

2025

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL FARMACIE



***EVALUAREA ROLULUI MARKERILOR
BIOCHIMICI DE DISFUNCȚIE
ENDOTELIALĂ, INFLAMAȚIE ȘI STRES
OXIDATIV ÎN COVID-19***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF.UNIV.DR. MARGINĂ DENISA

Student-doctorand:

STERIAN (căs. CONSTANTIN) LAURA

CUPRINS

Introducere.....	10
I.Partea generală.....	13
1. Implicațiile disfuncției endoteliale în COVID-19.....	13
1.1. Introducere.....	13
1.2. Funcția endotelială.....	13
1.3. Disfuncția endotelială.....	14
1.4. Endocan.....	15
1.5. MR-pro adrenomedulina (MR-proADM)	17
2. Profilul biomarkerilor de inflamație, coagulare și leziune tisulară în COVID-19: evaluare în contextul investigațiilor de laborator.....	19
2.1. Introducere.....	19
2.2. Markeri inflamatori.....	20
2.2.1. Proteina C Reactivă.....	20
2.2.2. Feritina.....	21
2.2.3. Citokine inflamatorii.....	22
2.4. Markeri ai coagulării.....	24
2.4.1. Fibrinogen.....	24
2.4.2. D dimeri.....	25
2.4.3. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	26
2.5. Markeri ai afectării tisulare.....	26
2.5.1. Lactat dehidrogenaza (LDH).....	26
2.5.2. Fosfataza alcalină.....	27
3. Vitamina D în COVID-19.....	29
3.1. Introducere.....	29
3.2. Vitamina D.....	29
3.3. Vitamina D - rolul imunomodulator.....	30
3.4. Vitamina D în COVID-19.....	31
3.4.1. Rolul imuno-modulator al vitaminei D în COVID-19.....	31
3.4.2. Relația concentrație vitamina D- susceptibilitate SARS-CoV-2- severitate	

COVID-19.....	32
4. Stresul oxidativ și capacitatea antioxidantă în COVID-19.....	35
4.1. Introducere.....	35
4.2. Markeri de stres oxidativ în COVID-19.....	35
4.3. Mecanisme antioxidante în COVID-19.....	37
II. Partea originală.....	39
5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	39
6. Metodologia generală a cercetării.....	41
6.1. Metodologie și aprobările de realizare ale studiilor.....	41
6.2. Prelevarea probelor de sânge.....	42
6.3. Determinarea parametrilor biochimici de rutină și specifici.....	42
6.3. Analiza statistică.....	43
7. Evaluarea nivelurilor serice de endocan.....	44
7.1. Introducere.....	44
7.2. Materiale și metode.....	45
7.2.1. Design-ul studiului.....	45
7.2.2. Determinarea endocan.....	45
7.3. Rezultate.....	45
7.3.1. Evaluarea comparativă a nivelurilor serice de endocan la pacienți COVID-19 vs. subiecți sănătoși și în funcție de severitatea infecției SARS- CoV-2.....	45
7.3.2. Evaluarea nivelurilor serice de endocan la pacienții cu diverse comorbidități.....	58
7.3.3. Evaluarea nivelurilor serice de endocan în funcție de tratamentul administrat.....	59
7.3.4. Evaluarea nivelurilor serice de endocan în funcție de rezultatul evaluărilor imagistice.....	63
7.3.5. Evaluarea nivelurilor serice de endocan în funcție de statusul vaccinării	66
7.4. Discuții.....	68
7.5. Concluzii parțiale.....	71

8. Profilul inflamator, al coagulării și al afectării tisulare la pacienții infectați cu SARS-CoV-2.....	73
8.1. Introducere.....	73
8.2. Materiale și metode.....	75
8.2.1. Design-ul studiului.....	75
8.3. Rezultate.....	75
8.3.1. Compararea nivelurilor serice ale markerilor inflamatori și de afectare tisulară la pacienții COVID-19 și non-COVID-19.....	75
8.3.2. Evaluarea markerilor de inflamație, ai afectării tisulare și de coagulare în funcție de gradul de severitate al infecției COVID-19.....	77
8.3.3. Analiza nivelurilor markerilor inflamatori, de coagulare și de leziune tisulară în raport cu rezultatele imagistice la pacienții COVID-19.....	81
8.3.4. Analiza nivelurilor markerilor inflamatori, de coagulare și de afectare tisulară în raport cu conduita terapeutică și statusul vaccinării la pacienții COVID-19.....	83
8.3.5. Analiza markerilor inflamatori, de coagulare și de afectare tisulară la pacienții COVID-19 cu comorbidități.....	86
8.4. Discuții.....	89
9. Vitamina D în context clinic și paraclinic în COVID-19.....	96
9.1. Introducere.....	96
9.2. Materiale și metode.....	97
9.2.1. Design-ul studiului.....	97
9.2.2. Determinarea 25(OH) D3.....	98
9.3. Rezultate.....	100
9.3.1. Determinarea nivelurilor serice de vitamina D la pacienții COVID-19, non-COVID-19 și subiecții din grupul de control.....	100
9.3.3. Analiza relației nivelurilor serice de vitamina D cu parametrii clinici și paraclinici la pacienții COVID-19 și non-COVID-19.....	104
9.3.2. Evaluarea nivelurilor serice de vitamina D în funcție de gradul de severitate al infecției COVID-19.....	110
9.3.4. Analiza rezultatelor imagistice, tratamentului și statusului vaccinării în	

raport cu nivelurile de vitamina D.....	111
9.3.5. Analiza nivelurilor serice de vitamina D în prezența comorbidităților..	116
9.4. Discuții.....	118
9.5. Concluzii parțiale.....	124
10. Evaluarea capacității antioxidante.....	125
10.1. Introducere.....	125
10.2. Materiale și metode.....	126
10.2.1. Design-ul studiului.....	126
10.2.2. Determinarea capacității antioxidante.....	126
10.3. Rezultate.....	127
10.3.1. Evaluarea capacității antioxidante la grup COVID-19 în raport cu grupul de control.....	127
10.3.2. Evaluarea capacității antioxidante la pacienții COVID-19, în funcție de severitatea bolii.....	128
10.3.3. Evaluarea capacității antioxidante în funcție de rezultatul evaluărilor imagistice, statusul vaccinal și prezența comorbidităților.....	130
10.3.4. Analiza capacității antioxidante în funcție de statusul vitaminei D....	133
10.4. Discuții.....	134
10.5. Concluzii parțiale.....	136
11. Evaluarea MR-proADM.....	138
11.1. Introducere.....	138
11.2. Materiale și metode.....	138
11.2.1. Design-ul studiului.....	138
11.2.2. Determinarea MR- proADM.....	139
11.3. Rezultate.....	139
11.3.1. Analiza comparativă a nivelurilor serice de MR-proADM la pacienți cu infecție SARS-CoV 2 și subiecți sănătoși.....	139
11.3.2. Evaluarea nivelurilor serice de MR-proADM în funcție de gradul de severitate al infecției SARS-CoV-2.....	139
11.3.3. Analiza nivelurilor serice de MR-proadrenomedulină în raport cu rezultatele imagistice și tratamentul administrat.....	140

11.3.4. Analiza nivelurilor serice de MR-proADM în prezența comorbidităților	142
11.4. Discuții	142
11.5. Concluzii	144
12. Concluzii și contribuții personale	145
Bibliografie	153

Introducere

Infecția cu virusul SARS-CoV-2 a determinat o criză globală de sănătate publică cu implicații majore asupra sistemelor medicale, economice și sociale.

Inițial, COVID-19 era considerat o pneumonie virală cu afectarea sistemului respirator, dar evoluția clinică a pacienților a indicat o afectare inflamatorie și vasculară sistemică. Ulterior, au fost definite “furtuna citokinică”, disfuncția endotelială și imunotromboza drept mecanisme fiziopatologice centrale în formele severe.

Încă de la debutul pandemiei, deficitul de vitamina D a fost incriminat drept factor predispozant pentru infectare, dar și pentru evoluția către formele severe.

În acest context, alegerea direcției de cercetare dezvoltate în cadrul acestei lucrări a avut drept punct de plecare strânsa legătură între inflamație- disfuncție endotelială- leziune tisulară- evenimente trombotice- stres oxidativ la pacienții cu infecție SARS-CoV-2

Tema de cercetare a acestei teze a fost evaluarea disfuncției endoteliale, a inflamației și a stresului oxidativ, relația dintre aceste fenomene la pacienții COVID-19, precum și potențiala implicare a vitaminei D în aceste procese.

