



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ

Трет циклус студии – Биомедицина

м-р Анкица Поп-Костова

**УЛОГАТА НА ВИТАМИНОТ Д КАЈ ПАЦИЕНТИ СО КОВИД-19 И НЕГОВА
ПОВРЗАНОСТ СО ВОСПАЛИТЕЛНИТЕ БИОМАРКЕРИ**

докторска дисертација

Штип, септември, 2022

Комисија за оценка и одбрана на докторската дисертација

Ментор:

Проф. д-р Татјана Рушковска

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Екстерен ментор:

Проф. д-р Ицко Ѓоргоски

Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

Членови на комисија за оценка и одбрана:

Претседател:

Проф. д-р Милка Здравковска

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Член:

Проф. д-р Ивица Смоковски

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Член:

Проф. д-р Ѓорѓи Шуманов

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Научно поле: Клиничка медицина

Научна област: Клиничка биохемија

Датум на одбрана: 01.09.2022 год.

*Иднината им припаѓа на оние кои веруваат во убавината на своите
соништа*

Елеонор Рузвелт

Посветено на Никола Поп-Костов и Росица Поп-Костова

СОДРЖИНА

АПСТРАКТ.....	1
ABSTRACT	4
1. ВОВЕД	7
1.1. Витамин Д и негова биосинтеза	8
1.1.1. Рецептор на витаминот Д.....	10
1.1.2. Дефицит на витамин Д.....	13
1.1.3. Влијанието на витаминот Д врз имунитетот.....	14
1.2. SARS-CoV-2.....	16
1.2.1. Репликација на SARS-CoV-2 и имунолошки одговор.....	19
1.3. КОВИД-19 и витамин Д	20
1.3.1. Цитокини	23
1.3.2. Интерлеукин 6	23
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА.....	26
2.1. Циркулирачки ензими кај пациенти со КОВИД-19.....	27
2.2. Воспалителни биомаркери кај пациенти со КОВИД-19.....	30
3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	33
4. МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА	34
4.1. Пациенти.....	34
4.2. Методологија	35
4.3. Статистичка обработка на податоците	37
5. РЕЗУЛТАТИ.....	38
6. ДИСКУСИЈА	63
7. ЗАКЛУЧОК	79
8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)	81

УЛОГАТА НА ВИТАМИНОТ Д КАЈ ПАЦИЕНТИ СО КОВИД-19 И НЕГОВА ПОВРЗАНОСТ СО ВОСПАЛИТЕЛНИТЕ БИОМАРКЕРИ

АПСТРАКТ

Вовед. Лабораториските анализи кај пациенти со КОВИД-19 се од големо значење за правилен пристап кон пациентот, како при самото поставување на дијагнозата, така и при понатамошното лекување. Клиничките податоци укажуваат дека висок процент од пациентите со КОВИД-19 развиваат абнормален инфламаторен одговор, што може да прогресира кон мултиорганска инсуфициенција и смрт. Неодамнешните истражувања укажуваат на постоење на комплексна интеракција помеѓу вирусните инфекции и витаминот Д. Во таа смисла, заштитниот ефект на витаминот Д е покажан во многу состојби поврзани со пневмонија и хиперпродукција на цитокини. Целта на оваа докторска дисертација беше да се изврши анализа на концентрациите на витаминот Д кај пациенти со КОВИД-19, паралелно со вредностите на циркулирачките ензими: AST, ALT, GGT, LDH, CK и CK-MB, вредностите на инфламаторните биомаркери Ц-реактивен протеин (CRP) и интерлеукин 6 (IL-6), бројот на леукоцити (white blood cells - WBC), брзината на седиментација на еритроцити (Se), феритинот (FER) и серумското железо (iron - IRN), зависно од тежината на клиничката слика.

Пациенти и методи. Оваа студија е дизајнирана како ретроспективна опсервациска студија и беше започната после одобрувањето од страна на Етичката комисија при Јавната здравствена установа - Градска општа болница „8-ми Септември“ - Скопје. Студијата вклучува вкупно 115 пациенти поделени во две групи: А група - асимптоматски и лесни случаи на пациенти со КОВИД-19, N=55 (36 мажи и 19 жени; средна возраст: 53.3 ± 1.4 год.) и Б група – средно-тешки и тешки случаи на пациенти со КОВИД-19 на кои им беше потребно сместување во болничка установа, N=60 (38 мажи и 22 жени; средна возраст: 56.1 ± 1.3 год.). Сите пациенти имаа позитивен PCR-тест за SARS-CoV-2 и беа пријавени за преглед на Тријажниот центар и Инфективната амбуланта во болницата. Тешките

случаи понатаму беа хоспитализирани на одделите за лекување од COVID-19. Анализирани се следните клиничко-биохемиски параметри: AST, ALT, GGT, LDH, CK и CK-MB, CRP, IL-6, WBC, Se, FER и IRN. Студијата е изработена во периодот септември - декември 2020 година.

Резултати. Не беше регистрирана сигнификантна разлика во однос на возраста кај двете групи пациенти. При првиот преглед, пациентите кои подоцна развиваа средно-тешка и тешка клиничка слика на КОВИД-19 имаа повисоки вредности на испитуваните циркулирачки ензими: AST, ALT, GGT, LDH, CK и CK-MB во споредба со асимптоматските и лесните случаи. Средните вредности на AST, GGT и LDH беа сигнификантно повисоки кај пациентите од Б групата во однос на А групата. Во текот на лекувањето кај дел од овие пациенти циркулирачките ензими се враќаа во рамките на референтните вредности, додека кај дел од нив вредностите драстично се зголемуваа.

Средните вредности на Se, WBC, CRP, IL-6 и FER беа повисоки кај пациентите од Б група во однос на А група. Изразито висока статистичка сигнификантност беше регистрирана кај параметрите CRP и IL-6, додека висока статистичка сигнификантност беше регистрирана кај параметрите Se и FER. Средната вредност на IRN беше сигнификантно пониска кај пациентите од Б група споредено со А група. Регистриравме статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу CRP и IL-6 и кај двете групи испитувани пациенти. Серумското железо покажа значајна инверзна корелација со CRP и IL-6, но само кај пациентите од А група.

Статистичката анализа на нашите податоци демонстрираше високо сигнификантна разлика во однос на серумските концентрации на витаминот Д, кои беа сигнификантно пониски кај пациентите од Б група во однос на А група. Дополнително беше извршена анализа на влијанието на полот врз вредностите на параметрите од интерес. Нашите резултати покажуваат дека ниските нивоа на витамин Д може да претставуваат значаен фактор на ризик за развој на болеста и се поврзани со половите разлики во однос на клиничката слика и исходот на пациентите со КОВИД-19.

Заклучок. Од клиничка перспектива, овие наоди можат да помогнат во раната тријажа на пациентите, но исто така и за следење на оштетувањето на белите дробови, црниот дроб и другите ткива и органи, како и за внимателна употреба на лекови кои можат да предизвикаат токсичност на црниот дроб кај пациенти со КОВИД-19. Дисбалансот на хомеостазата на железото е поврзан со ткивно оштетување и нарушена имунолошка функција на домаќинот и од тој аспект серумското железо и феритинот претставуваат параметри коишто имаат значајна улога во дијагностиката и следењето на пациентите со КОВИД-19. Во истражувачките напори за идентификување на двигателите и факторите на ризик за смртност од КОВИД-19, улогата на витаминот Д привлече интерес, особено имајќи го предвид неговото моќно модулаторно дејство врз имунолошкиот систем.

Клучни зборови: SARS-CoV-2, циркулирачки ензими, CRP, феритин, IL-6, полова разлика.

THE ROLE OF VITAMIN D IN PATIENTS WITH COVID-19 AND ITS RELATIONSHIP WITH THE INFLAMMATORY BIOMARKERS

ABSTRACT

Introduction. Laboratory tests in patients with COVID-19 are of particular importance to assure correct approach towards the patient, both at the time of diagnosis and further during the treatment. Clinical data suggest that a high percentage of the patients with COVID-19 develop an abnormal inflammatory response, which can progress to multiorgan failure and death. Recent research suggests a complex interaction between viral infections and vitamin D. In this regard, the protective role of vitamin D has been shown in many conditions associated with pneumonia and cytokine overproduction. The aim of this study was to conduct analysis of the concentrations of vitamin D in patients with COVID-19 in parallel with the values of circulating enzymes: AST, ALT, GGT, LDH, CK and CK-MB, the values of inflammatory biomarkers C-reactive protein (CRP) and interleukin 6 (IL-6), the white blood cell (WBC) count, erythrocyte sedimentation rate (Se), ferritin (FER), and serum iron (IRN), depending on their clinical presentation.

Patients and methods. This study was designed as a retrospective observation study which was started after approval from the Ethics Committee of the General City Hospital "8th September", Skopje. In total, the study includes 115 patients that are divided in two groups: Group A – COVID-19 asymptomatic patients and patients with mild symptoms, N=55 (36 men и 19 women; mean age: 53.3 ± 1.4 years) and Group B – COVID-19 patients with moderate and severe symptomatology for which in-hospital treatment was necessary, N=60 (38 men и 22 women; mean age: 56.1 ± 1.3 years). All the patients had positive PCR verification for SARS-CoV-2 and were admitted into the hospital's Triage center and Department of infection diseases. The severe cases were further hospitalized in the COVID-19 wards. The following clinical biochemistry parameters have been analyzed: AST, ALT, GGT, LDH, CK и CK-MB, CRP, IL-6, WBC, Se, FER и IRN. This study was conducted from September 2020 until December 2020.

Results. No significant age difference was observed between the two groups of patients. At the admission, patients who further developed moderate to severe clinical presentation of COVID-19 had higher values of circulating enzymes AST, ALT, GGT, LDH, CK and CK-MB, compared to asymptomatic and mild cases. Mean values of AST, GGT and LDH were significantly higher in the patients from Group B compared to Group A. During the medical treatment, in some of these patients the values of circulating enzymes dropped back to the reference values, whereas in some of them the values increased dramatically.

Mean values of Se, WBC, CRP, IL-6, and FER were higher in Group B patients than in Group A. Very high statistical significance was observed for CRP and IL-6, while high statistical significance was observed for Se and FER. The mean value of IRN was significantly lower in Group B patients compared with Group A. We observed a statistically significant positive correlation between CRP and IL-6 in both groups of patients. Serum iron shows a significant inverse correlation with CRP and IL-6, but only in Group A patients.

Statistical analysis of our data demonstrated a highly significant difference in terms of vitamin D concentrations, which were significantly lower in Group B patients compared with Group A. Additionally, an analysis of the impact of gender on the values of the parameters of interest has been conducted. Our results demonstrate that low levels of vitamin D may represent an important risk factor for the development of the disease and are related to the gender differences in the clinical presentation and outcome of patients with COVID-19.

Conclusion. From a clinical perspective, these findings may be of help in early triage of the patients, but also for monitoring of damage of the lungs, liver and other tissues and organs, as well as for careful use of drugs that may cause liver toxicity in patients with COVID-19. Imbalance of iron homeostasis is associated with tissue damage and impaired host immune system function, and in this respect serum iron and ferritin are parameters that play an important role in diagnosis and monitoring of patients with COVID-19. In the research efforts to identify the drivers and risk factors for

COVID-19 mortality, the role of vitamin D has attracted interest, especially given its potent modulatory effect on the immune system.

Keywords: SARS-CoV-2, circulating enzymes, CRP, ferritin, IL-6, sex difference.

1. ВОВЕД

Кон крајот на 2019 година, во градот Вухан, провинција Хубеи во Кина, беа регистрирани неколку случаи на пневмонија со непозната етиологија (N. Chen et al., 2020; Huang et al., 2020). Многу бргу оваа непозната болест се прошири и во другите провинции на Кина. Веќе на почетокот од 2020 година, болеста излезе од границите на Кина и молскавично почна да се шири низ целиот свет. На 7 јануари 2020 година, еден нов коронавирус беше идентификуван во примерок од земен брис од грлото кај еден таков пациент, а подоцна овој непознат вирус од страна на Светската здравствена организација (СЗО) е именуван како 2019-nCoV. Во февруари 2020 година, СЗО воспостави номенклатура на новонастанатото заболување предизвикано од SARS-CoV-2, како коронавирусна болест 2019 (КОВИД-19). Состојбата многу брзо се влоши во светски рамки и поради тоа во февруари 2020 година СЗО прогласи пандемија на КОВИД-19, како итен здравствен проблем од меѓународен интерес (Guo et al., 2020).

Светот многу тешко се справуваше со заразата и скоро и да беше невозможно да се ограничи ширењето на болеста. Избувнувањето на КОВИД-19 создаде глобална криза во јавното здравство во светски рамки. Во Македонија официјално првиот случај на болен од КОВИД-19 е регистриран на 26 февруари 2020 година, кај наша сограѓанка повратник од странство, конкретно од Италија. До 20 април 2022 година во нашата земја се направени вкупно 2 000 910 тестирања на SARS-CoV-2. Вкупната бројка на КОВИД-19 дијагностицирани лица изнесува 308 878, од кои починати се 9 265 лица.

Затоа што болеста многу брзо се шири, фокусот се насочува кон подобар третман и спречување на факторите кои ја зголемуваат сериозноста од КОВИД-19. Затоа, насушно се потребни превентивни здравствени мерки што можат да го намалат ризикот од инфекција, прогресија и сериозност од КОВИД-19. Оваа болест се карактеризира со висока контагиозност и изразена варијабилност во клиничката слика кај пациентите (Jain et al., 2020). На почетокот од пандемијата, кога е реализирано ова истражување, од инфицираните пациенти околу 40-45% беа асимптоматски случаи, а 30-40% развиваа само благи симптоми. Само

15-20% и помалку од случаите развиваа средно-тешка до тешка форма на болеста (Wu & McGoogan, 2020).

Дополнително, болеста претставува особено сериозна закана кај пациенти со претходни хронични заболувања, како што се на пример дијабетес и хипертензија, кои многу често се поврзани со развој на тешка клиничка слика кај заболени од КОВИД-19 (Hill et al., 2020). Поради тоа, научниците се фокусирани на подлабоко истражување на факторите кои ја зголемуваат или намалуваат сериозноста на клиничката слика на КОВИД-19. Авторите неуморно работејќи дојдоа до претпоставка и сознание дека нивото на витамин Д игра значајна улога во развојот и текот на болеста КОВИД-19 (Jain et al., 2020).

1.1. Витамин Д и негова биосинтеза

Витаминот Д (калциферол) е липосолубилен витамин кој има клучна улога во метаболизмот на калциумот и фосфорот (Institute of Medicine Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin & Calcium, 2011), но сепак се постулирани и други функции на овој витамин. Имено, докажано е дека витаминот Д претставува главен модулатор на имунолошкиот одговор кај автоимуните и инфективните болести (Wacker & Holick, 2013).

Постојат две главни форми на витамин Д и тоа:

Д₂ – ергокалциферол, што го произведуваат некои растенија;

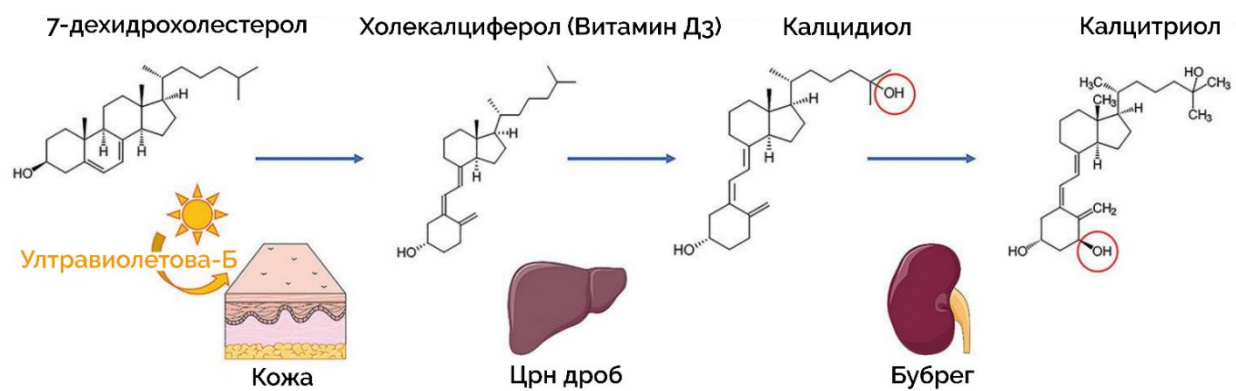
Д₃ – холекалциферол, што го произведува човечкиот организам со изложување на сончевите зраци.

Холекалциферолот всушност се создава во кожата со трансформација на 7-дехидрохолестерол под дејство на ултравиолетовата светлина од типот Б (УВ-Б), која е со бранова должина од 280 до 315 nm. Во отсуство на доволна изложеност на сончева светлина, внесот преку храната е од суштинско значење.

И двете форми во црниот дроб се конвертираат во 25(OH)D, т.е. calcidiol, кој потоа се транспортира до бубрезите, каде што се модифицира во 1,25(OH)₂D, т.е. calcitriol (Слика 1).

25(OH)D ја претставува главната циркулирачка форма на витамин Д и истиот може да се измери во серумот за да се определи статусот на витамин Д на поединецот (Holick et al., 2011). Сепак, 25(OH)D е биолошки инертен и бара дополнителна хидроксилација во бубрегот за да се формира биолошки активен дериват на витамин Д, т.е. 1,25(OH)₂D.

1,25(OH)₂D е главната хормонална форма на витамин Д, која носи три хидроксилни групи и е одговорна за повеќето биолошки активности. 1,25(OH)₂D е хормон растворлив во масти кој се поврзува со рецепторите на витамин Д (VDRs). Производството на 1,25(OH)₂D во бубрегот е строго контролирано, стимулирано со паратиroidен хормон и инхибирано од калциумот и фосфатите (Cardoso & Pereira, 2019).



Слика 1. Биосинтеза на витамин Д

Извор: (Pirauх, 2021)

Figure 1. Vitamin D biosynthesis

Source: (Pirauх, 2021)

Ензимот што ја катализира реакцијата на конверзија на 25(OH)D во 1,25(OH)₂D во бубрегот, исто така е експресиран и во активираните макрофаги и дендритични клетки (Fritsche et al., 2003; Monkawa et al., 2000). Сепак, за разлика од бубрежните клетки, кај останатите клетки ензимот не е супримиран од страна

на паратироидниот хормон или $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Наместо тоа, тој е индуциран во клетките со голем број на фактори, како што е на пример интерферон γ (INF- γ) и е регулиран во процесот на созревање на дендритичните клетки (Hewison et al., 2003).

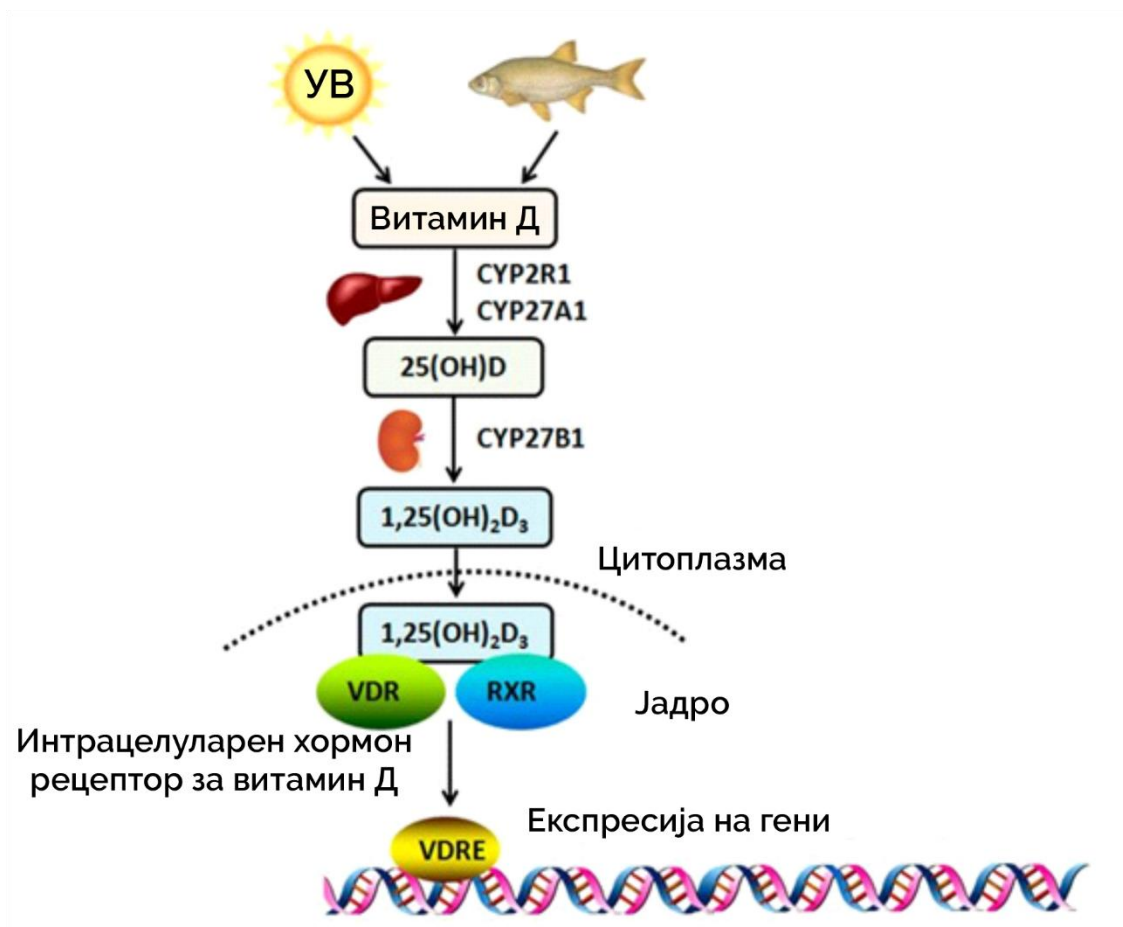
1.1.1. Рецептор на витаминот Д

Потенцијалната улога на витаминот Д и неговиот активен метаболит $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ во модулирањето на имуниот одговор веќе долго време се препознава со откривањето на рецепторот на витамин Д (VDR) кај макрофагите, дендритичните клетки и активираните Т- и В-лимфоцити и способноста на $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ да ја регулира пролиферацијата и функцијата на овие клетки (Szymczak & Pawliczak, 2016). Иако ова се клучните клетки кои посредуваат при адаптивниот имунолошки одговор, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ и VDR се исто така изразени во голем број епителни клетки кои заедно со горенаведените членови на адаптивниот имунолошки одговор придонесуваат во имунолошката функција.

Рецепторот на витамин Д (VDR) игра клучна улога како посредник на сигнализацијата на $25(\text{OH})\text{D}$. Генот *VDR* дава инструкции за биосинтеза на протеинот наречен витамин Д рецептор (VDR), кој му овозможува на телото да реагира на витаминот Д (Bahrami et al., 2018). Протеинот VDR се врзува за активната форма на витамин Д, калцитриол. Оваа интеракција му овозможува на VDR да биде партнер со друг протеин наречен ретиноиден X рецептор (RXR) (Fetahu et al., 2014). Добиениот комплекс потоа се врзува за одредени региони на ДНК, познати како елементи на одговор на витамин Д и ја регулира активноста на гените кои реагираат на витамин Д (Bikle, 2014) (Слика 2). Со вклучување или исклучување на овие гени, комплексот помага да се контролира апсорпцијата на калциум и фосфат, а регулира и други процеси.

