/I)
eGFR	Estimated glomerular filtration rate (Becsült glomerulációs filtrációs ráta)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FiO ₂	Fraction of Inspired Oxygen (Belélegzett O ₂ frakció)
GGO	Ground-glass opacity (Tejüvegszerű homály)
HDL	High density lipoprotein (Magas denzitású lipoprotein)
HE4	Human epididymis protein 4
ICAM-1	Intercellular cell adhesion protein-1
Ig	Immunoglobulin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
INF- γ	Interferon- γ
IQR	Interquartile range (Interkvartilis tartomány)
LDH	Lactate-dehydrogenase (Laktát-dehidrogenáz)
LDL	Low density lipoprotein (Alacsony denzitású lipoprotein)
Lp-PLA ₂	Lipoprotein-associated phospholipase A ₂
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MasR	Mitochondrial assembly receptor
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
MPV	Mean platelet volume (Átlagos vérlemezke térfogat)
NAAT	Nucleic Acid Amplification Test
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NLR	Neutrophil/lymphocyte ratio
NO	Nitrogen-oxide
NT-pro-BNP	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
OR	Odds ratio (Valószínűségi ráta)

PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAI-2	Plasminogen activator inhibitor-2
PaO ₂	Arterial partial pressure of oxygen (Artériás oxigén parciális nyomás)
PCT	Procalcitonin
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAAS	Renin-angiotensin-aldosterone system
RBD	Receptor-binding domain
RNS	Ribonukleinsav
ROC-görbe	„Receiver operating characteristic”-görbe
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2
SCCM	Society of Critical Care Medicine Consensus
SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor
SOFA-score	„Sequential Organ Failure Assessment” pontrendszer
SpO ₂	Perifériás O ₂ szaturáció
TF	Tissue factor (szöveti faktor)
TGF-β	Transforming growth factor-β
TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIDD	Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction
vWF	von Willebrand factor
WAP	Whey acidic protein
WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

2 Bevezetés

A COVID-19 (Coronavirus Disease-19) az ún. „Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2” (SARS-CoV-2) bétakoronavírus által okozott légúti megbetegedés, ami potenciálisan bármely szerv diszfunkcióját okozhatja, és akár súlyos szisztémás kórképpé teljedhet ki [1]. Az első eseteket 2019 novemberében észlelték Kína Wuhan tartományában. Néhány hónap leforgása alatt pandémiává nőtte ki magát, és gyakorlatilag a világ összes országában korábban sohasem tapasztalt egészségügyi katasztrófavhelyzetet okozott [2]. Jelenlegi ismereteink szerint eddig világszerte 776,3 millió igazolt fertőzésért és több, mint 7 millió halálesetért tehető felelőssé a vírus [3]. Bár a fertőzöttek többségénél a kórlefolyás csak enyhe felső légúti tünetekkel zajlott vagy az érintettek akár teljesen tünetmentesek voltak, ugyanakkor a betegek kb. 14%-ában súlyos, 5%-ukban pedig kritikus klinikai állapotot eredményező többszervi elégtelenség alakult ki [4].

Az első terápiás kudarcok komoly zavarodottságot okoztak a kórházi kezelést igénylő tüdőgyulladásos esetek kezelése során az intenzív terápiával foglalkozó szakemberek körében, hiszen a korábban sikeresen kezelt, hasonlóan súlyos légzési elégtelenséget eredményező bakteriális és virális kórképekkel szemben a COVID-19 pneumoniában szenvedő betegek kevésbé vagy egyáltalán nem reagáltak az intenzív terápia során alkalmazott invazív lélegeztetési módokra. A kezdeti keserű tapasztalatok alapján hamar nyilvánvalóvá vált, hogy a SARS-CoV-2 okozta pneumonia nem egy szokványos kórfolyamat, mivel a parenchyma pusztulásának okát nem a tüdőben kell keresnünk és legfőképp nem ott kell kezelnünk.

Holott az európai és a tengerentúli egészségügyi ellátórendszereknek korábban hasonló járványügyi vészhelyzetekkel nem kellett szembenéznie, a koronavírusok okozta endémiák az utóbbi két évtizedben jelentős terhet róttak az ázsiai országok egészségügyi szervezeteire [5-8]. A 2002-ben azonosított SARS („Severe Acute Respiratory Syndrome”) vírus és a 2012-ben megjelenő MERS („Middle East Respiratory Syndrome”) vírus okozta felső légúti fertőzések kezelésével szerzett eredményeknek és klinikai kutatásoknak hála, a SARS-CoV-2 infekció patomechanizmusával kapcsolatos vizsgálatok hamar az endothelium károsodást okozó tényezők és annak következményei felé fordultak [1,9,10]. Noha a súlyos, időnként életet veszélyeztető kór állapot kialakulása máig sem tisztázott pontosan, számos vizsgálati eredmény igazolta az érfalak belső rétegét képező endothelsejtek strukturális és funkcionális károsodásának szerepét [11-16].

A fertőzés bármely életkorban és akár kifogástalan egészségi állapotban is bekövetkezhet, ám bizonyos krónikus kórképek (pl. magasvérnyomás betegség, egyéb szív- érrendszeri kórállapotok, cukorbetegség, illetve az előrehaladott életkor stb.), amelyek patomechanizmusában az érendothelium funkciókárosodása szerepet játszik, hajlamosíthatnak a súlyos és az életet veszélyeztető klinikai manifesztáció kialakulására [17].

A vírus megjelenését követő első három évben utólagos járványügyi tanulmányok tettek kísérletet a SARS-CoV-2 által okozott megbetegedések ijesztően magas mortalitási adatainak magyarázatára [18,19]. Az egészségügyi ellátó rendszerek világszerte tapasztalt súlyos leterheltségét több tényező együttes jelenléte okozta. A vírus magas kontagiozitásának köszönhetően egy adott földrajzi területen egy időben nagyszámú fertőzés következett be. A kezdeti hiányos tájékoztatás és a potenciálisan súlyos megbetegedéstől való félelem enyhe légúti tünetek esetén is felesleges orvos-beteg találkozásokat generált [20]. A valóban kórházi felvételt igénylő, oxigén szupportációra szoruló betegek száma időnként megközelítette, nem egyszer meghaladta a fekvőbetegellátó intézmények kapacitását [21,22]. A rendkívül rapid, fulmináns lefolyás a kórházi felvétel időpontjában nem volt előre megjósolható, ami így sok esetben későn került felismerésre, és a szükségesnél később megkezdett, kevésbé hatékony kezeléshez vezetett.

Az értekezés alapjául szolgáló vizsgálataink megkezdésekor még nem álltak rendelkezésre olyan fizikális vizsgálati eredmények, tipikus klinikai tünetek, laboratóriumi vagy képalkotó vizsgálatok, amellyel a COVID-19 betegség kezdeti szakaszában az orvoshoz forduló betegek esetén előre megjósolható lett volna a kórkép lefolyásának üteme, a klinikai manifesztáció várható súlyossága vagy éppen a kedvezőtlen kimenetel valószínűsége. Napjainkra már számos irodalmi adat áll rendelkezésre arról, hogy a SARS-CoV-2 fertőzés kialakulásában prominens szerepet játszó fehérjék és a kórlefordulás során fellépő különböző sejtdiszfunkciókat jellemző markerek keringésben mérhető mennyisége a fertőzés során hogyan változik [23-27]. Az emelkedés mértéke és a várható klinikai prognózis közötti kapcsolatról ugyanakkor sok esetben ellentmondásos irodalmi adat állt rendelkezésre. Emiatt a szérumban/plazmában mérhető biomarkerek mennyiségének és azok időbeni kinetikájának analízise, illetve a várható kimenetellel való összefüggések keresése jelenleg is a tudományos kutatások középpontjában áll.

A kórházi kezelést igénylő, a COVID-19 betegség kezdeti vagy előrehaladott szakaszában orvoshoz forduló betegek esetében a mindenkori klinikai állapothoz igazított terápia mielőbbi megkezdése mellett rendkívül fontos a várható állapotrosszabbodás és az esetleges

szövődmények korai felismerése vagy lehetőség szerint azok megelőzése. Amennyiben a kórházi felvétel időpontjában megbízhatóan beazonosíthatók azok a betegek, akik nagyobb kockázatnak vannak kitéve a súlyosabb kórlefordulás tekintetében, úgy esetükben szorosabb klinikai kontroll és proaktív terápiás beavatkozások segítségével jelentősen csökkenthető a kedvezőtlen kimenetel valószínűsége.

Az értekezésben néhány olyan biomarker koncentrációjának változását vizsgáltuk részleteiben, amelyekről feltételeztük, hogy szintjük jelentősen megváltozhat súlyos COVID-19 betegségben. Ezek közül az „Angiotensin-converting enzyme 2” (ACE2) szérumaktivitás, valamint a „Humán epididymis protein 4” (HE4), a „Vascular cell adhesion molecule-1” (VCAM-1), a „Lipoprotein-associated phospholipase A2” (Lp-PLA2), a szolubilis E-selectin, P-selectin és CD40L fehérjekoncentráció változásának potenciális szerepét vizsgáltuk a súlyos COVID-19 tüdőgyulladásban szenvedő betegek kezelés előtti klinikai állapotának felmérésében és a várható kimenetel előzetes megítélésében. Emellett célul tűztük ki a fenti paraméterek kórlefordulással párhuzamos kinetikájának vizsgálatát és a mortalitással fennálló esetleges összefüggéseinek bemutatását. Továbbá a mások által már igazolt, prognosztikai szereppel bíró emelkedett össz „lactate dehidrogenase” (LDH) aktivitás háttérének pontosabb megismerése céljából az egyes LDH izoenzimek COVID-19 betegségben jellegzetes mintázatát kívántuk feltárni.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A COVID-19 betegség etiológiája, tünettana, rizikófaktorai és laboratóriumi diagnózisa

2019 novemberében egy kínai munkacsoport írta le elsőként egy, a *Coronaviridae* rendszertani csoportba sorolható új bétakoronavírus-törzset, amely a korábban már ismert „Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus” (SARS-CoV)-hoz hasonló szerkezete miatt a SARS-CoV-2 nevet kapta. A súlyos felső légúti tüneteket, kétoldali tüdőgyulladást, gépi lélegeztetést igénylő „Acute respiratory distress syndrome” (ARDS) tünetegyüttest, többszervi elégtelenséget és esetenként halált okozó kórképet a „World Health Organization” (WHO) 2020 márciusában COVID-19 betegségre keresztelte el. A vírus egy viszonylag nagyméretű, burokkal rendelkező, egyszálú RNS-t hordozó vírus [28], amely valószínűsíthetően előbb zoonóziással, majd számos mutáció révén emberről-emberre terjedt [29]. A fertőzés terjedésének leggyakoribb módja a cseppfertőzéssel történő transzmisszió [30], noha bizonyos feltételek mellett élettelen tárgyak (pl. papírpénz) közvetítésével is megtörténhet [31].

A megfertőződést követően a betegek nagy hányada tünetmentesen esik át az infekción [32], vagy csak enyhe légúti tünetek alakulnak ki úgy, mint köhögés, orrfolyás, torokfájás, gyakori esetben a szaglás és az ízézés átmeneti zavara [33], esetleg erythematosus bőrtünetek, urtikária jelenik meg [34]. Ugyanakkor idegrendszeri érintettség jeleiről, fejfájásról, szédülésről, tudatállapotváltozásról és akut neurovascularis eseményről is beszámoltak SARS-CoV-2 fertőzött betegek [35]. Ezzel szemben a fertőzöttek kb. 15%-a súlyos, elsősorban légzőszervi tünetekkel, légszomjjal, fulladásérzéssel, szapora légzéssel, köhögéssel, magas lázzal, esetenként gyomor-bélrendszeri panaszokkal kórházi kezelést igényel [35]. A betegek közel 5%-ánál viszont a fenti tünetek az adekvát kórházi kezelés ellenére progrediáltak, és a májat, a vesét, a központi idegrendszert, a gyomor-bél traktust, valamint a vérképzőszerveket érintő szervelégtelenség alakult ki, továbbá tromboemboliás szövődmények manifesztálódtak, amelyek együttesen végül a beteg korai halálához vezettek [35,36].

A SARS-CoV-2 vírussal történő fertőződés és a súlyosabb klinikai állapot kialakulásának egyaránt jól ismert rizikófaktorai az előrehaladott életkor és a férfi nem [37]. Előbbi leginkább a kevésbé hatékony immunválasszal és a polimorbiditással állhat összefüggésben, míg az utóbbi háttérben hormonális hatások, a vírus celluláris internalizációjában szerepet játszó ACE2 és a „Transmembrane protease serine 2” (TMPRSS2) genetikai polimorfizmusa, illetve

életmódbeli eltérések állhatnak [38]. Ahogy az előzőekben is utaltunk rá, egyes társbetegségek, különösen az endothelsejt károsodásával együtt járó kórképek úgy, mint a magasvérnyomás, egyéb kardiovaszkuláris betegségek, a cukorbetegség vagy a krónikus veseelégtelenség nem csupán az infekció kialakulásának kockázatát növeli, de független prediktorai is a súlyosabb prognózisnak [39,40].

A SARS-CoV-2 laboratóriumi kimutatása a járvány első időszakában kizárólag nukleinsav amplifikációs teszttel (NAAT) történt, jelentős részben „reverse transcriptase polymerase chain reaction” (RT-PCR) módszerrel [41]. A vírusfertőzöttség kimutatására hamar kifejlesztésre került az antigénteszt, mely 2020 november végén Magyarországon is elfogadottá vált a COVID-19 fertőzöttség igazolására. A pozitív esetek detektálására elsősorban felső légúti mintát használunk, ezek közé tartozik a nasopharyngealis és oropharyngealis váladékminta, ugyanakkor lehetőség van alsó légúti mintákat is analizálni, amelyek közé tartozik a köpetminta, a „bronchoalveolar lavage” (BAL) minta, esetleg légúti hámaspirátum, pleurális folyadékgyülem vagy tüdőszövet biopszia [42]. A megfertőződött betegekben már elég korán, akár a tünetek megjelenésekor kimutatható a vírus RNS RT-PCR teszttel. Az antigénteszt a mintában jelen lévő vírusfehérje kimutatásán alapszik. Mivel kevésbé érzékeny módszer, mint a PCR, negativitása esetén - tünetek mellett - a PCR teszt is elvégzendő. Pozitivitás esetében azonban a fertőzött személyek gyorsan (kb. 15 perc alatt) diagnosztizálhatók.

A SARS-CoV-2 fertőzés „utólagosan” is igazolható a szervezet fertőzésre adott sejtes vagy humorális immunválaszának mérésével. A sejtes immunválasz detektálásakor a perifériás T-sejteket *in vitro* stimuláljuk SARS-CoV-2 specifikus antigénekkkel, amely sejtek, ha korábban találkoztak a vírussal, aktiválódnak és fokozott mennyiségben γ -interferont termelnek. A sejtek által ürített γ -interferon mennyiségét megfelelő kontrollokhoz képest immunoassay-vel meghatározva jelenthetjük ki, hogy valaki korábban átesett-e SARS-CoV-2 fertőzésen [43]. Ezek a vizsgálatok a pandémia első két évében csak kevés laboratóriumban váltak elérhetővé, míg a humorális/szerológiai vizsgálatokat egyre több laboratórium vezette be, amelynek során a SARS-CoV-2 specifikus IgG, IgM vagy IgA osztályú antitesteket mutatjuk ki, külön-külön, vagy egymástól nem elkülönítve, úgynevezett össz Ig tesztben [44]. A SARS-CoV-2 kétféle fehérjéje ellen termelődő immunglobulinokat értékelhetjük: a nukleokapszid (N) és a spike protein, annak is leginkább a receptor-kötő doménje (S1-RBD) ellenit. Az ellenanyagokat kimutató tesztek lehetnek mennyiségi meghatározásra is alkalmasak. A laboratóriumok az S1-

RBD elleni ellenanyagszintet a WHO standardhoz viszonyítva BAU/ml (binding antibody unit/ml) mértékegységben határozzák meg.

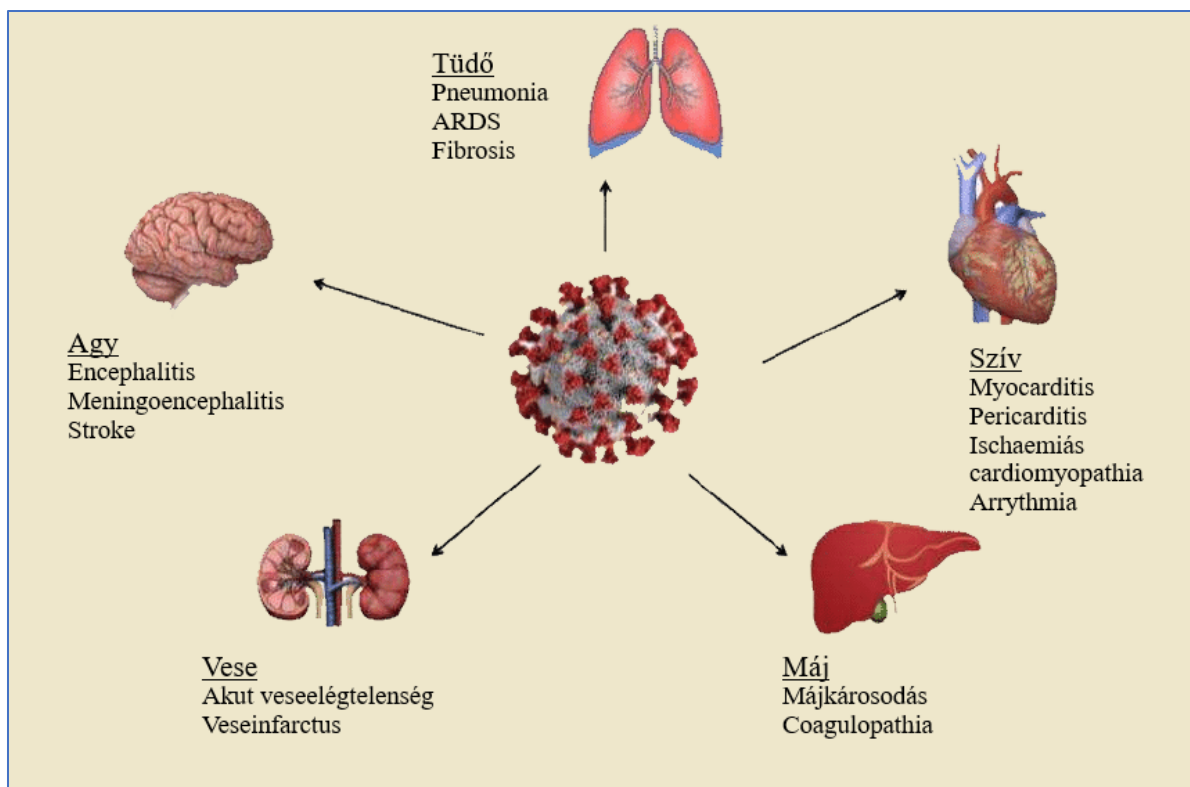
3.2 A COVID-19 betegség klinikai manifestációja

A COVID-19 kórkép a legtöbb esetben két jól elkülöníthető fázisra bontható, amit a megfertőződést követően egy kb. öt-tíz napos tünetmentes vírusszaporodási időszak előz meg [45]. Az első fázisban az excesszív vírusreplikáció eredményeképpen megjelenhetnek nem-specifikus felső légúti tünetek, láz, köhögés és akár légszomj [45,46]. A vírus szaporodása rendszerint a bevezető tünetek megjelenését követő 5. napon alábbhagy [45]. Hét-tíz nappal a kezdeti tünetek után a kórkép második fázisa következik, amely a jelentős citokinfelszabadulás által kiváltott túlzott immunreakció következménye [45]. A betegség második fázisát is elszenvedő betegek alkotják a potenciálisan kritikus állapotú, súlyos pneumoniában szenvedő és gyakorta egyéb szervérintettségekkel rendelkező, intenzív osztályos kezelést igénylő betegek csoportját [47,48].

A kórokozó elsődleges behatolási kapuja a felső és az alsó légutak hámfát borító légúti epithelsejtek [49], illetve a tüdőben található II-es típusú pneumocyták [50]. A vírus internalizációját, majd sejten belüli replikációját követően az endothelium és az epithelium struktúrák súlyos károsodása következhet be, amely fokozott érpermeabilitáshoz, így alveoláris és interstitialis oedema képződéshez vezetnek [51]. A korai ún. exudatív fázisban a II-es típusú pneumocyták által termelt surfactant megkevesbedik, fibrinlerakódások és hyalinmembrán képződés figyelhető meg [52]. A kiterjedt szöveti gyulladás és a masszív sejtkárosodás eredményeképpen sejtszinten apoptózis, szöveti szinten pedig nekrotikus folyamatok indulnak el, amelyek összességében diffúz alveoláris károsodást és a tüdőfunkció számottevő romlását eredményeznek [53]. Ezzel párhuzamosan a fibroblasztok kóros proliferációja indul el, ami az alveoláris exudatív folyamatokkal, illetve a vaszkuláris struktúrák vírus által kiváltott direkt károsodásával együtt citokinek (pl. transforming-growth factor- β [TGF- β]) és interleukinok (pl. interleukin-1 β [IL-1 β]) által mediált irreverzibilis pulmonális károsodáshoz, összességében ARDS-hez vezethet [53]. Eközben az endothelsejtek aktivációjának eredményeképpen a tüdő kapilláris hálózatában jelentősen megemelkedik a pro- és antiinflammatorikus mediátorok, valamint a neutrophilek és monocyták mennyisége. Az atelectasia és a konzolidált tüdőterületek arányának növekedése, illetve a tüdő vérellátásának zavara, a hajszálerek trombotikus és immunmediált obstrukciója, valamint a shuntkeringés kialakulása miatt

bekövetkező ventilációs-perfúziós aránytalanság összességében a gázcsere hatékonyságának drámai leromlását eredményezi [54].

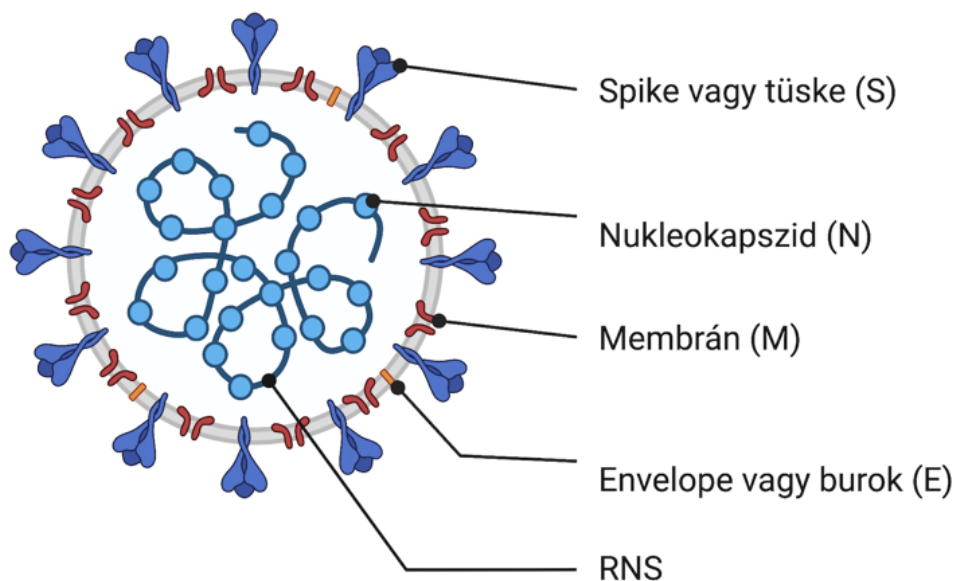
A COVID-19-asszociált ARDS-ben szenvedő betegek esetében gyakran előfordulnak egyéb másodlagos szervérntettségek. A szív- és érrendszert érintő rendellenességek közül myo/pericarditis, szív ischemia és arrhythmia léphet fel leginkább [55]. Az esetek nagy részében a kardiális szövődmények tünetmentesek, csupán az elektrokardiogramon észlelhető eltérések és a megemelkedett necroenzimek alapján következtethetünk rájuk [45]. Mindemellett 20%-ban életet veszélyeztető malignus ritmuszavar vagy szívmegállás következhet be [56]. A kritikus állapotú SARS-CoV-2 fertőzött betegek esetén gyakorta érintett lehet a vese is, akár vesepótló kezelést igénylő akut vesekárosodás is kialakulhat [57]. A vese érintettségének magas aránya több sérülési mechanizmus útján magyarázható, amelyek között megemlíthető a csökkent vérátáramlás, a glomeruláris mikrotrombusok jelenléte, illetve a „Renin-angiotensin-aldosterone system” (RAAS) autokrin aktivációja is [58,59]. Az invazív lélegeztetést igénylő, súlyos akut veseelégtelenségben szenvedő COVID-19 betegek mortalitási rizikója akár a 80%-ot is elérheti [60]. A kritikus állapotú páciensek egyharmadánál neurológiai manifesztációval is számolnunk kell(ett). Ezek a centrális és perifériás idegrendszert egyaránt érinthetik, vélhetően az idegszövet direkt károsodásából fakadó inflammációs kórképeket látunk (pl. myelitis, meningoencephalitis, encephalopathia stb.) [61]. A gépi lélegeztetést igénylő betegek dekonnekciónak jelentősen hátráltathatja a rekeszizmot érintő neuromuszkuláris manifesztáció, az ún. „ventilator-induced diaphragmatic dysfunction” (VIDD) is [62] (1. ábra).



1. ábra A súlyos SARS-CoV-2 fertőzés okozta potenciális szervkárosodások. Súlyos COVID-19 betegségben a tüdő mellett a szív, a máj, a vesék és a központi idegrendszer is érintett lehet. Az eredeti ábra forrása: [63].

3.3 A SARS-CoV-2 fertőzés molekuláris patomechanizmusa

Korábbi klinikai vizsgálatok alapján a SARS-CoV és a MERS vírushoz hasonlóan a SARS-CoV-2 emberi sejtekbe történő internalizációjának kulcsmolekulája a humán sejtek felszínén jelen lévő ACE2 glikoprotein [50,64,65]. Emberben legnagyobb mértékben a nazális és a bronchiális epithelsejteken, illetve a II-es típusú pneumocytákon expresszálódik ez a receptor [66]. Noha újabb kutatások alapján szintén jelen van a vékonybél, a here, a vese, a szív, a pajzsmirigy és a zsírszövet sejtjein, míg kisebb mennyiségben a vastagbél, a máj, a húgyhólyag és a mellékvese epithelsejtjein [66]. Az ACE2-nek a fertőzésben betöltött közvetlen szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint a receptort bőségesen expresszáló szövetek megfeleltethetők a vírus organotropizmusának [67].



2. ábra A SARS-CoV-2 vírus szerkezetének sematikus rajza. A vírus szerkezetének kialakításában többek között a tüskefehérje (S), a nukleokapszidfehérje (N), és a burokfehérje (E) vesz részt. A külső burok alatt található a pozitív egyszálú RNS. Az eredeti ábra forrása: [68].

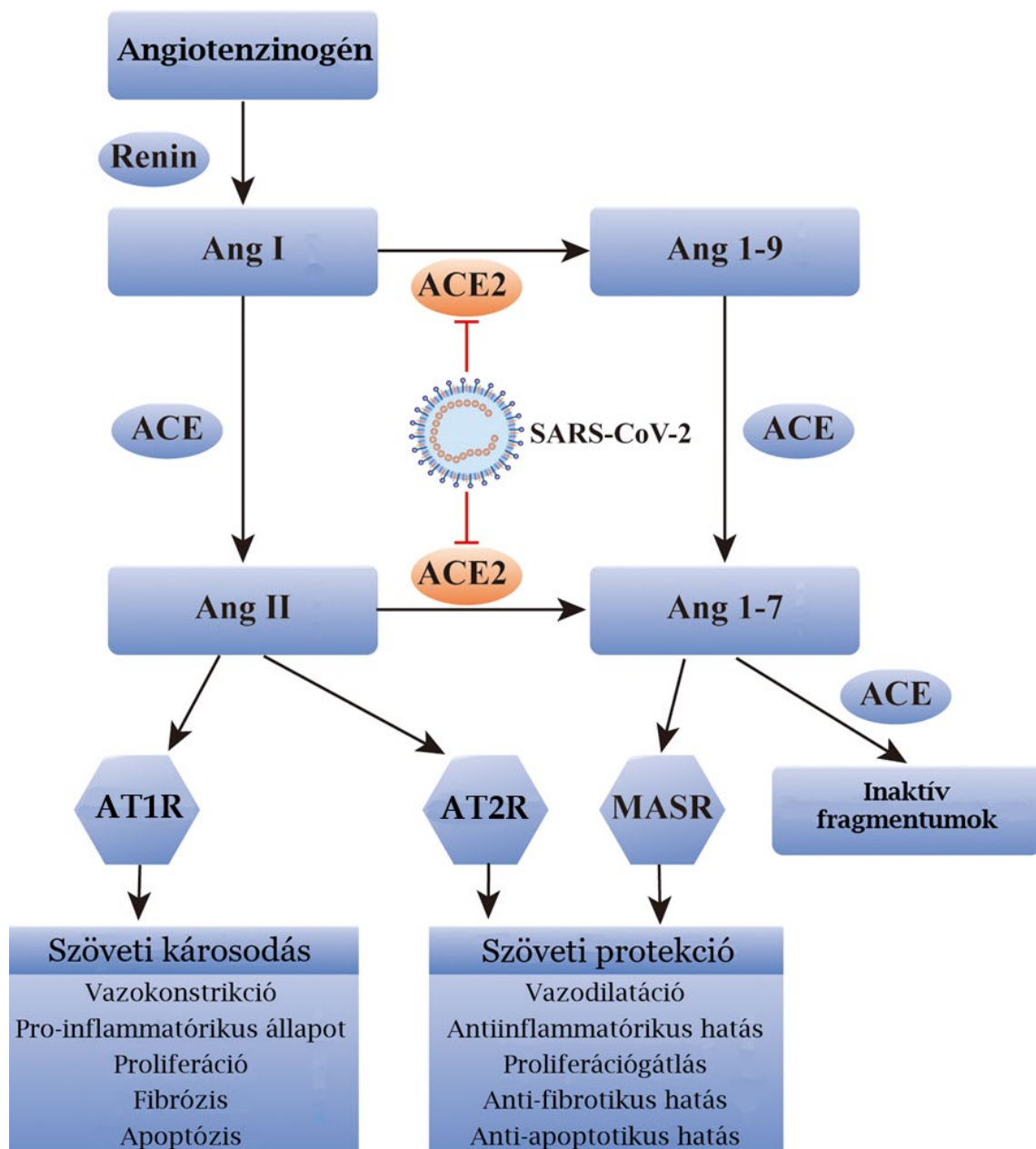
A SARS-CoV-2 vírus gömb alakú és megközelítőleg 125 nanométer nagyságú. Elnevezését a felszínéből tüskeszerűen kiemelkedő fehérjéknek a Nap koronájára emlékeztető elektronmikroszkópos megjelenése miatt kapta [69]. A vírus négy, a genom által kódolt fehérjét tartalmaz: az M („membrane”) protein a külső burok legfontosabb strukturális alkotója [70], az E („envelope”) fehérje egy, a burokban jóval kisebb arányban jelenlévő protein, a víruspartikulumok összeszerelésében és a gazdasejtből történő kijutásában játszik szerepet [71], az N („nucleocapsid”) protein pedig az örökítőanyagot körbevevő belső héj alkotója, emellett a vírusreplikációban is jelentős szerepet tölt be [72] (2. ábra). Infektológiai szempontból a legnagyobb jelentőséggel a külső burokból kiemelkedő S („spike”) protein rendelkezik. Két alegységből (S1 és S2) épül fel és a gazdasejthez történő kötődésben van szerepe [50,64,73]. A sejtfelszínen expresszálandó ACE2-höz kapcsolódva az S1/S2 komplexben konformációváltozás zajlik le, melynek során a vírusfehérjéből szabaddá váló aminosav szekvencia indukálta intracelluláris proteáz stimuláción keresztül a vírus külső burka és a sejtmembrán összeolvad, ami endocitózishoz vezet [74,75]. A membránfúzióban a TMPRSS2 nevű sejtfelszíni fehérjének kiemelkedő szerepe lehet: klinikai vizsgálatok során a molekula működésének gátlása megakadályozta a vírus gazdasejtbe történő internalizációját, így a sejt megfertőződését [75]. Noha a legutóbbi *in vitro* tanulmányok szerint az emberi

endothelsejteken jóval alacsonyabb koncentrációban mutatható ki az ACE2, mint a légúti epithelsejtekben és ez megemelkedett citokinkoncentráció mellett sem változik jelentősen [76], a véráramba bekerülő víruspartikulumok által kiváltott direkt endothelsejt aktiváció, az intracelluláris vírusreplikáció és a következményes vaszkuláris diszfunkció továbbra is egy általánosan elfogadott teória [77].