Obiectivele generale propuse au fost:

- Evaluarea disfuncției endoteliale, pe baza determinărilor nivelurilor serice de endocan și MR-proADM, la pacienții COVID-19
- Analiza profilului inflamator prin evaluarea unor markeri clasici (PCR, fibrinogen) și moderni (IL- 6, feritina, TNF- α) la pacienții COVID-19 comparativ cu pacienții cu alte tipuri de infecții virale respiratorii
- Determinarea statusului coagulării și al afectării tisulare la pacienții COVID-19 și non-COVID-19
- Analiza concentrațiilor biomarkerilor de disfuncție endotelială, inflamatori, de coagulare, ai leziunilor tisulare în funcție de gradul de severitate al COVID-19, rezultatele imagistice, tipul de tratament administrat, prezența comorbidităților și statusul imunizării prin vaccinare
- Determinarea nivelurilor serice de vitamina D la pacienți COVID-19 și cu alte infecții respiratorii virale și analiza comparativă a nivelurilor de vitamina D în raport cu parametrii clinici și paraclinici

- Evaluarea capacității antioxidante totale la pacienții COVID-19 și analiza în funcție de severitate, comorbidități și nivelul de vitamina D.

Rezultatele studiului evidențiază rolul diagnostic pentru endocan și feritina și rolul prognostic pentru MR-proADM și IL-6. Corelațiile endocan cu markeri de inflamație, ai leziunilor tisulare și de coagulare reflectă relațiile complexe inflamație-disfuncție endotelială-coagulopatie. Deficiența de vitamina D poate facilita inflamația și disfuncția endotelială la pacienții COVID-19 cu diabet.

PARTEA GENERALĂ

1. Implicațiile disfuncției endoteliale în COVID-19

La nivel pulmonar, disfuncția endotelială implică creșterea permeabilității capilare, infiltrarea perivasculară a celulelor inflamatorii, edeme interstițiale, retenția de lichid în spațiul alveolar, microhemoragii și microtromboze difuze în vasele periferice, manifestate clinic prin insuficiență respiratorie [1], [2]. Endocan reprezintă marker al disfuncției endoteliale și este implicat în procesele din patologii dependente de endoteliu: inflamație, migrație, angiogeneză, adeziune, progresie tumorală [3].

MR-proADM este modulator al microcirculației și contribuie în reducerea permeabilității vasculare, prin creșterea stabilității și a integrității endoteliale [4].

2. Profilul biomarkerilor de inflamație, coagulare și leziune tisulară în COVID-19: evaluare în contextul investigațiilor de laborator

Analiza combinată a biomarkerilor (proteina C reactivă (PCR), LDH (lactat dehidrogenaza), feritina, D dimeri) și a citokinelor și chemokinelor inflamatorii (factorul de necroză tumorală - TNF α), interleukin1 β -IL-1 β , interleukina 6- IL-6) poate fi utilizată în diagnosticul, stratificarea și prognosticul pacienților COVID-19 [7], [6]. În COVID-19, nivelul de PCR se asociază cu gradul de severitate, riscul de tromboembolism pulmonar și venos, riscul de insuficiență renală acută și mortalitate. Feritina este un indicator al severității, iar în cazurile severe riscul de ventilație mecanică și al mortalității sunt asociate

cu niveluri ridicate de IL-6. Concentrații ridicate ale D-dimerilor se corelează cu scorul CT și reflectă relația dintre coagulare și afectarea pulmonară.

3. Vitamina D în COVID-19

Meta-analiza unor studii prospective și retrospective a observat o incidență crescută a infecției SARS-CoV-2 și a formelor severe COVID-19 la pacienții cu niveluri reduse de vitamina D. Deficiența de vitamina D (< 30 ng/ml) se corelează semnificativ cu susceptibilitatea infecției SARS-CoV-2.

4. Stresul oxidativ și capacitatea antioxidantă în COVID-19

În cazurile severe COVID-19, eliberarea de citokine este însoțită de generarea unor specii oxidante, care induc disfuncție endotelială cu risc de afectare pulmonară și complicații trombotice [10]. La pacienții COVID-19, numeroase studii au evidențiat un stres oxidativ marcat asociat cu apărare antioxidantă redusă [11].

Evaluarea capacității antioxidante totale indică efectul combinat al antioxidantilor enzimatici și non-enzimatici, hidrosolubili și liposolubili. Capacitatea antioxidantă totală poate îndeplini rol de marker diagnostic sau prognostic, iar monitorizarea acesteia permite ghidarea terapiei antioxidante adjuvante în vederea reducerii inflamației și stresului oxidativ.

PARTEA ORIGINALĂ

5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Această lucrare este centrată pe evaluarea disfuncției endoteliale, a statusului inflamator și oxidativ în raport cu profilul clinic și imagistic, la pacienții COVID-19. Rolul imunomodulator al vitaminei D studiat anterior, în alte tipuri de infecții respiratorii, este controversat în COVID-19, dar deficiența de vitamina D reprezintă un factor de risc în evoluția bolii.

Obiectivele generale ale acestei lucrări științifice, în contextul definirii scopului, au fost reprezentate de:

1. Evaluarea disfuncției endoteliale (determinarea nivelurilor de endocan și MR-proADM la pacienții COVID-19; analiza relației endocan/MR-proADM cu gradul de severitate, de

afectare pulmonară, tratamentul administrat, comorbidități prezente, status vaccinal; evaluarea relației disfuncție endotelială- inflamație

2. Analiza profilului inflamator, al coagulării și leziunilor tisulare (evaluarea statusului inflamator prin intermediul unor biomarkeri moderni (IL-6, feritina, TNF- α) și clasici (PCR, fibrinogen; analiza profilului coagulării pe baza nivelurilor de D dimeri; evaluarea gradului de afectare tisulară prin analiza activităților fosfatazei alcaline și lactat dehidrogenazei

3. Determinarea și analiza vitaminei D (evaluarea comparativă pacienți COVID-19- control, pacienți COVID-19- non-COVID-19 a nivelurilor de vitamina D; clasificarea pacienților în funcție de nivelurile serice de vitamina D și analiza corelațiilor cu parametri clinici și paraclinici; analiza relației disfuncție endotelială- vitamina D

4. Evaluarea capacității antioxidante totale - analiza comparativă a statusului antioxidant între pacienții COVID-19 și subiecții sănătoși; evaluarea capacității antioxidante în raport cu severitatea bolii, rezultatele imagistice, statusul imunizării și prezența comorbidităților; analiza relației status antioxidant- vitamina D în context COVID-19.

6. Metodologia generală a cercetării

Această metodologie a fost aprobată de către Comisia Locală de Bioetică a Institutului Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș”, în baza protocolului de studiu furnizat, cu aviz favorabil C06884/23.06.2022.

Metodologia generală comună a acestei lucrări de doctorat a avut la bază sub-studii analitice observaționale și experimentale, care au inclus pacienți adulți (peste 18 ani), spitalizați în cadrul Institutului Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș” pentru infecție SARS-CoV-2, confirmată prin RT-PCR, pacienți cu alte tipuri de infecții virale (gripă, virus sincițial respirator, adenovirus, metapneumovirus) și subiecți sănătoși. Perioada de înrolare a acestora a fost 1septembrie 2022-31 ianuarie 2023.

Pacienții din subgrupul COVID-19 au fost clasificați în funcție de severitatea bolii, pe baza Ghidurilor de tratament NIH COVID-19, variind de la ușoară (stadiul 0) la critic (stadiul 3). Datele generale demografice, clinice, biologice și imagistice au fost colectate retrospectiv.

Nivelurile de IL 6 (pg/mL), endocan (pg/ml), MR-proadrenomedulină (pg/ml), TNF- α (pg/ml), IL-1(pg/ml), PAI1 (pg/ml) au fost analizate folosind metode ELISA conform instrucțiunilor producătorului.

Pentru prelucrarea datelor brute, am utilizat IBM SPSS (IBM Corporation, SUA). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ abatere standard, pentru cele cu distribuție normală, sau ca mediană [cuartila 25; cuartila 75], pentru cele distribuite non-gaussiană. Testul Kolmogorov-Smirnov a fost folosit pentru stabilirea tipului de distribuție a fiecărui parametru. Pentru determinarea diferențelor dintre grupuri (2 sau mai multe), am folosit teste parametrice (testul t-Student sau ANOVA) pentru datele distribuite normal și teste non-parametrice (Mann-Whitney sau Kruskal-Wallis) pentru datele distribuite non-normal. Pentru a verifica dacă două variabile de tip cantitativ, din studiu, se corelează și în ce măsură, am calculat *coeficientul Spearman*.

7. Evaluarea nivelurilor serice de endocan

7.1.Introducere. Ipoteza de lucru

Disfuncția endotelială la nivelul microvascularizației pulmonare induce imunotromboză cu status procoagulant și formarea de microtrombi [13]. Prezența și gradul disfuncției endoteliale se reflectă prin niveluri serice crescute de endocan.

Obiectivele studiului au fost:

- Determinarea nivelurilor serice de endocan la pacienți cu infecție SARS-CoV 2 comparativ cu subiecți sănătoși
- Evaluarea nivelurilor serice de endocan în funcție de gradul de severitate al infecției
- Corelarea nivelurilor serice de endocan cu biomarkeri de inflamație și de coagulare
- Interpretarea nivelurilor serice de endocan în raport cu rezultatele imagistice
- Analiza nivelurilor serice de endocan în funcție de tratamentul administrat
- Analiza nivelurilor serice de endocan în prezența comorbidităților
- Analiza nivelurilor de endocan în funcție de statusul vaccinării

7.2. Materiale și metode

Studiul a inclus 56 de pacienți internați consecutiv la Institutul Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Bals” în perioada 1 septembrie 2022 – 31 ianuarie 2023. Grupul de control a fost format din 31 de membri ai personalului medical sănătos, fără comorbidități.