Покрај својата улога во хомеостазата на калциумот, VDR има важна улога и во контролата на имунитетот, како и во контролата на клеточниот циклус (Saccone et al., 2015). Додека VDR регулира бројни гени низ геномот, останува многу да се научи за регулацијата на самиот ген *VDR* (Zeitelhofer et al., 2017). Рецепторот на

витамин Д има широко влијание и удел во патогенезата на различни болести и подобро разбирање на регулацијата на VDR може да го олесни развојот на подобрените стратегии за лекување и превенција на овие болести (Wimalawansa, 2019).



Слика 2. Метаболизам и механизам на дејство на витаминот Д

Извор: (Liu et al., 2018)

Figure 2. Metabolism and mechanism of action of vitamin D

Source: (Liu et al., 2018)

Истражувањата во текот на изминатите две децении покажаа дека различните биолошки дејства на 1,25(OH)₂D се иницирани преку прецизни

промени во генската експресија кои се посредувани од интрацелуларен витамин Д рецептор (VDR) (Hausler et al., 1998). Активирањето на VDR преку директна интеракција со $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ го поттикнува брзото врзување на рецепторот за регулаторните региони на целните гени, каде што дејствува на формирање на големи протеински комплекси, чии функционални активности се од суштинско значење за насочени промени во транскрипцијата (Sutton & MacDonald, 2003). Во повеќето целни клетки, овие дејства предизвикуваат изразување на мрежи на целни гени, чии функционални активности се комбинираат за да оркестрираат специфични биолошки одговори. Овие одговори се специфични за ткивото и се движат од многу сложени дејства од суштинско значење за хомеостатска контрола на минералниот метаболизам, до фокални дејства кои го контролираат растот, диференцијацијата и функционалната активност на бројни типови клетки, вклучувајќи ги и оние на имунолошкиот систем (Bouillon et al., 2008).

VDR е клучен регулатор на транскрипцијата во процесот на диференцијација на миелоидните прогенитори во моноцити и гранулоцити. Покрај тоа, VDR и неговиот лиганд се антагонисти на провоспалителните транскрипциони фактори во Т-клетките, како што е на пример NF- κ B, што резултира во намалена продукција на цитокини. Исто така, витаминот Д ја инхибира диференцијацијата, созревањето и имуностимулаторните капацитети на дендритичните клетки преку репресија на гените кои ги кодираат различните компоненти на главниот комплекс за хистокомпатибилност и неговите костимулативни молекули CD40, CD80 и CD86. Резултирачкиот фенотип на дендритични клетки што предизвикува имунолошка толеранција, доведува до индукција на регулаторните Т-клетки, со кои се регулира активноста на другите клетки на имунолошкиот систем (Boonstra et al., 2001).

Ова е централниот механизам за тоа како витаминот Д го намалува хроничното воспаление и автоимуноста. Ова исто така укажува на тоа дека во сигнализацијата на витаминот Д, имуномодулаторните и метаболичките функции се поблизу поврзани отколку што првично се претпоставувало и веројатно еволуирале паралелно.

1.1.2. Дефицит на витамин Д

Дефицитот на витамин Д најчесто се среќава во земјите каде што во зимските месеци нема ултравиолетово светло, а луѓето мора да се потпрат на исхраната како главен извор на витаминот. На темната кожа ѝ е потребна поголема изложеност на сонце, за да се одржи нормалното ниво на витамин Д во крвта. Генетските и епигенетските варијанти можат да помогнат во заштитата од недостаток на витамин Д. Способноста за ендогено синтетизирање на витамин Д укажува дека терминот „витамин“ не е најсоодветен. Сепак, со оглед на тоа што во денешно време луѓето имаат тенденција да престојуваат во затворено или да ја покриваат својата кожа со облека кога се на отворено, недоволното изложување на сонце резултира во ниско производство на ендогениот витамин Д. Бидејќи просечната исхрана на човекот не содржи многу витамин Д, во светски рамки се проценува дека повеќе од милијарда лица имаат дефицит на витамин Д.

Масните риби како туна, сардини, лосос и скуша, се најдобри извори на витамин Д во исхраната, како и конзумирање на црн дроб, сирење, жолчка од јајце и печурки. Покрај тоа, во некои земји, храната како на пример млеко и млечни производи, сок од портокал, житарки и маргарин е збогатена со витамин Д. Исто така, во многу држави се препорачува директно дополнување на витаминот Д преку таблети, капки или други суплементи кои индиректно ќе го надополнат недостатокот од витамин Д. Оптималното ниво за 25(OH)D изнесува од 75-250 nmol/L, но нивото на витамин Д потребно за одржување на хомеостазата на оптималниот имунолошки систем сè уште не е утврдено.

Нутригеномската проценка на одговорот на витамин Д *in vivo*, т.е. определувањето на индексот на реакција на витамин Д, подразбира дека треба да има персонализиран совет за додаток на витамин Д3, наместо општа препорака заснована на популацијата (Carlberg, 2019). Недостатокот на витаминот Д може да ја потенцира активноста на ренин-ангиотензин системот, што може да доведе до кардиоваскуларни болести и намалена белодробна активност, што всушност се застапени во голема мера кај пациенти инфицирани со SARS-CoV-2.

1.1.3. Влијанието на витаминот Д врз имунитетот

Целокупноста на имунолошкиот одговор вклучува два вида одговори во сложени интеракции кои вклучуваат бројни цитокини. Регулацијата на овие различни одговори и нивните интеракции е нијансирана од страна на $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$. Општо, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ го подобрува вродениот имунолошки одговор првенствено преку неговата способност да го стимулира кателицидинот, антиминобен пептид кој е важен за одбрана од инвазивните микроорганизми, додека тој го инхибира адаптивниот имунолошки одговор првенствено со инхибиција на созревањето на дендритичните клетки.

Бидејќи повеќето имуни клетки имаат краток век, тие покажуваат максимално прилагодлив одговор на промените во животната средина. Макрофагите и дендритичните клетки, како и нивните прекурсори, моноцитите, ги координираат метаболичките и воспалителните реакции и оксидативниот стрес преку промени во нивниот транскрипционен профил и соодветната поттипска спецификација. Така, сигнализацијата на липидите преку клучните нуклеарни рецептори има важна улога во диференцијацијата и епигенетското програмирање на имуните клетки, што укажува дека метаболизмот и имунитетот се поврзани, отколку што првично можело да се претпостави.

Преку VDR, витаминот Д ја модулира активноста и на вродениот и на стекнатиот имунолошки систем. На пример, кај моноцитите, витаминот Д го стимулира ефикасното препознавање на патогените бактерии преку рецептори (TLRs). Поради оваа причина, изложувањето на сончевата светлина или вештачката UV-B светлина се ефикасни третмани за превенција на многу болести. Спротивно на тоа, недостатокот на витамин Д е поврзан со зголемен ризик од развој на повеќе болести. Покрај тоа, се покажа дека витаминот Д спречува и различни инфекции, како што се оние на респираторниот или уринарниот тракт.

Витаминот Д е во интеракција со имунолошкиот систем. Тој учествува во регулацијата и диференцијацијата на клетките на имунолошкиот систем директно и индиректно.

- **Лимфоцитни клетки**

Витаминот Д има директни ефекти врз Т- и В-лимфоцитите, обликувајќи ги нивните одговори за активирање.

Ефектот на 1,25(OH)₂D на стекнат антиген специфичен имунолошки одговор е инхибиција на Т-лимфоцитната пролиферација (Bhalla et al., 1984; Lemire, 1992) особено на Th1 и производство на цитокини (Boonstra et al., 2001). Додавањето на 1,25(OH)₂D исто така беше забележано дека ја инхибира експресијата на интерлеукин 6 (IL-6), важен фактор кој ги стимулира Th17 клетките кои се критична компонента на автоимуните реакции (Stockinger, 2007; Xue et al., 2002).

Во В-клетките витаминот Д ја инхибира секрецијата на антитела и посебно производството на автоантитела.

- **Дендритични клетки**

Дендритичните клетки играат централна улога во регулирањето на имунолошката активација, додека пак витаминот Д има дополнителни имunosупресивни ефекти врз дендритичните клетки (Griffin et al., 2000). Се покажало дека 1,25(OH)₂D е еден од најмоќните блокатори на дендритичната клеточна диференцијација и секреција на IL-12 (D'Ambrosio et al., 1998). Со оглед на нивната клучна функција во одбраната на домаќинот и потенцијалната опасност од нерегулирана хиперинфламација, разбирањето на моноцитните и макрофагите фенотипови во КОВИД-19 е клучно за справување со патолошките механизми на болеста. Хиперактивираниите и нерегулирани имунолошки клетки претставуваат значителна опасност за прекумерно оштетување на ткивото (Karki et al., 2021; Merad & Martin, 2020; Schuler & Grom, 2015) и ја зголемуваат подложноста на секундарна бактериска суперинфекција.

- **Макрофаги**

Макрофагите се хетерогено семејство на ткивни, фагоцитни вродени имунолошки клетки, вклучувајќи ги Купферовите клетки во црниот дроб и белодробните алвеоларни и интерстицијални макрофаги, кои играат важна улога во ткивната хомеостаза и имунолошката одбрана (Bassler et al., 2019). Во случај

на инфекција, макрофагите регистрираат сигнали за опасност од микробиолошките патогени или оштетување на ткивото преку плејада рецептори за препознавање и реагираат со ослободување на воспалителни молекули кои ги елиминираат патогените, иницираат воспаление и регрутирање на дополнителни ефекторни клетки и промовираат заздравување на ткивото. Меѓутоа, како што е случајот на пример во синдромот на активирање на макрофагите (MAS), преголемиот одговор на макрофагите може да биде штетен за домаќинот (Schulert & Grom, 2015).

Дефицитот на витамин Д ја намалува способноста на макрофагите да созреат за да произведат површински антигени специфични за макрофаги, како и за лачење на водород пероксид кој е од суштинско значење за нивната антимикробна функција. Белодробните макрофаги кај КОВИД-19 добиени од инфилтрирачки воспалителни моноцити се во хиперактивирана состојба, што резултира со ослободување на проинфламаторни цитокини и регрутирање на цитотоксични ефекторни клетки, со што се влошува оштетувањето на ткивото на местото на инфекцијата. Витаминот Д учествува во модулација на одговорот на макрофагите, спречувајќи ги да ослободат прекумерно количество воспалителни цитокини и хемокини (Helming et al., 2005; Kapellos et al., 2019).

1.2. SARS-CoV-2

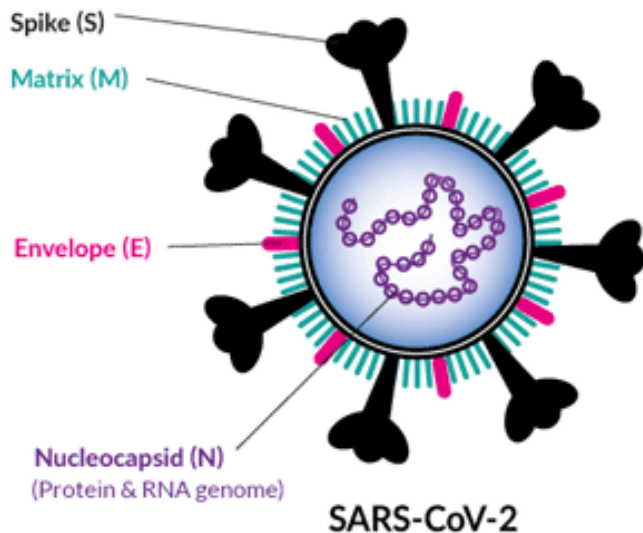
SARS-CoV-2 (или 2019-nCoV) е предизвикувачки агенс за КОВИД-19. Овој вирус припаѓа на лозата Б од родот β -коронавируси. Коронавирусите се релативно големи, обвиткани, RNA вируси (~ 30 kb). Нивната мембрана има изглед на круна, поради присуството на гликопротеински „шила“ (C. Liu et al., 2020) (Слика 3).

Геномот на SARS-CoV-2 кодира четири структурни протеини, но исто така и поголем број неструктурни протеини.

Две третини од геномот на SARS-CoV-2 кодира два полипротеина, pp1a и pp1ab, што заеднички се нарекуваат репликаза. Овие полипротеини се расцепуваат во 16 неструктурни протеини, вклучувајќи RNA-зависна RNA

полимераза (RdRp) со помош на две основни вирусни протеази, протеаза слична на 3C (3CLpro) и протеаза слична на папаин (PLpro).

Една третина од геномот на SARS-CoV-2, кодира четири основни структурни протеини и збир на дополнителни протеини и сите можат да влијаат врз вродениот имунолошки одговор на домаќинот (Zhu et al., 2020).



Слика 3. Шематски приказ на вирусната честичка на SARS-CoV-2

Извор: (Lei, 2021)

Figure 3. Schematic representation of SARS-CoV-2 viral particle

Source: (Lei, 2021)

Овие структурни протеини се:

- **Спајк (S) гликопротеини** - претставуваат најголеми структури на вирусот и се неопходни за влез во клетките домаќини;

- **Мали плик протеини (E)** - присутни се само во мали количини и најверојатно функционираат како јонски канали, не се неопходни за репликацијата на вирусот, но се неопходни за патогенезата;

- **Мембрански / Матрикс (M) протеини** - се најраспространетите протеини во структурата на вирусот и се одговорни за искривеноста на вирусната мембрана и врзувањето со нуклеокапсидот;

- **Нуклеокапсидни (N) протеини** - се врзуваат за геномот на вирусната RNA и обезбедуваат одржување на RNA-конформацијата.

Ангиотензин-конвертирачки ензим 2 (ACE2) е клеточен рецептор изразен во белите дробови, артериите, срцето, бубрезите и дигестивниот систем. ACE2 се врзува за вирусниот S-протеин и го сочинува клеточниот влезен рецептор за SARS-CoV-2 кај човекот (Zhou et al., 2020).

SARS-CoV-2 се врзува за два протеини изразени на површината на домаќинот, ACE2 и серинската протеаза TMPRSS2, преку неговиот S-протеин. Со помош на една екстрацелуларна протеаза, вирусниот S-протеин се поделува во две функционални поединици, S1 која се врзува со ACE2, S2 која понатаму се дели и активира од трансмембранската протеаза серин 2 од површината на домаќинот (TMPRSS2) (Hoffmann et al., 2020). Заедно, овие дејства резултираат со фузија на домаќин-вирусна мембрана и ослободување на RNA геномот во цитоплазмата на клетката домаќин.

SARS-CoV-2 антигените исто така дејствуваат на макрофагите, што пак може да произведе низа провоспалителни цитокини, вклучувајќи: IL-1, IL-4, IL-6, IL-2 и TNF- α (G. Li et al., 2020). Во некои случаи, овие цитокини пролиферираат засилено, неурамнотежено и разорно проинфламаторно реагирање кај домаќинот.

Се покажа дека SARS-CoV-2 влегува во клетката домаќин со ендоцитоза. За време на ендоцитозата, вирионот е опкружен со клеточната мембрана и се интернализира (вовлекува) преку формирање на цитоплазматски везикули наречени „ендосоми“ (Fehr & Perlman, 2015). Потребна е ендозомална киселина за да се добие ефикасна инфекција на клетките-домаќини. Улогата на ендоцитозата сè уште не е разјаснета во SARS-CoV-2 инфекција. По ослободувањето на вирусната РНК во цитоплазмата домаќин, транслационата машинерија на домаќинот се користи за транслација на есенцијалните вирусни полипротеини и

вирусни протеази. Овие вирусни протеази се одговорни за протеолизата на полипротеините во ефекторни протеини.

1.2.1. Репликација на SARS-CoV-2 и имунолошки одговор

За вирусна репликација е потребен „комплекс за репликација-транскрипција“ кој се состои од голем број компоненти, вклучително и вирусна РНК-зависна РНК полимераза (RdRp) и хеликаза (Fehr & Perlman, 2015).

Координиран, контролиран и избалансиран одговор на цитокините е од суштинско значење за имуниот одговор на домаќинот на SARS-CoV-2. Сепак, тешките случаи на КОВИД-19 покажуваат одржливо намалување на CD4+ и CD8+ Т-клетките и зголемување на воспалителни цитокини, вклучително и IL-6, што може да предизвика цитокинска бура. Блокирање на патот на трансдукција на сигналот на IL-6 со употреба на моноклонални антитела (mAbs) против рецепторот на IL-6 (IL-6R) е еден од терапевтските пристапи кај КОВИД-19.

Во моментот има многу ограничено познавање на имунолошкиот одговор на домаќинот на SARS-CoV-2. Сепак, врз основа на насобраните клинички и експериментални податоци како и податоците за однесувањето на претходните вируси, може да се направат предвидувања за тоа како имунолошкиот систем домаќин може да се справи со овој вирус и како вирусот може да избегне вакви одговори на домаќинот (Prompetchara et al., 2020).

Индукцијата на IFN-одговор од типот I е од суштинско значење за ограничување на ширењето на вирусот во рамките на домаќинот за време на раните фази на болеста. Интерферонот IFN тип I посредува во директни антивирусни ефекти, кои ја ограничуваат репликацијата на вирусите и ги модулираат вродените и адаптивни имунолошки одговори. Многу вируси, вклучително и SARS-CoV развија повеќе стратегии за да избегнат антивирусен одговор оркестриран според IFN тип I (Kindler et al., 2016). Нарушената регулација на IFN како одговор на домаќинот, предизвикана директно со вирус или со други индиректни средства, може да предизвика неурамнотежено производство на

провоспалителни цитокини и инфилтрација на воспалителни клетки, што доведува до потешка форма на КОВИД-19.

Имунопатологијата на КОВИД-19 во голема мера наликува на онаа што се гледа кај инфекции со САРС. Неодамнешните студии откриле дека зголемените нивоа на цитокини (на пр. IL-6, IL-10 и TNF- α) и лимфопенијата (значително намалени CD4+ и CD8+ Т-клетки) корелираат со сериозноста на болеста на КОВИД-19 (G. Chen et al., 2020). Покрај намалениот број на Т-клетки, карактеристично е дека преживеаните Т-клетки изгледаат нефункционални (Diao et al., 2020). Во потешките случаи на КОВИД-19, овој нерегулиран имунолошки одговор може да доведе до цитокинска бура, предизвикувајќи зголемена пулмонална патологија и респираторен дистрес и поголем ризик од лоши клинички резултати. Затоа, третманот само со антивирусни агенси може да не е доволен за да се запре уништувачката бура со цитокини и пулмоналното уништување кај овие пациенти. Така, понатамошните студии за развој на подобро разбирање за тоа како вирусот е препознаен од домаќинот и кои вирусни фактори ја поттикнуваат имунолошката дерегулација во КОВИД-19, ќе обезбедат основни согледувања за да помогнат во справување со вирусот.

1.3. КОВИД-19 и витамин Д

Кај пациентите болни од КОВИД-19 клиничката слика варира од асимптоматска до сериозно заболување, клиничка состојба со синдром на дисфункција на повеќе органи. Дури и кај пациенти од иста возрасна група без никакви коморбидитети, има голема варијација во нивната клиничка манифестација.

Од досегашните студии може да се заклучи дека само 10-15% од случаите развиваат сериозна клиничка слика со синдром на дисфункција на повеќе органи и респираторна инсуфициенција која наложува поставување на пациентите на механичка вентилација. Покрај синдромот на дисфункција, дополнителен проблем претставуваат бактериската суперинфекција, сепсата и септичниот шок, кои претставуваат сериозни состојби што се манифестираат кај болните од КОВИД-

19. Сепсата како посебен медицински ентитет претставува состојба на неконтролиран инфламаторен одговор. Иако бактериската инфекција е доминантна причина за синдромот на сепса, вирусните инфекции исто така може да предизвикаат сепса.

Бидејќи протоколот за лекување на КОВИД-19 релативно често се менува, лекарите се принудени да користат широка палета на лекови и суплементи, сè со цел да се олесни состојбата на најтешко болните од КОВИД-19. Неодамнешните податоци говорат за антивирусното дејство на витаминот Д, кој директно ја попречува вирусната репликација, а исто така има и антивоспалителен и имуномодулаторен ефект (Teunoori-Rad et al., 2019). Во рамките на оваа студија ние ја истраживме токму поврзаноста помеѓу концентрациите на витамин Д и воспалителните маркери кај асимптоматски и тешки случаи на КОВИД-19. Достапните податоци укажуваат дека прекумерната реакција на имунолошкиот систем е главниот процес што доведува до т.н. „цитокинска бура“, која се смета за главен фактор во катастрофалната инсуфициенција на органите и смрт кај дел од пациентите со КОВИД-19. Улогата на витаминот Д во контекст на вирусните инфекции е исто така поддржана од наодите за одредени варијанти на генот на рецепторот на витамин Д (VDR), кои се поврзани со зголемена подложност на респираторни инфекции. Истражувањата за статусот на витаминот Д и полиморфизмите на VDR може да придонесат за објаснување на „необичното однесување“ на SARS-CoV-2 и огромната разновидност на клинички презентации и исходи кај КОВИД-19 (Jakovac, 2020).

Се чини дека SARS-CoV-2 првично користи механизми за затајување на имунитетот, што кај некои пациенти е следено со имунолошка хипер-реакција и цитокинска бура, како заеднички патоген механизам со синдромот на акутна респираторна болест (ARDS) и синдромот на системски инфламаторен одговор (SIRS), без оглед на етиолошкиот фактор. Во таа смисла, заштитниот ефект на витаминот Д е прикажан во многу состојби поврзани со пневмонија, хиперпродукција на цитокини и ARDS (Jakovac, 2020). Неколкуче цитокини како тумор некротичниот фактор- α (TNF- α), IL-8, IL-12 и IL-6 играат важна улога во

патогената каскада на болеста, а најважниот медијатор на оваа бура е IL-6 (Magro, 2020; Nile et al., 2020).

