

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE



Lek. Daniel Chober

**Skuteczność leczenia immunomodulacyjnego w okresie burzy cytokinowej
u pacjentów z ciężkim zapaleniem płuc COVID-19**

**Efficacy of an immunomodulatory treatment during cytokine release storm
in patients with severe pneumonia COVID-19**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski

Szczecin 2023 r.

Pragnę serdecznie podziękować Panu Profesorowi Miłoszowi Parczewskiemu oraz Panu Doktorowi Boguszowi Aksak-Wąsowi za cenne uwagi, wszechstronną pomoc, która była ogromnym wsparciem podczas pisanie tej pracy a także za cały poświęcony czas.

Jednocześnie chciałem podziękować całemu zespołowi Samodzielnego Publicznego Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Szczecinie, w szczególności zespołowi Kliniki Chorób Zakaźnych PUM, bez których napisanie niniejszej pracy byłoby niemożliwe.

Spis treści

Spis treści	3
1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	6
1.1 Prace oryginalne	6
2. Zestawienie publikacji	8
3. Wstęp	9
3.1 SARS-CoV-2 – informacje ogólne	9
3.2 Warianty SARS-CoV-2	12
3.3 Przebieg naturalny COVID-19	17
3.4 Odpowiedź immunologiczna i burza cytokin	19
3.5 Leczenie zakażenia SARS-CoV-2 – informacje ogólne	21
3.5.1 Tocilizumab – charakterystyka leku.	23
3.5.2 Alternatywne leki immunomodulujące stosowane w COVID-19	24
3.5.3 Amantadyna – charakterystyka leku.	25
3.5.4 Uzasadnienie przeprowadzonych analiz retrospektywnych	26
4. Cele pracy	28
5. Materiały i metody	29
5.1 Skuteczność tocilizumabu u pacjentów z ciężkim lub krytycznym zajęciem płuc w COVID-19: badanie retrospektywne – Publikacja „Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study”	31
5.2 Stosowanie tocilizumabu u pacjentów, u których doszło do zatorowości płucnej w przebiegu burzy cytokinowej i zapalenia płuc COVID-19 – badanie retrospektywne. Publikacja: „Tocilizumab use among patients who developed pulmonary embolism in the course of cytokine release storm and COVID-19 pneumonia - a retrospective study.”	32
5.3 Poprawa przeżycia na OIT związana ze stosowaniem amantadyny u pacjentów z zapaleniem płuc COVID-19 - badanie retrospektywne. Publikacja: „Improved survival in ICU in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study.”	33
6. Wyniki	36
6.1 Skuteczność tocilizumabu u pacjentów z ciężkim lub krytycznym zajęciem płuc w COVID-19: badanie retrospektywne	36
6.1.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów z COVID-19	36
6.1.2 Dane kliniczne i laboratoryjne dotyczące grupy leczonej TCZ w porównaniu z grupą kontrolną.	37
6.1.3 Czynniki związane z przyjęciem na OIT w analizowanej grupie.	38
6.1.4 Ogólne ryzyko śmiertelności.	41

6.1.5	Śmiertelność związana z tocilizumabem.	44
6.2	Stosowanie tocilizumabu u pacjentów, u których doszło do zatorowości płucnej w przebiegu burzy cytokinowej i zapalenia płuc COVID-19 – badanie retrospektywne.	45
6.2.1	Charakterystyka kliniczna pacjentów z COVID-19.....	45
6.2.2	Dane kliniczne i laboratoryjne dotyczące grupy leczonej TCZ w porównaniu z grupą kontrolną.	46
6.2.3	Ogólne ryzyko śmiertelności	48
6.2.4	Śmiertelność związana z tocilizumabem	49
6.3.	Poprawa przeżycia na OIT związana ze stosowaniem amantadyny u pacjentów z zapaleniem płuc COVID-19 - badanie retrospektywne.	49
6.3.1	Charakterystyka kliniczna pacjentów z COVID-19 i czynniki związane ze śmiertelnością	49
6.3.2	Dane kliniczne i laboratoryjne dotyczące grupy leczonej amantadyną w porównaniu z grupą kontrolną	52
6.3.3	Ogólne wyniki związane z amantadyną	55
6.3.4	Charakterystyka kliniczna pacjentów leczonych tocilizumabem w zależności od przyjmowania amantadyny.....	57
6.3.5	Charakterystyka kliniczna pacjentów leczonych bez tocilizumabu w zależności od przyjmowania amantadyny.....	59
6.3.6	Charakterystyka pacjentów leczonych amantadyną w podziale na dwie grupy ze względu na czas przyjęcia	60
6.3.7	Charakterystyka pacjentów leczonych na oddziale intensywnej terapii przez co najmniej 48 godzin	62
6.3.8	Charakterystyka pacjentów z rozpoznaniem SARS-CoV-2 typu dzikiego w zależności od spożycia amantadyny	63
6.3.9	Charakterystyka pacjentów z rozpoznaniem szczepu alfa wirusa SARS-CoV-2 w zależności od spożycia amantadyny	64
7.	Wnioski.....	66
7.1	Wnioski główne:.....	66
7.2.	Wnioski szczegółowe:	67
8.	Praca oryginalna: Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study.	68
9.	Praca oryginalna: Tocilizumab use among patients who developed pulmonary embolism in the course of cytokine release storm and COVID-19 pneumonia - a retrospective study.	81
10.	Praca oryginalna: Improved survival in ICU in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study.	95
11.	Streszczenie w języku polskim	105

12.	Streszczenie w języku angielskim	108
13.	Piśmiennictwo	111
14.	Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach	119
14.1	Tytuł oryginału: Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study.....	119
14.2.	Tytuł oryginału: Tocilizumab use among patients who developed pulmonary embolism in the course of cytokine release storm and COVID-19 pneumonia - a retrospective study.....	120
14.3.	Tytuł orginału: Improved survival in ICU in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study.....	121

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.

1.1 Prace oryginalne

- Chober Daniel, Aksak-Wąs Bogusz, Bobrek-Lesiakowska Katarzyna, Budny-Finster Anna, Hołda Ewa, Mieżyńska-Kurtycz Joanna, Jamro Grzegorz, Parczewski Miłosz.
Tytuł oryginału: Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study. J. Clin. Med.2022 : vol. 11, nr 9, id. art. 2286,

Impact Factor: 4.964 Punktacja MEiN: 140.000

DOI: 10.3390/jcm11092286
- Chober Daniel, Aksak-Wąs Bogusz, Niścigorska-Olsen Jolanta, Niekrasz Małgorzata, Parczewski Miłosz.
Tytuł oryginału: Tocilizumab use among patients who developed pulmonary embolism in the course of cytokine release storm and COVID-19 pneumonia - a retrospective study. Biomedicines. 2022 : vol. 10, nr 7, id. art. 1581

Impact Factor: 4.757 Punktacja MEiN: 100.000

DOI: 10.3390/biomedicines10071581
- Chober Daniel, Czajkowski Zenon, Aksak-Wąs Bogusz, Dalewska-Kucharczyk Katarzyna, Hołubczak Katarzyna, Karasińska-Milchert Sylwia, Jaremko Mateusz, Skowron Miłosz, Karasińska-Cieślak Malwina, Parczewski Miłosz.
Improved survival in ICU in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study. Int. J. Infect. Dis.

Impact Factor: 12.074 Punktacja MEiN: 100.000

DOI: 10.1016/j.ijid.2022.09.026

2. Zestawienie publikacji

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	21.795	340
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	4	17.082	480
Razem	8	38.877	820

3. Wstęp

3.1 SARS-CoV-2 – informacje ogólne.

Koronawirusy (CoV) należą do rodziny Coronaviridae z rzędu Nidovirales, podzielonej na cztery rodzaje (α , β , γ i δ). SARS-CoV-2 należy do rodzaju β . CoV zawierają co najmniej cztery białka strukturalne: białko kolca (S), białko otoczki (E), białko membranowe (M) i białko nukleokapsydu (N). Białko kolca (S) jest białkiem fuzyjnym, które odpowiada za interakcję z receptorem powierzchniowym komórek, promuje przyczepność gospodarza i fuzję wirusa z błoną komórkową podczas infekcji wirusowej. Białko otoczki nazywane również białkiem płaszcza (E) pełni rolę w formowaniu wirionów. Białko membranowe (M) jest najobficiej występującym białkiem strukturalnym odgrywającym kluczową rolę w kierowaniu etapami składania i uwalniania wirusów poprzez interakcję z białkami strukturalnymi E, S i N. Białko nukleokapsydu (N) bierze udział w modyfikacji procesów komórkowych, replikacji oraz pełni funkcję ochronną dla RNA.[1]

Drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 - SARS-CoV-2) to wirus należący do grupy koronawirusów, odpowiedzialny za ostrą chorobę układu oddechowego COVID-19. Pierwsze informacje o przypadkach zakażenia wśród ludzi pochodzą z listopada 2019 roku z Wuhan w Chinach.[2] SARS-CoV-2 jest wirusem osłonkowym, jego genom jest zbudowany z jednoniciowego RNA o dodatniej polarności.[3] Swoją nazwę zawdzięcza charakterystycznej budowie – każdy wirion ma kulistą strukturę o średnicy 60-140nm otoczoną licznymi wypustkami o średnicy 9-12nm, które stwarzają wrażenie „korony słonecznej”.[4] Podobnie jak pozostałe koronawirusy jego genom składa się z ~ 30 000 nukleotydów co czyni go jednym z największych wirusów RNA.[5]

W transmisji SARS-CoV-2 kluczowym czynnikiem jest przeniesienie wirusa z człowieka na człowieka, jednakże wirus może również infekować i replikować się na wielu żywicielach zwierzęcych, w tym zwierzętach towarzyszących, zwierzętach domowych i hodowlanych. Replikacja w organizmach zwierzęcych może wiązać się z możliwością pojawienia się nowego wariantu wirusa.[6] Pierwsze doniesienia o okresie inkubacji COVID-19 określały średnią 5,5 dnia z przedziałem od 3 do 14 dni.[7] Ta oś czasu zakażenia została skrócona wraz z pojawieniem się nowych, wysoce zakaźnych wariantów. Dla przykładu mediana okresu bezobjawowego dla wariantu Omicron wynosi 3 dni.[8][9] Transmisja jest możliwa zarówno od gospodarzy bezobjawowych, jak i objawowych. Wczesne etapy infekcji wiążą się z najwyższą zdolnością wirusa do replikacji (najwyższa ekspresja wirusa w górnych drogach oddechowych). Zwykle szczyt zakaźności przypada na dwa dni przed i jeden dzień po wystąpieniu objawów, jednak w przypadku wariantu Omicron szczyt wydalania zakaźnych wirionów może być opóźniony do 3-6 dni po początkowych objawach. Zakaźność wirusa słabnie po 7-10 dniach, z wyjątkiem pacjentów z niedoborem odporności, u których notowano zakaźność przekraczającą 4 tygodnie.[3] Należy podkreślić, że wirusowe RNA może być wykrywalne metodami molekularnymi nawet kilka tygodni po zakażeniu i nie jest markerem zakaźności pacjenta.

Przebieg chorobowy w zakażeniu SARS-CoV-2 jest zmienny, obraz choroby obejmuje pełen zakres od bezobjawowego do ciężkiej niewydolności oddechowej. Objawy infekcji zależą od nasilenia replikacji wirusa, tropizmu komórkowego oraz odpowiedzi gospodarza. Powszechnie wiadomo, że białko S SARS-CoV-2 wiąże się z enzymem konwertującym angiotensynę 2 (ACE2), który jest znanym receptorem o kluczowym znaczeniu dla większości komórek gospodarza.[10] ACE2 ulega silnej ekspresji na komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych, enterocytach jelitowych lub śródbłonku naczyń. Jego ekspresja stwierdzona

została także w szeregu innych tkanek, w tym nerkach (komórki kanalikowe i kłębuszkowe), tkance tłuszczowej, sercu (miocyty, perocyty i epicardium), układzie nerwowym (neurony i komórki glejowe), męskim i żeńskim układzie rozrodczym (głównie komórki Leydiga i Sertoliego), skórze (naskórek), tarczycy, trombocytach, makrofagach, a nawet trzustkowych wysp Langerhansa. Ten tropizm komórkowy oparty na ekspresji ACE2 określa kliniczny przebieg choroby.[10]

W dotychczas opublikowanej literaturze opisywane są dwa szlaki wykorzystywane przez wirusa, aby wniknąć do komórek gospodarza. Wczesny zależny od transbłonowej proteazy, serynowej (TMPRSS2) oraz późny nazywany szlakiem endolizosomalnym. Pierwszy to szlak zależny od aktywacji TMPRSS2 gospodarza, umożliwiającej interakcję białka S z receptorem.[11][12] Drugim, alternatywnym szlakiem wnikania SARS-CoV-2 do komórek gospodarza jest szlak endocytarny z internalizacją do endosomów za pośrednictwem katepsyny.[11] W szlaku endolizosomalnym zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnalizacyjne po związaniu z receptorami na powierzchni komórki mogą zostać pochłonięte przez endocytozę. Te endocytozowane pęcherzyki mogą dojrzewać i różnicować się we wczesne endosomy (pH 5,5–6,0), późne endosomy (pH 5,5–5,0), lizosomy (pH 5,0–4,5) oraz endolizosomy (proces fuzji lizosomów i późnych endosomów). Różne substancje markerowe mogą wcześniej różnicować się od późnych endosomów, w tym Rab4 (wczesne endosomy) oraz Rab5 i Rab7 (późne endosomy). Zarówno wczesne, jak i późne endosomy regulują procesy recyklingu, które zwracają cząsteczki składowe z powrotem do błon plazmatycznych. Oba szlaki wykorzystywane są zamiennie, zależnie od ekspresji TMPRSS2: w tkankach o wysokiej ekspresji preferencyjnie stosuje się szlak wczesny, natomiast w przypadku braku proteazy wykorzystywany jest szlak późny. Skuteczność wnikania wirusa jest zwiększana przez ludzką furynę. Analizy genomowe SARS-CoV-2 ujawniły, że jego białko

S różni się od białka innych CoV strukturą posiadając miejsce cięcia aktywowane przez furynę. Przecięcie białka S wzmacnia jego tropizm do komórek nabłonka dróg oddechowych. Furyna ulega ekspresji w wielu ludzkich tkankach w tym w płucach, wątrobie i jelicie cienkim, co oznacza, że wirus może potencjalnie atakować wiele narządów.[13] Po przecięciu białka S błony strukturalne wirusa łączą się z błoną endosomalną, co ułatwia wnikięcie nukleokapsydu do cytoplazmy. W cytoplazmie wirus uwalnia RNA, które jest transkrybowane przez wirusową polimerazę RdRP, po czym następuje translacja do białek wirusowych, w tym błony strukturalnej (M), kolca (S) i E. Cząstki wirusa są następnie składane, pakowane i uwalniane przez egzocytozę. Replikacja wirusa powoduje ujemną regulację ACE2, co z kolei prowadzi do degradacji angiotensyny II, produkcji angiotensyny 1-7 i aktywacji receptora, związanego z ujemną regulacją angiotensyny II, za pośrednictwem receptora angiotensyny II typu 1 (AT1R). Aktywacja AT1R jest jednym z mechanizmów ostatecznie prowadzących do ostrego uszkodzenia płuc.[14] Mechanizm działania wirusa SARS-CoV-2 w tym kontekście jest bardzo podobny do obserwowanego w SARS-CoV.[12]

3.2 Warianty SARS-CoV-2

Istnieje wiele wariantów SARS-CoV-2, wirusa wywołującego chorobę koronawirusową 2019 (COVID-19). Stwierdzono, że niektóre z nich mają szczególne znaczenie ze względu na ich potencjał do zwiększonej transmisji, zwiększoną zjadliwość lub zmniejszoną skuteczność szczepionek przeciwko nim. Różnorodność wariantów oraz ich cechy szczególne przyczynia się do kontynuacji pandemii COVID-19.

Pierwsze dostępne sekwencje genetyczne SARS-CoV-2 zostały wyizolowane od pacjentów w Wuhan w grudniu 2019 r. Chińscy naukowcy porównali te wczesne sekwencje genetyczne ze szczepami koronawirusa nietoperza i łuskowca, aby odzwierciedlić rodowód ludzkiego

koronawirusa. Dzięki typ genomu (aktualnie znany jako wariant WUHAN) oznaczono symbolem „S”, a jego dominujący typ pochodny oznaczono „L”, aby odzwierciedlić zmiany zmutowanych aminokwasów.[15] Dalsza ewolucja doprowadziła do zróżnicowania się linii wirusowych w kolejne warianty w tym oznaczone w 2021 r. przez WHO warianty alfa, beta, gamma, delta i omikron. [16][17] . Na początku pandemii stosunkowo niska liczba infekcji skutkowała mniejszym prawdopodobieństwem mutacji genomu wirusa, a tym samym mniejszymi możliwościami występowania zróżnicowanych wariantów. Ponieważ występowanie wariantów było rzadsze, obserwacja mutacji białka S w regionie domeny wiążącej receptor (RBD) oddziałującej z ACE2 również nie była częsta.[18] Z biegiem czasu ewolucja genomu SARS-CoV-2 za pomocą losowych mutacji doprowadziła do wyselekcjonowania wariantów genetycznych. Kiedy w populacji pojawia się nowy wariant określa się go mianem „wyłaniającego się wariantu”(ang. Emerging variant – EV. Do konsekwencji pojawienia się nowych wariantów należy:

- Zwiększona zdolność do transmisji
- Zwiększona zachorowalność
- Zwiększona śmiertelność
- Zdolność do uniknięcia wykrycia za pomocą testów diagnostycznych
- Zmniejszona wrażliwość na leki przeciwwirusowe
- Zmniejszona wrażliwość na dotychczasowe przeciwciała
- Zdolność do zarażenia zaszczepionych osób
- Zwiększone ryzyko rozwinięcia powikłań takich jak wieloukładowy zespół zapalny czy Long-COVID
- Zwiększone powinowactwo do określonych grup demograficznych lub klinicznych

Warianty, które spełniają jedno lub więcej z tych kryteriów mogą zostać oznaczone jako „warianty w trakcie obserwacji” (ang. Variants under Investigation – Vul) lub jako „warianty będące przedmiotem zainteresowania” (ang. Variants of Interest – Vol). Rangę nadaje się do czasu weryfikacji i zatwierdzenia w/w właściwości. Charakterystyczną cechą wszystkich Vol jest to, że są przyczyną zwiększonego odsetka przypadków lub unikalnych klastrow epidemii mając przy tym ograniczone rozpowszechnianie jedynie na poziomie krajowym.

Rozpowszechnianie wariantu poza obręb kraju powoduje podniesienie rangi wariantu do „wariantu budzącego obawy” (ang. Variant of Concern -VoC). W przypadku pojawienia się dowodów na znaczne ograniczenie skuteczności środków zapobiegawczych lub interwencyjnych wariant zyskuje rangę „wariantu o poważnych konsekwencjach” (ang. Variant of High Consequence -VoHC).[19]. Dodatkową kategorię stanowią „warianty będące pod obserwacją” (ang. Variants Being Monitored – VBM) które obejmują:

- linie, których dane wskazują na potencjalny lub wyraźny wpływ na dostępne medyczne środki zaradcze.
- linie, które powodują cięższą chorobę lub zwiększoną transmisję, ale nie są już wykrywane.
- linie wcześniej oznaczone jako VOI, VOC lub VOHC, które obecnie krążą na bardzo niskim poziomie w Stanach Zjednoczonych.[19]

Lista VOC wg WHO:

- Alfa - linia B.1.1.7 [20]– nazywany również wariantem brytyjskim. Po raz pierwszy wykryty w październiku 2020 roku w Wielkiej Brytanii. Wariant ten na przełomie stycznia i lutego 2021r. stał się wariantem dominującym w całej Europie. W Polsce stał się dominującym w skali kraju 16 marca 2021r. kiedy jego

udział w krajowych badaniach przekroczył 52%. W ujęciu regionalnym wariant przekroczył 70% dla województw warmińsko-mazurskiego i pomorskiego w dniach 22–23 lutego, a nawet osiągnął 90% dla województwa wielkopolskiego 17 marca. Wariant ten w porównaniu ze szczepem dzikim wiązał się ze zwiększoną transmisją (+29% [24–33%]), częstością hospitalizacji (+52% [47–57%]) oraz śmiertelnością (+59% [44–74%]).[21]

- Beta - linia B.1.351 - po raz pierwszy wykryto go w zatoce Nelsona Mandeli w RPA w grudniu 2020 roku. Wariant ten cechował się zwiększoną transmisją w porównaniu do szczepu dzikiego (+25% [20–30%]). Brak wiarygodnych danych odnośnie częstości hospitalizacji oraz śmiertelności ze względu na zbyt małą ilość potwierdzonych zakażeń.[21]
- Gamma (P.1) - ten wariant SARS-CoV-2 został po raz pierwszy wykryty przez japoński Narodowy Instytut Chorób Zakaźnych 6 stycznia 2021 r. u czterech osób, które przybyły do Tokio z Brazylii cztery dni wcześniej. Wariant ten w porównaniu ze szczepem dzikim wiązał się ze zwiększoną transmisją (+38% [29-48%]), oraz śmiertelnością (+50% [20-90%]). Częstość hospitalizacji była prawdopodobnie większa.[21]
- Delta - linia B.1.617.2 - Po raz pierwszy wykryto go w Indiach pod koniec 2020 r. Swoje oznaczenie wariant Delta otrzymał 31 maja 2021 r. i rozprzestrzenił się w ponad 179 krajach do 22 listopada 2021 r. Wariant ten w porównaniu ze szczepem dzikim wiązał się ze zwiększoną transmisją (+97% [76-117%]), częstością hospitalizacji (+85% [39-147%]) oraz śmiertelnością (+137% [50-230%]). [21]

- Epsilon - linie B.1.427 oraz B.1.429 – wariant wykryty w Kalifornii w czerwcu 2020 roku. Wariant zdominowany przez wariant Alfa. Przez krótki czas należał do wariantów zainteresowania WHO.
- Zeta - linia P.2 – wariant wykryty w Rio w Janeiro. Przez krótki czas należał do wariantów zainteresowania WHO.
- Eta - linia B.1.525 - pierwsze przypadki wykryto w grudniu 2020 r. w Wielkiej Brytanii i Nigerii. Przez krótki czas należał do wariantów zainteresowania WHO.
- Iota - linia B.1.526 - wariant został wykryty w co najmniej 48 stanach USA i 18 krajach. Wzorem odzwierciedlającym Epsilon, wariant Iota początkowo był w stanie osiągnąć stosunkowo wysoki poziom w niektórych stanach, ale do maja 2021 roku została wyparty przez bardziej przenośne Delta i Alpha. Przez krótki czas należał do wariantów zainteresowania WHO.
- Kappa - linia B.1.617.1 - po raz pierwszy został wykryty w Indiach w grudniu 2020r. Do końca marca 2021 r. wariant Kappa stanowił ponad połowę zgłoszonych sekwencji z Indii. Przez krótki czas należał do wariantów zainteresowania WHO.
- Mu - linia B.1.621 - został po raz pierwszy wykryty w Kolumbii w styczniu 2021 r. i został wskazany przez WHO jako wariant zainteresowania 30 sierpnia 2021 r. Potwierdzono ogniska epidemiczne w Ameryce Południowej i Europie.
- Aktualnie krążącym VoC SARS-CoV-2 jest Omicron (linia B.1.1.529). Został on po raz pierwszy zgłoszony do Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z Republiki Południowej Afryki w dniu 24 listopada 2021 r. Porównując go z wariantem Delta stwierdzono znaczący spadek ilości hospitalizacji (-57% [59-61%]) oraz śmiertelności (-63% [59-74%]), natomiast ryzyko transmisji jest wyższe.[21]

3.3 Przebieg naturalny COVID-19

Zakres objawów klinicznych waha się od zakażenia bezobjawowego do zagrażającego życiu. W zależności od kohorty częstość bezobjawowych, łagodnych objawów lub przypadków z krótkotrwałymi, przemijającymi objawami wynosi od 25 do 50%. Dane te są poparte różnymi metaanalizami, z których wynika, że co najmniej jedna trzecia obserwowanych zakażeń była bezobjawowa. Serologiczne badania kohortowe wykazały, że nawet >50% przypadków mogło być nieświadomych wcześniejszego kontaktu z wirusem. Pierwsze dane z Chin wykazały, że większość pacjentów ma łagodne do umiarkowanych objawy choroby i dlatego może być leczona w warunkach ambulatoryjnych. U pacjentów bezobjawowych lub z łagodnymi objawami duszność zwykle nie występuje, a wysycenie krwi tlenem pozostaje prawidłowe ($SpO_2 \geq 95\%$). W obrazie radiologicznym zmiany zapalne nie przekraczają 10% objętości płuc[22].

U pacjentów objawowych z przynajmniej umiarkowanym zaawansowaniem choroby stwierdza się kliniczne i radiologiczne objawy łagodnego do umiarkowanego śródmiąższowego zapalenia płuc ze spadkiem wysycenia krwi tlenem ($SpO_2 < 94\%$). U tych pacjentów występuje gorączka, zmęczenie i inne objawy pozapłucne, a także suchy kaszel i duszność. W obrazie radiologicznym zmiany zapalne zajmują między 10 a 50% miąższu płucnego.

Ciężki przebieg choroby wiąże się z niewydolnością oddechową w której dominuje duszność, tachypnoe z częstością oddechów powyżej 30/min, istotny spadek wysycenia krwi tlenem ($SpO_2 < 90\%$). W badaniach radiologicznych dominują zmiany zapalne, które obejmujące ponad 50% pól płucnych.

Zespół ostrej niewydolności oddechowej rozwija się u około 5% pacjentów. Przebiega z krytyczną niewydolnością oddechową wymagającą mechanicznej wentylacji, często powikłana wstrząsem septycznym i/lub niewydolnością wielonarządową.