7.2.2 Determinarea endocan

Nivelurile de Endocan Uman/ESM1 au fost analizate cu ajutorul kitului ELISA, în concordanță cu instrucțiunile producătorului kitului.

7.3. Rezultate

7.3.1. Evaluarea comparativă a nivelurilor serice de endocan la pacienți COVID-19 vs. subiecți sănătoși și în funcție de severitatea infecției SARS-CoV-2

În grupul de studiu, nivelurile de endocan variază între 10.87 pg/ml și 154.95 pg/ml. Există o diferență semnificativă statistic între nivelurile serice de endocan determinate la pacienții din grupul de studiu și cele din grupul de control. Nivelul mediu în grupul pacienților a fost 77.21 pg/mL, iar în grupul de control, 33.09 pg/mL.

Punctul de *cut-off* optim pentru COVID-19- control este 47.51pg/ml. Proteina C reactivă și fosfataza alcalină au efecte pozitive și semnificative statistic asupra endocanului.

Pentru întreg grupul de pacienți COVID-19 am observat o corelație pozitivă semnificativă între endocan și fosfataza alcalină ($r=0.318$ $p=0.023$) și poate indica o relație endocan- fosfataza alcalină în context inflamator, de disfuncție endotelială și leziune tisulară.

Nivelul de endocan nu este influențat de severitatea bolii. Analiza nivelurilor serice de endocan determinate în cazul celor trei subgrupuri nu indică diferențe semnificative statistic.

7.3.2. Evaluarea nivelurilor serice de endocan la pacienții cu diverse comorbidități

Nivelurile serice de endocan nu diferă semnificativ statistic între pacienții cu sau fără comorbidități (boli cardiovasculare, obezitate, diabet). Pentru pacienții fără diabet se înregistrează corelații endocan- fosfataza alcalină ($r=0.384$, $p=0.011$), în timp ce la pacienții cu diabet, nivelul de endocan se corelează pozitiv cu feritina ($r=0.900$, $p=0.037$). Asocierea pozitivă cu nivelul de endocan poate indica impactul inflamației (feritinei) asupra funcției endoteliale.

7.3.3.Evaluarea nivelurilor serice de endocan în funcție de tratamentul administrat

Evaluarea nivelurilor de endocan în funcție de tratamentul administrat cu valori semnificativ crescute în grupul pacienților care au avut nevoie de combinație remdesivir+ dexametazonă. În cazul pacienților cu remdesivir+ dexametazonă+ oxigen, nivelul de endocan a fost semnificativ scăzut față de subgrupul căruia în care tratamentul administrat a fost doar remdesivir+ dexametazonă și poate sugera influența oxigenoterapiei asupra disfuncției endoteliale și a inflamației de la nivel pulmonar. Valoarea optimă de *cut-off* pentru a diferenția cel mai bine între pacienții "cu dexametazonă" și cei "fără dexametazonă" este 112.27pg/ml.

7.3.4.Evaluarea nivelurilor serice de endocan în funcție de rezultatul evaluărilor imagistice

În funcție de interpretarea rezultatelor examenelor imagistice, pacienții au fost clasificați în următoarele 4 subgrupuri: fără modificări imagistice, pneumonie cu focare pneumonice izolate, pneumonie cu focare izolate, fără infiltrate pleurale, pneumonie cu focare izolate și infiltrate și pneumonie extinsă cu infiltrate. Nivelul plasmatic al endocanului nu diferă între cele 4 subgrupuri.

7.3.5.Evaluarea nivelurilor serice de endocan în funcție de statusul vaccinării

Valoarea endocanului este semnificativ mai mare în subgrupul nevaccinaților ($p=0.024$).

7.4. Discuții

În studiul nostru, nivelurile serice de endocan ale pacienților cu COVID-19 au fost semnificativ mai mari ($p<0.001$) decât cele ale subiecților din grupul de control. Conform analizei ROC un potențial punct de *cut-off* COVID-19-control este în jurul valorii de 47.19 pg/ml.

În studiul nostru nu s-a observat o corelație între nivelul de endocan seric și gradul de severitate al bolii ($p=0.117$). Chenevier-Gobeaux et al. (2022) au raportat creșteri semnificative ale endocanului o dată cu agravarea bolii, în timp ce Guzel et al. nu au putut indica diferențe statistice [3], [14].

În grupul cu focare extinse și infiltrate, corelația D dimeri- endocan poate sugera legătura endocan și riscul de fenomene microvasculare și/sau trombotice. Studiul lui

Chenevier-Gobeux evidențiază rolul endocanului în tromboinflamație și îl indică drept un potențial biomarker al evenimentelor trombotice [14].

Noutatea studiului este conferită de analiza comparativă a nivelurilor de endocan între pacienții vaccinați și cei nevaccinați.

7.5. Concluzii parțiale

În concluzie, pacienții COVID-19 prezintă niveluri ale endocanului semnificativ mai mari decât subiecții sănătoși, din grupul de control. Valoarea de *cut-off* optimă pentru diferențierea dintre pacienții cu COVID-19 și grupul control este 47.51 pg/ml. PCR și fosfataza alcalină influențează semnificativ nivelurile serice de endocan. Concentrația plasmatică a endocanului nu diferă în funcție de gradul de severitate al bolii și nici de prezența comorbidităților. Statistica evidențiază o diferență semnificativă a valorilor endocanului în funcție de statusul vaccinal, cu niveluri mai mici la subiecții vaccinați. Aceste rezultate sugerează un posibil efect protector al vaccinării asupra funcției endoteliale.

8. Profilul inflamator, al coagulării și al afectării tisulare la pacienții infectați cu SARS-CoV-2

8.1. Introducere

Fiziopatologia COVID-19 se caracterizează prin inflamație sistemică și hiperactivare a sistemului imun, iar evaluarea markerilor inflamatori și de coagulare în vederea stratificării riscului pacienților și direcționarea conduitei terapeutice este esențială.

Investigarea markerilor căilor imune-inflamatorii (PCR, IL-6, feritina), de coagulare (fibrinogen, D dimeri), dar și nespecfici (afectare celulară- LDH, fosfataza alcalină) este utilizată în evaluarea patologiilor inflamatorii, dar și în evaluarea clinică și managementul terapeutic din bolile infecțioase virale sau bacteriene.

Obiectivele studiului au fost:

- Compararea nivelurilor serice ale markerilor inflamatori (PCR, fibrinogen, feritina) la pacienții COVID-19 și cei cu infecții non-COVID-19
- Evaluarea markerilor de inflamație, afectare tisulară și de coagulare în funcție de gradul de severitate al infecției COVID-19

- Analiza rezultatelor imagistice, a tratamentului și a statusului vaccinării în raport cu markerii de inflamație, afectare tisulară și de coagulare
- Analiza markerilor de inflamație, afectare tisulară și de coagulare la pacienții COVID-19 cu comorbidități

8.2. Materiale și metode

8.2.1. Design-ul studiului

Studiul a inclus 87 pacienți admiși în Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof.Dr.Matei Balș”, între 1 septembrie 2022 și 31 ianuarie 2023. Grupul de studiu a fost divizat în 2 subgrupuri: subgrupul COVID-19 (56 de pacienți cu un test RT-PCR pozitiv) și subgrupul non-COVID-19 (31 de pacienți cu alte infecții respiratorii virale).

8.3. Rezultate

8.3.1. Compararea nivelurilor serice ale markerilor inflamatori și de afectare tisulară la pacienții COVID-19 și non-COVID-19

Analizele comparative ale profilelor inflamatorii și de afectare tisulară, ale pacienților din cele două grupuri, nu indică niveluri serice diferite între markerii inflamatori. Se poate remarca că în cazul celor cu infecție SARS-COV2 nivelurile serice ale feritinei sunt semnificativ mai mari decât la cei cu alte tipuri de infecții virale ($p=0.011$).

8.3.2. Evaluarea markerilor de inflamație, ai afectării tisulare și de coagulare în funcție de gradul de severitate al infecției COVID-19

Evaluarea markerilor inflamatori indică niveluri semnificativ mai mari de PCR, fibrinogen și IL-6 în grupul cu formă severă comparativ cu cel cu formă moderată sau ușoară ($p =0.004$; $p=0.021$; $p=0.012$). Concentrațiile serice de PCR, IL-6, LDH și fibrinogen se corelează cu severitatea bolii. În ceea ce privește statusul trombotic, nivelul D dimerilor a fost semnificativ crescut la pacienții cu forme severe ($p=0.046$).