Хиповитаминозата Д има влијание кај различни воспалителни, заразни и автоимуни болести, а неодамнешните докази сугерираат дека таа може да претставува фактор на ризик и кај тековната пандемија на КОВИД-19. Всушност, исходот на КОВИД-19 се чини дека е под влијание на статусот на витамин Д кај населението. Неколку студии јасно покажаа дека $1,25(\text{OH})_2$ активниот метаболит на витаминот Д, покрај неговата класична функција во коскената хомеостаза зависна од калциум, исто така е активно вклучен и во регулирањето на вродениот и адаптивниот имунолошки одговор. Особено, тој игра клучна улога во контролата на цитокинската бура, т.е. ненадејното акутно зголемување на циркулирачките нивоа на различни проинфламаторни цитокини, индуцирано во неколку воспалителни состојби, а исто така и кај КОВИД-19. Оваа активност на витаминот Д се спроведува со инхибиција на производството на проинфламаторните цитокини, како што се TNF- α и IFN- γ , но и со зголемување на експресијата на антиинфламаторниот цитокин IL-10. Покрај тоа, витаминот Д го подобрува производството на специфични антимицробни пептиди кај неколку инфекции. Понатамошна важна карактеристика на витаминот Д е неговиот капацитет да го намали ризикот од вирусни инфекции, одржувајќи го интегритетот на епителот со зголемена регулација на гените кои ги кодираат потребните протеини за клеточните спојки. Ќе бидат потребни дополнителни студии за да се разјасни дали овие ефекти би можеле да се пројават и против SARS-CoV-2, доделувајќи му на витаминот Д заштитна улога против КОВИД-19. Врз основа на овие размислувања, меѓуиндивидуалната варијабилност во циркулирачките нивоа на $25(\text{OH})\text{D}$, биомаркерот за статусот на витамин Д, би можела да претставува биолошка основа за различната сериозност на белодробното воспаление и вирусната патогеност кај индивидуи со КОВИД-19. Поддршка на важната заштитна улога на витаминот Д во појавата на КОВИД-19 се забележаните негативни корелации помеѓу просечните нивоа на витамин Д во европските земји и бројот на случаи на КОВИД-19. Освен тоа, стапката на смртност се зголемува со возраста и

со присуството на коморбидитети и двете поврзани со намалени нивоа на витамин Д.

1.3.1. Цитокини

Цитокините се протеини со мала молекуларна тежина кои дејствуваат како посредници во имунолошкиот систем. Цитокининските молекули се врзуваат за рецепторите на површината на клетките, активирајќи механизми на клеточна пролиферација, диференцијација, активација, инхибиција и апоптоза.

Цитокините кои ги лачат лимфоцитите се нарекуваат лимфокини, додека пак моноцитните и макрофагните цитокини се нарекуваат монокини.

Лимфокините се познати и како интерлеукини кои имаат улога на гласници помеѓу имунокомпетентните клетки, учествуваат во одредувањето на типот, интензитетот и брзината на имунолошкиот одговор. Во зависност од односот помеѓу клетката која го лачи цитокинет и клетките на кои истиот дејствува, самиот цитокин може да се опише како паракрин и аутокрин. Ако цитокинет дејствува на клетките кои го излучуваат, ефектот се дефинира како аутокрин. Доколку дејствува на други клетки во непосредната околина, ефектот се дефинира како паракрин. Сите овие особини ги прават цитокините исклучителни и единствени регулаторни фактори на многу биолошки функции, како што се: имунолошката реакција, инфламацијата, хематопоезата, растот, обновувањето, апоптозата, диференцијацијата, пролиферацијата, инхибицијата и активацијата на клетките.

1.3.2. Интерлеукин 6

Интерлеукинет 6 (IL-6) е протеин изграден од 184 аминокиселински остатоци и по својата структура е доста сличен на леукемија инхибитор факторот (LIF), онкостатинот-М (OSM) и IL-11. Рецепторот на IL-6 е трансмембрански гликопротеин, кој го експресираат голем број на клетки. IL-6 стимулира пролиферација на В-лимфоцитите и нивно созревање во плазма клетки, како и продукција на антитела. Диференцијацијата на клетките од миелоидната лоза е

скоро невозможна без IL-6. Поради својата улога во инфламаторната каскада и способноста за стимулација на хепатоцитната продукција и секреција на протеински медијатори на воспалителната реакција, наречен е и фактор на хепатоцитна стимулација. IL-6 не поттикнува секреција на цитокини, но ја зголемува осетливоста на имунокомпетентните клетки на цитокини и најверојатно дејствува на бројот и афинитетот на цитокинските рецептори. Продукцијата и секрецијата на IL-6 секогаш се зголемува во акутната фаза на воспалението. IL-6 се излучува од разни клетки како што се В- и Т-лимфоцитите, моноцитите, макрофагите, дендритичните клетки, стромалните клетки, како и од многу нелимфоцитни клетки, вклучувајќи ги тука фибробластите и ендотелните клетки (Jones & Jenkins, 2018). IL-1 β и TNF- α се клучните активатори за лачење на IL-6 (Hunter & Jones, 2015).

Целиот спектар на различни дејствувања на IL-6 на разни клетки, јасно укажува на големата активност и важност на овој цитокин во регулацијата на имунолошкиот одговор и воспалителните реакции.

Цитокинска бура е процес во кој имунолошкиот систем реагира со прекумерно размножување на клетките на имунолошкиот систем што лачат цитокини, што пак ги активира новите клетки на имунолошкиот систем. Цитокинската бура е критична состојба опасна по живот, која бара прием на интензивна нега и има доста висока смртност. Таа се карактеризира со клиничка презентација на огромно системско воспаление, хиперферитинемија, хемодинамска нестабилност и повеќеорганска инсуфициенција, а доколку не се лекува доведува до смрт. Активирањето на цитокинската бура е неконтролиран имунолошки одговор, што резултира со континуирано активирање и пролиферација на имуните клетки, лимфоцити и макрофаги, кои произведуваат огромни количини на цитокини.

Клиничките наоди на цитокинската бура се припишуваат на дејството на проинфламаторните цитокини како IL-1, IL-6, IL-18, IFN- γ и TNF- α (Shimizu, 2019). Во отсуство на итна и соодветна терапевтска интервенција, пациентите развиваат акутен респираторен дистрес синдром, како резултат на акутно оштетување на

белите дробови проследено со повеќеорганска инсуфициенција. Оттука, цитокинската бура треба веднаш да се третира, инаку може да дојде до смрт (Ragab et al., 2020). Покрај антивирусните терапии кои можат директно да го таргетираат вирусот, се предлагаат антиинфламаторни терапии кои ги намалуваат реакциите на цитокините за да го намалат и морбидитетот и морталитетот кај пациентите со КОВИД-19. Терапевтските пристапи за управување со цитокинската бура КОВИД-19 може да обезбедат вистински пат за намалување на морбидитетот и морталитетот поврзан со КОВИД-19 и тоа е во фокусот на многу студии.

Витамином Д го инхибира стекнатиот, адаптивниот имунолошки систем, а му помага на вродениот имунитет односно го балансира имунолошкиот и антиинфламаторниот одговор (Баеке et al., 2010). Ова е од големо значење поради тоа што една од најзначајните манифестации на тешки форми на инфекција од SARS-CoV-2 е лимфопенијата (Tian & Rong, 2020).

Лимфопенијата е истакнат дел од SARS-CoV-2 инфекцијата и бројот на лимфоцити може да биде корисен за предвидување на сериозноста на болеста и клиничкиот исход. Цитотоксичните лимфоцити, како што се цитотоксичните Т-лимфоцити и природни клетки убијци (НК), се неопходни за контрола на вирусната инфекција, а функционалното трошење на цитотоксични лимфоцити е во корелација со прогресијата на болеста (Zhang et al., 2019). Сепак, дали цитотоксичните лимфоцити кај пациенти заразени со SARS-CoV-2 се трошат функционално, сè уште доволно не е објаснето.

Забележано е дека вкупниот број на клетки убијци (НК) и CD8+ Т-клетки е значително намален кај пациенти со SARS-CoV-2 инфекција. Функцијата на НК и CD8+ Т-клетките е исцрпена со зголемениот израз на рецепторите NKG2A кај пациенти со КОВИД-19. NKG2A е семејство на рецептори од типот Ц, кои се позиционирани претежно на површината на НК-клетките и подмножеството на CD8+ Т-лимфоцити и пренесуваат инхибиторен сигнал. Како резултат на тоа, активирањето на НК-клетките е потиснато. Важно е дека кај пациенти кои закрепнуваат по терапијата, бројот на НК- и CD8+ Т-клетки е обновен преку

намален израз на NKG2A. Овие резултати сугерираат дека функционалното исцрпување на цитотоксични лимфоцити е поврзано со инфекција со SARS-CoV-2. Оттука, инфекцијата со SARS-CoV-2 може да влијае на антивирусниот имунитет во рана фаза. Истражувањата потврдија дека факторот на некроза на туморот (TNF- α), интерлеукин 6 (IL-6) и други провоспалителни цитокини може да предизвикаат дефицит на лимфоцити (Halim et al., 2022; Liu et al., 2021).

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

Можните интеракции помеѓу вирусните инфекции и витаминот Д се чини дека се посложени отколку што се сметаше претходно. Неодамнешните откритија укажуваат на комплексна интеракција помеѓу вирусните инфекции и витаминот Д, вклучувајќи функционални имунорегулаторни карактеристики, интеракција со клеточни и вирусни фактори, поттикнување на автофагија и апоптоза и генетски и епигенетски промени (Teunmoori-Rad et al., 2019). Согласно на ова, во рандомизирани контролирани испитувања се потврди дека суплементацијата со витамин Д значително го намалува ризикот од инфекции на респираторниот тракт (Autier et al., 2017; Rejnmark et al., 2017). Друга студија пак вклучува 25 рандомизирани контролирани испитувања, со вкупно 10.933 учесници од 14 различни држави и покажува корисни ефекти од суплементацијата со витамин Д, кој придонесува за намалување на ризикот од најмалку една акутна инфекција на респираторниот тракт (Martineau et al., 2017).

Суплементацијата со витамин Д исто така е поврзана со зголемена антиоксидантна заштита. Зголеменото производство на глутатион го штеди витаминот Ц, кој има потенцијални антимицробни влијанија (Colunga Biancatelli et al., 2020; Lei et al., 2017; Mousavi et al., 2019).

Надополнувањето со витамин Д со дози од 3000-4000 ИЕ дневно е безбедно и препорачливо кај возрасни (Bischoff-Ferrari et al., 2010; Vieth et al., 2004). Секако, одговорот од дополнителна суплементација со витамин Д во голема мера варира меѓу поединци поради разликите во биолошките варијабели како што се етничката припадност, возраста, времетраењето на изложеност,

сезонските варијации, индексот на телесната маса, внесувањето на одредени лекови, основната концентрација на витаминот Д, генетиката и видот на додатоци од витамин Д (Fabbri et al., 2020; Mazahery & von Hurst, 2015).

Освен тоа, откриено е дека витаминот Д ја модулира реакцијата на макрофагите, спречувајќи ги да ослободат премногу воспалителни цитокини и хемокини (Helming et al., 2005). Опишано е исто така дека недостатокот на витамин Д ја нарушува способноста на макрофагите да созреат и да произведат површински антигени специфични за нив. Исто така оневозможени се да ја произведат лизозомната кисела фосфатаза и да ја спроведат нивната основна антимикуробна функција (Abu-Amer & Bar-Shavit, 1993).

Други истражувања се фокусирани на улогата на витаминот Д кај пациенти со КОВИД-19. Така на пример, Biesalski ја потенцира многузначајната врска на витаминот Д и коморбидитетите кај пациенти со КОВИД-19 (Biesalski, 2020). Laird и соработниците во својата студија заклучија дека оптимизирањето на концентрацијата на витамин Д во серум претставува сигурна придобивка во лекувањето на КОВИД-19 (Laird et al., 2020). Ретроспективна студија во САД вклучи голем број на случаи кои покажаа дека географската ширина, сончевата светлина и витаминот Д како индикатор, евентуално може да имаат поврзаност со помал ризик од заболување од КОВИД-19 и со морталитетот (Y. Li et al., 2020).

Врз основа на сите овие податоци од литературата, ние поставивме хипотеза дека постои поврзаност помеѓу воспалителниот одговор и нивото на витамин Д на самиот почеток на болеста и дека нивото на витамин Д на самиот почеток на болеста би можело да претставува прогностички параметар кај пациенти со КОВИД-19.

2.1. Циркулирачки ензими кај пациенти со КОВИД-19

Докажано е дека вирусот влијае на повеќе органи и системи, како што се срцето, бубрезите, црниот дроб, нервниот систем и крвните садови. Пациентите со дијабет, хипертензија, карцином, кардиопатија, нефропатија и заболувања на

црниот дроб се со поголем ризик да развијат тешка форма на болеста. Вкупната стапка на смртност кај КОВИД-19 е повисока кај постарите пациенти (Wu & McGoogan, 2020).

Кај висок процент од пациентите инфицирани со SARS-CoV-2 се јавува оштетување на црниот дроб, што е особено изразено кај оние со претходни црнодробни заболувања (Pawlotsky, 2020). Оштетувањата на хепаталната функција главно се карактеризираат со акутно зголемување на нивото на аланин аминотрансфераза (ALT), аспартат аминотрансфераза (AST) и γ -глутамил транспептидаза (GGT). Сепак, можните механизми сè уште се нејасни и може да се припишат на нарушувања на имунолошкиот систем, директна цитотоксичност, оштетувања на црниот дроб, предизвикани од бројните хепатотоксични лекови (антипиретици, антибиотици, антивирусни лекови и стероиди) или пак реактивирање на веќе постоечко заболување на црниот дроб (Y. Wang et al., 2020). Истражувањата сугерираат дека постои корелација помеѓу сериозноста на вирусната инфекција и степенот на оштетување на црниот дроб, а со тоа и покачувањето на хепаталните ензими. GGT како хепатален маркер може да е покачен уште при приемот на пациентите и да се зголеми на многу повисоко ниво за време на хоспитализацијата, додека зголемување на алкалната фосфатаза (ALP) не е забележано.

Лактат дехидрогеназата (LDH) е ензим вклучен во генерирањето на енергија преку катализирање на реверзибилната реакција на претворање на лактат во пируват. Присутна е во скоро сите телесни клетки, со највисоки нивоа во срцето, црниот дроб, белите дробови, мускулите, бубрезите и крвните клетки. Циркулирачката LDH претставува општ индикатор за акутно или хронично оштетување на ткивото и се смета за воспалителен маркер. Познато е дека LDH е зголемена при акутно и сериозно оштетување на белите дробови. Кај пациенти со КОВИД-19, LDH и Ц-реактивниот протеин (CRP) може да претставуваат одраз на степенот на оштетување на белите дробови.

Компјутерската томографија (КТ) на градниот кош има клучна улога во дијагностицирањето и проценката на сериозноста на зафатеноста на белите

дробови со пневмонија кај КОВИД-19 (Pan et al., 2020). КТ протоколите се користат за проценка на пулмоналното оштетување (Chung et al., 2020), а наодите од КТ се корисни за да се предвиди понатамошниот исход и текот на болеста (Colombi et al., 2020). Но, за жал КТ-скенирањето не е достапно во сите оддели за итни случаи и тријажни центри. Во таков случај вредностите на LDH и CRP може да бидат корисни за рано идентификување на пациенти со висок ризик за акутна респираторна инсуфициенција. Пациентите со високи вредности на LDH и CRP, дури и ако не се жалат на диспнеја или пак имаат само низок степен на респираторна инсуфициенција, може да имаат корист од брза хоспитализација, рано набљудување и правилен и навремен третман, што потенцијално води кон добар исход од лекувањето.

Циркулирачката креатин киназа (СК) претставува маркер што укажува на оштетување на мускулите и е потенцијално поврзана со потешка форма на КОВИД-19. Новиот коронавирус може да предизвика вирусен миозитис, како што беше забележано претходно и кај други коронавирусни инфекции. Познато е дека SARS-CoV-2 го користи ангиотензин-конвертирачкиот ензим 2 (ACE2) како рецептор за да влезе во човечките респираторни клетки и да предизвика инфекција. Поради присуството на ACE2 во разни ткива, вклучително и мускулите, можно е вирусот директно да ги напаѓа скелетните мускули преку истиот пат. Затоа е веродостојно да се предложи следење на СК кај пациенти со КОВИД-19, особено кога тие се жалат на мускулна болка и слабост (Rivas-García et al., 2020). Дали зголемувањето на нивото на циркулирачката СК е предизвикано од вирусен миозитис, имунолошка хиперактивација, токсичен ефект на цитокини или други механизми, тоа е предмет на понатамошни истражувања. Сепак, поради ниската сензитивност, овој параметар не може да се користи како самостоен маркер, туку треба да се комбинира со други параметри за да може да се даде мислење и проценка за текот на болеста.

Срцевите биомаркери се супстанции што се ослободуваат во крвта кога миокардната клетка е оштетена или под стрес и можат да бидат корисни при рано предвидување или дијагностицирање на болеста (Halushka et al., 2019). СК-МВ, еден од трите изоензими на СК, е присутен во високи концентрации во миокардот,

иако може да се открие и во мозокот и скелетните мускули. Ослободувањето на СК-МВ во циркулацијата и последователното зголемување на неговата активност во серумот долги години се користи за да се дијагностицира миокардна некроза и нејзините клинички манифестации, на пример миокарден инфаркт, но поврзан со почувствителни и специфични биомаркери како што е тропонинот. Овие параметри беа воведени во клиничката пракса при дијагностика и третман на КОВИД-19. Повисоките вредности на СК-МВ во серумот се значително поврзани со полош клинички статус и намалено преживување кај пациенти со КОВИД-19.

2.2. Воспалителни биомаркери кај пациенти со КОВИД-19

Клиничките докази и податоците од литературата покажуваат дека голем број пациенти со КОВИД-19 развиваат абнормален инфламаторен одговор кон вирусната инфекција, што кај дел од нив може да доведе до мултиорганска инсуфициенција и фатален исход. Кај инфекцијата со SARS-CoV-2 се дефинирани две фази што меѓусебно се преклопуваат и тоа: прва фаза која се карактеризира со висока репликативна активност на вирусот и втора фаза која е проследена со несоодветен имунолошки одговор на домаќинот (Siddiqi & Mehra, 2020).

Во врска со сериозноста на клиничката слика и прогнозата на исходот од болеста, се разликуваат три клинички фази. Фазата I е дефинирана со благи неодредени симптоми, како што се миалгија, сува кашлица, главоболка и субфебрилна состојба, без никакви лабораториски и радиолошки абнормалности. Фазата II се карактеризира со кашлица, висока температура, диспнеја, абнормална торакална RTG снимка, лимфопенија и зголемено ниво на воспалителни маркери. Конечно, третата фаза се одликува со клинички манифестации на тежок системски воспалителен синдром, што кулминира со тешка респираторна инсуфициенција со неповолна прогноза (Romagnoli et al., 2020). Во текот на оваа последна фаза на болеста, вредностите на неколку воспалителни маркери се екстремно покачени, што е проследено со ослободување на голема количина на воспалителни медијатори и појава на синдром на цитокинска бура (Ye et al., 2020).

Клиничките студии покажуваат дека променетите нивоа на некои крвни маркери се тесно поврзани со сериозноста на клиничката слика и степенот на смртност кај пациенти со КОВИД-19 (Tan et al., 2020). Покрај класичните параметри: број на леукоцити (white blood cells - WBC) и брзина на седиментација на еритроцити (Se), параметрите коишто најчесто се користат за следење на воспалителниот процес и еволуцијата на сепса се: лактат дехидрогеназа (LDH), Ц-реактивен протеин (CRP), прокалцитонин (PCT) и од неодамна интерлеукин 6 (IL-6) и феритин (FER).

Серумскиот CRP е важен воспалителен маркер којшто значително се покачува кај пациенти со потешка клиничка слика на КОВИД-19. CRP е протеин синтетизиран во црниот дроб, чие квантифицирање во серум има широка примена во клиничката пракса како ран маркер на инфекција и воспаление. Во крвта нормалната концентрација на CRP е помала од 10 mg/L, но бргу се зголемува во рок од 6 до 8 часа и достигнува врв во рок од 48 часа од почетокот на воспалението (Young et al., 1991). Неговиот полуживот е околу 19 часа, па поради тоа неговата концентрација бргу се намалува кога ќе завршат воспалителните фази и пациентот ќе почне да заздравува. CRP има способност да се врзе за фосфохолинот којшто е високо изразен на површината на оштетените клетки. Ова поврзување го активира класичниот пат на комплементот и ја модулира фагоцитната активност за да се елиминираат патогените микроорганизми и оштетените клетки.

IL-6 претставува еден од главните медијатори на инфламаторниот и имунолошкиот одговор инициран од инфекција или повреда и е клучен за контрола на вирусни инфекции (Velazquez-Salinas et al., 2019), вклучително и инфлуенца H1N1 (Dienz et al., 2012). Од сите цитокини кои можат да претставуваат селективни терапевтски цели, IL-6 се смета за особено важен во третманот на КОВИД-19 (Tanaka et al., 2016). Зголемени вредности на IL-6 се регистрирани кај повеќе од една половина од пациентите со КОВИД-19 (Zhang et al., 2020). Се смета дека нивото на IL-6 е поврзано со степенот на инфламаторен одговор, респираторна инсуфициенција, потребата од механичка вентилација или интубација и смртност кај пациенти со КОВИД-19.

Што се однесува пак до серумското железо и феритинот, податоците од литературата покажуваат дека при инфекција и инфламација метаболизмот на железото претрпува значителни модификации, што има своја клиничка примена при предвидување на смртноста кај пациенти со КОВИД-19. Се смета дека феритинот е еден од клучните медијатори на имунолошката дерегулација, особено при екстремна хиперферитинемија, преку директни имunosупресивни и провоспалителни ефекти, придонесувајќи за појава на цитокинска бура (Vargas-Vargas & Cortés-Rojo, 2020).

Имајќи ги предвид сите овие податоци од литературата, целта на нашето истражување беше да се определат и анализираат вредностите на гореспоменатите инфламаторни биомаркери при првиот преглед кај пациенти со различна клиничка манифестација на КОВИД-19 и да се изврши проценка на клиничкото значење на овие параметри, заедно со циркулирачките ензими и серумските концентрации на витаминот Д при поставување на дијагнозата и за прогноза на текот на болеста.

3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Основната цел на оваа докторска дисертација беше да се изврши анализа на концентрациите на витаминот Д кај пациенти со КОВИД-19, паралелно со вредностите на циркулирачките ензими AST, ALT, GGT, LDH, CK и CK-MB, вредностите на инфламаторните биомаркери, Ц-реактивен протеин (CRP) и интерлеукин 6 (IL-6), бројот на леукоцити (white blood cells - WBC), брзината на седиментација на еритроцити (Se), феритинот (FER) и серумското железо (iron - IRN), зависно од тежината на клиничката слика.

Во рамките на оваа примарна цел, ги дефиниравме и следните специфични цели:

- ▶ Да ја анализираме меѓусебната зависност, односно степенот на корелација помеѓу испитуваните параметри, зависно од тежината на клиничката слика кај пациентите со КОВИД-19;
- ▶ Да ја анализираме половата разлика во однос на испитуваните параметри, исто така зависно од тежината на клиничката слика кај пациентите со КОВИД-19;
- ▶ Преку рано идентификување на факторите на ризик за прогресија кон тешка клиничка слика или смрт да дадеме придонес кон одлуките за третман на пациентите со КОВИД-19.

4. МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

За изработка на оваа докторска теза се анализирани податоци од прецизно селектирани пациенти со КОВИД-19, при прв преглед, потврдени со позитивен PCR-тест. Пациентите се избрани по претходно утврдени критериуми и поделени во две групи. Кај сите пациенти се анализирани следните клиничко-биохемиски параметри: витамин Д, AST, ALT, GGT, LDH, СК и СК-МВ, CRP, IL-6, WBC, Se, FER и IRN.