3.4 Az ACE2 szerepe a COVID-19 betegség lezajlásában

Az ACE2 egy metalloproteáz aktivitással rendelkező enzim, a homeosztázisért felelős RAAS egyik kulcsmolekulája [78]. A vese hipoperfúzió, a hiponatrémia vagy a szimpatikus idegrendszer aktivációja eredményeképpen a vese glomeruláris sejtjeiben pro-renin képződik, amely vagy helyben, vagy a más szövetek által expresszált pro-renin-receptorhoz kötődve aktív reninné alakul [78,79]. A máj által termelt angiotenzinogént a renin „angiotensin I” (Ang I)-re transzformálja. Az Ang I a tüdőben termelődő ACE szubsztrátja, amiből „angiotensin II” (Ang II) képződik, amely potens végtermékként a szervezetben diffúzan jelenlévő angiotensin receptor 1 és 2-ön (AT1R és AT2R) keresztül számos folyamatot regulál: a szív-érrendszerben artériás és vénás vasokonstriktiót, hipertenziót és tachycardiát eredményez, a mellékvesekéregben aldosteron felszabadulást, a vese disztális tubulusaiban következményes nátrium-retenciót és káliumkiválasztást produkál, míg a hypothalamus és hypophysis stimulációjával antidiuretikus hormon (ADH) szint emelkedést és szomjúságérzetet generál (3. ábra).

Az utóbbi néhány évtizedben derült fény arra, hogy az Ang II az ATR1-n keresztül a MAPK és a Rho proteinek által az NF- κ B mediált szignáltranszdukciós útvonalon pro-inflammatórikus gének aktivációját is elősegíti [80-82]. Mindez „Vascular endothelial growth factor” (VEGF) lokális felszabadulást, ezen keresztül érpermeabilitás fokozódást okoz, továbbá számos citokin és kemokin, valamint sejtadhéziós molekulák, pl. az „Interleukin-6” (IL-6), „Monocyte chemoattractant protein” (MCP), „Vascular cell adhesion protein-1” (VCAM-1) és „Intercellular cell adhesion protein-1” (ICAM-1) termelődését idézi elő, amelyek együttesen a gyulladáshoz vezető folyamatokban résztvevő sejttypusok migrációját segítik elő [82]. Emellett az Ang II a thrombocytádhéziós molekulák (pl. P-selectin), valamint a szöveti faktor (TF) és a „plasminogen activator inhibitor-1 és 2” (PAI-1/2) endothelsejt és simaizomsejt általi expressziójának fokozása révén a lokális thrombosis valószínűségét is növelheti [83].

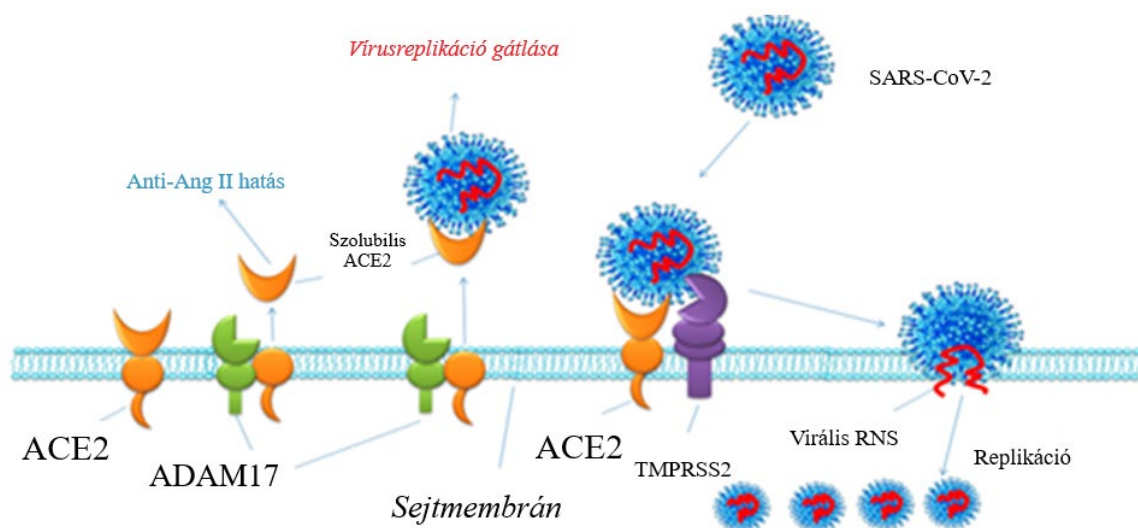


3. ábra Az ACE2 balanszírozó szerepe a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerben. Az eredeti ábra forrása: [85].

Az ACE2 RAAS rendszeren belüli pontos szerepére csupán az utóbbi két évtized során derült fény. Az enzim szubsztrátja az Ang I és Ang II egyaránt, melyekből proteolitikus hasítás révén “angiotenzin 1-9” (Ang 1-9) illetve “angiotenzin 1-7” (Ang 1-7) képződik. Az utóbbi a “mitochondrial assembly receptor”-hoz (MASR) kötődik, ami vazodilatációt okoz csökkentve ezzel a vérnyomást, továbbá gátolja az érfal trombotikus, flogisztikus és profibrotikus folyamatait, így egyfajta belső ellensúlyként funkcionál az extenzív Ang II képződéssel szemben (3. ábra) [86-88].

Az ATR1 általi aktiváció révén megvalósuló proinflammatorikus és prokoagulációs folyamatok ellensúlyozását szolgálják az ATR2-ön keresztül megvalósuló protektív hatások. A receptor aktiválódása az endothelsejtek nitrogen-oxide (NO) termelődését fokozza és bizonyos sejteken belül az NF- κ B mediált jelátviteli kaszkád aktivációját gátolja [84].

Bizonyos krónikus gyulladással járó kórállapotokban a sejtek felszínén expresszálandó ACE2 a proteáz aktivitással rendelkező fehérje (“A disintegrin and metalloproteinase 17”, ADAM17) hatására lehasad, és a véráramban kering tovább [89]. A lehasadás következtében az ACE2 funkciója károsodik, és balanszírozó képességét elveszíti [89,90]. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések, miszerint egyes kardiovaszkuláris kórképekben, mint magasvérnyomásban [91], aorta stenosisban [92], szívelégtelenségben [93], és pitvarfibrillációban [94] szenvedő betegek vérében a keringő ACE2 mennyisége jelentősen megemelkedik.



4. ábra A SARS-CoV-2 vírus internalizáció és az ACE2 “shedding” folyamata. Az eredeti ábra forrása: [95].

SARS-CoV-2 infekció esetén a RAAS mindkét “karja” (Ang II/AT1R/NF- κ B út vonal indukció), illetve az Ang 1-7/Ang 1-9/AT2R/NF- κ B út vonal gátlás) extenzíven működik. A még sejt felszínén lévő ACE2-t az ADAM17 enzim a sejt felszínről lehasítja és szolubilizálódik. A bontóenzimének (vagyis az ACE2) aktivitáscsökkenése miatt az Ang II mennyisége emelkedik, ami az ATR1-hez kötődve tovább fokozza az ADAM17 proteáz aktivitását, és ez a sejt felszíni

ACE2 expressziót tovább csökkenti, egyben növeli a keringő ACE2 szintjét és aktivitását [96]. Mindemellett az ACE2 nem csupán az angiotenzin, hanem többek között a bradykinin, pontosabban a des-Arginin-bradykinin enzimátikus hasításáért is felelős [97,98]. Ez utóbbi a „Bradykinin Receptor B1”-hez (BKB1R) képes kötődni és további gyulladáscsökkentő kemokinek termelődését potenciózza, melyek vazodilatációt, sejtproliferációt és fibrózist eredményeznek [50,97,99]. Összességében az ACE2 expresszió redukciója a protektív kardiovaszkuláris hatás csökkenéséhez, végső soron a pro-inflammatorikus és prokoaguláns hatások arányának előbb lokális, majd generalizált megnövekedéséhez vezethet [96]. Ugyanakkor a felszabaduló ACE2 fehérje és a víruspartikulák S-proteinen keresztüli egymáshoz való kötődésének feltételezhetően lehet kedvező hatása is, mivel ez gátolhatja a vírusreplikációt (4. ábra).

A fentiekben részletezett mechanizmusok alapján súlyos COVID-19 betegségben a szolubilis ACE2 mennyiségének növekedését várnánk, viszont a témában publikált vizsgálatok során ellenmondásos eredmények születtek: a kontrollhoz képest emelkedett ACE2 szérumszintről számolt be több közlemény [100-104], míg néhány szerző nem talált különbséget a kontroll csoporthoz képest [105,106], illetve egy kutatócsoport vizsgálatai során a kontrollokhoz képest inkább alacsonyabb szolubilis ACE2 szinteket sikerült kimutatni [107]. Munkacsoportunk - a jelen vizsgálatokat megelőzően - egy kritikus állapotú COVID-19 beteg nyomkövetése során a szolubilis ACE2 emelkedett szérum aktivitását detektálta [108]. Ezért fontosnak tartottuk nagy betegszám mellett ezen előzetes eredmények további vizsgálatát.

3.5 *A HE4 protein mérésének lehetséges szerepe COVID-19 kórképben*

A HE4 a „Whey acidic protein” (WAP) fehérje család tagja, a *WFDC2* gén terméke. A WAP fehérje családba olyan antiproteáz és antibakteriális aktivitással, illetve gyulladáscsökkentő hatással rendelkező proteinek sorolhatók, amelyek a tüdőben nagy mennyiségben képződnek és a kórokozók proteolitikus folyamatainak kivédésében játszanak jelentős szerepet [109,110]. A „Secretory leukocyte protease inhibitor” (SLPI) és az elafin a csoport két prominens tagja, melyek elsősorban „neutrophil elastase”-ra kifejtett gátló hatásuk révén egyes baktériumok (pl. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* stb.), gombák (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*), illetve retrovírusok (pl. Humán Immundeficiencia Vírus - HIV) ellen is hatékony védelmet biztosíthatnak [111-113].

A HE4 egy kisméretű szekretoros glikoprotein, amely elsőként a spermiumok érési folyamataiban feltételezett szerepe miatt vált ismertté [114]. Azóta számos humán szövetben

kimutatták az expresszióját: a nyálmirigyek, a száj- és orrüreg, valamint a légúti epithelsejtekben egyaránt [110], és szerin, valamint cisztein proteáz inhibitor hatásán keresztül a proteolitikus tulajdonsággal rendelkező mikrobák elleni védelemben játszik szerepet [115]. Az egészséges szövetek normál expressziójával szemben a légzőrendszer, az emlő és a reproduktív szervek egyes daganatos megbetegedéseikor viszont jelentős mértékben megnő az expressziója és magas koncentrációban van jelen a keringésben [110,116,117], ami alkalmassá teszi biomarkerként történő használatát malignus kórképek (pl. petefészekrák, tüdőrák) progressziójának megítélésében [118,119]. Ugyanakkor nem malignus pulmonológiai betegségekben, úgy, mint cisztás fibrózis, tuberculosis és interstitiális tüdőbetegségben is a szérum HE4 szint jól követte a gyulladásos folyamatok súlyosságát és ezáltal alkalmas laborparaméter volt a betegek klinikai állapotának értékelésében [120-122].

Súlyos SARS-CoV-2 fertőzésben a leginkább involvált szerv a tüdő, melynek károsodásához több, egymást potenciózó kóros mechanizmus járulhat hozzá. Az exudatív diffúz alveoláris károsodás, a hyalinmembrán képződés, a II-es típusú pneumocytá hiperplázia és a pro-inflammatorikus citokinek túlermelődése együttesen vezet a légzőfelület maradandó károsodásához, ami akár a beteg halálát is okozhatja [123]. Korábbi klinikai vizsgálatok során bakteriális ARDS-ben a jelentősen emelkedett szérum HE4 koncentráció szoros kapcsolatot mutatott a kedvezőtlen kimenetellel [124,125]. Ezidáig mindössze két publikáció ismert, amely a HE4 szérumszint prognosztikai szerepét vizsgálta COVID-19 betegségben, bár ezen tanulmányokban az intenzív ellátást igénylő tüdőgyulladásban szenvedő betegek esetében a pontos klinikai körülmények nem voltak teljesen tisztázottak [126,127], ezért a HE4 szerepének további elemzését fontosnak tartottuk súlyos COVID-19-ben.

3.6 Az endothelsejt diszfunkció kialakulása és molekuláris karakterisztikája súlyos COVID-19 betegségben

A vaszkuláris endothelium számos funkciót lát el a szervezet homeosztázisának fenntartása érdekében. Normál körülmények között az érfalakat belülről bélelő endothelsejtek észlelik és gyorsan reagálnak a mikrokörnyezetükben megjelenő humorális faktorokra és a hemodinamikai változásokra, melyen keresztül befolyással bírnak a hemosztázis, az oxidatív stressz, a gyulladás, a vaszkuláris permeabilitás, a véráramlás és a véralvadás folyamatára, illetve az érfal integritásának biztosítására egyaránt [128,129]. Mindezen felül a véráramba bejutó infektív ágensek elleni első védelmi vonalként is kiemelkedő szereppel bírnak [130].

Nyugalmi állapotban az endothelium antikoaguláns, antiadhezív és vasodilatátor karakterisztikával jellemezhető [131].

Endothelium diszfunkcióról akkor beszélünk, ha a fent említett endotheliális funkciók közül egy vagy több károsodik [132]. A véráramba jutott kórokozók vagy azok valamely alkotója az endothelsejtek felszínén és az intracelluláris térben elhelyezkedő ún. „pattern recognition receptor” (PRR) molekulákon keresztül egy konzervált, nem specifikus antivirális gyulladáshoz vezető kaszkádméchanizmust indítanak el, amely a sejten belüli NF- κ B- és MAPK-mediált szignáltranszdukciós útvonalakon keresztül IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , és INF- γ , továbbá különböző sejtadhéziós molekulák (pl. E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1) megnövekedett expresszióját eredményezi [132]. Az endothelium monolayer megbomlása következményes permeabilitásfokozódást generál, illetve lehetővé teszi a kötőszövetben jelenlévő prokoaguláns faktorok, pl. a TF, PAI-1, „von Willebrand factor” (vWF) és az „urokinase-type plasminogen activator” (uPA) felszabadulását [132]. A SARS-CoV-2 okozta fertőzés esetén az endothelsejtek és a fehérvérsejtek, illetve a vérlemezkék közötti intercelluláris kapcsolatok bizonyítottan kiemelkedő szerepet játszanak a szövődményként gyakran detektált myocardialis infarctus (MI), a vasculitis, az interstitialis pneumonitis és az ARDS kialakulásában [133-135]. Az indirekt sejtaktivációs mechanizmusok mellett az endothelsejtek felszínén jelenlévő ACE2 glikoproteinen keresztül megvalósuló közvetlen fertőződés, a következményes sejtaktiváció és károsodás, illetve sejtapoptózis is vélhetően nagy jelentőséggel bír [50,66,67].

A SARS-CoV-2 vírusfertőzés elsősorú behatolási pontja a légzőrendszer. Az alveoláris kapilláris rendszer a test legsűrűbb és egyben legkiterjedtebb érhálózat [130], így a pneumocyták és az alveoláris macrophagok megfertőződése valószínűleg az őket körbevevő endothelsejtek közvetlen és közvetett károsodását is magával vonja [136]. A krónikus endothélium gyulladás és diszfunkció jellegzetes megnyilvánulási formája az atherosclerosis, amely az érendothelsejtek, a vérlemezkék, a macrophagok és a környező simaizomsejtek kóros működésének eredményeképpen alakul ki [137]. A legutóbbi klinikai vizsgálatok alapján a sclerotikus plakk magját képező nekrotikus szövetszaporulat kialakulásában a Lp-PLA2, másik nevén „platelet-activating aethyl-hydrolase”, kulcsszerepet játszik [138]. Az Lp-PLA2 a macrophagok által termelt, a vérben az alacsony denzitású lipoproteinnel (LDL) komplexben keringő fehérje [139], és az oxidált foszfolipidekből hidrolízis útján pro-inflammatórikus karakterrel rendelkező mediátorokat hoz létre. Ez utóbbiak kulcsszerepet játszanak az endothelsejt diszfunkció és a túlzott mértékű vérlemezke aktiváció kialakulásában [138].

Továbbá kapcsolatba hozták az LDL oxidatív formájának kialakulásával is, mely az érfal intima gyulladással kaszkádfolyamatának elindításáért felelős [138]. A szérumban detektálható Lp-PLA2 szint hatékony biomarkernek bizonyult az atherosclerosis eredményezte visszatérő koszorúérbetegség és a stroke rizikóbecslésére [140], valamint a lipid anyagcsere zavarokban fennálló prokoaguláns hajlam értékelésében is [141]. Érdekes módon súlyos COVID-19 kórállapotban lecsökken az össz koleszterin, az LDL és a magas denzitású lipoprotein (HDL) mennyisége is [142], míg a sérült pneumocytákból és macrophagokból felszabaduló oxidált lipidtermékek aránya megnő ARDS-ben [143]. COVID-19 betegségben a lipidanyagcsere érintettsége és az endothelium funkciókárosodása ellenére az Lp-PLA2 mennyiségi változásának prediktív értékéről korlátozott számú eredményekkel rendelkezünk [144].

3.7 Az LDH izoenzim aktivitásának lehetséges eltérése COVID-19 betegségben

Az LDH enzim egy, a szervezet minden sejtje által termelt oxidoreduktáz, amely a piruvát-laktát reverzibilis átalakulását segíti elő. Sejtsérülés esetén a fehérje a véráramba kerül, ahol aktivitása jelentősen megemelkedhet. A molekula tetramer szerkezetű és két (M - muscle és H - heart) alegység különböző kombinációiból épül fel, melyeket izoenzimnek nevezünk és termelődésük bizonyos mértékben szövetspecifitást mutat [145,146]. Humánban összesen öt izoenzimet különböztetünk meg: az LDH-1 (4H alegység) döntően a szívizom, az LDH-2 (3H1M) a retikuloendotheliális rendszer, az LDH-3 (2H2M) a tüdő, az LDH-4 (1H3M) a vese, míg az LDH-5 (4M) a máj és a vázizom sejtjei által termelődik [145,146]. Rutin laboratóriumi körülmények között a szérumban lévő össz LDH aktivitást mérjük, mely az egyes izoenzim aktivitásának összegéből adódik. Számos más, rutinban mérhető laboratóriumi paraméter mellett a LDH-ről is bebizonyosodott, hogy COVID-19 betegségben a súlyosság tekintetében független prediktív faktorként viselkedik [147-150], illetve képes előrejelezni a súlyos tüdőkárosodást és a légzési elégtelenséget [150,151], továbbá a kedvezőtlen kimenetelt [147,148,152]. Bár korábbi vizsgálatok feltárták a más respiratórikus kórállapotokra jellemző LDH-izoenzim mintázatokat [153], a COVID-19 kórkép esetében csak kevés klinikai eredmény áll rendelkezésünkre [154].

4 Célkitűzések

Laboratóriumi vizsgálataink célja az volt, hogy összefüggést keressünk a szérumból/plazmából kimutatható, az endothelsejt diszfunkcióban emelkedett mennyiségben expresszáldó biomarkerek abnormális koncentrációja vagy aktivitása és a súlyos/kritikus állapotú COVID-19 betegségben szenvedő betegek klinikai állapota, valamint a kórkép kimenetele között. Vizsgálatainkba az intenzív osztályos gyakorlatban rutinszerűen mért paraméterek közül az LDH enzim öt szövetspecifikus izoenzimjét analizáltuk, illetve a korábbi tudományos eredményeink alapján az ACE2, a HE4, a P- és E-selectin, VCAM-1, CD40L, valamint a Lp-PLA2 biomarkerek szérumszintjét vagy aktivitását vettük górcső alá. Meghatároztuk továbbá az egyes paraméterek kórházi felvétel idején mért értékeinek prognosztikai szerepét a betegség progressziója és a várható kimenetele tükrében.

4.1 A szolubilis ACE2 aktivitás változásának vizsgálata súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek kimenetelével összefüggésben

A sejtfelszínen expresszált ACE2 fehérje alapvető szerepet játszik a SARS-CoV-2 vírusrészecskék internalizációjában és így a gazdaszervezet megfertőződésében. A korábbi eredmények alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy a szérumban keringő ACE2 aktivitása korrelációt mutat-e a COVID-19 klinikai súlyosságával és látható-e aktivitásbeli különbség az eltérő etiológiájú, súlyos bakteriális szepszishez képest a SARS-CoV-2 okozta vaszkuláris eltérések esetén. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- súlyos, illetve kritikus állapotú COVID-19 betegek szérummintáinak ACE2 aktivitását megmértük és összehasonlítottuk az egészséges populációban mért értékekkel, továbbá súlyos, nem SARS-CoV-2 okozta szepszis miatt kezelt betegek eredményeivel,
- a SARS-CoV-2 fertőzött betegeknél a kórházi kezelés előtt és a kezelés alatt is meghatároztuk a szolubilis ACE2 aktivitását a fehérje potenciális prediktív és prognosztikai értékének megítélése céljából,
- az ACE2 aktivitás értékeket a rutin laboratóriumi gyulladáshoz köthető markerekkel korreláltatva is megvizsgáltuk, és statisztikai analízissel elemeztük a független változóként viselkedő paramétereket.

4.2 A HE4 szérum szintjének vizsgálata pulmonális gyulladáshoz biomarkerként eltérő súlyosságú COVID-19 pneumoniában szenvedő betegekben

A légúti epithelsejtek által expresszált HE4 protein vizsgálata az elsősorban légúti fertőzést okozó súlyos SARS-CoV-2 infekció esetén kézenfekvőnek tűnt. Ezért megvizsgáltuk

- az enyhe, közepesen súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegekben a HE4 szérum szint változását a kórházi felvétel előtt, illetve a betegek egy részénél utánkötéses mintaákban is,
- a HE4 értékeket korreláltattuk a rutin laboratóriumi paraméterekkel és a klinikai állapot súlyosságával különös tekintettel a pulmonológiai érintettségre,
- a kórházi kezelés megkezdése előtt mért HE4 szérum szinteket összefüggésbe hoztuk a klinikai progresszióval és a betegség végkimenetelével az esetleges prognosztikai jelentőség megítélésé céljából.

4.3 Endothelsejt diszfunkciót és a vérlemezke aktivációt jellemző biomarkerek koncentrációjának vizsgálata súlyos COVID-19-ben

A COVID-19 kórkép patomechanizmusában megkérdőjelezhetetlen szerepet játszik az endothelium strukturális és funkcionális sérülése, ami kaszkádszerű gyulladáshoz és koagulációs mechanizmust indíthat el az érpályán belül. Az ekkor termelődő inflammációs proteinek és a másodlagosan bekövetkező vérlemezke aktiváció jelzőmolekulái a vérmintában mérhetővé válnak. Ebből következően

- retrospektív módon vizsgáltunk néhány sejteredetű paramétert a SARS-CoV-2 infekció okozta ARDS-ben szenvedő túlélők és a kedvezőtlen kimenetelt mutató betegek szérummintáiban és kontrollcsoportként enyhe légúti fertőzés tüneteit mutató, de SARS-CoV-2 specifikus RT-PCR negatív betegek mintáit analizáltuk,
- az endothelsejt diszfunkció detektálása érdekében a VCAM-1, E-selectin, ACE2 és Lp-PLA2 szérum szintek meghatározását végeztük, míg a vérlemezke aktiváció jellemzésére a plazma P-selectin és CD40L kimutatását választottuk,
- a fenti biomarkerek emelkedett szintje és a COVID-19 betegség kimenetele közötti esetleges relációt állapítottuk meg.

4.4 Az LDH egyes izoenzimjeinek vizsgálata enyhe/közepesen súlyos és súlyos COVID-19 betegségben

Feltártuk az LDH egyes izoenzimjeinek aktivitás változásait két eltérő klinikai súlyosságú, COVID-19 tüdőgyulladásban. Ennek érdekében

- a kórházi felvételt igénylő, súlyos és enyhe/közepesen súlyos COVID-19 betegségben szenvedő betegek szérummintáiban meghatároztuk az össz LDH aktivitást és eredményeinket korreláltattuk a klinikai állapot súlyosságával,
- egyenként megmértük az egyes LDH izoenzimek aktivitását, majd összefüggést kerestünk az izoenzim aktivitás értékei és más, rutin laboratóriumi paraméterek szérumszintje között,
- kapcsolatot kerestünk a tüdőérintettség mértéke és az LDH-izoenzimek eltéréseinek elektroforetikus mintázata között.

5 *Anyagok és módszerek*

A doktori értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények vizsgálatai során egy nagyszámú COVID-19 betegcsoport szérum, illetve plazma mintáit dolgoztuk fel a különböző biomarkerek analíziséért. A megfogalmazott célkitűzéseink megválaszolása érdekében a betegeket különböző alcsoportokba soroltuk és követtük a klinikai állapotuk kimenetelét. A különböző vizsgálatok alatt számos metodika átfedést mutatott egymással, így a laboratóriumi módszerek nem közleményenként, hanem egységesítve kerülnek bemutatásra.

5.1 *Betegek és kontrollok*

Kutatásaink során a SARS-CoV-2 okozta második és harmadik fertőzési „hullám” alatt (2020 decemberétől 2021 júliusáig) a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Infektológia Klinikán, valamint a Kenézy Gyula Campus Központi Intenzív Osztályán kezelt enyhe, súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegektől nyert vérmintákat dolgoztuk fel. Számos beteget a Jelölt maga kezelt. Ezen vizsgálati populáció mellett a szolubilis ACE2 szérumaktivitás mérések során a Budapesti Jahn Ferenc Dél-pesti Centrumkórház Országos Hematológiai és Infektológiai Intézetben kezelt és rendelkezésünkre bocsátott, szintén COVID-19 betegségben szenvedő betegek kisebb csoportjának a mintáit is bevontuk. A teljes vizsgált betegpopulációban 18 és 87 év közötti betegek szerepeltek. A vizsgálatokban szereplők körében a komorbiditási adatok a kezelőorvosok által rendelkezésünkre álltak. Az ismert rosszindulatú tumoros megbetegedést, az autoimmun kórképet, az idült tüdőbetegséget és a terhességet általános kizáró tényezőként kezeltük. A vizsgálati csoportunkba beválogatott betegek mindegyikénél az orr-garat váladékból elvégzett RT-PCR módszerrel került igazolásra az akut SARS-CoV-2 fertőzés. A kórházi felvételt követően a súlyos vagy kritikus állapotú COVID-19 betegek elhelyezése intenzív terápiás osztályon történt, míg az oxigénterápiát igénylő, de stabil állapotú betegek nyílt kórházi részlegen kerültek elhelyezésre. A klinikai állapot súlyosságának megítélésére minden esetben az ún. „Sequential Organ Failure Assessment” (SOFA) pontrendszert alkalmaztuk (1. táblázat). Amellett, hogy a kórházi kezelés indoka szinte kivétel nélkül a légzési elégtelenség és oxigénszupportációs igény volt, a betegek vizsgálati alcsoportokba történő kategorizálása a kiindulási SOFA- score segítségével történt: a 10 vagy annál nagyobb pontszámot elérő betegek a kritikus állapotú csoportba sorolódtak és elhelyezésük intenzív osztályon történt, míg a 10 alatti pontszámmal rendelkezőket súlyos, de

stabil állapotúnak tekintettük és nyílt osztályra kerültek. Az oxigén-szupplementáció iránti igény és így közvetve a tüdő funkcionális állapota - a SOFA-score-ban reprezentált szervi elégtelenségen kívül - a Horowitz-indexszel került kikalkulálásra, amely a belélegzett gázkeverék oxigén-frakciójából (FiO₂) és a beteg artériás vérében mérhető oxigén-nyomásból számítható ki (PaO₂), mértékegysége Hgmm (vagy kPa). A Horowitz-kvóciens (más néven Pa/Fi index) normális értéke oxigén szupportáció nélkül normál légköri nyomás esetén 350-450 Hgmm. A belélegzett és az artériás vérben mérhető oxigénszint különbség a pulmonális ventilációs és perfúziós kapacitásról árulkodik. Amennyiben akár a tüdőterületek átszellőzése, akár az alveolusoktól történő oxigénszállítás zavart szenved, az a Pa/Fi arány csökkenésében jelenik meg. Az ARDS a légzési elégtelenség legsúlyosabb formája, amelynek definícióját a 2012-ben lefektetett Berlin-kritériumok határozzák meg. A Horowitz-index alapján az ARDS - súlyosságát illetően - három kategóriára osztható: ha a Horowitz index értéke 200-300 Hgmm közötti, enyhe, ha 100-200 Hgmm közötti, közepes, míg 100 Hgmm alatt súlyos ARDS-re utal. A vizsgálataink során kontrollcsoportként bevont bakteriális szepszisben szenvedő betegek esetén a szepszis diagnosztikai kritériumait az Amerikai Tüdőgyógyász és Intenzív Terápiás Társaság kritériumrendszere alapján állapítottuk meg („American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus criteria”).

Paraméter	0	1	2	3	4
Pulmonális funkció - PaO₂/FiO₂ Hgmm (kPa)	≥ 400 (≥53,3)	< 400 (<53,3)	< 300 (<40)	< 200 (< 26,7) légzéstámogatási igény	< 100 (< 13,3) légzéstámogatási igény
Vérlemezkeszám (x 10³/μl)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Májfunkció - össz bilirubin mg/dl (μmol/l)	< 1,2 (20)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	≥ 12 (≥ 204)
Kardiovaszkuláris rendszer aktuális állapota	MAP ≥ 70 Hgmm	MAP < 70 Hgmm	Dopamin < 5* vagy dobutamin támogatás	Dopamin 5,1-15* vagy Epinephrin ≤ 0,1* vagy Norepinephrin ≤ 0,1*	Dopamin ≥ 15* vagy Epinephrin > 0,1* vagy Norepinephrin > 0,1*
Központi idegrendszer (GCS)	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Vesefunkció - kreatinin mg/dl (μmol/l)	< 1,2 (< 110)	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440)	> 5,0 (>440)
Ürített vizelet mennyisége (ml/nap)				< 500	< 200

1. táblázat A SOFA pontrendszer paramétereit. Rövidítések: PaO₂ - „Arterial partial pressure of oxygen”; FiO₂- „Fraction of Inspired Oxygen”; kPa – kiloPascal; GCS – Glasgow Coma Scale; MAP – Mean arterial pressure, *μg/testsúlykilogramm/perc.

A kórházi felvételt igénylő COVID-19 betegek esetén alkalmazott standard terápia a vizsgálat idején érvényben lévő magyarországi szakmai ajánlásnak („2020. évben azonosított új koronavírus [SARS-CoV-2] okozta fertőzések [COVID-19] megelőzésének és terápiájának kézikönyve”) megfelelően történt. Az oxigénterápia, a noninvazív és invazív lélegeztetés a betegek mindenkor oxigényigényének figyelembevételével került bevezetésre. A klinikai állapot progressziójának nyomonkövetését a korábban már bemutatott SOFA-pontrendszer és Horowitz-index rendszeres újraértékelésével végeztük. A betegek demográfiai jellemzői, társbetegségei, a mellkas CT-n látható tüdőérintettség, a terápiás modalitások, a kórházi kezelés hossza és a kimenetel tekintetében a kezelőorvosok által szolgáltatott adatokra hagyatkoztunk.

A szolubilis ACE2 és a HE4 vizsgálatok során kontroll csoportként olyan kritikus állapotú bakteriális szepszises betegeket válogattunk be, akik SARS-CoV-2 RT-PCR tesztje negatív eredményt adott és a bakteriális fertőzés ténye mikrobiológiai módszerekkel igazolva volt. A szepszis diagnózis felállítását az ACCP/SCCM („American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus”) érvényben lévő diagnosztikus kritériumai szerint végeztük. A VCAM-1, Lp-PLA2, E-selectin, P-selectin és CD40L markereket tanulmányozó mérésorozatunk során kontrollként enyhe légúti tüneteket mutató, a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Belgyógyászati Intézetben kórházi kezelésben részesülő, SARS-CoV-2 negatív betegek összegyűjtött szérum/plazmamintáit használtuk.

A kórházi felvételnél, a klinikai szituáció által kívánatos urgens terápiás lépésekkel (oxigénszupportáció, intravénás folyadékpótlás, etc.) együtt, de az inflammációt befolyásolni képes gyógyszeres kezelés megkezdése előtt az összes résztvevőtől alvadásgátolt (szérum) mintavétel, valamint Na-citrátot tartalmazó Vacutainer[®] csövekbe történt perifériás vénás vér (plazma) levétele történt, amelyet lehetőség szerint követéses mintákkal egészítettünk ki a hazabocsátás vagy még az exitus előtt. A kontroll csoportok tagjaitól a kórházi kezelés első 24 órájában történt a mintavétel.

5.2 Vizsgálati módszerek

A rutin laboratóriumi vizsgálatokra a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetben került sor. A már bealvadt vérmintákból a sejtalkotók centrifugálását követően a felülúszó szérumot eltávolítottuk és további feldolgozásig -70° C-on tároltuk. Az alvadásgátolt vérmintákat szintén lecentrifugáltuk, hogy a citrátos plazmát

eltárolhassuk. A fehérvérsejtszámot, a vérlemezkeszámot, a hemoglobin koncentrációt és az átlagos vérlemezke térfogatot (mean platelet volume - MPV) rutin körülmények között egy Advia® 2120 Hematology System automatán (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NJ, USA) határoztuk meg. A C-reaktív protein (CRP), a procalcitonin (PCT), az IL-6, a ferritin, és a cardiac troponin T (cTnT) koncentráció kimutatása elektro-kemilumineszcens immunoassay (Cobas® e411, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) segítségével történt, míg a D-dimer meghatározáshoz immunoturbidimetriás méréseket végeztünk (BCS® XP, Siemens, München, Németország). Az enzimaktivitások vizsgálata (aszpartát-aminotranszferáz [AST] és alanin-aminotranszferáz [ALT], valamint az LDH) és a kreatinin, illetve az urea meghatározása kinetikus kolorimetrikus assay-vel történt Cobas® 6000 analízátor készülék segítségével (Roche Diagnostics). A becsült glomeruláris filtrációs ráta (eGFR) értékét a „CKD-EPI” („Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration”) egyenlete alapján határoztuk meg.