8.3.3 Analiza nivelurilor markerilor inflamatori, de coagulare și de leziune tisulară în raport cu rezultatele imagistice la pacienții COVID-19

Markerii clasici (PCR și fibrinogen) se corelează cu gradul de afectare pulmonară ($p<0.001$; $p=0.005$), în timp ce markerii moderni (IL- 6) au niveluri semnificative statistic mai

mari în cazul pacienților cu focare extinse și pleurezie, comparativ cu cei cu focare izolate, fără pleurezie ($p=0.01$).

8.3.4 Analiza nivelurilor markerilor inflamatori, de coagulare și de afectare tisulară în raport cu conduita terapeutică și statusul vaccinării la pacienții COVID-19

În grupurile care au primit remdesivir, asocierea cu dexametazonă și oxigen se corelează cu niveluri semnificativ crescute ale PCR și fibrinogen ($p<0.05$; $p=0.004$), în timp ce asocierea doar cu dexametazonă se corelează cu niveluri crescute ale fibrinogenului ($p=0.01$). Analiza statusului inflamator în funcție de statusul imunizării prin vaccinare nu indică diferențe semnificative între pacienții vaccinați și cei nevaccinați.

8.3.5 Analiza markerilor inflamatori, de coagulare și afectare tisulară la pacienții COVID-19 cu comorbidități

Statusul inflamator al pacienților cu boli cardiovasculare indică valori semnificativ crescute ale PCR, fibrinogen, LDH și fosfatază alcalină. În cazul pacienților COVID-19 diabetici, analiza markerilor inflamatori indică niveluri serice semnificativ statistic mai mari decât la pacienții fără diabet, doar pentru feritină ($p=0.017$).

8.4. Discuții

Intensitatea corelațiilor pozitive între markerii inflamatori la pacienții infectați cu SARS-CoV-2 evidențiază o activare imunoinflamatorie amplificată, cu trăsături potențial distinctive față de alte infecții respiratorii. Nivelurile PCR se corelează semnificativ cu severitatea bolii, prezența patologiilor cardiovasculare, necesitatea oxigenoterapiei și gradul de afectare pulmonară. În grupul analizat, nivelul de fibrinogen a fost semnificativ mai mare în cazurile severe decât în cele moderate și ușoare.

IL-6 este sensibil atât la extinderea focarelor, cât și la prezența pleureziei, având valori semnificativ mai mari la pacienții cu afectare pulmonară extinsă asociată cu pleurezie. Analiza în raport cu tratamentul administrat, nivelurile crescute de IL-6 se asociază cu necesar de administrare a oxigenoterapiei.

Hipereferitinemia este prevalentă la pacienții COVID-19 diabetici și poate fi considerat un biomarker util în *screening*-ul pacienților diabetici [15].

Există diferențe semnificative între nivelurile de LDH ale cazurilor ușoare și severe. În cazurile severe din grupul analizat, corelațiile pozitive între LDH și IL-6, leucocite și fibrinogen sugerează o interdependență între afectarea tisulară (LDH), răspunsul inflamator sistemic (IL- 6, fibrinogen) și mobilizarea celulară (leucocitoză).

Din analiza datelor se poate observa că nivelurile crescute ale D dimerilor se asociază cu formele severe.

Severitatea modificărilor imagistice s-a corelat cu creșteri semnificative ale nivelurilor de PCR, fibrinogen, fosfatază alcalină, IL-6 și D-dimeri, această relație sugerează interconectarea între procesul inflamator sistemic, activarea coagulării și extinderea afectării pulmonare.

8.5. Concluzii parțiale

Parametrii analizați, PCR, fibrinogen, IL-6 și D dimeri se asociază cu gradul de severitate al infecției, afectarea pulmonară și necesitatea administrării oxigenoterapiei, având astfel valoare de diagnostic și prognostic. Feritina a fost singurul marker inflamator asociat atât cu diagnosticul de COVID-19, diferențiindu-l de alte infecții respiratorii virale, cât și cu prezența diabetului zaharat de tip 2, sugerând un posibil rol în identificarea pacienților cu comorbidități care pot influența severitatea răspunsului inflamator

9.Vitamina D în context clinic și paraclinic în COVID-19

9.1.Introducere

Studii anterioare au indicat deficiența de vitamina D drept factor de risc în dezvoltarea inflamației asociată cu un risc crescut de infecție [16], [17].

Obiectivele studiului au fost:

- Determinarea nivelurilor serice de vitamina D la pacienții COVID-19, infecții non-COVID-19 și grup de control (subiecți clinic sănătoși)
- Analiza relației nivelurilor serice de vitamina D cu parametrii clinici și paraclinici la pacienții COVID-19 și non-COVID-19
- Evaluarea nivelurilor serice de vitamina D în funcție de gradul de severitate al infecției COVID-19

- Analiza rezultatelor imagistice, a tratamentului și a statusului vaccinării, în raport cu nivelurile de vitamina D, la pacienții COVID-19
- Analiza nivelurilor serice de vitamina D în prezența comorbidităților, la pacienții COVID-19

9.2. Materiale și metode

9.2.1 Design-ul studiului

Studiul a inclus 78 pacienți (52 de pacienți cu un teste RT-PCR pozitiv și 26 de pacienți cu alte infecții respiratorii virale) internați în Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof.Dr.Matei Balș”, între 1 septembrie 2022 și 31 ianuarie 2023 și 34 subiecți în grupul de control.

9.2.2 Determinarea 25(OH) D3

Analizele au fost efectuate cu un sistem de cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă compus dintr-o pompă Eksigent MicroLC 200Plus (Eksigent Technologies, un autosampler CTC PAL (Zwingen, Elvetia) model QTRAP 5500 (AB Sxiex, Toronto, Canada). Pentru achiziția de date a fost utilizat programul informatic Analyst 1.6.3. (Sciex). Separarea cromatografică s-a făcut pe o coloană Halo PFP 0,5X50mm (Eksigent), termostată la 35°C.

9.3. Rezultate

9.3.1. Determinarea nivelurilor serice de vitamina D la pacienții COVID-19, non-COVID-19 și subiecții din grupul de control

Nivelurile de vitamina D nu diferă semnificativ între cele 3 grupuri ($p=0.852$)

9.3.3 Analiza relației nivelurilor serice de vitamina D cu parametrii clinici și paraclinici la pacienții COVID-19 și non-COVID-19

Pacienții din fiecare grup (COVID-19/non-COVID-19) au fost împărțiți în câte trei subgrupuri, în funcție de nivelurile de vitamina D: deficiența de vitamina D (<20 ng/ml), insuficiența ($20-30$ ng/ml) și nivel suficient de vitamina D (>30 ng/ml).

În subgrupul pacienților cu deficiență de vitamina D, feritina s-a corelat pozitiv cu endocan ($r=0.607$, $p=0.048$) și cu raportul neutrofile/limfocite (NLR) ($r=0.692$, $p=0.018$).

În subgrupul cu insuficiență de vitamina D, nivelul vitaminei D s-a corelat negativ cu endocan ($r=-0.611$, $p=0.009$).

La pacienții non-COVID-19, biomarkerii inflamației (PCR și fibrinogen) au fost semnificativ mai crescuți în subgrupul cu deficiență de vitamina D comparativ cu subgrupurile cu insuficiență sau suficiență de vitamina D ($p=0.005$; $p=0.036$). Pacienții non-COVID-19 cu insuficiență de vitamina D au prezentat un raport neutrofile/limfocite (NLR) semnificativ mai mare decât cei cu deficiență sau suficiență de vitamina D ($p=0.012$).

A fost observată o diferență statistic semnificativă a raportului neutrofile/limfocite (NLR) la pacienții cu COVID-19 cu deficiență de vitamina D, comparativ cu cei non-COVID-19 ($p=0.05$). Compararea între pacienții cu COVID-19 și non-COVID-19 având insuficiență de vitamina D a indicat niveluri semnificativ mai ridicate de LDH ($p=0.044$), PCR ($p<0.001$), fibrinogen ($p=0.018$) și raport neutrofile/limfocite ($p=0.04$) la pacienții non-COVID-19.

9.3.2 Evaluarea nivelurilor serice de vitamina D în funcție de gradul de severitate al infecției COVID-19

Distribuția pacienților în funcție de severitatea COVID-19 nu a indicat diferențe semnificative statistic ale nivelurilor serice de 25(OH) D3 ($p=0.991$).

9.3.4. Analiza rezultatelor imagistice, tratamentului și statusului vaccinării în raport cu nivelurile de vitamina D

Analizele rezultatelor investigațiilor imagistice indică o frecvență mai mare a deficienței de vitamina D pentru cazurile cu modificări pulmonare la examenul radiologic sau CT, dar nu există o asocieră statistică între valorile de vitamina D și complexitatea tratamentului ($p=0.496$).

Relația vitamina D- statusul vaccinării nu indică diferențe semnificative statistic ($p=0.092$).

9.3.5 Analiza nivelurilor serice de vitamina D în prezența comorbidităților

Analiza statusului vitaminei D, la pacienții COVID-19 cu diferite comorbidități, nu indică diferențe semnificative între pacienții cu sau fără boli cardiovasculare, dislipidemie sau obezitate. Diferențe semnificative statistic au fost observate în grupul COVID-19, între pacienții cu sau fără diabet și cei cu/ fără boală renală cronică.