4.1. Пациенти

Оваа студија е дизајнирана како ретроспективна опсервациска студија. Студијата е започната по одобрувањето од страна на Етичката комисија при Јавната здравствена установа - Градска општа болница „8-ми Септември“ – Скопје, која во пикот на пандемијата беше преименувана во главен Ковид центар за територијата на цела Република Северна Македонија, организирана со Тријажен центар и околу 400-450 болнички кревети исполнети само од болни од КОВИД-19.

Период којшто е опфатен во оваа студија е септември – декември 2020 година.

Услови за влез во студијата се следните: мажи и жени на возраст од 25 до 66 год., без претходни заболувања, при прв преглед со потврдена дијагноза на КОВИД-19. Сите случаи беа пријавени за амбулантски преглед и лекување на Инфективната амбуланта и Тријажниот центар во болницата. Лесните случаи беа следени и лекувани преку дневна болница, а тешките случаи беа хоспитализирани во болницата на одделите за лекување од КОВИД-19.

Пациентите вклучени во студијата се поделени во две групи:

А група - асимптоматски и лесни случаи на пациенти со КОВИД-19;

Б група – средно-тешки и тешки случаи на пациенти со КОВИД-19, на кои им беше потребно сместување во болничка установа.

Критериуми за исклучување од студијата се следните: пациенти со хронична опструктивна белодробна болест (ХОББ), пациенти со хронична бубрежна болест на дијализа, пациенти со дијабет, бремени жени и пациенти со карцином.

Кај секој пациент е направен рутински преглед со мерење на виталните параметри (телесна температура, кислородна сатурација, срцев ритам, крвен притисок) и земање на материјал за крвни анализи (Se, комплетна крвна слика, стандардни биохемиски анализи, определување на серумскиот интерлеукин 6, феритин, CRP и витамин Д). Направена е и рендген-снимка на бели дробови и срце со цел да се утврди дали е присутна бронхопневмонија.

4.2. Методологија

За крвните анализи беше земена една серумска епрувета и една епрувета со EDTA за комплетна крвна слика. Вкупната потребна количина на крв за изработка на овие анализи беше не повеќе од 10mL. Крвните примероци за анализа се прецизно собрани и навреме донесени во лабораторијата за обработка.

Анализите се изработени на претходно калибрирани и контролирани апарати со користење на дневни и месечни контроли. Користени се внатрешни и надворешни контроли од производителот Bio-Rad.

Анализите се изработуваа на Siemens апарати и тоа:

- ❖ Автоматизиран биохемиски анализатор Dimension RxL – спектрофотометриски методи;
- ❖ Имунолошки анализатори Advia Centaur XP и Immulite 2000 XPi, каде што се применети CLIA метод, односно хемилуминисценција и директна хемилуминисценција со помош на магнетни партикули;
- ❖ Хематолошки анализатор 5 diff. Advia 2120i со комплетна диференцијална крвна слика;
- ❖ Автоматизиран нефелометриски систем BN ProSpec System каде што се работи со нефелометриски метод;
- ❖ Брзината на седиментација на еритроцити беше определувана со автоматизиран анализатор ALIFAX.

На автоматизираниот биохемиски анализатор Dimension RxL се изработуваа сите биохемиски параметри и тоа: AST, ALT, GGT, LDH, CK, CK-MB и серумското железо (iron - IRN).

На имунолошкиот анализатор Advia Centaur XP се определија вредностите на витаминот Д.

На имунолошкиот анализатор Immulite 2000 Xpi се добија вредностите на инфламаторниот биомаркер интерлеукин 6 (IL-6).

Автоматизираниот нефелометриски систем BN ProSpec System ги обработи серумите за да се добијат вредностите на Ц-реактивен протеин (CRP) и феритинот (FER).

На хематолошкиот анализатор 5 diff. Advia 2120i се изработи комплетната диференцијална крвна слика, заедно со бројот на леукоцити (white blood cells - WBC).

Брзината на седиментација на еритроцити (Se), беше определувана со помош на автоматизиран анализатор ALIFAX.

4.3. Статистичка обработка на податоците

За статистичка обработка на резултатите е користена програмата SPSS, при што се анализирани следните параметри:

- ❖ Параметри на дескриптивна статистика:
 - Средна вредност;
 - Стандардна грешка;
 - 95% интервал на доверба за средната вредност;
 - Стандардна девијација;
 - Минимална вредност;
 - Максимална вредност.
- ❖ Анализа на дистрибуција:
 - Kolmogorov-Smirnov тест;
 - Shapiro-Wilk тест.
- ❖ Анализа на сигнификантност:
 - Mann-Whitney U тест.
- ❖ Анализа на корелација:
 - Spearman-ов коефициент на корелација.

Сите податоци и добиени резултати се претставени во табели и во графичка форма.

5. РЕЗУЛТАТИ

Оваа студија е дизајнирана како ретроспективна опсервациска студија и беше започната по одобрувањето од страна на Етичката комисија при Јавната здравствена установа - Градска општа болница „8-ми Септември“ – Скопје. Студијата вклучува вкупно 115 пациенти поделени во две групи:

А група - асимптоматски и лесни случаи на пациенти со КОВИД-19,

N=55 (36 мажи и 19 жени; средна возраст: 53.3 ± 1.4 год.);

Б група – средно-тешки и тешки случаи на пациенти со КОВИД-19 на кои им беше потребно сместување во болничка установа,

N=60 (38 мажи и 22 жени; средна возраст: 56.1 ± 1.3 год.).

Сите пациенти имаа позитивен PCR-тест за SARS-CoV-2 и беа пријавени за прв преглед на Тријажниот центар и Инфективната амбуланта во болницата. Тешките случаи понатаму беа хоспитализирани на одделите за лекување од КОВИД-19. Студијата е изработена во периодот септември - декември 2020 година, кога циркулираше основниот сој на SARS-CoV-2. Потребните крвни примероци за анализа беа земени при првиот преглед на пациентите на Тријажниот центар и Инфективната амбуланта со потврдена дијагноза на КОВИД-19 преку позитивен PCR-тест.

Сите податоци од оваа студија се анализирани со соодветни статистички методи и соодветно се претставени и компарирани. Групите од пациенти А и Б беа составени од полнолетни односно возрасни пациенти, кои во тој прв бран на КОВИД-19 впрочем беа најмногу засегнати, а тоа беа пациенти кои ги исполнуваа условите за влез во оваа опсервациска студија.

Најпрвин пациентите ги поделивме по пол и возраст и ги анализиравме и претставиме вредностите поврзани со овие параметри. Потребно беше да се утврди дали со статистичката обработка на податоците ќе воочиме разлика во однос на возраста кај двете групи пациенти (Табела 1).

Табела 1. Пол и возраст на пациентите кои се вклучени во студијата

Table 1. Sex and age of the patients included in the study

Група	Дескриптивна статистика – возраст и пол			
	N	мажи/жени	возраст (год.)	min - max
А група	55	36/19	53.1 ± 1.4	29 - 66
Б група	60	38/22	56.1 ± 1.3	26 - 66

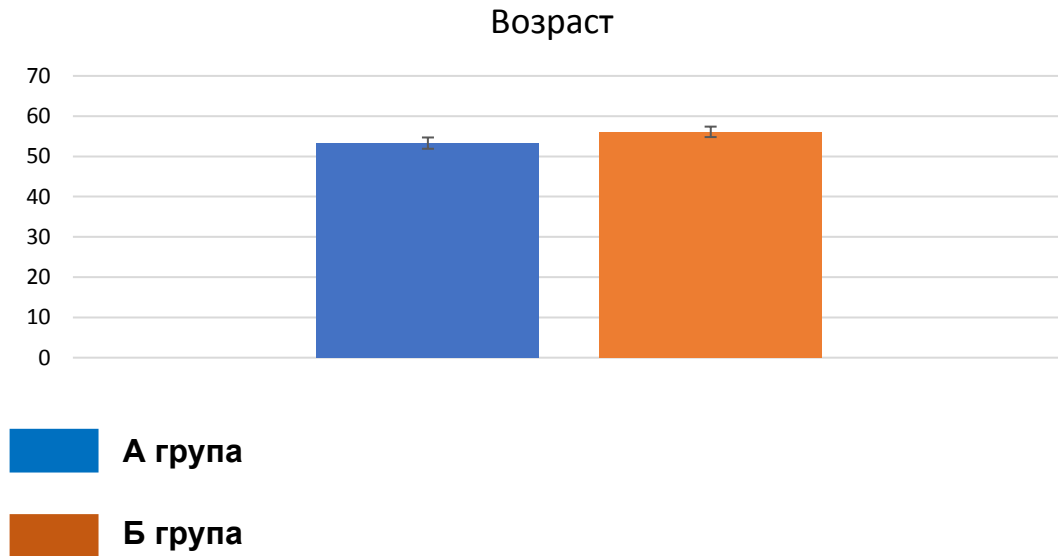
А група - асимптоматски и лесни случаи на пациенти со КОВИД-19;

Б група – средно-тешки и тешки случаи на пациенти со КОВИД-19 на кои им беше потребно сместување во болничка установа.

Вредностите за возраста на пациентите се прикажани како средна вредност ± стандардна грешка.

Понатаму, статистичката обработка на податоците покажа дека двете групи пациенти не се разликуваат сигнификантно во однос на возраста. Ова е особено значаен податок поради тоа што на тој начин е исклучено влијанието на возраста врз останатите испитувани параметри и исходот од болеста.

Овие резултати се прикажани на Слика 4, каде што јасно се гледа дека имаме отсуство на статистичка сигнификантност во однос на возраста.



Слика 4. Анализа на статистичка сигнификантност – возраст кај пациентите со КОВИД-19

Figure 4. Analysis of statistical significance – age in the patients with COVID-19

А група - асимптоматски и лесни случаи на пациенти со КОВИД-19;

Б група – средно-тешки и тешки случаи на пациенти со КОВИД-19 на кои им беше потребно сместување во болничка установа.

Вредностите за возраста на пациентите се прикажани како средна вредност ± стандардна грешка.

Статистичката сигнификантност е анализирана со Mann-Whitney U-тест.

Понатаму, направена е статистичка обработка на добиените резултати од двете групи на пациенти со анализа на параметри од дескриптивната статистика, и тоа: средна вредност, стандардна грешка, 95% интервал на доверба за средната вредност и стандардна девијација. Во продолжение, е даден табеларен приказ на резултатите од дескриптивната статистика за сите испитувани параметри, вклучително и за циркулирачките ензими, воспалителните биомаркери

и витаминот Д како важни параметри во следењето на состојбата на пациентите заболени од КОВИД-19, зависно од тежината на клиничката слика.

Табела 2. Брзина на седиментација на еритроцити, WBC, циркулирачки ензими и возраст кај пациенти со КОВИД-19 од А група (асимптоматски и лесни случаи)

Table 2. Erythrocyte sedimentation rate, WBC, circulating enzymes and age in patients with COVID-19 from Group A (asymptomatic and with mild symptoms)

	Средна вредност	Стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност	Стандардна девијација
Возраст (год.)	53.3	1.4	50.5 - 56.1	10.3
Седиментација** (mm/h)	27.0	1.9	23.3 - 30.8	13.9
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	6.9	0.3	6.2 - 7.5	2.3
AST (U/L)	40.7	3.5	33.7 - 47.6	25.7
ALT (U/L)	62.3	7.4	47.4 - 77.2	55.1
LDH (U/L)	332.0	23.2	285.6 - 378.4	171.7
GGT (U/L)	49.4	4.6	40.2 - 58.6	33.9
CK (U/L)	179.5	55.5	68.2 - 290.8	411.6
CK-MB** (U/L)	19.7	1.0	17.7 - 21.7	7.5

** Параметри каде што е застапена нормална распределба

Кај А групата, од сите параметри прикажани во Табела 2, нормална распределба имаме само кај параметрите Se и CK-MB.

Следно ги анализиравме податоците од воспалителните биомаркери и витаминот Д кај пациентите од А група.

Табела 3. Воспалителни биомаркери и витамин Д кај пациенти со КОВИД-19 од А група (асимптоматски и лесни случаи).

Table 3. Inflammatory biomarkers and vitamin D in patients with COVID-19 from Group A (asymptomatic and with mild symptoms).

	Средна вредност	Стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност	Стандардна девијација
IRN ($\mu\text{mol/L}$)	7.1	0.7	5.7 - 8.4	4.9
Ferritin ($\mu\text{g/L}$)	424.8	43.5	337.5 - 512.1	322.8
CRP (mg/dL)	37.8	4.8	28.2 - 47.4	35.5
IL-6 (pg/mL)	16.3	2.4	11.4 - 21.1	18.0
Vit. D** (nmol/L)	61.5	1.9	57.7 - 65.2	14.0

** Параметри каде што е застапена нормална распределба

Кај А групата, од сите параметри прикажани во Табела 3, нормална распределба имаме кај витаминот Д.

На сличен начин како што се прикажани податоците од дескриптивната статистика за пациентите од А група во табелите 2 и 3, следува табеларен приказ на податоците за пациентите од Б група (Табела 4 и Табела 5).

Табела 4. Брзина на седиментација на еритроцити, WBC, циркулирачки ензими и возраст кај пациенти со КОВИД-19 од Б група (средно-тешки и тешки случаи на кои им беше потребно сместување во болничка установа)

Table 4. Erythrocyte sedimentation rate, WBC, circulating enzymes and age in patients with COVID-19 from Group B (moderate and severe cases in need for hospitalization)

	Средна вредност	Стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност	Стандардна девијација
Возраст (год.)	56.1	1.3	53.5 - 58.7	9.9
Седиментација (mm/h)	36.5	2.6	31.3 - 41.7	20.1
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8.2	0.5	7.2 - 9.1	3.6
AST (U/L)	54.5	3.8	46.9 - 62.1	29.4
ALT (U/L)	63.9	7.4	49.0 - 78.8	57.7
LDH (U/L)	439.0	23.6	391.9 - 486.2	182.4
GGT (U/L)	97.6	13.0	71.7 - 123.6	100.5
CK (U/L)	214.0	33.9	146.3 - 281.8	262.2
CK MB (U/L)	22.6	1.4	19.8 - 25.3	10.6

Кај Б групата, кај ниту еден од параметрите прикажани во Табела 4 не е присутна нормална распределба.

Табела 5. Воспалителни биомаркери и витамин Д кај пациенти со КОВИД-19 од Б група (средно-тешки и тешки случаи на кои им беше потребно сместување во болничка установа)

Table 5. Inflammatory biomarkers and vitamin D in patients with COVID-19 from Group B (moderate and severe cases in need for hospitalization)

	Средна вредност	Стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност	Стандардна девијација
IRN ($\mu\text{mol/L}$)	5.1	0.4	4.3 - 6.0	3.2
Ferritin ($\mu\text{g/L}$)	904.9	129.3	646.2 - 1163.6	1001.5
CRP (mg/dL)	100.3	7.4	85.5 - 115.2	57.4
IL-6 (pg/mL)	71.8	11.5	48.8 - 94.9	89.1
Vit. D** (nmol/L)	32.2	1.4	29.5 - 34.9	10.5

** Параметри каде што е застапена нормална распределба

Во рамките на Б групата, нормална распределба имаме само кај витаминот Д.

Пациентите кои при првиот преглед имаат значително покачени вредности на циркулирачките ензими имаат зголемен ризик од развој на потешка форма на болеста, следена со зголемено ниво на воспалителните маркери и потенцијално фатален исход.

Поради тоа, со следната анализа на податоците ќе ја утврдиме статистичката сигнификантност во однос на сите испитувани параметри кај пациентите со КОВИД-19. Имено, ги анализиравме средните вредности на параметрите за пациентите од Б група во однос на А група, преку анализа на статистичката сигнификантност со примена на Mann-Whitney U-тест. Овие податоци се прикажани во Табела 6 и Табела 7.

Табела 6. Статистичка сигнификантност на вредностите за циркулирачките ензими и возраста кај пациенти со КОВИД-19

Table 6. Statistical significance of the values of circulating enzymes and the age in patients with COVID-19

	А група		Б група	
	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средна вредност	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средна вредност
Возраст (г.)	53.3 ± 1.4	50.5 – 56.1	56.1 ± 1.3 ns	53.5 – 58.7
AST (U/L)	40.7 ± 3.5	33.7 - 47.6	54.5 ± 3.8*	45.1 – 64.7
ALT (U/L)	62.3 ± 704	47.4 – 77.2	63.9 ± 7.4 ns	49.0 – 78.8
LDH (U/L)	332.0 ± 23.2	285.6– 378.4	439.0 ± 23.6**	391.9 –486.2
GGT (U/L)	49.4 ± 4.6	40.2 – 58.6	97.6± 13.0*	71.7 – 123.6
СК (U/L)	179.5 ± 55.5	68.2 – 290.8	214.0± 33.9 ns	146.3 – 281.8
СК-МВ (U/L)	19.7 ± 1.2	17.2 – 21.7	22.6 ± 1.4 ns	19.8 – 25.3

А група - асимптоматски и лесни случаи на пациенти со КОВИД-19

Б група – средно-тешки и тешки случаи на пациенти со КОВИД-19 на кои им беше потребно сместување во болничка установа

** $p < 0.001$; * $p < 0.01$; ns - несигнификантно, споредено со А група

Средните вредности на AST, ALT и GGT беа повисоки кај пациентите од Б група во однос на А група, при што разликата беше статистички сигнификантна за AST и GGT ($p < 0.01$).

Средните вредности на СК и СК-МВ беа повисоки кај пациентите од Б група, но без статистичка сигнификантност.

Висока статистичка сигнификантност е регистрирана кај LDH, која беше значајно повисока кај пациентите од Б група споредено со А група ($p < 0.001$).

Сите овие резултати се прикажани во Табела 6.

Нашите резултати покажаа дека генерално, пациентите кои ќе развијат средно-тешка и тешка клиничка слика, при прв преглед имаат сигнификантно повисоки вредности за дел од циркулирачките ензими во однос на асимптоматските и лесните случаи. Со изработка на овие рутински анализи на серумски ензими кај пациенти со КОВИД-19 може да се проценат и понатаму да се следат оштетувањата на белите дробови, црниот дроб, мускулите и другите ткива и органи, сè до откажување на одделни органи и затајување на цели органски системи, или пак враќање на вредностите во нормала и целосно излекување. Од резултатите од оваа студија, поткрепени со достапните податоци од литературата, може да се заклучи дека циркулирачките ензими AST, ALT, GGT, LDH, СК и СК-МВ претставуваат прогностички фактори за исходот на болеста кај пациенти со КОВИД-19. Од клиничка перспектива, овие наоди можат да помогнат во раната тријажа на пациентите, но исто така и за следење на оштетувањето на белите дробови, црниот дроб и другите ткива и органи, како и за внимателна употреба на лекови кои можат да предизвикаат токсичност на црниот дроб кај пациенти со КОВИД-19.

Табела 7. Статистичка сигнификантност на вредностите за витамин Д, селектирани воспалителни биомаркери и сродни параметри кај пациенти со КОВИД-19

Table 7. Statistical significance of the values of vitamin D, selected inflammatory biomarkers and related parameters in patients with COVID-19

	А група		Б група	
	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност
Se (mm/h)	27.0 ± 1.9	23.3 - 30.8	36.5 ± 2.6**	31.3 - 41.7
WBC (x10⁹)	6.9 ± 0.3	6.2 - 7.5	8.2 ± 0.5 ns (p=0.051)	7.2 - 9.1
CRP (mg/L)	37.8 ± 4.8	28.2 - 47.4	100.3 ± 7.4***	85.5 - 115.2
IL-6 (pg/mL)	16.3 ± 2.4	11.4 - 21.1	71.8 ± 11.5***	48.8 - 94.9
FER (µg/L)	424.8 ± 43.5	337.5 - 512.1	904.9 ± 129.3**	646.2 - 1163.6
IRN (µmol/L)	7.1 ± 0.7	5.7 - 8.4	5.1 ± 0.4*	4.3 - 6.0
Vit. D (nmol/L)	61.6 ± 1.9	57.7 – 65.2	32.2 ± 1.4***	29.5 – 34.9

А група - асимптоматски и лесни случаи на пациенти со КОВИД-19

Б група - средно тешки и тешки случаи на пациенти со КОВИД-19 на кои им беше потребно сместување во болничка установа

***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05; ns - несигнификантно, споредено со А група

Статистичката обработка на податоците покажа дека средните вредности на Se, WBC, CRP, IL-6 и FER беа повисоки кај пациентите од Б група во однос на А група.

Изразито висока статистичка сигнификантност беше регистрирана кај параметрите CRP и IL-6 ($p < 0.001$), додека висока статистичка сигнификантност беше регистрирана кај параметрите Se и FER ($p < 0.01$).

Средната вредност на WBC беше повисока кај пациентите од Б група, но со гранична вредност на статистичката сигнификантност ($p = 0.051$).

Вредноста на IRN беше сигнификантно пониска кај пациентите од Б група споредено со А група ($p < 0.05$).

Кај витаминот Д со статистичка обработка на податоците се покажа дека средната вредност кај пациентите од Б група е пониска во однос на А група, со изразито висока статистичка сигнификантност ($p < 0.001$).

Сите овие резултати се прикажани во Табела 7.

Резултатите од ова истражување покажуваат дека евалуацијата на воспалителните биомаркери претставува достапна и практична алатка за проценка на сериозноста на болеста кај пациенти со КОВИД-19, а понатаму и за проценка на одговорот кон терапијата и крајниот исход на болеста. Дисбалансот на хомеостазата на железото е поврзан со ткивно оштетување и нарушена имунолошка функција на домаќинот и од тој аспект серумското железо и феритинот претставуваат параметри коишто имаат значајна улога во дијагностиката и следењето на пациентите со КОВИД-19.

Понатаму, наша следна цел беше да ги определиме коефициентите на корелација помеѓу сите испитувани параметри, посебно кај секоја од двете групи пациенти. За таа цел, со помош на статистичката програма SPSS пресметавме Spearman-ов коефициент на корелација, а добиените резултати ги прикажавме табеларно.

Во следните три табели се презентирани резултатите за А група.