Przebieg choroby jest czteroetapowy. W **stadium pierwszym** objawy są łagodne lub nie występują. Wysycenie hemoglobiny tlenem bez suplementacji tlenu wynosi >94% przy pomiarze za pomocą pulsoksymetru. Chorzy nie wymagają hospitalizacji. Objawy są mało specyficzne, zależą od wariantu SARS-CoV-2, dominują kaszel, katar, bóle głowy i zatok, zmęczenie, stany podgorączkowe i gorączka, bóle gardła, bóle mięśniowe, jadłowstręt i brak apetytu, nudności i wymioty, biegunka, zaburzenia smaku i węchu.[23] W **stadium drugim** pojawiają się kliniczne i radiologiczne objawy śródmiąższowego zapalenia płuc o łagodnym lub umiarkowanym nasileniu. Spadkom saturacji <94% przy oddychaniu tlenem atmosferycznym towarzyszy uczucie duszności, nasilające się przy kaszlu. W dalszym ciągu utrzymuje się gorączka oraz zmęczenie, objawy pozapłucne. W **stadium trzecim** dominują objawy niewydolności oddechowej – duszność, tachypnoe >30/min, SpO₂ <90% przy braku suplementacji tlenem. Radiologicznie dominują zmiany zapalne w płucach zajmujące ~50% miąższu płucnego.[24] W tym stadium choroby u 15% chorych może rozwinąć się burza cytokinowa. [25] Najczęstszymi pozapłucnymi manifestacjami choroby są objawy neurologiczne będące najczęściej efektem incydentów ostrej choroby naczyniowo-mózgowej, zapalenia mózgu, zespołu Guillaina i Barrego.[26] **Stadium czwarte** będące ARDS rozwija się u ~5% chorych. Stadium temu często towarzyszy niewydolność wielonarządowa oraz objawy wstrząsu septycznego. Incydenty kardiologiczne takie jak zaburzenia rytmu serca, ostre zespoły wieńcowe, zapalenie mięśnia sercowego, niestabilność hemodynamiczna, niewydolność krążenia są stwierdzane u ponad jednej piątej pacjentów przyjmowanych do Oddziałów Intensywnej Terapii.[27]

3.4 Odpowiedź immunologiczna i burza cytokin

Zakażenie SARS-CoV-2 powoduje wydzielanie znacznej ilości zapalnych cytokin i chemokin. Wysoki poziom IL-2 (interleukiny), IL-7, IL-10, G-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów), TNF (czynnik martwicy nowotworów), CXCL10 (CXC-ligand chemokiny 10), MCP1 (białko chemotaktyczne monocytów -1) i MIP1 α (białko zapalne makrofagów 1 alfa) w surowicy obserwowano u pacjentów z ciężkim COVID-19, co prowadziło do hiperreaktywności układu odpornościowego gospodarza.[12] U pacjentów z COVID-19 stwierdzono śródmiąższowe nacieki zapalne w płucach z dominacją jednojądrzastych limfocytów i ciężką limfopenię z nadaktywnymi limfocytami T we krwi obwodowej. Na poziomie komórkowym u pacjentów z ciężkim COVID-19 uwalnianie cytokin prozapalnych prowadzi do limfopenii, dysfunkcji limfocytów oraz anomalii granulocytów i monocytów.[28]

Burza cytokinowa związana z COVID-19 (CS) jest unikalną formą odpowiedzi hiperzapalnej związaną z zakażeniem SARS CoV-2.[12] Pierwszy raz CS opisano w 1993 roku w związku z chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD).[29] Od tego czasu wielokrotnie odnotowano jej wystąpienie w przebiegu chorób zakaźnych i niezakaźnych, takich jak:

- Zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS) w przebiegu infekcji grypy H1N1, H5N1, SARS-CoV-1, Grypy typu B, paragrypy;
- Infekcje wirusami EBV i CMV;
- Sepsa o etiologii paciorkowcowej z grupy A;
- Zespół hemofagocytowy;
- Zespół aktywacji makrofagów;

- Gorączka krwotoczna Ebola;
- Ospa prawdziwa;
- Zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej.[30][31][32]

Burza cytokinowa spowodowana nadmiernym wydzielaniem cytokin prowadzi do ostrej ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej. Początek burzy cytokinowej przypomina zespół ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej (SIRS) z brakiem równowagi między odpowiedziami prozapalnymi i przeciwzapalnymi. Z definicji odpowiedź zapalna ma na celu ochronę gospodarza przed szkodliwymi bodźcami i jest mechanizmem niezbędnym do powrotu do zdrowia. Jednak nadaktywna odpowiedź zapalna, jak w przypadku zespołu burzy cytokin, może powodować rozległe uszkodzenia tkanek i jest bezpośrednio związana ze śmiertelnością.[33] Cytokiny prozapalne, takie jak TNF- α , IL-6 i IL-12, są wytwarzane przez szereg komórek odpornościowych, takich jak limfocyty B, limfocyty T, makrofagi, komórki dendrytyczne czy monocyty w wyniku zwiększonej ekspresji i aktywacji TLR7 i TLR8 w tkance płuc.[34] IL-6 jest aktywatorem szlaku JAK/STAT3 podczas zapalenia. Badania z 2020 roku wykazały, że szlak IL-6-JAK-STAT3 jest silnie powiązany z nasileniem objawów COVID-19. Burza cytokin jest charakterystyczna dla zespołu aktywacji makrofagów (MAS), ale w zakażeniu SARS-CoV-2 parametry makrofagów różnią się od parametrów występujących w klasycznym MAS. U pacjentów z COVID-19 obserwowano zwiększoną aktywność markerów aktywacji monocytów sCD14 i sCD163, podczas gdy monocyty silnie wyrażały receptor ACE2 i indukowały ekspresję IL-6, przyczyniając się w ten sposób do nasilenia burzy cytokinowej.[35] Burza cytokinowa u pacjentów z COVID-19 jest również związana z masywnym naciekiem komórek jednojądrzastych we wszystkich narządach (w szczególności w płucach), zakrzepicą żylną i niedotlenieniem tkanek oraz prowadzi do uszkodzeń

strukturalnych pęcherzyków i dysfunkcji wentylacji płuc poprzez uszkodzenie błony śluzowej naczyń włosowatych płuc i promowanie obrzęku pęcherzyków płucnych. CS jest w dużej mierze odpowiedzialny za zespół dysfunkcji wielu narządów (MODS), którego głównymi składnikami są ARDS i/lub SIRS. Zwykle CS rozwija się w późniejszych stadiach infekcji, ponad 5-7 dni od początkowych objawów. Ponieważ IL-6 i IL-1 są istotnymi aktywatorami CS i kaskady zapalnej, te poziomy IL-6 stały się laboratoryjnym markerem CS.[36]

3.5 Leczenie zakażenia SARS-CoV-2 – informacje ogólne.

Leczenie zakażeń SARS-CoV-2 powinno być uzależnione od stadium choroby, stanu klinicznego chorego oraz czynników ryzyka rozwinięcia ciężkiej postaci COVID-19. Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych rekomenduje postępowanie terapeutyczne opisane w Tabeli 1.[37]

Tabela 1. Zalecane przez PTEiLChZ postępowanie farmakologiczne w zakażeniach SARS-CoV-2

Stadium choroby	Leczenie podstawowe	Leczenie wspomagające
stadium 1 – skąpoobjawowe	• molnupirawir stosowany <i>p.o.</i> 2×dz. 800 mg przez 5 dni • nirmatrelwir/rytonawir stosowany <i>p.o.</i> 2×dz. 300/100mg przez 5 dni • remdesiwir stosowany <i>i.v.</i> 1×dz. przez 3 dni, dawka nasycająca 1. dnia 200 mg, potem dawka podtrzymująca 100 mg przez 2 dni • sotrowimab* stosowany w pojedynczej infuzji <i>i.v.</i> zawierającej 500 mg • kasiriwimab/imdewimab* stosowany <i>i.v.</i> lub <i>s.c</i> w pojedynczej dawce 1200 mg (600/600 mg)	• budesonid wziewnie w dawce 2×dz. 800 µg • leki przeciwgorączkowe • nawodnienie doustne • leki przeciwkaszlowe w przypadku uporczywego kaszlu
stadium 2 – pełnoobjawowe	• molnupirawir stosowany <i>p.o.</i> 2×dz. 800 mg przez 5 dni • nirmatrelwir/rytonawir stosowany <i>p.o.</i> 2×dz. 300/100mg przez 5 dni • remdesiwir stosowany <i>i.v.</i> 1×dz. przez 5 dni, dawka nasycająca 1. dnia	• heparyna drobnocząsteczkowa w dawce profilaktycznej • deksametazon do rozważenia, ale tylko u pacjentów otrzymujących

	200 mg, potem dawka podtrzymująca 100 mg przez 2 dni • sotrowimab* stosowany w pojedynczej infuzji <i>i.v.</i> zawierającej 500 mg⁵⁵ • kasirwimab/imdewimab* stosowany <i>i.v.</i> lub <i>s.c.</i> w pojedynczej dawce 1200 mg (600/600 mg)	leki przeciwwirusowe • antybiotykoterapia w przypadku wtórnych zakażeń bakteryjnych • leczenie objawowe • tlenoterapia • nawodnienie doustne lub dożylne
stadium 3 - z niewydolnością oddechową	• tocilizumab w pojedynczym wlewie <i>i.v.</i> 8 mg/kg; w razie braku poprawy można podać 2. dawkę po 8–24 godz. • anakinra w dawce 100 mg <i>s.c.</i> 1xdz. przez 10 dni; • baricytynib <i>p.o.</i> 4 mg/d do końca hospitalizacji, ale nie dłużej niż 14 dni, • Fosforan deksametazonu podawany <i>i.v.</i> w dawce dziennej 6-8 mg przez 7-10 dni	• heparyna drobnocząsteczkowa w dawce profilaktycznej, którą można zwiększyć w uzasadnionych przypadkach • antybiotykoterapia w przypadku wtórnych zakażeń bakteryjnych • leczenie objawowe • tlenoterapia nisko-/wysokoprzepływową • nawodnienie dożylne
stadium 4 - zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS)	• fosforan deksametazonu podawany <i>i.v.</i> w dawce dziennej 12mg^c przez 7-10 dni; • tocilizumab w pojedynczym wlewie <i>i.v.</i> 8 mg/kg; w razie braku poprawy można podać 2. dawkę po 8–24 godz.	• tlenoterapia wysokoprzepływową • wentylacja nieinwazyjna • wentylacja inwazyjna • VV ECMO u wybranych chorych • heparyna drobnocząsteczkowa w dawce profilaktycznej, którą można zwiększyć w uzasadnionych przypadkach • nie zaleca się empirycznej antybiotykoterapii, o ile nie ma cech zakażenia bakteryjnego

Źródło: Zalecenia dotyczące postępowania w zakażeniach SARS-CoV-2 Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych z 23 lutego 2022 roku

*Działanie przeciwciał monoklonalnych na aktualnie krążące subwarianty linii Omicron jest ograniczone.

Zgodnie z zaleceniami PTEiLChZ leczenie immunomodulacyjne zarezerwowane jest dla trzeciego i czwartego stadium choroby. Objawy pojawiające się na początku 2. tygodnia

choroby związane z narastającą dusznością oraz masywną redukcją SpO₂ poniżej 90% mogą sugerować początek rozpoczynającej się burzy cytokinowej.

3.5.1 Tocilizumab – charakterystyka leku.

Tocilizumab należy do grupy leków immunosupresyjnych, inhibitorów interleukin o kodzie ATC: L04AC07. Wiąże się on swoiście z receptorami IL-6 związanymi z błonami komórkowymi jak i tymi rozpuszczalnymi hamując przekazywanie sygnału przez błony komórkowe. Lek ten z powodzeniem stosowany był w leczeniu RZS, u których po wdrożeniu leczenia obserwowano szybkie zmniejszenie stężenia białka C-reaktywnego (CRP), szybkości osadzenia Biernackiego, stężenia fibrynogenu oraz osoczowego amyloidu A (SSA). U chorych leczonych tocilizumabem stężenie CRP normalizowało się w ciągu 7-14 dni od wdrożenia i utrzymywało się przez cały czas leczenia. Skuteczność leku udowodniono również w leczeniu wielostawowego młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (wMIZS), olbrzymiokomórkowego zapalenia tętnic (GCA) oraz w zespołach uwalniania cytokin (CRS) związanych z terapią komórkami T CAR (tisagenlecleucel i aksykabtagen cytoleucel) w leczeniu złośliwych nowotworów krwi.

Stosowanie tocilizumabu u pacjentów z zapaleniem płuc o etiologii COVID-19 wskazane jest jedynie u dorosłych leczonych ogólnie kortykosteroidami i wymagających tlenoterapii uzupełniającej lub wentylacji mechanicznej. Na podstawie prowadzonych badań nie ustalono skuteczności leku u chorych z COVID-19, u których nie stwierdza się zwiększonego stężenia CRP. Leku należy podawać w koadministracji z glikokortykosteroidami, ponieważ nie można wykluczyć zwiększenia śmiertelności w przypadku monoterapii.

Zgodnie z obowiązującymi w trakcie trwania badania wytycznymi Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych obraz chorobowy sugerujący CRS ze stwierdzoną jednocześnie istotną elewacją stężenia IL-6 ($>100\text{pg/ml}$) uzasadnia podanie tocilizumabu. Tocilizumab jako przeciwciało monoklonalne działające przeciw receptorowi IL-6 redukuje ryzyko przyjęcia do OIT. Zgodnie z charakterystyką produktu leczniczego lek nie powinien być stosowany u pacjentów:

- z bezwzględną ilością neutrofilów $<2000/\text{ul}$;
- małopłytkowością $<50\text{ tyś}/\text{ul}$;
- aktywnością aminotransferazy alaninowej przekraczającą 5-krotnie górną granicę normy.

3.5.2 Alternatywne leki immunomodulujące stosowane w COVID-19.

Do leków stosowanych alternatywnie do tocilizumabu należą anakinra oraz baricytynib. Anakinra jest antagonistą receptora IL-1, należy do grupy leków immunosupresyjnych o kodzie ATC: L04AC. Lek ten jest wytwarzany metodą rekombinacji DNA w systemie ekspresji genów *E. coli*. Działa on poprzez hamowanie wiązania z receptorami IL-1RI drogą kompetycyjną. U pacjentów z COVID-19 progresja od zapalenia płuc do ARDS w dużej mierze zależy od wczesnego uwalniania Interleukiny 1(IL-1) z zakażonych wirusem komórek nabłonka płuc. Jego stosowanie w leczeniu COVID-19 zaleca się u pacjentów ze zwiększonym do przynajmniej 6 ng/ml stężeniem rozpuszczalnego receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu (su- PAR). Leczenie powinno zostać odroczone do momentu, w którym pacjent wymaga nieinwazyjnej lub inwazyjnej wentylacji mechanicznej lub ECMO – głównie ze względu na brak wystarczających dowodów dotyczących skuteczności.

Baricytynib będący wybiórczym i odwracalnym inhibitorem kinaz JAK1 i JAK2, należy do grupy leków immunosupresyjnych o kodzie ATC: L04AA. Ze względu na brak wystarczających danych potwierdzających skuteczność może być stosowany jedynie jako lek z kategorii off-label po uzyskaniu zgody pacjenta.

3.5.3 Amantadyna – charakterystyka leku.

Chlorek amantadyny nie znajduje się na liście leków rekomendowanych w leczeniu infekcji SARS-CoV-2. Jej potencjalne działanie przeciwwirusowe w leczeniu infekcji SARS-CoV-2 zostało wykluczone, natomiast budziło długotrwałe kontrowersje w związku ze stosowaniem leku bez odpowiednich badań klinicznych. Również potencjalne działanie immunomodulacyjne wymaga przeprowadzenia dalszych badań, w tym randomizowanego badania klinicznego.

Pierwsze doniesienia o możliwych zastosowaniach leku pojawiły się już latach 60 ubiegłego wieku.[38] Po wstępnych doniesieniach o właściwościach przeciwwirusowych amantadyna została dopuszczona do stosowania zarówno w profilaktyce jak i leczeniu zakażenia wirusem grypy typu A.[39] Obecnie lek wycofany z zaleceń leczenia grypy ze względu na uniwersalną oporność na białko wirusowe M2.[40]

Amantadyna jest obecnie stosowana zgodnie zaleceniami neurologicznymi jako neurostymulant. Posiada on zdolność od przenikania bariery krew-mózg i osiągnięcia wysokiego stężenia w płynie mózgowo-rdzeniowym.[39] Potrafi modulować aktywność dopaminy poprzez zwiększanie jej pozakomórkowego uwalniania oraz blokowanie wychwyty zwrotnego.[41] Działa jako agonista receptora σ_1 , przez co reguluje działanie dopaminergiczne.[42] Ponadto amantadyna niekompetycyjnie hamuje receptor n-metylo-d-asparagianu (NMDA) przez co pośredniczy w stymulacji uwalniania acetylocholin. [43]

Amantadyna była z powodzeniem stosowana w schorzeniach związanych z szerokorozumianymi zmianami świadomości, pamięci i funkcji poznawczych.[44]–[46] Zwiększa poziom dopaminy, zwłaszcza w płacie czołowym wykazując jednocześnie umiarkowane działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie wydzielania czynników prozapalnych w obrębie mikrogleju.[47] Według danych uzyskanych z badań nad urazowym uszkodzeniem mózgu, neurostymulanty, takie jak amantadyna, sprzyjają wybudzeniu ze śpiączki i mogą zwiększać udział pacjentów we wczesnej rehabilitacji.[48] Dostępne badania wskazują na korzystny wpływ terapii amantadyną na stan świadomości hospitalizowanych na OIT pacjentów z urazowym uszkodzeniem mózgu, u których leczenie rozpoczęto krótko po urazie.[49] Wykazano również, że wczesne leczenie amantadyną wiązało się ze spadkiem śmiertelności wśród leczonych zachowawczo pacjentów z zawałem dużej półkuli.[50] Wreszcie ostatnio zasugerowano, że szybkie rozpoczęcie leczenia amantadyną podczas wczesnej opieki nad pacjentami przyjętymi z powodu udaru niedokrwienego, krwotoku śródmózgowego lub krwotoku podpajęczynówkowego wiąże się z lepszym rokowaniem.[51]

3.5.4 Uzasadnienie przeprowadzonych analiz retrospektywnych

Ponieważ dane dotyczące wpływu leczenia immunomodulacyjnego szczególnie tocilizumabem na przeżycie osób z ciężkimi postaciami COVID-19 pozostają w centrum zainteresowań klinicznych w ramach pracy doktorskiej podjąłem się analizy przeżycia związanej z leczeniem tocilizumabem w szczególnych grupach pacjentów – jak opisano w celach pracy poniżej. Dodatkowo, w związku z kontrowersjami związanymi ze stosowaniem Amantadyny w leczeniu zakażenia SARS CoV-2, która jest jednocześnie stosowana w formie dożylniej jako neurostymulant u pacjentów z ARDS wymagających wentylacji mechanicznej podjąłem się retrospektywnej analizy efektów leczenia tym lekiem. Należy podkreślić, że lek

ten **nie był stosowany jako leczenie przeciwwirusowe** lecz zgodnie ze standardowym wskazaniem jakim są zaburzenia czuwania i stanu świadomości o różnej etiologii w warunkach szpitalnych.– zgodnie z rejestracją i charakterystyką produktu leczniczego. Opisane prace nie były badaniami interwencyjnymi, a leki stosowano wyłącznie zgodnie z praktyką kliniczną i charakterystykami produktów.

4. Cele pracy

Cele główne pracy:

- Ocena wpływ leczenia tocilizumabu na śmiertelność w grupie pacjentów z ciężkim (50-75%) i krytycznym (>75%) zajęciem płuc w przebiegu COVID-19.
- Ocena wpływu tocilizumabu na śmiertelność u pacjentów z potwierdzoną ostrą zatorowością płucną i zapaleniem płuc COVID-19.
- Ocena wpływu terapii amantadyną na śmiertelność pacjentów leczonych na OIT z powodu COVID-19.

Cele szczegółowe pracy:

- Identyfikacja czynników ryzyka przyjęcia na OIT i zgonu wśród pacjentów z ciężkim (50-75%) i krytycznym (>75%) zajęciem płuc w przebiegu COVID-19.
- Ocena czynników związanych ze zwiększoną śmiertelnością w OIOM u pacjentów z COVID-19.
- Identyfikacja czynników ryzyka związanych z wyższą śmiertelnością u pacjentów z zatorowością płucną i COVID-19.

5. Materiały i metody

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Pomorskim Uniwersytecie Medycznym (KB-0012/92/2020). Jak opisano powyżej, badania nie były związane z interwencyjnym stosowaniem leków i było analizą retrospektywną.

Badanie powstało na bazie dużego zbioru danych o pacjentach obserwowanych w Samodzielnym Publicznym Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym w Szczecinie. Baza danych zawierała informację o 4 287 pacjentach hospitalizowanych z zakażeniem SARS-CoV-2. W badaniu zebraliśmy dane kliniczne z dokumentacji medycznej (wiek, płeć, historię leczenia, czas pobytu w szpitalu, czas trwania leczenia na OIT, statystyki przeżycia, wyjściowe poziomy utlenowania krwi, wyniki tomografii komputerowej klatki piersiowej oraz wybrane parametry laboratoryjne).

W każdym przypadku wykonano badanie PCR potwierdzające zakażenie SARS-CoV-2 przy użyciu wymazów z nosogardła.

Wszyscy pacjenci zostali przyjęci do szpitala na podstawie oceny lekarzy dyżurnych szpitalnego oddziału ratunkowego/oddziału chorób zakaźnych. Przy przyjęciu do szpitala brano pod uwagę stan ogólny, choroby współistniejące oraz wyniki badań laboratoryjnych i obrazowych. Wszyscy pacjenci byli leczeni zgodnie z aktualną wiedzą i wytycznymi Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Specjalistów Chorób Zakaźnych (PTEiLChZ)[52][23] otrzymując deksametazon, antybiotyki, profilaktycznie lub leczniczo heparyną drobnocząsteczkową. Baza danych powstała na podstawie informacji zebranych między 4 marca 2020 r. i 16 stycznia 2022 r.

Nasilenie zajęcia płuc oceniono za pomocą skali zalecanej przez Francuskie Towarzystwo Obrazowania Klatki Piersiowej (SIT). SIT zaleca stopniowanie zajęcia płuc jako nieobecnego lub minimalnego (< 10%), umiarkowanego (10–25%), rozległego (25–50%), ciężkiego (50–75%) lub krytyczny (> 75%).[53]

Leki podawane w szpitalu mogące mieć wpływ na wyniki końcowe:

- 5-dniowy kurs Remdesivir rozpoczynał się w ciągu 7 dni od wystąpienia objawów, jeśli objawy trwały dłużej, nie rozpoczynano podawania leku. Remdesivir podawany był dożylnie raz dziennie przez 5 dni, w dawce nasycającej 200 mg pierwszego dnia, a następnie w dawce podtrzymującej 100 mg.
- U każdego z pacjentów zastosowano leczenie podtrzymujące i objawowe.

Leczenie podtrzymujące obejmowało:

- antybiotykoterapia (Ceftriakson był lekiem z wyboru, ale możliwe były odstępstwa w zależności od stanu pacjenta);
- Terapia tlenowa (zastosowano tlenoterapię o niskim/wysokim przepływie lub wentylację mechaniczną. Nie stosowano ECMO.);
- Nawadnianie dożylne;
- Deksametazon podawany dożylnie w dawce co najmniej 6 mg na dobę;
- heparyna drobnocząsteczkowa lub niefrakcjonowana w dawkach terapeutycznych.

Przed podaniem leków immunomodulujących wykluczaliśmy ostre infekcje wirusowe, w tym wirusem cytomegalii, wirusem zapalenia wątroby typu B i C oraz ludzkim wirusem niedoboru odporności w oparciu o standardowe metody serologiczne.

5.1. Skuteczność tocilizumabu u pacjentów z ciężkim lub krytycznym zajęciem płuc w COVID-19: badanie retrospektywne – Publikacja „Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study”

Przeanalizowaliśmy próbki i zestaw danych 182 przypadków z rozpoznaniem na podstawie tomografii komputerowej klatki piersiowej (C-CT) ciężkim lub krytycznym zapaleniem płuc. Wszyscy chorzy przed przyjęciem do szpitala wykazywali kliniczne objawy kaszlu, duszności, gorączki ($> 38^{\circ}\text{C}$) i wysycenia tlenem poniżej lub równe 90%.

Pacjentów podzielono na dwie grupy. Pierwsza, w której Tocilizumab podawano dożylnie w dawce 8mg/kg (maksymalna dawka: 800mg) dwukrotnie w odstępie 12 godzin. Drugi stosował tylko standardowe leczenie zgodne z wytycznymi.

Ponieważ chciałem zbadać wpływ TCZ w grupie z ciężkim zapaleniem płuc i CRS (wskazanie do stosowania TCZ), kryteria włączenia do tego badania były następujące:

- W badaniu CT potwierdzone ciężkie (zajęcie płuc 50–75%) lub krytyczne (zajęcie płuc $> 75\%$) zapalenie płuc związane z COVID-19;
- biochemiczne wskaźniki burzy cytokinowej - poziom IL-6 $>100\text{pg/ml}$;
- Wiek >18 lat.

Punktem końcowym tej analizy był zgon lub wypis ze szpitala.

5.2 Stosowanie tocilizumabu u pacjentów, u których doszło do zatorowości płucnej w przebiegu burzy cytokinowej i zapalenia płuc COVID-19 – badanie retrospektywne. Publikacja: „Tocilizumab use among patients who developed pulmonary embolism in the course of cytokine release storm and COVID-19 pneumonia - a retrospective study.”

W tym badaniu retrospektywnie przeanalizowaliśmy zestaw danych pacjentów z potwierdzoną ostrą zatorowością płucną związaną z co najmniej umiarkowanym zajęciem płuc z powodu pneumonii w przebiegu COVID-19. U wszystkich pacjentów stwierdzono gorączkę (>38 st C) oraz wysycenie hemoglobiny tlenem mniejsze lub równe 90% przy braku suplementacji przed przyjęciem do szpitala. Zapalenie płuc potwierdzono za pomocą tomografii komputerowej klatki piersiowej (C-CT). Wszystkie badania laboratoryjne i CT (w tym angio-CT tętnic płucnych) wykonano bezpośrednio po przyjęciu, w ciągu pierwszych 24 godzin.

Głównym celem tego badania było określenie skuteczności i bezpieczeństwa TCZ u pacjentów z zapaleniem płuc COVID-19 i ostrą zatorowością płucną. Drugim celem tego badania była próba identyfikacji czynników ryzyka związanych z wyższą śmiertelnością.

Aby odpowiedzieć na powyższe pytania, ustaliliśmy następujące kryteria włączenia i wyłączenia do badania:

1. Kryteria włączenia do badania:

- potwierdzone w TK zapalenie płuc z co najmniej 10% zajęciem płuc;
- potwierdzona radiologicznie i klinicznie ostra zatorowość płucna;
- CRS z poziomem IL-6 przekraczającym 80 pg/ml;

- Wiek > 18 lat;
- Gorączka > 38 °C przy przyjęciu do szpitala;
- Nasycenie tlenem mniejsze lub równe 90% przy braku suplementacji;
- Potwierdzone aktywne zakażenie SARS-CoV-2.

2. Kryteria wykluczenia z badania:

- poziom prokalcytoniny >2 ng/ml – jako predyktor powikłań septycznych, w których TCZ jest przeciwwskazane.

Analizowani pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy. Pierwsza, w której Tocilizumab podawano dożylnie w dawce 8 mg/kg (maksymalna dawka: 800 mg) dwukrotnie w odstępie 12 godzin. Drugą grupę stanowili pacjenci, którzy nie wyrazili zgody na podanie Tocilizumabu oraz pacjenci, którzy mimo zgody nie otrzymywali leków z powodów pozamedycznych (brak dostępności leków w szpitalu) lub mieli przeciwwskazania medyczne do ich stosowania. Druga grupa stosowała jedynie standardowe leczenie zgodne z wytycznymi.

Punktem końcowym tej analizy był zgon lub wypis ze szpitala.

5.3 Poprawa przeżycia na OIT związana ze stosowaniem amantadyny u pacjentów z zapaleniem płuc COVID-19 - badanie retrospektywne. Publikacja: „Improved survival in ICU in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study.”

Baza danych zawiera informacje o pacjentach hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym w Szczecinie. Baza pacjentów biorących udział w badaniu, którzy byli obserwowani w OIT między 24 marca 2020 a 29 maja 2021

zawierała 241 wpisów. Wszystkie dane zostały w pełni zanonimizowane przed analizami statystycznymi.

W tym badaniu retrospektywnie przeanalizowaliśmy zbiór danych pacjentów z COVID-19 wymagających wentylacji mechanicznej w OIT. Wszyscy pacjenci objęci tą analizą mieli zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS) w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2. Każdorazowo ostateczną decyzję o przyjęciu na OIT podejmował anestezjolog.. Zapalenie płuc potwierdzono tomografią komputerową klatki piersiowej (C- CT). W ocenie badań obrazowych radiolog wspierał się algorytmem AI i analizował odsetek tkanki płucnej dotkniętej COVID-19. Wszystkie testy laboratoryjne wykonano w ciągu 24 godzin od przyjęcia do szpitala.