Az LDH egyes izoenzimjeinek aktivitását gélelektroforézis segítségével analizáltuk (LDH Hydragel® 7 kit [Sebia, Norcross, GA, USA]) 8,4 pH-n agaróz gélen. Az elkülönített izoenzim vizualizációja speciális kromogén szubsztráttal történt. A kapott formazán precipitátum mennyisége az LDH izoenzim aktivitásával volt arányos. A félautomata HYDRASYS® elektroforézis készülék (Sebia) segítségével futattuk a mintákat az agaróz gélen. A megszáradt gélről denzitometria segítségével határoztuk meg az egyes izoformák relatív mennyiségét. Az LDH izoenzim arányát a Hydragel® 7 kit gyártó utasításai alapján kalkuláltuk ki. A mérések kivitelezésében Dzsudzsák Erika analitikus (DE, Laboratóriumi Medicina Intézet) nyújtott segítséget.

A szérum ACE2 aktivitás egy „in-house” fluoreszcens kinetikus assay-vel történt, amihez egy specifikus fluoreszcens szubsztrátot alkalmaztunk egy korábbi közleményben bemutatott módszer alapján [108]. A mérések kivitelezésében Dr. Fagyas Miklós egyetemi docens (DE, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) segítségét köszönjük.

A HE4 szérumszint mérése automatizált immunoassay segítségével történt (Architect® i1000SR, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Németország). A minták VCAM-1, E- és P-selectin, valamint CD40L szintjét kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kitek segítségével mutattuk ki a gyártó utasításai alapján (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), míg az Lp-PLA2 detektálása - szintén a gyártó utasításai alapján - egy másik automatizált kemilumineszcens immunoassay-vel történt (Snibe Maglumi® 800, Snibe, Shenzhen, Kína).

5.3 Statisztikai számítások

Az adatok normalitásának vizsgálatára Shapiro-Wilk és Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. Két tanulmányunk lefolytatása előtt a már csak limitált számban elérhető „minta-pool” miatt a méréseket megelőzően az Intercooled Stata v17 program segítségével 90 %-os statisztikai erő és 0,05 α érték mellett meghatároztuk a szignifikáns különbségek kimutatásához szükséges legkisebb mintaszám nagyságát. Korábbi közlemények alapján a HE4 szérumszint mérésekor a súlyos és kritikus állapotú COVID-19 fertőzött csoportok esetében meghatározott középvértéket (145,7 pmol/l, valamint 284,0 pmol/l) és a hozzá tartozó standard deviáció értékét (118,4 pmol/l, valamint 201,6 pmol/l) vettük figyelembe [127], és a legkisebb kívánatos mintaszám alcsoportonként 30-nak bizonyult. A szolubilis E-selectin meghatározás esetén a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel rendelkező intenzív osztályos kohorszok vizsgálatai alapján 33,7 ng/ml, illetve 60,6 ng/ml medián értékek és 25,0–45,5 ng/ml, valamint 49,2–111,6 ng/ml IQR mellett [155], a minimális mintaszám 33 volt. Eredményeinket medián érték (interkvartilis tartomány, IQR) formában fejeztük ki. Két kohorsz mintáinak összehasonlítására Mann-Whitney U tesztet vagy χ^2 tesztet, illetve Fisher-féle egzakt próbát alkalmaztunk. A kórházi kezelés előtti és a követéses minták szérumszintjeinek összevetése Wilcoxon-féle párosított teszttel történt. Kettőnél több csoport összehasonlítása során Kruskal-Wallis tesztet végeztünk Dunn-féle *post-hoc* analízissel. A vizsgált biomarkerek, valamint más klinikai és laboratóriumi paraméterek közötti korreláció kimutatása Spearman teszttel történt, ahogy az össz LDH és az egyes LDH izoenzimek aktivitásai közötti kapcsolat vizsgálata is. A kórházi felvételkor mért biomarker szérumszintek és a Horowitz-index klinikai progresszióra és kimenetelre gyakorolt diszkriminatív erejét ROC görbe („receiver operating characteristic”) analízissel értékeltük az AUC („area under the curve”) érték meghatározásával. A küszöb értékeket a Youden-index maximuma alapján határoztuk meg. Többszörös logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk a vizsgált szérumaktivitások prognózisra és a klinikai kimenetelre gyakorolt hatásának feltárása érdekében, valamint a demográfiai és komorbiditási jellemzők és a rutin laboratóriumi paraméterek, mint függő változók relációinak vizsgálatára. A $p < 0,05$ valószínűségi szintet tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai analízishez GraphPad Prism[®] szoftvert használtunk (6.01 verzió, La Jolla, CA, USA).

6 Eredmények

6.1 *A szolubilis ACE2 aktivitás súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegekben jól korrelál a kórkép súlyosságával, valamint képes előrejelezni a várható kimenetelt*

Egy korábbi tudományos közleményünk alapján a szolubilis ACE2 aktivitás jelentős emelkedése egy súlyos COVID-19 tüdőgyulladásban szenvedő beteg esetében igazolást nyert [108]. Vizsgálataink során ezért egy nagy betegpopulációban még a kórházi kezelést megelőzően a szérumban meghatároztuk az ACE2 aktivitást, és kerestük a klinikai állapot súlyosságával, illetve a kedvezőtlen kimenetellel való összefüggését.

6.1.1 *A vizsgálatban résztvevő súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek demográfiai és anamnesztikus jellemzői*

Ebbe a tanulmányba összesen 176, RT-PCR vizsgálattal igazolt COVID-19 pozitív egyént vontunk be (2. táblázat). A kórházba érkezést követően ún. triázs-vizsgálat során kritikus, illetve súlyos, de stabil állapotú betegekből álló alsocsoportot képeztünk. A 110 kritikus állapotú betegből álló csoport átlagéletkora magasabb volt, mint a 66 enyhébb klinikai tüneteket mutató kohorszé (medián [IQR] 67 [59-76] év vs. 61 [52-65] év; $p < 0,0001$), a nemek arányában különbség nem mutatkozott. A kórházi kezelés időtartamában szignifikáns különbség nem volt (medián [IQR] 10 [5-19] nap vs. 8 [6-12] nap; $p = 0,1517$). Gépi lélegeztetési igényben jelentős differencia mutatkozott a két csoport között (96 fő a kritikus állapotú csoportban szemben a súlyos állapotú COVID-19 betegek esetében talált 6 fővel). A kimenetel tekintetében is szignifikáns eltérést detektáltunk, miszerint a kritikus állapotú betegek körében 78,2% volt az elhalálozás aránya, míg a súlyos állapotú betegeknek csupán 4,5%-a mutatott kedvezőtlen prognózist ($p < 0,0001$). A szérumban ACE2 meghatározással párhuzamosan a rutin laboratóriumi paraméterek vizsgálatára is sor került a kórházi kezelést megelőzően. A kritikus állapotú COVID-19 betegek csoportjában a gyulladáshoz kapcsolódó laborparaméterek úgy, mint a CRP, IL-6, szérumban ferritin és fehérvérsejtszám jelentősen magasabbnak bizonyultak. A szakirodalmi megfigyelésekkel ellentétben [156-158] esetünkben a vérlemezkeszámban jelentős eltérés a két kohorsz között nem igazolódott.

	Kritikus állapotú COVID-19 betegek (n=110)	Súlyos állapotú COVID-19 betegek (n=66)	Nem COVID-19 eredetű súlyos szepszikus betegek (n=32)
Antropometriai és klinikai adatok			
Életkor (évek) (medián, IQR)	67 (59-76) *	61 (52-65) §	68 (52-75)
Nem (Férfi/Nő)	68/42	39/27	21/11
Kórházi kezelés időtartama (nap)	10 (5-19)	8 (6-12)	9 (5-14)
Gépi lélegeztetés (volt/nem volt, %)	96/14 (87,3) *.#	6/60 (9,1) §	20/12 (62,5)
SOFA-pontszám	12 (10-13) *	4 (3-8) §	10 (5-11)
Horowitz index (Pa/Fi, Hgmm)	103 (71-160) *.#	147 (89-222) §	243 (182-384)
Mortalitás (n, %)	86 (78,2) *.#	3 (4,5) §	21 (65,6)

Laboratóriumi paraméterek			
CRP (mg/l) (medián, IQR)	173,2 (116,7-256,3) *	101,9 (34,2-221,6) §	162,1 (102,0-205,3)
PCT (µg/l)	0,6 (0,26-3,41) *.#	0,06 (0,05-0,30) §	9,1 (3,8-26,5)
IL-6 (ng/l)	96,8 (37,8-242) *.#	35,2 (4,1-63,7) §	351,9 (47,2-3832,0)
Ferritin (µg/l)	1038 (577,3-1753) *	648,9 (350,2-950,3)	n.a.
Kreatinin (µmol/l)	112 (80-164) *.#	88 (73-101) §	208 (95-335)
Urea (mmol/l)	9,5 (6,5-15,6) *	5,9 (4,5-7,5) §	11,5 (7,5-25,6)
AST (U/l)	49 (34-67) *	37,5 (27,2-49,5)	44 (23-151)
ALT (U/l)	37 (22-69)	36 (23-50) §	30 (15-117)
LDH (U/l)	812 (574-1095) *.#	545 (385-747) §	337 (239-486)
cTnT (ng/l)	26,4 (10-105) *	10 (10-11)	n.a.
Fehérvérsejtszám (G/l)	10,2 (6,9-13,9) *.#	6,9 (5,4-9,6) §	12,9 (8,1-20,7)
Hemoglobín (g/l)	129,5 (114-144) *.#	137,5 (127-149) §	112 (88-131)
Vérlemezkeszám (G/l)	238 (163-320) #	224 (155-282) §	174 (66-225)
MPV (fl)	8,3 (7,6-9,5) *.#	7,8 (6,9-8,6) §	11,6 (10,1-12,1)

Társbetegségek			
Magasvérnyomás (igen/nem, %)	98/12 (80,9) *.#	44/22 (66,7)	20/12 (62,5)
Cukorbetegség	41/69 (37,3)	19/47 (28,8)	10/22 (31,2)
Kardiális dekompenzáció	40/70 (36,4) *	10/56 (15,2) §	12/20 (37,5)
COPD	21/89 (19,1)	8/58 (12,1)	4/28 (12,5)
Pitvarfibrilláció	43/67 (39,1) *.#	8/58 (12,1) §	9/23 (28,1)
Veseelégtelenség	34/76 (30,9) *	9/57 (13,6) §	11/21 (34,4)

Kezelés			
Antivirális kezelés (igen/nem, %)	104/6 (94,5) #	63/3 (95,4) §	0/32 (0)
Azithromycin	97/13 (88,2) *.#	22/44 (33,3) §	0/32 (0)
Egyéb antibiotikum	98/12 (89,1) *	44/22 (66,7) §	32/0 (100)
Kortikosteroidok	37/73 (33,6) *.#	13/53 (19,7)	5/27 (15,6)
Dexamethasone	97/13 (88,2) *.#	22/44 (33,3) §	0/32 (0)
LMWH	79/31 (71,8) *.#	24/42 (36,4) §	17/15 (53,1)

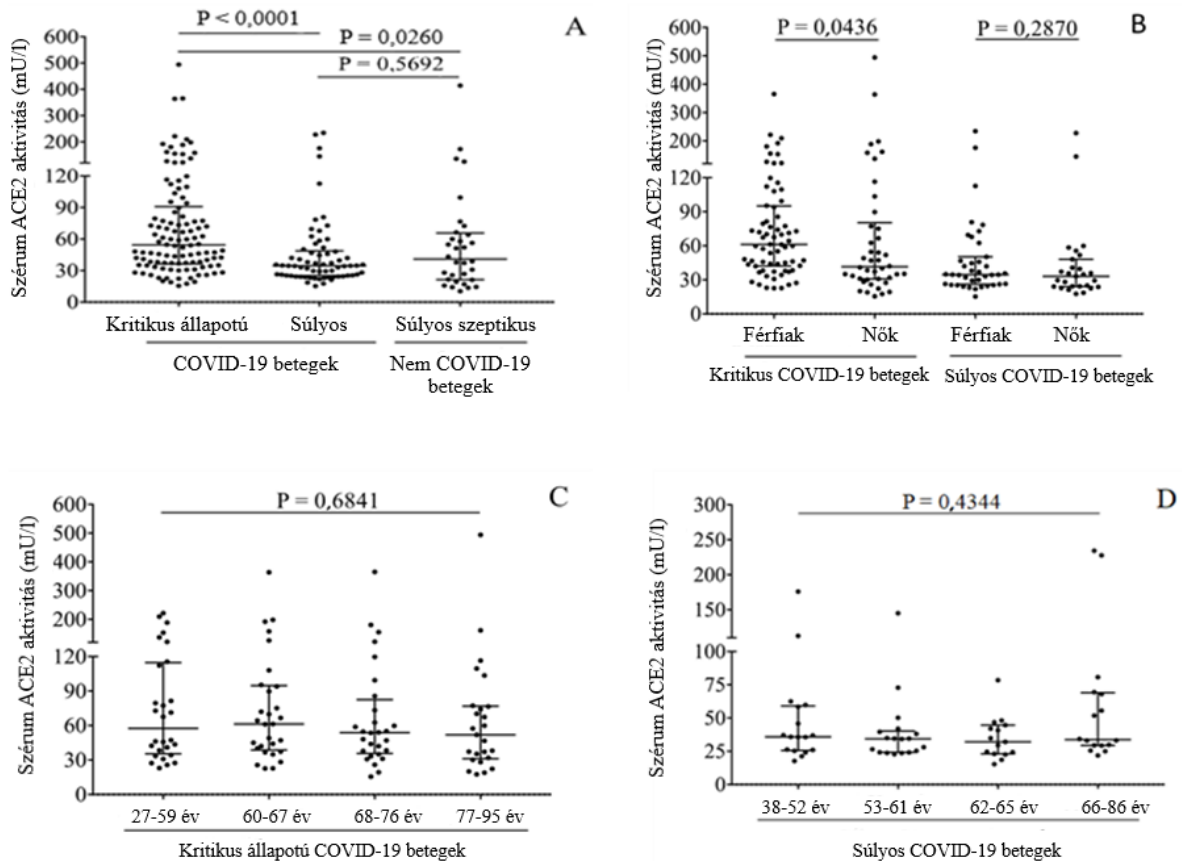
2. táblázat A vizsgálatba beválogatott összesen 176 COVID-19 beteg demográfiai jellemzői, kiindulási klinikai és laboratóriumi paramétereit. A statisztikailag szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) az egyes alcsoportok között különböző szimbólumokkal jelöltük: * = szignifikáns eltérés a kritikus állapotú COVID-19 csoporthoz képest, # = a súlyos COVID-19 csoporthoz képest, illetve § = a non-COVID-19 szepszikus kohorsz adataihoz képest. Rövidítések: CRP: C-reaktív protein, PCT: procalcitonin, IL-6: interleukin-6, AST: aszpartát-aminotranszferáz, ALT: alanin-aminotranszferáz, LDH: laktát dehidrogenáz, cTnT: „cardiac troponin T”, MPV: „mean platelet volume”, COPD: „chronic obstructive pulmonary disease”, LMWH: „low molecular weight heparin”, n.a.: nincs adat.

A kor és a nemi eloszlás alapján a súlyos állapotú COVID-19 csoporthoz illesztett nem COVID-19 etiológiájú súlyos szeptikus betegek az előbbiekhöz hasonló SOFA-értékekkel rendelkeztek, noha a mortalitási arányuk elmaradt a súlyos COVID-19 csoporthoz képest. Azon betegek esetén, akiknél súlyos fokú légzési elégtelenség állt fenn, Horowitz-indexet számoltunk a pulmonális funkció és az oxigenizációs kapacitás dinamikus meghatározása érdekében. A kritikus állapotú, előrehaladott ARDS-ben szenvedő COVID-19 betegek körében (103 [71-160] Hgmm, $p < 0,0001$) szignifikánsan alacsonyabb kvócienszt számítottunk, mint a súlyos, de nem kritikus COVID-19 betegekben (147 [89-222] Hgmm, $p < 0,0001$), vagy a nem COVID-19 etiológiával bíró szeptikus betegek (243 [182-384] Hgmm) esetében.

6.1.2 A kórházi felvételnél mért ACE2 szérumaktivitás és a COVID-19 betegség súlyossága közötti kapcsolat

A kórházi felvételnél meghatározott ACE2 szérumaktivitás szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a kritikus állapotú COVID-19 betegek alkotta csoportban (54,4 [36,7-90,8] mU/l), mint a súlyos tünetekkel rendelkező betegek körében (34,5 [25,2-48,7] mU/l, $p < 0,0001$), valamint a nem COVID-19 etiológiával bíró súlyos szeptikus betegek esetén (40,9 [21,4-65,7] mU/l; $p = 0,0260$) az alapbetegségekre való tekintet nélkül (5/A. ábra). A koronavírus fertőzöttek körében megvizsgáltuk, hogy az életkor és a nem közvetlen hatással rendelkeznek-e a szérum ACE2 szintre (5/B-D. ábra). Megfigyeléseink során azt találtuk, hogy az ACE2 szignifikánsan magasabb szérumszintet mutatott a férfiak esetében a kritikus állapotú betegek körében ($p = 0,0436$), noha hasonló különbséget a súlyos klinikai tünetekkel rendelkező COVID-19 betegek csoportjában nem tudtunk kimutatni ($p = 0,2870$). Az életkor előrehaladtával a teljes betegpopuláció vizsgálata során emelkedő tendenciát detektáltunk az ACE2 aktivitás tekintetében ($p = 0,0134$) a tünetek súlyosságától függetlenül, míg a klinikai tünetek szerint differenciált csoportokat egyenként analizálva a fenti összefüggést egyik esetben sem tudtuk kimutatni ($p = 0,6841$, illetve $p = 0,4344$ külön a kritikus és a súlyos állapotú betegek csoportjaiban). A fenti megfigyelés alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az ACE2 szérumszintet inkább a tünetek súlyossága, mintsem az életkor befolyásolta. Mindemellett Spearman-analízis során sem mutatkozott összefüggés a kórházi felvételnél mért ACE2 aktivitás és a betegek életkora között ($r = 0,074$, $p = 0,3279$). Végül górcső alá vettük a kiindulási szolubilis ACE2-t és a klinikai rutinban vizsgált laboratóriumi paraméterek szintje közötti kapcsolatot, relációt keresve a koronavírus fertőzés okozta szív- és érrendszeri, máj- és

vesekárosodáshoz vezető generalizált gyulladási állapot és az ACE2 felszabadulása között. A vizsgálati eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az általunk mért kiindulási szolubilis ACE2 aktivitás erős korrelációt mutatott a COVID-19 betegség klinikai súlyosságával, mindamellett, hogy az aktivitásfokozódás nem tekinthető specifikusnak a SARS-CoV-2 infekcióra.

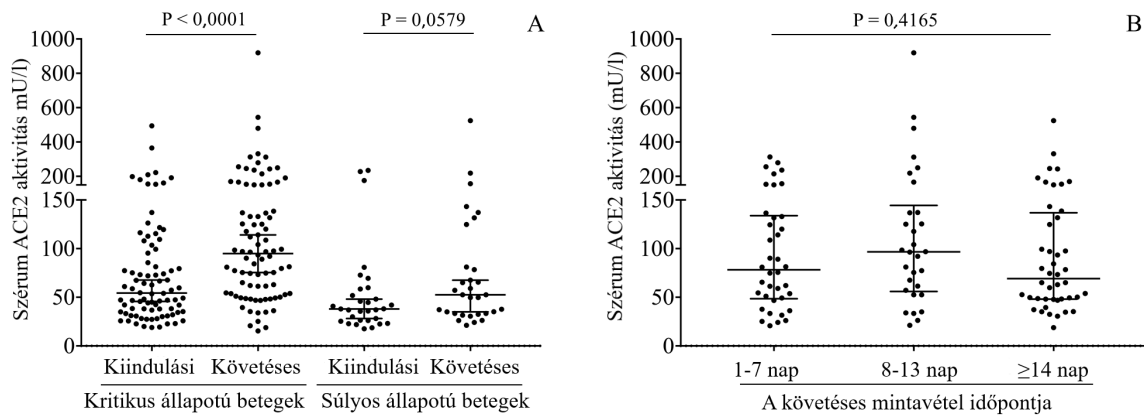


5. ábra A kiindulási ACE2 szérumaktivitás összehasonlítása kritikus és súlyos állapotú COVID-19 betegek, illetve súlyos bakteriális szepszisben szenvedő páciensek között (A). A nem (B), valamint az életkor befolyásoló hatása (C és D) a kezelés előtti ACE2 aktivitás értékeire a két COVID-19 beteg alcsoportban.

6.1.3 Az ACE2 szint változása a kórházi kezelés alatt a kritikus állapotú és a súlyos COVID-19 betegségben szenvedők körében

A vizsgálatunkba beválogatott betegek egy jelentős részénél módunkban állt nem csupán a kórházi felvételt megelőzően, hanem a kezelés során is úgynevezett utánkövetéses ACE2 vizsgálatot végezni (6/A. ábra). Eredményeink szerint a kritikus állapotú COVID-19 betegeket magába foglaló csoportban további szignifikáns szérumszint emelkedés ($p < 0,0001$) volt detektálható a kiindulási értékekhez képest az adekvát kórházi kezelés ellenére, míg a

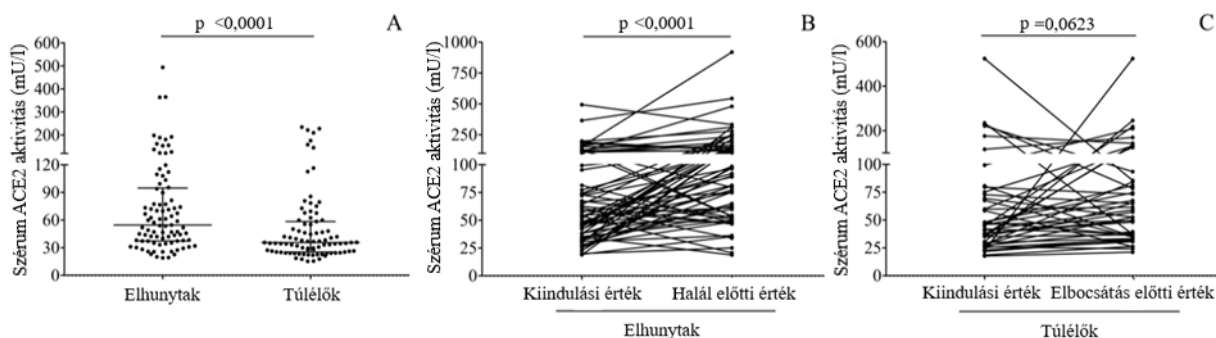
súlyos klinikai manifesztációval rendelkező betegek csoportjában a hospitalizáció alatt statisztikailag szignifikáns szérumszint emelkedést nem tudtunk kimutatni ($p = 0,0579$). Mindemellett hasonló ACE2 szérumszint értékeket mértünk a kórházi kezelést megelőzően, mint a terápia első, második vagy harmadik hetében levett mintákban ($p = 0,4165$) (6/B. ábra). Összességében elmondhatjuk, hogy vizsgálati csoportunkban jelentős és egyben tartósan magas szolubilis ACE2 szérumszint emelkedés észlelhető a kritikus állapotú COVID-19 betegek esetében.



6. ábra A súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek szérum ACE2 aktivitás értékeinek változásai a kórházi kezelés alatt (A). Külön is megvizsgáltuk, hogy a mintavétel időpontja mennyire befolyásolta az ACE2 aktivitás értékeit (B).

6.1.4 Az összefüggés keresése a szolubilis ACE2 és a COVID-19 betegség kimenetele között

A továbbiakban a szolubilis ACE2 SARS-CoV-2 fertőzés esetén játszott potenciális prognosztikai szerepét helyeztük az érdeklődésünk középpontjába. A kórházi kezelés kimenetelének ismeretében megállapítottuk, hogy a betegség miatt elhunyt vizsgálati egyének esetében szignifikánsan magasabb kiindulási ACE2 szérumaktivitás volt kimutatható (54,6 [37,3-94,7] mU/l), mint a kedvező kimenetellel rendelkező páciensek esetén (35,6 [25,3-58,5] mU/l, $p < 0,0001$) (7/A. ábra). Ezt követően összevetettük az utánkövetés során mért szérumszinteket ugyanazon betegek kiindulási értékeivel annak érdekében, hogy lássuk a szolubilis ACE2 kinetikájának változását a kórkép előrehaladtával.

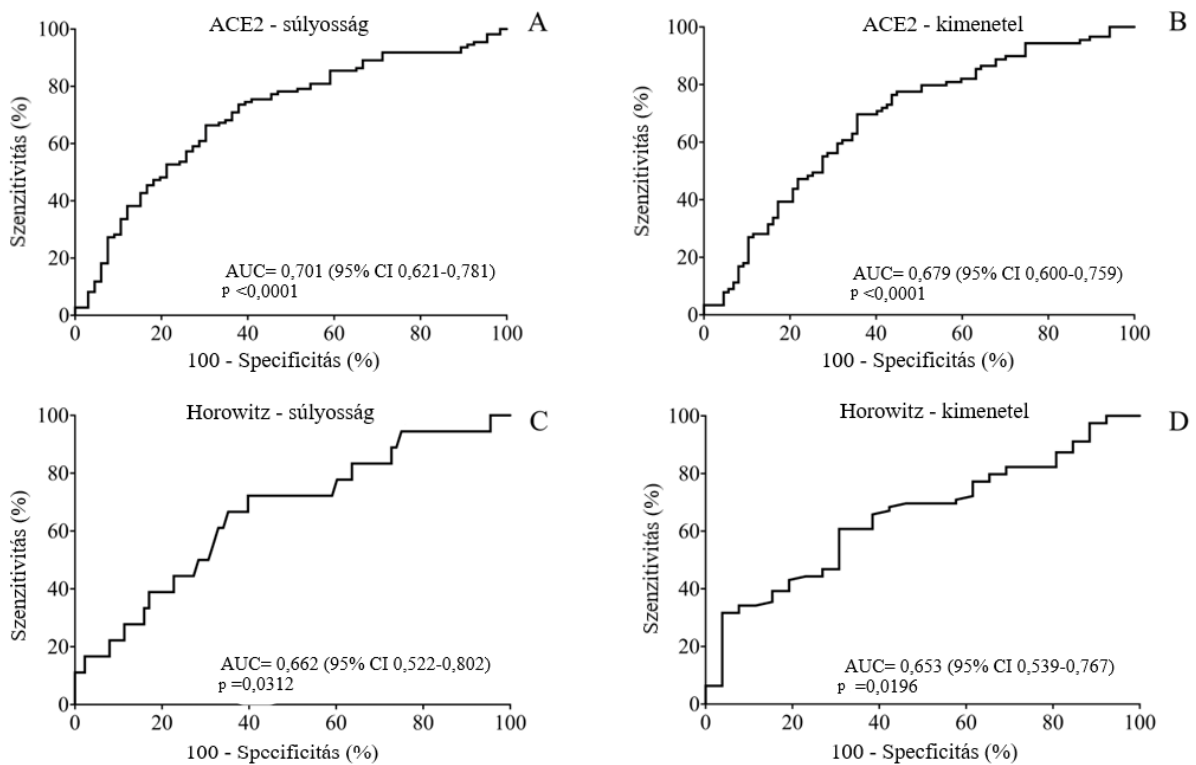


7. ábra A szérumszintű ACE2 aktivitás értékeinek összehasonlítása az eltérő kimenetet mutató betegekben (A), valamint a kórházi kezelés alatti kinetika követése az elhunyt és a túlélő betegek csoportjában (B és C).

Ebben a megközelítésben láthatóvá vált, hogy a kedvezőtlen kimenettel rendelkező betegek – függetlenül a SARS-CoV-2 fertőzés klinikai súlyosságától – szignifikáns további ACE2 szérumszint emelkedést produkáltak a kórházi kezelés ellenére gyakorlatilag az elhalálozás előtt ($p < 0,0001$), míg a COVID-19 betegségből felépülő egyéneknél nem láttunk szignifikáns változást a hazabocsátást megelőző ACE2 szérumszintekben a kezdeti értékekhez képest ($p = 0,0623$) (7/B-C. ábra). A fenti eredményeket áttekintve megállapítható, hogy szoros reláció állt fenn a szolubilis ACE2 szérumszint és a COVID-19 várható kimenetele között.

6.1.5 A kiindulási szolubilis ACE2 aktivitás elemzése a COVID-19 klinikai manifesztáció súlyosságának és a betegség kimenetelének előrejelzésére

A kórházi kezelést megelőzően mért szolubilis ACE2 szérumszint prognosztikai szerepének további vizsgálatára ROC-görbe elemzést végeztünk. A Youden-index alapján a betegség súlyosságának előrejelzésében a kiindulási ACE2 szérumszint legjobb küszöbértékének 45,4 mU/l bizonyult 60%-os szenzitivitás és 71,2%-os specificitás, valamint 0,701-es AUC érték (95% CI [0,621-0,781], $p < 0,0001$) mellett. Megegyező “cut-off” értéket alkalmazva a kiindulási szolubilis ACE2 szérumszint 61,8%-os szenzitivitás és 65,5%-os specificitás és az előzőekhez hasonlóan magas AUC érték mellett [0,679 (95% CI [0,600-0,759], $p < 0,0001$)] képes volt előrejelezni a várható mortalitást (8/A-B. ábra).



8. ábra A kiindulási szérumban ACE2 aktivitás (A és B), illetve a Horowitz-index (C és D) a COVID-19 betegség súlyosságára és kimenetelére gyakorolt hatásának vizsgálata ROC analízissel.

Külön logisztikus regressziós analízist is végeztünk annak tisztázására, hogy vajon a kiindulási ACE2 aktivitás független prediktív faktornak tekinthető-e a klinikai manifesztáció súlyosságának tekintetében. A magasabb kiindulási ACE2 szérumban aktivitás szignifikánsan magasabb “odds ratio”-val rendelkezett a súlyosabb kimenetelre vonatkozóan (OR: 1,032, 95% CI [1,005-1,061], $p = 0,019$). Továbbá a ferritin, a kreatinin, az össz fehérvérsejtszám és lymphocytaszám, a hemoglobin, illetve az MPV értéke mutatott statisztikailag szignifikáns valószínűségi rátát (OR) a COVID-19 fertőzés súlyosságának előrejelzésében. Összegzésképpen a fenti adatok alátámasztják az ACE2 szérumban aktivitás prediktív szerepét a SARS-CoV-2 fertőzés által okozott, kórházi kezelést igénylő tünetegyüttes kedvezőtlen kimenetele tekintetében.

6.1.6 A kóros Horowitz-index és szérumban ACE2 szint relációja súlyos COVID-19 betegségben

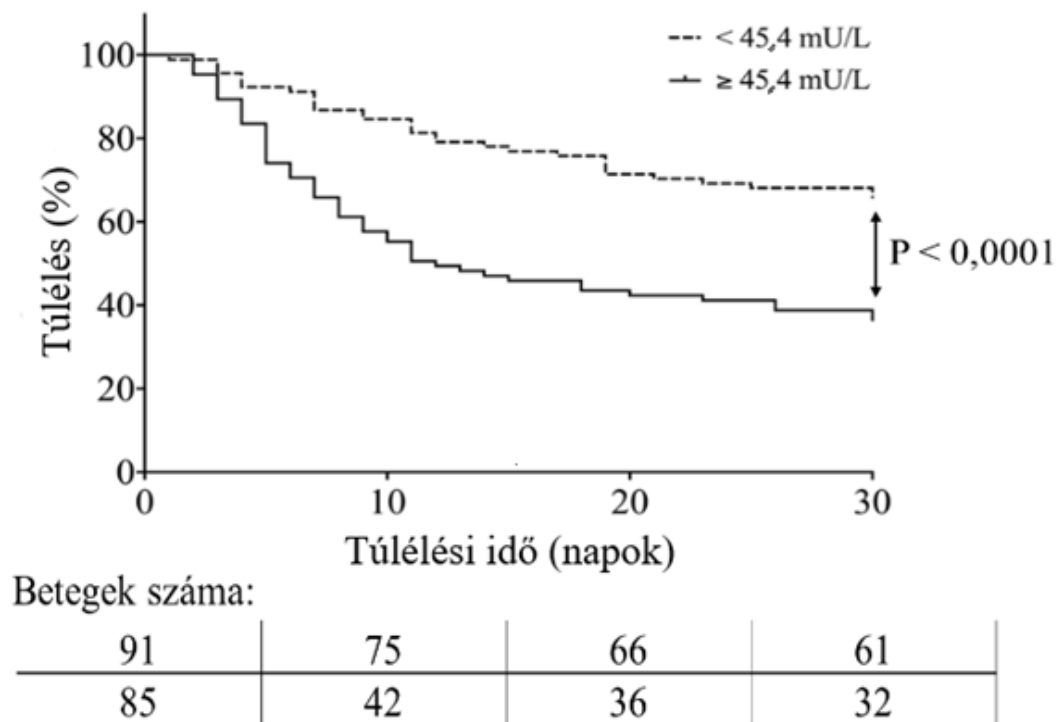
Ahogy korábban már említettük, az úgynevezett Pa/Fi arány vagy Horowitz-index szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az általunk vizsgált kritikus állapotú COVID-19

betegségben szenvedő betegekben ($p = 0,0306$) a súlyos állapotú csoport értékeivel összevetésben. Ezt a klinikai állapot jellemzésére is jól használható attribútumot a betegség kimenetelének függvényében megvizsgálva azt láthattuk, hogy a kezelés során elhunyt betegek esetén szignifikánsan alacsonyabb értékeket detektáltunk, mint a kedvező kimenetellel rendelkező betegek esetén ($100,5 [66,3-160]$ Hgmm vs. $142 [90,7-200,3]$ Hgmm, $p = 0,0180$). A továbbiakban a Pa/Fi arányszám ROC-görbe elemzését végeztük (8/C-D. ábra), mely során a betegség súlyosságának előrejelzése szempontjából a legjobb küszöbértéknek 129 Hgmm bizonyult $66,7\%$ -os szenzitivitás, valamint $64,8\%$ -os specificitás, továbbá $0,662$ -es AUC érték mellett (95% CI $[0,522-0,802]$, $p = 0,0312$). Azonos "cut-off" értéket használva, a Horowitz-kvóciens a kedvezőtlen kimenetelt $65,8\%$ -os szenzitivitás és $61,5\%$ -os specificitás, valamint $0,653$ -es AUC érték (95% CI $[0,539-0,767]$, $p = 0,0196$) mellett volt képes előrejelezni.