Табела 8. Коефициенти на корелација помеѓу испитуваните циркулирачки ензими и возраст кај пациентите со КОВИД-19, А група - асимптоматски и лесни случаи

Table 8. Correlation coefficients between analyzed circulating enzymes and the age in patients with COVID-19 from Group A (asymptomatic and with mild symptoms)

А група							
	Возраст	AST	ALT	LDH	CK	CK-MB	GGT
Возраст	---	0.104	-0.144	0.141	0.050	0.068	0.042
AST		---	0.664**	0.500**	0.120	0.163	0.492**
ALT			---	0.302*	-0.134	0.030	0.674**
LDH				---	0.202	0.424**	0.391**
CK					---	0.472**	-0.337*
CK-MB						---	-0.025
GGT							---

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Табела 9. Коефициенти на корелација помеѓу испитуваните воспалителни биомаркери и сродни параметри кај пациентите со КОВИД-19, А група - асимптоматски и лесни случаи

Table 9. Correlation coefficients between analyzed inflammatory biomarkers and related parameters in patients with COVID-19 from Group A (asymptomatic and with mild symptoms)

А група							
	WBC	Se	IRN	CRP	FER	IL-6	Vit. D
WBC	---	0.132	0.088	0.196	0.047	-0.014	-0.154
Se		---	-0.016	0.180	-0.171	-0.002	0.095
IRN			---	-0.380**	-0.124	-0.424**	-0.084
CRP				---	0.216	0.525**	-0.046
FER					---	0.045	-0.014
IL-6						---	0.095
Vit. D							-----

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Табела 10. Коефициенти на корелација помеѓу испитуваните циркулирачки ензими и возраст кај пациентите со КОВИД-19 и воспалителни биомаркери и сродни параметри, А група - асимптоматски и лесни случаи

Table 10. Correlation coefficients between analyzed circulating enzymes and the age in patients with COVID-19 and the inflammatory biomarkers and related parameters, Group A - asymptomatic and with mild symptoms

А група							
	WBC	Se	IRN	CRP	FER	IL-6	Vit. D
Возраст	0.193	0.021	-0.086	0.017	-0.098	0.305*	-0.043
AST	0.147	0.134	-0.156	0.281*	0.354**	0.249	-0.059
ALT	0.235	0.039	0.045	0.026	0.353**	-0.149	-0.085
LDH	0.226	-0.001	-0.133	0.381**	0.529**	0.102	-0.142
CK	-0.211	-0.062	-0.289*	0.278*	0.209	0.314*	0.114
CK-MB	0.109	0.024	-0.395**	0.220	0.247	0.241	0.023
GGT	0.439**	0.108	0.132	0.043	0.395**	-0.154	-0.251

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Резултатите од анализата на корелација кај пациентите од А група од нашето истражување покажаа позитивни и статистички сигнификантни коефициенти на корелација помеѓу AST, ALT, LDH и GGT.

Исто така, регистрирана е изразито висока и статистички сигнификантна корелација помеѓу LDH и CK-MB кај пациентите од А група.

Статистичката обработка на податоците од истражувањето покажа дека кај железото имаме негативна корелација со CRP и IL-6. Изразено висока позитивна корелација е присутна помеѓу CRP и IL-6 кај пациентите од А група.

Понатаму, од податоците презентирани во Табела 10, може да се забележи дека е присутен висок степен на позитивна корелација помеѓу CRP и LDH ($p < 0.01$). Статистичката сигнификантност на корелацијата на CRP со останатите циркулирачки ензими како AST и CK е нешто пониска и изнесува $p < 0.05$.

Од Табела 10 се гледа исто така дека феритинот позитивно корелира со повеќето циркулирачки ензими како AST, ALT, LDH и GGT, каде што имаме $p < 0.01$.

Кај железото е присутна негативна корелација со CK и CK-MB.

Понатаму, продолживме со анализа на корелациите помеѓу испитуваните параметри кај пациентите од Б група, а резултатите се презентирани во следните три табели.

Табела 11. Коефициенти на корелација помеѓу испитуваните циркулирачки ензими и возраст кај пациентите со КОВИД-19, Б група – средно-тешки и тешки случаи на кои им беше потребно сместување во болничка установа

Table 11. Correlation coefficients between analyzed circulating enzymes and the age in patients with COVID-19 from Group B (moderate and severe cases in need for hospitalization)

Б група							
	Возраст	AST	ALT	LDH	CK	CK-MB	GGT
Возраст	---	0.170	-0.104	0.114	0.007	-0.022	-0.009
AST		---	0.754**	0.432**	0.180	0.273*	0.516**
ALT			---	0.184	0.064	-0.159	0.522**
LDH				---	0.293*	0.288*	0.142
CK					---	0.668**	0.081
CK-MB						---	0.098
GGT							----

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Табела 12. Коефициенти на корелација помеѓу испитуваните воспалителни биомаркери и сродни параметри кај пациентите со КОВИД-19, Б група – средно-тешки и тешки случаи на кои им беше потребно сместување во болничка установа

Table 12. Correlation coefficients between analyzed inflammatory biomarkers and related parameters in patients with COVID-19 from Group B (moderate and severe cases in need for hospitalization)

Б група							
	WBC	Se	IRN	CRP	FER	IL-6	Vit. D
WBC	---	0.156	0.184	0.240	0.236	0.244	0.135
Se		---	0.052	0.217	0.055	0.179	0.193
IRN			---	0.018	0.213	-0.025	-0.072
CRP				---	0.026	0.259*	0.019
FER					---	-0.146	0.041
IL-6						---	0.066
Vit. D							----

* $p < 0.05$

Табела 13. Коефициенти на корелација помеѓу испитуваните циркулирачки ензими и возраст кај пациентите со КОВИД-19 и воспалителни биомаркери и сродни параметри, Б група – средно-тешки и тешки случаи на кои им беше потребно сместување во болничка установа

Table 13. Correlation coefficients between analyzed circulating enzymes and the age in patients with COVID-19 and the inflammatory biomarkers and related parameters, Group B (moderate and severe cases in need for hospitalization)

Б група							
	WBC	Se	IRN	CRP	FER	IL-6	Vit. D
Возраст	0.127	0.111	0.170	-0.088	0.475**	0.132	0.099
AST	-0.213	0.077	0.131	-0.018	0.257*	-0.103	-0.091
ALT	-0.261*	0.056	0.123	0.060	0.169	-0.202	-0.005
LDH	0.133	0.143	0.045	0.139	0.369**	0.042	-0.180
CK	0.008	-0.063	-0.202	0.034	0.321*	-0.027	-0.184
CK-MB	-0.099	-0.076	-0.027	-0.007	0.151	-0.114	-0.267*
GGT	-0.126	0.045	0.226	-0.183	0.233	-0.166	-0.070

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Слично како кај пациентите од А група и кај пациентите од Б група беа забележани позитивни коефициенти на корелација помеѓу AST, ALT, LDH и GGT, при што AST и ALT значително и статистички сигнификантно корелираат со GGT ($p < 0.01$). Исто така присутна е позитивна корелација на LDH со СК и СК-МВ ($p < 0.05$), додека СК корелира со и СК-МВ кај пациентите од Б група.

Во однос на воспалителните маркери, резултатите од статистичката анализа за пациентите од Б група ја потврдија позитивната корелација помеѓу CRP и IL-6, што беше забележано и кај пациентите од А група.

Претходно прикажаните резултати од нашите статистички пресметки во рамките на оваа студија (Табела 7 и Табела 9) покажаа дека вредностите на феритин се сигнификантно повисоки кај пациентите од Б група и дека серумското железо покажува сигнификантна инверзна корелација со CRP и IL-6 кај А група. Меѓутоа, ваква корелација не беше регистрирана кај Б група, најверојатно поради драматичната клиничка слика кај овие пациенти и прилично големите интер-индивидуални разлики. Дисбалансот на хомеостазата на железото е поврзан со ткивно оштетување и нарушена имунолошка функција на домаќинот, така што веројатно е дека нарушената хомеостаза на железото не е само „пасивен случаен минувач“, туку има важна улога во самиот тек на болеста. Од тука, серумското железо и феритинот претставуваат параметри коишто имаат значајна улога во дијагностиката и следењето на текот на болеста кај пациентите со КОВИД-19.

Од Табела 13 можеме да забележиме дека е присутна значајна позитивна корелација ($p < 0.01$) помеѓу феритинот и LDH кај пациентите од Б група. Нешто помала позитивна корелација и со понизок степен на сигнификантност е нотирана за FER со AST и СК ($p < 0.05$).

Сигнификантна негативна корелација е присутна помеѓу витаминот Д и СК-МВ кај оваа група на пациенти ($p < 0.05$).

Неодамнешните научни сознанија укажуваат на постоење на комплексна интеракција помеѓу вирусните инфекции и витаминот Д.

Речиси од самиот почеток на пандемијата, витаминот Д беше издвоен како многу значаен во лекувањето на КОВИД-19 и е еден од факторите кои можат да влијаат на текот и сериозноста на болеста. Недостатокот на витамин Д е многу повеќе присутен кај пациенти со тежок облик на КОВИД-19 за кои е потребна итна хоспитализација, бидејќи кај нив е забележан многу висок процент на смртност. При тоа, ниските серумските концентрации на витамин Д биле директно поврзани со проинфламаторните цитокини, IL-6, зголемено ниво на CRP, како и зголемен ризик за пневмонија и акутен респираторен дистрес синдром.

Паралелно со овие искуства, во првиот налет на пандемијата беше регистрирана и значајна полова разлика во однос на морбидитетот и морталитетот од КОВИД-19, којашто сè уште не е добро објаснета.

Во контекст на сите овие сознанија и искуства, ние во нашето истражување покажавме дека концентрацијата на витаминот Д е сигнификантно пониска кај пациентите со средно-тешка и тешка клиничка слика (Табела 7), што е во согласност со податоците од литературата.

Но, потоа логично си го поставивме прашањето: Дали полот има влијание врз вредностите на анализираните параметри?

За таа цел, со примена на Mann-Whitney U-тестот, ја анализиравме статистичката сигнификантност за сите испитувани параметри во однос на полот, и тоа посебно за пациентите од А група, посебно за Б група. Резултатите од овие анализи се прикажани во табелите што следат и тоа: во Табела 14 и Табела 15 за пациентите од А група, а во Табела 16 и Табела 17 за пациентите од Б група.

Табела 14. Статистичка сигнификантност на вредностите за циркулирачките ензими и возраста кај пациенти со КОВИД-19, мажи и жени од А група - асимптоматски и лесни случаи

Table 14. Statistical significance of the values of circulating enzymes and the age in patients with COVID-19, men and women from Group A - asymptomatic and with mild symptoms

	Мажи		Жени	
	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средна вредност	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средна вредност
Возраст (г.)	52.5 ± 1.8	49.0 – 56.1	54.8 ± 2.3 ns	50.0 – 59.6
AST (U/L)	45.1 ± 5.0	35.0 – 55.2	32.3 ± 2.7 ns	26.6 – 37.9
ALT (U/L)	71.6 ± 10.7	49.8 – 93.4	44.5 ± 5.3 ns	33.4 – 55.7
LDH (U/L)	334.7 ± 29.2	275.4 – 394.0	327.0 ± 38.9 ns	245.3 – 408.6
GGT (U/L)	53.6 ± 6.3	40.8 – 66.4	41.5 ± 5.4 ns	30.2 – 52.8
СК (U/L)	226.6 ± 83.8	56.4 – 396.8	90.3 ± 13.3 ns	62.3 – 118.3
СК-МВ (U/L)	19.7 ± 1.2	17.2 – 22.2	19.6 ± 1.8 ns	15.8 – 23.4

ns - несигнификантно, во однос на пациентите од машки пол

Табела 15. Статистичка сигнификантност на вредностите за витамин Д, селектирани воспалителни биомаркери и сродни параметри кај пациенти со КОВИД-19, мажи и жени од А група - асимптоматски и лесни случаи

Table 15. Statistical significance of the values of vitamin D, selected inflammatory biomarkers and related parameters in patients with COVID-19, men and women from Group A - asymptomatic and with mild symptoms

	Мажи		Жени	
	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност
Se (mm/h)	25.1 ± 2.0	21.0 – 29.3	30.6 ± 3.7 ns	22.8 – 38.5
WBC (x10 ⁹)	6.7 ± 0.4	6.0 – 7.5	7.1 ± 0.6 ns	5.8 – 8.4
CRP (mg/L)	39.1 ± 5.9	27.1 – 51.1	35.3 ± 8.4 ns	17.7 – 52.9
IL-6 (pg/mL)	17.8 ± 3.3	11.0 – 24.5	13.5 ± 3.1 ns	7.1 – 19.9
FER (µg/L)	518.1 ± 54.5	407.5 – 628.7	248.0 ± 53.5**	135.5 – 360.4
IRN (µmol/L)	7.7 ± 0.9	5.9 – 9.5	5.8 ± 0.9	3.9 – 7.8
Vit. D (nmol/L)	61.6 ± 2.2	57.2 – 66.0	61.3 ± 3.7	53.4 – 69.1

** $p < 0.01$; ns - несигнификантно, во однос на пациентите од машки пол

Од резултатите прикажани во Табела 14 и Табела 15 се гледа дека кај пациентите од А група, сигнификантна полова разлика е присутна само кај феритинот ($p < 0.01$). Кај останатите параметри не е забележана сигнификантност. Освен тоа, се забележува дека кај пациентите од А група нема речиси никаква разлика во однос на концентрацијата на витаминот Д помеѓу двата пола, односно и мажите и жените на почетокот на болеста имаат речиси идентични серумски концентрации на витамин Д.

Табела 16. Статистичка сигнификантност на вредностите за циркулирачките ензими и возраста кај пациенти со КОВИД-19, мажи и жени од Б група – средно-тешки и тешки случаи на кои им беше потребно сместување во болничка установа

Table 16. Statistical significance of the values of circulating enzymes and the age in patients with COVID-19, men and women from Group B (moderate and severe cases in need for hospitalization)

	Мажи		Жени	
	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средна вредност	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средна вредност
Возраст (г.)	57.8 ± 1.4	55.1 – 60.6	53.1 ± 2.5 ns	47.8 – 58.3
AST (U/L)	54.9 ± 4.8	45.1 – 64.7	54.0 ± 6.3 ns	40.9 – 67.0
ALT (U/L)	68.5 ± 10.0	48.3 – 88.6	56.1 ± 10.9 ns	33.5 – 78.7
LDH (U/L)	449.7 ± 34.9	378.9 – 520.5	420.6 ± 22.6 ns	373.7 – 467.5
GGT (U/L)	101.6 ± 15.5	70.1 – 133.0	90.8 ± 23.5 ns	41.9 – 139.7
СК (U/L)	220.4 ± 42.1	135.2 – 305.6	203.1 ± 58.2 ns	82.0 – 324.1
СК-МВ (U/L)	22.4 ± 1.8	18.8 – 26.0	22.8 ± 2.2 ns	18.2 – 27.4

ns - несигнификантно, во однос на пациентите од машки пол

Табела 17. Статистичка сигнификантност на вредностите за витамин Д, селектирани воспалителни биомаркери и сродни параметри кај пациенти со КОВИД-19, мажи и жени од Б група – средно-тешки и тешки случаи на кои им беше потребно сместување во болничка установа

Table 17. Statistical significance of the values of vitamin D, selected inflammatory biomarkers and related parameters in patients with COVID-19, men and women from Group B (moderate and severe cases in need for hospitalization)

	Мажи		Жени	
	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност	Средна вредност ± стандардна грешка	95% интервал на доверба за средната вредност
Se (mm/h)	37.8 ± 3.3	31.2 – 44.5	34.2 ± 4.3 ns	25.3 – 43.1
WBC (x10 ⁹)	8.3 ± 0.6	7.1 – 9.5	7.9 ± 0.7 ns	6.4 – 9.4
CRP (mg/L)	93.4 ± 7.9	77.5 – 109.3	112.3 ± 14.9 ns	81.3 – 143.3
IL-6 (pg/mL)	65.8 ± 11.8	41.9 – 89.6	82.3 ± 24.2 ns	32.1 – 132.6
FER (µg/L)	969.2 ± 132.8	700.0 – 1238.3	794.0 ± 271.0*	230.3 – 1357.6
IRN (µmol/L)	5.3 ± 0.5	4.3 – 6.4	4.8 ± 0.7 ns	3.3 – 6.3
Vit. D (nmol/L)	35.8 ± 1.7	32.4 – 39.2	26.0 ± 1.7 ***	22.5 – 29.4

*** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; ns - несигнификантно, во однос на пациентите од машки пол

Од резултатите прикажани во Табела 16 и Табела 17 се гледа дека кај пациентите од Б група има присуство на сигнификантна полова разлика повторно кај феритинот ($p < 0.05$), отсуство на сигнификантност кај сите останати параметри, меѓутоа со значителен и особено значаен исклучок кај витаминот Д. Имено, во Б групата, кај пациентите со средно-тешка и тешка клиничка слика на КОВИД-19 на кои им беше потребно сместување во болничка установа, при прв преглед се регистрирани пониски вредности на витаминот Д кај женскиот пол во однос на мажите, со присуство на изразито висока статистичка сигнификантност ($p < 0.001$). Притоа, средните вредности на витаминот Д помеѓу мажите и жените се разликуваат за околу десет единици.

Овој податок за постоење на изразита и статистички сигнификантна полова разлика во однос на серумските концентрации на витамин Д кај Б групата, пациенти со средно-тешка и тешка клиничка слика на КОВИД-19, е од особено значење имајќи предвид дека во почетокот на пандемијата, кога впрочем е реализирано ова истражување, искуствата и литературните податоци укажуваат на помал степен на морбидитет и морталитет кај женската популација. Нашите податоци укажуваат дека во такви услови, развојот на потешка клиничка слика кај жените е асоциран со екстремно ниски серумски концентрации на витамин Д.

Сега, логично е да се постави прашањето дали овие ниски концентрации на витамин Д кај жените би можеле да бидат еден од клучните фактори којшто придонел овие припаднички на женскиот пол да развијат потешка форма на КОВИД-19.

Сепак, за да се утврдат точните механизми и причинско-последични врски на кој начин витаминот Д е поврзан со полот и тежината на клиничката слика кај пациентите со КОВИД-19, неопходно е да се направат дополнителни базични и клинички истражувања.

6. ДИСКУСИЈА

Кај пациентите со инфекција со SARS-CoV-2 честопати се среќаваат компликации како што се пневмонија, респираторна инсуфициенција и акутен респираторен дистрес синдром. Иако патофизиологијата којашто лежи во основата на тешката форма на КОВИД-19 останува недоволно разбрана, акумулираните докази покажуваат дека хиперинфламаторен синдром предизвикува фулминантното и фатално ослободување на цитокини, кои пак се поврзани со сериозноста на болеста и неповолниот краен исход. Тешкотии при дишењето, чувство на притисок на белите дробови, синкава боја на усните и лицето, сето тоа се знаци за тревога и бараат итна медицинска интервенција, предупредува и Американскиот центар за контрола и превенција на болести. Доколку ваквата тешка клиничка слика понатаму прогресира, ситуацијата наложува поставување на пациентите на механичка вентилација.

Податоците од клиничките и базичните биомедицински истражувања ја покажаа поврзаноста помеѓу клиничкиот исход на КОВИД-19 и воспалителните цитокини. Целосната и сеопфатна клиничка проценка фокусирана на имунолошките карактеристики и лабораториските резултати е од фундаментално значење за категоризација на пациентите и соодветен избор на третман. Во таа смисла, разбирањето на вирусната имунопатогенеза може да помогне во справување со тешките компликации и да го овозможи најдобриот можен пристап во управувањето со оваа болест. Хуморалните имунолошки реакции индуцирани од SARS-CoV-2 се брзи и нивната големина, како и кинетиката на временскиот тек корелираат со сериозноста на болеста КОВИД-19 (Carrillo et al., 2021).

Оштетувањето на белите дробови е една од основните причини за морбидитет и морталитет кај пациентите со тешка клиничка слика на КОВИД-19. Исто така, покажано е дека развојот на тешка форма на КОВИД-19 е поверојатен кај постарите лица, односно лица кои имаат намалена имунолошка функција. Кога заштитниот имунолошки одговор на домаќинот е нарушен, вирусот ќе пропагира

во голема мера, предизвикувајќи масовно уништување на ткивата со висока експресија на ангиотензин-конвертирачкиот ензим 2 (ACE2) (Shi et al., 2020).

Белодробното воспаление е во основата на респираторни нарушувања коишто се животозагрозувачки, а се среќаваат претежно кај пациентите од постарата возрасна група со тешка форма на болеста (Xu et al., 2020). Сепак, идентификацијата на имунолошките механизми коишто го одредуваат времетраењето на инфекцијата предизвикана од вирусот, како и тоа дали ќе се развие тешка форма на КОВИД-19 или пак болеста ќе помине полесно, со блага или умерена форма, сè уште е предмет на бројни истражувања.

Освен тоа, забележани се извесни сличности, но и значителни разлики во однос на клиничките карактеристики помеѓу пациенти со полесна и потешка клиничка слика на КОВИД-19 и тоа во прв ред во однос на кинетиката на имунолошкиот одговор и резултатите од лабораториските анализи. Во тој поглед, направена е споредба помеѓу пациенти со КОВИД-19 примени во болница на единицата за интензивна нега, но без потреба од механичка вентилација и пациенти кои се примени на инфективно одделение. Резултатите од ова истражување покажале присуство на повисоки нивоа на специфични цитокини кај пациентите од единицата за интензивна нега, на тој начин согледувајќи дека нивоата на циркулирачки цитокини силно корелираат со сериозноста на болеста (Tahmasebi et al., 2021). Овие согледувања се поткрепени со резултатите за воспалителните маркери од нашето истражување, коишто ги презентираме во рамките на оваа докторска дисертација.

Синдромот на прекумерно ослободување на цитокини или цитокинска бура е комплексен синдром на хиперимун одговор што се детектира преку соодветни лабораториски анализи и е следен со симптоми коишто вклучуваат треска, гадење, главоболка и хипотензија (Stahl et al., 2020). Цитокинската стимулација од инфективни фактори и прекумерниот одговор на цитокините се опишани како двигател на патологијата кај пациентите со тешка клиничка слика на КОВИД-19 во напредната фаза на болеста (Ye et al., 2020). Цитокинскиот профил кај КОВИД-19 вклучува зголемено производство на цитокини, како што се: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7,

IL-8, TNF- α и хемокини, како што се CXCL10 и CCL2, кои претежно превладуваат кај тешките SARS-CoV-2 инфекции (Mehta et al., 2020; Wan et al., 2020). Покрај тешкото оштетување на белодробното ткиво, многу пациенти со тешка форма на КОВИД-19 во доцната фаза исполнуваат неколку критериуми за дијагноза на сепса, вклучувајќи ладни екстремитети и слаби периферни пулсирања, тешка метаболна ацидоза и нарушена функција на црниот дроб и бубрезите (H. Li et al., 2020), како водечка причина за критична форма на болеста (Guan et al., 2020).

Освен тоа, тешката SARS-CoV-2 инфекција се карактеризира и со една силно изразена лимфоцитопенија, што укажува на состојба на имunosупресија. Иако развојот на лимфопенија е главно поврзан со намалувањето на апсолутниот број на Т-клетките, придонесот на Б-лимфоцитите во контекст на пневмонијата кај КОВИД-19 останува контроверзен. Има значителен број на студии кои укажуваат дека апсолутниот број на Б-клетки бил во нормален опсег кај повеќето пациенти за време на текот на болеста КОВИД-19 (J. Liu et al., 2020; Qin et al., 2020). Други извештаи сугерираат намалување на бројот на Б-клетки кај пациенти со КОВИД-19 и дека тешките случаи имаат пониски вредности во однос на лесните случаи (F. Wang et al., 2020), додека апсолутниот број на вкупни лимфоцити е намален кај пациентите со КОВИД-19. Свкупно, постои значителна хетерогеност меѓу пациентите во однос на одговорот на циркулирачките Б-клетки, иако генерално се чини дека и пропорцијата и бројот на Б-клетките најчесто не се намалени (G. Chen et al., 2020).