Podstawowym celem tego badania było określenie skuteczności i bezpieczeństwa siarczanu amantadyny u pacjentów z zapaleniem płuc COVID-19 leczonych na OIT. Drugim celem tego badania była próba identyfikacji czynników ryzyka związanych z wyższą śmiertelnością. Trzeciorzędnym celem tego badania była próba określenia korelacji między stosowaniem amantadyny a innymi lekami immunomodulującymi. Aby odpowiedzieć na powyższe pytania, ustaliliśmy następujące kryteria włączenia i wyłączenia do badania:

1. Kryteria włączenia do badania:

- Ostra niewydolność oddechowa wymagająca wentylacji mechanicznej;
- potwierdzone w badaniu TK śródmiąższowe zapalenie płuc;
- Wiek > 18 lat;
- Potwierdzone zakażenie SARS-CoV-2 przy przyjęciu do szpitala.

2. Kryteria wykluczenia:

- Aktywna choroba nowotworowa.

Leczenie było zgodne z aktualną wiedzą, wytycznymi Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Specjalistów Chorób Zakaźnych (PTEiLChZ) oraz charakterystyką produktu.

Siarczan amantadyny podawano dożylnie w dwóch dawkach po 200 mg dziennie (każda w 500 ml). Po rozpoczęciu terapii amantadyną lek podawano do czasu ekstubacji (chyba że zaburzenia równowagi wodno-elektrolitowej wymagały modyfikacji). Wlew amantadyny opierał się na rejestracji leku w European Medicines Evaluation Agency oraz na zgodności z polską charakterystyką produktu leczniczego, dlatego nie była potrzebna zgoda pacjenta na tę procedurę.

6. Wyniki

6.1. Skuteczność tocilizumabu u pacjentów z ciężkim lub krytycznym zajęciem płuc w COVID-19: badanie retrospektywne.

6.1.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów z COVID-19

Zbiór danych obejmował 182 dorosłych pacjentów, mediana wieku 68,5 (IQR 61 – 76) lat, z ciężkim lub krytycznym zajęciem płuc (Tabela 1). Wszystkie przypadki zostały sklasyfikowane jako ciężkie lub krytyczne zajęcie płuc na podstawie tomografii komputerowej klatki piersiowej (C-CT) a mediana zajęcia płuc wynosiła 59,61% (IQR 54,52-67,38). Kluczowe parametry biochemiczne wskazujące na zaawansowany stan zapalny były istotnie podwyższone. Mediana IL-6 wynosiła 177,5 pg/ml (IQR 129-287) przy jednocześnie niskim stężeniu prokalcytoniny [mediana 0,35 ng/ml (IQR 0,17-0,65)] wyraźnie wskazującym na burzę uwalniania cytokin. Uwagę zwraca wyjątkowo wysoka mediana dehydrogenazy mleczanowej [mediana 630 U/L (IQR 521,5-783,5)], co może wskazywać na ryzyko ciężkiego przebiegu choroby. Spośród 182 przypadków wszyscy otrzymywali glikokortykosteroidy (deksametazon podawany dożylnie w dawce co najmniej 6 mg na dobę), antybiotykoterapię (lekiem z wyboru był ceftriakson w dawce co najmniej 2 g na dobę, ale może się różnić w zależności od stanu pacjenta), dożylne nawodnienie, wspomagająca tlenoterapia i profilaktyczną lub terapeutyczną dawkę heparyny drobnocząsteczkowej. Spośród 182 przypadków 57 (31%) otrzymało remdesivir. Zachowano przyjmowane przez pacjentów leki przewlekłe, o ile nie wymagały one modyfikacji – np. u chorych na cukrzycę we wszystkich przypadkach odstawiano metforminę, a w leczeniu stosowano insulinę zgodnie z profilem glikemii.

Najczęstszą chorobą współistniejącą było nadciśnienie tętnicze, które dotyczyło 63 (34%) przypadków. Cukrzycę stwierdzono w 38 przypadkach (21%). 25 (14%) przypadków dotyczyło zarówno cukrzycy, jak i nadciśnienia tętniczego. Inne choroby współistniejące zebrane w naszej bazie występowały sporadycznie i nie miały znaczenia statystycznego.

Tabela 1. Wyjściowa charakterystyka wszystkich pacjentów włączonych do badania

	Wyjściowa charakterystyka wszystkich pacjentów włączonych do badania			
	<i>n</i>	Mediana	Kwartył dolny	Kwartył górny
Wiek, lata	182	68,50	61,00	76,00
Procent zajęcia płuc, %	182	59,61	54,52	67,38
WBC, x10 ³ /ul	181	9,05	6,37	11,88
NEU, x10 ³ /ul	181	7,10	5,20	9,90
LYM, x10 ³ /ul	181	0,80	0,50	1,10
RBC, x10 ⁶ /ul	181	4,57	4,15	4,91
HGB g/dL	181	13,60	12,30	14,70
HCT, %	181	39,50	36,10	42,70
Płytki krwi, x10 ³ /ul	181	231,00	183,00	284,00
Prokalcytonina, ng/mL	179	0,35	0,17	0,65
CRP, mg/l	182	183,97	133,75	258,28
IL-6, pg/ml	182	177,50	129,00	287,00
LDH, U/L	176	630,00	521,50	783,50
D-dimery, ug/l	178	1195,50	631,00	4387,00
Kreatinina, mg/dl	182	1,13	0,87	1,48
AST, U/L	176	59,00	47,00	82,00
ALT, U/L	176	39,00	26,50	60,50
Troponina T, ng/l	174	26,80	15,70	49,00
GGTP, U/L	167	63,00	36,00	127,00
Bilirubina całkowita, mg/dl	167	0,59	0,42	0,77

6.1.2 Dane kliniczne i laboratoryjne dotyczące grupy leczonej TCZ w porównaniu z grupą kontrolną.

Grupa badana obejmowała 100 (55%) pacjentów otrzymujących TCZ i 82 (45%) grupę kontrolną leczoną wyłącznie standardową opieką. Mediana czasu od przyjęcia do szpitala do podania pierwszej dawki tocilizumabu wyniosła 1 dzień (IQR 1-2dni).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między poszczególnymi grupami pod względem wieku, chorób współistniejących, odsetka zajęcia płuc, liczby białych krwinek, liczby neutrofilów, liczby limfocytów, liczby czerwonych krwinek, poziomu hemoglobiny, hematokrytu, liczby płytek krwi, poziomu CRP, poziomu interleukiny-6, poziomu dehydrogenazy mleczanowej, aktywność d-dimerów, poziomu bilirubiny, GGTP oraz aktywność aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej. Grupy różniły się statystycznie pod względem stężenia troponiny T, prokalcytoniny i kreatyniny.

Mediana długości pobytu w szpitalu wyniosła 15 (IQR 6-28) dni; 16 (IQR 9,5-28,5) dni w grupie TCZ i 11,5 (IQR 9,5-28,5) dni w grupie leczonej bez TCZ , [p=0,109].

6.1.3 Czynniki związane z przyjęciem na OIT w analizowanej grupie.

Spośród 182 pacjentów 59 (32,4%) zostało przyjętych na OIT z powodu zapalenia płuc związanego z COVID-19 i jego powikłań. Spośród 59 pacjentów przyjętych na OIT, 30 (51%) było leczonych TCZ, a 29 (49%) było leczonych tylko standardowo. Spośród 123 pacjentów nieprzyjętych na OIT, 52 (42%) było leczonych TCZ, a 71 (58%) leczono tylko standardowo [p = 0,27]. Wszyscy pacjenci przebywający na OIT byli poddawani inwazyjnej wentylacji mechanicznej. Analizowaliśmy grupę pod kątem istotności statystycznej czynników ryzyka przyjęcia na OIT. Statystycznie istotnymi czynnikami w naszej analizie były wiek, liczba czerwonych krwinek, poziomy CRP, D-dimery i poziom troponiny T. Mediana wieku była wyższa w grupie przyjętej na OIT. Mediana procentowego wieku zajęcia płuc i liczby krwinek czerwonych była wyższa w grupie nieprzyjętej na OIT.

Istotnym czynnikiem przy przyjęciu na OIT były choroby współistniejące. Pomiedzy grupami wystąpiły istotne statystycznie różnice w częstości nadciśnienia tętniczego i cukrzycy (Chi2 p = 0,001), które miały wpływ na ryzyko przyjęcia na OIT. Spośród 63

przypadków związanych z nadciśnieniem tętniczym 38 przyjęto na OIT (60%). Spośród 38 przypadków związanych z cukrzycą 26 przyjęto na OIT (68%). Zauważalna była również różnica między grupami pod względem stosowania remdesiviru (χ^2 $p=0,001$). Spośród 57 przypadków leczonych tym środkiem 28 zostało przyjętych na OIT (49%). Wszystkie istotne statystycznie czynniki przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka grup przyjętych na OIT vs nieprzyjętych na OIT

Charakterystyka grup przyjętych na OIT vs nieprzyjętych na OIT				Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka przyjęcia do OIT			
	ICU <i>n</i> = 59	Non-ICU <i>n</i> = 123	<i>p</i>	<i>p</i> value	Hazard ratio (HR)	Lower 95%CI HR value	Upper 95%CI HR value
Procent zajęcia płuc, <i>mediana</i> (<i>IQR</i>)	59,06 (54,39- 63,76)	63,51 (54,61- 71,39)	0,049	0,161	1,024	0,991	1,058
RBC, x10 ⁶ /ul, <i>mediana</i> (<i>IQR</i>)	4,475 (4,04-4,86)	4,7 (4,33-5)	0,022	0,441	1,211	0,744	1,974
CRP, mg/l, <i>mediana</i> (<i>IQR</i>)	175,2 (125,4- 249,81)	205,71 (156,79- 277,91)	0,021	0,004	1,005	1,002	1,009
D-dimery, ug/l, <i>mediana</i> (<i>IQR</i>)	1488 (660- 6501)	868 (594- 1923)	0,009	0,158	1,000	1,000	1,000
Troponina T, ng/l, <i>mediana</i> (<i>IQR</i>)	30,65 (18,7- 54,25)	21,2 (12,8- 39,1)	0,034	0,321	1,002	0,998	1,006
Grupa wiekowa 18-65 (odniesienie) vs. 65+	34 (58%)	33 (27%)	0,001	0,517	1,236	0,651	2,345
Nadciśnienie tętnicze <i>n</i> (%) Tak (odniesienie)	38 (60%)	25(40%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,001	0,468	0,780	0,398	1,526
Cukrzyca, <i>n</i> (%) Tak (odniesienie)	26 (68%)	12 (32%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,001	0,021	2,117	1,119	4,002
Remdesivir, <i>n</i> (%) Tak (odniesienie)	28 (47%)	29 (24%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,001	0,645	1,148	0,637	2,070
Tocilizumab, <i>n</i> (%) Tak (odniesienie)	29 (49%)	71 (58%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,277	0,064	0,575	0,320	1,032

Stworzyliśmy wielowymiarowe modele proporcjonalnego hazardu Coxa dla wszystkich statystycznie istotnych czynników oraz dla podawania tocilizumabu. W wieloczynnikowych modelach proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 3) wyższe poziomy CRP [HR: 1005 (CI: 1001-1008), $p = 0,004$] i cukrzyca jako choroba współistniejąca [HR: 2116 (CI: 1119-4002), $p = 0,02$] wiązały się z większym prawdopodobieństwem przyjęcia na OIT. Podanie tocilizumabu wiązało się z mniejszym prawdopodobieństwem przyjęcia na OIT, ale nie było ono istotne statystycznie [HR: 0,574 (CI: 0,320-1,031), $p=0,063$]. (Tabela 2.)

6.1.4 Ogólne ryzyko śmiertelności.

Ogólna śmiertelność w grupie była wysoka. Spośród 182 pacjentów 115 (63,1%) zmarło z powodu zapalenia płuc związanego z COVID-19 i jego powikłań, a 67 (36,9%) przeżyło. Spośród 59 pacjentów przyjętych na OIT 45 (76,2%) zmarło, a 14 (23,8%) przeżyło. Mediana długości leczenia dla grupy, która nie przeżyła, wynosiła 9 (IQR 3,5; 19) dni. Mediana długości leczenia w grupie, która przeżyła, wynosiła 27,5 (IQR 15; 40) dni.

Analizowaliśmy również grupę w kontekście czynników ryzyka zgonu, niezależnie od stosowania tocilizumabu (Tabela 5). Wyższe czynniki śmiertelności w naszej analizie były związane z wiekiem, płcią, liczbą limfocytów, liczbą krwinek czerwonych, stężeniem hemoglobiny, hematokrytem, stężeniem prokalcytoniny, stężeniem kreatyniny, stężeniem troponiny T oraz aktywnością aminotransferaz i GGTP. Stężenie interleukiny-6 i aktywność dehydrogenazy mleczanowej nie różniły się istotnie.

Cukrzyca wiązała się z wyższym ryzykiem zgonu (10 punktów procentowych), ale nie była to różnica istotna statystycznie dla badanej grupy ($\chi^2 p=0,25$). Ponadto nadciśnienie i

stosowanie remdesiviru nie wiązały się z różnicami w ryzyku śmiertelności. Wszystkie istotne statystycznie czynniki przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka grupy, która przeżyła, w porównaniu z pacjentami, którzy zmarli.

	Charakterystyka grupy, która przeżyła, w porównaniu z pacjentami, którzy zmarli.			Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla śmiertelności			
	Przeżyło <i>n</i> = 67	Zmarło <i>n</i> = 115	<i>p</i> value	<i>p</i> value	Hazard ratio (HR)	Lower 95%CI HR value	Upper 95%CI HR value
Procent zajęcia płuc, <i>mediana (IQR)</i>	56,73 (53,71-63,76)	61,11 (54,78-68,34)	0,051	0,199	1,017	0,992	1,044
LYM, x10 ³ /ul, <i>mediana (IQR)</i>	0,9 (0,6-1,3)	0,7 (0,5-1,1)	0,024	0,438	0,854	0,574	1,273
RBC, x10 ⁶ /ul, <i>mediana (IQR)</i>	4,78 (4,25-5,12)	4,46 (4,05-4,82)	0,004	0,797	0,891	0,368	2,157
HGB g/dL, <i>mediana (IQR)</i>	14 (12,8-14,8)	13,4 (12-14,4)	0,016	0,867	0,957	0,570	1,607
HCT, %, <i>mediana (IQR)</i>	41,2 (37,5-43,3)	39,2 (35,4-41,8)	0,026	0,826	1,024	0,834	1,256
ALT, U/L, <i>mediana (IQR)</i>	44 (36-69)	33,5 (23-55)	0,001	0,638	0,999	0,992	1,006
Troponina T, ng/l, <i>mediana (IQR)</i>	19,1 (11,8-27,1)	34,55 (21,5-60,4)	0,000	0,013	1,002	1,001	1,004
GGTP, U/L, <i>mediana (IQR)</i>	76,5 (45,5-158,5)	47 (31-95)	0,001	0,092	0,998	0,995	1,001
Grupa wiekowa 18-65 (odniesienie) vs. 65+	35 (52%)	32 (28 %)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,001	0,003	0,466	0,286	0,761
Płeć, n (%) Male(odniesienie)	52 (78%)	72 (63%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,036	0,966	1,012	0,611	1,676
Prokalcytoninaa, n (%) <2,0ng/mL(odniesienie)	65 (98%)	100 (88%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,016	0,683	0,840	0,364	1,940
Poziom kreatyniny, n (%) <2,0 mg/dl(odniesienie)	66 (99%)	97 (84%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,002	0,048	0,499	0,251	0,993
Cukrzyca, n (%) Tak	11 (16%)	27 (23%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,258	0,346	0,789	0,482	1,292
Tocilizumab, N (%) Tak (odniesienie)	42 (63%)	58 (50%)	Chi-square Pearson <i>p</i> = 0,109	0,032	0,615	0,394	0,956

6.1.5 Śmiertelność związana z tocilizumabem.

Śmiertelność w grupie leczonej TCZ wyniosła 58,0% (n=58) w porównaniu z 69,5% (n=57) w grupie bez TCZ [p=0,02341]. Mediana długości pobytu w szpitalu dla grupy TCZ wyniosła 16 (IQR 9,5; 28,5) dni i 11,5 (IQR 3; 24) dni dla osób bez TCZ. Dla tych, którzy przeżyli, mediana czasu leczenia wyniosła 28 (IQR 15; 41) dni dla grupy TCZ i 22 (IQR 14; 35) dni dla grupy bez TCZ. W przypadku osób, które zmarły, mediana czasu leczenia wynosiła 12 (IQR 6; 20) dni dla grupy TCZ i 6 (IQR 2; 15) dni dla grupy bez TCZ (Figure 1.) W wieloczynnikowych modelach proporcjonalnego ryzyka Coxa dla wszystkich statystycznie istotnych czynników oraz dla podawania tocilizumabu - niższy wiek, stężenie kreatyniny poniżej 2 mg/dl oraz dożylne podanie tocilizumabu wiązały się z niższą śmiertelnością [HR : 0,466 (CI: 0,286 – 0,761), p = 0,003], [HR : 0,499 (CI: 0,251 – 0,993), p = 0,003] i [HR : 0,615 (CI: 0,394-0,956), p = 0,032]]. Wyższy poziom troponiny T był związany z wyższą śmiertelnością, ale współczynnik ryzyka był niski.

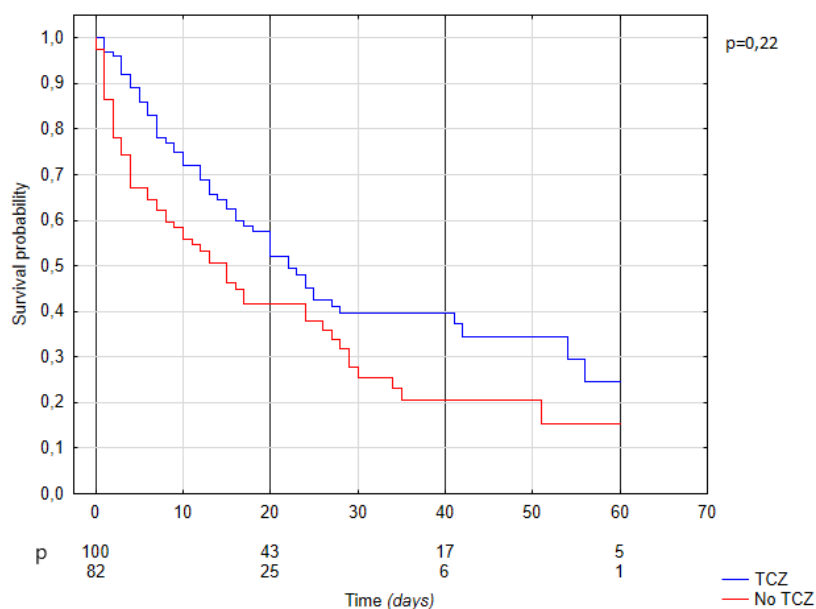


Figure 1. Krzywe Kaplana-Meiera przedstawiające szacowane prawdopodobieństwo przeżycia w przypadku leczenia związanego z TCZ pacjentów z ciężkim lub krytycznym zapaleniem płuc związanym z COVID-19.

6.2 Stosowanie tocilizumabu u pacjentów, u których doszło do zatorowości płucnej w przebiegu burzy cytokinowej i zapalenia płuc COVID-19 – badanie retrospektywne.

6.2.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów z COVID-19

Ostateczny zbiór danych obejmował 64 dorosłych pacjentów, mediana wieku 68 (IQR 57–75) lat, z potwierdzoną ostrą zatorowością płucną (Tab. 4.). Wszystkie przypadki zostały sklasyfikowane jako umiarkowane, rozległe, ciężkie lub krytyczne zajęcie płuc na podstawie tomografii komputerowej klatki piersiowej (C-CT), a mediana zajęcia płuc wynosiła 38,27% (IQR 24,77-50,34). Kluczowe parametry biochemiczne wskazujące na zaawansowany stan zapalny były istotnie podwyższone. Mediana IL-6 wynosiła 138,50 pg/ml (IQR 113,00-206,50) przy jednocześnie niskim stężeniu prokalcytoniny [mediana 0,17 ng/ml (IQR 0,10-0,31)]. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej była w większości przypadków wysoka [mediana 499,50 U/l (IQR 349,00-638,00)], co wiąże się z ciężkim przebiegiem choroby. Najczęstszą chorobą współistniejącą było nadciśnienie tętnicze, które występowało w 13 (20%) przypadkach. Cukrzycę stwierdzono w 2 przypadkach (3%), w wywiadzie nowotworowym w 1 przypadku (1%).

Tabela 4. Wyjściowa charakterystyka wszystkich pacjentów włączonych do badania

	Wyjściowa charakterystyka wszystkich pacjentów włączonych do badania			
	N	Mediana	Kwartył dolny	Kwartył górny
Wiek, lata	64	68,00	57,00	75,00
Procent zajęcia płuc, %	64	38,27	24,77	50,34
WBC, x10 ³ /ul	64	8,81	6,72	10,91
RBC, x10 ⁶ /ul	64	4,66	4,25	5,06
HGB, g/dL	64	13,95	12,65	15,10
HCT, %	64	40,15	36,85	43,45
Płytki krwi, x10 ³ /ul	64	227,50	179,00	302,50

Prokalcytonina, ng/mL	63	0,17	0,10	0,31
CRP, mg/l	64	146,40	104,68	205,53
IL-6, pg/ml	64	138,50	113,00	206,50
LDH, U/L	58	499,50	349,00	638,00
D-dimery, ug/l	64	1611,50	631,50	8481,50
Kreatinina, mg/dl	64	0,94	0,82	1,22
eGFR, ml/min	64	80,25	57,61	96,21
AST, U/L	57	49,00	35,00	72,00
ALT, U/L	57	36,00	22,00	62,00
Glukoza, mg/dl	61	123,00	113,00	145,00
Bilirubina całkowita, mg/dl	59	0,63	0,41	0,85

6.2.2 Dane kliniczne i laboratoryjne dotyczące grupy leczonej TCZ w porównaniu z grupą kontrolną.

Grupa badana obejmowała 28 (44%) pacjentów otrzymujących TCZ i 36 (56%) pacjentów z grupy kontrolnej leczonych wyłącznie standardową opieką. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między poszczególnymi grupami pod względem wieku, odsetka zajęcia płuc, płci, chorób współistniejących, liczby krwinek białych, liczby krwinek czerwonych, poziomu hemoglobiny, hematokrytu, liczby płytek krwi, poziomu prokalcytoniny, poziomu białka C-reaktywnego, poziomu interleukiny- 6, poziomu dehydrogenazy mleczanowej, aktywność D-dimerów, poziomu kreatyniny, eGFR, aktywność aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej, poziomu bilirubiny, poziomu troponiny T i CKMB (Tabela 5.).

Tabela 5. Charakterystyka grup TCZ vs Non-TCZ

	TCZ N= 28 (44%)	Non-TCZ N= 36 (56%)	P value
Wiek, lata	68,5 (54,5 -75)	67 (61,5 -74)	0,538
Procent zajęcia płuc, %	33,82 (24,28 -49,22)	43,67 (28,2 -53,34)	0,211

WBC, x10 ³ /ul	8,43 (6,65 -10,78)	8,81 (7,39 -10,96)	0,461
RBC, x10 ⁶ /ul	4,58 (4,13 -5,01)	4,76 (4,45 -5,13)	0,206
HGB, g/dL	13,6 (11,75 -15,2)	14,05 (13,05 -15,05)	0,218
HCT, %	39,95 (35 -43,45)	41,3 (38,85 -43,65)	0,307
Płytki krwi, x10 ³ /ul	227,5 (176 -316,5)	232 (180 -290)	0,898
Prokalcytonina, ng/mL	0,17 (0,1 -0,35)	0,2 (0,12 -0,3)	0,429
CRP, mg/l	132,54 (97,64 -227,02)	153,93 (132,29 -189,51)	0,201
IL-6, pg/ml	137,5 (104,55 -209)	146,5 (116 -206,5)	0,844
LDH, U/L	481 (355 -638)	515 (345 -674)	0,919
D-dimer, ug/l	2301,05 (695 -8481,5)	912,5 (586 -6799)	0,486
Kreatynina, mg/dl	0,95 (0,74 -1,23)	0,94 (0,88 -1,22)	0,477
eGFR, ml/min	80,39 (56,66 -103,63)	79,47 (58,98 -90,25)	0,574
AST, U/L	53 (41 -82)	47,5 (34 -69)	0,378
ALT, U/L	43 (22 -89)	33 (25 -55)	0,665
Glukoza, mg/dl	123 (114 -145)	123,5 (112 -141,5)	0,739
Bilirubina, mg/dl	0,7 (0,45 -0,98)	67 (61,5 -74)	0,205
Płeć, n (%) Męska (odniesienie)	24 (86%)	23 (64%)	Chi-square Pearson p=0.049
Cukrzyca, n(%) Tak (odniesienie)	2 (7%)	0 (0%)	Chi-square Pearson p=0.103
Nadciśnienie tętnicze, n(%) Tak (odniesienie)	5 (18%)	8 (22%)	Chi-square Pearson p=0.666
Choroba nowotworowa, n(%) Tak (odniesienie)	0 (0%)	1 (3%)	Chi-square Pearson p=0.374
Remdesivir , n(%) Tak (odniesienie)	23 (82%)	28 (78%)	Chi-square Pearson p=0.666

Przyjęcie do OIT, n(%)			Chi-square Pearson
Tak (odniesienie)	4 (14%)	2 (6%)	p=0.234
Śmiertelność, n(%)			Chi-square Pearson
Przeżył (odniesienie)	16 (57%)	29 (81%)	p=0.041

Mediana długości pobytu w szpitalu wyniosła 17 (IQR 12,5-24,0) dni i nie różniła się między grupą otrzymującą TCZ [17,0 (IQR 12,5-25,5) dni] w porównaniu z [17,0 (IQR 12,5-22,0) dni] w grupie bez TCZ [p = 0,645].

6.2.3 Ogólne ryzyko śmiertelności

Spośród 64 pacjentów 19 (30%) zmarło z powodu zapalenia płuc związanego z COVID-19 i jego powikłań, a 45 (70%) przeżyło. Mediana czasu leczenia dla grupy, która nie przeżyła wynosiła 12 (IQR 4-20) dni. Mediana czasu leczenia dla grupy, która przeżyła wynosiła 20 (IQR 14-26) dni. (Figura 2.)

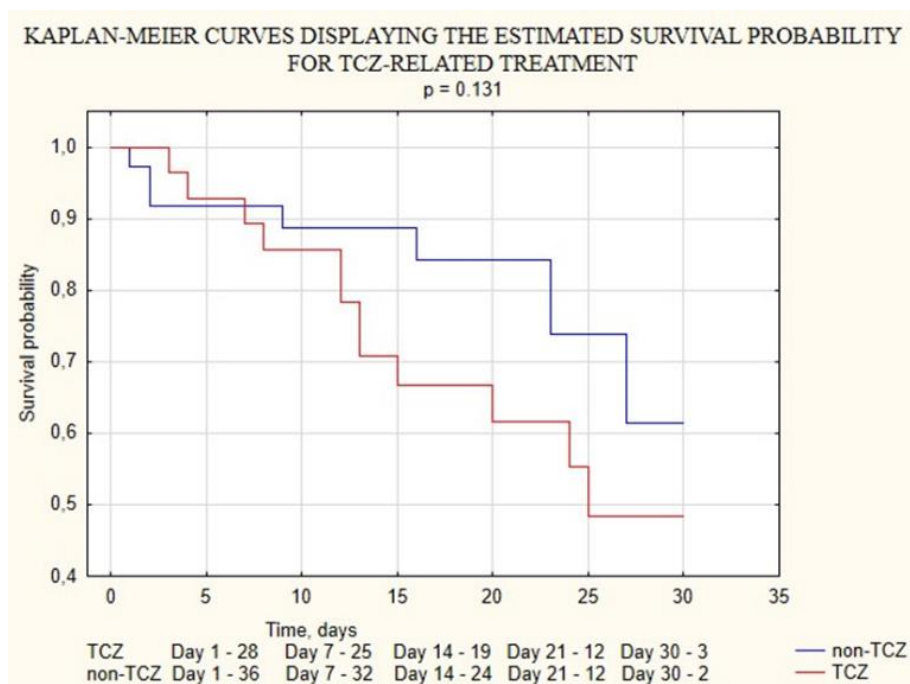


Figure 2. Krzywe Kaplana-Meiera przedstawiające szacowane prawdopodobieństwo przeżycia w przypadku leczenia związanego z TCZ.