Meglepő módon, az ACE2 szérumszint és a Horowitz-index közötti kapcsolat vizsgálata során nem tudtunk szoros relációt kimutatni a két paraméter között: a teljes vizsgálati csoportban: $r = 0,045$, $p = 0,6417$; a kritikus állapotú COVID-19 alcsoportban: $r = 0,0342$, $p = 0,7517$. Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy bár a Pa/Fi arányszám COVID-19 betegségben is hasznos klinikai paraméter a tüdő funkcionális állapotváltozásának nyomon követésére, mégis a COVID-19 betegségben tapasztalt megnövekedett ACE2 expresszióval közvetlen kapcsolata ebben a vizsgálati csoportban nem volt megállapítható.

6.1.7 A 30 napos mortalitás előrejelzése a kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegekben a kiindulási ACE2 szérumaktivitása alapján

A vizsgálatunkba beválogatott 176 SARS-CoV-2 pozitív beteg közül a 30 napos utánkövetéses időszak során 89 ($50,6\%$) fő elhunyt. A korábban részletezett eredmények alapján szignifikáns különbség volt tapasztalható a kedvező és a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező egyének kiindulási ACE2 szérumaktivitás értékei között, továbbá a biomarker kimenetelt előrejelző képességét ROC analízis igazolta. A korábban meghatározott küszöbértékkel elvégzett Kaplan-Meier elemzés szignifikánsan magasabb mortalitási valószínűséget mutatott az emelkedett kiindulási ACE2 szérumszinttel ($\geq 45,4$ mU/l) rendelkező COVID-19 betegek esetében azon páciensekhez képest, akiknek a kórházi felvételkor mért szérumaktivitása nem érte el ezt a cut-off értéket ($37,2\%$, illetve $64,7\%$, Log-Rank $p < 0,0001$) (9. ábra).



30 napos mortalitás		
Alacsony ACE2	Magas ACE2	Log-Rank P
37,3%	64,7%	<math>< 0,0001</math>

9. ábra Kaplan-Meier analízis az emelkedett kiindulási szérums ACE2 aktivitás és a 30 napon belüli mortalitás közötti reláció tekintetében. A görbe alatt az egyes időpontokban (0-30 nap) megállapított betegszám került feltüntetésre.

Összességében elmondható, hogy a kórházi kezelést megelőzően mért szolubilis szérums ACE2 aktivitás hasznos biomarker lehet a COVID-19 betegség klinikai manifesztáció súlyosságának és a várható kimenetel előrejelzésében.

6.2 A HE4 megemelkedett szérumszintje képes előrejelezni a COVID-19 tünetek súlyosságát és a betegség mortalitását

Munkacsoportunk korábbi, a cisztás fibrózis progressziójában és a CFTR-specifikus terápia hatékonyságának megítélésében a HE4 szint mérésével végzett ígéretes eredményeinek birtokában [120,159,160] vizsgáltuk az ugyancsak progresszív tüdőkárosodást okozó, kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegség esetében a szérumban detektálható HE4 fehérje mennyiségét. Retrospektív analízisünk során az alábbi kérdéseinkre kerestük a választ: i) vajon a kórházba került betegek terápia előtt mért HE4 szérumszintje összefüggést mutat-e a klinikai állapotuk súlyosságával; ii) látható-e tendenciózus változás a fehérje szérumszintjében a betegség progressziójával párhuzamosan; iii) kimutatható-e a HE4 relációja a klasszikus gyulladásos biomarkerek szintjével, illetve a tüdőérintettség mértékével; és iv) megjósolható-e a kiindulási HE4 szérumszint segítségével az intenzív terápiát igénylő, kritikus állapotú betegek várható kimenetele.

6.2.1 A klinikai vizsgálatba bevont betegcsoportok legfontosabb demográfiai jellemzői

Ezen vizsgálatunk során összesen 99 tartós vagy átmeneti kórházi kezelést igénylő, RT-PCR vizsgálattal igazolt SARS-CoV-2 pozitív egyén vérmintája állt rendelkezésünkre. Ebből 40 kritikus állapotú, további 40 súlyos klinikai manifesztációval rendelkező, illetve 19 enyhe tüneteket mutató beteg kórházi felvételkor és a betegek egy részénél a kezelés során nyert szérummintáját is vizsgálhattuk (3. táblázat). A mintavétel időpontjában egyetlen, a vizsgálatba beválogatott betegnél sem volt kimutatható bakteriális koinfekció. Kor és nemi eloszlás tekintetében nem mutatkozott különbség az alsó csoportok között, továbbá a kórházban töltött napok számában sem találtunk eltérést a kritikus állapotú és a súlyos COVID-19 kohorsz között (medián [IQR], 9,5 [6-18] nap vs. 10 [6-13] nap). A gépi lélegeztetési igény nem meglepő módon a kritikus állapotú betegcsoportban szignifikánsan magasabbnak bizonyult (37, illetve 2 beteg, $p < 0,0001$). Emellett a kedvezőtlen kimenetel aránya is jelentős eltérést mutatott (90% vs. 7,5%, $p < 0,0001$). Az általános gyulladásos szérummarkerek tekintetében a CRP, a PCT, az IL-6, a ferritin és a fehérvérsejtszám volt szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$, illetve $p < 0,0001$) a kritikus állapotú COVID-19 csoportban a súlyos állapotú betegek értékeihez képest, míg a vérlemezkeszámban nem tudtunk markáns különbséget kimutatni a két kohorsz között. A gépi lélegeztetési igénnyel összhangban a Horowitz-index is jelentősen alacsonyabbnak

bizonyult a kritikus állapotú betegek csoportjában a súlyos COVID-19 manifesztációval rendelkező betegek csoportjával szemben (95 [65-139] Hgmm vs. 154 [100-277] Hgmm, $p < 0,001$).

Változók	Kritikus állapotú COVID-19 betegek (n=40)	Súlyos állapotú COVID-19 betegek (n=40)	Enyhe tünetes COVID-19 betegek (n=19)	Kritikus állapotú, bakteriális szepszises betegek (n=25)
Antropometriai és klinikai adatok				
Életkor (évek) (medián, IQR)	65 (55-75)	61 (52-66)	63 (56-72)	68 (49-74)
Nem (Férfi/Nő)	23/17	26/14	7/12	14/11
Kórházi kezelés időtartama (napok) (medián, IQR)	9,5 (6-18)	10 (6-13)	0	10 (7-12,5)
Gépi lélegeztetés (igen/nem, %)	37/3 (93)***	2/38 (5)	-	11/14 (44)#
SOFA-pontszám	12 (10-14)***	7 (3-10)	-	9 (5-10)
Horowitz index (P/F, Hgmm) (medián, IQR)	95 (65-139)**	154 (100-277)	-	n.a.
Tüdőérítettség a mellkas CT alapján (%) (medián, IQR)	70 (55-80)*	55 (25-70)	-	n.a.
Mortalitás (fő, %)	36 (90)***	3 (7,5)	0 (0)	11 (44)#

Laboratóriumi paraméterek				
CRP (mg/l)	180 (131-271)**	112 (30-241)	2,3 (0,9-12,8)***	175 (142-263)
PCT (µg/l)	0,5 (0,3-2,9)***	0,05 (0,05-0,21)	n.a.	9,0 (4,5-26,5)###
IL-6 (ng/l)	96,5 (38,8-330)***	38,7 (3,8-52,0)	n.a.	162 (61,9-835,3)
Ferritin (µg/l)	1271 (776-2455)***	613 (345-1031)	167 (30-468)**	n.a.
Urea (mmol/l)	8,6 (6,2-13,8)***	5,5 (4,3-6,7)	5,3 (4,9-6,0)	12,7 (10,1-19,8)##
Kreatinin (µmol/l)	109,0 (82,5-159,8)**	87,0 (79,3-98,5)	66,0 (59,0-78,0)‡	219 (93,5-313,5)#
GFR CKD-EPI (ml/min/1,73 m ²)	59,5 (36,2-71,5)*	67,0 (60,0-77,8)	88,0 (73,2-90,0)‡	22,0 (15-58)#
AST (U/l)	49,0 (38,5-55,8)*	36,5 (27,3-50,3)	19,5 (15,0-25,3)‡	45,0 (22,5-181)
ALT (U/l)	36,5 (23,0-69,0)	36,0 (26,3-54,0)	22,0 (14,5-29,8)‡	42,0 (13,5-193,5)
LDH (U/l)	781 (674-1083)***	530 (393-748)	192 (179-244)††	326 (251-455)###
Fehérvérsejtszám (G/l)	9,1 (6,6-13,8)*	6,7 (5,4-10,1)	7,8 (5,9-9,5)	13,9 (7,7-19,8)#
Hemoglobin (g/l)	131 (119-147)	140 (127-151)	136 (131-150)	108 (93-127)###
Thrombocytaszám (G/l)	237 (162-293)	213 (149-269)	239 (177-307)	174 (61-224)#
MPV (fl)	8,3 (7,6-9,9)	8,1 (7,2-8,8)	9,2 (7,8-10,8)	11,7 (10,5-12,3)###
ACE2 aktivitás (mU/l)	50,5 (32,6-80,4)**	34,7 (25,4-49,7)	n.a.	n.a.

Társbetegségek				
Magasvérnyomás (igen/nem, %)	37/3 (93)*	28/12 (70)	13/6 (68)	19/6 (76)##
Diabetes mellitus	10/30 (25)	12/28 (30)	3/16 (16)	12/13 (48)
Kardiális dekompenzáció	14/26 (35)	8/32 (20)	0/0 (0)	5/20 (20)
Pitvarfibrilláció	12/28 (30)*	4/36 (10)	0/0 (0)	7/18 (28)
Veseelégtelenség	13/27 (32,5)**	3/37 (7,5)	0/0 (0)	14/11 (56)

3. táblázat A kritikus, a súlyos és az enyhe tüneteket mutató COVID-19 betegek, illetve a kritikus állapotú, bakteriális szepszisen szenvedő betegek főbb demográfiai és klinikai jellemzői, valamint kiindulási laboratóriumi értékei. Az egyes alcsoportok közötti szignifikáns eltéréseket és azok mértékét a következő szimbólumok jelölik: *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ a kritikus és súlyos állapotú COVID-

19 betegek csoportja között; ###p < 0,0001, ##p < 0,001, #P < 0,05 a kritikus állapotú COVID-19 és bakteriális szepszisben szenvedő betegek kohorszai között; ###p < 0,0001, ##p < 0,001, ‡P < 0,05 a súlyos és enyhe tünetekkel rendelkező COVID-19 alcsoportok között. Rövidítések: SOFA-score: “Sequential Organ Failure Assessment score”, CRP: C-reaktív protein, PCT: procalcitonin, IL-6: interleukin-6, GFR-CKD-EPI: “Glomeruláris filtrációs ráta” AST: aszpartát transzamináz, ALT: alanin aminotranszferáz, LDH: laktát-dehidrogenáz, MPV: “mean platelet volume”, ACE2: Angiotenzin konvertáló enzim 2, n.a.: nincs adat.

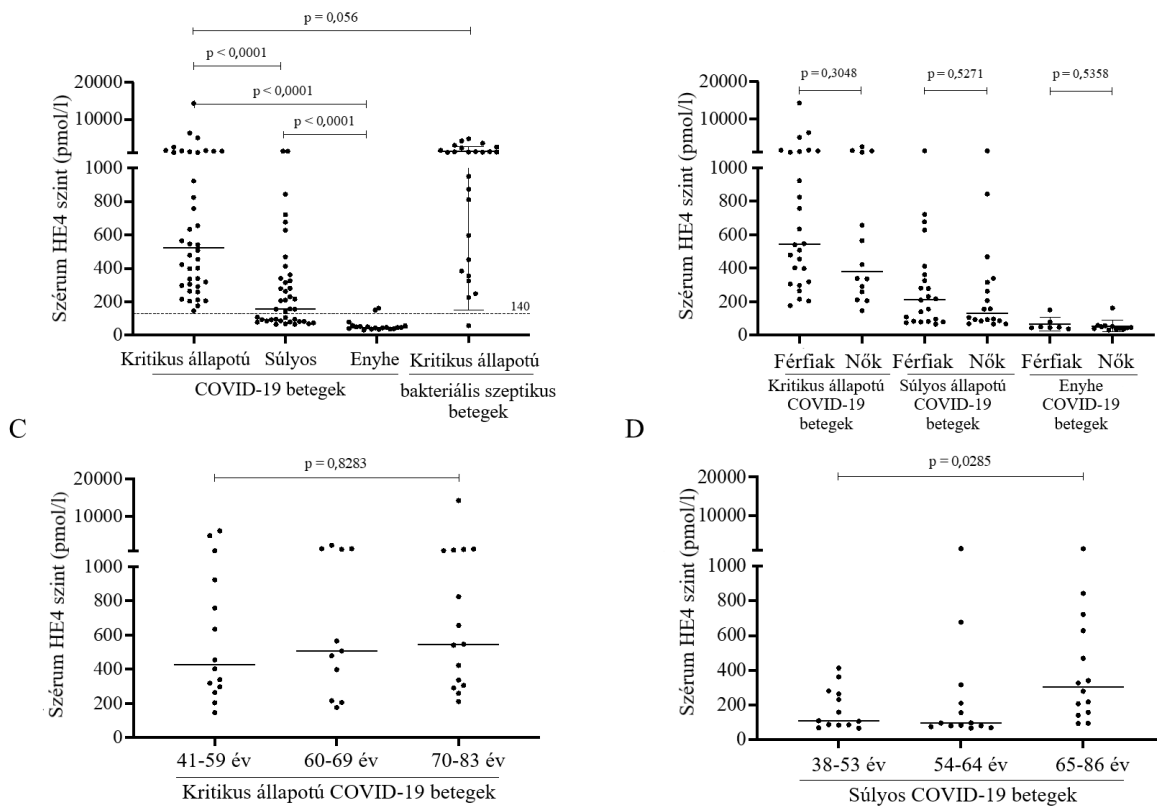
Mindemellett jelentős differencia volt látható a CRP, a ferritin és az össz LDH aktivitás vonatkozásában a súlyos és az enyhe tüneteket mutató COVID-19 alcsoportok között.

A Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet Intenzív Osztályának jóvoltából a SARS-CoV-2-pozitív egyének mellé kontrollcsoportként korban és nemi eloszlásban a kritikus állapotú COVID-19 kohorshoz illesztett, 25 főből álló, bakteriális szepszisben szenvedő betegcsoport mintái álltak rendelkezésünkre. A szeptikus betegek kétharmada pozitív hemokultúrával (pl. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* stb.) bírt. A kritikus állapotú COVID-19 betegcsoporttal összevetve a SOFA-pontérték esetükben alacsonyabbnak bizonyult (12 [10-14] vs. 9 [5-10], p < 0,0001), viszont jelentősen magasabb PCT, fehérvérsejtszám és MPV, valamint alacsonyabb vérlemezkeszám és szignifikánsan rosszabb vesefunkciós értékek voltak detektálhatók a bakteriális szepszissel bíró kontrollok körében. Ellenben, a kedvezőtlen kimenetel aránya alacsonyabbnak adódott a körükben a kritikus állapotú COVID-19 betegcsoport adataihoz képest.

6.2.2 *A magas kiindulási szérumszint HE4 szint erős korrelációt mutat a COVID-19 súlyos klinikai manifesztációival*

A vizsgálatba bevolt összes COVID-19 és szeptikus beteg esetében elvégeztük a kezelés megkezdése előtt levett szérumminták HE4 szintjének meghatározását (10/A. ábra). Méréseink szerint a kritikus állapotú COVID-19 betegek HE4 szérumszintje szignifikánsan magasabbnak adódott, mint a súlyos vagy enyhe tünetekkel bíró egyéneknél (p < 0,0001). Fontos megjegyezni, hogy a kritikus állapotú betegek mintáiban kivétel nélkül a tesztleírás alapján megállapított normálértéket jócskán meghaladó mértékben tudtunk HE4 szintet detektálni, míg a súlyos állapotú betegek mintáinak 45%-a esetében a kimutatott fehérje mennyiség megfelelt a posztmenopauza időszakában elfogadott referenciatartománynak, mindösszesen két beteg

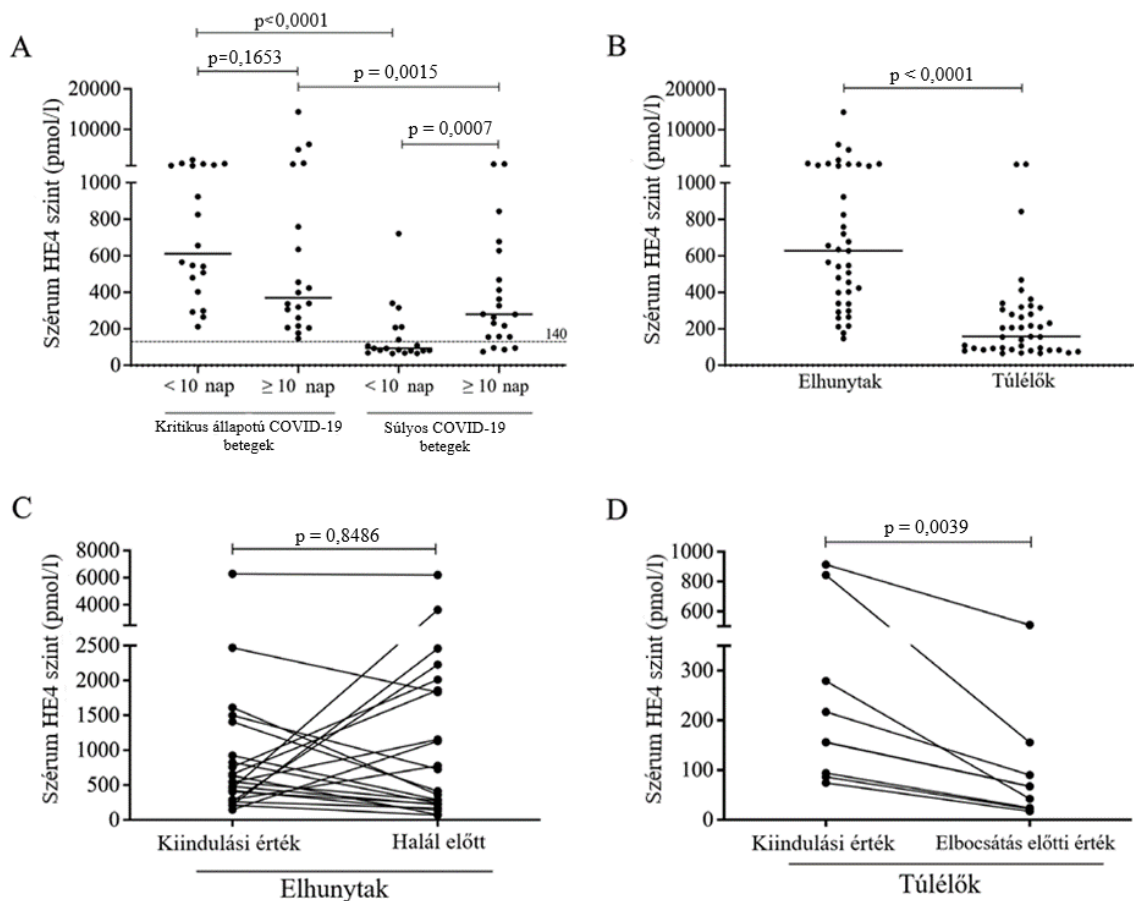
mutatott 140 pmol/l feletti értékeket. A kritikus állapotú COVID-19 pozitív betegek és a súlyos szeptikus betegek eredményeit összehasonlítva hasonlóan magas szérumszinteket detektáltunk statisztikailag szignifikáns különbség nélkül ($p = 0,056$) (10/A. ábra).



10. ábra A kiindulási HE4 szérumszintek vizsgálata a kritikus állapotú, súlyos és enyhe tüneteket mutató COVID-19 betegek, illetve a bakteriális szepszisben szenvedő kritikus állapotú betegek esetében. A SARS-CoV-2 pozitív betegek mintáiban a klinikai manifesztáció súlyosságával korreláló HE4 szint emelkedés volt detektálható (A). Az egyes alcsoportok vizsgálatánál a férfiak esetében magasabb HE4 szint volt kimutatható, noha a nemi különbség befolyásoló hatása nem igazolódott (B). Az életkor a kritikus állapotú COVID-19 betegek esetében nem befolyásolta a HE4 kiindulási szérumszintjét (C), viszont a súlyos állapotú COVID-19 csoport tagjai körében az idősebbekben magasabb volt a HE4 (D).

A következőkben az életkor és a nem HE4 szérumszintjére gyakorolt befolyásoló szerepét vizsgáltuk mintáinkban (10/B-D ábra). Egyik COVID-19 kohorszban sem tudtunk jelentős eltérést kimutatni a férfi és női betegek értékei között. Az életkor befolyásoló szerepének tisztázására Spearman analízist végeztünk, amely szignifikáns korrelációt mutatott a változók között ($r = 0,349$, $p = 0,0015$). Amikor a klinikai súlyosság alapján elkülönített COVID-19 pozitív alcsoportokat egyenként vizsgáltuk, sem a kritikus ($p = 0,8283$), sem pedig a súlyos

állapotú betegek ($p = 0,8015$) kohorszában nem sikerült életkorral összefüggő varianciát kimutatni, habár az utóbbi csoport esetében az életkorral összefüggő emelkedő tendencia kimutatható volt ($p = 0,0285$). A rutin laboratóriumi paraméterek tekintetében is megvizsgáltuk külön a kiindulási HE4 szérumszintet, mely során kis mértékű, de statisztikailag mégis szignifikáns korrelációt találtunk a CRP, az IL-6 és a fehérvérsejtszám esetében, valamint COVID-19 betegségben igazolt prognosztikai szereppel is bíró össz LDH, ferritin és szolubilis ACE2 aktivitás tekintetében is. Továbbá hasonló összefüggés mutatkozott a kiindulási HE4, illetve néhány fontos klinikai paraméter vonatkozásában úgy, mint a SOFA-pontérték és a mellkas CT-n látható tüdőérintettség mértéke.



11. ábra A kiindulási HE4 szérumszint a kórházi tartózkodás hossza (A), illetve a kimenetel függvényében (B). Külön megvizsgáltuk a szérum HE4 kinetikáját a kedvezőtlen (C) és a kedvező kimenetelt mutató (D) COVID-19 betegek körében. A minták a diagnózis időpontjában, majd a kórházi benttartózkodás alatt a végső kimenetel körüli időpontban kerültek levételre.

A kórházi tartózkodás hossza és a kórházi felvételnél meghatározott HE4 szérumszint között eltérő tendenciát detektáltunk a kritikus és a súlyos állapotú betegek körében: előbbiek esetében a 10 napnál rövidebb kórházi kezelés és ezzel együtt korai(bb) elhalálozás mellett jóval magasabb kiindulási HE4 értékeket mértünk ($p < 0,0001$), mint a súlyos COVID-19 betegek körében, míg a súlyos betegek csoportjában a 10 napnál hosszabb kórházi benttartózkodást már előre jelezte a magasabb HE4 koncentráció, mint akiknek ennél kevesebb időt kellett benttölteni a kedvező állapotjavulás végett ($p = 0,0007$) (11/A. ábra). A fenti eredmények azt sugallják, hogy a kiindulási HE4 koncentráció alakulása leginkább a COVID-19 betegség klinikai manifesztációk súlyosságával állhat összefüggésben párhuzamosan a szisztémás gyulladás mértékével és a pulmonális diszfunkció kiterjedésével.

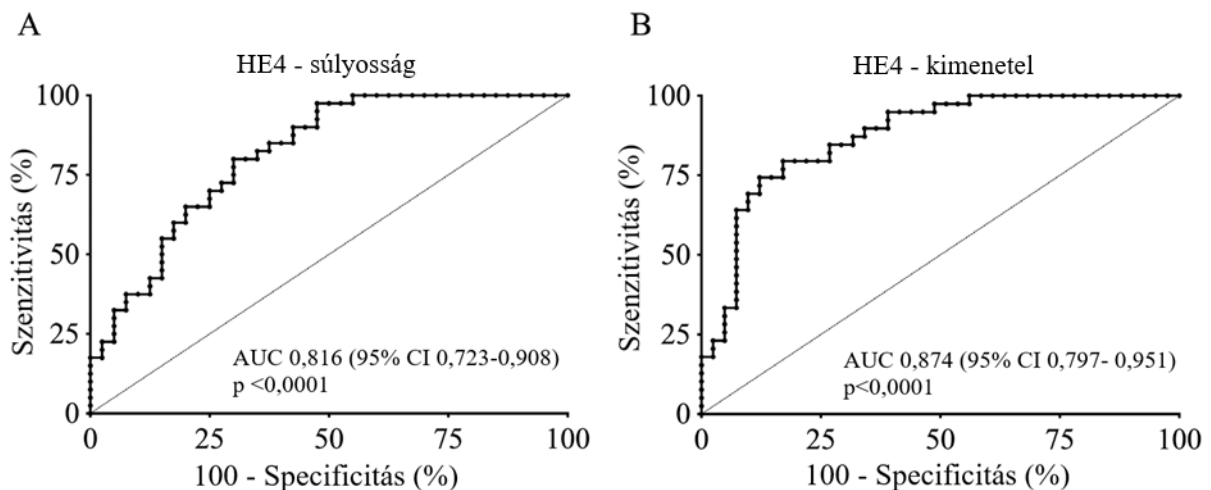
6.2.3 A HE4 szérumszint változása kedvező és kedvezőtlen kimenetelt mutató COVID-19 betegek esetében

A következőkben a betegeket retrospektív módon újabb csoportbontásban vizsgáltuk az ismert kimenetel függvényében a kiindulási HE4 szérumszintek és a mortalitás függvényében (11/B-D. ábra). Eredményeink alapján az elhunytak körében szignifikánsan magasabb HE4 szérumszintek voltak detektálhatók a kórházi kezelést megelőzően a betegséget túlélők értékeihez képest ($p < 0,0001$). Nyolc kedvező és 22 kedvezőtlen kimenetellel rendelkező COVID-19 beteg esetén lehetőségünk volt a kórházi kezelés folyamán utánkövetéses minták vizsgálatára is. Az intenzív osztályos terápia alkalmazása során a HE4 szérumszint sok esetben csökkenő tendenciát mutatott, viszont az elhunyt betegek mintáiban szignifikáns különbség nem volt kimutatható ($p = 0,8486$). Ezzel szemben jelentős HE4 koncentráció csökkenést tudtunk detektálni a kiindulási és az elbocsátást megelőző minták között azon betegek esetében, akik gyógyultan távozhattak a kórházból ($p = 0,0039$). A fenti eredményeink rávilágítanak arra, hogy a kiindulási HE4 szérumszint előrejelzi a kórkép várható kimenetelét, továbbá a kórházi kezelés folyamán mutatott kinetikája párhuzamot mutat a COVID-19 progressziójával.

6.2.4 A kiindulási HE4 szint hatékonyan prediktálja a kimenetelt és a klinikai tünetek várható súlyosságát COVID-19 betegségben

A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a fent részletezett eredményeink alapján vajon alkalmazható-e a kórházi kezelést megelőzően meghatározott HE4 szérumszint a

COVID-19 betegségben prognosztikai faktorként. Ennek érdekében részletes statisztikai elemzést végeztünk a klinikai tünetek súlyossága és a várható kimenetel előrejelzése tekintetében. Első lépésben ROC-AUC görbe analízis során Youden-index segítségével meghatároztuk a kiindulási HE4 szérumszint legjobb diszkriminatív küszöbértékét, amely 286,3 pmol/l-nek adódott, és 80%-os szenzitivitás és 70%-os specificitás mellett 0,816-os (95% CI [0,723-0,908], $p < 0,0001$) AUC értéken előrejelezte a súlyos klinikai manifesztációt. Továbbá a mortalitás tekintetében a hasonló metodikával nyert 331,7 pmol/l kiindulási HE4 érték 80%-os szenzitivitás és 83%-os specificitás mellett 0,874-es (95% CI [0,797-0,951], $p < 0,0001$) AUC érték mellett előrejelezte a kedvezőtlen kimenetelt COVID-19 betegségben (12/A-B. ábra). Statisztikai számításaink alapján a kiindulási HE4 szérumszint hatékonyan képes előrejelezni a COVID-19 kórkép várhatóan életet veszélyeztető klinikai manifesztációját.



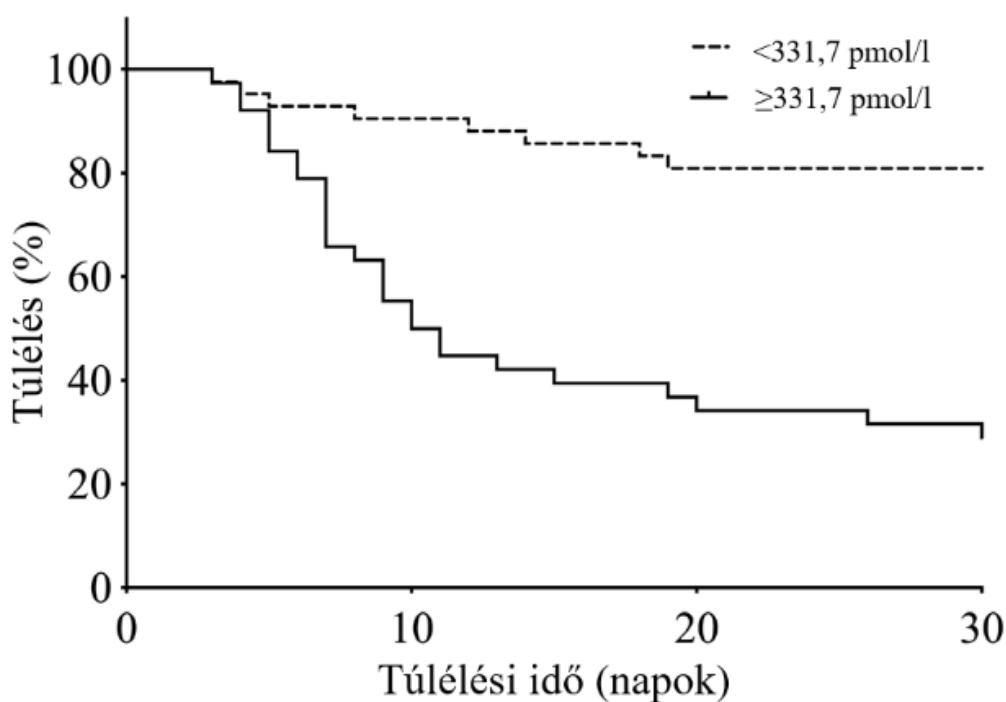
12. ábra ROC görbe analízis a kiindulási HE4 szérumszint prediktív potenciáljának igazolására a COVID-19 betegség klinikai manifesztációjának súlyossága (A), illetve kimenetele (B) tekintetében. Jelentős AUC értéket tapasztaltunk a kezelés előtti HE4 szint és a súlyos COVID-19 kórkép súlyossága/progressziója vonatkozásában.

Annak igazolására, miszerint a kiindulási szérumszint HE4 szint más laboratóriumi paraméterektől függetlenül képes prediktálni a várható klinikai súlyosságot és a kimenetelt COVID-19 betegségben, logisztikus regressziós analízist végeztünk. A HE4 szérumszint szignifikánsan magas korrigált esélyhányadost mutatott (OR: 10,618 [2,331-48,354]; $p = 0,002$) a kedvezőtlen kimenetel tekintetében. Emellett megjegyzendő, hogy vizsgálatunkban a csökkent abszolút lymphocytaszám (OR: 0,175, 95% CI [0,033-0,925], $p = 0,040$), a magas IL-6 (OR: 5,605

[1,516-20,724]; $p = 0,010$) és ferritin koncentráció (OR: 5,911 [1,194-29,259]; $p = 0,029$), valamint az emelkedett fehérvérsejtszám (OR: 5,435 [1,152-25,626]; $p = 0,032$) egyaránt szignifikáns esélyhányadosnak tekinthető a kimenetel előrejelzésében. A COVID-19 kórkép klinikai súlyosságának előrejelzésében a kiindulási HE4 “borderline” szignifikanciát mutatott (OR: 3,642, 95% CI [0,985-13,457]; $p = 0,053$), míg a ferritin (OR: 4,813 [1,237-18,723]; $p = 0,023$) és az abszolút lymphocytaszám (OR: 0,224 [0,055-0,909]; $p = 0,036$) statisztikailag szignifikáns esélyhányadosként viselkedett. Össességében a HE4 kiindulási szérumszint potenciális prognosztikai biomarkernek tekinthető kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegségben.