Pacienții diabetici și cei cu boală renală cronică cu COVID-19 au niveluri serice ale 25(OH) D3 semnificativ mai scăzute comparativ cu pacienții fără aceste patologii ($p=0.003$; $p=0.028$). La pacienții cu BRC există o corelație pozitivă endocan- vitamina D ($r=0.857$; $p=0.024$).

9.4. Discuții

Rezultatele studiului indică faptul că pacienții cu COVID-19/ alte infecții virale au o prevalență crescută a deficienței/insuficienței de vitamina D ($<30\text{ng/ml}$), dar nu se poate concluziona ca există o asociere specifică între deficiența/insuficiența de 25(OH) D și o vulnerabilitate mai mare pentru infecția COVID-19.

La pacienții COVID-19 cu deficit de vitamina D, corelația pozitivă semnificativă între nivelul de endocan și concentrația serică de feritină poate indica un impact al feritinei asupra funcției endoteliale, în contextul deficienței de vitamina D. Feritina influențează semnificativ nivelul de endocan la pacienții cu deficit de vitamina D și COVID-19, astfel inflamația sistemică poate contribui la disfuncția endotelială, în contextul deficitului de vitamina D. Lipsa acestor rezultate în cazurile cu concentrații suficiente de 25(OH)D sugerează că vitamina D poate avea un rol de modulator.

În cazul pacienților COVID-19 cu insuficiență de vitamina D, nivelurile de 25(OH)D se corelează negativ cu endocan și poate indica faptul ca statusul vitaminei D poate influența funcția endotelială. Această observație susține ideea că vitamina D poate influența inflamația și procesul de reglare a disfuncției endoteliale la pacienții cu COVID-19 și niveluri serice de vitamina D cu valori între $20\text{-}30\text{ng/ml}$. Studiul nostru este primul în care este evaluată relația dintre nivelurile serice de vitamina D- endocan în cazul pacienților COVID-19.

Corelația negativă dintre vitamina D și NLR, în formele ușoare, poate indica asocierea nivelurilor scăzute de vitamina D cu afectarea răspunsului imun și a proceselor inflamatorii.

Legătura fiziopatologică și de mecanism dintre diabet și infecția COVID-19 se manifestă în prezența deficienței de vitamina D.

9.5 Concluzii parțiale

Concentrațiile plasmatice de vitamina D nu diferă semnificativ statistic între pacienții COVID-19, non-COVID-19 și subiecții sănătoși. Severitatea infecției COVID-19 nu s-a corelat cu statusul vitaminei D.

Deficiența de vitamina D poate reprezenta un factor de risc în dezvoltarea inflamației și a disfuncției endoteliale și poate fi asociată cu un risc crescut de infecție, mai ales în cazul pacienților cu comorbidități, în special în cazurile cu diabet zaharat și boală renală cronică.

10. EVALUAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE

10.1.Introducere

Capacitatea antioxidantă este un indicator al protecției împotriva stresului oxidativ. Reducerea mecanismelor antioxidante de apărare contribuie la patogeniza infecției SARS-CoV-2, iar determinarea capacității antioxidante totale este o metodă indirectă de evaluare a gradului de stres oxidativ [19].

Scopul studiului prezentat în acest capitol a fost evaluarea capacității antioxidante la pacienții COVID-19, divizați în subgrupuri în funcție de severitatea patologiei, modificările imagistice, prezența comorbidităților, statusul vaccinal și nivelul de vitamina D.

Obiectivele studiului au fost:

- Evaluarea capacității totale antioxidante comparativ la pacienții COVID-19 și subiecții din grupul de control
- Analiza capacității totale antioxidante în funcție de gradul de severitate al infecției
- Evaluarea capacității antioxidante în corelație cu rezultatele investigațiilor imagistice, prezența comorbidităților și statusul vaccinal
- Analiza capacității antioxidante în funcție de statusul vitaminei D.

10.2. Materiale și metode

10.2.1 Design-ul studiului

Studiul a inclus 56 pacienți COVID-9 admiși în Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof.Dr.Matei Balș” și 20 subiecți sănătoși în grupul de control.

10.2.2. Determinarea capacității antioxidante

Pentru determinarea capacității antioxidante (CAO) a probelor de ser (CAOs) am utilizat o metodă bazată pe acidul 2,2’-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS). Capacitatea antioxidantă se exprimă ca procent de inhibiție (%DDO) a ABTS⁺, prin utilizarea următoarei formule: $\%DDO = \frac{DO_{\text{martor}} - D_{\text{probă}}}{DO_{\text{martor}}} \times 100$ (DO martor = Absorbanța soluției ABTS⁺; DO probă = Absorbanța soluției ABTS⁺ după adăugarea probei)

10.3. Rezultate

10.3.1.Evaluarea capacității antioxidante la grup COVID-19 în raport cu grupul de control

Studiul a inclus 56 pacienți, reprezentând grupul COVID-19 și 20 subiecți sănătoși, grupul de control.

Analizele comparative ale capacităților antioxidante, exprimate ca procente de inhibiție ale radicalului liber (%DDO) din cele două grupuri indică o valoare semnificativ statistic mai mare în grupul de control comparativ cu pacienții COVID-19 (p=0.020).

În grupul COVID-19, dintre corelațiile observate, notabile au fost cele negative, dintre capacitatea antioxidantă (%DDO) și endocan (r=-0.473, p<0.001) și cele pozitive, cu nivelul de neutrofile (r=0.345, p=0.009) și nivelul PAI1 (r=0.613, p=0.01). Aceste corelații indică o relație între statusul antioxidant, sistemul imun și disfuncția endotelială.

10.3.2. Evaluarea capacității antioxidante la pacienții COVID-19, în funcție de severitatea bolii

În cadrul grupului COVID-19, analizele comparative ale capacităților antioxidante în funcție de gradul de severitate al bolii (ușoară, moderată, severă) indică niveluri semnificativ crescute, inițial, după incubarea cu sursa de radicali liberi, în subgrupul cu formă severă

($p=0.015$). În cazul pacienților cu formă ușoară, capacitatea antioxidantă se corelează negativ cu nivelul de endocan ($r=-0.608$, $p=0.016$). În formele medii, există o corelație negativă între capacitatea antioxidantă și feritină ($r=-0.733$, $p=0.021$) și endocan ($r=-0.411$, $p=0.046$). Analiza acestor corelații indică o asociere a capacității antioxidante cu inflamația și disfuncția endotelială, evidentă în cazurile ușoare și moderate.

10.3.3. Evaluarea capacității antioxidante în funcție de rezultatul evaluărilor imagistice, statusul vaccinal și prezența comorbidităților

Evaluarea capacității antioxidante în raport cu absența/ prezența unui grad de afectare pulmonară relevată prin examenele imagistice nu indică diferențe semnificative statistice ($p=0.313$). Pentru pacienții cu focare izolate și pleurezie, capacitatea antioxidantă are corelații pozitive cu nivelul de leucocite ($r=0.786$, $p=0.028$) și negativă cu endocan ($r=-0.786$, $p=0.048$). La pacienții cu focare extinse și infiltrate pleurale, se menține corelația negativă dintre capacitatea antioxidantă și endocan ($r=-0.685$, $p=0.035$).

Pe măsură ce gradul de afectare pulmonară crește, capacitatea antioxidantă nu se mai corelează cu markeri de inflamație sau indicatori ai statusului imun (PAI1, limfocite, neutrofile), dar se manifestă o asociere negativă cu markerii de disfuncție endotelială (endocan).

Analiza capacității antioxidante în funcție de statusul imunizării nu indică diferențe semnificative statistice între pacienții vaccinați și cei nevaccinați ($p=0.593$).

În ceea ce privește prezența/ absența comorbidităților, capacitatea antioxidantă nu diferă semnificativ între pacienții COVID-19 cu comorbidități și cei fără comorbidități ($p=0.785$).

10.3.4. Analiza capacității antioxidante în funcție de statusul vitaminei D

Pacienții COVID-19 au fost clasificați în funcție de nivelul seric al vitaminei D: deficient (< 20 ng/ml), insuficient (20-30 ng/ml) și suficient (> 30 ng/ml). Se constată că pacienții cu deficiență de vitamina D au un status antioxidant semnificativ crescut comparativ cu cei cu nivel suficient ($p=0.022$) (tabel 10.6).

10.4. Discuții

În prima etapă a studiului nostru, un nivel scăzut al capacității antioxidante la pacienții COVID-19, comparativ cu subiecții sănătoși poate fi cauzat de persistența stresului oxidativ indus de infecția virală [20]. Capacitatea antioxidantă se corelează negativ cu nivelul de endocan la pacienții COVID-19 și indică o asociere între un nivel scăzut al apărării antioxidante și riscul disfuncției endoteliale și inflamației.