6.2.4 Śmiertelność związana z tocilizumabem

Śmiertelność w grupie TCZ wyniosła 43% (n=12) w porównaniu z 19% (n=7) w grupie bez TCZ. Skonstruowałem wieloczynnikowe modele proporcjonalnego ryzyka Coxa dla wszystkich czynników istotnych statystycznie oraz dla podawania tocilizumabu zgodnie z głównym celem naszego badania. W naszych obliczeniach uwzględniliśmy zastosowanie Remdesiviru, aby oszacować potencjalny wpływ innych leków na przeżycie u pacjentów z zatorowością płucną. W wieloczynnikowych proporcjonalnych modelach zagrożeń Coxa wiek [HR: 1,118 (CI: 1,055-1,187), p = 0,001] oraz podawanie tocilizumabu wiązały się z wyższą śmiertelnością [HR: 3,342 (CI: 1,077-10,370)], p=0,036].

Tabela 6. Wieloczynnikowe modele proporcjonalnego ryzyka Coxa dla śmiertelności

	Wieloczynnikowe modele proporcjonalnego ryzyka Coxa dla śmiertelności			
	P value	Hazard ratio (HR)	Lower 95%CI HR value	Upper 95%CI HR value
Wiek, lata	0.001	1.119	1.055	1.187
Procent zajęcia płuc, %	0.511	1.009	0.980	1.039
Prokalcytonina, ng/mL	0.084	2.039	0.906	4.586
Remdesivir (odniesienie) vs. no Remdesivir	0.132	0.261	0.045	1.502
TCZ (odniesienie) vs. no TCZ	0.036	3.342	1.077	10.370

6.3. Poprawa przeżycia na OIT związana ze stosowaniem amantadyny u pacjentów z zapaleniem płuc COVID-19 - badanie retrospektywne.

6.3.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów z COVID-19 i czynniki związane ze śmiertelnością

Ostateczny zbiór danych obejmował 241 dorosłych pacjentów z medianą wieku 65 lat (IQR 59-71). Żaden z analizowanych w badaniu pacjentów nie był zaszczepiony pełną

dawką szczepionki SARS-CoV-2. U 143 pacjentów potwierdziliśmy zakażenie dzikim wariantem SARS-CoV-2, co stanowiło 59% wszystkich uwzględnionych w tej analizie. Pozostałe 41% (n = 98) stanowiły infekcje wariantem Alpha (B.1.1.7). Kluczowe parametry biochemiczne wskazujące na zaawansowany stan zapalny były istotnie podwyższone w analizowanej grupie. Mianowicie mediana IL-6 wynosiła 104 pg/ml (IQR 51,80-167,00) przy jednocześnie niskim stężeniu prokalcytoniny [mediana 0,27 ng/ml (IQR 0,150-0,50)]. Dla każdego pacjenta obliczono wskaźnik masy ciała (BMI); mediana BMI wyniosła 29,4 (IQR 26,57-34,41). W badanej grupie dominowała płeć męska (n = 153; 63,5%). Najczęstszą chorobą współistniejącą było nadciśnienie tętnicze, które występowało w 129 (53,5%) przypadkach. Otyłość i cukrzycę stwierdzono odpowiednio w 97 (40,2%) i 81 (33,6%) przypadkach. Przewlekłą niewydolność krążenia stwierdzono w 24 (9,9%) przypadkach. Kluczowym lekiem towarzyszącym COVID-19 był deksametazon podawany dożylnie w dawce co najmniej 6 mg na dobę (n = 241; 100%) we wszystkich przypadkach, remdesivir w 99 przypadkach (41%), a TCZ w 127 pacjentów (52,7%).

Ogólna śmiertelność w naszym badaniu była wysoka (72,6%). (Tabela 7.) Nie było statystycznie istotnych różnic między grupami, które przeżyły/zmarły pod względem płci, wzrostu, masy ciała, BMI, wstępnych badań laboratoryjnych, chorób współistniejących, podawania remdesiviru lub TCZ. Grupy różniły się istotnie pod względem odsetka zajęcia płuc (przeżyło 32,47% [16,09-51,57%] vs zmarło 47,20% [31,74-59,68%]). Pacjenci, którzy

przeżyli, byli znacznie młodszy, a ich mediana wieku wynosiła 62 lata (IQR 55-68) w porównaniu z pacjentami, którzy zmarli (mediana: 67 [IQR: 60-72] lat, wartość P = 0,005).

Tabela 7. Charakterystyka badanych grup według wyników przeżycia.

	Przeżyli N = 66 (27,4%)	Zmarli N = 175 (72,6%)	p
Wiek, lata, median (IQR)	62 (55 - 68)	67 (60 - 72)	0,005
Wzrost, cm (IQR)	172 (162 - 178)	172 (164 - 178)	0.666
Waga, kg (IQR)	90 (75 - 103)	88 (79 - 100)	0.950
BMI, kg/m ² (IQR)	30.47 (26.12 - 34.41)	29.38 (27.16 - 34.29)	0.756
Procent zajęcia płuc, % (IQR)	32.47 (16.09 – 51.57)	47.20 (31.74 – 59.68)	0.010
WBC, x10 ³ /ul (IQR)	7.73 (5.45 - 12.26)	7.67 (5.4 - 10.31)	0.545
HGB, g/dL (IQR)	13.7 (12.3 - 15)	13.55 (12 - 14.7)	0.651
Płytki krwi, x10 ³ /ul (IQR)	221 (184 - 275)	199 (156 - 277)	0.139
CRP, mg/l (IQR)	123,06 (60.93 - 215.51)	126.54 (70.27 - 190.4)	0.894
Prokalcytonina, ng/mL (IQR)	0.22 (0.13 - 0.54)	0.27 (0.16 - 0.48)	0.341
IL-6, pg/ml (IQR)	86.5 (38.6 - 157)	107 (53.9 - 175)	0.162
Kreatynina, mg/dl (IQR)	1,08 (0.8 - 1.46)	1.11 (0.86 - 1.52)	0.262
ALT, U/L (IQR)	36 (23 - 58)	40 (23 - 62)	0.497
D-dimery, ug/l (IQR)	0.6 (0.39 - 1.67)	0.71 (0.35 - 1.37)	0.769
Płeć, n (%) Male	35 (57%)	118 (66%)	Chi-square Pearson p=0.251
Otyłość, n(%) Tak	28 (46%)	69 (38%)	Chi-square Pearson p=0.297
Cukrzyca, n(%) Tak	16 (26%)	65 (36%)	Chi-square Pearson p=0.157

Nadciśnienie tętnicze, n(%) Tak	35 (57%)	94 (52%)	Chi-square Pearson p=0.485
Niewydolność serca, n(%) Tak	5 (8%)	19 (11%)	Chi-square Pearson p=0.594
Remdesivir, n(%) Tak	23 (38%)	76 (42%)	Chi-square Pearson p=0.535
Tocilizumab, n(%) Tak	27 (44%)	100 (56%)	Chi-square Pearson p=0.126
Wariant wirusa, n(%) Wild / Alpha	47 (71%)	96 (55%)	Chi-square Pearson p=0.021

6.3.2 Dane kliniczne i laboratoryjne dotyczące grupy leczonej amantadyną w porównaniu z grupą kontrolną

Grupa badana obejmowała 141 (58,5%) pacjentów otrzymujących amantadynę oraz 100 (41,5%) pacjentów z grupy kontrolnej leczonych bez tego środka. Nie było statystycznie istotnych różnic między grupami pod względem płci, wzrostu, masy ciała, BMI, procentowego zajęcia płuc, liczby białych krwinek, poziomu hemoglobiny, liczby płytek krwi, białka C-reaktywnego (CRP), prokalcytoniny, IL-6, poziomu kreatyniny, aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) (Tabela 8). Pacjenci otrzymujący amantadynę byli znacznie starsi, z medianą wieku 67 (IQR: 60-71) lat, w porównaniu z grupami nieamantadyny (mediana: 63 [IQR: 58-68] lat, wartość P = 0,032), z nieco wyższą liczbą płytek krwi (grupa amantadyny $219,5 \times 103/\text{ul}$ [176,5-285,5] vs grupa bez amantadyny $185 \times 103/\text{ul}$ [148-258] wartość P = 0,014) i D-dimer (grupa amantadyny 0,806 ug/l [0,413 -1,566] vs grupa bez amantadyny 0,522 [0,281-1,193] wartość p = 0,025), na początku badania. Nadciśnienie tętnicze występowało statystycznie częściej w grupie leczonej amantadyną (59,5% vs 45%, wartość p = 0,025). Spośród 141 pacjentów, którzy otrzymali amantadynę, 99 (70%) było zakażonych wirusem SARS-CoV-2 typu dzikiego, a 51 (30%) wariantem alfa.

Spośród 100 pacjentów leczonych bez amantadyny 44 (44%) było zakażonych SARS-CoV-2 typu dzikiego, a 56 (56%) było zakażonych wariantem alfa.

Tabela 8. Charakterystyka grup według zastosowania amantadyny

	Grupa z amantadyną N = 141	Grupa bez amantadyny N = 100	p
Wiek, lata	67 (60 - 71)	63 (58 - 68)	0.032
Wzrost, cm	172 (164 - 178)	172 (165 - 178)	0.898
Waga, kg	88.5 (75 - 100)	88 (80 - 103)	0.747
BMI	29.705 (27.34 - 32.87)	29.38 (26.55 - 34.94)	0.904
Procent zajęcia płuc, %	44.205 (25.065 – 58.79)	45.180 (25.230 – 56.410)	0.934
WBC, x10 ³ /ul	8.145 (5.94 - 11.365)	7.34 (5.02 - 9.77)	0.077
HGB, g/dL	13.6 (12.05 - 14.7)	13.4 (11.8 - 15.2)	0.736
Płytki krwi, x10 ³ /ul	219.5 (176.5 - 285.5)	185 (148 - 258)	0.014
CRP, mg/l	121.285 (75.98 - 202.595)	127.23 (61.33 - 176.035)	0.199
Prokalcytonina, ng/mL	0.285 (0.15 - 0.545)	0.24 (0.14 - 0.43)	0.183
IL-6, pg/ml	109 (51.4 - 181)	95.2 (51.8 - 151)	0.313
Kreatynina, mg/dl	1.05 (0.855 - 1.475)	1.12 (0.81 - 1.59)	0.426
ALT, U/L	40 (25 - 62)	36.5 (20.5 - 59)	0.194
D-dimer, ug/l	0.806 (0.413 - 1.566)	0.522 (0.281 - 1.193)	0.025

Płeć, n (%) Male	85 (60%)	68 (68%)	Chi-square Pearson p=0.223
Otyłość, n(%) Tak	61 (43.2%)	36 (36%)	Chi-square Pearson p=0.275
Cukrzyca, n(%) Tak	47 (33.3%)	34 (34%)	Chi-square Pearson p=0.914
Nadciśnienie tętnicze, n(%) Tak	84 (59.5%)	45 (45%)	Chi-square Pearson p=0.025
Niewydolność serca, n(%)Tak	15 (10.5%)	9 (9%)	Chi-square Pearson p=0.675
Remdesivir, n(%) Tak	54 (38.3%)	45 (45%)	Chi-square Pearson p=0.297
Tocilizumab, n(%) Tak	81 (57.5%)	46 (46%)	Chi-square Pearson p=0.079
Śmiertelność, n(%) Zmarł	84 (59.5%)	91 (91%)	Chi-square Pearson p=0.001

Wariant wirusa, n(%)			Chi-square
Wild / Alpha	99 (70%)	44(44%)	Pearson
			p=0.001

6.3.3 Ogólne wyniki związane z amantadyną

Śmiertelność ogólna była wysoka i wyniosła 72,6% (n = 175). Śmiertelność w grupie amantadyny była wyraźnie niższa [59,5% (n = 84)] w porównaniu z grupą leczoną bez amantadyny (91% (n = 91), wartość $p < 0,001$). Mediana całkowitej długości pobytu w szpitalu wyniosła 12,7 (IQR 6,9-23,4) dni, 19,9 (IQR 11,3-29,6) dni w grupie amantadyny i 6,6 (IQR 2,6-10,0) dni w grupie bez amantadyny. W przypadku osób, które przeżyły, mediana długości leczenia wynosiła 30 (IQR 21,9-30) dni w grupie amantadyny i 10,9 (IQR 3,9-13,9) dni w grupie leczonej bez amantadyny. Dla tych, którzy zmarli, mediana długości leczenia wynosiła 15,8 (IQR 10,1-21,6) dni w grupie amantadyny i 6,5 (IQR 2,2-9,8) dni w grupie leczonej bez amantadyny (Figura 3).

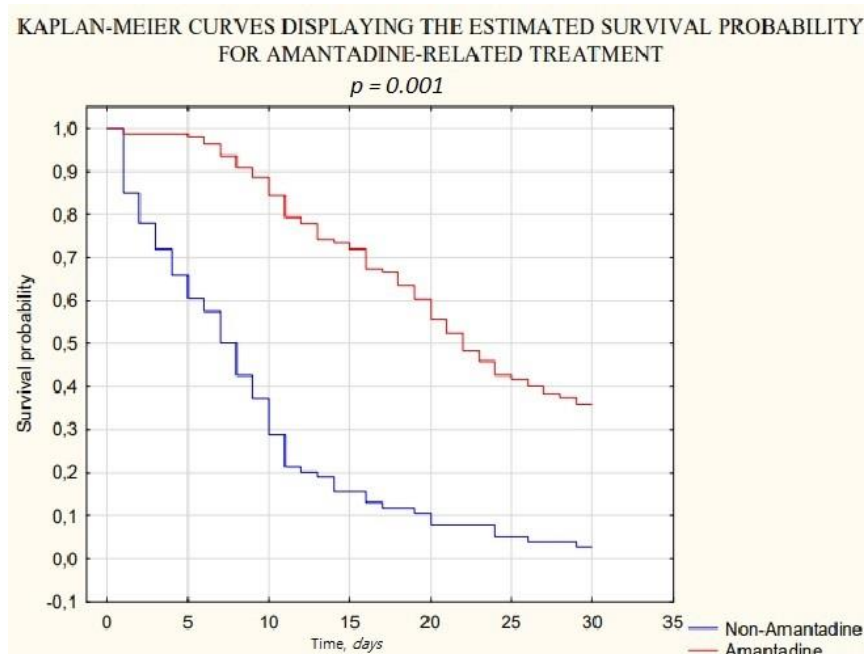


Figure 3. Krzywe Kaplana-Meiera przedstawiające oszacowane prawdopodobieństwo przeżycia dla leczenia związanego z amantadyną.

Skonstruowałem wielowymiarowe modele proporcjonalnego hazardu Coxa dla wszystkich statystycznie istotnych czynników, podawanie amantadyny zgodnie z głównym celem naszego badania, choroby współistniejące zgodnie z drugorzędnym celem badania oraz podawanie remdesiwiru i TCZ zgodnie z celem trzeciorzędowym. W wieloczynnikowych modelach proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 9.) podawanie TCZ wiązało się z wyższą śmiertelnością (HR: 1,731, CI: 1,183-2,532, wartość p = 0,005), podczas gdy podawanie amantadyny wiązało się z niższym ryzykiem zgonu (HR: 0,220, CI: 0,146-0,333, wartość p = 0,001). Szczep wirusa nie był statystycznie istotnym czynnikiem w modelu proporcjonalnego hazardu Coxa dla śmiertelności.

Tabela 9. Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka zgonu dla wszystkich pacjentów włączonych do badania

	Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka zgonu			
	P value	Hazard ratio (HR)	Lower 95%CI HR value	Upper 95%CI HR value
Wiek, lata	0.275	1.011	0.991	1.031
Płytki krwi, x10 ³ /ul	0.174	0.999	0.996	1.001
D-dimery, ug/l	0.768	0.991	0.930	1.055
Procent zajęcia płuc, %	0.395	1.004	0.995	1.013
Tocilizumab, Tak (odniesienie)	0.005	1.731	1.183	2.532
Remdesivir, Tak (odniesienie)	0.161	0.759	0.516	1.116
Amantadyna, Tak (odniesienie)	0.001	0.220	0.146	0.333
Płeć, Male (odniesienie)	0.114	1.368	0.927	2.019

Nadciśnienie tętnicze, Tak (odniesienie)	0.269	1.248	0.843	1.847
Niewydolność serca, Tak (odniesienie)	0.671	1.139	0.624	2.079
Cukrzyca, Tak (odniesienie)	0.978	1.006	0.683	1.481
Otyłość, Tak (odniesienie)	0.423	1.176	0.791	1.748
Wariant wirusa, Wild (odniesienie)	0.359	0.839	0.577	1.221

6.3.4 Charakterystyka kliniczna pacjentów leczonych tocilizumabem w zależności od przyjmowania amantadyny

Zgodnie z dodatkowymi celami tej analizy, aby odzwierciedlić połączony efekt środków o potencjale immunomodulującym, przeanalizowaliśmy zmienne związane z leczeniem TCZ wśród 127 pacjentów, którzy otrzymali ten środek w zbiorze danych przypadków leczonych na OIT. Następnie obliczyliśmy różnice między pacjentami, którzy otrzymywali TCZ w zależności od stosowania amantadyny. Jedynymi istotnymi różnicami między grupami był bardziej zaawansowany wiek wśród pacjentów otrzymujących amantadynę i podawany remdesivir. W wielowymiarowych modelach proporcjonalnego ryzyka Coxa podawanie amantadyny było jedynym czynnikiem związanym z różnicami w śmiertelności wśród pacjentów otrzymujących TCZ z ciężkim COVID-19 (HR: 0,205 [CI: 0,131 - 0,322], P -wartość = 0,001) (Tabela 10). Skumulowaną śmiertelność Kaplana-Meyera obliczono ze statystyczną istotnością danych dotyczących przeżycia (Figura 4).

Tabela 10. Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka zgonu dla pacjentów leczonych TCZ

	Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka zgonu			
	P value	Hazard ratio (HR)	Lower 95%CI HR value	Upper 95%CI HR value
Wiek, lata	0.840	1.002	0.979	1.026
WBC	0.206	0.972	0.930	1.016
Remdesivir, Tak	0.405	1.207	0.775	1.878
Amantadyna, Tak	0.001	0.205	0.131	0.322
Płeć, Male	0.061	1.507	0.981	2.315
Nadciśnienie tętnicze, Tak	0.379	1.218	0.784	1.893
Niewydolność serca, Tak	0.815	1.095	0.514	2.333
Cukrzyca, Tak	0.942	0.983	0.613	1.575
Otyłość, Tak	0.504	1.159	0.752	1.788

KAPLAN-MEIER CURVES DISPLAYING THE ESTIMATED SURVIVAL PROBABILITY FOR PATIENTS TREATED WITH TCZ DIVIDED INTO AMANTADINE DEPENDENT GROUPS
 $p = 0.001$

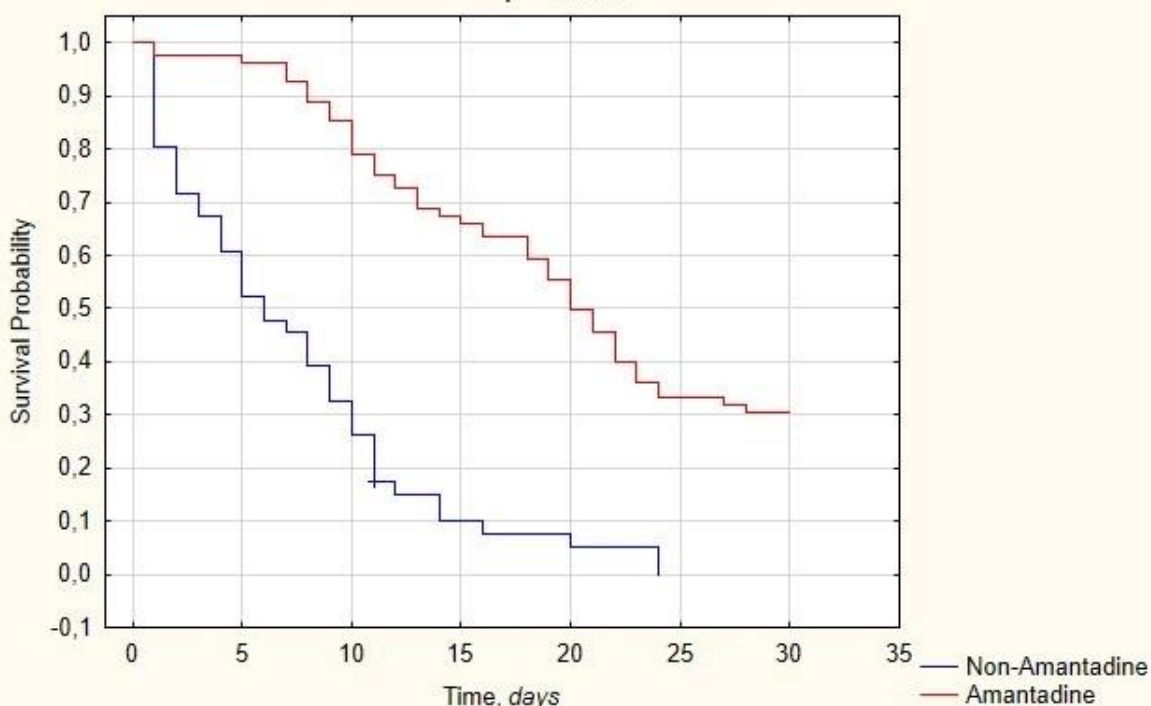


Figure 4. Krzywe Kaplana-Meiera przedstawiające oszacowane prawdopodobieństwo przeżycia dla pacjentów leczonych TCZ w podziale na grupy zależne od amantadyny.

6.3.5 Charakterystyka kliniczna pacjentów leczonych bez tocilizumabu w zależności od przyjmowania amantadyny

Spośród 114 pacjentów, którzy nie otrzymywali TCZ, 60 (53%) było leczonych amantadyną, a 54 (47%) bez niej. Grupy były jednorodne pod względem wieku, płci, wzrostu, masy ciała, BMI, krwinek białych, hemoglobiny, CRP, prokalcytoniny, IL-6, kreatyniny, ALT i D-dimerów. Pacjenci leczeni amantadyną mieli znacząco wyższy poziom płytek krwi ($221 \times 103/\text{ul}$ [184-300] vs $182,5 \times 103/\text{ul}$ [144-258], wartość $P = 0,04$). Otyłość i nadciśnienie występowały częściej w grupie amantadyny (33 [55%] vs 18 [33,3%], wartość $p = 0,02$) i (38 [63,3%] vs 21 [38,9%], wartość $p = 0,009$). W wieloczynnikowych modelach proporcjonalnego hazardu Coxa skonstruowanych identycznie jak w części 6.3.4 podawanie amantadyny było jedynym czynnikiem związanym z różnicami w śmiertelności wśród

pacjentów z ciężkim COVID-19 leczonych bez TCZ (HR: 0,224 [CI: 0,133-0,375], wartość $p = 0,001$). Skumulowaną śmiertelność Kaplana-Meyera obliczono ze statystyczną istotnością danych dotyczących przeżycia (Figura 5).

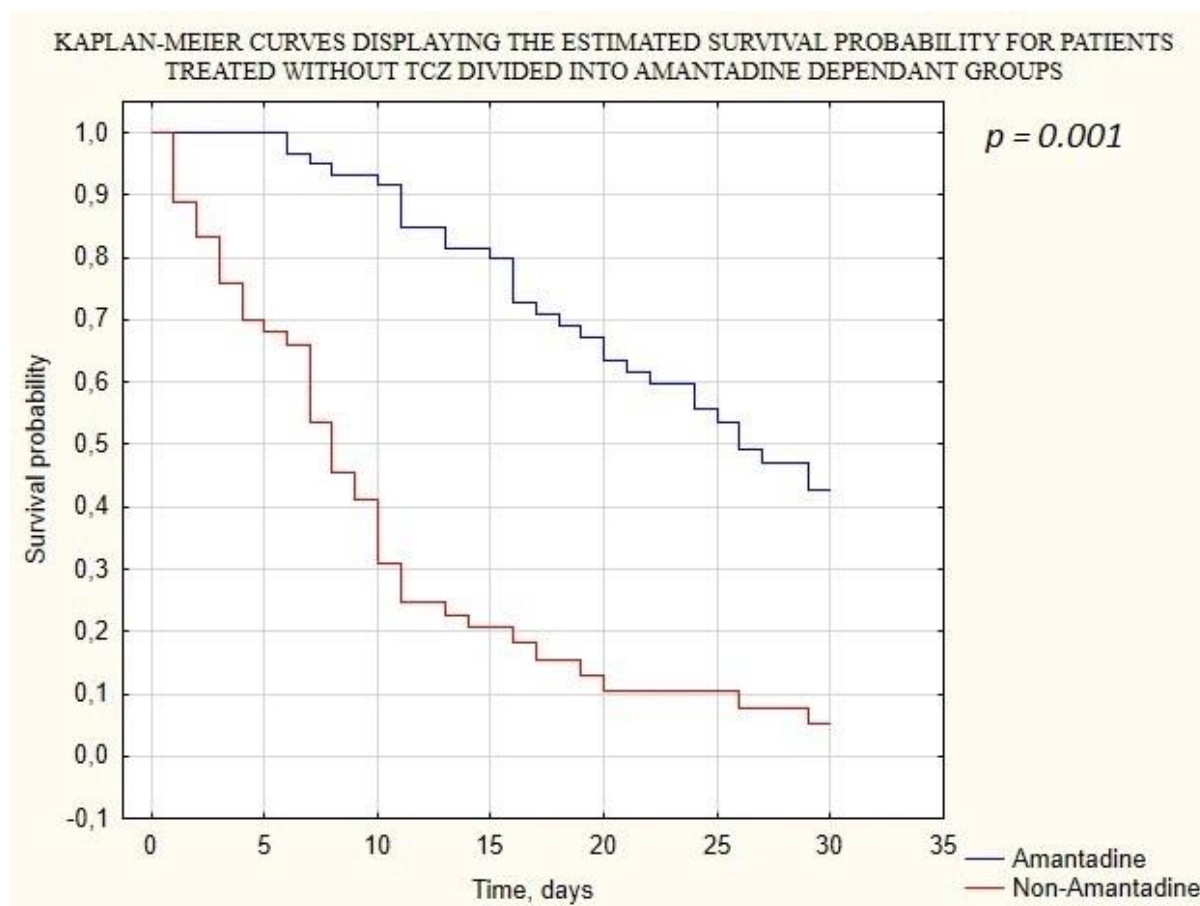


Figure 5. Krzywe Kaplana-Meiera przedstawiające oszacowane prawdopodobieństwo przeżycia dla pacjentów leczonych bez TCZ w podziale na grupy zależne od amantadyny.