6.2.5 A magas kiindulási HE4 szérumszint alkalmazása COVID-19 kórképben szenvedő betegek 30 napon belüli mortalitás valószínűségének meghatározásában

Az összesen 80 intenzív osztályos ellátást igénylő súlyos és kritikus állapotú COVID-19 beteg közül 35 életét vesztette a fertőzésből kifolyólag a 30 napos utánkötéses időszak során (13. ábra). A fenti megállapításunk szerint a kiindulási HE4 szérumszintben jelentős különbség volt észlelhető a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel rendelkező COVID-19 betegek között, továbbá a ROC-AUC görbeelemzés alapján megállapítottunk egy küszöbértéket (331,7 pmol/l), ami felett hatékonyan előrejelzi a kórkép várható kimenetelét. Ezen küszöbértéket használva elvégeztük a Kaplan-Meier görbe analízist is, mely eredménye szerint a jelentősen emelkedett HE4 szérumszinttel rendelkező COVID-19 betegek esetén szignifikánsan magasabb a mortalitás valószínűsége a következő 30 napban, mint a küszöbérték alatti szérumszinttel rendelkező betegtársaik körében (71% vs. 19%, Log rank $p < 0,0001$). A klinikai követéses időszakot 40 napra kiterjesztve a kritikus állapotú COVID-19 csoport tagjai közül további 4 beteg elhunyt, míg a 331,7 pmol/l HE4 kiindulási szérumszint alatti értékkel rendelkező betegek közül egyet sem veszítettünk el. A fenti állításokat összegezve a szérum HE4 kiindulási koncentrációja az intenzív osztályos ellátást igénylő COVID-19 betegek körében alkalmas lehet a betegség kimenetelének előrejelzésére.



	Betegek száma:		Log-Rank teszt: p<0,0001	
---	42	38	34	34
—	38	19	13	11

13. ábra Kaplan-Meier görbe analízis alapján az emelkedett kiindulási HE4 szérumszint jól korrelál a 30 napon belül bekövetkező mortalitás magasabb valószínűségével. A görbe alatt az egyes időpontokban (0-30 nap) megállapított betegszám került feltüntetésre.

6.3 Az endothelsejt diszfunkció és a thrombocyta aktiváció jellemzésére alkalmas biomarkerek szérumszint vizsgálata súlyos COVID-19 betegekben

A SARS-CoV-2 fertőzés és a következményes szisztémás gyulladáshoz vezető reakció patomechanizmusának mélyebb megismerése a generalizált, kaszkádszerű endothelsejt károsodás, a következményes kóros regeneratív folyamatok és az ezekben résztvevő mediátorok vizsgálata felé irányította a figyelmünket. A gyulladt endothelium és az aktivált vérlemezkék által a keringésbe került különböző citokinek és kemoadhezív faktorok szérumszint emelkedése információval szolgálhat a kórkép pillanatnyi stádiumáról, vagy előrevetítheti a további állapotromlást is. Vizsgálataink során olyan más etiológiájú endothelsejt diszfunkcióban, illetve thrombocytaaktivációban jelentős szerepet játszó molekulákat vettünk

gőrcső alá COVID-19-ben, amelyeknek az eddig rendelkezésünkre álló irodalmi adatok szerint lényeges szerepük lehet a súlyos klinikai tünetekkel járó betegség kialakulásában. Célul tűztük ki a szolubilis VCAM-1, az ACE2, az E-selectin és az Lp-PLA2 mint endothelsejt aktivációhoz köthető biomarkerek, illetve a keringő P-selectin és CD40L mint a thrombocyta aktivációt jellemző paraméterek szérumszintjének meghatározását súlyos COVID-19 betegek körében. Az említett biomarkerek értékeit egymással, majd a rutin laboratóriumi és a klinikai paraméterekkel korreláltattuk, végül a mortalitás tekintetében igyekeztünk prediktív szerepüket meghatározni. Noha a szolubilis ACE2 szérumszinttel egy korábbi vizsgálatunk során célzottan és részletesen már foglalkoztunk (lásd előbb), a most bemutatásra kerülő vizsgálatunkban elsősorban a többi lement endothelsejt specifikus paraméterhez fűződő kapcsolatára igyekeztünk rávilágítani súlyos SARS-CoV-2 fertőzésben.

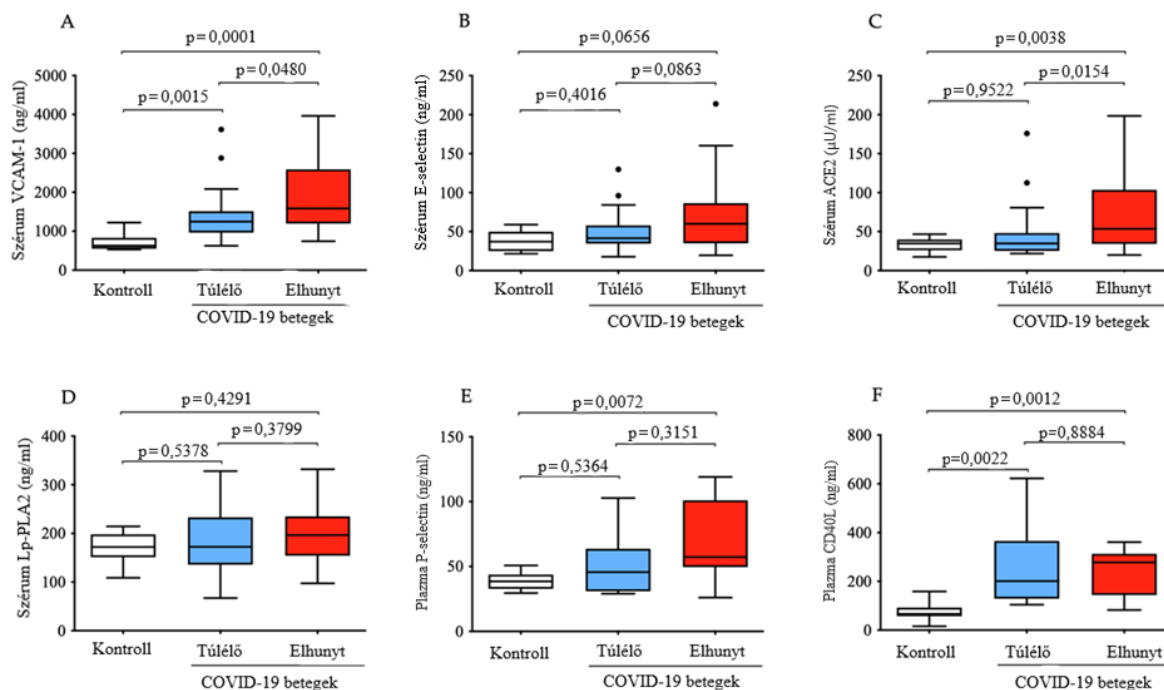
6.3.1 Az endothelsejt biomarker vizsgálatban résztvevő COVID-19 betegek demográfiai és klinikai jellemzése

Ebbe a vizsgálatunkba összesen 70 súlyos állapotú COVID-19 beteget vontunk be, majd a kórlefordulás alapján két alcsoportot képeztünk. Az életkor, a nem és a társbetegségek függvényében szignifikáns különbség nem volt kimutatható, valamint a kórházi kezelés időtartama is hasonlóan mutatkozott a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel jellemezhető alcsoportok között (medián (IQR) 9,0 [5,5–16] nap vs. 10 [6,5–13] nap). A gépi lélegeztetésre szoruló betegek aránya magasabb volt az ARDS-ben szenvedő, később elhunyt betegeket tömörítő csoportban a gyógyult egyénekhez képest (30/33 beteg vs. 2/37 beteg, $p < 0,0001$). Kontrollként egy 16 fős, életkor és nem szerint a vizsgálati betegpopulációhoz illesztett, egyéb okból klinikai kezelés alatt álló betegcsoport szolgált. A rutin laboratóriumi paraméterek szintje a kontrollcsoport esetén mind a kedvezőtlen, mind a kedvező kimenetellel rendelkező COVID-19 betegekénél alacsonyabbnak bizonyult. A gyulladási paraméterek, mint a CRP, PCT, IL-6, ferritin és a fehérvérsejtszám szignifikánsan magasabb volt az elhunyt betegek mintáiban a túlélők értékeihez képest ($p < 0,001$, illetve $p < 0,0001$), míg a vérlemezkeszám és az MPV tekintetében jelentős differenciát nem sikerült kimutatni. A kórházi felvételtől kalkulált Horowitz-index jelentősen alacsonyabbnak adódott a kedvezőtlen kimenetelű betegek körében (95 [65–157] Hgmm vs. 196 [138–381] Hgmm, $p < 0,001$), emellett a tüdő strukturális állapotáról adekvát információt adó mellkas CT-n is jóval kiterjedtebb tüdőérintettség látszott

a később elhunyt betegek, mint a gyógyhajlamot mutatók esetében (73 [60–80] %, illetve 50 [30–70] %, $p < 0,05$).

6.3.2 A magas kiindulási VCAM-1, ACE2 és az endothelsejt diszfunkció mértékének kapcsolata súlyos COVID-19 betegségben

Első lépésben a kiindulási szérum VCAM-1, E-selectin, ACE2 és Lp-PLA2 retrospektív méréseit végeztük a vaszkuláris károsodás mértékének és az endothelsejtek aktivációjának megítélése céljából, majd a kapott adatokat összevetettük az ismert klinikai kimenetellel (14. ábra). Szignifikáns különbséget detektáltunk az elhunyt és a túlélő betegek kiindulási szolubilis VCAM-1 és ACE2 értékei között ($p = 0,0001$ és $p = 0,0038$), továbbá jelentős változás volt megfigyelhető a túlélők esetében. Ezzel ellentétben az E-selectin szintekben csupán határértéken lévő szignifikancia mutatkozott ($p = 0,0656$) a két csoport között, míg az Lp-PLA2 szintek nem különböztek jelentősen a koronavírus fertőzésben szenvedőkben (14/A-D. ábra). Ezzel párhuzamosan a vérlemezke aktivációt jellemző faktorok is meghatározásra kerültek, mely során a szolubilis P-selectin szignifikánsan magasabbnak adódott az elhunyt betegek körében ($p = 0,0072$), míg a plazma CD40L kiindulási értéke mindkét COVID-19 csoport tagjai esetében szignifikánsan megemelkedett ($p = 0,0012$, valamint $p = 0,0022$), de a túlélők és elhunytak eredményei között jelentős különbség nem volt (14/E-F. ábra). Az adataink alapján az intenzív osztályos felvételkor meghatározott szolubilis VCAM-1 és ACE2 emelkedett értéke egyértelműen jelezte a háttérben zajló endothelium károsodás jelenlétét és az annak köszönhetően bekövetkező eltérő betegségkimenetelt. A következőkben a kapott adatok statisztikai elemzését végeztük el kapcsolatot keresve az életkor, a kórházi felvételkor számított Horowitz-index, a rutin laboratóriumi paraméterek és a vizsgált vaszkuláris biomarkerek szérumszintje között. Spearman analízis segítségével megállapítást nyert, hogy az életkor nem befolyásolja a vizsgált paraméterek változását, habár ennek befolyásoló szerepét a vizsgálati csoportjaink életkor alapján történő illesztése miatt korábban kizártuk. Jelentős korrelációt találtunk a VCAM-1, az ACE2, valamint a Horowitz-index ($r = 0,3115$), a PCT ($r = 0,3664$), az IL-6 ($r = 0,4599$) és az E-selectin ($r = 0,3643$) vonatkozásában, míg a vesefunkció érintettségéről árulkodó GFR értékkel fordított kapcsolat igazolódott ($r = -0,5076$) (4. táblázat).



14. ábra A VCAM-1 (A), az E-selectin (B), az ACE2 (C), az Lp-PLA2 (D), a P-selectin (E), illetve a CD40L (F) kezelés előtti koncentrációjának összevetése eltérő kimenetelű COVID-19 betegcsoportokban, valamint SARS-CoV-2 negatív kontrollokban. Az endothelsejt aktivációhoz/sérüléshez köthető biomarkerek szérumból, míg a thrombocyta aktivációra érzékeny paramétereket citrátos plazmából mértük meg.

Az endothelsejt károsodást jelző E-selectin, ACE2 és a rutin laboratóriumi paraméterek összevetése során szignifikáns korreláció mutatkozott a CRP, a PCT, az IL-6, az LDH és a ferritin esetében. Meglepő módon a szérum Lp-PLA2 és az általános inflammatorikus paraméterek összevetése során semmilyen kapcsolatot nem tudtunk kimutatni. A thrombocyta aktivációt jellemző biomarkerek és az előzőekben említett endothelsejt diszfunkcióhoz társuló molekulák egymáshoz viszonyított kinetikáját tekintve mérsékelt, de szignifikáns korreláció mutatkozott az ACE2 és CD40L között ($r = 0,2948$).

Paraméterek	VCAM-1 (ng/ml)	E-selectin (ng/ml)	ACE2 (μU/ml)	Lp-PLA2 (ng/ml)
Életkor (év)	r = 0,1290	r = 0,1589	r = 0,1497	r = 0,1865
Horowitz-index (Hgmm)	r = 0,3115 *	r = 0,1251	r = 0,0602	r = 0,3551
CRP (mg/l)	r = 0,2991	r = 0,2885 *	r = 0,4602 ***	r = 0,2003
PCT (μg/l)	r = 0,3664 **	r = 0,3336 **	r = 0,3484 **	r = 0,1896
IL-6 (ng/l)	r = 0,4599 ***	r = 0,3649 **	r = 0,2373 *	r = 0,1232
Ferritin (μg/l)	r = 0,3209 **	r = 0,5220 ***	r = 0,4461 ***	r = 0,2396
Össz LDH (U/l)	r = 0,1471	r = 0,2995 *	r = 0,4297 **	r = 0,1479
GFR-CKD-EPI (ml/min/1,73m ²)	r = -0,5076 ***	r = -0,2223	r = -0,2498	r = -0,1414
Fehérvérsejtszám (G/l)	r = 0,2154	r = 0,2735 *	r = 0,1598	r = 0,1899
E-selectin (ng/ml)	r = 0,3643 **	r = 1,0000	r = 0,4143 ***	r = 0,1998
P-selectin (ng/ml)	r = 0,1834	r = 0,1781	r = 0,0954	r = 0,1500
CD40L (ng/ml)	r = 0,3182	r = 0,1889	r = 0,2948 *	r = 0,1190

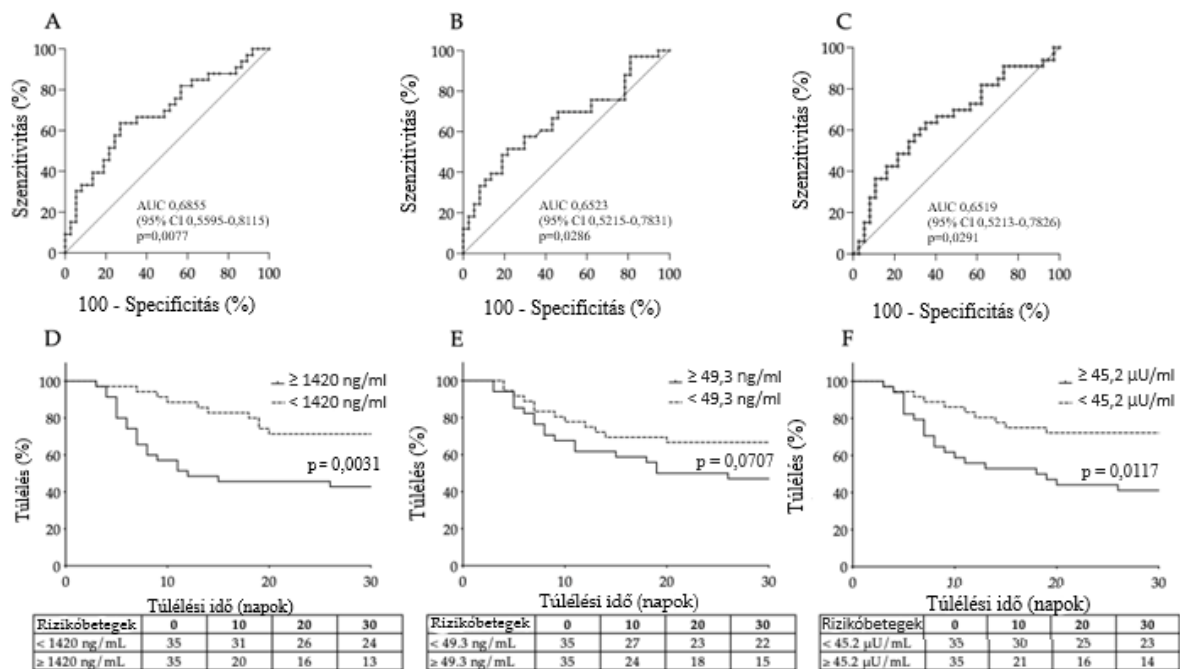
4. táblázat A kiindulási VCAM-1, E-selectin, ACE2 és Lp-PLA2 értékek összevetése néhány rutin klinikai és laboratóriumi paraméterrel Spearman-teszt segítségével. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

Ezen eredmények azt sugallják, hogy a szolubilis VCAM-1 és ACE2 kinetikáját jelentősen befolyásolja a SARS-CoV-2 fertőzés következtében fellépő endotheliitis, míg a jelenleg vizsgált betegeink esetében sem a thrombocyta aktivációnak, sem a lipid peroxidációnak egyértelmű molekuláris lenyomatát nem sikerült kimutatnunk.

6.3.3 *Alkalmos lehet-e a kórházi kezelést megelőzően mért szolubilis VCAM-1, E-selectin és ACE2 szérumszint a kedvezőtlen kimenetellel fenyegető COVID-19 betegség korai felismerésére?*

Kutatásunk következő szakaszában az általunk vizsgált laboratóriumi markerek klinikai használhatóságát, prognosztikai faktorként történő alkalmazását vizsgáltuk meg. Statisztikai analízisünk során ROC-AUC görbe elemzéssel előbb az egyes faktorok diagnosztikus karakterisztikáját helyeztük a középpontba (15. ábra). A kiindulási VCAM-1 szérumszint esetén a Youden-index alapján a legjobb diszkriminatív küszöbérték 1420 ng/ml volt, 64%-os szenzitivitás és 73%-os specificitás mellett 0,6855-ös (95% CI [0,5595–0,8115], $p = 0,0077$) AUC értéken jelezte előre a kórkép kimenetelét (15/A. ábra). A szérumban E-selectin koncentráció

és az ACE2 aktivitás esetében nagyon hasonló AUC értékek mutatkoztak a kedvező és a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek elkülönítésére (15/B-C. ábra).



15. ábra A VCAM-1 (A), E-selectin (B) és ACE2 (C) prediktív potenciájának vizsgálata a kedvezőtlen kimenetel tekintetében ROC görbe analízis segítségével. Ezzel párhuzamosan az eltérő kiindulási szérumszintek 30 napos mortalitásra gyakorolt hatásának elemzése a VCAM-1 (D), az E-selectin (E), valamint az ACE2 (F) vonatkozásában Kaplan-Meier görbe analízis alapján.

Az E-selectin esetében a legjobb küszöbérték 49,3 ng/ml volt 58%-os szenzitivitás és 70,3%-os specificitás és 0,6523-as AUC érték mellett (95% CI [0,5215–0,7813], p = 0,0286). Végül – az ACE2-vel folytatott korábbi vizsgálataink eredményeihez hasonlóan – a kiindulási ACE2 szérumszint 0,6519-es AUC értéken (95% CI [0,5213–0,7826], p = 0,0291) 57,6%-os szenzitivitás és 70,4%-os specificitás mellett 45,2 μ U/ml küszöbértéknél bírt a legjobb megkülönböztető erővel (15/A-C. ábra). Az elvégzett ROC-AUC elemzések alapján elmondhatjuk, hogy a kiindulási VCAM-1, E-selectin és ACE2 közel azonos hatékonysággal képes előrejelezni a betegség kimenetelét súlyos állapotú COVID-19 betegekben.

6.3.4 A 30 napon belüli mortalitás előrejelzése az emelkedett kiindulási VCAM-1 és ACE2 szérumszintek alapján súlyos COVID-19 kórleírásban szenvedő betegekben

A 70 intenzív osztályos kezelést igénylő, súlyos klinikai állapotú COVID-19 beteg közül 33 elhunyt a 30 napos utánkövetéses időszakban. A megelőző számításaink során meghatározott

“cut-off” értékek mellett kíváncsiak voltunk, hogy a kezelés előtti VCAM-1, E-selectin és az ACE2 eredmények vajon alkalmasak lehetnek-e a 30 napos mortalitás valószínűségének predikciójára. A kiszámított küszöbértékeket alapul véve Kaplan-Meier túlélési görbe analízis során megállapítást nyert, hogy az emelkedett kiindulási VCAM-1 szérumszinttel rendelkező betegek szignifikánsan nagyobb kockázattal bírnak a kedvezőtlen kimenetel tekintetében COVID-19 kórképben (68% vs. 37% mortalitási arány, Log-rank $p = 0,0031$). Továbbá a $\geq 45,2$ $\mu\text{U/ml}$ kiindulási ACE2 szérumaktivitás önmagában szintén magasabb mortalitási rizikót jelent a beteg számára (65,7% szemben 40%, Log-rank $p = 0,0117$). A fentiekkel ellentétben a kórházi kezelés előtt mért emelkedett E-selectin szérumszint ($\geq 49,3$ ng/ml) prediktív potenciálja még éppen elmarad a szignifikancia határértéktől a 30 napos mortalitás tekintetében ($p = 0,0707$) súlyos COVID-19 betegségben (15/D-F. ábra). Vizsgálatunk ezen eredményeit összegezve az intenzív osztályos terápiát igénylő súlyos SARS-CoV-2 fertőzött betegek kiindulási VCAM-1 szérumszintjei és ACE2 aktivitása a vizsgált paraméterek közül a legalkalmasabbak a várható mortalitás előrejelzésére.

6.4 Az LDH izoenzimek vizsgálata COVID-19 betegségben

A korábbi vizsgálataink során végzett irodalomkutatás alapján a rutin laboratóriumi markerek közül COVID-19 betegségben az egyik legalkalmasabb rutin laborparaméternek a szérum LDH enzimaktivitás bizonyult. A korábbi klinikai vizsgálatok alapján ugyanis szoros összefüggés mutatkozott az emelkedett LDH és a COVID-19 klinikai tüneteinek súlyossága, valamint a mortalitás valószínűsége között [147-150]. Ezen túlmenően az össz LDH aktivitás súlyos állapotú koronavírus fertőzöttek esetén független rizikófaktornak is tekinthető [147,148,150]. Ugyanakkor az egyes LDH izoenzimek kinetikájáról nincsenek irodalmi adatok annak ellenére, hogy az egyes izoenzimek aktivitás változása akár specifikus lehet a súlyos, egyszerre több szerv elégtelenségét okozó COVID-19 betegségben.

6.4.1 A vizsgálatba beválogatott betegek klinikai jellemzői

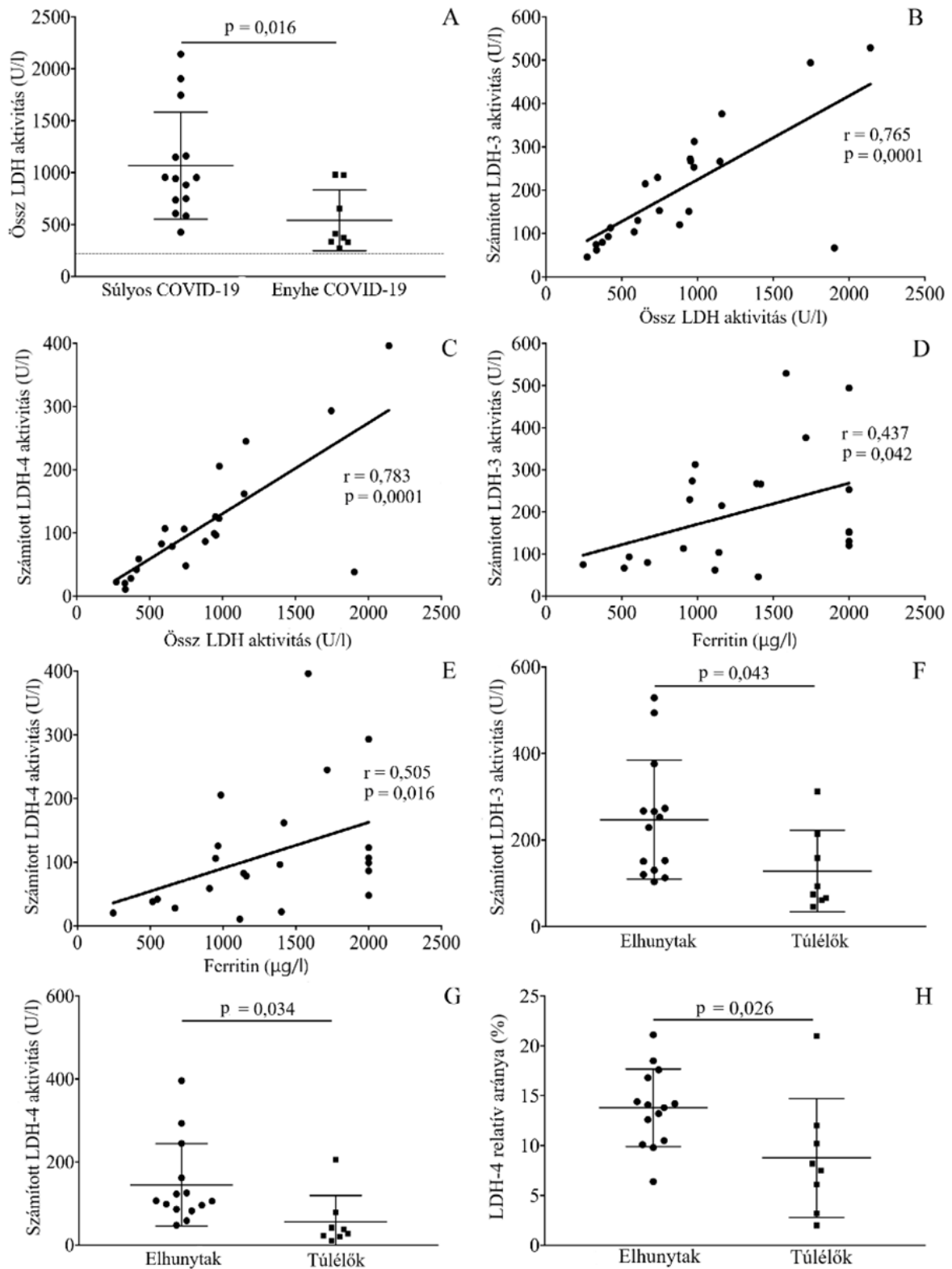
Összesen 22 (13 férfi és 9 nő, életkoruk 29-81 év között változott) egymást követő, kórházi felvételt igénylő súlyos (14 beteg) vagy enyhe/közepesen súlyos tüdőgyulladásban szenvedő (8 beteg) COVID-19 pozitív páciens szérummintáit analizáltuk, akiknek rutinszerűen történt össz LDH aktivitás mérés. A lefagyasztott mintáinkból utólagosan LDH gélelektroforézis

vizsgálatot végeztünk tudományos célból. A klinikai manifesztáció súlyossága szerint a páciensek ellátása az intenzív osztályon, illetve az infektológiai osztályon folytatódott. Az adekvát kórházi kezelés ellenére a súlyos pneumoniával diagnosztizált COVID-19 betegek (n = 14) az életüket vesztették a felvételt követő 28 napos utánkövetés során, míg az enyhébb tüneteket mutató betegek (n = 8) gyógyultan távoztak. A klinikai kórlapok alapján a betegek a SARS-CoV-2 fertőzést megelőzően többféle krónikus kórképben szenvedtek, így magasvérnyomás betegségben, (in)stabil anginában, vesekövességben, diabetes mellitusban, különböző vesebetegségekben (glomerulonephritis, gyógyszer-indukálta nephropathia) és krónikus gyulladásos ízületi kórképekben.

6.4.2 A szérum össz LDH aktivitás és a rutin laboratóriumi markerek szintjének változása súlyos és enyhe/közepesen súlyos COVID-19 betegekben

A korábbi vizsgálataink eredményeivel összehangban az általunk vizsgált betegek mintáiban a gyulladásos paraméterek, mint a fehérvérsejtszám, a ferritin és a CRP emelkedett értéket mutattak a szérumban. Mind a súlyos, mind az enyhe/közepesen súlyos állapotú COVID-19 betegek esetében a normál referenciatartománynál magasabb össz LDH aktivitás mutatkozott a kórházi felvétel időpontjában (272-2141 U/l). A súlyos pneumoniában szenvedő betegek csoportjában az átlagos össz LDH értékek szignifikánsan nagyobbak adódtak az enyhébb tünetekkel bíró betegeknél mért szinthez képest (medián [IQR] 947,5 [704,3-1307,0] U/l vs. 391,5 [331,8-895,8] U/l, $p = 0,016$) (16/A. ábra). A továbbiakban a betegektől nyert mintákból gélelektroforézis segítségével igyekeztünk az egyes LDH izoenzimek egymáshoz viszonyított aktivitási arányát meghatározni.

Annak ellenére, hogy a rutinszerűen mért össz LDH aktivitás és a gélelektroforézis során számított izoenzim aktivitások között egyértelmű összefüggés nem volt szembeutó, a statisztikai analízis során szignifikáns kapcsolat igazolódott az LDH-3 ($r = 0,765$, $p = 0,0001$) és az LDH-4 izoenzim ($r = 0,783$, $p = 0,0001$), valamint az össz-LDH aktivitás között. Az LDH-3 és LDH-4, valamint a COVID-19 betegségben jellemzően szérumszint emelkedést mutató rutin laboratóriumi paraméterek közötti közvetlen relációt vizsgálva szerény, de statisztikailag szignifikáns kapcsolatot detektáltunk mindkét izoenzim és a ferritin szérumszintje között ($r = 0,437$, $p = 0,042$; illetve $r = 0,505$, $p = 0,016$) (16/B-E. ábra).

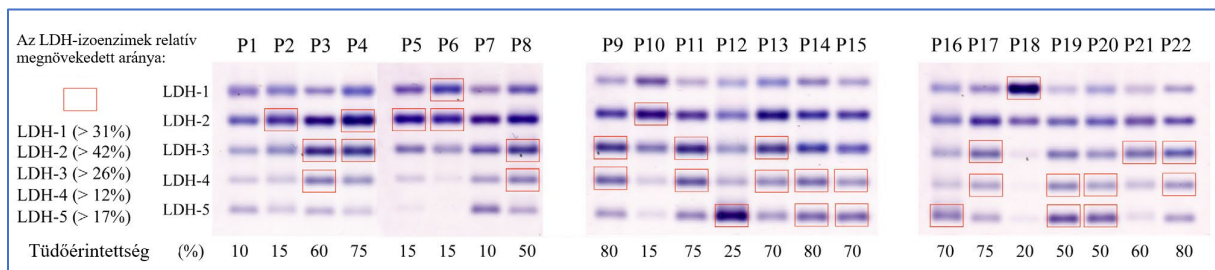


16. ábra Összefüggések vizsgálata a kezelés előtti össz LDH aktivitás, az egyes LDH izoenzimek aktivitása, a ferritinszint és a betegség kimenetele között COVID-19 betegekben. A két csoport közötti különbség meghatározását Mann-Whitney U teszttel, míg a korreláció vizsgálatot Spearman teszttel végeztük.

Végül a kimenetel tekintetében vizsgálva az egyes izoenzimek aktivitását szignifikánsan magasabb LDH-3 (241,0 [127,7-299,0] U/l, illetve 83,7 [63,0-200,9] U/l, $p = 0,043$) és LDH-4 (106,4 [85,5-182,7] U/l, illetve 33,0 [20,9-69,4] U/l, $p = 0,034$) aktivitás, valamint külön az LDH-4 esetében nagyobb relatív %-os arány ($p = 0,026$) is megfigyelhető volt a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek esetében a túlélőkhöz képest (16/F-H. ábra).

6.4.3 Az egyes LDH izoenzimek aktivitás mintázata COVID-19 betegség okozta pneumóniában

Az elvégzett denzitometriás analízisünk során nyert eredmények alapján COVID-19 betegségre specifikus LDH izoenzim mintázatot nem sikerült azonosítanunk (17. ábra). Az általunk vizsgált 22 minta közül kilenc esetben a gélelektroforézis középső zónájában, tehát leginkább az LDH-3, esetenként az LDH-2 és LDH-4 területén detektáltunk nagyobb arányú aktivitást. Három betegnél izolált LDH-2 aktivitás emelkedést tapasztaltunk. További hat esetben az LDH-5 izoenzim fokozott aktivitását észleltük az LDH-4 szimultán emelkedésével vagy anélkül, továbbá két betegnél magasabb LDH-1 szint mutatkozott. Két esetben az össz LDH szérumaktivitás emelkedés ellenére egyik izoenzim esetében sem tudtunk relatív aktivitás eltérést kimutatni (17. ábra).



17. ábra Az egyes LDH izoenzimek arányának meghatározása gélelektroforézissel COVID-19 betegek szérummintáiban. A gélfotókon pirossal vannak jelölve az egyes betegmintákban azonosított kóros aktivitást mutató izoenzimek sávjai.