În subgrupul cu formă severă, capacitatea antioxidantă este semnificativ mai mare comparativ cu cea în cazul formelor moderate și ușoare. Capacitatea antioxidantă mai mare în formele severe poate reflecta rezultatul asocierii unui răspuns compensatoriu la un stres oxidativ extrem cu tratamentele administrate precoce.

În cazurile ușoare și moderate, se evidențiază o corelație între capacitatea antioxidantă și statusul inflamator și disfuncția endotelială, dar care nu se menține în cazurile severe. Mecanisme imune de reglare pot contribui, în formele ușoare și moderate, la o relație dinamică și interdependentă între statusul antioxidant, inflamație și afectare endotelială.

Analiza capacității antioxidante la pacienții COVID-19 clasificați în funcție de gradul de afectare pulmonară nu indică diferențe semnificative statistice.

Evaluarea statusului antioxidant în funcție de nivelul vitaminei D la pacienții COVID-19 nu indică o asociere între capacitatea antioxidantă și concentrația plasmatică a 25 (OH) D.

10.5. Concluzii parțiale

Rezultatele acestui studiu indică o capacitate antioxidantă semnificativ scăzută a pacienților COVID-19 comparativ cu subiecții sănătoși. Capacitatea antioxidantă nu diferă semnificativ în funcție de gradul de afectare pulmonară, prezența comorbidităților sau statusul vaccinal. La pacienții cu forme severe sau cu deficiență de vitamina D, capacitatea antioxidantă este semnificativ mai mare comparativ cu celelalte subgrupuri și poate fi explicată, fie prin activarea unor mecanisme antioxidante compensatorii și/ sau utilizarea de medicamente cu proprietăți antioxidante.

Un aspect important al analizei din acest studiu îl reprezintă corelația negativă dintre capacitatea antioxidantă și endocan la pacienții cu forme ușoare și moderate, la cei cu afectare

pulmonară extinsă, la cei nevaccinați și la cei cu comorbidități. În aceste subgrupuri, se manifestă o relație complexă reciprocă între stresul oxidativ și disfuncția endotelială.

11. Evaluarea MR-proADM

11.1.Introducere

Un număr redus de studii au abordat analiza MR-proadrenomedulinei (*mid-regional pro-adrenomedulin*, MR-pro ADM), hormon asociat cu disfuncția endotelială și organică la pacienții cu sepsis și infecții respiratorii.

Studiul descris în acest capitol a avut drept scop determinarea nivelurilor serice de MR-proADM la pacienții cu COVID-19 și analiza capacității de biomarker de diagnostic și/sau prognostic. Astfel, am determinat prin metoda ELISA nivelurile serice de MR-proADM atât la pacienții COVID-19, cât și la subiecți sănătoși.

Obiectivele studiului au fost:

- Analiza comparativă a nivelurilor serice de MR-proADM la pacienți cu infecție SARS-CoV 2 și subiecți sănătoși
- Evaluarea nivelurilor serice de MR-proADM în funcție de gradul de severitate al infecției SARS-CoV-2
- Analiza nivelurilor serice de MR-proADM în raport cu rezultatele imagistice și tratamentul administrat
- Analiza nivelurilor serice de MR-proADM în prezența comorbidităților

11.2.Materiale și metode

11.2.1 *Design*-ul studiului

Studiul a inclus 56 pacienți COVID-19 admiși în Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof.Dr.Matei Balș”, între 1 septembrie 2022 și 31 ianuarie 2023 și 23 subiecți în grupul de control.

11.2.2 Determinarea MR- proADM

După decongelare, probele de ser recoltate de la pacienți COVID-19 și subiecți sănătoși au fost vortexate, iar nivelurile de MR-proADM au fost analizate cu ajutorul kitului ELISA, în concordanță cu instrucțiunile producătorului kitului, rezultatele au fost exprimate în pg/mL. Calculele au fost realizate utilizând un program computerizat de ajustare a curbelor (SPARK10M V4.0.22) și determinate prin analiză de regresie (Tecan, Infinite M200 Pro).

11.3.Rezultate

11.3.1. Analiza comparativă a nivelurilor serice de MR-proADM la pacienți cu infecție SARS-CoV 2 și subiecți sănătoși

În grupul de studiu, nivelurile de MR-pro ADM au variat între 27.75 pg/ml și 347.8 pg/ml. Analiza statistică indică existența unei diferențe semnificative între nivelurile serice de MR-proADM determinate la pacienții din grupul de studiu și cele din grupul de control ($p < 0.01$)

11.3.2.Evaluarea nivelurilor serice de MR-proADM în funcție de gradul de severitate al infecției SARS-CoV-2

Analiza nivelurilor serice de MR- proADM determinate în cazul celor trei subgrupuri indică diferențe semnificative statistic ($p < 0.01$), iar nivelul de MR- proADM se corelează cu severitatea bolii. Pacienții încadrați în subgrupul cu formă severă au avut niveluri ale MR-proADM semnificativ mai mari decât cei cu forme ușoare sau moderate ($p < 0.01$; $p < 0.01$).

11.3.3. Analiza nivelurilor serice de MR-proadrenomedulină în raport cu rezultatele imagistice și tratamentul administrat

Analiza comparativă a nivelurilor serice de MR-proADM relevă diferențe semnificativ statistice între cele 4 subgrupuri, iar concentrațiile serice de MR-pro ADM se corelează cu gradul de afectare pulmonară ($p < 0.001$). În cazul pacienților cu focare extinse și pleurezie, nivelurile serice ale noului marker sunt semnificativ mai mari decât la cei fără modificări imagistice ($p = 0.0180$) și cei cu focare izolate ($p = 0.020$). Datele observate pot sugera o relație între MR-pro-ADM și reacția pleurală pe baza unei permeabilități crescute.

Analizele efectuate în funcție de tratamentul administrat (antiviral *per os*, antiviral injectabil, antiviral injectabil+ dexametazonă, antiviral injectabil+ dexametazonă+ oxigen) relevă o diferență semnificativă statistică între subgrupuri ($p < 0.01$). Asocierea oxigenoterapiei la tratamentul antiviral se corelează cu niveluri de MR-proADM semnificativ mai mari față de utilizarea antiviralului *per os* ($p < 0.01$), antiviralului injectabil ($p = 0.020$) sau a combinației antiviral injectabil cu corticoterapie ($p = 0.011$). Rezultatele pot indica o disfuncție endotelială accentuată în condiții de hipoxemie.

11.3.4. Analiza nivelurilor serice de MR-proADM în prezența comorbidităților

Analiza nivelurilor de MR-proADM nu indică diferențe semnificative statistic între pacienții cu comorbidități și cei fără comorbidități ($p = 0.186$)

11.4. Discuții

Diferențele semnificative dintre pacienții COVID-19, comparativ cu subiecții sănătoși indică proprietatea de marker de diagnostic a MR-pro ADM.

Analiza privind asocierea nivelurilor de MR-proADM cu gradul de severitate COVID-19 indică diferențe semnificative între pacienții cu forme severe și cei cu forme moderate, respectiv, forme ușoare. Rezultatele obținute corespund cu date din literatură, studii recente (Atallah et al (2022), Astapovskii et al(2022)) demonstrează valoarea de prognostic a MR-pro ADM, cu performanțe mai bune decât alți markeri utilizați (PCR, feritină, LDH)[22].

În etapa următoare am analizat nivelurile de MD-pro ADM în raport cu severitatea rezultatelor imagistice și am observat o asociere semnificativă între nivelul MR-proADM și gradul de afectare pulmonară.

Concentrațiile crescute de MR-proADM s-au corelat cu existența infiltratelor pleurale, dar nu și cu extensia focarelor pneumonice. Infiltratele pleurale manifestate prin exsudat sau îngroșări pleurale se asociază cu inflamație sistemică și hipoxie, cu creșterea permeabilității vasculare și activarea celulelor endoteliale și secreție crescută de MR-proADM. Astfel se explica relația dintre reacția inflamatorie pleurală și rolul MR- proADM.

Analiza nivelurilor de MR-pro ADM în funcție de tratamentul administrat, evidențiază diferențe semnificative între subgrupuri și se observă o relație între creșterea concentrațiilor de

MR-proADM și utilizarea oxigenoterapiei, asociate medicației etiologice și antiinflamatorii [5].

11.5. Concluzii

MR-proADM este marker cu valoare de prognostic, iar determinarea nivelurilor de MR-pro ADM poate contribui la stratificarea pacienților în funcție de gradul de severitate și afectare pulmonară, dar și în inițierea precoce a terapiilor adecvate. Corelația negativă dintre endocan și MR-proADM observată la pacienții cu COVID-19 care prezintă focare pneumonice izolate și pleurezie sugerează o relație disociată între inflamația endotelială locală și răspunsul vascular sistemic

11. Concluzii și contribuții personale

În cadrul studiilor derulate în perioada doctoratului, au fost îndeplinite obiectivele propuse inițial. Astfel, am determinat concentrațiile plasmatice a două molecule implicate în disfuncția endotelială (endocan și MR-proadrenomedulină) și am analizat modul în care se corelează cu diverse caracteristici ale pacienților COVID-19. De asemenea, am evaluat tabloul inflamator și al coagulării, prin analiza unor markeri clasici (PCR, fibrinogen, D dimeri) și moderni (IL-6, feritina). Pentru evaluarea statusului sistemului imunitar și oxidativ, am determinat concentrațiile serice de vitamina D și capacitatea antioxidantă totală.