6.3.6 Charakterystyka pacjentów leczonych amantadyną w podziale na dwie grupy ze względu na czas przyjęcia

Mediana czasu od przyjęcia na OIT do podania amantadyny wyniosła 3 dni (IQR 0-6 dni). Decyzja o podaniu amantadyny należała do lekarza prowadzącego. Decydującą kwestią w większości przypadków był stan nawodnienia chorego oraz przejściowe przeciwwskazania do podania amantadyny, takie jak: ciężka zdekompensowana niewydolność serca (klasa IV wg New York Heart Association), kardiomiopatia, zapalenie mięśnia sercowego, blok

przedsionkowo-komorowy II lub III stopnia, bradykardia. Aby odzwierciedlić możliwy błąd związany z czasem podania, podzieliliśmy pacjentów leczonych amantadyną na tych, którzy otrzymali pierwszą dawkę w ciągu 5 dni od przyjęcia (n = 99 [70,2%]) na OIT i tych, którzy otrzymali ją po 5 dniach od przyjęcia rozpoczęcie intensywnej terapii (42 [29,8%]).

Ustaliliśmy ten limit, ponieważ w przypadku większości leków przeciwwirusowych nie obserwuje się korzyści po upływie 5 dni od wystąpienia objawów COVID-19, a także w celu wykluczenia błędu systematycznego dotyczącego wczesnej śmiertelności na OIT.

Analizowane grupy były jednorodne pod względem wieku, płci, BMI, wyników badań laboratoryjnych, chorób współistniejących i leczenia towarzyszącego, ale różniły się istotnie śmiertelnością (34% wskazuje na korzyść otrzymania amantadyny po 5 dniach od przyjęcia, wartość P = 0,05). W wieloczynnikowych modelach proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 11) podawanie amantadyny po 5. dniu było niezależnie związane z niższą śmiertelnością (HR: 0,560 [CI: 0,313-0,999], wartość p = 0,050).

Tabela 11. Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka zgonu dla pacjentów leczonych amantadyną według grup czasu przyjęcia

	Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka zgonu			
	P value	Hazard ratio (HR)	Lower 95%CI HR value	Upper 95%CI HR value
Remdesivir, Tak	0.649	1.114	0.700	1.774
Tocilizumab, Tak	0,099	0.668	0.414	1,078
Amantadyna czas podania, >5 day	0,050	0.560	0.313	0.999

Płeć, Male	0.309	1.275	0.799	2,036
Nadciśnienie tętnicze, Tak	0.717	1,089	0.686	1.730
Niewydolność serca, Tak	0.405	1.377	0.649	2.924
Cukrzyca, Tak	0.322	0.783	0.482	1.271
Otyłość, Tak	0.361	1.235	0.785	1.942

6.3.7 Charakterystyka pacjentów leczonych na oddziale intensywnej terapii przez co najmniej 48 godzin

Aby uniknąć błędu statystycznego związanego z rejestracją pacjentów którzy zmarli bezpośrednio po przyjęciu do OIT, stworzyliśmy dodatkową analizę wykluczającą osoby, które zmarły w ciągu 48 godzin od przyjęcia na OIT. Okres 48-godzinny opiera się na podsumowaniu charakterystyki produktu leczniczego amantadyny, zgodnie z którym amantadyna osiąga pełny efekt terapeutyczny po 48 godzinach. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami pod względem płci, wieku, wzrostu, masy ciała, BMI, liczby białych krwinek, poziomu hemoglobiny, CRP, prokalcytoniny, IL-6, poziomu kreatyniny i aktywności ALT. Pacjenci otrzymujący amantadynę mieli nieznacznie wyższą liczbę płytek krwi i D-dimer na początku badania. Nadciśnienie tętnicze występowało statystycznie częściej w grupie leczonej amantadyną (59% vs 42%, wartość $P = 0,014$).

W wieloczynnikowych modelach proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 12) płeć (HR: 1,526 [CI: 1,063-2,190], wartość $P = 0,023$) i podawanie TCZ wiązało się z wyższą śmiertelnością

(HR: 1,543 [CI: 1,089-2,185], wartość P = 0,015), podczas gdy podawanie amantadyny wiązało się z niższym ryzykiem zgonu (HR: 0,242 [CI: 0,169-0,348], wartość P = 0,001).

Tabela 12. Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka zgonu dla pacjentów, którzy przeżyli pierwsze 48 godzin po przyjęciu na OIOM

	Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla ryzyka zgonu			
	P value	Hazard ratio (HR)	Lower 95%CI HR value	Upper 95%CI HR value
Płytki krwi, $\times 10^3/\text{ul}$	0,049	0.998	0.996	1,000
D-dimer, $\mu\text{g/l}$	0.410	1,026	0.966	1,090
Remdesivir, Tak	0.417	1.156	0.816	1.638
Tocilizumab, Tak	0,015	1.543	1,089	2.185
Amantadyna, Tak	0,001	0.242	0.169	0.348
Płeć, Male	0,023	1.526	1,063	2.190
Nadciśnienie tętnicze, Tak	0.829	0.963	0.684	1.357
Niewydolność serca, Tak	0.779	1,093	0.591	2,022
Cukrzyca, Tak	0.840	1,038	0.728	1.480
Otyłość, Tak	0.397	0.860	0.607	1.220

6.3.8 Charakterystyka pacjentów z rozpoznaniem SARS-CoV-2 typu dzikiego w zależności od spożycia amantadyny

Potwierdziliśmy zakażenie SARS-CoV-2 typu dzikiego u 143 pacjentów. Spośród 143 pacjentów 99 (70%) otrzymywało w leczeniu amantadynę. Grupy różniły się pod względem BMI (amantadyna 30,56 [26,67-35,15] vs grupa bez amantadyny 27,81 [26,39-29,92], wartość p = 0,039). Nie stwierdzono różnic statystycznych pod względem płci, wieku,

wzrostu, masy ciała, odsetka zajęcia płuc czy podstawowych badań laboratoryjnych. Otyłość i nadciśnienie tętnicze występowały znacznie częściej w grupie leczonej amantadyną (45 [45%] vs 10 [23%], wartość $p = 0,009$) i (58 [59%] vs 16 [36%], wartość $p = 0,014$), odpowiednio. Pozostałe choroby współistniejące oraz podawanie TCZ lub remdesiwiru nie różniły się statystycznie. Śmiertelność była istotnie niższa w grupie leczonej amantadyną (57% vs 91%, wartość $P = 0,001$).

Skonstruowałem wielowymiarowe modele proporcjonalnego hazardu Coxa dla wszystkich statystycznie istotnych czynników, podaży amantadyny zgodnie z głównym celem naszego badania, chorobami współistniejącymi zgodnie z drugorzędnym celem badania oraz podażą remdesiwiru i TCZ zgodnie z celem trzeciorzędowym. W wieloczynnikowych modelach proporcjonalnego hazardu Coxa podawanie TCZ wiązało się z wyższą śmiertelnością (HR: 2,200 [CI: 1,248-3,876], wartość $P = 0,006$), podczas gdy podawanie amantadyny wiązało się z niższym ryzykiem zgonu (HR: 0,212 [CI : 0,123-0,365], wartość $P = 0,001$).

6.3.9 Charakterystyka pacjentów z rozpoznaniem szczepu alfa wirusa SARS-CoV-2 w zależności od spożycia amantadyny

Potwierdziliśmy zakażenie SARS-CoV-2 szczepem Alpha (B.1.1.7) u 98 pacjentów. Spośród 98 pacjentów w tej grupie 42 (43%) otrzymało w leczeniu amantadynę. Grupy różniły się poziomem D-dimerów (amantadyna 0,855 [0,409-2,064] vs grupa bez amantadyny 0,512 [0,264-0,9715], wartość $p = 0,023$). Nie stwierdzono różnic statystycznych pod względem płci, wieku, wzrostu, masy ciała, BMI, odsetka zajęcia płuc czy podstawowych badań laboratoryjnych. Choroby współistniejące i podawanie TCZ lub remdesiwiru nie różniły się statystycznie. Śmiertelność była istotnie niższa w grupie leczonej amantadyną (66% vs 91%, wartość $P = 0,002$).

Ponownie Skonstruowałem wielowymiarowe modele proporcjonalnego hazardu Coxa dla wszystkich statystycznie istotnych czynników, podawaniem amantadyny zgodnie z głównym celem naszego badania, chorobami współistniejącymi zgodnie z drugorzędnym celem badania oraz podawaniem remdesiwiru i TCZ zgodnie z celem trzeciorzędowym . W wieloczynnikowych modelach proporcjonalnego hazardu Coxa podawanie amantadyny wiązało się z niższym ryzykiem zgonu (HR: 0,216 [CI: 0,128-0,364], wartość P = 0,001). Inne czynniki nie były istotne statystycznie.

7. Wnioski

7.1 Wnioski główne:

1. W leczeniu pacjentów z ciężkim lub krytycznym zapaleniem płuc związanym z COVID-19, u których rozwija się burza cytokinowa wyrażona wysokim poziomem interleukiny-6 (>100 pg/ml), podawanie tocilizumabu wraz ze standardowym leczeniem (opartym na deksametazonie, antybiotykoterapii i heparynie drobnocząsteczkowej) zapewnia znacznie lepszy efekt terapeutyczny od samego standardowego leczenia pod względem przeżycia, konieczności zastosowania wentylacji mechanicznej i przyjęcia na OIT.

2. W przypadku pacjentów z ostrą zatorowością płucną z radiologicznie potwierdzonym co najmniej umiarkowanym zajęciem płuc związanym z COVID-19 podanie tocilizumabu wraz ze standardowym leczeniem (opartym na deksametazonie, antybiotykoterapii) daje znacznie gorszy efekt pod względem przeżycia niż samo leczenie standardowe.

Dysfunkcjonalna odpowiedź immunologiczna na SARS-COV-2 prowadząca do burzy cytokinowej może przyczynić się do wcześniejszego wystąpienia ostrego udaru niedokrwienego lub zatorowości płucnej. Tocilizumab jest lekiem z wyboru u pacjentów wymagających terapii immunomodulacyjnej w celu zmniejszenia nadmiernej produkcji cytokin. Należy go jednak stosować ze szczególną ostrożnością, szczególnie u pacjentów z potwierdzonym epizodem choroby zakrzepowo-zatorowej

3. Pacjenci leczeni na oddziałach intensywnej terapii z powodu ciężkiej niewydolności oddechowej mogą odnieść korzyść z rozpoczęcia leczenia siarczanem amantadyny. Istotnie niższa śmiertelność była obserwowana wśród pacjentów, którzy rozpoczęli leczenie w późniejszym okresie hospitalizacji, potwierdza brak wpływu amantadyny na ostrą fazę zakażenia SARS-CoV-2. Dokładny wpływ leku na przeżycie jest nieznany i wymaga dalszych

badań. Zasadne wydaje się przeprowadzenie dalszych badań, w tym randomizowanego badania kontrolowanego, zwłaszcza ze względu na niski koszt ewentualnego leczenia w przypadku potwierdzenia skuteczności.

7.2. Wnioski szczegółowe:

1. Czynnikiem ryzyka przyjęcia do OIT u pacjentów z ciężkim lub krytycznym zajęciem płuc w przebiegu COVID-19 są wysokie wyjściowe stężenie CRP oraz cukrzyca.

Czynnikiem ryzyka zgonu u pacjentów z ciężkim lub krytycznym zajęciem płuc w przebiegu COVID-19 są zaawansowany wiek, płeć męska, podwyższona liczba limfocytów, obniżona liczba krwinek czerwonych, obniżony poziom hemoglobiny, obniżony hematokryt, wyjściowe stężenie prokalcytoniny powyżej 2ng/ml, wyjściowe stężenie kreatyniny powyżej 2mg/ml, wysoki poziom troponiny T oraz zwiększone poziomy aktywności aminotransferaz i GGTP.

2. Czynnikiem ryzyka zgonu w OIT u pacjentów z COVID-19 są zaawansowany wiek oraz wysoki procent zajęcia płuc w wyjściowym badaniu obrazowym. Nie stwierdziliśmy statystycznie istotnych różnic między przeżyciem a zgonem ze względu na płeć, wzrost, wagę, BMI, wstępne badania laboratoryjne, choroby współistniejące, podanie remdesiviru lub TCZ

3. Czynnikiem ryzyka zgonu u pacjentów z zatorowością płucną oraz COVID-19 są zaawansowany wiek oraz wysokie wyjściowe stężenie prokalcytoniny.

8. Praca oryginalna: Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study.



Article

Effectiveness of Tocilizumab in Patients with Severe or Critical Lung Involvement in COVID-19: A Retrospective Study

Daniel Chober ^{*}, Bogusz Aksak-Wąs , Katarzyna Bobrek-Lesiakowska, Anna Budny-Finster, Ewa Hołda, Joanna Mieżyńska-Kurtycz, Grzegorz Jamro and Miłosz Parczewski ^{*}

Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Pomeranian Medical University in Szczecin, 71-455 Szczecin, Poland; bogusz.aw@gmail.com (B.A.-W.); klesiakowska@gmail.com (K.B.-L.); budny.finster@gmail.com (A.B.-F.); ewaholda79@gmail.com (E.H.); jmiezynsk@gmail.com (J.M.-K.); grzjamro@gmail.com (G.J.)

^{*} Correspondence: daniel.chober@pum.edu.pl (D.C.); milosz.parczewski@pum.edu.pl (M.P.); Tel.: +48-503-707-357 (D.C.)

Abstract: Introduction: Acute lung injury is associated with dysfunctional immune response to SARS-CoV-2. This leads to CRS, which require immunomodulatory treatments aiming to limit the excessive production of cytokines. The literature so far indicates the effectiveness of tocilizumab in patients with COVID-19-associated pneumonia, but there is no clear evidence of its effectiveness in patients with at least 50% lung involvement; therefore, we aimed to bridge this gap in knowledge. Materials and methods: Longitudinal data for 4287 patients with confirmed COVID-19 infection were collected between 1st March 2020 and 16th of January 2022. In total, 182 cases with lung involvement >50% and biochemical indicators of cytokine release storm (IL-6 >100 pg/mL) were selected and analyzed using non-parametric statistics and multivariate Cox models. Results: Among the 182 included patients, 100 (55%) were treated with TCZ, while 82 (45%) did not receive TCZ. The groups were balanced regarding demographics, lung involvement and biochemical markers. Overall mortality in the group was 63.1%. Mortality in the TCZ group was 58.0% compared to 69.5% ($n = 57$) in the non-TCZ group ($p = 0.023$). In multivariate Cox proportional hazards models, intravenous administration of tocilizumab was associated with lower probability of ICU admission (HR: 0.333 (CI: 0.159–0.700, $p = 0.004$)) and lower mortality (HR: 0.57306 (CI: 0.354–0.927, $p = 0.023$)). Conclusions: Tocilizumab is effective as a treatment in the most severely ill patients, in whom the level of lung involvement by the inflammatory process can exceed 50% with coexisting biochemical indices of cytokine storm (IL-6 > 100 pg/mL).

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; tocilizumab; mortality; dexamethasone; ICU; CRS



Citation: Chober, D.; Aksak-Wąs, B.; Bobrek-Lesiakowska, K.; Budny-Finster, A.; Hołda, E.; Mieżyńska-Kurtycz, J.; Jamro, G.; Parczewski, M. Effectiveness of Tocilizumab in Patients with Severe or Critical Lung Involvement in COVID-19: A Retrospective Study. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 2286. <https://doi.org/10.3390/jcm11092286>

Academic Editor: Yan Sanders

Received: 15 March 2022

Accepted: 18 April 2022

Published: 20 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since November 2019, when the first SARS-CoV-2 infection was identified, almost 430 million cases of this infection have been confirmed worldwide, with over 6 million deaths [1]. Disease severity ranges from asymptomatic or mild to severe, with symptoms of acute respiratory distress syndrome (ARDS) [2]. Severe and critical cases of COVID-19, which occur respectively in 14% and 5% of patients, may lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS) due to COVID-19-associated pneumonia [3]. The COVID-19 mortality rates appears to be associated with the presence of severe ARDS and range widely, from 12 to 78 percent, with an average range of 25 to 50 percent [4].

Routinely used blood biomarkers for COVID-19 disease combined with radiologic assessment, including chest computed tomography (C-CT), may help to identify disease severity and mortality [5]. However, currently identified blood biomarkers such as interleukin-6 (IL-6), lactate dehydrogenase or procalcitonin, analyzed as standard of care on admission to hospital, have only moderate predictive value for mortality for COVID-19 compared to age or comorbidities [6,7]. The predictive value of imaging diagnostics based on computed

tomography of the chest (C-CT) appears to be crucial in terms of severity and mortality [8]. The extent of lung involvement determined on the basis of the first C-CT examination correlates with clinical severity [9–11]. The French Society of Thoracic Imaging (SIT) recommends grading lung involvement as absent or minimal (<10%), moderate (10–25%), extensive (25–50%), severe (50–75%) or critical (>75%) [12].

COVID-19 treatment has evolved notably since the early pandemic period, with the current standard of care including antiviral agents such as remdesivir, molnupiravir and nirmatrelvir for the treatment of the early disease, supplemented with low-molecular-weight heparin, dexamethasone and supportive oxygen treatment [13]. Advanced disease stages with acute lung injury are commonly associated with dysfunctional immune response to SARS-CoV-2. This leads to cytokine release storm (CRS) with overproduction of interleukin-6 (IL-6), which requires immunomodulatory treatments aiming to limit the excessive production of cytokines [14]. To date, associations between increased concentration of cytokines such as IL-6, interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and mortality have been identified [15,16]. Corticosteroids, anti-interleukin-1 receptor monoclonal antibody therapy (anakinra), anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody treatment (tocilizumab) and selective and reversible inhibitor of JAK1 and JAK2 kinases (baricitinib) have been included as a guideline-based standard of care in cases with CRS over time [13]. The administration of dexamethasone daily for up to 10 days reduced mortality among patients requiring oxygen support with or without mechanical ventilation [17]. Additionally, the anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody agent, tocilizumab (TCZ), has been reported to reduce mortality among hospitalized patients with COVID-19 pneumonia who did not require mechanical ventilation [18]. The use of tocilizumab, the IL-6 receptor blocker, is important as it may disrupt the inflammatory cascade at this key disease stage. However, some studies have not reported a benefit of TCZ use, mostly because of selection bias, failure to reach 80% power or due to very wide confidence intervals that lead to missing of potential benefit [19,20].

TCZ should only be used in cases with identified cytokine storm, with IL-6 levels exceeding 100 pg/mL [21] and features of COVID-19 associated pneumonia; however, data on its efficacy in the group of the patients with precisely identified severe disease are limited. To address this gap, we wished to evaluate the effect of TCZ treatment on mortality in the group of patients with severe (50–75%) and critical (>75%) lung involvement. A secondary goal of the study was to identify risk factors for ICU admission and mortality.

2. Materials and Methods

2.1. Study Groups

Our database contains information about patients hospitalized at the Regional Hospital in Szczecin, Poland, which was the largest COVID-19 treatment center in the West-Pomeranian region of Poland, where in total >13,000 disease cases were evaluated for admission during the current SARS-CoV-2 pandemics. Patients participating in the study were observed from 4th of March 2020 to 23rd of January 2022, when the database was closed. The database contains 4287 cases, all admitted to the hospital with COVID-19. Informed consent for participation in the analysis was obtained from all subjects, but the participation did not influence treatment options for the patients. All data were fully anonymized before statistical analyses.

In this study, we retrospectively analyzed the dataset of cases with severe or critical COVID-19 pneumonia based on chest computed tomography (C-CT). All patients presented with clinical symptoms of cough, dyspnea, fever (>38 °C) and oxygen saturation less than or equal to 90% prior to hospital admission. In every case, polymerase chain reaction (PCR) for severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) was performed using pharyngeal swabs, confirming infection with this virus, while pneumonia was confirmed using chest computed tomography (C-CT).

We assessed the lung involvement severity using the scale recommended by The French Society of Thoracic Imaging (SIT). The French Society of Thoracic Imaging (SIT)

recommends grading lung involvement as absent or minimal (<10%), moderate (10–25%), extensive (25–50%), severe (50–75%) or critical (>75%).

All patients were admitted to the hospital on the basis of the assessment of the doctors on duty at the hospital emergency department. On admission to the hospital, the general condition, comorbidities and results of laboratory and imaging tests were taken into account. All laboratory and CT tests were performed immediately upon admission. Laboratory data used for this analysis were obtained within the first 24 h from admission. In cases where the tocilizumab was administered based on an increase in IL-6 in the subsequent days of hospitalization, the last IL-6 value prior to the drug administration was used.

All patients were treated in accordance with the current knowledge and guidelines of the Polish Association of Epidemiologists and Infectious Diseases Specialists (PTEiLChZ) [13,21]. If administered, the 5-day remdesivir course was started within 7 days of the onset of symptoms; if symptoms lasted longer, drug administration was not initiated. Remdesivir administered intravenously once daily for 5 days, with a loading dose of 200 mg on day 1, followed by maintenance doses of 100 mg. Chloroquine and lopinavir were not used in patients included for this analysis. Supportive treatment was applied to each of the patients. The supportive treatment included:

- Antibiotic therapy (intravenous ceftriaxon was the drug of choice but could vary depending on the patient's condition);
- Oxygen therapy (low- or high-flow oxygen therapy or mechanical ventilation were used, while no extracorporeal ventilation was used among patients included in this analysis);
- Intravenous rehydration based on individual needs;
- Dexamethasone administered intravenously at a dose of at least 6 mg per day;
- Low-molecular-weight heparin administered in prophylactic or therapeutic doses depending on patient condition.

This dataset was collected for all consecutive patients with severe pneumonia admitted to the Regional Hospital, Szczecin, Poland, between 4 March 2020 and 16 January 2022. The patients were divided into two groups for this analysis. In the first group, tocilizumab was administered intravenously at a dose of 8 mg/kg (maximum dose: 800 mg) twice, 12 h apart. The second group was administered only standard treatment in line with the guidelines. The control group consisted of patients who did not consent to the administration of tocilizumab and patients who, despite consenting, did not receive drugs for non-medical reasons (lack of drug availability in the hospital) or had medical contraindications for the drug use. Tocilizumab was administered according to guidelines, which did not change in this respect over time. Tocilizumab was administered only to patients with oxygen saturation (SpO₂) <90% and interleukin-6 concentration >100 pg/mL. The final decision to use tocilizumab was at the discretion of the treating physician based on patient condition, consent for the drug use, indications listed above and infection risk. Before administering tocilizumab, acute CMV, EBV, HBV, HCV and HIV viral infections were ruled out, as well as acute toxoplasma gondii infestation based on serology.

As we wished to study the effects of TCZ in the group with severe pneumonia and CRS (indication for the TCZ use), the inclusion criteria for this study were as follows:

- CT-confirmed COVID-19-associated severe (lung involvement 50–75%) or critical (lung involvement > 75%) pneumonia;
- Biochemical indicators of cytokine release storm IL-6 level > 100 pg/mL (the level of interleukin-6 was established on the basis of the recommendations [21]);
- Age > 18 years.

The endpoint for this analysis was death or discharge from the hospital.

2.2. Ethical Issues

The study protocol was approved by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland (approval number: KB-0012/92/2020). All patients gave

their informed consent to participate in the study. Additional consent had to be given for the administration of off-label drugs, including tocilizumab. In every case, individual emergency consent was provided by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland, which was the standard procedure for the drug administration. The ethical committee worked on a daily basis from the beginning of the pandemic to provide consent for these cases. The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

2.3. Sampling and Data Collection Methodology

In this study, we collected clinical data from medical records, including data on age, sex, comorbidities, treatment history, duration of in-hospital stay, duration of treatment in the ICU, survival statistics, baseline blood oxygenation levels, chest CT scan results and selected laboratory parameters (white blood cell count, neutrophils count, lymphocytes count, hemoglobin levels, platelet count, procalcitonin levels, C-reactive protein levels, interleukin 6 levels, lactate dehydrogenase levels, d-dimer activity, bilirubin levels, troponin T levels, GGTP and aspartate and alanine aminotransferase activity levels). We created two groups based on procalcitonin concentration. The first group received a procalcitonin concentration below 2 ng/mL and the second group received a procalcitonin concentration above 2.0 ng/mL, as per laboratory sepsis prognostic recommendations. We divided creatinine concentrations into two thresholds, the first concentration below 2 mg/mL and the second above 2 mg/mL. This level simply corresponded to eGFR 30 mL/min/1.73 m² for our group. The differences in the concentration of troponins T were most likely due to the secondary origin of renal failure.

2.4. Statistics

Clinical and baseline laboratory characteristics were calculated for non-parametric statistics, as data did not follow the normal distribution patterns. Statistical comparisons were performed using Mann–Whitney U tests for non-parametric statistics. Multiway tables were made with consideration of chi-square, Pearson and NW results. Confidence intervals (CIs) and interquartile ranges (IQRs) are indicated where appropriate.

A Kaplan–Meyer cumulative mortality test was calculated with the statistical significance of survival data analyzed using the log-rank test. Unadjusted and multivariate Cox proportional hazard models were used to assess the effects of the analyzed parameters on the risk of death and to calculate the hazard ratios (HR). For the final model, the best fit based on Akaike's information criteria was selected. Here, *p*-values of 0.05 were considered significant.

Commercial software (Statistica 13.0 PL; Statsoft, Warsaw, Poland) was used for the statistical calculations.

3. Results

3.1. Clinical Characteristics of Patients with COVID-19

From our database, we selected cases with at least 50% lung involvement and concomitant CRS markers (IL-6 > 100 pg/mL) (Figure 1).

The dataset included 182 adult patients, with a median age 68.5 (IQR 61–76) years, with severe or lung involvement (Table 1). All cases were classified as having severe or critical lung involvement based on chest computed tomography (C-CT), with a median of lung involvement value of 59.61% (IQR 54.52–67.38). The key biochemical parameters indicative of advanced inflammation were significantly elevated. The median IL-6 was 177.5 pg/mL (IQR 129–287), with a concurrently low procalcitonin concentration (median 0.35 ng/mL (IQR 0.17–0.65)), clearly indicating a cytokine release storm. Attention is drawn to the extremely high median lactate dehydrogenase level (median 630 U/L (IQR 521.5–783.5)), which may indicate the risk of a severe course of the disease. Of 182 cases, all received glucocorticoids (dexamethasone administered intravenously at a dose of at least 6 mg per day), antibiotic therapy (drug of choice was ceftriaxone at at least 2 g daily

but could vary depending on the patient's condition), intravenous rehydration, supportive oxygen supplementary therapy and therapeutic low-molecular heparin. Of 182 cases, 57 (31%) received remdesivir. The patients' chronic medications were maintained unless they required modification; for example, in diabetic patients, metformin was discontinued in all cases and insulin was used in treatment according to the glycemic profile.

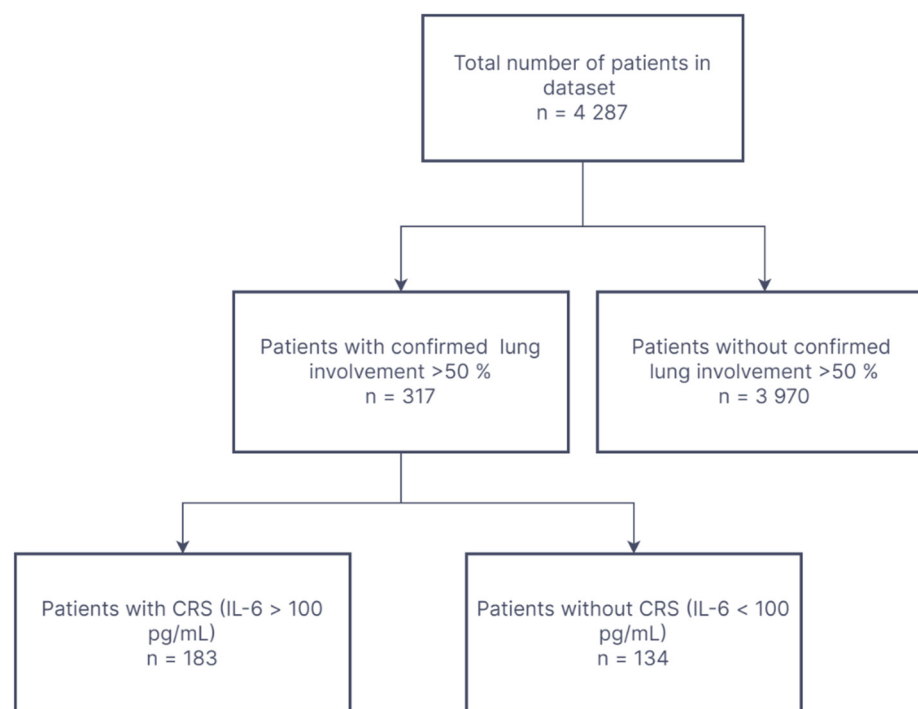


Figure 1. Flowchart of the study inclusion criteria.