Исцрпувањето на алвеоларните макрофаги, како ефекторни клетки за пулмоналниот клеточно-посредуван имунитет (Pribul et al., 2008) кај тешко инфицираните бели дробови е веројатно водечка причина за нивната нарушена функција. Истражувањата покажаа дека постои поврзаност помеѓу сериозноста на клиничката слика при инфекција со SARS-CoV-2 и загубата на резидентни алвеоларни макрофаги, придружено со акумулација на воспалителни макрофаги кои потекнуваат од моноцити, што може да предизвика тешка смртоносна пневмонија (Salomé & Magen, 2020). Земени заедно, овие податоци убедливо сугерираат дека прекумерното лачење на проинфламаторни цитокини со потекло

од макрофагите претставува медијатор на имунолошки посредувани негативни ефекти кај пациенти инфицирани со SARS-CoV-2.

Притоа, клучното прашање е: Како да се препознае оваа состојба и рано да се интервенира кај пациентите со КОВИД-19, кај кои постои зголемен ризик од развој на компликации и цитокинска бура? Одговор на ова прашање се резултатите од лабораториските анализи преку кои ги следиме вредностите на воспалителните биомаркери и циркулирачките ензими. Резултатите од овие анализи даваат значајни информации според кои може да се прогнозира каква форма на КОВИД-19 ќе развие пациентот – дали асимптоматска до лесна форма, па болеста ќе ја помине само со домашно лекување, или пак тешка форма на болеста за која ќе биде неопходно сместување во болничка установа. Во овој контекст, значаен е придонесот на нашето истражување, каде што со обработка на добиените податоци од пациентите кои ги исполнија критериумите за влез во студијата, успеавме да ја потенцираме и потврдиме важноста на лабораториските вредности на циркулирачките ензими и воспалителните биомаркери кај пациентите со КОВИД-19.

Тековните податоци укажуваат дека хиперимуната реакција која води до цитокинска бура, клинички специфицирана со лимфопенија, патолошко ткивно оштетување, респираторна инсуфициенција, шок и откажување на органите е причината за овие несакани исходи кај пациентите со КОВИД-19. Со цел да истражиме како да се дојде до подобра клиничка грижа за овие пациенти, нашата студија ги опиша лабораториските манифестации кај овие пациенти при првиот преглед, коишто ќе бидат корисни за прецизно дефинирање на понатамошниот клинички тек и лекувањето. Анализата на лабораториските резултати во нашата студија покажа дека абнормалностите како што се цитопенија, хиперферитинемија, покачени вредности на LDH, CRP, IL-6 и ниско ниво на серумско железо се значително почести кај пациентите со тешка клиничка слика во споредба со оние со полесна клиничка слика или асимптоматски.

Значителното нарушување на заштитниот имунолошки одговор кај пациенти со особено тешка клиничка слика на КОВИД-19 доведува до сериозна

дисфункционална состојба, синдром на значително ослободување на цитокини и појава на сериозно воспаление, што на крај води до мултисистемска инсуфициенција и многу често до фатален исход. При вакви состојби се јавува комплетно нарушување на ензимолошкиот статус и појава на екстремно покачени вредности на циркулирачките ензими. Поконкретно, нашите резултати покажаа дека пациентите кои развиваат средно тешка и тешка клиничка слика, при првиот преглед имаат сигнификантно повисоки средни вредности на црнодробните ензими AST и GGT во однос на пациентите од А група (асимптоматски и лесни случаи). Клиничките податоци покажуваат дека кај пациентите кои развиваат особено тешка клиничка слика на КОВИД-19 се јавуваат бројни компликации, вклучително и оштетување на црниот дроб (An et al., 2021), но исто така и хематолошки, кардиоваскуларни и респираторни нарушувања, секундарни инфекции, нарушувања на белодробната функција и појава на електролитен дисбаланс. Сите овие компликации водат кон фатален исход на КОВИД-19.

Резултатите од нашето истражување покажаа исто така дека пациентите кои развиваат средно тешка и тешка клиничка слика на КОВИД-19 при првиот преглед имаат сигнификантно повисоки средни вредности на LDH во однос на пациентите од А група (асимптоматски и лесни случаи). Абнормалните вредности на LDH не само што можат да резултираат од црнодробно и срцево оштетување, туку можат да предочат оштетувања и на други органи, како и намалена оксигенација. Бидејќи LDH е присутна и во белодробното ткиво, покачените нивоа забележани кај КОВИД-19, но и кај други вирусни респираторни инфекции, може да претставуваат ран показател за степенот на оштетување на белите дробови, што може да влијае и врз крајниот клинички исход (Henry et al., 2020). LDH претставува општ индикатор за акутно или хронично оштетување на ткивата и се смета за воспалителен маркер. Во литературата е опишано дека вредностите на LDH се зголемени при акутно и сериозно оштетување на белите дробови, или кога постојат и други интерстицијални белодробни инфекции (McFadden & Oliphant, 1991). Кај асимптоматските и лесните случаи на КОВИД-19, LDH е незначително покачена и за кратко време после лекувањето вредностите се враќаат во нормала. Од друга страна, кај средно тешките и тешките случаи на КОВИД-19 и

посебно кај хоспитализираните пациенти, вредноста на LDH забележува пораст. Врз основа на вредностите на LDH, може многу рано да се процени ризикот од механичка инвазивна вентилација.

Пациентите со веќе постоечки срцеви заболувања имаат поголем ризик за развој на акутен кардиоваскуларен синдром во рамките на КОВИД-19. Неодамнешните истражувања покажаа дека SARS-CoV-2 може да предизвика акутна болест слична на миокардитис кај инаку здрав пациент (Inciardi et al., 2020). Срцевите биомаркери се силно поврзани со воспалителните маркери, што укажува на тоа дека срцевите биомаркери можат да ја следат севкупната сериозност на болеста и дисфункцијата на повеќе органи и органски системи. Во текот на првата недела по приемот може да послужат како параметри за набљудување и рана интервенција. Значително повисоки нивоа на срцевите биомаркери има кај критично болните пациенти и особено кај оние со фатален исход во споредба со нивоата кај пациентите кои не биле критично болни и успешно закрепнале.

Појавата на пандемијата од КОВИД-19 го преоптовари здравствениот систем во многу земји во светот, но истовремено иницираше бројни клинички студии со цел да се добијат веродостојни податоци за карактеристиките на самата болест и да се воспостават соодветни протоколи за лекување. Постои релативно голема варијабилност на податоците добиени од овие студии, во прв ред поради тоа што резултатите од истражувањата се под влијание на демографските фактори, достапните ресурси на здравствените системи, а исто така влијае и самиот дизајн на студиите. Нашите резултати покажаа дека пациентите кои ќе развијат средно тешка и тешка клиничка слика, при првиот преглед имаат сигнификантно повисоки вредности речиси за сите воспалителни маркери во однос на асимптоматските и лесните случаи. Постојат бројни податоци дека серумските концентрации на CRP се асоцирани со сериозноста на клиничката слика кај пациенти со КОВИД-19, при што зголемените нивоа на CRP се поврзани со прекумерно производство на воспалителни цитокини. Во тој правец и нашите резултати покажуваат дека зголеменото ниво на IL-6 е во тесна врска со сериозноста на клиничката слика и овој параметар особено добро ги

идентификува пациентите кои ќе еволуираат кон потешки форми на КОВИД-19. Од клиничка гледна точка, се смета дека нивоата на IL-6 корелираат со респираторната инсуфициенција, што е во согласност со резултатите од неодамнешните студии. Ова говори дека SARS-CoV-2 активира вродени и адаптивни имунолошки одговори, што резултира со ослободување на IL-6 и други цитокини, зголемена васкуларна пропустливост и респираторна инсуфициенција (Hadjadj et al., 2020). Освен тоа, резултатите од нашето истражување ја потврдија позитивната корелација помеѓу CRP и IL-6, што беше забележано и кај двете групи пациенти.

Железото е микроелемент од суштинско значење за сите живи клетки, бидејќи има клучна улога во бројни метаболни процеси, вклучувајќи синтеза, репарација и транскрипција на ДНК, производство на енергија, транспорт и складирање на кислород и детоксикација на лекови. Феритинот служи за врзување на железото и негово складирање во биолошки достапна форма за виталните клеточни процеси, истовремено штитејќи ги протеините, липидите и нуклеинските киселини од потенцијалната токсичност на слободното железо (Lepanto et al., 2019). Меѓутоа, постојат исто така бројни докази дека воспалителните процеси во организмот предизвикуваат промени во хомеостазата на железото (Kernan & Carcillo, 2017). Овие промени се регистрираат и кај пациенти со КОВИД-19, манифестирани со високи серумски концентрации на феритин (Colafrancesco et al., 2020) и ниски концентрации на серумското железо (Zhao et al., 2020). Статистичката обработка на податоците од нашето истражување покажа дека вредностите на феритин се сигнификантно повисоки кај пациентите од Б група и дека серумското железо покажува сигнификантна инверзна корелација со CRP и IL-6 кај А група. Ваква корелација не е присутна кај Б група, најверојатно поради драматичната клиничка слика кај овие пациенти и прилично големите интер-индивидуални разлики. Овие резултати се во склад со податоците од поновата литература, каде што хиперферитеринемичниот синдром е опишан како една од главните манифестации на тешката форма на КОВИД-19 која може да резултира со фатален исход (Colafrancesco et al., 2020), сугерирајќи ја потребата од

евалуација на нивото на феритин како параметар асоциран со инфекција и инфламација.

Се чини дека SARS-CoV-2 првично користи механизми за затајување на имунитетот, што кај некои пациенти е проследено со имунолошка хиперреакција и цитокинска бура, како заеднички патоген механизам на синдромот на акутна респираторна болест (ARDS) и синдромот на системски инфламаторен одговор (SIRS), без оглед на етиолошкиот фактор. Во таа смисла, заштитниот ефект на витаминот Д е покажан во многу состојби поврзани со пневмонија, хиперпродукција на цитокини и ARDS. Како што претходно беше истакнато, цитокините се протеини кои дејствуваат како посредници во имунолошкиот систем. IL-6 се излучува од различни клетки како што се В- и Т-лимфоцити, моноцити, макрофаги, дендритични клетки, стромални клетки, како и од други видови клетки, вклучувајќи ги тука фибробластите и ендотелните клетки. IL-1 β и TNF- α се клучните активатори за лачење на IL-6. Витаминот Д како докажан имуномодулатор, дејствува на тој начин што го поддржува вродениот имунитет преку производство на неколку антимицробни пептиди (кателицидини, дефенсивини и IL-37). Освен тоа, витаминот Д дејствува и на адаптивниот имунитет со модулирање на главните проинфламаторни цитокини (на пример, IL-6, TNF-алфа и интерферон-гама) и контролирање на одговорот посредуван од Th1 лимфоцитите. Овие регулаторни механизми се очекува да бидат помалку ефикасни во услови на дефицит на витамин Д, но може да се обноват по адекватна суплементација (Chiodini et al., 2021).

Неодамнешните научни сознанија укажуваат на комплексна интеракција помеѓу вирусните инфекции и витаминот Д, вклучувајќи функционални имунорегулаторни карактеристики, интеракција со клеточни и вирусни фактори, поттикнување на автофагија и апоптоза, како и генетски и епигенетски промени. Согласно на ова, во рандомизирани контролирани испитувања се потврди дека суплементацијата со витамин Д значително го намалува ризикот од инфекции на респираторниот тракт (Jolliffe et al., 2021). Суплементацијата со витамин Д со дози од 3000-4000 IЕ дневно е безбедна и препорачлива кај возрасни. Одговорот кон суплементацијата со витамин Д во голема мера варира меѓу поединци поради

разликите во биолошките варијабилности како што се етничката припадност, возраста, времетраењето на изложеност, сезонските варијации, индексот на телесната маса, внесувањето на одредени лекови, основната концентрација на витаминот Д, генетиката и видот на додатоци од витамин Д. Недостатокот на витамин Д погодува речиси 50% од населението ширум светот и се смета за јавно здравствен проблем кој ги погодува не само постарите, туку и луѓето од сите возрасти. Мнозинството од здравите индивидуи имаат ниска концентрација на витамин Д, главно на крајот од зимата поради несоодветна изложеност на сонце. Недостатокот на витамин Д е независен фактор на ризик за вкупната смртност кај општата популација и е поврзан со зголемена подложност кон респираторни инфекции.

Според Ендокриното здружение и Здружението за адолесцентно здравје и медицина ("Recommended vitamin D intake and management of low vitamin D status in adolescents: a position statement of the society for adolescent health and medicine", 2013), усвоени се следните референтни вредности за 25(OH)D:

- ❖ изразен недостаток: $< 50 \text{ nmol/L}$;
- ❖ инсуфициенција: $50\text{-}75 \text{ nmol/L}$;
- ❖ доволност: $\geq 75 \text{ nmol/L}$.

Хиповитаминозата Д е дефинирана како вредности на 25(OH)D $< 75 \text{ nmol/L}$ или (30 ng/mL), а тешкиот дефицит на витамин Д е дефиниран како вредности на 25(OH)D $< 25 \text{ nmol/L}$.

Една експериментална студија која го анализираше антивирусниот потенцијал на различни молекули против SARS-CoV-2 го документираше инхибиторниот ефект на 1,25(OH)₂D, активниот метаболит на витамин Д, врз епителни клетки инфицирани со вирусот (Mok et al., 2020). Освен тоа, има сè поголем број на податоци кои покажуваат поврзаност помеѓу серумскиот 25(OH)D, којшто претставува широко прифатен маркер за статусот на витамин Д во организмот и различните клинички исходи на КОВИД-19, односно сериозноста на клиничката слика и морталитетот, што е презентирano во клинички студии и мета-анализи (Kazemi et al., 2021; Munshi et al., 2021; Pereira et al., 2022). Исто така, беа објавени

и податоци кои укажуваат дури и на праговите од 25(OH)D кои го дефинираат статусот на витамин Д, којшто е најверојатно поврзан со подложноста на инфекција со SARS-CoV-2 и исходот на КОВИД-19 (Diaz-Curiel et al., 2021; Grant et al., 2020).

Со оглед на недостатокот на специфичен третман и сериозното здравствено и економско оптоварување од самата пандемија, од огромно значење беше да се истражат факторите на ризик за пренесување на инфекцијата SARS-CoV-2 и за развој на тешка клиничка слика на КОВИД-19, особено пред имплементацијата на ефикасна стратегија за вакцинација на населението. Исто така, транспарентноста и брзата комуникација на клиничките и научните сознанија беа од голема важност во оваа критична фаза. Во ова сценарио, дефицитот на витамин Д претставува еден значаен фактор на ризик кој може лесно да се модифицира, особено со оглед на релативно ниската цена и безбедноста на суплементацијата. Недостатокот на витамин Д е многу поприсутен кај пациенти со тежок облик на КОВИД-19 за кои е потребна итна хоспитализација (Chiodini et al., 2021). Освен тоа, неодамнешните студии покажаа дека кај пациентите со изразен недостаток на витамин Д се забележува повисоко ниво на клеточни воспалителни маркери и CRP, пневмонија и срцева слабост (Hopefl et al., 2022; Notz et al., 2021; Saxena et al., 2022). Свкупно, пациентите со КОВИД-19 кај кои е регистриран недостаток на витамин Д (вклучувајќи и тежок недостаток), определен при прием во болница, покажале зголемен ризик од респираторен дистрес и смрт од респираторна инсуфициенција или други компликации (Chiodini et al., 2021). Овие опсервации ги потврдивме и ние, со резултатите презентирани во рамките на оваа докторска дисертација. **Овде е од особена важност да се истакне временската рамка на нашето истражување, а тоа е периодот септември – декември 2020 година, кога најголем дел од овие сознанија не беа достапни, туку само можеа да се насетат во клиничката пракса.**

Всушност, витаминот Д (преку неговиот рецептор) може да биде директно вклучен во регулирањето на многу клеточни патишта кои играат улога во прогресијата и сериозноста на инфекцијата со SARS-CoV-2. Ефектите на витаминот Д врз имунолошкиот систем најверојатно ја играат клучната улога

(Kumar et al., 2021). Исто така, регистрирана е директна улога на витаминот Д во заштитата на интегритетот на пулмоналната епителна бариера и фаворизирање на нејзиното заздравување (Hansdottir et al., 2008). Дефицитот на витамин Д е поврзан со зголемен ризик од развој на ARDS и се чини дека неговата корекција може да го намали оштетувањето на алвеоларните капилари кои се најмногу оштетени (Dancer et al., 2015). Конечно, добриот статус на витамин Д може да влијае на протромботичната состојба (Aihara et al., 2004; Ohsawa et al., 2000), намалувајќи го ризикот од белодробна и системска тромбоза кои вообичаено се присутни кај пациентите со тешка форма на КОВИД-19.

Заштитната улога на витаминот Д се чини исто така дека се должи во значителен дел на локалното дејство на активниот метаболит на витамин Д, 1,25(OH)₂D т.е. калцитриол, врз системот ренин-ангиотензин преку директен ефект врз експресијата на ангиотензин-конвертирачкиот ензим (ACE2) (Xu et al., 2017). Ова претставува една особено значајна опсервација поради фактот што ACE2 е идентификуван како функционален рецептор за SARS-CoV-2. Можната улога на генетските варијанти, генската експресија и епигенетските фактори коишто се поврзани со ACE2 и патофизиологијата на КОВИД-19 се предмет на научен интерес. Во овој поглед, варијантите на ACE2 за кои е познато дека се поврзани со хипертензија и други кардиоваскуларни болести, би можеле исто така да бидат одговорни за варијациите во клиничката слика на КОВИД-19 (Patel et al., 2012).

ACE2 е важен регулатор на ренин-ангиотензин системот (RAS). ACE2 е дел од двојниот RAS систем кој се состои од оската ACE-AngII-AT1R и оската ACE2-Ang-(1-7)-Mas. Активираната оска ACE-AngII-AT1R може да доведе до поголем број здравствени проблеми, вклучувајќи проинфламаторни и профибротични ефекти во респираторниот систем, васкуларна дисфункција, миокардна фиброза, нефропатија, како и дефекти во секрецијата на инсулин и зголемена инсулинска резистенција. Се претпоставува дека инфекцијата SARS-CoV-2 ја намалува активноста на ACE2, што резултира со токсична акумулација на AngII, што пак може да предизвика ARDS или фулминантен миокардитис. Активирањето на оската ACE2-Ang-(1-7)-Mas од друга страна, има антиинфламаторно,

антифибротично, антиоксидативно, како и заштитно дејство врз васкуларната функција, миокардна фиброза, нефропатија, панкреатитис и инсулинска резистенција. Така, рамнотежата помеѓу овие две оски, што може да биде под влијание на возраста, полот и етничката припадност, како и индексот на телесна маса може да влијае на одговорот на КОВИД-19 (Hanff et al., 2020).

Особено важно и директно релевантно за предметот на истражување во рамките на оваа докторска дисертација е дека витаминот Д, преку модулирање на ACE2, може да ги ублажи ARDS и акутните повреди на белите дробови, вклучително и оние предизвикани од SARS-CoV-2. Имено, експериментална студија ја покажала заштитната улога на витаминот Д при акутна белодробна повреда преку зголемување на нивото mRNA на *VDR* и *ACE2* (Yang et al., 2016). Значи, витаминот Д како ендокрин модулатор, би можел да предизвика активност на оската ACE2-Ang-(1-7)-Mas и да го инхибира ренинот и оската ACE-AngII-AT1R, а со тоа да демонстрира потенцијална заштитна улога против ARDS.

Има повеќе докази дека полот и половите хормони влијаат врз многу компоненти од циркулирачкиот и ткивниот RAS, вклучително и ACE2. Така на пример, покажано е дека естрогенот го модулира локалниот RAS во атријален миокард изолиран од постари лица, манифестирајќи протективни ефекти, делумно преку зголемување на експресијата на ACE2 (Bukowska et al., 2017). Од друга страна, андрогенот може да ја зголеми експресијата на трансмембранската серин-протеаза 2 (TMPRSS2), што дејствува во правец на фаворизирање на инфекцијата (Pozzilli & Lenzi, 2020). Според тоа, хормоналните и генетските фактори може да доведат до поголема активност на ACE2 кај жените и TMPRSS2 кај мажите, со што барем делумно се објаснува подобриот исход и пониската стапка на смртност кај жени со КОВИД-19. Имено, како што се ширеше пандемијата, разликите во однос на тежината на клиничката слика и смртноста од КОВИД-19 помеѓу машката и женската популација стануваа област на активно истражување. И навистина, бројни студии и анализи покажуваат дека морбидитетот, сериозноста на болеста и смртноста на мажите поради КОВИД-19 биле значително повисоки од оние на жените (Nguyen et al., 2021; Pradhan & Olsson, 2020).

Освен влијанието врз циркулирачкиот и ткивниот RAS (Getachew & Tizabi, 2021), полова разлика постои и во однос на имунолошкиот одговор. Генерално, вродениот и стекнат имунолошки одговор се поефикасни кај жените отколку кај мажите (Klein & Flanagan, 2016), што може да им обезбеди на жените поефикасна одбрана, фаворизирајќи го вирусниот клиренс. Сугерирано е дека витаминот Д дејствува на начин зависен од естроген во контролирањето на диференцијацијата на регулаторните Т-клетки. Притоа е покажано дека естрогенот ја зголемува експресијата на VDR во CD4+Т клетките и ја намалува експресијата на CYP24A1, ензим кој го инактивира витаминот Д (Spanier et al., 2015). За возврат, витаминот Д пројавува ткивно-специфични ефекти врз периферниот метаболизам на естрогенот (Lundqvist et al., 2011). Витаминот Д освен тоа предизвикува посилен инхибиција на производството на проинфламаторни цитокини и поголемо зголемување на антиинфламаторните цитокини во лимфоцитите кај жени со мултиплекс склероза во споредба со пациентите од машки пол (Correale et al., 2010). Понатаму, голем број пациенти со КОВИД-19 покажуваат тешки кардиоваскуларни оштетувања, а оние со веќе постоечки кардиоваскуларни заболувања се чини дека имаат зголемен ризик од смрт (Evans et al., 2020). Естрогенот има познати заштитни ефекти врз кардиоваскуларниот систем со посредство на естрогенските рецептори, што резултира со активирање на ендотелијална азотен оксид синтаза (Regitz-Zagrosek et al., 2010). Сите овие дејства со посредство на естроген може да претставуваат дополнителна причина за полово специфичните разлики во исходот на КОВИД-19.