A kórházi felvétel során készített mellkas CT vizsgálatok különböző mértékű tüdőérintettséget igazoltak, amelynek kiterjedtsége a súlyosabb klinikai tüneteket mutató, kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek esetén szignifikánsan nagyobb volt az enyhébb tünetekkel kórházba kerülő túlélőkéhez képest (70 [50-76] % vs. 15 [50-76] %, $p = 0,003$). A tüdőérintettség mértéke és az egyes LDH izoenzim aktivitások közötti kapcsolat vizsgálata során az 50%-nál nagyobb arányú pulmonális károsodásban szenvedő betegek esetén az agarózgél középső LDH frakcióinak magasabb arányú aktivitása volt kimutatható. Az izolált

LDH-2 izoenzim emelkedéssel párhuzamosan mérsékelt parenchymaérintettség mutatkozott (< 20%). A COVID-19 okozta súlyos májelégtelenség és pneumonia együttesen eredményezhetett emelkedett LDH-5 izoenzim aktivitást (6 beteg esetében), míg két kritikus állapotú páciens esetében kimutatott magas LDH-1 arány háttérében intravascularis hemolízis valószínűsíthető. Eredményeink alapján szoros kapcsolat mutatkozott a SARS-CoV-2 fertőzés okozta pulmonális manifesztáció és az LDH izoenzimek középső frakcióinak relatív aktivitás fokozódása között, bár eredményeink értelmezésekor szem előtt kell tartanunk, hogy az LDH izoenzimek arányát számos egyéb klinikai körülmény és társbetegség is befolyásolhatja.

7 Megbeszélés

A SARS-CoV-2 által okozott COVID-19 betegség az esetek egyötödében súlyos, akár életet veszélyeztető, elsősorban a tüdőt, de sok esetben más szervrendszert párhuzamosan érintő fertőző megbetegedés. A diagnózis felállítása a tünetek által felvetett gyanú alapján a beteg orrtorok váladék mintájából RT-PCR technikával a vírus-RNS kimutatásán alapszik [161]. Bizonyos demográfiai faktorok, mint az előrehaladott életkor, a cukorbetegség, a krónikus tüdő, illetve szív-érrendszeri megbetegedés, az idült veseelégtelenség, a rosszindulatú tumoros betegség fennállása, az immunszuppresszív állapot, az obezitás és a sarlósejtes anaemia független prediktív faktorai a súlyos lefolyású és kedvezőtlen kimenetellel záruló COVID-19 betegségnek [40,162-166]. A korai klinikai vizsgálatok alapján számos próbálkozás történt a gyakorlatban gyorsan és könnyen alkalmazható, a rizikóstratifikációt elősegítő pontrendszer bevezetésére, melyek a kórházi kezelés kezdetén észlelt tünetek alapján igyekeztek kiemelni a magasabb kockázatú betegeket [167], noha ez a gyakorlat Magyarországon végül nem terjedt el. A korai fertőzési stádiumban észlelt klinikai és laboratóriumi paraméterek is szolgálhatnak támpontul a magasabb rizikóval rendelkező betegek felismerésében. A kórházi felvételkor észlelt hypoxia önmagában fontos független rizikófaktora a kedvezőtlen kimenetelnek. Egy korábbi klinikai vizsgálatban 140 COVID-19 pneumóniában szenvedő súlyos beteg adatai alapján a perifériás artériás szaturáció (SpO_2) 90%-nál magasabb értéke 84%-os szenzitivitás és 97%-os specificitás mellett képes volt előrejelezni a túlélést [168]. Az ún. PaO_2/FiO_2 arányszám vagy Horowitz-index a klinikai gyakorlatban a hypoxaemia és a tüdőben zajló gázcseré hatékonyságának jellemzésére széles körben elfogadott mérőszám. Normál tartománya 350-450 Hgmm között helyezkedik el, 300 Hgmm alatt légzési elégtelenségre utal [169]. Az ARDS diagnózisát és súlyossági fokát 2012 óta a Berlin kritérium rendszer alapján határozzuk meg, amelynek oszlopos része a PaO_2/FiO_2 hányados meghatározása [169]. Emellett a kritikus állapotú betegek rizikóbecslésére alkalmazott SOFA-score számításánál is figyelembe vesszük [170]. A súlyos légzési elégtelenséget okozó COVID-19 betegség egyik kritériuma a 300 Hgmm alatti PaO_2/FiO_2 hányados [171]. Retrospektív analízisek alapján a kórlefolyás kezdetén meghatározott arányszám jó prediktív értékkel különítette el az enyhe és a kórházi kezelést igénylő eseteket [172], továbbá befolyással lehet a kórházi kezelés hosszára [173], és a 300 Hgmm alatti értékkel rendelkező betegeknek akár háromszor nagyobb esélyük volt a kedvezőtlen kimenetelre [174]. A képalkotó vizsgálatok közül a legnagyobb szenzitivitással a mellkas CT rendelkezik, noha a fertőzés korai szakaszában vagy enyhe tünetek esetén normális leletet is kaphatunk [175]. A legjellemzőbb patomorfológiai entitás az

ún. tejüvegszerű homály (ground-glass opacity, GGO) illetve a kétoldali konszolidáció [176]. A CT-felvételen látható tüdőérintettség nem csupán a légzési elégtelenség súlyosságával korrelált, hanem fordítottan arányos a kedvező kimenetel valószínűségével is [177].

Általánosan elfogadott gyakorlat, hogy minden kórházi kezelést megelőzően perifériás vénás vér mintavétele történik, melyből a rutin laboratóriumi paraméterek kerülnek meghatározásra. A pandémia kirobbanása óta nagymennyiségű adat gyűlt össze, melyek alapján számos metaanalízis vizsgálta ezen paraméterek kimenetelre gyakorolt hatását. A kezdeti lymphopenia a kórállapot súlyosságával progrediált [27]. A neutrophil/lymphocyta arány (NLR) a betegek állapotromlásával emelkedett és prediktív faktora volt a kedvezőtlen kimenetelnek [178]. Az eosinophilek arányának folyamatos csökkenése szintén negatív prognózisra utalt [179]. A thrombocytaszám változásának tekintetében ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésre: a kezdeti vizsgálatok súlyos thrombocytopeniáról számoltak be a kritikus állapotú betegek körében és összefüggést láttak a vérlemezkeszám csökkenésének mértéke és az elhalálozás valószínűsége között [180]. Noha más szerzők nem találtak jelentős eltérést a thrombocytaszámban az ARDS-ben szenvedő COVID-19 betegek körében [181]. Figyelembe véve azt a tényt, miszerint a súlyos szeptikus állapotban a csontvelői megakaryocytákról a vérlemezkék gyorsabb lefűződése következhet be, illetve, hogy a COVID-19-ben rendkívül gyakori thromboemboliás események jelentős konzumpciós thrombocytopeniát generálhatnak a keringésben, a két klinikai megfigyelés nem zárja ki egymást [182]. Egy korábbi vizsgálat az intenzív osztályon kezelt COVID-19 betegek esetében a perifériás vérben keringő abszolút éretlen vérlemezkeszám (A-IPC) vizsgálata során fordított arányosságot talált az A-IPC értéke és a negatív kimenetel között, melynek háttérében valószínűleg a thrombopoietin termelődés és funkció elégtelensége állhat [183]. A kémiai markerek közül az LDH, az AST, az ALT, a kreatinin, az össz kreatinin-kináz (CK), a cTnI és az NT-pro-BNP szignifikánsan magasabb koncentrációban volt kimutatható a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek mintáiban, mint a túlélők esetén [166]. Hasonlóan egyes akut fázis fehérjék (pl. CRP, PCT, ferritin, szérum amyloid-A) szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen a súlyos állapotú COVID-19 betegek populációjában, mint az enyhébb tünetekkel rendelkező társaik esetében [183,184] és egyben előrejelítették a kedvezőtlen prognózist. A D-dimert 1 µg/ml feletti mennyiségben a kórházban kezelt betegek körében a kedvezőtlen prognózis független prediktív faktorának találták [185], emellett előrejelezte a thromboemboliás szövődmények, a kritikus klinikai állapot és az elhalálozás nagyobb valószínűségét is [186].

Bár számos klinikai jel és laborparaméter utalhat a súlyos COVID-19 kórlefolyás magasabb kockázatára, figyelembe kell vennünk azt a tényt, hogy a jelenleg rendelkezésre álló paraméterek többsége a nagyfokú generalizált gyulladás és a kezdődő többszervi elégtelenség következményeképpen mutat jelentős változást a kórlefolyás előrehaladtával, és eképpen az első klinikai tünetek megjelenésével egyidőben még nem bírnak prognosztikai erővel. A kedvezőtlen prognózisra hajlamos betegek kiemelése már az első orvosi vizsgálat alkalmával esszenciális lenne annak érdekében, hogy ezen betegek agresszív szupportív terápiában és szorosabb megfigyelésben részesülhessenek. A SARS-CoV-2 infekció patomechanizmusának ismeretében kézenfekvő volt olyan új biomarkerek felkutatása, melyek akár a gazdasejt fertőződése révén, akár a következményes endothelsejt károsodásból adódóan megemelkedett mennyiségben expresszálódnak és kerülnek a véráramba, ezáltal szérumszintjük jól korrelál a kórkép előrehaladtával.

Vizsgálatsorozatunk célja az volt, hogy a szérumban kimutatható mennyiségben jelenlévő, a SARS-CoV-2 fertőzés progressziójában feltehetően résztvevő molekulák, mediátorok expressziójának fokozódását igazoljuk és kapcsolatot keressünk a klinikai tünetek súlyossága, valamint a vizsgált biomarkerek szérumszintjei között. Továbbá célunk volt olyan szérummarkerek felkutatása, amelyek már a kórházi kezelés megkezdése előtt nagy valószínűséggel képesek előrevetíteni a kedvezőtlen kimenetelt.

A sejtfelszínen expresszáló ACE2 glikoprotein a humán gazdasejtek megfertőződési folyamatának egyik legfontosabb szereplője [75]. Az ACE2 egy többféle funkcióval bíró, a szervezet homeosztázisában kiemelkedő szerepet játszó enzim, amely az Ang I és II lebontásán keresztül azok vazokonstriktor, prokoaguláns és proinflammatorikus hatását hivatott tompítani [86-88]. Az epithelsejtek és endothelsejtek felszínén expresszáló ACE2 molekulát a vírus S1 és S2 felszíni fehérjéi kvázi receptorként használják, a kialakult kötés pedig a vírus endocytosisát idézi elő [74,75]. Az internalizációt megelőzendő, egyfajta protektív mechanizmus révén a SARS-CoV-2 bekötődése az ACE2 leválásához [75], ún. “shedding”-jéhez vezet, ezáltal a keringő ACE2 szintje és aktivitása megnő [96]. Korábbiakban a SARS-CoV vírussal végzett vizsgálatok szoros korrelációt mutattak ki a pulmonalis epithelsejtek ACE2 expressziójának csökkenése, illetve az érpermeabilitás fokozódása, a következményes tüdőödéma és a romló légzési elégtelenség között ARDS állatmodelleken [187]. COVID-19-ben több kutatócsoport vizsgálta a szolubilis ACE2 mennyiségét eltérő eredményekkel [100-107]. Munkacsoportunk elsőként egy kritikus állapotú COVID-19 beteg esetében végzett esettanulmány során a szolubilis ACE2 jelentősen emelkedett szérumaktivitását igazolta [108]. A keringő ACE2 mennyiségének a COVID-19 betegség lefolyása során alakuló kinetikájáról és

a klinikai manifesztációval összefüggő mértékű változásáról előzőleg nem állt rendelkezésre adat. A fertőzés kezdeti szakaszában megkerülhetetlen szerepet játszó humán fehérje szérumszintjének mérése kézenfekvőnek tűnt a fertőzés súlyosságának és a szervezet válaszütemének megbecslése és a kórlefordulás irányának meghatározása céljából.

Vizsgálataink során arra a megállapításra jutottunk, hogy a kritikus állapotú COVID-19 betegek szérummintáiban szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitás volt kimutatható mind a súlyos állapotú COVID-19, de még a nem COVID-19 etiológiájú súlyos széptikus kontroll csoport értékeihez viszonyítva egyaránt - a komorbiditásoktól függetlenül. A vizsgált COVID-19 betegek esetében a kritikus állapotú csoportban a férfiak körében még magasabb ACE2 aktivitás értékeket mértünk. Kardiovaszkuláris betegségekben szenvedő betegpopuláción végzett ACE2 szérumszint vizsgálatok során a férfiak esetében szintén magasabb ACE2 eredmények mutatkoztak, mely különbség a hipertenzió fennállása esetén szignifikáns mértéket ért el [91]. Bár a kritikus állapotú COVID-19 betegeink 80,9%-a hipertóniában szenvedett, a betegek kóros ACE2 aktivitás értékei elsősorban a SARS-CoV-2 fertőzés rovására írható. A teljes vizsgált populációra vetítve a tünetek súlyosságától függetlenül a magasabb életkorú betegeknél emelkedettebb ACE2 aktivitás mutatkozott, viszont az egyes vizsgálati alcsoportokban az életkor ACE2 szintre gyakorolt hatását Spearman analízissel nem tudtuk igazolni. Ebből azt a következtetést szűrtük le, hogy az emelkedett ACE2 aktivitás oka legfőképpen az előrehaladott életkorban nagyobb arányban előforduló kardiovaszkuláris kórállapotokban és az idősebbeknél gyakrabban látott súlyosabb lefordulású COVID-19 betegségben keresendő. A kórházi kezelés alatt nyert utánkövetéses vizsgálatok alapján a kritikus állapotú COVID-19 betegek körében a kiindulási szolubilis ACE2 szinthez képest további szignifikáns mértékű szérumszint emelkedést detektáltunk szemben a súlyos pneumóniában szenvedő betegek kezelés alatt lényegesen nem változó szérumszintjeivel. Fontos rávilágítanunk arra, hogy az általunk vizsgált, kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegek esetében a kezelés előtti szolubilis ACE2 szintek jelentősen és tartósan emelkedettek maradtak vagy még további növekedést mutattak, és jelentősen csökkenő tendenciát a gyógyuló betegek esetében sem detektáltunk. A szolubilis ACE2 esetleges prognosztikai szerepének vizsgálatára a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek felvételi, majd későbbi szérumszintjeinek alakulását követtük. Az elhalálozott betegek esetében a kezdetben is szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitás a kezelés későbbi szakaszában - jellemzően kevéssel az exitus előtt - további jelentős emelkedést produkált. Mivel a legnagyobb klinikai jelentőséget a kezdeti tünetek megjelenésekor mérhető szolubilis ACE2 szérumszint prognózisra gyakorolt hatásától vártuk, így statisztikai analízissel vizsgáltuk a biomarker prognosztikai potenciálját a

súlyosság és a kimenetel tekintetében. ROC görbe elemzéssel 45,4 mU/l kiindulási ACE2 szérumszint mellett 60%-os szenzitivitás és 71,2%-os specificitás, de 0,701-es AUC értéken a súlyos kórlefolyás, továbbá ugyanolyan “cut-off” értéket alkalmazva 61,8%-os szenzitivitás és 65,5%-os specificitás mellett hasonlóan magas AUC értékkel (0,679) a kedvezőtlen kimenetel is előrejelezhető volt. Logisztikus regressziós analízis alapján a ferritin, a kreatinin, a fehérvérsejt- és lymphocytaszám, a hemoglobin, illetve a MPV mellett a kiindulási ACE2 aktivitás független prediktív faktornak mutatkozott a vizsgálati csoportunk esetében (OR: 1,032, $p = 0,019$).

A tüdő funkcionális állapotának jellemzésére alkalmas egyik leggyorsabb és legegyszerűbb paraméter a Horowitz-index, amely a kritikus állapotú COVID-19 betegeink körében szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a súlyos tüdőgyulladásban szenvedő betegekhez képest. Várakozásainknak megfelelően a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező egyének körében jelentősen alacsonyabb kiindulási Horowitz-indexet számítottunk a túlélők értékeihez képest, melynek diszkriminatív értékét Youden indexszel 129 Hgmm-ben határoztuk meg. A kórkép súlyosságának előrejelzésében 66,7%-os szenzitivitás, valamint 64,8%-os specificitás és 0,662-es AUC érték mellett, míg a kimenetel előrejelzésében 65,8%-os szenzitivitás és 61,5%-os specificitás, valamint 0,653-as AUC érték mellett volt használható. Annak ellenére, hogy a rendelkezésre álló irodalmi adatok azt sugallják, hogy a szérumban nagy mennyiségben keringő szolubilis ACE2 jelentős része a megfertőzött tüdő epithelsejtjeinek felszínéről származik [187,188], a további statisztikai analízis során a szolubilis ACE2 és a pulmonális funkcionális károsodással következményesen romló Horowitz-index között fennálló statisztikai kapcsolatot nem tudtunk kimutatni. A kórházi felvétel utáni 30 napos követéses periódus során a vizsgálatunkba beválogatott 176 COVID-19 beteg közül 89 elhunyt. A kiindulási 45,4 mU/l ACE2 szérumszint diszkriminatív értékkel elvégzett Kaplan-Meier görbe analízis alapján szignifikánsan magasabb 30 napos mortalitási valószínűség mutatkozott a küszöbérték feletti szérumszinttel rendelkező betegek esetében (37,2% illetve 64,7%, Log-Rank $p < 0,0001$). Az elvégzett vizsgálatok alapján a kezelés előtt mérhető szérumszint ACE2 aktivitás egy új hatékony biomarkernek bizonyult COVID-19 betegek esetében a kórkép lefolyásának és a várható kimenetelének előrejelzésében egyaránt.

A HE4 elsősorban a felső és alsó légúti epithelsejtek felszínén expresszálódik jelentős mennyiségben [110], egyes mirigyes szerveket érintő onkológiai kórképekben szérumszintje nagymértékben és konzekvensen megemelkedik [110,116,117], ennek köszönhetően többek között epitheliális petefészekrák [189] és nem-kissejtes tüdőrák [190] esetében prognosztikai

faktorként használható a betegség diagnosztizálása és követése során is. Mindemellett a megnövekedett HE4 szérumszint potenciális biomarkernek tekinthető krónikus veseelégtelenségben [191,192] és progresszív interstitiális tüdőfibrózisban is [193]. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai jelentősen emelkedett HE4 szérumszintet igazoltak cisztás fibrózisban, melynek változásai szoros korrelációt mutattak a betegség progressziójával, a légzésfunkciós paraméterekkel és a CFTR-specifikus gyógyszeres kezelés hatékonyságával is [120,160,194,195]. A közelmúltban publikált közlemények alapján súlyos bakteriális szepszishez társult ARDS esetén a HE4 szérumszint független prediktív faktora volt a kedvezőtlen kimenetelnek [124,125]. Annak ellenére, hogy a HE4 proteinek a légutakon keresztül bejutott kórokozók elleni humorális immunitásban játszott szerepét feltételezik [196], és közzismert, hogy a súlyos COVID-19 betegség leggyakoribb szervi manifesztációja a kétoldali pneumonia, a SARS-CoV-2 fertőzésben bekövetkező HE4 szérumszint változások tekintetében szerény irodalmi adat állt rendelkezésre [126,127].

Vizsgálatunk során az enyhe, súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek szérummintái mellett kontroll csoportként bakteriális szepszisben szenvedők mintáiban elemeztük a kórházi felvételt követően mért HE4 szérumszinteket. A komoly tüdőérintettséggel járó COVID-19 és a bakteriális szepszises kontroll betegekben egyaránt a normálisnál jelentősen emelkedettebb HE4 szérumszint volt kimutatható. A teljes vizsgálati populáció esetén a HE4 szint az életkorral némi korrelációt mutatott, ami a korábbi irodalmi adatokkal egybeesik [197], habár ezt a tendenciát a súlyosság szerint differenciált alcsoportok esetén már nem tudtuk kimutatni. Számos laboratóriumi paraméter (pl. szolubilis ACE2, IL-6, CRP, ferritin, össz LDH, fehérvérsejtszám stb.) és a klinikai állapotot jellemző paraméterek (SOFA-score, mellkas CT-n látható tüdőérintettség mértéke) tekintetében összefüggés mutatkozott a kezdeti HE4 szérumszintekkel. Ezen túlmenően a HE4 és a kórházi napok számának tekintetében a súlyos állapotú COVID-19 betegek esetében egyenes arányosság, a kritikus állapotú, legtöbbször a felvételt követően rövid időn belül exitálónál fordított reláció mutatkozott. A fenti eredményeket tekintve a kezdeti HE4 szint nagy valószínűséggel már az első tünetek idején súlyos fokú tüdődestrukcióra és generalizált gyulladás kiterjedésére utalhat. A következőkben igyekeztünk összefüggést kimutatni a kórházi kezelést megelőző HE4 szérumszint és a várható kimenetel között. Retrospektív analízis során a később elhunyt betegek esetén szignifikánsan magasabb kiindulási értékeket mérhettünk, amelyek a kezelés során érdemi változást az exitus bekövetkeztéig nem mutattak. Ezzel szemben a kezelést követően gyógyultak esetén az utánkövetéses szérumminták HE4 koncentrációja jelentős csökkenést mutatott a kezelést megelőző értékekhez képest ($p = 0,0039$). A továbbiakban

kíváncsiak voltunk arra is, hogy a kiindulási HE4 szint alkalmas lehet-e a kórházi kezelést igénylő COVID-19 kórkép súlyosságának és kimenetelének előrejelzésére. ROC-AUC analízissel 286,3 pmol/l szérumszintű HE4 “cut-off” érték mellett a betegség súlyos lefolyása 80%-os szenzitivitás és 70%-os specificitás mellett kiemelkedően jó 0,816-os AUC értéken előrejelezhető volt, továbbá 331,7 pmol/l kiindulási HE4 szint 80%-os szenzitivitás és 83%-os specificitás mellett 0,874-es AUC értéken szintén előrejelezte a kedvezőtlen kimenetelt. A biomarker független prediktív értékének meghatározására logisztikus regressziós analízist végeztünk, amely alapján a kóros HE4 szérumszint magas esélyhányadost (OR: 10,618) mutatott a kedvezőtlen kimenetelre a korábban már igazolt prognosztikai szereppel bíró laboratóriumi paraméterek (abszolút lymphocytaszám, össz fehérvérsejtszám, IL-6, ferritin) mellett. Mindemellett a várható súlyosság tekintetében már jóval szerényebb, de még szignifikáns összefüggés mutatkozott a HE4 szint kapcsán. A 30 napos utánkövetéses időszakban a mortalitás valószínűsége a fentebb említett 331,7 pmol/l diszkriminatív küszöbérték alatti és feletti szérumszinttel rendelkező betegek esetén szignifikáns különbséget mutatott (71% és 19% mortalitás, Log-rank $p < 0,0001$). A követéses időszakot 40 napra kiterjesztve a két csoport statisztikai különbsége még markánsabbnak mutatkozott (81% vs. 19%). A fentieket figyelembevéve a kórházi kezelés kezdetén mért szérumszintű HE4 egy fontos prognosztikai faktor lehet a COVID-19 kórkép várható lefolyása és kimenetele prediktálásában és a betegek korai rizikóstratifikációjában egyaránt.

Még néhány évtizeddel ezelőtt is az erek belső falát borító sejtrétegnek csupán passzív, határoló funkciót tulajdonított az orvostudomány, viszont az azóta eltelt időben megannyi lokális és szisztémás élettani folyamatban igazolódott aktív, autokrin és parakrin szerepe, amelyeken keresztül világossá vált, hogy az endothelium hibátlan működése nélkülözhetetlen a szövetek vérellátásának dinamikus optimalizálásához, a hemosztázis és a koagulációs folyamatok kiegyensúlyozottsága szempontjából. Számos kutatási adat és klinikai megfigyelés alátámasztja az endothelium sérülés jelentőségét súlyos SARS-CoV-2 infekciót követően. A COVID-19 betegség lefolyása során a véráramba került víruspartikulák direkt vagy indirekt mechanizmusok révén előidézik az endothelsejtek aktivációját, melynek eredményeképpen citokinek, kemoattraktáns molekulák, proinflammációs faktorok jutnak a keringésbe. Ezek a molekulák a gyulladást előidéző sejtek és a thrombocyták aktivációját idézik elő, valamint az endothelsejt réteg folytonosságának megszakadását, trombogén faktorok megjelenését eredményezik további gyulladást előidéző kaszkádfolyamatot idézve elő. Az egyes szervekre levetítve ez a folyamat vérellátási zavarban, érelzáródásban manifesztálódik, és a COVID-19 kórlefutásában gyakran előforduló myocardialis infarctus, vasculitis, interstitialis pneumonitis

vagy éppen ARDS képében szembesül vele a klinikus [133-135]. A vizgálsorozatunk következő szakaszában az endothelsejtek aktivációjával összefüggésbe hozható molekulák szérumszintjét vizsgáltuk súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek esetében azok kórlefolyással, a betegség súlyosságával, illetve kimenetelével összefüggésben álló kinetikájának feltárása céljából. Retrospektív analízisünket kritikus állapotú betegekre terjesztettük ki, és két alcsoportot képeztünk a kedvező és kedvezőtlen kimenetelnek megfelelően.

Az érfal belső sejtrétegének sérülése az NF- κ B és MAPK intracelluláris szingáltransdukciós útvonalon keresztül az IL-6, IL-8, IL-1 β fokozott expressziója mellett [24] reparatív mechanizmusok beindulását és az antitrombotikus attribútumok elvesztését vonja maga után. Ennek részeként immunsejtek és thrombocyták jelennek meg a gyulladós érszakaszon. Az ún. selectinek a fehérvérsejtek toborzásáért felelős glikoproteinek. Az E-selectin az endothelsejtek aktivációjakor a keringésbe jutó adhéziós molekula, az endothelsejtek aktivációjának egyik érzékeny biomarkere. Noha a COVID-19 betegség patomechanizmusában az endothelium károsodás/sérülés szerepe bizonyítottnak tűnik, és a kórkép kezdetén detektált szolubilis E-selectin szint a legtöbb klinikai vizsgálat során abnormális értéket mutatott [155,198], Gelzo és munkatársai érdekes módon nem találtak szignifikáns különbséget a tünetmentes és a kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegek eredményei között [199]. Továbbá a szolubilis E-selectin koncentráció erős korrelációt mutatott a neutrophil sejtszám és a tünetek kezdetétől eltelt napok számával is [198]. A plazma P-selectin az endothelsejtek Weibel-Palade testekben, illetve a thrombocyták intracelluláris α -granulumaiban helyezkedik el és a vérlemezkék aktivációját kiváltó noxa hatására az expressziója megnő. Egy 7668 beteg adatait összesítő meta-analízis alapján számos más, az endothelsejt diszfunkcióval kapcsolatba hozható biomarker mellett az E- és P-selectin kiindulási szérumszintje is magasabbnak adódott a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező SARS-CoV-2 fertőzöttek körében [200]. A közelmúltban publikált vizsgálat szerint a kórházi felvételnél szignifikánsan magasabb E-selectin ($\geq 32,5$ ng/ml) és P-selectin ($\geq 3,2$ ng/ml) független prediktorai voltak a kórházi kezelés alatt bekövetkező thromboembóliás eseményeknek [201], mely a súlyos endothelium diszfunkció következtében kialakuló prothrombotikus klinikai állapot fennállását támasztja alá. Intenzív osztályos kezelést igénylő COVID-19 betegek kezelést megelőző E-selectin szintje figyelemreméltó 0,88-as AUC értéken 100%-os szenzitivitás és 75%-os specificitás mellett megbízhatóan előrejelezte a kedvezőtlen kimenetelt [155]. Várakozásainkkal ellentétben, az általunk vizsgált betegpopulációban csupán szerény, de szignifikáns különbséget tudtunk

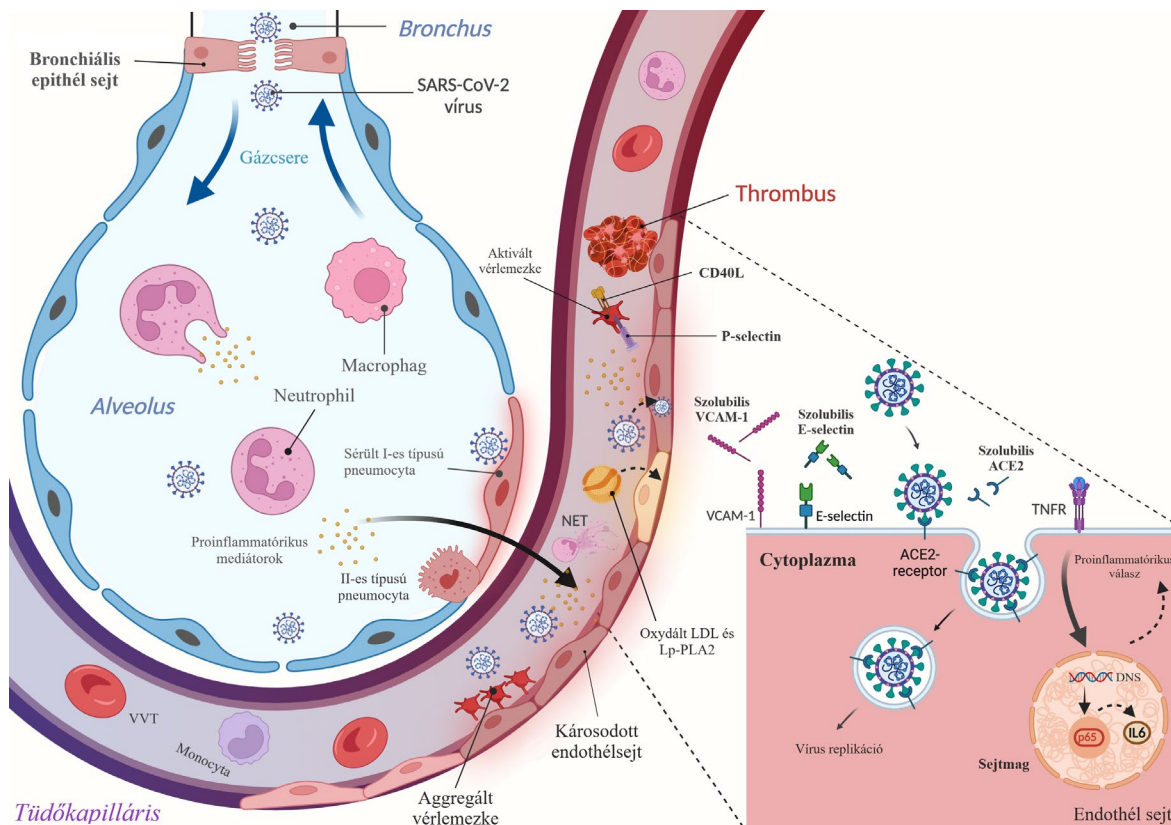
kimutatni a túlélő és elhunyt COVID-19 betegek kiindulási E-selectin értékei között. Noha a kimenetelre gyakorolt hatás vizsgálata során a 49,3 ng/ml kiindulási E-selectin szérumszint 0,6523-as AUC értéket mutatott, Kaplan-Meier túlélési görbe analízissel nem sikerült szignifikáns különbséget detektálnunk a diszkriminatív érték alatti és fölötti szintekkel bíró érintettek között.

Az arteriosclerosis talaján kialakult kardiovaszkuláris kórképek és a stroke [140], valamint a lipid anyagcserezavarokban előforduló procoaguláns [141] és oxidatív stresszállapotok kialakulásában [141] bizonyítottan oki szerepet játszó Lp-PLA2 a makrophágok által termelt, a keringésben főként az LDL-hez kapcsoltnan keringő molekula [139]. Az Lp-PLA2 az oxidált lipoproteinek hidrolízise révén proinflammatorikus ágensek létrehozásában játszik szerepet, melyek az endothelsejtek aktivációjában, az arteriosclerotikus plakkok nekrotikus magjának kialakulásában különös jelentőséggel bír [138]. A megnövekedett oxidatív stressz a proinflammatorikus citokinek emelkedett szintjét eredményezi és fordítva: ez az önmagát erősítő folyamat pedig a kardio-metabolikus környezet romlásához vezet [202]. Az Lp-PLA2 szérumszint prediktív faktorként történő mérését európai és amerikai ajánlások is tartalmazzák a stroke és a visszatérő kardiális események előrejelzésére [203]. Korábbi kutatások során erős korreláció mutatkozott a kritikus állapotú betegek rizikóbesorolásához használt APACHE II pontérték és az Lp-PLA2 szérumszint között [204]. A súlyos COVID-19 betegségben mind a keringő össz koleszterin, mind az LDL és HDL szintje csökken [142], míg ARDS-ben a sérült pneumocyttákból és makrophágokból oxidált foszfolipidek válnak szabaddá nagy mennyiségben [143]. Az endothelsejt aktivációban betöltött prominens szerepe ellenére az Lp-PLA2 SARS-CoV-2 infekcióban kimutatható esetleges prediktív jelentőségéről szerény vizsgálati eredmények állnak rendelkezésre [144]. Jelen klinikai vizsgálattal a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel rendelkező COVID-19 betegek kiindulási Lp-PLA2 szérumszintjében szignifikáns eltérés nem volt kimutatható. Eredményeink alapján az Lp-PLA2 szintje nem korrelált a gyulladásos paraméterekkel és nem mutatott jellegzetes kinetikát a progresszióval párhuzamosan sem. Eredményeink hátterében az Lp-PLA2 dominálónan arteriosclerosissal összefüggő szérumszint változása, és a molekulára elenyésző hatással bíró COVID-19 okozta endothelium károsodás állhat. Az általunk vizsgált betegcsoportok kardiovaszkuláris rizikófaktoraiban szignifikáns különbség nem állt fenn.