Table 1. Baseline characteristics of all patients included in the study.

	Baseline Characteristics of All Patients Included in the Study			
	<i>n</i>	Median	Lower Quartile	Upper Quartile
Age, years	182	68.50	61.00	76.00
Percentage of Lung Involvement, %	182	59.61	54.52	67.38
WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$	181	9.05	6.37	11.88
NEU, $\times 10^3/\mu\text{L}$	181	7.10	5.20	9.90
LYM, $\times 10^3/\mu\text{L}$	181	0.80	0.50	1.10
RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$	181	4.57	4.15	4.91
HGB g/dL	181	13.60	12.30	14.70
HCT, %	181	39.50	36.10	42.70
Platelets, $\times 10^3/\mu\text{L}$	181	231.00	183.00	284.00
Procalcitonin, ng/mL	179	0.35	0.17	0.65
CRP, mg/L	182	183.97	133.75	258.28
IL-6, pg/mL	182	177.50	129.00	287.00
LDH, U/L	176	630.00	521.50	783.50
D-dimer, $\mu\text{g/L}$	178	1195.50	631.00	4387.00
Creatinine, mg/dL	182	1.13	0.87	1.48
AST, U/L	176	59.00	47.00	82.00
ALT, U/L	176	39.00	26.50	60.50
Troponin T, ng/L	174	26.80	15.70	49.00
GGTP, U/L	167	63.00	36.00	127.00
Bilirubin total, mg/dL	167	0.59	0.42	0.77

The most common comorbidity was arterial hypertension, which was present in 63 (34%) cases. Diabetes was found in 38 cases (21%). In total, 25 (14%) cases were related with both diabetes and hypertension. Other comorbidities collected in our database occurred occasionally and had no statistical significance.

3.2. Clinical and Laboratory Data on TCZ Treated vs. Control Group

The study group included 100 (55%) patients who received TCZ and 82 (45%) controls treated who received standard care only. The median time from hospital admission to administration of the first dose of tocilizumab was 1 day (IQR 1–2 days).

There were no statistically significant differences between particular groups regarding age, comorbidities, percentage of lung involvement, white blood cell count, neutrophils count, lymphocytes count, red blood cells count, hemoglobin level, hematocrit level, platelets count, CRP levels, interleukin-6 levels, lactate dehydrogenase levels, d-dimer activity, bilirubin levels, GGTP or aspartate and alanine aminotransferase activity levels. The groups differed statistically in terms of troponin T, procalcitonin and creatinine levels.

The median lengths of hospital stay were 15 (IQR 6–28) days, and 16 (IQR 9.5–28.5) days for the TCZ group, and 11.5 (IQR 9.5–28.5) days for the non-TCZ group ($p = 0.109$).

3.3. Factors Associated with ICU Admission in the Analyzed Group

Out of 182 patients, 59 (32.4%) were admitted to ICU due to COVID-19-related pneumonia and its complications. Out of 59 patients admitted to ICU, 30 (51%) were treated with TCZ and 29 (49%) were treated with standard care only. Of 123 patients not admitted to ICU, 52 (42%) were treated with TCZ and 71 (58%) were treated with standard care only ($p = 0.27$). All patients in ICU were on invasive mechanical ventilation. We analyzed the group in terms of statistical significance of risk factors for admission to ICU. Statistically significant factors in our analysis were age, red blood count, CRP levels, D-dimers and troponin T levels. The median age was higher in groups admitted to ICU. The median percentage of lung involvement and median red blood cell count were higher in groups not admitted to ICU.

Comorbidities were important factors in admission to the ICU. There were statistically significant differences between the groups regarding frequency of hypertension and diabetes ($\text{Chi}^2 p = 0.001$), which affected the risk of admission to the ICU. Out of 63 cases related to hypertension, 38 were admitted to ICU (60%). Out of 38 cases related to diabetes, 26 were admitted to ICU (68%). Additionally, there were notable differences between the groups regarding remdesivir use ($\text{Chi}^2 p = 0.001$). Out of 57 cases treated with this agent, 28 were admitted to ICU (49%). All statistically significant factors are presented in Table 2.

We created multivariate Cox proportional hazards models for all statistically significant factors and for the administration of tocilizumab as the main goal of our study. In the multivariate Cox proportional hazards models (Table 2), higher CRP levels (HR: 1005 (CI: 1001–1008), $p = 0.004$) and diabetes as a concomitant disease (HR: 2116 (CI: 1119–4002), $p = 0.02$) were associated with higher probability of ICU admission. Administration of tocilizumab was associated with lower probability of ICU admission, but it was not statistically significant (HR: 0.574 (CI: 0.320–1031), $p = 0.063$) (Table 2).

Table 2. Characteristics of groups admitted to ICU vs. not admitted to ICU.

Characteristics of Groups Admitted to ICU vs. Not Admitted to ICU				Cox Proportional Hazards Model for ICU Admission			
	ICU n = 59	Non-ICU n = 123	p	p Value	Hazard Ratio (HR)	Lower 95%CI HR Value	Upper 95%CI HR Value
Percentage of Lung Involvement, median (IQR)	59.06 (54.39–63.76)	63.51 (54.61–71.39)	0.049	0.161	1024	0.991	1058
RBC, $\times 10^6 / \mu\text{L}$, median (IQR)	4475 (4.04–4.86)	4.7 (4.33–5)	0.022	0.441	1211	0.744	1974
CRP, mg/L, median (IQR)	175.2 (125.4–249.81)	205.71 (156.79–277.91)	0.021	0.004	1005	1002	1009
D-dimers, $\mu\text{g/L}$, median (IQR)	1488 (660–6501)	868 (594–1923)	0.009	0.158	1000	1000	1000
Troponin T, ng/L, median (IQR)	30.65 (18.7–54.25)	21.2 (12.8–39.1)	0.034	0.321	1002	0.998	1006
Age Group 18–65 (reference) vs. 65+	34 (58%)	33 (27%)	0.001	0.517	1236	0.651	2345
Hypertension n (%) Yes (reference)	38 (60%)	25(40%)	Chi-square Pearson p = 0.001	0.468	0.780	0.398	1526
Diabetes, n (%) Yes (reference)	26 (68%)	12 (32%)	Chi-square Pearson p = 0.001	0.021	2117	1119	4002
Remdesivir, n (%) Yes (reference)	28 (47%)	29 (24%)	Chi-square Pearson p = 0.001	0.645	1148	0.637	2070
Tocilizumab, n (%) Yes (reference)	29 (49%)	71 (58%)	Chi-square Pearson p = 0.277	0.064	0.575	0.320	1032

3.4. Overall Mortality Risk

Overall mortality in the group was high. Out of 182 patients, 115 (63.1%) died from COVID-19-related pneumonia and its complications, while 67 (36.9%) survived. Out of 59 patients admitted to ICU, 45 (76.2%) died and 14 (23.8%) survived. The median length of treatment for the group who did not survive was 9 (IQR 3.5; 19) days. The median length of treatment for the group who survived was 27.5 (IQR 15; 40) days.

We also analyzed the group within the context of death risk factors, regardless of tocilizumab use (Table 3). Higher mortality factors in our analysis were associated with age, gender, lymphocyte count, red blood cell count, hemoglobin level, hematocrit, procalcitonin level, creatinine level, troponin T level and the activity levels of aminotransferases and GGTP. The concentrations of interleukin-6 and the activity levels of lactate dehydrogenase did not differ significantly.

Table 3. Characteristic of surviving group compared to the patients who died.

Characteristics of Surviving Group Compared to the Patients Who Died				Cox Proportional Hazards Model for Mortality			
	Survived n = 67	Died n = 115	p Value	p Value	Hazard Ratio (HR)	Lower 95%CI HR Value	Upper 95%CI HR Value
Percentage of Lung Involvement, median (IQR)	56.73 (53.71–63.76)	61.11 (54.78–68.34)	0.051	0.199	1017	0.992	1044
LYM, $\times 10^3 / \mu\text{L}$, median (IQR)	0.9 (0.6–1.3)	0.7 (0.5–1.1)	0.024	0.438	0.854	0.574	1273
RBC, $\times 10^6 / \mu\text{L}$, median (IQR)	4.78 (4.25–5.12)	4.46 (4.05–4.82)	0.004	0.797	0.891	0.368	2157
HGB g/dL, median (IQR)	14 (12.8–14.8)	13.4 (12–14.4)	0.016	0.867	0.957	0.570	1607
HCT, %, median (IQR)	41.2 (37.5–43.3)	39.2 (35.4–41.8)	0.026	0.826	1024	0.834	1256
ALT, U/L, median (IQR)	44 (36–69)	33.5 (23–55)	0.001	0.638	0.999	0.992	1006
Troponin T, ng/L, median (IQR)	19.1 (11.8–27.1)	34.55 (21.5–60.4)	0.000	0.013	1002	1001	1004
GGTP, U/L, median (IQR)	76.5 (45.5–158.5)	47 (31–95)	0.001	0.092	0.998	0.995	1001
Age Group 18–65 (reference) vs. 65+	35 (52%)	32 (28%)	Chi-square Pearson p = 0.001	0.003	0.466	0.286	0.761
Gender, n (%) Male(reference)	52 (78%)	72 (63%)	Chi-square Pearson p = 0.036	0.966	1012	0.611	1676
Procalcitonin, n (%) <2.0 ng/mL (reference)	65 (98%)	100 (88%)	Chi-square Pearson p = 0.016	0.683	0.840	0.364	1940
Creatinine Level, n (%) <2.0 mg/dL (reference)	66 (99%)	97 (84%)	Chi-square Pearson p = 0.002	0.048	0.499	0.251	0.993
Diabetes, n (%) Yes	11 (16%)	27 (23%)	Chi-square Pearson p = 0.258	0.346	0.789	0.482	1292
Tocilizumab, n (%) Yes (reference)	42 (63%)	58 (50%)	Chi-square Pearson p = 0.109	0.032	0.615	0.394	0.956

Diabetes was associated with higher mortality risk (10 percent points), but there were no statistically significant differences (Chi2 $p = 0.25$). Additionally, hypertension and remdesivir use were not associated with mortality risk differences. All statistically significant factors are presented in Table 3.

3.5. Tocilizumab Associated Mortality

The mortality rate in the TCZ group was 58.0% ($n = 58$) compared to 69.5% ($n = 57$) in the non-TCZ group ($p = 0.02341$). The median length of hospital stay for the TCZ group was 16 (IQR 9.5; 28.5) days, while it was 11.5 (IQR 3; 24) days for the non-TCZ group. For those who survived, the median lengths of treatment were 28 (IQR 15; 41) days for the TCZ group and 22 (IQR 14; 35) days for the non-TCZ group. For those who died, the median lengths of treatment were 12 (IQR 6; 20) days for the TCZ group and 6 (IQR 2; 15) days for the non-TCZ group (Figure 2).

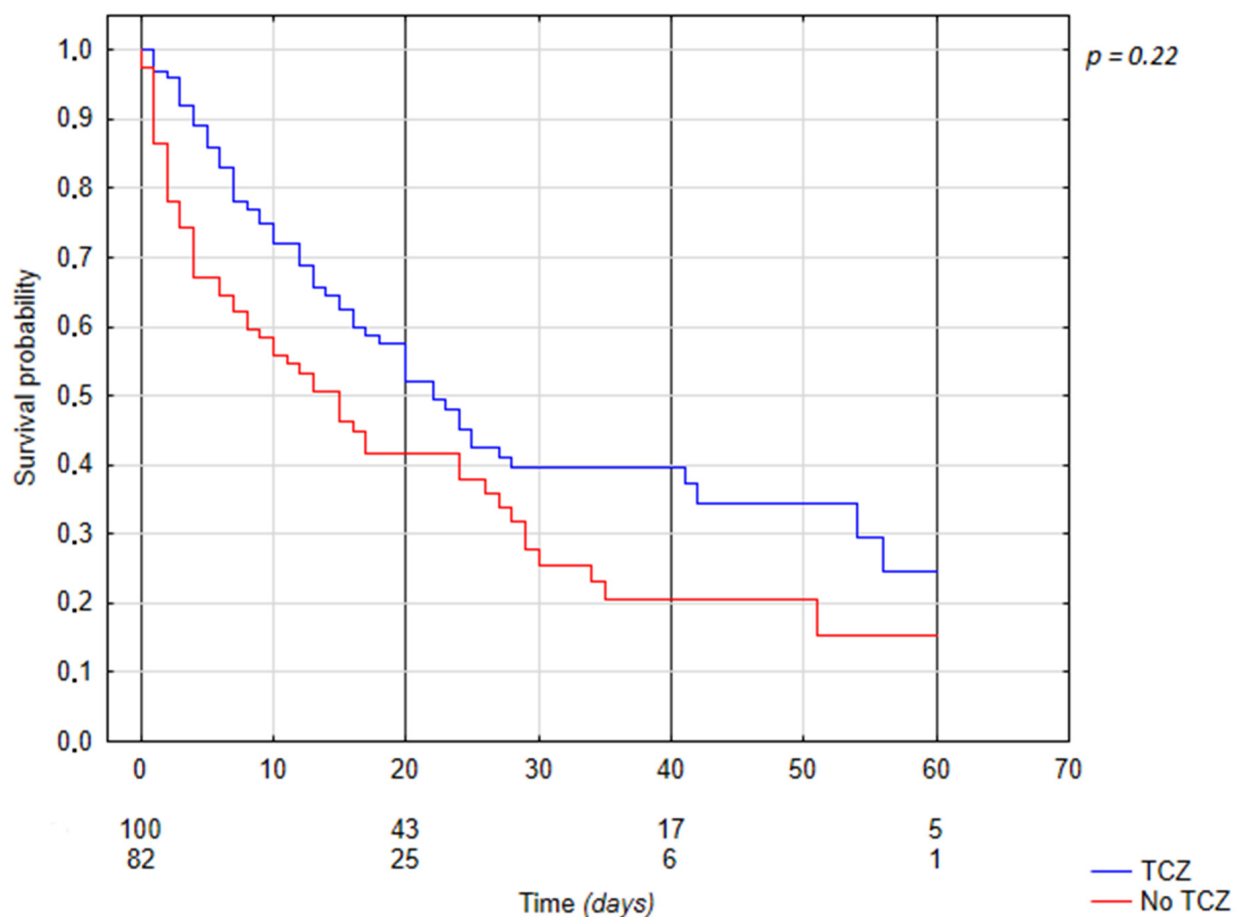


Figure 2. Kaplan–Meier curves displaying the estimated survival probability for TCZ-related treatment of patients with severe or critical COVID-19-related pneumonia.

We created multivariate Cox proportional hazards models for all statistically significant factors and for the administration of tocilizumab. As diabetes appears to be an important factor, we added it as an additional variable. In multivariate proportional Cox hazards models (Table 3), lower age, creatinine levels below 2 mg/dL and intravenous administration of tocilizumab were associated with lower mortality (HR: 0.466 (CI: 0.286–0.761), $p = 0.003$; HR: 0.499 (CI: 0.251–0.993), $p = 0.003$; and HR: 0.615 (CI: 0.394–0.956), $p = 0.032$, respectively). Higher troponin T levels were associated with higher mortality but the hazard ratio was low.

4. Discussion

The risk of death in cases with severe and critical lung involvement of COVID-19 is increased in patients with cytokine storm. In the literature to date, the influence of the cytokine storm and hyperinflammatory syndrome on the risk of death in the course of SARS-CoV-2 infection and the possibility of targeting them with immunomodulatory agents, especially corticosteroids and tocilizumab, have been well described [14,17,18,22]. However, the published data do not include any study that would directly observe the effectiveness of tocilizumab as an immunomodulating treatment in the most severely ill patients, in whom the level of lung involvement due to the inflammatory process would exceed 50% with coexisting biochemical indices of cytokine storm (IL-6 > 100 pg/mL). The WHO issued the first recommendation regarding IL-6 receptor blockers as the fifth version of the WHO living guidelines. The recommendations followed the publication of RECOVERY and REMAP-CAP trial publications. No changes have been made since then for the IL-6 receptor blocker recommendation [23].

In this study, we analyzed the effects of tocilizumab on mortality in patients with radiologically proven severe or critical COVID-19-related pneumonia with concomitant biochemical markers of cytokine storms. As the efficacy of tocilizumab was associated with the use of glucocorticoids, we would like to emphasize that all patients in this study received at least 6 mg of dexamethasone daily. With no statistically significant differences between treatment arms in terms of age, percentage of lung involvement, white blood cell count, neutrophils count, lymphocytes count, red blood cells count, hemoglobin level, hematocrit, platelet count, CRP levels, interleukin-6 levels, lactate dehydrogenase levels, d-dimer activity, bilirubin levels, GGTP, aspartate and alanine aminotransferase activity levels and grouped levels of procalcitonin and creatinine, we found a significantly lower 60 day mortality rate in patients treated with tocilizumab in addition to standard treatment as compared to those treated with standard treatment only (dexamethasone, antibiotics, prophylactic or therapeutic low-molecular-weight heparin). The mean mortality in the group treated with tocilizumab was 58% compared to 69.5% in the group treated without this agent (Figure 2). The overall mortality in this study was high due to the eligibility criteria, which allowed only extremely severe patients to be included in the study. The low percentage of ICU admissions was associated with a constant lack of beds in the ICU, age-related disqualification and the phenomenon of “sudden death”, when the deterioration of vital functions occurs so quickly that it is impossible to transfer to the ICU. In a retrospective study of the predictors of mortality in patients with severe COVID-19 pneumonia, the overall mortality rate at 30 days was 56.60% [24]. The similar mortality rate suggests that just like the authors of the above-mentioned study, we qualified only the most seriously ill patients for our research.

Our results in reducing mortality are in line with the results of the randomized analysis of RECOVERY [25]. The analysis compared two groups of patients with regard to tocilizumab-related mortality. The mortality in the tocilizumab group was 31% out of 2022 patients compared to 35% of 2094 patients receiving standard care. The mortality differences in our work were significantly greater. This was due to differences in qualification for the study. Eligibility for randomization in the RECOVERY trial was based on the CRP level and dyspnea expressed as saturation <92%. Our analysis included only patients with severe dyspnea (saturation <90%), with at least 50% lung involvement by inflammation, and we used the concentration of interleukin-6 as the primary cytokine storm biomarker; in this group expected mortality was notably greater.

Another large study in patients with severe pneumonia was REMAP-CAP [26]. It was based on ICU patients who required respiratory or cardiovascular support. Patients were divided into a combined group treated with interleukin-6 receptor antagonists in addition to standard therapy and a group receiving only standard therapy. In-hospital mortality in the pooled interleukin-6 receptor antagonist group was 27% (108 out of 395 patients) compared with 36% (142 out of 397 patients) in the control group. The percentage decreases in mortality were similar, while the overall mortality in our study was diametrically greater.

The main differences between our studies were based on the preliminary qualification of patients for the study, namely the definition of the disease severity. Severe COVID-19 was defined as receiving support for respiratory or cardiovascular failure in the ICU. The only biochemical markers analyzed were CRP and D-dimers. The severity of the pneumonia was not assessed radiographically.

The EMPACTA trial suggested that tocilizumab reduced the combined risk of mechanical ventilation and death among hospitalized patients with COVID-19 pneumonia who were not receiving mechanical ventilation, but the overall mortality was even higher in the tocilizumab group (10.4% (95%CI, 7.2 to 14.9) vs. 8.6% (95%CI, 4.9 to 14.7)) [18]. The differences between studies lay in the study qualification criteria. Eligibility for the EMPACTA study did not take into account the concentration of IL-6. In our case, the concentration of interleukin-6 was a crucial marker for TCZ implementation, in line with local guidelines (required a concentration >100 pg/mL). In the EMPACTA study, patients were excluded if they were receiving continuous positive airway pressure, bilevel positive airway pressure or mechanical ventilation. In our study, patients were eligible for tocilizumab administration regardless of the method of oxygen supplementation.

In a study by Stone et al., treatment with tocilizumab was considered ineffective in preventing intubation or death [20]. In this study, the inclusion criteria were based on the presence of at least two of the following: fever (body temperature > 38 °C) within 72 h prior to study entry, pulmonary infiltrates or the need for supplemental oxygen to maintain oxygen saturation above 92%. Additionally, it was required to meet one of the laboratory criteria: CRP level > 50 mg/L, level of ferritin > 500 ng/mL, level of d-dimers > 1000 ng/mL or level of lactate dehydrogenase > 250 U/L. Furthermore, patients were excluded if they were receiving supplemental oxygen at a rate greater than 10 liters per minute. The study entry criteria did not guarantee that tocilizumab was administered to patients with dyspnea or CRS markers. This raises doubts as to whether tocilizumab was administered in a timely manner, which could reduce its effectiveness.

Additionally, in a study by Salvarani et al., tocilizumab was considered ineffective in terms of preventing disease progression or clinical worsening compared to standard care. It is worth noting that their study had several limitations. The main disadvantages of their work were the failure to reach 80% of the power as the sample size was much smaller than calculated (126 vs. 398), as well as the selection bias of excluding patients with more severe disease, making it impossible to analyze the efficacy of tocilizumab in severe cases of COVID-19 pneumonia [19].

Our study had several limitations that we know of. They were related to its observational and retrospective nature. Immunomodulating treatment was selected by physicians on the basis of knowledge and guidelines, and was periodically limited by the availability of drugs and lack of randomization. We did not conduct a safety analysis of the drugs used due to the lack of access to such data. Electronic data recording may result in possible data entry errors, but we took every precaution to minimize such risks.

The main advantage of the current analysis was the collection of data from one center, which excluded the possibility of error related to different standards of individual tests. Another advantage of our analysis was the accurate assessment of lung involvement and its impact on the treatment process.

5. Conclusions

Recent research has elucidated the role of IL-6 blockade in the treatment of COVID-19. Recently, the REMAP-CAP [24] and RECOVERY [23] studies have provided evidence of the improved survival benefit of tocilizumab in patients with COVID-19-pneumonia. A large meta-analysis also found reductions in all-cause mortality associated with administration of IL-6 antagonists [27]. Our results suggest that the combination of tocilizumab with standard therapy (based on dexamethasone) provides a significantly better survival effect than standard therapy alone in patients with severe or critical lung involvement of COVID-19 who have developed a cytokine storm characterized by high interleukin-6 levels

(>100 pg/mL). Cytokine release syndrome has become a significant clinical problem in recent years. While tocilizumab may be effective in treating CRS, we still lack effective alternative treatments. Only further research into understanding the essence of CRS and possible immunomodulatory therapies can help to solve this problem.

Author Contributions: Conceptualization, D.C.; methodology, D.C.; software, D.C.; validation, D.C. and M.P.; formal analysis, D.C.; investigation, D.C.; resources, D.C., B.A.-W., K.B.-L., A.B.-F., E.H., J.M.-K., G.J. and M.P.; data curation, D.C.; writing—original draft preparation, D.C.; writing—review and editing, D.C.; visualization, D.C.; supervision, D.C. and M.P.; project administration, D.C. and M.P.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the National Centre for Research and Development, Agreement No. SZPITALE-JEDNOIMIENNE/27/2020, 20 November 2020, for implementation and financing of a non-competitive project (Prevention and Treatment: COVID-19), titled “Development of Modern Laboratory Technologies, IT and Bioinformatics Dedicated to the Diagnosis and Prevention of SARS-CoV-2 Infections”, implemented as part of the “Support for Homonymous Hospitals in Combating the Spread of SARS-CoV-2 Infection and Treating COVID-19” project.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland (approval number: KB-0012/92/2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: The original anonymous dataset is available on request from the corresponding author at daniel.chober@pum.edu.pl.