Astfel, scopul studiului prezentat în cadrul în capitolul 7 a fost determinarea nivelurilor serice de endocan la pacienții COVID-19, evaluarea comparativă cu subiecții sănătoși, dar și analiza în raport cu gradul de severitate, afectarea pulmonară, tipul de tratament administrat, statusul imunizării prin vaccinare și prezența comorbidităților.

Capacitatea discriminativă ridicată pentru endocan în diferențierea pacienților COVID-19 de subiecții sănătoși a fost evidențiată la un punct optim de *cut-off* stability la 47.51 pg/ml. Dintre markerii inflamatori, proteina C reactivă și fosfataza alcalină influențează semnificativ nivelul de endocan seric.

Noutatea studiului este conferită de analiza endocanului în funcție statusul imunizării prin vaccinare, valorile endocanului au fost semnificativ mai mari în cazul nevaccinaților, sugerând rolul său în modularea relației complexe dintre răspunsul imun, inflamație și disfuncție endotelială.

Aceste observații indică faptul că endocanul ar putea fi marker de diagnostic dar nu și prognostic. Corelația endocan cu markeri de inflamație (feritina) dependent de statusul metabolic (diabet), cu cei ai afectării tisulare (fosfataza tisulară) în funcție de severitate (forme ușoare) sau cu cei ai coagulării (D dimeri) raportat de gradul de afectare pulmonară (focare extinse cu pleurezie) sugerează rolul modulator al acestuia în procesele inflamatorii și trombotice. Aceste relații reflectă interacțiuni complexe între inflamația sistemică, disfuncția endotelială și riscurile de complicații, mai ales în contextul bolilor metabolice și al afectării pulmonare, cu rol în evaluarea și ghidarea tratamentelor. Imunizarea prin vaccinare poate conferi un grad de protecție împotriva disfuncției endoteliale din COVID-19.

În capitolul 8 am evaluat statusul inflamator, al coagulării și al leziunilor tisulare la pacienții COVID-19 în raport cu datele de la pacienți cu alte tipuri de infecții virale.

În urma evaluării analizelor am observat că nu există diferențe semnificative ale markerilor inflamatori clasici (PCR, fibrinogen) între pacienții COVID-19 și a celor non-COVID-19, dar existența unor corelații pozitive între acești markeri, la pacienții COVID-19, sugerează un răspuns imun amplificat, nespecific altor infecții respiratorii. Feritina a avut niveluri semnificativ mai ridicate la pacienții cu infecție SARS-CoV-2 comparativ cu cei cu alte tipuri de infecții virale și poate sugera COVID-19 drept un sindrom hiperferitinemic. Markerii de inflamație (PCR, fibrinogen, IL-6), cei ai coagulării (D dimeri) și de afectare tisulară (LDH) se corelează cu severitatea COVID-19. Gradul de afectare pulmonară evaluat imagistic se corelează cu nivelurile de PCR, fibrinogen, fosfataza alcalină, IL-6 și D dimeri și ilustrează relația inflamație- coagulare- afectare pulmonară. Pacienții cu comorbidități cardiovasculare au niveluri semnificativ crescute ale PCR, fibrinogen și LDH, și reflectă condițiile inflamatorii ale patologiilor de fond, iar cei cu diabet manifestă hiperferitinemie. **PCR, fibrinogen, IL-6 și D dimerii au valoare de prognostic al severității COVID-19 și al gradului de afectare pulmonară. Evaluarea IL-6 și PCR contribuie în ghidarea terapiei și suplimentarea cu oxigen. Feritina este un marker de diagnostic în COVID-19, iar hiperferitinemia este prevalentă la pacienții COVID-19 diabetici.**

În cadrul capitolului 9 obiectivele studiului au fost compararea concentrațiilor serice de vitamina D între pacienții COVID-19, pacienții cu alte tipuri de infecții virale și subiecții

sănătoși, clasificarea pacienților COVID-19 și non-COVID-19 în funcție de nivelurile serice de vitamina D și analiza datelor clinice și paraclinice între subgrupurile create și evaluarea nivelurilor de vitamina D în raport cu severitatea, gradul de afectare pulmonară, tipul de tratament administrat, statusul imunizării și prezența comorbidităților.

Atât pacienții COVID-19, non-COVID-19, cât și subiecții control au un nivel seric insuficient de vitamina D, iar diferențele nu sunt semnificative, astfel deficiența/insuficiența de 25(OH) D nu indică o vulnerabilitate mai mare pentru infecția COVID-19.

Analiza comparativă între pacienții COVID-19 și non-COVID-19 cu același status al vitaminei D a relevat, la concentrații deficiente de vitamina D, un raport NLR semnificativ ridicat față de cei non-COVID-19. În condițiile unui status deficitar/insuficient, dar nu și suficient al vitaminei D, pacienții non-COVID-19 au prezentat niveluri semnificativ mai crescute ale proteinei C reactive și ale fibrinogenului, comparativ cu pacienții COVID-19. Aceste constatări subliniază rolul potențial modulator al vitaminei D asupra răspunsului inflamator.

La pacienții COVID-19 cu deficit de vitamina D, s-a remarcat o corelație pozitivă semnificativă între nivelul de endocan și concentrația serică de feritină și indică un impact al feritinei asupra funcției endoteliale, în contextual deficienței de vitamina D

În cazul pacienților COVID-19 cu insuficiență de vitamina D, nivelurile de 25(OH)D se corelează negativ cu endocan și poate indica faptul că statusul vitaminei D poate influența funcția endotelială.

Statusul vitaminei D nu diferă semnificativ în funcție de severitatea COVID-19, deși se remarcă o incidență crescută a deficienței de vitamina D la pacienții cu forme moderate și severe.

Diferențe semnificative ale nivelurilor serice de 25(OH) D₃ s-au înregistrat între pacienții diabetici/ non-diabetici din grupul COVID-19. Niveluri scăzute 25(OH)D pot reprezenta un factor predispozant al relației bidirecționale dintre diabet-COVID-19, crescând susceptibilitatea, prin afectarea funcției endoteliale și risc de complicații microvasculare. Cel mai important factor limitant al studiului nostru a fost numărul redus de pacienți cu impact

asupra semnificației statistice a rezultatelor. Din cele cunoscute de noi, sunt date reduse despre relația vitamina D-COVID-19/vitamina D-non-COVID-19 în populația României.

Deficiența de vitamina D nu reprezintă un marker de diagnostic sau prognostic în COVID-19. Variațiile concentrațiilor de vitamina D modulează relația imunitate-inflamație, dependent de etiologia infecției. Niveluri deficiente pot facilita dezvoltarea inflamației sistemice cu efect asupra funcției endoteliale, mai ales în cazurile pacienților cu diabet. Acest studiu este primul în care este evaluată relația dintre nivelurile serice de vitamina D- endocan în cazul pacienților COVID-19.

În COVID-19, stresul oxidativ reprezintă cauză, dar și consecință și poate induce disfuncție endotelială și afectare organică. Capacitatea antioxidantă este un indicator al protecției împotriva stresului oxidativ și determinarea acesteia este o metodă indirectă de evaluare a gradului de stres oxidativ. În cadrul capitolului 10 am realizat analize comparative ale capacității antioxidante la pacienții COVID-19 și subiecți sănătoși, evaluarea capacității antioxidante în funcție de severitatea infecției, gradul de afectare pulmonară, prezența comorbidităților, statusul vaccinal și al vitaminei D.

În grupul subiecților sănătoși capacitate antioxidantă a fost semnificativ mai mare decât la pacienții COVID-19. În grupul COVID-19 se manifestă o corelație negativă între capacitatea antioxidantă și nivelul de endocan și indică o asociere între un nivel scăzut al apărării antioxidante și riscul disfuncției endoteliale și inflamației.

Analiza în funcție de severitatea infecției indică în subgrupul cu formă severă, capacitatea antioxidantă semnificativ mai mare comparativ cu cele determinate în cazul formelor moderate și ușoare. Analiza capacității antioxidante la pacienții COVID-19 clasificați în funcție de gradul de afectare pulmonară nu indică diferențe semnificative statistic. Evaluarea statusului antioxidant în funcție de nivelul vitaminei D la pacienții COVID-19 nu indică o asociere între capacitatea antioxidantă și concentrația plasmatică a 25 (OH) D. **Pacienții COVID-19 au un status antioxidant semnificativ redus în comparație cu subiecții sănătoși, dar care nu se asociază cu severitatea infecției, gradul de afectare pulmonară, prezența comorbidităților sau statusul vaccinal. Corelația negativă dintre capacitatea antioxidantă și endocan la pacienții cu forme ușoare și moderate, la cei cu**

afectare pulmonară extinsă, la cei nevaccinați și la cei cu comorbidități indică o relație complexă reciprocă între stresul oxidativ și disfuncția endotelială.