Резултатите од оваа докторска дисертација се во согласност со податоците од литературата за полово специфичните разлики во однос на исходот на КОВИД-19. Имено, во нашето истражување и во двете групи испитувани пациенти мажите беа побројни во однос на жените. Меѓутоа, и покрај заштитната улога на хормоналните и генетските фактори, дел од жените сепак развиваат тешка клиничка слика на КОВИД-19. Но, ако во нашето истражување ги погледнеме вредностите на витаминот Д кај Б група – средно-тешки и тешки случаи на пациенти со КОВИД-19 на кои им беше потребно сместување во болничка установа, ќе видиме дека имаме значителна и високо сигнификантна разлика во

однос на концентрациите на витамин Д помеѓу мажите и жените. Имено, вредностите на витаминот Д помеѓу мажите и жените се разликуваат просечно за околу десет единици, односно жените од оваа група имаат особено изразен недостаток на витамин Д при развој на потешка форма на болеста. Според нашите сознанија, досега во литературата не постои сличен податок за постоење на полова разлика во однос на концентрациите на серумскиот витамин Д при прв преглед кај пациенти со КОВИД-19, кои понатаму ќе развијат средно-тешка и тешка клиничка слика на КОВИД-19. Оваа наша опсервација произлегува од специфичниот, оригинален дизајн на студијата, како и тесната и добро дефинирана временска рамка за реализацијата на истражувањето, што претставуваат силни страни на оваа клиничка студија.

Како заклучок, се чини дека исходот на КОВИД-19 е под влијание на интеракцијата помеѓу генетските и хормоналните фактори, како и факторите од надворешната средина. Ниските нивоа на 25(OH)D може да претставуваат фактор на ризик за развој на болеста. Особено примамливо е да се претпостави дека синергијата помеѓу витаминот Д и естрогенот може да влијае на половите разлики во исходот на пациентите со КОВИД-19. Генерално вродениот и стекнатиот имунолошки одговор се поефикасни кај жените отколку кај мажите. Ова може да им обезбеди на жените поефикасна одбрана во борбата против различни патогени. Друго можно објаснување за половите разлики во смртноста од КОВИД-19 е полово зависната модулација на клеточните рецептори и корецептори што ги користи SARS-CoV-2 за да навлезе во човечки клетки домаќини.

Сепак, за идентификување на механизмите кои се во основа на нашата опсервација за постоење сигнификантна полова разлика во однос на концентрациите на серумскиот витамин Д при прв преглед кај пациенти со КОВИД-19 кои понатаму ќе развијат средно-тешка и тешка клиничка слика на КОВИД-19, неопходни се дополнителни клинички и базични истражувања.

Сумарно, оваа студија беше започната и сите анализи беа направени за време на првиот удар на пандемијата, во зимската сезона септември – декември 2020 година, кај мажи и жени со позитивен PCR-тест за SARS-CoV-2, кои беа пријавени за прв преглед на Тријажниот центар и Инфективната амбуланта во болницата, со што се исклучува влијанието на сезонските варијации врз статусот на витаминот Д. Силни страни на студијата се нејзиниот фокус и добро дефинираните критериуми како што се: пациенти со КОВИД-19 кои развиваат клиничка слика со различна тежина, поврзано со различните прагови на 25(OH)D (т.е. инсуфициенција, недостаток и тежок недостаток) коишто го дефинираат статусот на витаминот Д при првиот преглед. Поради тоа, нашите резултати имаат силна биолошка веродостојност и би можеле да имаат релевантно влијание во клиничката пракса и јавното здравје. Иако беше невозможно да се идентификува точниот праг од 25(OH)D кој го дефинира ризикот од тежок КОВИД-19 и смрт, нашите резултати сугерираат дека ќе бидат потребни нивоа на 25(OH)D повисоки од 75 pmol/L за да се минимизира клиничкиот импакт на инфекцијата SARS-CoV-2, што е во согласност со претходните согледувања за статусот на витаминот Д и ризикот од инфекции во различни клинички услови. Нашето истражување покажува дека пациентите со КОВИД-19 кај кои при првиот преглед е регистрирана инсуфициенција или недостаток на витамин Д (вклучувајќи и тежок недостаток), понатаму имаат зголемен ризик од респираторен дистрес, од респираторна инсуфициенција или други компликации. Освен тоа, пациентите со неоптимален статус на витамин Д се чини дека се изложени на поголем ризик од инфекција со SARS-CoV-2 и хоспитализација поврзана со КОВИД-19. Иако во оваа фаза не е можно да се потврди причинско-последичната врска на витаминот Д со КОВИД-19, нашите податоци се во согласност со резултатите од некои неодамнешни пилот-студии и мета-анализи кои покажуваат дека високата доза на холекалциферол или калцидиол 25(OH)D може да ја намали сериозноста на КОВИД-19 и на тој начин сугерираат дека соодветен статус на витаминот Д би можел да биде корисен да го намали клиничкиот и економскиот товар поврзан со КОВИД-19. Меѓутоа, третманот со витаминот Д којшто е започнат предоцна, откако пациентот ќе развие тежок облик на КОВИД-19, може да биде и

неефикасен, бидејќи примарните ефекти на витаминот Д врз инфекцијата со SARS-CoV-2 се да се намали одржливоста на вирусот преку индуцирање на кателицидинот и намалување на ризикот од цитокинска бура.

Резултатите од оваа докторска дисертација може да бидат од особена важност за пациентите, посебно за оние од ранливите групи, како што се на пример постарите лица, каде што постои изразен недостаток на витамин Д. Сепак, понатамошни студии ќе бидат неопходни со цел да ја испитаат ефикасноста на додатоките на витамин Д, во комбинација или не со агонисти на естроген, како валиден адјуванс за превенција или третман на оваа тешка заразна болест. Како што се ширеше пандемијата на КОВИД-19, разликите во однос на инфективност и смртност помеѓу машката и женската популација стануваа област на активно истражување. Тековната литература сугерира дека мажите имаат тенденција за поголем ризик од тешка инфекција и смртност поврзана со КОВИД-19. Оттука, имуномодулаторните ефекти на витаминот Д поврзани со полот сугерираат дека е можно витаминот Д да игра важна улога во исходот и смртноста кај пациентите со КОВИД-19. Сепак, досегашните студии не успеаја експлицитно да го одговорат прашањето за поврзаноста на витаминот Д со полот и крајниот исход од КОВИД-19.

Се разбира, сите овие сознанија за значењето и улогата на витаминот Д ни од далеку не ја намалуваат важноста на кампањата за вакцинација на населението, за да се намали здравствено-економскиот товар на државите од инфекцијата со SARS-CoV-2. Конечно, имајќи ја предвид безбедноста, лесната достапност и ниската цена на чинење на суплементацијата со витамин Д, постигнувањето соодветен статус на витамин Д имаше релевантна улога додека вакцините не беа широко достапни, а можеби исто така тоа ќе биде случај и потоа, како адјувантна алатка за оптимизирање на имуногениот одговор на вакцинација.

7. ЗАКЛУЧОК

- ▶ Од резултатите од оваа студија може да се заклучи дека пациентите кои при првиот преглед имаат значително покачени вредности на циркулирачките ензими се со зголемен ризик од развој на потешка форма на болеста, следена со зголемено ниво на воспалителните маркери и потенцијално фатален исход.
- ▶ Од клиничка перспектива, овие наоди можат да помогнат во раната тријажа на пациентите, но исто така и за внимателно следење на оштетувањето на белите дробови, црниот дроб и другите ткива и органи, како и за внимателна употреба на лекови кои можат да предизвикаат токсичност на црниот дроб кај пациенти со КОВИД-19.
- ▶ Резултатите од нашето истражување покажуваат дека определувањето на воспалителните маркери, во прв ред CRP и IL-6, е од особено значење за проценка на сериозноста на болеста, а понатаму и за проценка на одговорот кон терапијата и крајниот исход.
- ▶ Може да сугерираме исто така дека воспалителниот процес предизвикан од инфекцијата со SARS-CoV-2 значително влијае и на метаболизмот на железото.
- ▶ Дисбалансот на хомеостазата на железото е поврзан со ткивно оштетување и нарушена имунолошка функција на домаќинот, така што веројатно е дека нарушената хомеостаза на железото не е само „пасивен случаен минувач“, туку има важна улога во самиот тек на болеста. Оттука, серумското железо и феритинот претставуваат параметри коишто имаат значајна улога во дијагностиката и следењето на текот на болеста кај пациентите со КОВИД-19.
- ▶ Интеракцијата помеѓу вирусните инфекции и витаминот Д останува интригирачки концепт, а глобалниот отпечаток што витаминот Д може да го има врз имунолошкиот одговор во контекст на вирусните инфекции е област на зголемен интерес.

- ▶ Недостатокот на витамин Д значително ја зголемува можноста за сериозно заболување после инфекција со SARS-CoV-2.
- ▶ Интензитетот на инфламаторниот одговор е поголем кај пациентите со недостаток на витамин Д.
- ▶ И покрај тоа што жените имаат поголема природна заштита како што се хормоналните и генските фактори, сепак и тие развиваат тешка и драматична клиничка слика на КОВИД-19. Причината за развојот на ваква тешка клиничка може да се токму ниските вредности на витамин Д.
- ▶ Хормоналните и генетските фактори може да доведат до поголема експресија на ACE2 кај жените, што барем делумно го објаснува подобриот исход и пониската стапка на смртност кај пациенти од женски пол.
- ▶ Познато е дека генерално, вродените и стекнатите имунолошки одговори се поинтензивни кај жените отколку кај мажите. Ова може да им обезбеди на жените поефикасна одбрана против SARS-CoV-2.
- ▶ Друго значајно објаснување за половите разлики во смртноста од КОВИД-19 е полово-зависната модулација на клеточните рецептори и корецептори што ги користи SARS-CoV-2 за да навлезе во човечки клетки домаќини.

Како еден генерален заклучок, може да се каже дека исходот на КОВИД-19 е под влијание на интеракцијата помеѓу генетските, хормоналните и еколошките фактори.

Ниските нивоа на 25(OH)D може да претставуваат фактор на ризик за развој на болеста.

Особено примамливо е да се претпостави дека витаминот Д може да влијае на половите разлики во исходот на пациентите со КОВИД-19.

Овие резултати можат да бидат добра основа за понатамошни базични и клинички истражувања со кои ќе се расветлат механизмите кои се во основа на поврзаноста на витаминот Д со полот и крајниот исход од КОВИД-19.

8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Abu-Amer, Y., & Bar-Shavit, Z. (1993). "Impaired bone marrow-derived macrophage differentiation in vitamin D deficiency". *Cell Immunol*, 151(2), 356-368. <https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1245>
2. Aihara, K., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Yamashita, M., Sudo, T., Hayashi, H., Yamada, Y., Endoh, F., Fujimura, M., Yoshida, T., Yamaguchi, H., Hashizume, S., Kato, M., Yoshimura, K., Yamamoto, Y., Kato, S., & Matsumoto, T. (2004). "Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice". *J Biol Chem*, 279(34), 35798-35802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404865200>
3. An, Y. W., Song, S., Li, W. X., Chen, Y. X., Hu, X. P., Zhao, J., Li, Z. W., Jiang, G. Y., Wang, C., Wang, J. C., Yuan, B., & Liu, H. Q. (2021). "Liver function recovery of COVID-19 patients after discharge, a follow-up study". *Int J Med Sci*, 18(1), 176-186. <https://doi.org/10.7150/ijms.50691>
4. Autier, P., Mullie, P., Macacu, A., Dragomir, M., Boniol, M., Coppens, K., Pizot, C., & Boniol, M. (2017). "Effect of vitamin D supplementation on non-skeletal disorders: a systematic review of meta-analyses and randomised trials". *Lancet Diabetes Endocrinol*, 5(12), 986-1004. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(17\)30357-1](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(17)30357-1)
5. Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). "Vitamin D: modulator of the immune system". *Curr Opin Pharmacol*, 10(4), 482-496. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.001>
6. Bahrami, A., Sadeghnia, H. R., Tabatabaeizadeh, S. A., Bahrami-Taghanaki, H., Behboodi, N., Esmaeili, H., Ferns, G. A., Mobarhan, M. G., & Avan, A. (2018). "Genetic and epigenetic factors influencing vitamin D status". *J Cell Physiol*, 233(5), 4033-4043. <https://doi.org/10.1002/jcp.26216>
7. Bassler, K., Schulte-Schrepping, J., Warnat-Herresthal, S., Aschenbrenner, A. C., & Schultze, J. L. (2019). "The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell". *Annu Rev Immunol*, 37, 269-293. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041728>

8. Bhalla, A. K., Amento, E. P., Serog, B., & Glimcher, L. H. (1984). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation". *J Immunol*, 133(4), 1748-1754.
9. Biesalski, H. K. (2020). "Vitamin D deficiency and co-morbidities in COVID-19 patients – A fatal relationship?" *Nfs Journal*, 20, 10-21.
<https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.06.001>
10. Bikle, D. D. (2014). "Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications". *Chem Biol*, 21(3), 319-329.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
11. Bischoff-Ferrari, H. A., Shao, A., Dawson-Hughes, B., Hathcock, J., Giovannucci, E., & Willett, W. C. (2010). "Benefit-risk assessment of vitamin D supplementation". *Osteoporos Int*, 21(7), 1121-1132.
<https://doi.org/10.1007/s00198-009-1119-3>
12. Boonstra, A., Barrat, F. J., Crain, C., Heath, V. L., Savelkoul, H. F., & O'Garra, A. (2001). "1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells". *J Immunol*, 167(9), 4974-4980.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.4974>
13. Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., Lieben, L., Mathieu, C., & Demay, M. (2008). "Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice". *Endocr Rev*, 29(6), 726-776.
<https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>
14. Bukowska, A., Spiller, L., Wolke, C., Lendeckel, U., Weinert, S., Hoffmann, J., Bornfleth, P., Kutschka, I., Gardemann, A., Isermann, B., & Goette, A. (2017). "Protective regulation of the ACE2/ACE gene expression by estrogen in human atrial tissue from elderly men". *Exp Biol Med (Maywood)*, 242(14), 1412-1423.
<https://doi.org/10.1177/1535370217718808>
15. Cardoso, M. P., & Pereira, L. A. L. (2019). "Native vitamin D in pre-dialysis chronic kidney disease". *Nefrologia (Engl Ed)*, 39(1), 18-28.
<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.07.004>

16. Carlberg, C. (2019). "Nutrigenomics of Vitamin D". *Nutrients*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/nu11030676>
17. Carrillo, J., Izquierdo-Useros, N., Ávila-Nieto, C., Pradenas, E., Clotet, B., & Blanco, J. (2021). "Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity". *Biochem Biophys Res Commun*, 538, 187-191. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.108>
18. Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). "Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019". *J Clin Invest*, 130(5), 2620-2629. <https://doi.org/10.1172/jci137244>
19. Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). "Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study". *Lancet*, 395(10223), 507-513. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30211-7)
20. Chiodini, I., Gatti, D., Soranna, D., Merlotti, D., Mingiano, C., Fassio, A., Adami, G., Falchetti, A., Eller-Vainicher, C., Rossini, M., Persani, L., Zambon, A., & Gennari, L. (2021). "Vitamin D Status and SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Clinical Outcomes". *Front Public Health*, 9, 736665. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.736665>
21. Chung, M., Bernheim, A., Mei, X., Zhang, N., Huang, M., Zeng, X., Cui, J., Xu, W., Yang, Y., Fayad, Z. A., Jacobi, A., Li, K., Li, S., & Shan, H. (2020). "CT Imaging Features of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV)". *Radiology*, 295(1), 202-207. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200230>
22. Colafrancesco, S., Alessandri, C., Conti, F., & Priori, R. (2020). "COVID-19 gone bad: A new character in the spectrum of the hyperferritinemic syndrome?" *Autoimmun Rev*, 19(7), 102573. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102573>

23. Colombi, D., Bodini, F. C., Petrini, M., Maffi, G., Morelli, N., Milanese, G., Silva, M., Sverzellati, N., & Michieletti, E. (2020). "Well-aerated Lung on Admitting Chest CT to Predict Adverse Outcome in COVID-19 Pneumonia". *Radiology*, 296(2), E86-e96. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020201433>
24. Colunga Biancatelli, R. M. L., Berrill, M., & Marik, P. E. (2020). "The antiviral properties of vitamin C". *Expert Rev Anti Infect Ther*, 18(2), 99-101. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1706483>
25. Correale, J., Ysrraelit, M. C., & Gaitán, M. I. (2010). "Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D3 immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects". *J Immunol*, 185(8), 4948-4958. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000588>
26. D'Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M. G., Mazzeo, D., Di Lucia, P., Lang, R., Sinigaglia, F., & Panina-Bordignon, P. (1998). "Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene". *J Clin Invest*, 101(1), 252-262. <https://doi.org/10.1172/jci1050>
27. Dancer, R. C., Parekh, D., Lax, S., D'Souza, V., Zheng, S., Bassford, C. R., Park, D., Bartis, D. G., Mahida, R., Turner, A. M., Sapey, E., Wei, W., Naidu, B., Stewart, P. M., Fraser, W. D., Christopher, K. B., Cooper, M. S., Gao, F., Sansom, D. M., . . . Thickett, D. R. (2015). "Vitamin D deficiency contributes directly to the acute respiratory distress syndrome (ARDS)". *Thorax*, 70(7), 617-624. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206680>
28. Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., Ning, L., Chen, L., Li, M., Liu, Y., Wang, G., Yuan, Z., Feng, Z., Zhang, Y., Wu, Y., & Chen, Y. (2020). "Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)". *Front Immunol*, 11, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
29. Diaz-Curiel, M., Cabello, A., Arboiro-Pinel, R., Mansur, J. L., Heili-Frades, S., Mahillo-Fernandez, I., Herrero-González, A., & Andrade-Poveda, M. (2021). "The relationship between 25(OH) vitamin D levels and COVID-19 onset and disease

- course in Spanish patients". *J Steroid Biochem Mol Biol*, 212, 105928. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105928>
30. Dienz, O., Rud, J. G., Eaton, S. M., Lanthier, P. A., Burg, E., Drew, A., Bunn, J., Suratt, B. T., Haynes, L., & Rincon, M. (2012). "Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung". *Mucosal Immunol*, 5(3), 258-266. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.2>
31. Evans, P. C., Rainger, G. E., Mason, J. C., Guzik, T. J., Osto, E., Stamataki, Z., Neil, D., Hofer, I. E., Fragiadaki, M., Waltenberger, J., Weber, C., Bochaton-Piallat, M. L., & Bäck, M. (2020). "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*, 116(14), 2177-2184. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa230>
32. Fabbri, A., Infante, M., & Ricordi, C. (2020). "Editorial - Vitamin D status: a key modulator of innate immunity and natural defense from acute viral respiratory infections". *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(7), 4048-4052. https://doi.org/10.26355/eurrev_202004_20876
33. Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). "Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis". *Methods Mol Biol*, 1282, 1-23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
34. Fetahu, I. S., Höbaus, J., & Kállay, E. (2014). "Vitamin D and the epigenome". *Front Physiol*, 5, 164. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00164>
35. Fritsche, J., Mondal, K., Ehrnsperger, A., Andreesen, R., & Kreutz, M. (2003). "Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells". *Blood*, 102(9), 3314-3316. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3521>
36. Getachew, B., & Tizabi, Y. (2021). "Vitamin D and COVID-19: Role of ACE2, age, gender, and ethnicity". *J Med Virol*, 93(9), 5285-5294. <https://doi.org/10.1002/jmv.27075>

37. Grant, W. B., Lahore, H., McDonnell, S. L., Baggerly, C. A., French, C. B., Aliano, J. L., & Bhattoa, H. P. (2020). "Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths". *Nutrients*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/nu12040988>
38. Griffin, M. D., Lutz, W. H., Phan, V. A., Bachman, L. A., McKean, D. J., & Kumar, R. (2000). "Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs". *Biochem Biophys Res Commun*, 270(3), 701-708. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2490>
39. Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., Liu, L., Shan, H., Lei, C. L., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L. J., Zeng, G., Yuen, K. Y., Chen, R. C., Tang, C. L., Wang, T., Chen, P. Y., Xiang, J., . . . Zhong, N. S. (2020). "Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China". *N Engl J Med*, 382(18), 1708-1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
40. Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., Tan, K. S., Wang, D. Y., & Yan, Y. (2020). "The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status". *Mil Med Res*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>
41. Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pène, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T. A., Merklings, S. H., Terrier, B. (2020). "Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients". *Science*, 369(6504), 718-724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
42. Halim, C., Mirza, A. F., & Sari, M. I. (2022). "The Association between TNF- α , IL-6, and Vitamin D Levels and COVID-19 Severity and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Pathogens*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens11020195>
43. Halushka, P. V., Goodwin, A. J., & Halushka, M. K. (2019). "Opportunities for microRNAs in the Crowded Field of Cardiovascular Biomarkers". *Annu Rev*

- Pathol*, 14, 211-238. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012827>
44. Hanff, T. C., Harhay, M. O., Brown, T. S., Cohen, J. B., & Mohareb, A. M. (2020). "Is There an Association Between COVID-19 Mortality and the Renin-Angiotensin System? A Call for Epidemiologic Investigations". *Clin Infect Dis*, 71(15), 870-874. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
45. Hansdottir, S., Monick, M. M., Hinde, S. L., Lovan, N., Look, D. C., & Hunninghake, G. W. (2008). "Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense". *J Immunol*, 181(10), 7090-7099. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7090>
46. Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., Dominguez, C. E., & Jurutka, P. W. (1998). "The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed". *J Bone Miner Res*, 13(3), 325-349. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.3.325>
47. Helming, L., Böse, J., Ehrchen, J., Schiebe, S., Frahm, T., Geffers, R., Probst-Keppler, M., Balling, R., & Lengeling, A. (2005). "1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation". *Blood*, 106(13), 4351-4358. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1029>
48. Henry, B. M., Aggarwal, G., Wong, J., Benoit, S., Vikse, J., Plebani, M., & Lippi, G. (2020). "Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis". *Am J Emerg Med*, 38(9), 1722-1726. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.05.073>
49. Hewison, M., Freeman, L., Hughes, S. V., Evans, K. N., Bland, R., Eliopoulos, A. G., Kilby, M. D., Moss, P. A., & Chakraverty, R. (2003). "Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells". *J Immunol*, 170(11), 5382-5390. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5382>
50. Hill, M. A., Mantzoros, C., & Sowers, J. R. (2020). "Commentary: COVID-19 in patients with diabetes". *Metabolism*, 107, 154217. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154217>

51. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor". *Cell*, *181*(2), 271-280.e278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
52. Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P., Murad, M. H., & Weaver, C. M. (2011). "Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline". *J Clin Endocrinol Metab*, *96*(7), 1911-1930. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0385>
53. Hopefl, R., Ben-Eltriki, M., & Deb, S. (2022). "Association Between Vitamin D Levels and Inflammatory Markers in COVID-19 Patients: A Meta-Analysis of Observational Studies". *J Pharm Pharm Sci*, *25*, 124-136. <https://doi.org/10.18433/jpps32518>
54. 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., . . . Cao, B. (2020). "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China". *Lancet*, *395*(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
55. Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease". *Nat Immunol*, *16*(5), 448-457. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>
56. Inciardi, R. M., Lupi, L., Zacccone, G., Italia, L., Raffo, M., Tomasoni, D., Cani, D. S., Cerini, M., Farina, D., Gavazzi, E., Maroldi, R., Adamo, M., Ammirati, E., Sinagra, G., Lombardi, C. M., & Metra, M. (2020). "Cardiac Involvement in a Patient With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)". *JAMA Cardiol*, *5*(7), 819-824. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.1096>
57. Institute of Medicine Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin, D., & Calcium. (2011). "The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health". In A. C. Ross, C. L. Taylor, A. L. Yaktine, & H. B.