Acknowledgments: We would like to acknowledge all medical personnel involved in the care of COVID-19 patients.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard with Vaccination Data. Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 12 March 2022).
2. Son, K.B.; Lee, T.J.; Hwang, S.S. Disease severity classification and COVID-19 outcomes, Republic of Korea. *Bull. World Health Organ.* **2021**, *99*, 62. [CrossRef] [PubMed]
3. Wu, Z.; McGoogan, J.M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* **2020**, *323*, 1239–1242. [CrossRef] [PubMed]
4. COVID-19: Epidemiology, Clinical Features, and Prognosis of the Critically Ill Adult—Up To Date. Available online: <https://www.uptodate.com/contents/COVID-19-epidemiology-clinical-features-and-prognosis-of-the-critically-ill-adult> (accessed on 26 March 2022).
5. Li, X.; To, K.K.W. Biomarkers for severe COVID-19. *eBioMedicine* **2021**, *68*, 103405. [CrossRef] [PubMed]
6. Xiong, Y.; Ma, Y.; Ruan, L.; Li, D.; Lu, C.; Huang, L. Comparing different machine learning techniques for predicting COVID-19 severity. *Infect. Dis. Poverty* **2022**, *11*, 19. [CrossRef]
7. Wiśniewska, H.; Skonieczna-Żydecka, K.; Parczewski, M.; Niścigorska-Olsen, J.; Karpińska, E.; Hornung, M.; Jurczyk, K.; Witak-Jędra, M.; Laurans, Ł.; Maciejewska, K.; et al. Hepatotropic Properties of SARS-CoV-2—Preliminary Results of Cross-Sectional Observational Study from the First Wave COVID-19 Pandemic. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 672. [CrossRef]
8. Sanli, D.E.T.; Yildirim, D.; Sanli, A.N.; Erozan, N.; Husmen, G.; Altundag, A.; Tuzuner, F.; Dikensoy, O.; Kirsoglu, C.E. Predictive value of CT imaging findings in COVID-19 pneumonia at the time of first-screen regarding the need for hospitalization or intensive care unit. *Diagn. Interv. Radiol.* **2021**, *27*, 599. [CrossRef]
9. Yang, R.; Li, X.; Liu, H.; Zhen, Y.; Zhang, X.; Xiong, Q.; Luo, Y.; Gao, C.; Zeng, W. Chest ct severity score: An imaging tool for assessing severe COVID-19. *Radiol. Cardiothorac. Imaging* **2020**, *2*, e200047. [CrossRef]
10. Li, K.; Wu, J.; Wu, F.; Guo, D.; Chen, L.; Fang, Z.; Li, C. The Clinical and Chest CT Features Associated with Severe and Critical COVID-19 Pneumonia. *Investig. Radiol.* **2020**, *55*, 327–331. [CrossRef]
11. Xiong, Y.; Sun, D.; Liu, Y.; Fan, Y.; Zhao, L.; Li, X.; Zhu, W. Clinical and High-Resolution CT Features of the COVID-19 Infection: Comparison of the Initial and Follow-up Changes. *Investig. Radiol.* **2020**, *55*, 332–339. [CrossRef]
12. Jalaber, C.; Lapotre, T.; Morcet-Delattre, T.; Ribet, F.; Jouneau, S.; Lederlin, M. Chest CT in COVID-19 pneumonia: A review of current knowledge. *Diagn. Interv. Imaging* **2020**, *101*, 431–437. [CrossRef]

13. Flisiak, R.; Horban, A.; Jaroszewicz, J.; Kozielowicz, D.; Mastalerz-Migas, A.; Owczuk, R.; Parczewski, M.; Pawłowska, M.; Piekarska, A.; Simon, K.; et al. Management of SARS-CoV-2 infection: Recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of April 26, 2021. *Pol. Arch. Intern. Med.* **2021**, *131*, 48–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Xu, X.; Han, M.; Li, T.; Sun, W.; Wang, D.; Fu, B.; Zhou, Y.; Zheng, X.; Yang, Y.; Li, X.; et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 10970–10975. [[CrossRef](#)]
15. Flisiak, R.; Jaroszewicz, J.; Rogalska, M.; Łapiński, T.; Berkan-Kawińska, A.; Bolewska, B.; Tudrujek-Zdunek, M.; Kozielowicz, D.; Rorat, M.; Leszczyński, P.; et al. Tocilizumab Improves the Prognosis of COVID-19 in Patients with High IL-6. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cabaro, S.; D'Esposito, V.; Di Matola, T.; Sale, S.; Cennamo, M.; Terracciano, D.; Parisi, V.; Oriente, F.; Portella, G.; Beguinot, F.; et al. Cytokine signature and COVID-19 prediction models in the two waves of pandemics. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 693–704. [[CrossRef](#)]
18. Salama, C.; Han, J.; Yau, L.; Reiss, W.G.; Kramer, B.; Neidhart, J.D.; Criner, G.J.; Kaplan-Lewis, E.; Baden, R.; Pandit, L.; et al. Tocilizumab in Patients Hospitalized with COVID-19 Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 20–30. [[CrossRef](#)]
19. Salvarani, C.; Dolci, G.; Massari, M.; Merlo, D.F.; Cavuto, S.; Savoldi, L.; Bruzzi, P.; Boni, F.; Braglia, L.; Turrà, C.; et al. Effect of Tocilizumab vs Standard Care on Clinical Worsening in Patients Hospitalized with COVID-19 Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern. Med.* **2021**, *181*, 24–31. [[CrossRef](#)]
20. Stone, J.H.; Frigault, M.J.; Serling-Boyd, N.J.; Fernandes, A.D.; Harvey, L.; Foulkes, A.S.; Horick, N.K.; Healy, B.C.; Shah, R.; Bensaci, A.M.; et al. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2333–2344. [[CrossRef](#)]
21. Flisiak, R.; Horban, A.; Jaroszewicz, J.; Kozielowicz, D.; Pawłowska, M.; Parczewski, M.; Piekarska, A.; Tomasiewicz, K.; Zarebska-Michaluk, D. Management of SARS-CoV-2 infection: Recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of March 31, 2020. *Pol. Arch. Intern. Med.* **2020**, *130*, 352–357. [[CrossRef](#)]
22. Radulescu, A.; Istrate, A.; Muntean, M. Treatment with Tocilizumab in Adult Patients with Moderate to Critical COVID-19 Pneumonia: A Single-Center Retrospective Study. *Int. J. Infect. Dis.* **2022**, *117*, 1–7. [[CrossRef](#)]
23. World Health Organization. *Therapeutics and COVID-19: Living Guideline*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022.
24. Mahendra, M.; Nuchin, A.; Kumar, R.; Shreedhar, S.; Mahesh, P.A. Predictors of mortality in patients with severe COVID-19 pneumonia—A retrospective study. *Adv. Respir. Med.* **2021**, *89*, 135–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Abani, O.; Abbas, A.; Abbas, F.; Abbas, M.; Abbasi, S.; Abbass, H.; Abbott, A.; Abdallah, N.; Abdelaziz, A.; Abdelfattah, M.; et al. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): A randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* **2021**, *397*, 1637–1645. [[CrossRef](#)]
26. Remap-Cap Investigators. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1491–1502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. The WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group; Shankar-Hari, M.; Vale, C.L.; Godolphin, P.J.; Fisher, D.; Higgins, J.P.T.; Spiga, F.; Savović, J.; Tierney, J.; Baron, G.; et al. Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA* **2021**, *326*, 499–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- 9.** Praca oryginalna: Tocilizumab use among patients who developed pulmonary embolism in the course of cytokine release storm and COVID-19 pneumonia - a retrospective study.

Article

Tocilizumab Use among Patients Who Developed Pulmonary Embolism in the Course of Cytokine Release Storm and COVID-19 Pneumonia—A Retrospective Study

Daniel Chober ^{1,*}, Bogusz Aksak-Wąs ¹, Jolanta Niścigorska-Olsen ¹, Małgorzata Niekrasz ² and Miłosz Parczewski ^{1,*}

¹ Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Pomeranian Medical University in Szczecin, 71-455 Szczecin, Poland; bogusz.aw@gmail.com (B.A.-W.); j.niscigorska-olsen@wp.pl (J.N.-O.)

² Department of Neurology, Regional Hospital in Szczecin, 71-455 Szczecin, Poland; mal.niekrasz@gmail.com

* Correspondence: daniel.chober@pum.edu.pl (D.C.); mparczewski@yahoo.co.uk (M.P.)

Abstract: Introduction: Thromboembolic events, including mainly pulmonary embolisms and ischemic strokes, occur in up to one-third of COVID-19 patients. As efficacy of tocilizumab (TCZ) among patients with acute pulmonary embolism (PE) was not previously investigated, this study aimed to provide such data. Objectives: The aim of the study was to investigate the effect of TCZ on mortality in patients with confirmed acute pulmonary embolism, cytokine release storm and COVID-19 pneumonia. Patients and methods: Longitudinal data of 4287 patients with confirmed SARS-CoV-2 infection were collected between 4 March 2020 and 16 January 2022. In this study, we retrospectively analyzed the samples and dataset of cases with confirmed acute pulmonary embolism associated with at least moderate lung involvement due to COVID-19 pneumonia. Results: In the analyzed dataset, 64 adult patients were diagnosed with PE, and of these, 28 (44%) cases were treated with two 8 mg/kg doses of TCZ, and 36 (56%) did not receive this agent. The groups were balanced regarding demographics, comorbidities and the biochemical markers. Overall mortality in our study was 29.6% (n = 17). Mortality in the group treated with TCZ was 43% (n = 12) compared to 19% (n = 7) in the group without TCZ. In multivariate proportional Cox hazards models, intravenous administration of TCZ was independently associated with higher mortality (HR: 3.342 (CI: 1.077–10.370), *p* = 0.036). Conclusions: In patients with COVID-19 pneumonia with at least moderate lung involvement, CRS and acute pulmonary embolism, administration of TCZ is associated with increased mortality. Therefore, TCZ should be used with caution in SARS-CoV-2 cases with pulmonary embolism.

Keywords: COVID-19; tocilizumab; embolism; thrombosis; mortality

Citation: Chober, D.; Aksak-Wąs, B.; Niścigorska-Olsen, J.; Niekrasz, M. Tocilizumab Use among Patients Who Developed Pulmonary Embolism in the Course of Cytokine Release Storm and COVID-19 Pneumonia—A Retrospective Study. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1581. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071581>

Academic Editor: Célia F. Rodrigues and Natália Cruz-Martins

Received: 23 May 2022

Accepted: 28 June 2022

Published: 2 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Hemostasis and thrombosis are complex, multifactorial processes. Thrombosis, as a common mechanism underlying myocardial infarction, ischemic stroke and venous thromboembolism (VTE), is the leading global cause of mortality [1]. Structurally, arterial and venous thrombi notably differ: Arterial thrombi are rich in platelets and form in the circumference of ruptured plaques. Venous thrombi are rich in both fibrin and red blood cells and form even in the environment of the intact endothelial wall [2]. Pulmonary embolism (PE) affects 60–112 per 100,000 inhabitants/year [3,4]. According to prospective cohort studies, the acute phase mortality ranges from 7 to 11% [5–7].

Since the beginning of the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) pandemic, nearly 430 million cases of this infection have been confirmed with over 6 million deaths worldwide [8]. While acute respiratory failure is the main reported cause of death in patients infected with SARS-CoV-2 [9], the studies conducted so far suggest

the influence of an increased incidence of venous thrombosis, which significantly worsens the prognosis and increases mortality [10,11]. Meta-analyses indicate a two-fold increased risk of death in COVID-19 patients who developed a venous thrombotic event [12]. A plethora of studies and analyses have already confirmed a correlation between COVID-19 and the risk of thrombosis disclosing prothrombotic activity of this viral infection [13–15]. For example, a large meta-analysis reported that PE and deep vein thrombosis (DVT) were observed in 16.5% and 14.8% of COVID-19 patients, respectively, while in more than half of the patients with PE, no DVT was observed [16]. Furthermore, clinical data have shown an incidence of VTE in the COVID-19 patient population with a variable incidence between 7 and 31% [17,18].

Multiple risk factors contributing to the venous thrombosis in COVID-19 patients were identified, and include generalized hypercoagulability, dysfunctional immune response to SARS-CoV-2 leading to cytokine release syndrome (CRS), hyperinflammation associated with endothelial cell damage, hypoxemia resulting in cardiopulmonary failure, and metabolic disorders [19–21]. Immunothrombosis may be the main factor responsible for the development of thrombotic events in COVID-19 patients, as various types of innate immune activation have been observed concurrently in patients with such complications [22,23]. Hereditary diseases (such as the FVL mutation, fibrinogen gamma (FGG) mutation, homozygous prothrombin G20210A mutation) are also among the conditions favoring of thrombosis [24].

Anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody agent, TCZ, has been reported to reduce mortality among hospitalized patients with COVID-19 pneumonia [25,26]. TCZ should only be used in cases with identified CRS. CRS is a clinical diagnosis that is based on the presence of a fever (≥ 38.0 °C), with or without variable degrees of hypotension, hypoxia, and/or other end-organ dysfunctions. The temporal relationship to the triggering immune therapy is important for establishing the diagnosis of CRS. Laboratory studies are not required to diagnose CRS, but they may help to distinguish CRS from other conditions that can cause similar findings. CRS is associated with increased levels of IL-6. IL-6 levels exceeding 80 pg/mL are highly predictive of mechanical ventilation use [27]. There is limited evidence in the available literature on the effect of TCZ on the risk of thrombosis [28,29]. Isolated reports suggest an increased risk of thromboembolism (TE) associated with transient elevations in D-dimer levels [29], while other studies report a reduced risk of thrombosis in patients treated with TCZ [30]. Guidelines indicate that TCZ should only be used in cases with identified cytokine storm; however, the guidelines do not consider its safety among cases with thrombotic events [31]. Case reports suggest that physicians should be aware that tocilizumab may mask inflammatory markers (e.g., IL6, CRP, fibrinogen and ferritin) without reducing the risk of thrombotic events, creating a façade of better prognostic outcomes instead [28]. At the same time, other immunomodulatory drugs used in the cytokine storm phase of COVID-19, such as baricitinib, are clearly contraindicated among patients with increased thrombosis risk [32].

The aim of the study was to investigate the effect of TCZ on mortality in patients with confirmed acute PE and COVID-19 pneumonia. To our knowledge, this is a first study investigating safety of TCZ use among patients who developed PE in the course of COVID-19 before the introduction of immunomodulating treatment. Here, we analyze mortality risk and safety of TCZ in this selected population.

2. Materials and Methods

2.1. Study Groups

Our database contains information about patients hospitalized at the Regional Hospital in Szczecin, Poland. Patients participating in the study were observed from 4 March 2020 to 23 January 2022 when the database was closed. The database contains 4287 cases. Informed consent for data analysis was obtained from all subjects participating in the study. All data were fully anonymized before statistical analyzes.

In this study, we retrospectively analyzed the dataset of patients with confirmed acute PE associated with at least moderate lung involvement due to COVID-19 pneumonia. Patients enrolled in this study before admission to hospital reported drops in oxygen saturation less than or equal to 90% and fever ($>38^{\circ}\text{C}$). In each case, SARS-CoV-2 infection was confirmed using SARS-CoV-2 polymerase chain reaction (PCR) tests from throat swabs. In each case, pneumonia was confirmed using computed tomography of the chest (C-CT). All laboratory and CT (including angio-CT of pulmonary arteries) tests were performed immediately upon admission, within the first 24 h.

The primary objective of this study was to determine the efficacy and safety of TCZ in patients with COVID-19 pneumonia and acute PE. A secondary goal of this study was to try to identify the risk factors associated with higher mortality. In order to answer the above questions, we established the following inclusion and exclusion criteria for the study:

1. Inclusion criteria for this study were as follows:

- CT confirmed COVID-19-pneumonia with at least 10% lung involvement;
- CT and clinically proven acute PE;
- CRS with IL-6 levels exceeding 80 pg/mL;
- Age > 18 years;
- Fever $> 38^{\circ}\text{C}$ at admission to hospital;
- Oxygen saturation less or equal to 90%;
- Confirmed ongoing SARS-CoV-2 infection.

2. Exclusion criteria:

- Procalcitonin level >2 ng/mL-as a predictor of septic complications where TCZ is contraindicated;

We divided all analyzed patients into two groups. The first group consisted of patients who received 8 mg/kg intravenous tocilizumab (maximum dose: 800 mg) twice, 12 h apart. The second group consisted of patients who did not consent to the administration of tocilizumab and patients who, despite consenting, did not receive drugs due to medical contraindications or for non-medical reasons (no drugs available in the hospital). The second group used only standard treatment in line with the guidelines. Before administering tocilizumab, we ruled out acute viral infections including cytomegalovirus, hepatitis B and C as well as human immunodeficiency virus based on standard serological methods. Acute toxoplasma gondii was also excluded prior to TCZ administration. The median time from hospital admission to administration of first dose of tocilizumab was 1 day (IQR 1–2 days). According to the guidelines of the Polish Society of Epidemiologists and Doctors of Infectious Diseases and the Summary of Product Characteristics, a second dose of TCZ may be administered if the general condition deteriorates or there is no improvement. Due to the lack of clearly defined criteria for improving the patient's general condition, we assumed that all patients who persistently had dyspnea or fever should be given another dose of TCZ.

The endpoint for this analysis was death or discharge from the hospital.

To evaluate lung involvement, we used the scale recommended by the French Chest Imaging Society (SIT), the European Society of Radiology (ESR) and the European Society for Chest Imaging (ESTI). Following the recommendations of SIT and ESTI, we used the following division of pneumonia: (1) absent or minimal ($<10\%$), (2) moderate (10–25%), (3) extensive (25–50%), (4) severe (50–75%), and (5) critical ($>75\%$) [33,34].

Decision on the hospital admission was based on the assessment of the doctors on duty working in the Hospital Emergency Department and the Infectious Diseases Admission Room. Treatment was in line with the current knowledge, guidelines of the Polish Society of Epidemiologists and Infectious Diseases Specialists (PTEiLChZ) and product characteristics [31,35].

If given, the following concomitant medications were used:

The decision to use remdesivir has always been made by a physician. Remdesivir was administered in 5-day courses. On day 1, it was given as a 200 mg loading dose followed by a 100 mg maintenance dose thereafter. The first administration of remdesivir was started within 7 days of onset of symptoms, if symptoms lasted longer, treatment was not started.

- Chloroquine was not used.
 - Supportive treatment was applied to each of the patients.
The supportive treatment included:
 - antibiotic therapy (Ceftriaxon was drug of choice but could vary depending on the patient's condition);
 - Oxygen therapy (Low-/high-flow oxygen therapy or mechanical ventilation were used. No ECMO were used);
 - Intravenous rehydration;
 - Dexamethasone administered intravenously in a dose of at least 6 mg per day;
 - Low-molecular-weight or non-fractionated heparin in therapeutic doses.
- All patients, in accordance with the applicable standards and guidelines, received:
- Prophylactic antibiotic (preferably ceftriaxone in a dose of at least 2 g per day);
 - Glucocorticoids (dexamethasone in a dose of at least 6 mg per day iv);
 - Supportive oxygen supplementary therapy;
 - Intravenous rehydration.

In most cases, the existing concomitant drugs were maintained, unless they required modification, e.g., in diabetic patients, oral hypoglycemic drugs were abandoned in favor of insulin according to the glycemic profile. None of the patients required thrombolytic therapy including administration of alteplase, streptokinase, and urokinase.

2.2. Ethical issues

The study protocol was approved by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland (approval number: KB-0012/92/2020). All patients provided informed consent for participation in the study, related with administration of off-label drug—tocilizumab. The study was conducted in accordance with principles of the Declaration of Helsinki.

2.3. Sampling and Data Collection Methodology

Clinical data such as gender, age, comorbidities, treatment history, length of stay in hospital, duration of ICU treatment, survival statistics, chest computed tomography results, baseline blood oxygenation levels, and selected laboratory parameters were collected from medical records. Among the selected laboratory tests were lymphocytes and red blood cells count, hemoglobin levels, platelet count, procalcitonin levels, C-reactive protein levels, interleukin 6 levels, lactate dehydrogenase levels, d-dimer activity, eGFR and aspartate and alanine aminotransferase activity. All cases of PE were confirmed radiographically using CT angiography. Comorbidities were assessed in terms of their incidence.

2.4. Statistics

Baseline laboratory parameters and clinical data were calculated separately for parametric and non-parametric statistics. We used the Mann–Whitney U test for nonparametric statistics to perform a statistical comparison. The multiway tables were constructed taking into account the chi-square test. Kaplan–Meyer cumulative mortality was calculated with statistical significance of survival data analyzed using log-rank test. Unadjusted and multivariate Cox proportional hazards models were used to assess the impact of the analyzed parameter on the risk of death and to calculate the risk factors (HR). The Akaike's information criteria was base for selection of the final model. The *p*-values of 0.05

were considered significant. For the statistical calculations, we used commercial software (Statistica 13.0 PL; Statsoft, Warsaw, Poland).

3. Results

3.1. Clinical Characteristics of Patients with COVID-19

From our database, we selected cases accordingly to inclusion and exclusion criteria as showed on flowchart (Figure 1).

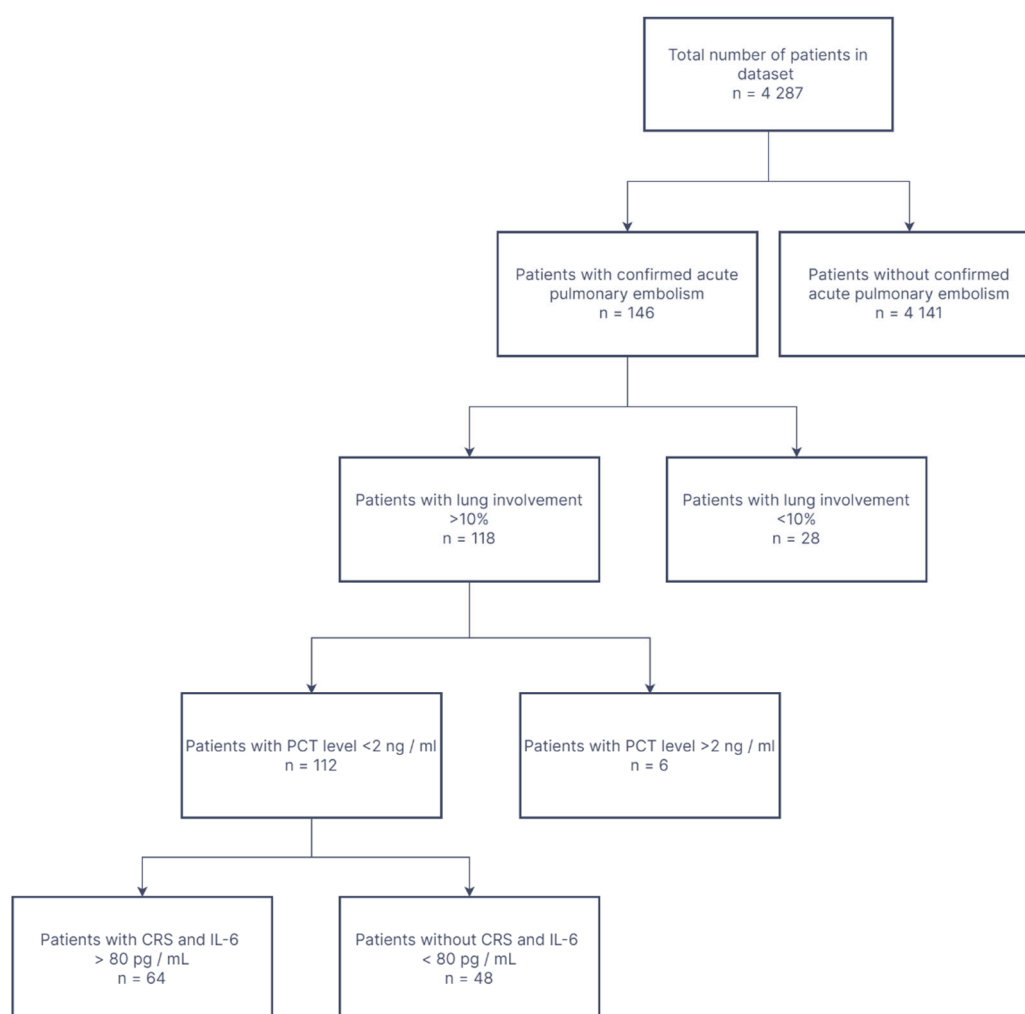


Figure 1. Study flow diagram.

The final dataset included 64 adult patients, median age 68 (IQR 57–75) years, with confirmed acute PE (Table 1). All cases were classified as moderate, extensive, severe or critical lung involvement based on chest computed tomography (C-CT) and the median of lung involvement was 38.27% (IQR 24.77–50.34). The key biochemical parameters indicative of advanced inflammation were significantly elevated. The median IL-6 was 138.50 pg/mL (IQR 113.00–206.50) with a concurrently low procalcitonin concentration (median 0.17 ng/mL (IQR 0.10–0.31)). Lactate dehydrogenase activity was high in most of the cases (median 499.50 U/L (IQR 349.00–638.00)), which is known to be associated with severe course of the disease. The most common concomitant disease was arterial hypertension, which was present in 13 (20%) cases. Diabetes was found in two cases (3%), and a history of cancer in one case (1%).

Table 1. Baseline characteristics of all patients included in the study.

	Baseline Characteristics of All Patients Included in the Study			
	N	Median	Lower Quartile	Upper Quartile
Age, years	64	68.00	57.00	75.00
Percentage of Lung Involvement, %	64	38.27	24.77	50.34
WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$	64	8.81	6.72	10.91
RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$	64	4.66	4.25	5.06
HGB, g/dL	64	13.95	12.65	15.10
HCT, %	64	40.15	36.85	43.45
Platelets, $\times 10^3/\mu\text{L}$	64	227.50	179.00	302.50
Procalcitonin, ng/mL	63	0.17	0.10	0.31
CRP, mg/L	64	146.40	104.68	205.53
IL-6, pg/mL	64	138.50	113.00	206.50
LDH, U/L	58	499.50	349.00	638.00
D-dimer, $\mu\text{g/L}$	64	1611.50	631.50	8481.50
Creatinine, mg/dL	64	0.94	0.82	1.22
eGFR, mL/min	64	80.25	57.61	96.21
AST, U/L	57	49.00	35.00	72.00
ALT, U/L	57	36.00	22.00	62.00
Glucose, mg/dL	61	123.00	113.00	145.00
Bilirubin total, mg/dL	59	0.63	0.41	0.85

3.2. Clinical and Laboratory Data on TCZ Treated vs. Control Group

The study group included 28 (44%) patients who received TCZ and 36 (56%) controls treated with standard of care only. There were no statistically significant differences between particular groups regarding age, percentage of lung involvement, gender, comorbidities, white blood cells count, red blood cells count, hemoglobin level, hematocrit, platelets count, procalcitonin levels, C-reactive protein levels, interleukin-6 levels, lactate dehydrogenase levels, D-dimer activity, creatinine levels, eGFR, aspartate and alanine aminotransferase activity, bilirubin levels, troponin T and CKMB levels (Table 2).

Table 2. Characteristic of Groups TCZ vs. Non-TCZ.

	TCZ N = 28 (44%)	Non-TCZ N = 36 (56%)	p Value
Age, years	68.5 (54.5–75)	67 (61.5–74)	0.538
Percentage of Lung Involvement, %	33.82 (24.28–49.22)	43.67 (28.2–53.34)	0.211
WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$	8.43 (6.65–10.78)	8.81 (7.39–10.96)	0.461
RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$	4.58 (4.13–5.01)	4.76 (4.45–5.13)	0.206
HGB, g/dL	13.6 (11.75–15.2)	14.05 (13.05–15.05)	0.218
HCT, %	39.95 (35–43.45)	41.3 (38.85–43.65)	0.307
Platelets, $\times 10^3/\mu\text{L}$	227.5 (176–316.5)	232 (180–290)	0.898
Procalcitonin, ng/mL	0.17 (0.1–0.35)	0.2 (0.12–0.3)	0.429
CRP, mg/L	132.54 (97.64–227.02)	153.93 (132.29–189.51)	0.201
IL-6, pg/mL	137.5 (104.55–209)	146.5 (116–206.5)	0.844
LDH, U/L	481 (355–638)	515 (345–674)	0.919
D-dimer, $\mu\text{g/L}$	2301.05 (695–8481.5)	912.5 (586–6799)	0.486
Creatinine, mg/dL	0.95 (0.74–1.23)	0.94 (0.88–1.22)	0.477
eGFR, mL/min	80.39 (56.66–103.63)	79.47 (58.98–90.25)	0.574
AST, U/L	53 (41–82)	47.5 (34–69)	0.378

ALT, U/L	43 (22–89)	33 (25–55)	0.665
Glucose, mg/dL	123 (114–145)	123.5 (112–141.5)	0.739
Bilirubin total, mg/dL	0.7 (0.45–0.98)	67 (61.5–74)	0.205
Gender, n (%)			Chi-square
Male (reference)	24 (86%)	23 (64%)	Pearson $p = 0.049$
Diabetes, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	2 (7%)	0 (0%)	Pearson $p = 0.103$
Hypertension, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	5 (18%)	8 (22%)	Pearson $p = 0.666$
Cancer, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	0 (0%)	1 (3%)	Pearson $p = 0.374$
Remdesivir admission, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	23 (82%)	28 (78%)	Pearson $p = 0.666$
ICU admission, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	4 (14%)	2 (6%)	Pearson $p = 0.234$
Mortality, n (%)			Chi-square
Died (reference)	12 (43%)	7 (19%)	Pearson $p = 0.041$

Median length of hospital stay was 17 (IQR 12.5–24.0) days and did not differ between the TCZ receiving group (17.0 (IQR 12.5–25.5) days) compared to (17.0 (IQR 12.5–22.0) days) for non TCZ [$p = 0.645$].

Only six (9%) patients were treated in ICU. All patients in ICU were on invasive mechanical ventilation. The low percentage of ICU admissions was associated with the constant lack of beds in the ICU, age-related disqualification and the phenomenon of “sudden death”, when the deterioration of vital functions occurs so quickly that it is impossible to transfer to the ICU.

3.3. Overall Mortality Risk

Out of 64 patients, 19 (30%) died from COVID-19-related pneumonia and its complications and 45 (70%) survived. Median length of hospitalization for the group who did not survive was 12 (IQR 4–20) days. Median length of hospitalization for the group who survived was 20 (IQR 14–26) days. (See Figure 2.)