Analiza din capitolul 11 evidențiază MR-proADM drept marker cu valoare de diagnostic și prognostic, iar determinarea nivelurilor de MR-pro ADM poate contribui la stratificarea pacienților în funcție de gradul de severitate și afectare pulmonară, dar și în inițierea precoce a terapiilor adecvate. Niveluri crescute de MR-proADM se datorează activării celulelor endoteliale și creșterii permeabilității vaculare în contextul manifestării infiltratelor pleurale. Corelația negativă dintre endocan și MR-proADM observată la pacienții cu COVID-19 care prezintă focare pneumonice izolate și pleurezie sugerează o relație disociată între inflamația endotelială locală și răspunsul vascular sistemic. Astfel cei doi biomarkeri pot contribui la o caracterizare a relației status inflamator- vascular în COVID-19.

Elementul major de noutate al acestei cercetări este reprezentat de dozarea parametrilor de disfuncție endotelială (endocan și MR-proadrenomedulină) și analiza lor în raport cu date clinice, paraclinice și imagistice la pacienții COVID-19. Din cunoștințele autorilor, este primul studiu în care endocan este evaluat în raport cu statusul imunizării prin vaccinare anti-SARS-CoV-2. De asemenea, date reduse sunt publicate despre relația vitamina D-COVID-19/vitamina D-non-COVID-19 în populația României. Evaluarea endocan în raport cu vitamina D și statusul antioxidant în COVID-19 reprezintă elemente de noutate, despre care nu există date în literatură.

Cel mai important factor limitant al studiului nostru a fost numărul redus de pacienți cu impact asupra semnificației statistice a rezultatelor. Lucrarea și-a atins obiectivele care au conturat scopul, respectiv analiza markerilor de disfuncție endotelială, evaluarea unor noi markeri inflamatori, a vitaminei D și a statusului antioxidant.

Cercetările vor fi continuate în perioada post doctorală; astfel, se va încerca o extindere a numărului de pacienți cu diverse tipuri de infecții pentru a valida utilizarea markerilor de disfuncție endotelială pentru utilizarea clinică. Considerăm de o importanță crucială evaluarea markerilor disfuncției endoteliale la pacienții cu patologii infecțioase.

BIBLIOGRAFIE

- [1] M. C. Pelle *et al.*, “Endothelial Dysfunction in COVID-19: Potential Mechanisms and Possible Therapeutic Options,” Oct. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/life12101605.
- [2] A. Bonaventura *et al.*, “Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19,” *Nat Rev Immunol*, vol. 21, no. 5, pp. 319–329, May 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00536-9.
- [3] S. Görgün *et al.*, “Diagnostic and Prognostic Value of Serum Endocan Levels in Patients With COVID-19,” *Angiology*, vol. 72, no. 10, pp. 942–946, Nov. 2021, doi: 10.1177/00033197211026044.
- [4] P. Pietraszko, M. Zorawski, E. Bielecka, P. Sielatycki, and E. Zbroch, “Mid-Regional Proadrenomedullin in COVID-19—May It Act as a Predictor of Prolonged Cardiovascular Complications?,” Dec. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms242316821.
- [5] N. Wang *et al.*, “Circulating mid-regional proadrenomedullin is a predictor of mortality in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis,” *BMC Infect Dis*, vol. 23, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/s12879-023-08275-z.
- [6] F. Banchini, G. M. Cattaneo, and P. Capelli, “Serum ferritin levels in inflammation: a retrospective comparative analysis between COVID-19 and emergency surgical non-COVID-19 patients,” *World J Emerg Surg*, vol. 16, no. 1, p. 9, Mar. 2021, doi: 10.1186/s13017-021-00354-3.
- [7] E. Beydoğan and P. Yürük Atasoy, “The relationship between CRP at admission and thorax CT findings in patients diagnosed with COVID-19,” *Int J Clin Pract*, vol. 75, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.1111/ijcp.14962.
- [8] S. Golabi *et al.*, “Oxidative Stress and Inflammatory Status in COVID-19 Outpatients: A Health Center-Based Analytical Cross-Sectional Study,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/antiox11040606.

- [9] N. Yaghoubi, M. Youssefi, F. Jabbari Azad, F. Farzad, Z. Yavari, and F. Zahedi Avval, "Total antioxidant capacity as a marker of severity of COVID-19 infection: Possible prognostic and therapeutic clinical application," *J Med Virol*, vol. 94, no. 4, pp. 1558–1565, Apr. 2022, doi: 10.1002/jmv.27500.
- [10] E. Pavlova, P. Atanasov, I. Ivanov, and G. Dyankov, "Biomarkers of Oxidative Stress in COVID-19 Patients," *Int J Mol Sci*, vol. 26, no. 8, p. 3869, Apr. 2025, doi: 10.3390/ijms26083869.
- [11] J. Djordjevic *et al.*, "Laboratory Puzzle of Oxidative Stress, Parameters of Hemostasis and Inflammation in Hospitalized Patients with COVID-19," *Biomedicines*, vol. 12, no. 3, Mar. 2024, doi: 10.3390/biomedicines12030636.
- [12] S. wen Xu, I. Ilyas, and J. ping Weng, "Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies," Apr. 01, 2023, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41401-022-00998-0.
- [13] A. Bonaventura *et al.*, "Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19," *Nat Rev Immunol*, vol. 21, no. 5, pp. 319–329, May 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00536-9.
- [14] C. Chenevier-Gobeaux *et al.*, "Plasma Endocan as a Biomarker of Thrombotic Events in COVID-19 Patients," *J Clin Med*, vol. 11, no. 19, Oct. 2022, doi: 10.3390/jcm11195560.
- [15] M. Kumar, C. Bindu, A. Shyam, and R. Reena, "Ferritin – The key model inflammatory marker in diabetic and non-diabetic COVID-19," *Asian J Med Sci*, vol. 12, no. 12, pp. 23–31, Dec. 2021, doi: 10.3126/ajms.v12i12.39717.
- [16] W. B. Grant *et al.*, "Evidence that vitamin d supplementation could reduce risk of influenza and covid-19 infections and deaths," Apr. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/nu12040988.
- [17] V. Contreras-Bolívar, B. García-Fontana, C. García-Fontana, and M. Muñoz-Torres, "Vitamin D and COVID-19: where are we now?," 2023, *Taylor and Francis Ltd*. doi: 10.1080/00325481.2021.2017647.

- [18] S. Suhail *et al.*, “Role of Oxidative Stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: A Review,” Dec. 01, 2020, *Springer*. doi: 10.1007/s10930-020-09935-8.
- [19] S. Dogan, T. Bal, M. Çabalak, N. Dikmen, H. Yaqoobi, and O. Ozcan, “Oxidative stress index can be a new marker related to disease severity in COVID-19,” *Turkish Journal of Biochemistry*, vol. 46, no. 4, pp. 349–357, Aug. 2021, doi: 10.1515/TJB-2021-0013.
- [20] S. W. Smail, E. Babaei, and K. Amin, “Hematological, Inflammatory, Coagulation, and Oxidative/Antioxidant Biomarkers as Predictors for Severity and Mortality in COVID-19: A Prospective Cohort-Study,” *Int J Gen Med*, vol. 16, pp. 565–580, 2023, doi: 10.2147/IJGM.S402206.
- [21] J. M. Solis-Paredes *et al.*, “Plasma Total Antioxidant Capacity and Carbonylated Proteins Are Increased in Pregnant Women with Severe COVID-19,” *Viruses*, vol. 14, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/v14040723.
- [22] N. J. Atallah *et al.*, “Mid-regional Proadrenomedullin Biomarker Predicts Coronavirus Disease 2019 Clinical Outcomes: A US-Based Cohort Study,” *Open Forum Infect Dis*, vol. 9, no. 9, Sep. 2022, doi: 10.1093/ofid/ofac423.

Lucrări publicate

1. Investigation of Serum Endocan Levels in SARS-CoV-2 Patients, **L. Constantin**, A. Ungurianu, A. Streinu-Cercel, O. Săndulescu, V. Aramă, D. Margină, I. Țârcomnicu

Int. J. Mol. Sci. 2024, 25(5), 3042; doi.org/10.3390/ijms25053042 (2024, IF:4.9)

<https://www.mdpi.com/1422-0067/25/5/3042>

2. Vitamin D and COVID-19: comparative analysis with other respiratory infections and impact of comorbidities, L. Constantin, A. Ungurianu, I. Țârcomnicu, E. Bălulescu, D. Margină⁵ *GERMS*. 2024;14(3):232-245. doi: [10.18683/germs.2024.1435](https://doi.org/10.18683/germs.2024.1435) (2024, IF:2)

<https://www.germs.ro/en/Articles/Vitamin-D-and-COVID-19-comparative-analysis-with-other-respiratory-infections-and-impact-of-comorbidities-2227>