- Del Valle (Eds.), *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*.
<https://doi.org/10.17226/13050>
58. Jain, A., Chaurasia, R., Sengar, N. S., Singh, M., Mahor, S., & Narain, S. (2020). "Analysis of vitamin D level among asymptomatic and critically ill COVID-19 patients and its correlation with inflammatory markers". *Sci Rep*, *10*(1), 20191. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77093-z>
59. Jakovac, H. (2020). "COVID-19 and vitamin D-Is there a link and an opportunity for intervention?" *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *318*(5), E589. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00138.2020>
60. Jolliffe, D. A., Camargo, C. A., Jr., Sluyter, J. D., Aglipay, M., Aloia, J. F., Ganmaa, D., Bergman, P., Bischoff-Ferrari, H. A., Borzutzky, A., Damsgaard, C. T., Dubnov-Raz, G., Esposito, S., Gilham, C., Ginde, A. A., Golan-Tripto, I., Goodall, E. C., Grant, C. C., Griffiths, C. J., Hibbs, A. M., . . . Martineau, A. R. (2021). "Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory infections: a systematic review and meta-analysis of aggregate data from randomised controlled trials". *Lancet Diabetes Endocrinol*, *9*(5), 276-292. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(21\)00051-6](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(21)00051-6)
61. Jones, S. A., & Jenkins, B. J. (2018). "Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer". *Nat Rev Immunol*, *18*(12), 773-789. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0066-7>
62. Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., & Schultze, J. L. (2019). "Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases". *Front Immunol*, *10*, 2035. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>
63. Karki, R., Sharma, B. R., Tuladhar, S., Williams, E. P., Zalduondo, L., Samir, P., Zheng, M., Sundaram, B., Banoth, B., Malireddi, R. K. S., Schreiner, P., Neale, G., Vogel, P., Webby, R., Jonsson, C. B., & Kanneganti, T. D. (2021). "Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock

- Syndromes". *Cell*, 184(1), 149-168.e117.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.025>
64. Kazemi, A., Mohammadi, V., Aghababae, S. K., Golzarand, M., Clark, C. C. T., & Babajafari, S. (2021). "Association of Vitamin D Status with SARS-CoV-2 Infection or COVID-19 Severity: A Systematic Review and Meta-analysis". *Adv Nutr*, 12(5), 1636-1658. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab012>
65. Kernan, K. F., & Carcillo, J. A. (2017). "Hyperferritinemia and inflammation". *Int Immunol*, 29(9), 401-409. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx031>
66. Kindler, E., Thiel, V., & Weber, F. (2016). "Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response". *Adv Virus Res*, 96, 219-243. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.006>
67. Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). "Sex differences in immune responses". *Nat Rev Immunol*, 16(10), 626-638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
68. Kumar, R., Rathi, H., Haq, A., Wimalawansa, S. J., & Sharma, A. (2021). "Putative roles of vitamin D in modulating immune response and immunopathology associated with COVID-19". *Virus Res*, 292, 198235. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198235>
69. Laird, E., Rhodes, J., & Kenny, R. A. (2020). "Vitamin D and Inflammation: Potential Implications for Severity of Covid-19". *Ir Med J*, 113(5), 81.
70. Lei, G. S., Zhang, C., Cheng, B. H., & Lee, C. H. (2017). "Mechanisms of Action of Vitamin D as Supplemental Therapy for Pneumocystis Pneumonia". *Antimicrob Agents Chemother*, 61(10). <https://doi.org/10.1128/aac.01226-17>
71. Lei, P. (2021). "Update on COVID-19: How to deal with mutated SARS-CoV-2". *Medical Research & Publication*, 7(4). <https://doi.org/10.14218/MRP.2021.133>
72. Lemire, J. M. (1992). "Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3". *J Cell Biochem*, 49(1), 26-31. <https://doi.org/10.1002/jcb.240490106>

73. Lepanto, M. S., Rosa, L., Paesano, R., Valenti, P., & Cutone, A. (2019). "Lactoferrin in Aseptic and Septic Inflammation". *Molecules*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/molecules24071323>
74. Li, G., Fan, Y., Lai, Y., Han, T., Li, Z., Zhou, P., Pan, P., Wang, W., Hu, D., Liu, X., Zhang, Q., & Wu, J. (2020). "Coronavirus infections and immune responses". *J Med Virol*, 92(4), 424-432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>
75. Li, H., Liu, L., Zhang, D., Xu, J., Dai, H., Tang, N., Su, X., & Cao, B. (2020). "SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses". *Lancet*, 395(10235), 1517-1520. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30920-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30920-x)
76. Li, Y., Li, Q., Zhang, N., & Liu, Z. (2020). "Sunlight and vitamin D in the prevention of coronavirus disease (COVID-19) infection and mortality in the United States". *Research Square*, preprint. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-32499/v1>
77. Liu, C., Zhou, Q., Li, Y., Garner, L. V., Watkins, S. P., Carter, L. J., Smoot, J., Gregg, A. C., Daniels, A. D., Jervey, S., & Albaiu, D. (2020). "Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases". *ACS Cent Sci*, 6(3), 315-331. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00272>
78. Liu, G., Jiang, X., Zeng, X., Pan, Y., & Xu, H. (2021). "Analysis of Lymphocyte Subpopulations and Cytokines in COVID-19-Associated Pneumonia and Community-Acquired Pneumonia". *J Immunol Res*, 2021, 6657894. <https://doi.org/10.1155/2021/6657894>
79. Liu, J., Li, S., Liu, J., Liang, B., Wang, X., Wang, H., Li, W., Tong, Q., Yi, J., Zhao, L., Xiong, L., Guo, C., Tian, J., Luo, J., Yao, J., Pang, R., Shen, H., Peng, C., Liu, T., . . . Zheng, X. (2020). "Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients". *EBioMedicine*, 55, 102763. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>
80. Liu, W., Zhang, L., Xu, H. J., Li, Y., Hu, C. M., Yang, J. Y., & Sun, M. Y. (2018). "The Anti-Inflammatory Effects of Vitamin D in Tumorigenesis". *Int J Mol Sci*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092736>

81. Lundqvist, J., Norlin, M., & Wikvall, K. (2011). "1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts tissue-specific effects on estrogen and androgen metabolism". *Biochim Biophys Acta*, 1811(4), 263-270. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.01.004>
82. Magro, G. (2020). "SARS-CoV-2 and COVID-19: Is interleukin-6 (IL-6) the 'culprit lesion' of ARDS onset? What is there besides Tocilizumab?" *SGP130Fc. Cytokine X*, 2(2), 100029. <https://doi.org/10.1016/j.cyttox.2020.100029>
83. Martineau, A. R., Jolliffe, D. A., Hooper, R. L., Greenberg, L., Aloia, J. F., Bergman, P., Dubnov-Raz, G., Esposito, S., Ganmaa, D., Ginde, A. A., Goodall, E. C., Grant, C. C., Griffiths, C. J., Janssens, W., Laaksi, I., Manaseki-Holland, S., Mauger, D., Murdoch, D. R., Neale, R., . . . Camargo, C. A., Jr. (2017). "Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data". *Bmj*, 356, i6583. <https://doi.org/10.1136/bmj.i6583>
84. Mazahery, H., & von Hurst, P. R. (2015). "Factors Affecting 25-Hydroxyvitamin D Concentration in Response to Vitamin D Supplementation". *Nutrients*, 7(7), 5111-5142. <https://doi.org/10.3390/nu7075111>
85. McFadden, R. G., & Oliphant, L. D. (1991). "Serum lactate dehydrogenase in interstitial lung disease". *Chest*, 100(4), 1182. <https://doi.org/10.1378/chest.100.4.1182-b>
86. Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2020). "COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression". *Lancet*, 395(10229), 1033-1034. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30628-0)
87. Merad, M., & Martin, J. C. (2020). "Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages". *Nat Rev Immunol*, 20(6), 355-362. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
88. Mok, C. K., Ng, Y. L., Ahidjo, B. A., Hua Lee, R. C., Choy Loe, M. W., Liu, J., Tan, K. S., Kaur, P., Chng, W. J., Wong, J. E.-L., Wang, D. Y., Hao, E., Hou, X., Tan, Y. W., Mak, T. M., Lin, C., Lin, R., Tambyah, P., Deng, J., & Hann Chu, J. J.

- (2020). "Calcitriol, the active form of vitamin D, is a promising candidate for COVID-19 prophylaxis". *bioRxiv*, 2020.2006.2021.162396. <https://doi.org/10.1101/2020.06.21.162396>
89. Monkawa, T., Yoshida, T., Hayashi, M., & Saruta, T. (2000). "Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression in macrophages". *Kidney Int*, 58(2), 559-568. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00202.x>
90. Mousavi, S., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (2019). "Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Vitamin C". *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 9(3), 73-79. <https://doi.org/10.1556/1886.2019.00016>
91. Munshi, R., Hussein, M. H., Toraih, E. A., Elshazli, R. M., Jardak, C., Sultana, N., Youssef, M. R., Omar, M., Attia, A. S., Fawzy, M. S., Killackey, M., Kandil, E., & Duchesne, J. (2021). "Vitamin D insufficiency as a potential culprit in critical COVID-19 patients". *J Med Virol*, 93(2), 733-740. <https://doi.org/10.1002/jmv.26360>
92. Nguyen, N. T., Chinn, J., De Ferrante, M., Kirby, K. A., Hohmann, S. F., & Amin, A. (2021). "Male gender is a predictor of higher mortality in hospitalized adults with COVID-19". *PLoS One*, 16(7), e0254066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254066>
93. Nile, S. H., Nile, A., Qiu, J., Li, L., Jia, X., & Kai, G. (2020). "COVID-19: Pathogenesis, cytokine storm and therapeutic potential of interferons". *Cytokine Growth Factor Rev*, 53, 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.cytofr.2020.05.002>
94. Notz, Q., Herrmann, J., Schlesinger, T., Kranke, P., Sitter, M., Helmer, P., Stumpner, J., Roeder, D., Amrein, K., Stoppe, C., Lotz, C., & Meybohm, P. (2021). "Vitamin D deficiency in critically ill COVID-19 ARDS patients". *Clin Nutr*. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.03.001>
95. Ohsawa, M., Koyama, T., Yamamoto, K., Hirosawa, S., Kamei, S., & Kamiyama, R. (2000). "1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and its potent synthetic analogs downregulate tissue factor and upregulate thrombomodulin expression in

- monocytic cells, counteracting the effects of tumor necrosis factor and oxidized LDL". *Circulation*, 102(23), 2867-2872. <https://doi.org/10.1161/01.cir.102.23.2867>
96. Pan, F., Ye, T., Sun, P., Gui, S., Liang, B., Li, L., Zheng, D., Wang, J., Hesketh, R. L., Yang, L., & Zheng, C. (2020). "Time Course of Lung Changes at Chest CT during Recovery from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)". *Radiology*, 295(3), 715-721. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200370>
97. Patel, S. K., Wai, B., Ord, M., Maclsaac, R. J., Grant, S., Velkoska, E., Panagiotopoulos, S., Jerums, G., Srivastava, P. M., & Burrell, L. M. (2012). "Association of ACE2 genetic variants with blood pressure, left ventricular mass, and cardiac function in Caucasians with type 2 diabetes". *Am J Hypertens*, 25(2), 216-222. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.188>
98. Pawlotsky, J. M. (2020). "COVID-19 and the liver-related deaths to come". *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 17(9), 523-525. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0328-2>
99. Pereira, M., Dantas Damascena, A., Galvão Azevedo, L. M., de Almeida Oliveira, T., & da Mota Santana, J. (2022). "Vitamin D deficiency aggravates COVID-19: systematic review and meta-analysis". *Crit Rev Food Sci Nutr*, 62(5), 1308-1316. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1841090>
100. Piraux, A. (2021). "[Interest of vitamin D in COVID-19]". *Actual Pharm*, 60(605), 52-55. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2021.02.012> (Vitamine D et Covid-19.)
101. Pozzilli, P., & Lenzi, A. (2020). "Commentary: Testosterone, a key hormone in the context of COVID-19 pandemic". *Metabolism*, 108, 154252. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154252>
102. Pradhan, A., & Olsson, P. E. (2020). "Sex differences in severity and mortality from COVID-19: are males more vulnerable?" *Biol Sex Differ*, 11(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00330-7>
103. Pribul, P. K., Harker, J., Wang, B., Wang, H., Tregoning, J. S., Schwarze, J., & Openshaw, P. J. (2008). "Alveolar macrophages are a major determinant of early

- responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development". *J Virol*, 82(9), 4441-4448. <https://doi.org/10.1128/jvi.02541-07>
104. Prompetchara, E., Ketloy, C., & Palaga, T. (2020). "Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic". *Asian Pac J Allergy Immunol*, 38(1), 1-9. <https://doi.org/10.12932/ap-200220-0772>
105. Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., Xie, C., Ma, K., Shang, K., Wang, W., & Tian, D. S. (2020). "Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China". *Clin Infect Dis*, 71(15), 762-768. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
106. Ragab, D., Salah Eldin, H., Taeimah, M., Khattab, R., & Salem, R. (2020). "The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far". *Front Immunol*, 11, 1446. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446>
107. "Recommended vitamin D intake and management of low vitamin D status in adolescents: a position statement of the society for adolescent health and medicine". (2013). *J Adolesc Health*, 52(6), 801-803. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2013.03.022>
108. Rejnmark, L., Bislev, L. S., Cashman, K. D., Eiríksdóttir, G., Gaksch, M., Grübler, M., Grimnes, G., Gudnason, V., Lips, P., Pilz, S., van Schoor, N. M., Kiely, M., & Jorde, R. (2017). "Non-skeletal health effects of vitamin D supplementation: A systematic review on findings from meta-analyses summarizing trial data". *PLoS One*, 12(7), e0180512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180512>
109. Rivas-García, S., Bernal, J., & Bachiller-Corral, J. (2020). "Rhabdomyolysis as the main manifestation of coronavirus disease 2019". *Rheumatology (Oxford)*, 59(8), 2174-2176. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa351>
110. Romagnoli, S., Peris, A., De Gaudio, A. R., & Geppetti, P. (2020). "SARS-CoV-2 and COVID-19: From the Bench to the Bedside". *Physiol Rev*, 100(4), 1455-1466. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2020>

111. Saccone, D., Asani, F., & Bornman, L. (2015). "Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics". *Gene*, 561(2), 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.024>
112. Salomé, B., & Magen, A. (2020). "Dysregulation of lung myeloid cells in COVID-19". *Nat Rev Immunol*, 20(5), 277. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0303-8>
113. Saxena, P., Nigam, K., Mukherjee, S., Chadha, S., & Sanyal, S. (2022). "Relation of vitamin D to COVID-19". *J Virol Methods*, 301, 114418. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114418>
114. Schulert, G. S., & Grom, A. A. (2015). "Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine- directed therapies". *Annu Rev Med*, 66, 145-159. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-061813-012806>
115. Shi, Y., Wang, Y., Shao, C., Huang, J., Gan, J., Huang, X., Bucci, E., Piacentini, M., Ippolito, G., & Melino, G. (2020). "COVID-19 infection: the perspectives on immune responses". *Cell Death Differ*, 27(5), 1451-1454. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0530-3>
116. Shimizu, M. (2019). "Clinical Features of Cytokine Storm Syndrome. In R. Cron & E. Behrens (Eds.), *Cytokine Storm Syndrome*". Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22094-5_3
117. Siddiqi, H. K., & Mehra, M. R. (2020). "COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal". *J Heart Lung Transplant*, 39(5), 405-407. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.012>
118. Spanier, J. A., Nashold, F. E., Mayne, C. G., Nelson, C. D., & Hayes, C. E. (2015). "Vitamin D and estrogen synergy in Vdr-expressing CD4(+) T cells is essential to induce Helios(+)FoxP3(+) T cells and prevent autoimmune demyelinating disease". *J Neuroimmunol*, 286, 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.015>
119. Stahl, K., Schmidt, B. M. W., Hoepfer, M. M., Skripuletz, T., Möhn, N., Beutel, G., Eder, M., Welte, T., Ganser, A., Falk, C. S., Koenecke, C., & David, S. (2020).

- "Extracorporeal cytokine removal in severe CAR-T cell associated cytokine release syndrome". *J Crit Care*, 57, 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2020.02.010>
120. Stockinger, B. (2007). "Th17 cells: An orphan with influence". *Immunol Cell Biol*, 85(2), 83-84. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100035>
121. Sutton, A. L., & MacDonald, P. N. (2003). "Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone". *Mol Endocrinol*, 17(5), 777-791. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0363>
122. Szymczak, I., & Pawliczak, R. (2016). "The Active Metabolite of Vitamin D3 as a Potential Immunomodulator". *Scand J Immunol*, 83(2), 83-91. <https://doi.org/10.1111/sji.12403>
123. Tahmasebi, S., El-Esawi, M. A., Mahmoud, Z. H., Timoshin, A., Valizadeh, H., Roshangar, L., Varshoch, M., Vaez, A., Aslani, S., Navashenaq, J. G., Aghebati-Maleki, L., & Ahmadi, M. (2021). "Immunomodulatory effects of nanocurcumin on Th17 cell responses in mild and severe COVID-19 patients". *J Cell Physiol*, 236(7), 5325-5338. <https://doi.org/10.1002/jcp.30233>
124. Tan, C., Huang, Y., Shi, F., Tan, K., Ma, Q., Chen, Y., Jiang, X., & Li, X. (2020). "C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early". *J Med Virol*, 92(7), 856-862. <https://doi.org/10.1002/jmv.25871>
125. Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2016). "Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm". *Immunotherapy*, 8(8), 959-970. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0020>
126. Teymoori-Rad, M., Shokri, F., Salimi, V., & Marashi, S. M. (2019). "The interplay between vitamin D and viral infections". *Rev Med Virol*, 29(2), e2032. <https://doi.org/10.1002/rmv.2032>
127. Tian, Y., & Rong, L. (2020). "Letter: Covid-19, and vitamin D". Authors' reply. *Aliment Pharmacol Ther*, 51(10), 995-996. <https://doi.org/10.1111/apt.15764>

128. Vargas-Vargas, M., & Cortés-Rojo, C. (2020). "Ferritin levels and COVID-19". *Rev Panam Salud Publica*, 44, e72. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2020.72>
129. Velazquez-Salinas, L., Verdugo-Rodriguez, A., Rodriguez, L. L., & Borca, M. V. (2019). "The Role of Interleukin 6 During Viral Infections". *Front Microbiol*, 10, 1057. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01057>
130. Vieth, R., Kimball, S., Hu, A., & Walfish, P. G. (2004). "Randomized comparison of the effects of the vitamin D3 adequate intake versus 100 mcg (4000 IU) per day on biochemical responses and the wellbeing of patients". *Nutr J*, 3, 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-8>
131. Wacker, M., & Holick, M. F. (2013). "Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation". *Nutrients*, 5(1), 111-148. <https://doi.org/10.3390/nu5010111>
132. Wan, S., Yi, Q., Fan, S., Lv, J., Zhang, X., Guo, L., Lang, C., Xiao, Q., Xiao, K., Yi, Z., Qiang, M., Xiang, J., Zhang, B., & Chen, Y. (2020). "Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP)". *medRxiv*, 2020.2002.2010.20021832. <https://doi.org/10.1101/2020.02.10.20021832>
133. Wang, F., Nie, J., Wang, H., Zhao, Q., Xiong, Y., Deng, L., Song, S., Ma, Z., Mo, P., & Zhang, Y. (2020). "Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia". *J Infect Dis*, 221(11), 1762-1769. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa150>
134. Wang, Y., Liu, S., Liu, H., Li, W., Lin, F., Jiang, L., Li, X., Xu, P., Zhang, L., Zhao, L., Cao, Y., Kang, J., Yang, J., Li, L., Liu, X., Li, Y., Nie, R., Mu, J., Lu, F., . . . Zhao, J. (2020). "SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19". *J Hepatol*, 73(4), 807-816. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.002>
135. Wimalawansa, S. J. (2019). "Vitamin D Deficiency: Effects on Oxidative Stress, Epigenetics, Gene Regulation, and Aging". *Biology (Basel)*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/biology8020030>

136. Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). "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*, 323(13), 1239-1242. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
137. Xu, J., Yang, J., Chen, J., Luo, Q., Zhang, Q., & Zhang, H. (2017). "Vitamin D alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulation of the renin-angiotensin system". *Mol Med Rep*, 16(5), 7432-7438. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7546>
138. Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F. S. (2020). "Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome". *Lancet Respir Med*, 8(4), 420-422. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30076-x](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30076-x)
139. Xue, M. L., Zhu, H., Thakur, A., & Willcox, M. (2002). "1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*". *Immunol Cell Biol*, 80(4), 340-345. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.80.4august.1.x>
140. Yang, J., Xu, J., & Zhang, H. (2016). "Effects of vitamin D on the expression levels of angiotensin-converting enzyme 2 and vitamin D receptor in the lung tissue of rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury". *Chinese Journal of Emergency Medicine*, 25(12), 1284-1289. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.12.016>
141. Ye, Q., Wang, B., & Mao, J. (2020). "The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19". *J Infect*, 80(6), 607-613. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>
142. Young, B., Gleeson, M., & Cripps, A. W. (1991). "C-reactive protein: a critical review". *Pathology*, 23(2), 118-124. <https://doi.org/10.3109/00313029109060809>
143. Zeitelhofer, M., Adzemovic, M. Z., Gomez-Cabrero, D., Bergman, P., Hochmeister, S., N'Diaye, M., Paulson, A., Ruhrmann, S., Almgren, M., Tegnér,

- J. N., Ekström, T. J., Guerreiro-Cacais, A. O., & Jagodic, M. (2017). "Functional genomics analysis of vitamin D effects on CD4+ T cells in vivo in experimental autoimmune encephalomyelitis". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(9), E1678-e1687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615783114>
144. Zhang, C., Wang, X. M., Li, S. R., Twelkmeyer, T., Wang, W. H., Zhang, S. Y., Wang, S. F., Chen, J. Z., Jin, X., Wu, Y. Z., Chen, X. W., Wang, S. D., Niu, J. Q., Chen, H. R., & Tang, H. (2019). "NKG2A is a NK cell exhaustion checkpoint for HCV persistence". *Nat Commun*, 10(1), 1507. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09212-y>
145. Zhang, Z. L., Hou, Y. L., Li, D. T., & Li, F. Z. (2020). "Laboratory findings of COVID-19: a systematic review and meta-analysis". *Scand J Clin Lab Invest*, 80(6), 441-447. <https://doi.org/10.1080/00365513.2020.1768587>
146. Zhao, K., Huang, J., Dai, D., Feng, Y., Liu, L., & Nie, S. (2020). "Serum Iron Level as a Potential Predictor of Coronavirus Disease 2019 Severity and Mortality: A Retrospective Study". *Open Forum Infect Dis*, 7(7), ofaa250. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa250>
147. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., . . . Shi, Z. L. (2020). "A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin". *Nature*, 579(7798), 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
148. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019". *N Engl J Med*, 382(8), 727-733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>