Az endothelsejtek által termelt különböző sejtadhéziós molekulák közül a VCAM-1 számos megelőző klinikai vizsgálatban szignifikánsan emelkedett szérumszintet mutatott súlyos COVID-19 betegek esetében, akár egészséges populációhoz [205,206], akár csak az enyhe tüneteket mutató SARS-CoV-2 fertőzöttekhez viszonyítva [207-209]. Enyhe és súlyos

légségi elégtelenségben szenvedő, kórházban kezelt betegek körében végzett vizsgálat a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek esetén magasabb VCAM-1 értékekről számolt be [210]. Intenzív terápiát igénylő SARS-CoV-2 fertőzöttek körében végzett, a dexamethasone terápia kedvező hatását elemző kutatás során a vizsgálati és a kontroll csoportban is szignifikánsan magasabb VCAM-1 szintek a mortalitás tekintetében jó prediktív értékkel bírtak, noha ezen eredményeket a szteroid terápia vagy annak hiánya befolyásolhatta [211]. További elemzések szerint a kórházi kezelés előtt mért szérumszintű VCAM-1 szint a 30 napos mortalitás valószínűségével is korrelációt mutatott [212].

Számos klinikai tanulmány igazolta korábban a vérlemezkék humorális és sejtes immunválaszban betöltött szerepét, melynek során a thrombocyták és fehérvérsejtek között kialakuló interakció befolyásoló hatással bír a thrombotikus folyamatokra [213,214]. A vérlemezkék és neutrophilek között létrejött sejt-sejt interakció a thrombocyta aktiváció egyik érzékeny markere [215]. Ahogy fentebb már említettük, a kiindulási plazma P-selectin koncentráció erős korrelációt mutatott a kedvezőtlen kimenetellel és a kezelés során bekövetkezett thromboembóliás események gyakoriságával [201]. Az általunk végzett mérések során szignifikánsan magasabb kezdeti szolubilis P-selectin szintek mutatkoztak a később elhalálozott kritikus állapotú páciensek esetében, míg a gyógyult betegek esetében csupán mérsékelt emelkedés volt detektálható (18. ábra).



18. ábra A SARS-CoV-2 infekció által kiváltott endothelsejt és thrombocytá aktivációt eredményező molekuláris mechanizmusok összefoglalása.

Vizsgálatsorozatunk utolsó lépéseként 22, enyhe/közepesen súlyos és súlyos COVID-19 okozta tüdőgyulladásban szenvedő beteg esetében analizáltuk az egyes LDH izoenzim aktivitások és a betegek klinikai tünetei közötti esetleges összefüggéseket. Számos korábbi tanulmány igazolta, hogy a kiindulási össz LDH aktivitás COVID-19 kórképben mind a klinikai manifesztáció súlyossága [147,148], mind pedig a várható kimenetel [147,148,152] tekintetében független prognosztikai faktorként szerepel, emellett egyéb, sérumból kimutatható biomarker molekulák szimultán emelkedése esetén segíthet előrejelezni a kórkép súlyosságát és kimenetelét egyaránt [216,217]. A humán szervezetben megtalálható ötféle LDH izoenzim viszonylag nagy szervspecifitást mutat, ennek megfelelően szöveti sérülés vagy fokozott sejtpusztulás esetén a szervre jellemző LDH izoenzim magasabb aktivitással jelenik meg a perifériás vérben az össz LDH sérumbotivitás emelkedését okozva [218]. Ennek megfelelően az össz LDH aktivitás háttérében álló izoenzim-profilot vettük görcső alá. Az általunk vizsgált összes beteg sérumbotivában emelkedett össz LDH aktivitás mutatkozott, továbbá az irodalmi adatokkal egybecsengő módon a súlyosabb tünetekkel rendelkezők jelentősen magasabb össz LDH aktivitást mutattak. Noha egyik izoforma esetén sem tapasztaltunk kizárólagos, COVID-19-re típusos aktivitás fokozódást, a vizsgált 22 páciens közül kilenc

széruma az elvégzett gélelektroforézis során emelkedett „középmézős aktivitást” mutatott, tehát az LDH-3 és/vagy az LDH-2 és LDH-4 izoformák relatíve emelkedett aktivitása volt detektálható. Továbbá a denzitometriás analízis alapján számított LDH-3 és LDH-4 aktivitás szignifikáns korrelációt mutatott a szérumból mért össz-LDH aktivitással, illetve a szérum ferritin szinttel.

A kedvezőtlen kimenetellel rendelkező COVID-19 betegek esetében észlelhető szignifikánsan nagyobb tüdőérintettség közismert klinikai jelenség. Az elváltozás hátterében felvetődik a SARS-CoV-2 által okozott közvetlen tüdőszérülés, a gyulladással járó válaszütem, valamint a következményes csökkent artériás oxigénszaturáció [219]. Mindemellett nagy mintaszámú COVID-19 kórképben szenvedő populáción végzett elemzés alapján erős fordított arányosság mutatható ki a szérum össz LDH aktivitás, illetve a Horowitz-kvóciens között [151]. Vizsgálatunk esetében a mellkas CT vizsgálat során 50%-nál kiterjedtebb tüdőérintettséggel rendelkező páciensek egyes LDH izoenzim aktivitása tekintetében erősebb jel detektálható, továbbá az LDH-2 izoenzim relatív aktivitás fokozódása jelent meg enyhe, 20%-nál alacsonyabb pulmonáris disszemináció mellett. Következésképpen a szérumban kimutatható LDH-3 és LDH-4 aktivitás fokozódás erős összefüggésben állhat az alsó légutak COVID-19 általi involvációjával. Mindazonáltal számolnunk kell a SARS-CoV-2 fertőzés által generált további szervkárosodások LDH izoenzimre gyakorolt befolyásoló hatásával is: az LDH-5 emelkedés összefüggésbe hozható mind a pneumonia, mind a májelégtelenség okozta sejtelhalással, az immuntrombotikus folyamatok következményeként fellépő esetleges intravasculáris hemolízis az LDH-1 megnövekedését eredményezheti. Továbbá felvetődhet az általunk vizsgált betegek anamnesztikus adataiból ismert társbetegségeinek LDH izoenzimre moduláló szerepe is, viszont jelen vizsgálatunk során a hipertenzió, cardiomyopathia, diabetes mellitus, veseelégtelenség, angina pectoris és cataracta sem befolyásolta érdemben az izoenzim aktivitását. Összességében eredményeink azt sugallják, hogy bár COVID-19 tipikus LDH izoenzim mintázat vélhetően nem detektálható, viszont az emelkedett LDH-3 és LDH-4 izoenzim aktivitás szoros korrelációt mutathat a kedvezőtlen kimenetellel, épp úgy, ahogy korábbi tanulmányok azt az össz LDH esetében már megerősítették [147,220]. Vélhetően a súlyos tüdőkárosodás okozta apoptotikus sejtpusztulás egyenes következménye a szérumban detektálható LDH aktivitás fokozódás, melyet a kiterjedt sokszervi elégtelenség további össz LDH szérumaktivitás emelkedéssel követhet. Későbbi, nagyobb mintaszámú populáción elvégzett klinikai vizsgálatok tovább pontosíthatják az egyes LDH izoenzim forrását, így egyértelműbbé tehetik az összefüggést a szervérintettség és a relatív LDH izoenzim aktivitás emelkedések között.

8 Összefoglalás

A SARS-CoV-2 vírus által okozott COVID-19 betegség egy magas kontagiozitású, általában enyhe légúti tüneteket okozó fertőző megbetegedés. A betegek kis hányadánál kózházi kezelést igénylő tüdőgyulladás, ritkán többszervi elégtelenség alakul ki, amely halálhoz vezethet. A megfertőződést követően oki terápia nem ismert, a fertőzés elkerülésére irányuló általános higiéniai szabályok betartása mellett különböző mechanizmusokon alapuló védőoltások állnak rendelkezésre. A betegség pontos patomechanizmusa napjainkig csak nagyvonalakban ismert, nagy valószínűséggel a SARS-CoV-2 vírus által okozott direkt és indirekt endothelsejt aktiváció, a következményes hiperinflammáció és a másodlagos intravaszkuláris immuntrombotikus események eredményezik jellemzően a tüdő, de egyes esetekben a több más létfontosságú szerv sérülését és funkcióvesztését.

A COVID-19 betegség kezdeti stádiumában a disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények életre hívását megelőzően nem állt rendelkezésre olyan vizsgálómódszer vagy klinikai tünetegyüttes, amely megbízhatóan képes lett volna differenciálni azokat a betegeket, akik esetében súlyosabb betegséglefolyás, esetleg kedvezőtlen kimenetel várható. Vizsgálatsorozatunk célja olyan, szérumból/plazmából detektálható biomarkerek felderítése volt, amelyek a SARS-CoV-2 infekció kezdeti szakaszában képesek megbízhatóan előrejelezni a betegség lefolyását és a mortalitás várható valószínűségét.

Eredményeink alapján a kórházi felvételt megelőzően mért emelkedett szérum ACE2 aktivitás, illetve a HE4 szint megbízhatóan előrejelezte a későbbi súlyos kórleefolyást, illetve a kedvezőtlen kimenetelt. Az endothelsejt aktivációt és thrombocytá diszfunkciót fémjelző klasszikus biomarkerek közül a VCAM-1 és az E-selectin korai szérumszint emelkedése erős korrelációt mutatott a magasabb mortalitási rizikóval. Mindemellett az ismert prognosztikai szereppel bíró össz LDH aktivitás háttérének vizsgálata során tipikus, COVID-19 betegségre jellemző izoenzim aktivitás mintázatot nem tudtunk kimutatni.

Összességében megállapítható, hogy a COVID-19 betegség korai szakaszában kimutatott emelkedett szolubilis ACE2 és HE4 szint megbízhatóan stratifikálja azokat a betegeket, akiknél súlyosabb kórleefolyás várható és szorosabb klinikai obszerváció indokolt a kritikus légzési elégtelenség, invazív lélegeztetési igény és esetleges tromboemboliás szövődmények magasabb kockázata miatt. A nagy rizikóval rendelkező betegcsoport kezelése során alkalmazott proaktív klinikai szemlélet, az esetleges állapotrosszabbodás idő előtti észlelésének köszönhetően bevezetett korai szupportív terápiával megelőzhető olyan kritikus szövődmények vagy definitív károsodások kialakulása, amelyek későbbi észlelése a beteg halálához vezethetnek.

9 Summary

COVID-19 disease, caused by the SARS-CoV-2 virus, is an infectious clinical condition with high contagiousness that usually results in mild respiratory symptoms. However, a few percentages of COVID-19 patients develop severe pneumonia with multiorgan failure that requires hospital treatment and may lead to death. The cause of infection following infection is still unknown, and vaccinations based on various mechanisms have become available to avoid infection, in addition to observing general hygiene rules. The pathomechanism of COVID-19 is most likely based on the direct and indirect endothelial activation caused by SARS-CoV-2, the consequent hyperinflammation and secondary intravascular immunothrombotic events which typically lead to damage and loss of function of the lungs and in some cases, other vital organs.

In the initial stage of the COVID-19 pandemic, there was no test or set of clinical symptoms that could undoubtedly differentiate those patients with a higher risk for a more severe course or an unfavorable outcome of the disease. The aim of our study series was to find some new biomarkers in the serum/plasma that can reliably predict the course of the disease and mortality in the initial phase of severe SARS-CoV-2 infection.

Based on our results, elevated serum ACE2 activity and augmented HE4 level at hospital admission reliably predicted the subsequent severe course of the disease and the unfavorable outcome. Among the classic biomarkers that can demonstrate endothelial cell activation and platelet dysfunction, early serum levels of VCAM-1 and E-selectin showed a strong correlation with a higher mortality risk. In addition, during the examination of the background of total LDH activity, which had been earlier known as a prognostic role in severe COVID-19 disease, we could not detect a typical isoenzyme activity pattern characteristic to SARS-CoV-2 infection.

Overall, we conclude that elevated soluble ACE2 and HE4 levels detected in the early stages of the COVID-19 disease reliably stratify those patients in whom a more severe disease course is expected. In case of these patients, a closer clinical observation is warranted due to the higher risk of critical respiratory failure, and there is a clinical need for invasive ventilation and possible thromboembolic complications. The proactive clinical approach used in the treatment of the high-risk patient group with early supportive therapy according to the early detection of possible deterioration, can prevent the development of critical complications or irreversible damage, which may lead to the death of these patients.

10. Az értekezés új tudományos eredményei, a jelölt saját megállapításai

1. Súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegekben a kórházi kezelés előtti ACE2 szérumszint aktivitás szoros korrelációt mutat a betegség prognózisával és a mortalitással.
2. A kiindulási szérumszint HE4 szint jelentősen megemelkedik COVID-19 pneumoniában, jól elkülöníti a kritikus és a súlyos állapotú betegeket egymástól, valamint prediktálja a korai elhalálozás rizikóját.
3. A fokozott endothelsejt aktivációt jelző szolubilis VCAM-1 és E-selectin szintek megbízhatóan előrejelzik a kedvezőtlen kimenetelt kritikus állapotú COVID-19 betegek esetén.
4. Bár az egyes LDH izoenzim aktivitásában egyértelmű COVID-19 specifikus „mintázat” nem detektálható, az LDH-3 és LDH-4 aktivitásban szignifikáns különbség mutatkozik a túlélő és az elhalálozott COVID-19 betegek között.

10 Irodalomjegyzék

1. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270-273.
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224): 565-574.
3. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (dátum: 2024. 09. 22.)
4. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239-1242.
5. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burgüiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003; 348(20): 1967-1976.
6. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ; SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003; 348(20): 1953-1966.
7. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012; 367(19): 1814-1820.
8. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet*. 2015; 386(9997): 995-1007.

9. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798): 265-269.
10. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, Meng J, Zhu Z, Zhang Z, Wang J, Sheng J, Quan L, Xia Z, Tan W, Cheng G, Jiang T. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(3): 325-328.
11. Quinaglia T, Shabani M, Breder I, Silber HA, Lima JAC, Sposito AC. Coronavirus disease-19: The multi-level, multi-faceted vasculopathy. *Atherosclerosis*. 2021; 322: 39-50.
12. Matsuishi Y, Mathis BJ, Shimojo N, Subrina J, Okubo N, Inoue Y. Severe COVID-19 Infection Associated with Endothelial Dysfunction Induces Multiple Organ Dysfunction: A Review of Therapeutic Interventions. *Biomedicines*. 2021; 9(3): 279.
13. Evans PC, Rainger GE, Mason JC, Guzik TJ, Osto E, Stamataki Z, Neil D, Hofer IE, Fragiadaki M, Waltenberger J, Weber C, Bochaton-Piallat ML, Bäck M. Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res*. 2020; 116(14): 2177-2184.
14. Calabretta E, Moraleda JM, Iacobelli M, Jara R, Vlodaysky I, O'Gorman P, Pagliuca A, Mo C, Baron RM, Aghemo A, Soiffer R, Fareed J, Carlo-Stella C, Richardson P. COVID-19-induced endotheliitis: emerging evidence and possible therapeutic strategies. *Br J Haematol*. 2021; 193(1): 43-51.
15. Pons S, Fodil S, Azoulay E, Zafrani L. The vascular endothelium: the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. *Crit Care*. 2020; 24(1): 353.
16. Hui KP, Cheung MC, Lai KL, Ng KC, Ho JC, Peiris M, Nicholls JM, Chan MC. Role of Epithelial-Endothelial Cell Interaction in the Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Clin Infect Dis*. 2022; 74(2): 199-209.
17. Zheng Z, Peng F, Xu B, Zhao J, Liu H, Peng J, Li Q, Jiang C, Zhou Y, Liu S, Ye C, Zhang P, Xing Y, Guo H, Tang W. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J Infect*. 2020; 81(2): e16-e25.

18. Karlinsky A, Kobak D. Tracking excess mortality across countries during the COVID-19 pandemic with the World Mortality Dataset. *Elife*. 2021; 10: e69336.
19. COVID-19 Excess Mortality Collaborators. Estimating excess mortality due to the COVID-19 pandemic: a systematic analysis of COVID-19-related mortality, *Lancet*. 2022; 399(10334): 1513-1536.
20. Haileamlak A. The impact of COVID-19 on health and health systems. *Ethiop J Health Sci*. 2021; 31(6): 1073-1074.
21. Bong CL, Brasher C, Chikumba E, McDougall R, Mellin-Olsen J, Enright A. The COVID-19 Pandemic: Effects on Low- and Middle-Income Countries. *Anesth Analg*. 2020; 131(1): 86-92.
22. Lupu D, Tiganasu R. COVID-19 and the efficiency of health systems in Europe. *Health Econ Rev*. 2022; 12(1): 14.
23. Flaumenhaft R, Enjoji K, Schmaier AA. Vasculopathy in COVID-19. *Blood*. 2022; 140(3): 222-235.
24. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, Duan G. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*. 2020; 12(4): 372.
25. Grobler C, Maphumulo SC, Grobbelaar LM, Bredenkamp JC, Laubscher GJ, Lourens PJ, Steenkamp J, Kell DB, Pretorius E. Covid-19: The Rollercoaster of Fibrin(Ogen), D-Dimer, Von Willebrand Factor, P-Selectin and Their Interactions with Endothelial Cells, Platelets and Erythrocytes. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(14): 5168.
26. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, Stürzl M, Staats L, Mahajan A, Schauer C, Kremer AN, Völkl S, Amann K, Evert K, Falkeis C, Wehrfritz A, Rieker RJ, Hartmann A, Kremer AE, Neurath MF, Muñoz LE, Schett G, Herrmann M. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine*. 2020; 58: 102925.
27. Chen Z, Xu W, Ma W, Shi X, Li S, Hao M, Fang Y, Zhang L. Clinical laboratory evaluation of COVID-19. *Clin Chim Acta*. 2021; 519: 172-182.
28. Asselah T, Durantel D, Pasmant E, Lau G, Schinazi RF. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *J Hepatol*. 2021; 74(1): 168-184.

29. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020; 26(4): 450-452.
30. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, Dahal S, Kumar H, Kv D. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J.* 2020; 96(1142): 753-758.
31. Cai J, Sun W, Huang J, Gamber M, Wu J, He G. Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(6): 1343-1345.
32. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) in China. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2020; 41, 145-151.
33. Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, Bernacchia D, Siano M, Oreni L, Rusconi S, Gervasoni C, Ridolfo AL, Rizzardini G, Antinori S, Galli M. Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(15): 889-890.
34. Recalcati S. Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020; 34(5): e212-e213.
35. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, Chang J, Hong C, Zhou Y, Wang D, Miao X, Li Y, Hu B. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020; 77(6): 683-690.
36. Zhang C, Shen L, Le KJ, Pan MM, Kong LC, Gu ZC, Xu H, Zhang Z, Ge WH, Lin HW. Incidence of Venous Thromboembolism in Hospitalized Coronavirus Disease 2019 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cardiovasc Med.* 2020; 7: 151.
37. Pijls BG, Jolani S, Atherley A, Derckx RT, Dijkstra JIR, Franssen GHL, Hendriks S, Richters A, Venemans-Jellema A, Zalpuri S, Zeegers MP. Demographic risk factors for COVID-19 infection, severity, ICU admission and death: a meta-analysis of 59 studies. *BMJ Open.* 2021; 11(1): e044640.
38. Gao YD, Ding M, Dong X, Zhang JJ, Kursat Azkur A, Azkur D, Gan H, Sun YL, Fu W, Li W, Liang HL, Cao YY, Yan Q, Cao C, Gao HY, Brüggem MC, van de Veen W, Sokolowska M,

Akdis M, Akdis CA. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy*. 2021; 76(2): 428-455.

39. Guan WJ, Liang WH, Zhao Y, Liang HR, Chen ZS, Li YM, Liu XQ, Chen RC, Tang CL, Wang T, Ou CQ, Li L, Chen PY, Sang L, Wang W, Li JF, Li CC, Ou LM, Cheng B, Xiong S, Ni ZY, Xiang J, Hu Y, Liu L, Shan H, Lei CL, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Cheng LL, Ye F, Li SY, Zheng JP, Zhang NF, Zhong NS, He JX; China Medical Treatment Expert Group for COVID-19. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J*. 2020; 55(5): 2000547.

40. Liang W, Liang H, Ou L, Chen B, Chen A, Li C, Li Y, Guan W, Sang L, Lu J, Xu Y, Chen G, Guo H, Guo J, Chen Z, Zhao Y, Li S, Zhang N, Zhong N, He J; China Medical Treatment Expert Group for COVID-19. Development and Validation of a Clinical Risk Score to Predict the Occurrence of Critical Illness in Hospitalized Patients With COVID-19. *JAMA Intern Med*. 2020; 180(8): 1081-1089.

41. Bohn MK, Lippi G, Horvath A, Sethi S, Koch D, Ferrari M, Wang CB, Mancini N, Steele S, Adeli K. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58(7): 1037-1052.

42. Peeling RW, Wedderburn CJ, Gracia PJ, Boeras D, Fongwen N, Nkengasong J, Sall A, Tanuri A, Heymann DL. Serology testing in the COVID-19 pandemic response. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20: e45-49.

43. Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, Castilletti C, Palmieri F, Gualano G, Vittozzi P, Nicastrì E, Lepore L, Antinori A, Vergori A, Caccamo N, Cantini F, Girardi E, Ippolito G, Grifoni A, Goletti D. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*. 2021; 27(2): 286.e7-286.e13.

44. Nagy B Jr. Foreword: Current laboratory aspects of COVID-19. *eJIFCC* 2022; 33(2): 75-78.

45. Sherren PB, Ostermann M, Agarwal S, Meadows CIS, Ioannou N, Camporota L. COVID-19-related organ dysfunction and management strategies on the intensive care unit: a narrative review. *Br J Anaesth*. 2020; 125(6): 912-925.

46. Yang W, Cao Q, Qin L, Wang X, Cheng Z, Pan A, Dai J, Sun Q, Zhao F, Qu J, Yan F. Clinical characteristics and imaging manifestations of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): A multi-center study in Wenzhou city, Zhejiang, China. *J Infect.* 2020; 80: 388-393.
47. da Rosa Mesquita R, Francelino Silva Junior LC, Santos Santana FM, Farias de Oliveira T, Campos Alcântara R, Monteiro Arnozo G, Rodrigues da Silva Filho E, Galdino Dos Santos AG, Oliveira da Cunha EJ, Salgueiro de Aquino SH, Freire de Souza CD. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. *Wien Klin Wochenschr.* 2021; 133(7-8): 377-382.
48. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, Alvarado-Arnez LE, Bonilla-Aldana DK, Franco-Paredes C, Henao-Martinez AF, Paniz-Mondolfi A, Lagos-Grisales GJ, Ramírez-Vallejo E, Suárez JA, Zambrano LI, Villamil-Gómez WE, Balbin-Ramon GJ, Rabaan AA, Harapan H, Dhama K, Nishiura H, Kataoka H, Ahmad T, Sah R; Latin American Network of Coronavirus Disease 2019-COVID-19 Research (LANCOVID-19). Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis.* 2020; 34: 101623.
49. Doerschug KC, Schmidt GA. Pulmonary Aspects of COVID-19. *Annu Rev Med.* 2022; 73: 81-93.
50. Bourgonje AR, Abdulle AE, Timens W, Hillebrands JL, Navis GJ, Gordijn SJ, Bolling MC, Dijkstra G, Voors AA, Osterhaus AD, van der Voort PH, Mulder DJ, van Goor H. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Pathol.* 2020; 251(3): 228-248.
51. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, Rech R, Colombo R, Antinori S, Corbellino M, Galli M, Catena E, Tosoni A, Gianatti A, Nebuloni M. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20(10): 1135-1140.
52. Hellman U, Karlsson MG, Engström-Laurent A, Cajander S, Dorofte L, Ahlm C, Laurent C, Blomberg A. Presence of hyaluronan in lung alveoli in severe Covid-19: An opening for new treatment options? *J Biol Chem.* 2020; 295(45): 15418-15422.
53. Batah SS, Fabro AT. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. *Respir Med.* 2021; 176: 106239.

54. Gattinoni L, Chiumello D, Caironi P, Busana M, Romitti F, Brazzi L, Camporota L. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? *Intensive Care Med.* 2020; 46(6): 1099-1102.
55. Madjid M, Safavi-Naeini P, Solomon SD, Vardeny O. Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System: A Review. *JAMA Cardiol.* 2020; 5(7): 831-840.
56. Shao F, Xu S, Ma X, Xu Z, Lyu J, Ng M, Cui H, Yu C, Zhang Q, Sun P, Tang Z. In-hospital cardiac arrest outcomes among patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. *Resuscitation.* 2020; 151: 18-23.
57. Yang X, Jin Y, Li R, Zhang Z, Sun R, Chen D. Prevalence and impact of acute renal impairment on COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2020; 24(1): 356.
58. Ostermann M, Lumlertgul N, Forni LG, Hoste E. What every Intensivist should know about COVID-19 associated acute kidney injury. *J Crit Care.* 2020; 60: 91-95.
59. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, Yi F, Yang HC, Fogo AB, Nie X, Zhang C. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int.* 2020; 98(1): 219-227.
60. Zahid U, Ramachandran P, Spitalewitz S, Alasadi L, Chakraborti A, Azhar M, Mikhalina G, Sherazi A, Narh JT, Khattar P, Bedi P. Acute Kidney Injury in COVID-19 Patients: An Inner City Hospital Experience and Policy Implications. *Am J Nephrol.* 2020; 51(10): 786-796.
61. Keyhanian K, Umeton RP, Mohit B, Davoudi V, Hajighasemi F, Ghasemi M. SARS-CoV-2 and nervous system: From pathogenesis to clinical manifestation. *J Neuroimmunol.* 2020; 350: 577436.
62. Berger D, Bloechlinger S, von Haehling S, Doehner W, Takala J, Z'Graggen WJ, Schefold JC. Dysfunction of respiratory muscles in critically ill patients on the intensive care unit. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016; 7(4): 403-412.
63. Mishu MA, Samiha F, Zahan K, Saha A, Ferdousee S. Multi-organ Dysfunction Due to SARS-CoV-2 Infection: A Comparative Overview. *Am J Intern Med.* 2021; 9(1): 26-35.
64. Hatmal MM, Alshaer W, Al-Hatamleh MAI, Hatmal M, Smadi O, Taha MO, Oweida AJ, Boer JC, Mohamud R, Plebanski M. Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2. *Cells.* 2020; 9(12): 2638.

65. Amraei R, Rahimi N. COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. *Cells*. 2020; 9(7): 1652.
66. Li MY, Li L, Zhang Y, Wang XS. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty*. 2020; 9(1): 45.
67. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022; 23(1): 3-20.
68. Nagy B, Csoma E, Kappelmayer J. SARS-CoV-2 szerológiai vizsgálatok: a humorális immunválasz vizsgálata különféle laboratóriumi tesztekkel. *Metabolizmus* 2022; 20(5): 254-262.
69. Neuman BW, Adair BD, Yoshioka C, Quispe JD, Orca G, Kuhn P, Milligan RA, Yeager M, Buchmeier MJ. Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy. *J Virol*. 2006; 80(16): 7918-7928.
70. Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, Rottier P, Warren G. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*. 1984; 308(5961): 751-752.
71. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castaño-Rodríguez C, Alcaraz A, Torres J, Aguilera VM, Enjuanes L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2014; 10(5): e1004077.
72. Sturman LS, Holmes KV, Behnke J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol*. 1980; 33(1): 449-462.
73. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004; 203(2): 631-637.
74. Jaimes JA, Millet JK, Whittaker GR. Proteolytic cleavage of the SARS-CoV-2 spike protein and the role of the novel S1/S2 site. *iScience*. 2020; 23(6): 101212.
75. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181(2): 271-280.e8.

76. McCracken IR, Saginc G, He L, Huseynov A, Daniels A, Fletcher S, Peghaire C, Kalna V, Andaloussi-Mäe M, Muhl L, Craig NM, Griffiths SJ, Haas JG, Tait-Burkard C, Lendahl U, Birdsey GM, Betsholtz C, Nosedá M, Baker AH, Randi AM. Lack of Evidence of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Expression and Replicative Infection by SARS-CoV-2 in Human Endothelial Cells. *Circulation*. 2021; 143(8): 865-868.
77. Escher R, Breakey N, Lämmle B. Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation. *Thromb Res*. 2020; 190: 62.
78. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother*. 2017; 94: 317-325.
79. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*. 2006; 20(5): 953-970.
80. El Bekay R, Alvarez M, Monteseirín J, Alba G, Chacón P, Vega A, Martin-Nieto J, Jiménez J, Pintado E, Bedoya FJ, Sobrino F. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood*. 2003; 102(2): 662-671.
81. Cantero-Navarro E, Fernández-Fernández B, Ramos AM, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Sánchez-Niño MD, Sanz AB, Ruiz-Ortega M, Ortiz A. Renin-angiotensin system and inflammation update. *Mol Cell Endocrinol*. 2021; 529: 111254.
82. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001; 10(3): 321-329.
83. Feener EP, Northrup JM, Aiello LP, King GL. Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1995; 95(3): 1353-1362.
84. Sabuhi R, Ali Q, Asghar M, Al-Zamily NR, Hussain T. Role of the angiotensin II AT2 receptor in inflammation and oxidative stress: opposing effects in lean and obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300(3): F700-706.
85. Li Z, Xu X, Yang M, Feng J, Liu C, Yang C. Role of angiotensin-converting enzyme 2 in neurodegenerative diseases during the COVID-19 pandemic. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12: 24453-24461.

86. Zamai L. The Yin and Yang of ACE/ACE2 Pathways: The Rationale for the Use of Renin-Angiotensin System Inhibitors in COVID-19 Patients. *Cells*. 2020; 9(7): 1704.
87. Paz Ocaranza M, Riquelme JA, García L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS, Lavandero S. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2020; 17(2): 116-129.
88. Santos RAS, Oudit GY, Verano-Braga T, Canta G, Steckelings UM, Bader M. The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019; 316(5): H958-H970.
89. Patel VB, Parajuli N, Oudit GY. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in diabetic cardiovascular complications. *Clin Sci (Lond)*. 2014; 126(7): 471-482.
90. Xu J, Sriramula S, Xia H, Moreno-Walton L, Culicchia F, Domenig O, Poglitsch M, Lazartigues E. Clinical Relevance and Role of Neuronal AT₁ Receptors in ADAM17-Mediated ACE2 Shedding in Neurogenic Hypertension. *Circ Res*. 2017; 121(1): 43-55.
91. Úri K, Fagyas M, Kertész A, Borbély A, Jenei C, Bene O, Csanádi Z, Paulus WJ, Édes I, Papp Z, Tóth A, Lizanecz E. Circulating ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2016; 17(4): 1470320316668435.
92. Fagyas M, Kertész A, Siket IM, Bánhegyi V, Kracsó B, Szegedi A, Szokol M, Vajda G, Rác I, Gulyás H, Szkibák N, Rác V, Csanádi Z, Papp Z, Tóth A, Sipka S. Level of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 activity is highly elevated in old-aged patients with aortic stenosis: implications for ACE2 as a biomarker for the severity of COVID-19. *Geroscience*. 2021; 43(1): 19-29.
93. Fagyas M, Bánhegyi V, Úri K, Enyedi A, Lizanecz E, Mányiné IS, Mártha L, Fülöp GÁ, Radovits T, Pólos M, Merkely B, Kovács Á, Szilvássy Z, Ungvári Z, Édes I, Csanádi Z, Boczán J, Takács I, Szabó G, Balla J, Balla G, Seferovic P, Papp Z, Tóth A. Changes in the SARS-CoV-2 cellular receptor ACE2 levels in cardiovascular patients: a potential biomarker for the stratification of COVID-19 patients. *Geroscience*. 2021; 43(5): 2289-2304.
94. Wallentin L, Lindbäck J, Eriksson N, Hijazi Z, Eikelboom JW, Ezekowitz MD, Granger CB, Lopes RD, Yusuf S, Oldgren J, Siegbahn A. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) levels in relation to risk factors for COVID-19 in two large cohorts of patients with atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2020; 41(41): 4037-4046.

95. Xiao L, Sakagami H, Miwa N. ACE2: The key Molecule for Understanding the Pathophysiology of Severe and Critical Conditions of COVID-19: Demon or Angel. *Viruses*. 2020; 12(5): 491.
96. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, Raizada MK, Grant MB, Oudit GY. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res*. 2020; 126(10): 1456-1474.
97. Cousin VL, Giraud R, Bendjelid K. Pathophysiology of COVID-19: Everywhere You Look You Will See ACE₂! *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8: 694029.
98. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2002; 277(17): 14838-14843.
99. Colarusso C, Terlizzi M, Pinto A, Sorrentino R. A lesson from a saboteur: High-MW kininogen impact in coronavirus-induced disease 2019. *Br J Pharmacol*. 2020; 177(21): 4866-4872.
100. van Lier D, Kox M, Santos K, van der Hoeven H, Pillay J, Pickkers P. Increased blood angiotensin converting enzyme 2 activity in critically ill COVID-19 patients. *ERJ Open Res*. 2021; 7(1): 00848-2020.
101. Kragstrup TW, Singh HS, Grundberg I, Nielsen AL, Rivellese F, Mehta A, Goldberg MB, Filbin MR, Qvist P, Bibby BM. Plasma ACE2 predicts outcome of COVID-19 in hospitalized patients. *PLoS One*. 2021; 16(6): e0252799.
102. Kaur G, Yogeswaran S, Muthumalage T, Rahman I. Persistently Increased Systemic ACE2 Activity Is Associated With an Increased Inflammatory Response in Smokers With COVID-19. *Front Physiol*. 2021; 12: 653045.
103. Patel SK, Juno JA, Lee WS, Wragg KM, Hogarth PM, Kent SJ, Burrell LM. Plasma ACE2 activity is persistently elevated following SARS-CoV-2 infection: implications for COVID-19 pathogenesis and consequences. *Eur Respir J*. 2021; 57(5): 2003730.

104. Reindl-Schwaighofer R, Hödlmoser S, Eskandary F, Poglitsch M, Bonderman D, Strassl R, Aberle JH, Oberbauer R, Zoufaly A, Hecking M. ACE2 Elevation in Severe COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021; 203(9): 1191-1196.
105. Rieder M, Wirth L, Pollmeier L, Jeserich M, Goller I, Baldus N, Schmid B, Busch HJ, Hofmann M, Kern W, Bode C, Duerschmied D, Lothar A. Serum ACE2, Angiotensin II, and Aldosterone Levels Are Unchanged in Patients With COVID-19. *Am J Hypertens.* 2021; 34(3): 278-281.
106. Kintscher U, Slagman A, Domenig O, Röhle R, Konietschke F, Poglitsch M, Möckel M. Plasma Angiotensin Peptide Profiling and ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)-2 Activity in COVID-19 Patients Treated With Pharmacological Blockers of the Renin-Angiotensin System. *Hypertension.* 2020; 76(5): e34-e36.
107. Rojas M, Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Ramírez-Santana C, Anaya JM. How Important Is the Assessment of Soluble ACE-2 in COVID-19? *Am J Hypertens.* 2021; 34(3): 296-297.
108. Nagy B Jr, Fejes Z, Szentkereszty Z, Sütő R, Várkonyi I, Ajzner É, Kappelmayer J, Papp Z, Tóth A, Fagyas M. A dramatic rise in serum ACE2 activity in a critically ill COVID-19 patient. *Int J Infect Dis.* 2021; 103: 412-414.
109. Clauss A, Lilja H, Lundwall A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J.* 2002; 368: 233-242.
110. Bingle L, Singleton V, C.D. Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2) is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene.* 2002; 21: 2768-2773.
111. Zani ML, Baranger K, Guyot N, Dallet-Choisy S, Moreau T. Protease inhibitors derived from elafin and SLPI and engineered to have enhanced specificity towards neutrophil serine proteases. *Protein Sci.* 2009; 18(3): 579-594.
112. Baranger K, Zani ML, Labas V, Dallet-Choisy S, Moreau T. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is, like its homologue trappin-2 (pre-elafin), a transglutaminase substrate. *PLoS One.* 2011; 6(6): e20976.

113. McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest.* 1995; 96(1): 456-464.
114. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod.* 1991; 45: 350-357.
115. Chhikara N, Saraswat M, Tomar AK, Dey S, Singh S, Yadav S. Human epididymis protein-4 (HE-4): a novel cross-class protease inhibitor. *PLoS One.* 2012; 7(11): e47672.
116. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene.* 1999; 238(2): 375-385.
117. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol.* 2006;19(6): 847-853.
118. Fabbro M, Lamy PJ, Touraine C, Floquet A, Ray-Coquard I, Mollevi C. HE4 and CA-125 kinetics to predict outcome in patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma: the META4 clinical trial. *Front Oncol.* 2024; 13: 1308630
119. Nagy B Jr, Bhattoa HP, Steiber Z, Csobán M, Szilasi M, Méhes G, Müller M, Lázár J, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. Serum human epididymis protein 4 (HE4) as a tumor marker in men with lung cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52(11): 1639-1648.
120. Nagy B Jr, Nagy B, Fila L, Clarke LA, Gönczy F, Bede O, Nagy D, Újhelyi R, Szabó Á, Anghelyi A, Major M, Bene Z, Fejes Z, Antal-Szalmás P, Bhattoa HP, Balla G, Kappelmayer J, Amaral MD, Macek M Jr, Balogh I. Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis. *Chest.* 2016; 150(3): 661-672.
121. Li L, Yao Y, Liang J, Zhan X, Wang F, Yue C, Wu BQ, Hu S, Liu M, Wan J, Luo J. Serum human epididymis protein 4 concentrations are associated with severity of patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Chim Acta.* 2020; 502: 255-260.
122. Meng K, Tian M, Gui X, Xie M, Gao Y, Shi S, Zhao T, Xiao Y, Cai H, Ding J. Human epididymis protein 4 is associated with severity and poor prognosis of connective tissue disease-

associated interstitial lung disease with usual interstitial pneumonia pattern. *Int Immunopharmacol.* 2022; 108: 108704.

123. Bösmüller H, Matter M, Fend F, Tzankov A. The pulmonary pathology of COVID-19. *Virchows Arch.* 2021; 478(1): 137-150.

124. Lai X, Kang M, Chen Y, Xu F, Wang K, Cao J. Elevated serum level of human epididymal protein 4 (HE4) predicts poor prognosis in the critically ill with sepsis: A prospective observational cohort study. *Clin Biochem.* 2022; 109-110: 79-85.

125. Luo J, Liang J, Wang S, Huang S, Zhou L, Shi Y, Zhang J, Wang Y, Wu BQ, Li L. Serum human epididymis secretory protein 4 correlates with sepsis-associated acute respiratory distress syndrome and 28-day mortality in critically ill patients. *Ann Clin Biochem.* 2022; 59(5): 338-346.

126. Schirinzi A, Cazzolla AP, Lovero R, Lo Muzio L, Testa NF, Ciavarella D, et al. New Insights in Laboratory Testing for COVID-19 Patients: Looking for the Role and Predictive Value of *Human epididymis secretory protein 4* (HE4) and the Innate Immunity of the Oral Cavity and Respiratory Tract. *Microorganisms.* 2020; 8: 1718.

127. Wei X, Su J, Yang K, Wei J, Wan H, Cao X, et al. Elevations of serum cancer biomarkers correlate with severity of COVID-19. *J Med Virol.* 2020; 92: 2036-2041.

128. Libby P, Lüscher T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J.* 2020; 41(32): 3038-3044.

129. Libby P. The vascular biology of atherosclerosis In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF, eds. *Braunwald's Heart Disease, 11th ed Philadelphia, PA: Elsevier.* 2018; p859–875.

130. Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttorp N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost.* 2009; 102(6): 1103-1109.

131. Vanhoutte PM, Shimokawa H. Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation.* 1989; 80(1): 1-9.

132. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(10): 803-815.

133. Inciardi RM, Solomon SD, Ridker PM, Metra M. Coronavirus 2019 Disease (COVID-19), Systemic Inflammation, and Cardiovascular Disease. *J Am Heart Assoc.* 2020; 9(16): e017756.
134. Zhang J, Tecson KM, McCullough PA. Endothelial dysfunction contributes to COVID-19-associated vascular inflammation and coagulopathy. *Rev Cardiovasc Med.* 2020; 21(3): 315-319.
135. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, Huang H, Zhang L, Zhou X, Du C, Zhang Y, Song J, Wang S, Chao Y, Yang Z, Xu J, Zhou X, Chen D, Xiong W, Xu L, Zhou F, Jiang J, Bai C, Zheng J, Song Y. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020; 180(7): 934-943.
136. Goveia J, Rohlenova K, Taverna F, Treps L, Conradi LC et al. An Integrated Gene Expression Landscape Profiling Approach to Identify Lung Tumor Endothelial Cell Heterogeneity and Angiogenic Candidates. *Cancer Cell.* 2020; 37(1): 21-36.e13.
137. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; 407(6801): 233-241.
138. Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, Ballantyne C, Cannon C P, Criqui M, Cushman M et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: Collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010; 375, 1536–1544.
139. Huang F, Wang K, Shen J. Lipoprotein-associated phospholipase A2: The story continues. *Med. Res. Rev.* 2020; 40, 79-134.
140. Caslake M, Packard C. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ as a biomarker for coronary disease and stroke. *Nat. Rev. Cardiol.* 2005; 2: 529–535.
141. Kim M, Yoo H J, Lee D, Lee J H. Oxidized LDL induces procoagulant profiles by increasing lysophosphatidylcholine levels, lysophosphatidylethanolamine levels, and Lp-PLA₂ activity in borderline hypercholesterolemia. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2020; 30: 1137-1146.
142. Hu X, Chen D, Wu L, He G, Ye W. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clin. Chim. Acta* 2020; 510, 105–110.

143. Kellner M, Noonepalle S, Lu Q, Srivastava A, Zemskov E, Black S M. ROS Signaling in the Pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *Adv Exp Med Biol.* 2017; 967: 105–137.
144. Dua P, Mishra A, Reeta K H. Lp-PLA2 as a biomarker and its possible associations with SARS-CoV-2 infection. *Biomark. Med.* 2022; 16: 821–832.
145. Laganá G, Barreca D, Calderaro A, Bellocco E. Lactate Dehydrogenase Inhibition: Biochemical Relevance and Therapeutical Potential. *Curr Med Chem.* 2019; 26(18): 3242-3252.
146. Read JA, Winter VJ, Eszes CM, Sessions RB and Brady RL. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins*, 2001; 43: 175-185.
147. Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2020; 58(7): 1021-1028.
148. Szarpak L, Ruetzler K, Safiejko K, Hampel M, Pruc M, Kanczuga-Koda L et al. Lactate dehydrogenase level as a COVID-19 severity marker. *Am J Emerg Med*, 2021; 45(45), 638-639.
149. Hu J, Zhou J, Dong F, Tan J, Wang S, Li Z, Zhang X, Zhang H, Ming J, Huang T. Combination of serum lactate dehydrogenase and sex is predictive of severe disease in patients with COVID-19. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(42): e22774.
150. Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, Song Z, Zha Y, Xue Y, Gu G. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12(12): 11245-11258.
151. Poggiali E, Zaino D, Immovilli P, Rovero L, Losi G, Dacrema A, Nuccetelli M, Vadacca GB, Guidetti D, Vercelli A, Magnacavallo A, Bernardini S, Terracciano C. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in CoVID-19 patients. *Clin Chim Acta.* 2020; 509: 135-138.
152. Han H, Xie L, Liu R, Yang J, Liu F, Wu K, Chen L, Hou W, Feng Y, Zhu C. Analysis of heart injury laboratory parameters in 273 COVID-19 patients in one hospital in Wuhan, China. *J Med Virol.* 2020; 92(7): 819-823.

153. Drent M, Cobben NA, Henderson RF, Wouters EF, van Dieijen-Visser M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J*. 1996; 9(8): 1736-1742.
154. Serrano-Lorenzo P, Coya ON, López-Jimenez A, Blázquez A, Delmiro A, Lucia A, Arenas J, Martín MA; COVID-19 '12 Octubre' Hospital Clinical Biochemistry Study Group. Plasma LDH: A specific biomarker for lung affectation in COVID-19? *Pract Lab Med*. 2021; 25: e00226.
155. Vassiliou AG, Keskinidou C, Jahaj E, Gallos P, Dimopoulou I, Kotanidou A, Orfanos SE. ICU Admission Levels of Endothelial Biomarkers as Predictors of Mortality in Critically Ill COVID-19 Patients. *Cells*. 2021; 10(1): 186.
156. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, Du B, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Zhong NS; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020; 382(18): 1708-1720.
157. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020; 395(10229): 1054-1062.
158. Liu Y, Sun W, Guo Y, Chen L, Zhang L, Zhao S, Long D, Yu L. Association between platelet parameters and mortality in coronavirus disease 2019: Retrospective cohort study. *Platelets*. 2020; 31(4): 490-496.
159. Nagy B Jr, Bene Z, Fejes Z, Heltshe SL, Reid D, Ronan NJ, McCarthy Y, Smith D, Nagy A, Joseloff E, Balla G, Kappelmayer J, Macek M Jr, Bell SC, Plant BJ, Amaral MD, Balogh I. Human epididymis protein 4 (HE4) levels inversely correlate with lung function improvement (Δ FEV₁) in cystic fibrosis patients receiving ivacaftor treatment. *J Cyst Fibros*. 2019; 18(2): 271-277.
160. Pócsi M, Fejes Z, Bene Z, Nagy A, Balogh I, Amaral MD, Macek M Jr, Nagy B Jr. Human epididymis protein 4 (HE4) plasma concentration inversely correlates with the improvement of

cystic fibrosis lung disease in p.Phe508del-CFTR homozygous cases treated with the CFTR modulator lumacaftor/ivacaftor combination. *J Cyst Fibros*. 2023; 22(6): 1085-1092.

161. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, Ng DYM, Wan CKC, Yang P, Wang Q, Peiris M, Poon LLM. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia, *Clin Chem*. 2020; 66(4): 549-555.

162. Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev*. 2021; 37(2): e3377.

163. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223): 497-506.

164. Cecconi M, Forni G, Mantovani A. Ten things we learned about COVID-19. *Intensive Care Med*. 2020; 46(8): 1590-1593.

165. Price-Haywood EG, Burton J, Fort D, Seoane L. Hospitalization and Mortality among Black Patients and White Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 382(26): 2534-2543.

166. Chen T, Wu D, Chen H, Yan W, Yang D, Chen G, Ma K, Xu D, Yu H, Wang H, Wang T, Guo W, Chen J, Ding C, Zhang X, Huang J, Han M, Li S, Luo X, Zhao J, Ning Q. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study *BMJ*. 2020; 368: m1091.

167. Zhou Y, He Y, Yang H, Yu H, Wang T, Chen Z, Yao R, Liang Z. Development and validation a nomogram for predicting the risk of severe COVID-19: A multi-center study in Sichuan, China. *PLOS One*. 2020; 15(5): e0233328.

168. Xie J, Covassin N, Fan Z, Singh P, Gao W, Li G, Kara T, Somers VK. Association between hypoxemia and mortality in patients with COVID-19. *Mayo Clinic Proceedings*. 2020; 95(6): 1138-1147.

169. ARDS Definition Task Force; Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome. *JAMA*. 2012; 307(23): 2526-2533.

170. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe

organ dysfunction/failure: On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996; 22(7): 707-710.

171. Emberi Erőforrások Minisztériuma. A 2020. évben azonosított új koronavírus (SARS-CoV-2) okozta fertőzések (COVID-19) megelőzésének és terápiájának kézikönyve. (2020.)

172. Sinatti G, Santini SJ, Tarantino G, Picchi G, Cosimini B, Ranfone F, Casano N, Zingaropoli MA, Iapadre N, Bianconi S, Armiento A, Carducci P, Ciardi MR, Mastroianni CM, Grimaldi A, Balsano C. PaO₂/FiO₂ ratio forecasts COVID-19 patients' outcome regardless of age: a cross-sectional, monocentric study. *Intern Emerg Med.* 2022; 17(3): 665-673.

173. Zinellu A, De Vito A, Scano V, Paliogiannis P, Fiore V et al. The PaO₂/FiO₂ ratio on admission is independently associated with prolonged hospitalization in COVID-19 patients. *J Infect Dev Ctries.* 2021; 15(3): 353-359.

174. Sartini S, Massobrio L, Cutuli O, Campodonico P, Bernini C et al. Role of SatO₂, PaO₂/FiO₂ Ratio and PaO₂ to Predict Adverse Outcome in COVID-19: A Retrospective, Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2021; 18(21): 11534.

175. Rubin GD, Ryerson CJ, Haramati LB, Sverzellati N, Kanne JP, Raouf S, Schluger NW, Volpi A, Yim JJ, Martin IBK, Anderson DJ, Kong C, Altes T, Bush A, Desai SR, Goldin J, Goo JM, Humbert M, Inoue Y, Kauczor HU, Luo F, Mazzone PJ, Prokop M, Remy-Jardin M, Richeldi L, Schaefer-Prokop CM, Tomiyama N, Wells AU, Leung AN. The Role of Chest Imaging in Patient Management During the COVID-19 Pandemic: A Multinational Consensus Statement From the Fleischner Society. *Chest.* 2020; 158(1): 106-116.

176. Wong HYF, Lam HYS, Fong AH, Leung ST, Chin TW, Lo CSY, Lui MM, Lee JCY, Chiu KW, Chung TW, Lee EYP, Wan EYF, Hung IFN, Lam TPW, Kuo MD, Ng MY. Frequency and Distribution of Chest Radiographic Findings in Patients Positive for COVID-19. *Radiology.* 2020; 296(2): E72-E78.

177. Mehrabi Nejad MM, Abkhoo A, Salahshour F, Salehi M, Gity M, Komaki H, Kolahi S. Chest CT Scan Features to Predict COVID-19 Patients' Outcome and Survival. *Radiol Res Pract.* 2022; 2022: 4732988.

178. Zhang B, Zhou X, Zhu C, Song Y, Feng F, Qiu Y, Feng J, Jia Q, Song Q, Zhu B, Wang J. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. *Front Mol Biosci.* 2020; 7: 157.

179. Sun DW, Zhang D, Tian RH, Li Y, Wang YS, Cao J, Tang Y, Zhang N, Zan T, Gao L, Huang YZ, Cui CL, Wang DX, Zheng Y, Lv GY. The underlying changes and predicting role of peripheral blood inflammatory cells in severe COVID-19 patients: A sentinel? *Clin Chim Acta*. 2020; 508: 122-129.
180. Liu Y, Sun W, Guo Y, Chen L, Zhang L, Zhao S, Long D, Yu L. Association between platelet parameters and mortality in coronavirus disease 2019: Retrospective cohort study. *Platelets*. 2020; 31: 490–496.
181. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, Huang H, Zhang L, Zhou X, Du C, Zhang Y, Song J, Wang S, Chao Y, Yang Z, Xu J, Zhou X, Chen D, Xiong W, Xu L, Zhou F, Jiang J, Bai C, Zheng J, Song Y. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020; 180: 934–943.
182. Amgalan A, Othman M. Hemostatic laboratory derangements in COVID-19 with a focus on platelet count. *Platelets*. 2020; 31(6): 740–745.
183. Billoir P, Leprêtre P, Thill C, Bellien J, Le Cam Duchez V, Selim J, Tamion F, Clavier T, Besnier E. Routine and Advanced Laboratory Tests for Hemostasis Disorders in COVID-19 Patients: A Prospective Cohort Study. *J Clin Med*. 2022; 11(5): 1383.
184. Li H, Xiang X, Ren H, Xu L, Zhao L, Chen X, Long H, Wang Q, Wu Q. Serum Amyloid A is a biomarker of severe Coronavirus Disease and poor prognosis. *J Infect*. 2020; 80(6): 646–655.
185. Zhang G, Zhang J, Wang B, Zhu X, Wang Q, Qiu S. Analysis of clinical characteristics and laboratory findings of 95 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a retrospective analysis. *Respir Res*. 2020; 21(1): 74.
186. Bansal A, Singh AD, Jain V, Aggarwal M, Gupta S, Padappayil RP, Nadeem M, Joshi S, Mian A, Greathouse T, Wells D, Gupta M, Khan MZ. The association of D-dimers with mortality, intensive care unit admission or acute respiratory distress syndrome in patients hospitalized with coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Heart Lung*. 2021; 50(1): 9-12.
187. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM.

Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 2005; 436(7047): 112-116.

188. Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, Farzan M, Wohlford-Lenane C, Perlman S, McCray PB Jr. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol*. 2005; 79(23): 14614-14621.

189. James NE, Chichester C, Ribeiro JR. Beyond the Biomarker: Understanding the Diverse Roles of Human Epididymis Protein 4 in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *Front Oncol*. 2018; 8: 124.

190. Mo D, He F. Serum Human Epididymis Secretory Protein 4 (HE4) is a Potential Prognostic Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Lab*. 2018; 64(9): 1421-1428.

191. Nagy B Jr, Krasznai ZT, Balla H, Csobán M, Antal-Szalmás P, Hernádi Z, Kappelmayer J. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem*. 2012; 49(Pt 4): 377-380.

192. Yuan T, Li Y. Human Epididymis Protein 4 as a Potential Biomarker of Chronic Kidney Disease in Female Patients With Normal Ovarian Function. *Lab Med*. 2017; 48(3): 238-243.

193. Nishiyama N, Masuo M, Nukui Y, Tateishi T, Kishino M, Tateishi U, Morota K, Ohbo K, Miyazaki Y. Human epididymis protein 4 is a new biomarker to predict the prognosis of progressive fibrosing interstitial lung disease. *Respir Investig*. 2021; 59(1): 90-98.

194. Bene Z, Fejes Z, Macek M Jr, Amaral MD, Balogh I, Nagy B Jr. Laboratory biomarkers for lung disease severity and progression in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2020; 508: 277-286.

195. Bene Z, Fejes Z, Szanto TG, Fenyvesi F, Váradi J, Clarke LA, Panyi G, Macek M Jr, Amaral MD, Balogh I, Nagy B Jr. Enhanced Expression of Human Epididymis Protein 4 (HE4) Reflecting Pro-Inflammatory Status Is Regulated by CFTR in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 592184.

196. Small DM, Doherty DF, Dougan CM, Weldon S, Taggart CC. The role of whey acidic protein four-disulfide-core proteins in respiratory health and disease. *Biol Chem*. 2017; 398(4): 425-440.

197. Gasiorowska E, Kluz T, Lipski D, Warchoł W, Tykarski A, Nowak-Markwitz E. Human Epididymis Protein 4 (HE4) Reference Limits in Polish Population of Healthy Women, Pregnant Women, and Women with Benign Ovarian Tumors. *Dis Markers*. 2019; 2019: 3890906.
198. Oliva A, Rando E, Al Ismail D, De Angelis M, Cancelli F, Miele MC, Aronica R, Mauro V, Di Timoteo F, Loffredo L, Mastroianni CM. Role of Serum E-Selectin as a Biomarker of Infection Severity in Coronavirus Disease 2019. *J Clin Med*. 2021; 10(17): 4018.
199. Gelzo M, Cacciapuoti S, Pinchera B, De Rosa A, Cernerà G, Scialò F, Comegna M, Mormile M, Fabbrocini G, Parrella R, Corso G, Gentile I, Castaldo G. Further Findings Concerning Endothelial Damage in COVID-19 Patients. *Biomolecules*. 2021; 11(9): 1368.
200. Mohebbi A, Haybar H, Nakhaei Moghaddam F, Rasti Z, Vahid MA, Saki N. Biomarkers of endothelial dysfunction are associated with poor outcome in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2023; 33(4): e2442.
201. Watany MM, Abdou S, Elkolaly R, Elgharbawy N, Hodeib H. Evaluation of admission levels of P, E and L selectins as predictors for thrombosis in hospitalized COVID-19 patients. *Clin Exp Med*. 2022; 22(4): 567-575.
202. Levonen AL, Vähäkangas E, Koponen JK, Ylä-Herttuala S. Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease: current status and future perspectives. *Circulation*. 2008; 117(16): 2142-2150.
203. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, Foster E, Hlatky MA, Hodgson JM, Kushner FG, Lauer MS, Shaw LJ, Smith SC Jr, Taylor AJ, Weintraub WS, Wenger NK, Jacobs AK; American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2010; 122(25): e584-636.
204. Huang Z, Jiang H, Cui X, Liang G, Chen Y, Wang T, Sun Z, Qi L. Elevated serum levels of lipoprotein-associated phospholipase A2 predict mortality rates in patients with sepsis. *Mol Med Rep*. 2018; 17(1) :1791-1798.

205. Birnhuber A, Fließner E, Gorkiewicz G, Zacharias M, Seeliger B, David S, Welte T, Schmidt J, Olschewski H, Wygrecka M, Kwapiszewska G. Between inflammation and thrombosis: endothelial cells in COVID-19. *Eur Respir J*. 2021; 58(3): 2100377.
206. Liu N, Long H, Sun J, Li H, He Y, Wang Q, Pan K, Tong Y, Wang B, Wu Q, Gong L. New laboratory evidence for the association between endothelial dysfunction and COVID-19 disease progression. *J Med Virol*. 2022; 94(7): 3112-3120.
207. Tong M, Jiang Y, Xia D, Xiong Y, Zheng Q, Chen F, Zou L, Xiao W, Zhu Y. Elevated Expression of Serum Endothelial Cell Adhesion Molecules in COVID-19 Patients. *J Infect Dis*. 2020; 222(6): 894-898.
208. Yao S, Luo N, Liu J, Zha H, Ai Y, Luo J, Shi S, Wu K. Elevated Serum Levels of Progranulin and Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Patients with COVID-19. *J Inflamm Res*. 2021; 14: 4785-4794.
209. Fernández S, Palomo M, Molina P, Díaz-Ricart M, Escolar G, Téllez A, Seguí F, Ventosa H, Torramade-Moix S, Rovira M, Carreras E, Nicolás JM, Castro P. Progressive endothelial cell damage in correlation with sepsis severity. Defibrotide as a contender. *J Thromb Haemost*. 2021; 19(8): 1948-1958.
210. Vieceli Dalla Sega F, Fortini F, Spadaro S, Ronzoni L, Zucchetti O, Manfrini M, Mikus E, Fogagnolo A, Torsani F, Pavasini R, Marracino L, Verri M, Morandi L, D'Aniello E, Volta CA, Campo G, Ferrari R, Rizzo P, Contoli M. Time course of endothelial dysfunction markers and mortality in COVID-19 patients: A pilot study. *Clin Transl Med*. 2021; 11(3): e283.
211. Keskinidou C, Vassiliou AG, Zacharis A, Jahaj E, Gallos P, Dimopoulou I, Orfanos SE, Kotanidou A. Endothelial, Immunothrombotic, and Inflammatory Biomarkers in the Risk of Mortality in Critically Ill COVID-19 Patients: The Role of Dexamethasone. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11(7): 1249.
212. Bruni F, Charitos P, Lampart M, Moser S, Siegemund M, Bingisser R, Osswald S, Bassetti S, Twerenbold R, Trendelenburg M, Rentsch KM, Osthoff M. Complement and endothelial cell activation in COVID-19 patients compared to controls with suspected SARS-CoV-2 infection: A prospective cohort study. *Front Immunol*. 2022; 13: 941742.
213. Ali RA, Wuescher LM, Worth RG. Platelets: essential components of the immune system. *Curr Trends Immunol*. 2015; 16: 65-78.

214. Marcoux G, Laroche A, Espinoza Romero J, Boilard E. Role of platelets and megakaryocytes in adaptive immunity. *Platelets*. 2021; 32(3): 340-351.
215. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 9060143.
216. Gómez LC, Curto SV, Sebastian MBP, Jiménez BF, Duniol MD. Predictive Model of Severity in SARS CoV-2 Patients at Hospital Admission Using Blood-Related Parameters. *EJIFCC*. 2021; 32(2): 255-264.
217. Lagolio E, Demurtas J, Buzzetti R, Cortassa G, Bottone S, Spadafora L, Cocino C, Smith L, Benzing T, Polidori MC. A rapid and feasible tool for clinical decision making in community-dwelling patients with COVID-19 and those admitted to emergency departments: the Braden-LDH-Horowitz Assessment-BLITZ. *Intern Emerg Med*. 2022; 17(3): 839-844.
218. Lott JA, Nemensanszky E. Lactate dehydrogenase. In: Lott JA, Wolf PL, eds. *Clinical Enzymology, a case oriented approach*. 1987; pp. 213–244.
219. Canovi S, Besutti G, Bonelli E, Iotti V, Ottone M, Albertazzi L, Zerbini A, Pattacini P, Giorgi Rossi P, Colla R, Fasano T; Reggio Emilia COVID-19 Working Group. The association between clinical laboratory data and chest CT findings explains disease severity in a large Italian cohort of COVID-19 patients. *BMC Infect Dis*. 2021; 21(1): 157.
220. Turrini M, Gardellini A, Beretta L, Buzzi L, Ferrario S, Vasile S, Clerici R, Colzani A, Liparulo L, Scognamiglio G, Imperiali G, Corrado G, Strada A, Galletti M, Castiglione N, Zanon C. Clinical Course and Risk Factors for In-Hospital Mortality of 205 Patients with SARS-CoV-2 Pneumonia in Como, Lombardy Region, Italy. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(6): 640.

11. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/528/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sütő Renáta
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sütő, R.**, Pócsi, M., Fagyas, M., Kalina, E., Fejes, Z., Szentkereszty, Z., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Comparison of Different Vascular Biomarkers for Predicting In-Hospital Mortality in Severe SARS-CoV-2 Infection.
Microorganisms. 12 (1), 1-15, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms12010229>
IF: 4.1 (2023)
2. **Sütő, R.**, Pócsi, M., Szabo, Z., Fejes, Z., Ivády, G., Kerekes, G., Fagyas, M., Nagy, A. C., Szentkereszty, Z., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Elevated level of serum human epididymis protein 4 (HE4) predicts disease severity and mortality in COVID-19 pneumonia.
BMC Pulm Med. 23 (1), 1-11, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12890-023-02811-y>
IF: 2.6
3. Fagyas, M., Fejes, Z., **Sütő, R.**, Nagy, Z., Székely, B., Pócsi, M., Ivády, G., Bíró, E., Bekő, G., Nagy, A. C., Kerekes, G., Szentkereszty, Z., Papp, Z., Tóth, A., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Circulating ACE2 activity predicts mortality and disease severity in hospitalized COVID-19 patients.
Int. J. Infect. Dis. 115, 8-16, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.028>
IF: 8.4
4. Dzsudzsák, E., **Sütő, R.**, Pócsi, M., Fagyas, M., Szentkereszty, Z., Nagy, B. Jr.: Profiling of lactate dehydrogenase isoenzymes in COVID-19 disease.
EJIFCC. 32 (4), 432-441, 2021.





További közlemények

5. Csoma, E., Nagy, K. Á., **Sütő, R.**, Szakács, S. E., Pócsi, M., Nagy, A. C., Bíró, K., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Evaluation of the diagnostic performance of two automated SARS-CoV-2 neutralization immunoassays following two doses of mRNA, adenoviral vector, and inactivated whole-virus vaccinations in COVID-19 naïve subjects.

Microorganisms. 11 (5), 1-13, 2023.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11051187>

IF: 4.1

6. Nagy, B. Jr., Fejes, Z., Szentkereszty, Z., **Sütő, R.**, Várkonyi, I., Ajzner, É., Kappelmayer, J., Papp, Z., Tóth, A., Fagyas, M.: A dramatic rise in serum ACE2 activity in a critically ill COVID-19 patient.

Int. J. Infect. Dis. 103, 412-414, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.184>

IF: 12.074

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,274

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
15,1**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.10.25.



12. Tárgyszavak - keywords

COVID-19

SARS-CoV-2

Pneumonia

ARDS

Endothél diszfunkció – endothelial dysfunction

Gyulladás - inflammation

ACE2

RAAS

HE4

VCAM-1

E-selectin

P-selectin

CD40L

Vérlemezke aktiváció – platelet activation

Lp-PLA2

LDH izoenzimek – LDH isoforms

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Nagy Béla** egyetemi docens úrnak, hogy az elmúlt évek alatt a kísérletek tervezésétől és kivitelezésétől, a prezentációk elkészítésén át, a közlemények és az értekezés megírásáig mindenben segített és mindvégig ösztönözte tudományos tevékenységemet.

Hálásan köszönöm **Dr. Kappelmayer János** professzor úrnak, hogy a doktori képzés során biztosította a laboratóriumi munkám tárgyi feltételeit. Köszönöm, hogy eredményeinket több hazai konferencián bemutathattuk.

Köszönetet mondok jelenlegi intézetigazgatómnak, **Dr. Fülesdi Béla** professzor úrnak és szakmai koordinátoromnak, **Dr. Szentkereszty Zoltán** főorvos úrnak, hogy támogatták a PhD-tanulmányaim elvégzését.

Köszönöm az együttműködő klinikus kollégáknak (**Dr. Kerekes György, Dr. Szentkereszty Zoltán, Dr. Szabó Zsolt, Dr. Nagy Zsuzsanna, Dr. Székely Borbála**) a COVID-19 és szeptikus betegektől származó vérminták biztosítását.

Köszönetemet fejezem ki kollaborációs partnereinknek, **Dr. Papp Zoltán és Dr. Tóth Attila** professzor uraknak, **Dr. Fagyas Miklós** egyetemi docensnek, **Dr. Bekó Gabriella** főorvosnőnek és **Dr. Bíró Edinának**, hogy a vizsgálatok megtervezésében, kivitelezésében és az eredmények interpretálásában nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak.

Köszönöm **Dr. Fejes Zsoltnak, Pócsi Mariannának, és Dzsudzsák Erika** analitikusnak, hogy a vizsgálati módszerek elvégzésével nagyban hozzájárultak a közlemények elkészítéséhez.

Külön köszönöm **Dr. Nagy Attila** egyetemi docensnek a statisztikai számolásokban nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm **Férjemnek és Családomnak**, hogy mellettem álltak és biztatásukkal folyamatosan támogatták kutatási feladataimat is.

14. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye:

1. Fagyas M, Fejes Z, **Sütő R**, Nagy Z, Székely B, Pócsi M, Ivády G, Bíró E, Bekő G, Nagy A, Kerekes G, Szentkereszty Z, Papp Z, Tóth A, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Circulating ACE2 activity predicts mortality and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *Int J Infect Dis.* 2022; 115: 8-16.
2. Dzsudzsák E, **Sütő R**, Pócsi M, Fagyas M, Szentkereszty Z, Nagy B Jr. Profiling of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in COVID-19 Disease. *EJIFCC.* 2021; 32(4): 432-441.
3. **Sütő R**, Pócsi M, Szabó Z, Fejes Z, Ivády G, Kerekes G, Fagyas M, Nagy A, Szentkereszty Z, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Elevated level of serum human epididymis protein 4 (HE4) predicts disease severity and mortality in COVID-19 pneumonia. *BMC Pulm Med.* 2023; 23(1): 512.
4. **Sütő R**, Pócsi M, Fagyas M, Kalina E, Fejes Z, Szentkereszty Z, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Comparison of Different Vascular Biomarkers for Predicting In-Hospital Mortality in Severe SARS-CoV-2 Infection. *Microorganisms.* 2024; 12(1): 229.