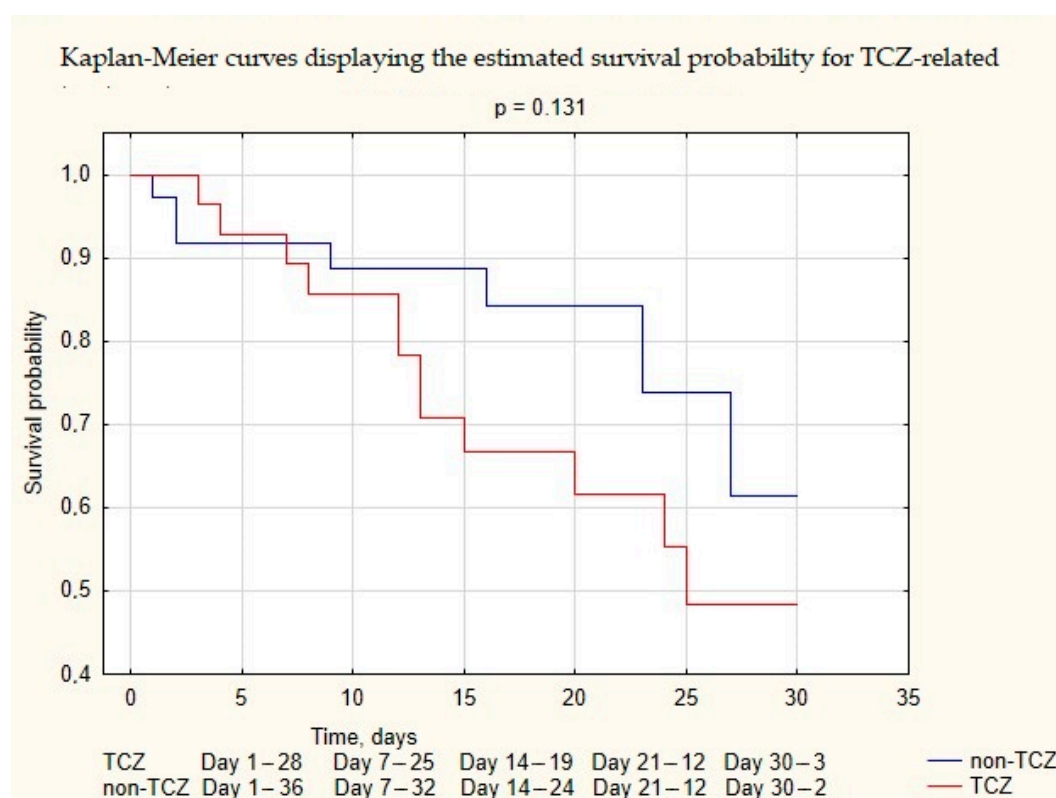


Figure 2. Kaplan-Meier curves displaying the estimated survival probability for TCZ-related treatment.

We also analyzed the group in the context of death risk factors, regardless of the TCZ use (Table 3). Higher mortality factors in our analysis were associated with age and procalcitonin T levels. Other factors did not differ significantly (Table 3).

Table 3. Characteristic of surviving group compared to the patients who died.

	Survived N = 45(70%)	Died N = 19 (30%)	p Value
Age, years	67 (54–71)	76 (63–82)	0.002
Percentage of Lung Involvement, %	35.67 (23.88–49.49)	44.77 (30.49–60.57)	0.113
WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$	8.59 (6.67–10.93)	9.34 (7.09–10.77)	0.730
RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$	4.78 (4.32–5.15)	4.46 (4.14–4.81)	0.092
HGB, g/dL	14.1 (12.9–15.2)	13.3 (12.1–14.4)	0.123
HCT, %	40.9 (37.3–43.6)	39.1 (34.4–42.4)	0.169
Platelets, $\times 10^3/\mu\text{L}$	242 (183–315)	224 (178–288)	0.370
Procalcitonin, ng/mL	0.16 (0.1–0.25)	0.27 (0.14–0.49)	0.028
CRP, mg/L	138.6 (101.63–188.16)	163.83 (117.35–207.23)	0.258
IL-6, pg/mL	129 (95.7–176)	168 (123–242)	0.071
LDH, U/L	503.5 (355–636)	474 (313–678)	0.608
D-dimer, ug/L	1223 (603–8463)	2145 (805–8861)	0.436
Creatinine, mg/dL	0.94 (0.8–1.1)	1.03 (0.83–1.55)	0.246
eGFR, mL/min	83.11 (66.38–96.55)	72.94 (41.61–93.58)	0.146
AST, U/L	53 (41–77)	38 (30–69)	0.160
ALT, U/L	43.5 (28–79)	26 (16–55)	0.084
Glucose, mg/dL	121.5 (111–136)	127 (114–173)	0.327

Bilirubin total, mg/dL	0.64 (0.41–0.83)	0.62 (0.36–0.96)	0.651
Gender, n (%)			Chi-square
Male (reference)	34 (75%)	13 (68%)	Pearson $p = 0.554$
Diabetes, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	2 (4%)	0 (0%)	Pearson $p = 0.350$
Hypertension, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	12 (27%)	1 (5%)	Pearson $p = 0.052$
Cancer, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	1 (2%)	0 (0%)	Pearson $p = 0.512$
Remdesivir admission, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	34 (76%)	17 (90%)	Pearson $p = 0.206$
ICU admission, n (%)			Chi-square
Yes (reference)	2 (4%)	4 (21%)	Pearson $p = 0.037$

3.4. Tocilizumab-Associated Mortality

Mortality in the TCZ group was 43% ($n = 12$) compared to 19% ($n = 7$) in the non-TCZ group.

We constructed multivariate Cox proportional hazards models for all statistically significant factors and for the administration of TCZ in line with the main goal of our study.

We included the use of Remdesivir in our calculations to estimate the potential impact of other drugs on survival in patients with PE. In multivariate proportional Cox hazards models (Table 4), age (HR: 1.118 (CI: 1.055–1.187), $p = 0.001$), and administration of TCZ was associated with higher mortality (HR: 3.342 (CI: 1.077–10.370), $p = 0.036$). (See Table 4.)

Table 4. Cox proportional-hazards model for mortality risk.

	Cox Proportional-Hazards Model for Mortality			
	p Value	Hazard Ratio (HR)	Lower 95%CI Value	Upper 95%CI Value
Age, years	0.001	1.119	1.055	1.187
Percentage of Lung Involvement, %	0.511	1.009	0.980	1.039
Procalcitonin, ng/mL	0.084	2.039	0.906	4.586
Administration of Remdesivir (reference) vs. no Remdesivir	0.132	0.261	0.045	1.502
Administration of TCZ (reference) vs. no TCZ	0.036	3.342	1.077	10.370

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study investigating the relationship between Tocilizumab administration and the risk of mortality among patients who developed PE in the course of CRS and COVID-19 pneumonia. Our study shows that the use of tocilizumab in patients with acute PE correlates with an increased risk of death.

It is well known that all patients hospitalized for severe acute infectious disease are at a higher risk of thromboembolic events [18]. Evidence strongly highlighted the fact that severe COVID-19 pneumonia is often complicated by coagulopathy, which significantly increased the risk of acute PE and thus mortality [12]. According to some studies, TE is associated with COVID-19 pneumonia with a frequency of 20–30% [36,37], reaching up to

40–70% [38–40]. At the same time, correlation between the occurrence of TE and the severe course of the disease, including admission to the intensive care unit and potential death, has been regularly reported [41]. Mortality in the group of patients with both proximal and distal DVT was significantly higher compared to the group without DVT [41]. However, no differences in mortality were found between proximal DVT and distal DVT [41]. Numerous studies have shown that in-hospital treatment with heparin was associated with a lower mortality, especially in critically ill COVID-19 patients and in those with highly activated blood clotting [42,43].

For this study, we have selected a unique, high-risk group of COVID-19 patients with diagnosis of acute PE in whom the biochemical parameters of CRS were established. With no statistically significant differences between particular groups regarding age, comorbidities, and initial biochemical markers, we found significantly higher 30-day mortality [HR: 3.342 (CI: 1.077–10.370), $p = 0.036$] among patients treated with TCZ in addition to standard treatment as compared to those treated with standard treatment (dexamethasone, antibiotics, intravenous rehydration, supportive oxygen supplementary therapy). The difference suggests a negative influence of TCZ on the applied anticoagulation therapy.

In Surbhi Warrior's study, a lower incidence of thrombosis in COVID-19 patients who received steroids together with tocilizumab was reported. The database for this study consisted of 1265 patients, of whom only 4.8% ($N = 61$) had been diagnosed with PE. This study suggests that steroids and tocilizumab may reduce the proinflammatory state that leads to thrombosis [30]. At the same time, it was emphasized that mortality was higher in patients who received COVID-19-related treatment. Administration of TCZ was associated with an increase in the odds ratio of mortality (OR 2.51 (CI 1.06–5.96)). The authors of the study assumed that this was related to the severity of the disease. In comparison, our data indicate that the severity of the disease in both groups is similar and that the negative effect of TCZ on survival may be independent. Our study database was significantly larger.

Kok Hoe Chan's study showed a relationship between the concentration of IL-6 and venous thrombotic disease. The database for this study consisted of 436 patients, of whom only 24 met the inclusion criteria. Transient elevations in D-dimer levels have been reported in patients with COVID-19 who received TCZ. The trend towards an increased number of deaths related to TE was highlighted [29]. Our studies differ in terms of eligibility for the study. The only admission criteria for the above-mentioned study were confirmed SARS-CoV-2 virus infection and treatment with tocilizumab. For comparison, in our study we narrowed the group to people with radiologically confirmed acute PE. Moreover, our group is much more numerous and homogeneous in terms of laboratory tests and the CT image.

Conversely to our data, Gagan Kumar's study concluded that tocilizumab was not associated with VTE [44]. The database for the cited study consisted of 4645 patients, of whom only 91 had been diagnosed with PE. Overall, 251 (5.4%) patients had VTE. However, in this study, the only inclusion criterion was confirmed SARS-CoV-2 virus infection in people over 18 years of age. Moreover, only 14.3% ($n = 36$) of patients with VTE were treated with tocilizumab. There were no data on the incidence and correlation of PE in the above-mentioned study.

Our study has several limitations, mostly related to its observational and retrospective nature of the presented analysis, which should be confirmed by prospective data. Immunomodulating treatment was selected by physicians on the basis of knowledge and guidelines, periodically limited by the availability of drugs and without randomization.

The main advantage of the current analysis is the large initial dataset, which allows for homogeneous analysis of at-risk patient groups. Collection of data from one center allowed us to exclude the possibility of an error related to different standards of individual tests. Another advantage of our analysis is the accurate assessment of lung involvement and its impact on the treatment process. Last but not least, rigorous inclusion criteria

for the study allowed for the exclusion of an error resulting from a poorly selected study group.

5. Conclusions

For patients with acute PE, with radiologically proven at least moderate COVID-19-related lung involvement, the administration of a double dose of TCZ together with standard treatment (based on dexamethasone, antibiotic therapy) provides a much worse effect than the standard treatment alone in terms of survival. A dysfunctional immune response to SARS-CoV-2 leading to a CRS may contribute to the earlier onset of acute ischemic stroke or PE. Tocilizumab is the drug of choice for patients requiring immunomodulatory therapy to reduce excessive cytokine production. However, it should be used with extra caution, especially in patients with a confirmed episode of TE. Only further research into understanding the essence of CRS and possible immunomodulatory therapies can help to solve this problem.

Author Contributions: Conceptualization, D.C.; methodology, D.C.; software, D.C.; validation, D.C., M.P., formal analysis, D.C.; investigation, D.C.; resources, D.C., B.A.-W., J.N.-O., M.N. and M.P.; data curation, D.C.; writing—original draft preparation, D.C.; writing—review and editing, D.C. and M.P.; visualization, D.C.; supervision, D.C. and M.P.; project administration, D.C. and M.P.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the National Centre For Research and Development, Agreement No. SZPITALE-JEDNOIMIENNE/27/2020, 20 November 2020, for implementation and financing of a non-competitive project (PREVENTION AND TREATMENT: COVID-19) titled, “Development of modern laboratory technologies, IT and bioinformatics dedicated to the diagnosis and prevention of SARS-CoV-2 infections”, implemented as part of the recruitment for, “Support for homonymous hospitals in combating the spread of SARS-CoV-2 infection and treating COVID-19”.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and protocol was approved by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland (approval number: KB-0012/92/2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: The original anonymous dataset is available on request from the corresponding author at Daniel.chober@pum.edu.pl.

Acknowledgments: We would like to acknowledge all the medical personnel involved in the care of COVID-19 patients.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wendelboe, A.M.; Raskob, G.E. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1340–1347. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306841>.
2. Koupnova, M.; Kehrel, B.E.; Corkrey, H.A.; Freedman, J.E. Thrombosis and platelets: An update. *Eur. Heart J.* **2017**, *38*, 785–791. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHW550>.
3. Wiener, R.S.; Schwartz, L.M.; Woloshin, S. Time trends in pulmonary embolism in the United States: Evidence of overdiagnosis. *Arch. Intern. Med.* **2011**, *171*, 831–836. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTERNMED.2011.178>.
4. Kröger, K.; Moerchel, C.; Moysidis, T.; Santosa, F. Incidence rate of pulmonary embolism in Germany: Data from the federal statistical office. *J. Thromb. Thrombolysis* **2010**, *29*, 349–353. <https://doi.org/10.1007/S11239-009-0396-1>.
5. Aujesky, D.; Hughes, R.; Jiménez, D. Short-term prognosis of pulmonary embolism. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7* (Suppl. 1), 318–321. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2009.03408.X>.
6. Stein, P.D.; Kayali, F.; Olson, R.E. Estimated case fatality rate of pulmonary embolism, 1979 to 1998. *Am. J. Cardiol.* **2004**, *93*, 1197–1199. <https://doi.org/10.1016/J.AMJCARD.2004.01.058>.
7. Laporte, S.; Mismetti, P.; Décousus, H.; Uresandi, F.; Otero, R.; Lobo, J.L.; Monreal, M.; RIETE Investigators. Clinical predictors for fatal pulmonary embolism in 15,520 patients with venous thromboembolism: Findings from the Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbolica venosa (RIETE) Registry. *Circulation* **2008**, *117*, 1711–1716. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.726232>.

8. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard with Vaccination Data. Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 12 March 2022).
9. Elezkurtaj, S.; Greuel, S.; Ihlow, J.; Michaelis, E.G.; Bischoff, P.; Kunze, C.A.; Sinn, B.V.; Gerhold, M.; Hauptmann, K. Causes of death and comorbidities in hospitalized patients with COVID-19. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82862-5>.
10. Tan, B.K.; Mainbourg, S.; Friggeri, A.; Bertoletti, L.; Douplat, M.; Dargaud, Y.; Grange, C.; Lobbes, H.; Provencher, S.; Lega, J.C. Arterial and venous thromboembolism in COVID-19: A study-level meta-analysis. *Thorax* **2021**, *76*, 970–979. <https://doi.org/10.1136/THORAXJNL-2020-215383>.
11. Zhou, F.; Yu, T.; Du, R.; Fan, G.; Liu, Y.; Liu, Z.; Xiang, J.; Wang, Y.; Song, B.; Gu, X.; et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet* **2020**, *395*, 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).
12. Kollias, A.; Kyriakoulis, K.G.; Lagou, S.; Kontopantelis, E.; Stergiou, G.S.; Syrigos, K. Venous thromboembolism in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Vasc. Med.* **2021**, *26*, 415–425. <https://doi.org/10.1177/1358863X21995566>.
13. Hanff, T.C.; Mohareb, A.M.; Giri, J.; Cohen, J.B.; Chirinos, J.A. Thrombosis in COVID-19. *Am. J. Hematol.* **2020**, *95*, 1578. <https://doi.org/10.1002/AJH.25982>.
14. Bikdeli, B.; Madhavan, M.V.; Jimenez, D.; Chuich, T.; Dreyfus, I.; Driggin, E.; Nigoghossian, C.D.; Ageno, W.; Madjid, M.; Guo, Y.; et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *75*, 2950–2973. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2020.04.031>.
15. Violi, F.; Ceccarelli, G.; Cangemi, R.; Cipollone, F.; D'Ardes, D.; Oliva, A.; Pirro, M.; Rocco, M.; Alessandri, F.; D'Ettore, G.; et al. Arterial and venous thrombosis in coronavirus 2019 disease (Covid-19): Relationship with mortality. *Intern. Emerg. Med.* **2021**, *16*, 1231–1237. <https://doi.org/10.1007/S11739-020-02621-8/FIGURES/1>.
16. Suh, Y.J.; Hong, H.; Ohana, M.; Bompard, F.; Revel, M.P.; Valle, C.; Gervaise, A.; Poissy, J.; Susen, S.; Hékimian, G.; et al. Pulmonary Embolism and Deep Vein Thrombosis in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology* **2021**, *298*, E70–E80. <https://doi.org/10.1148/RADIOL.2020203557>.
17. Xie, Y.; Wang, X.; Yang, P.; Zhang, S. Covid-19 complicated by acute pulmonary embolism. *Radiol. Cardiothorac. Imaging*, vol. 2, no. 2, p. e200067, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1148/RYCT.2020200067/ASSET/IMAGES/LARGE/RYCT.2020200067.FIG2.JPEG>.
18. Cheruiyot, I.; Kipkorir, V.; Ngure, B.; Misiani, M.; Munguti, J.; Ogeng'o, J. Arterial Thrombosis in Coronavirus Disease 2019 Patients: A Rapid Systematic Review. *Ann. Vasc. Surg.* **2021**, *70*, 273. <https://doi.org/10.1016/J.AVSG.2020.08.087>.
19. Zakeri, A.; Jadhav, A.P.; Sullenger, B.A.; Nimjee, S.M. Ischemic stroke in COVID-19-positive patients: An overview of SARS-CoV-2 and thrombotic mechanisms for the neurointerventionalist. *J. Neurointerv. Surg.* **2021**, *13*, 202–206. <https://doi.org/10.1136/NEURINTSURG-2020-016794>.
20. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 693–704. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2021436>.
21. Violi, F.; Pignatelli, P.; Cammisotto, V.; Bartimoccia, S.; Carnevale, R.; Nocella, C. COVID-19 and thrombosis: Clinical features, mechanism of disease, and therapeutic implications. *Kardiol. Pol. (Polish Heart J.)* **2021**, *79*, 1197–1205. <https://doi.org/10.33963/KP.A2021.0154>.
22. Libby, P.; Luscher, T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 3038–3044. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHAA623>.
23. O'Sullivan, J.M.; Gonagle, D.M.; Ward, S.E.; Preston, R.J.S.; O'Donnell, J.S. Endothelial cells orchestrate COVID-19 coagulopathy. *Lancet Haematol.* **2020**, *7*, e553–e555. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30215-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30215-5).
24. Fiore, J.R.; Ciarallo, M.; Di Stefano, M.; Sica, S.; Scarale, M.; D'Errico, M.; Corallo, F.; Lo Caputo, S.; Margaglione, M.; Santantonio, T. Severe systemic thrombosis in a young COVID-19 patient with a rare homozygous prothrombin G20210A mutation. *Infez Med.* **2021**, *29*, 259–262.
25. Abani, O.; Abbas, A.; Abbas, F.; Abbas, M.; Abbasi, S.; Abbass, H.; Abbott, A.; Abdallah, N.; Abdelaziz, A.; Abdelfattah, M.; et al. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): A randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* **2021**, *397*, 1637–1645. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00676-0/ATTACHMENT/7079F7FB-CB08-4ACC-87C0-D40759EB5CF0/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00676-0/ATTACHMENT/7079F7FB-CB08-4ACC-87C0-D40759EB5CF0/MMC1.PDF).
26. Chober, D.; Aksak-Wąs, B.; Bobrek-Lesiakowska, K.; Budny-Finster, A.; Hołda, E.; Mieżyńska-Kurtycz, J.; Jamro, G.; Parczewski, M. Effectiveness of Tocilizumab in Patients with Severe or Critical Lung Involvement in COVID-19: A Retrospective Study. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 2286. <https://doi.org/10.3390/jcm11092286>.
27. Herold, T.; Jurinovic, V.; Arnreich, C.; Lipworth, B.J.; Hellmuth, J.C.; von Bergwelt-Baildon, M.; Klein, M.; Weinberger, T. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, *146*, 128–136.e4. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2020.05.008>.
28. Atallah, B.; El Nekidy, W.; Mallah, S.I.; Cherfan, A.; AbdelWareth, L.; Mallat, J.; Hamed, F. Thrombotic events following tocilizumab therapy in critically ill COVID-19 patients: A Façade for prognostic markers. *Thromb. J.* **2020**, *18*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12959-020-00236-9/FIGURES/1>.
29. Chan, K.H.; Patel, B.; Podel, B.; Szablea, M.E.; Shaaban, H.S.; Guron, G.; Slim, J. Tocilizumab and Thromboembolism in COVID-19: A Retrospective Hospital-Based Cohort Analysis. *Cureus* **2021**, *15*, e15208. <https://doi.org/10.7759/CUREUS.15208>.
30. Warrior, S.; Behrens, E.; Thomas, J.; Rajakumar, P.; Gezer, S.; Venugopal, P.; Jain, S. Impact of Treatment and Anticoagulation on Thrombosis in COVID-19 Patients. *Blood* **2020**, *136* (Suppl. 1), 6–7. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2020-137707>.

31. Flisiak, R.; Horban, A.; Jaroszewicz, J.; Koziulewicz, D.; Mastalerz-Migas, A.; Owczuk, R.; Parczewski, M.; Pawłowska, M.; Piekarska, A.; Simon, K.; et al. Management of SARS-CoV-2 infection: Recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of April 26, 2021. *Polish Arch. Intern. Med.* **2021**, *131*, 48–496. <https://doi.org/10.20452/PAMW.15979>.
32. Flisiak, R.; Horban, A.; Jaroszewicz, J.; Koziulewicz, D.; Mastalerz-Migas, A.; Owczuk, R.; Parczewski, M.; Pawłowska, M.; Piekarska, A.; Simon, K.; et al. Diagnosis and therapy of SARS-CoV-2 infection: Recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of November 12, 2021. *Polish Arch. Intern. Med.* **2021**, *131*, 16140. <https://doi.org/10.20452/PAMW.16140>.
33. Revel, M.P.; Parkar, A.P.; Prosch, H.; Silva, M.; Sverzellati, N.; Gleeson, F.; Brady, A. COVID-19 patients and the radiology department—Advice from the European Society of Radiology (ESR) and the European Society of Thoracic Imaging (ESTI). *Eur. Radiol.* **2020**, *30*, 4903–4909. <https://doi.org/10.1007/S00330-020-06865-Y/FIGURES/5>.
34. Jalaber, C.; Lapotre, T.; Morcet-Delattre, T.; Ribet, F.; Jouneau, S.; Lederlin, M. Chest CT in COVID-19 pneumonia: A review of current knowledge. *Diagn. Interv. Imaging* **2020**, *101*, 431–437. <https://doi.org/10.1016/J.DIII.2020.06.001>.
35. Flisiak, R.; Horban, A.; Jaroszewicz, J.; Koziulewicz, D.; Pawłowska, M.; Parczewski, M.; Piekarska, A.; Simon, K.; Tomasiewicz, K.; Zarębska-Michaluk, D. Management of SARS-CoV-2 infection: Recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of March 31, 2020. *Polish Arch. Intern. Med.* **2020**, *130*, 352–357. <https://doi.org/10.20452/PAMW.15270>.
36. Cui, S.; Chen, S.; Li, X.; Liu, S.; Wang, F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* **2020**, *18*, 1421–1424. <https://doi.org/10.1111/JTH.14830>.
37. Middeldorp, S.; Coppens, M.; van Haaps, T.F.; Foppen, M.; Vlaar, A.P.; Müller, M.C.; Bouman, C.C.; Beenen, L.F.; Kootte, R.S.; Heijmans, J.; et al. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* **2020**, *18*, 1995–2002. <https://doi.org/10.1111/JTH.14888>.
38. Helms, J.; Tacquard, C.; Severac, F.; Leonard-Lorant, I.; Ohana, M.; Delabranche, X.; Merdji, H.; Clere-Jehl, R.; Schenck, M.; Fagot Gandet, F.; et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: A multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med.* **2020**, *46*, 1089–1098. <https://doi.org/10.1007/S00134-020-06062-X>.
39. Litjens, J.F.; Leclerc, M.; Chochois, C.; Monsallier, J.M.; Ramakers, M.; Auvray, M.; Merouani, K. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *J. Thromb. Haemost.* **2020**, *18*, 1743–1746. <https://doi.org/10.1111/JTH.14869>.
40. Klok, F.A.; Kruip, M.J.H.A.; Van der Meer, N.J.M.; Arbous, M.S.; Gommers, D.A.M.P.J.; Kant, K.M.; Kaptein, F.H.J.; van Paassen, J.; Stals, M.A.M.; Huisman, M.V.; et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb. Res.* **2020**, *191*, 148–150. <https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2020.04.041>.
41. Zhang, L.; Feng, X.; Zhang, D.; Jiang, C.; Mei, H.; Wang, J.; Zhang, C.; Li, H.; Xia, X.; Kong, S.; et al. Deep Vein Thrombosis in Hospitalized Patients with COVID-19 in Wuhan, China: Prevalence, Risk Factors, and Outcome. *Circulation* **2020**, *142*, 114–128. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046702>.
42. Marietta, M.; Vandelli, P.; Mighali, P.; Vicini, R.; Coluccio, V.; D’Amico, R. Randomised controlled trial comparing efficacy and safety of high versus low Low-Molecular Weight Heparin dosages in hospitalized patients with severe COVID-19 pneumonia and coagulopathy not requiring invasive mechanical ventilation (COVID-19 HD): A structured summary of a study protocol. *Trials* **2020**, *21*, 574. <https://doi.org/10.1186/S13063-020-04475-Z>.
43. Di Castelnuovo, A.; Costanzo, S.; Antinori, A.; Berselli, N.; Blandi, L.; Bonaccio, M.; Cauda, R.; Guaraldi, G.; Menicanti, L.; Mennuni, M.; et al. Heparin in COVID-19 Patients Is Associated with Reduced In-Hospital Mortality: The Multicenter Italian CORIST Study. *Thromb. Haemost.* **2021**, *121*, 1054–1065. <https://doi.org/10.1055/A-1347-6070>.
44. Kumar, G.; Patel, D.; Odeh, T.; Rojas, E.; Sakhuja, A.; Meersman, M.; Dalton, D.; Nanchal, R.; Guddati, A.K. Incidence of Venous Thromboembolism and Effect of Anticoagulant Dosing in Hospitalized COVID-19 Patients. *J. Hematol.* **2021**, *10*, 162–170. <https://doi.org/10.14740/JH836>.

- 10.** Praca oryginalna: Improved survival in ICU in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study.



Improved survival in intensive care unit in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study

Daniel Chober^{1,*}, Zenon Czajkowski², Bogusz Aksak-Wąs¹, Katarzyna Dalewska-Kucharczyk², Katarzyna Hołubczak², Sylwia Karasińska-Milchert², Mateusz Jaremko², Miłosz Skowron², Malwina Karasińska-Cieślak¹, Miłosz Parczewski¹

¹ Pomeranian Medical University, Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Szczecin, Poland

² Regional Hospital, Intensive Care Unit, Szczecin, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2022

Revised 13 September 2022

Accepted 17 September 2022

Keywords:

COVID-19

Mortality

ICU

Amantadine

ARDS

ABSTRACT

Objectives: Possible immunomodulatory effect of amantadine in patients treated in intensive care unit (ICU), mostly among patients with brain injuries or vascular diseases was observed in several studies. The potential antiviral effect of amantadine against SARS-CoV-2 was discarded in clinical trials; however, immunomodulatory potential was not studied. The aim of the study was to investigate the effect of immunomodulatory amantadine therapy on mortality in patients with respiratory insufficiency due to COVID-19 requiring mechanical ventilation in ICU.

Methods: Retrospective analysis of 241 cases of 141 (58.5%) receiving intravenous amantadine sulfate vs 100 (41.5%) controls on standard of care only was performed.

Results: Overall mortality was 72.6%, being notably lower among amantadine treated patients (59.5%, $n = 84$) compared with controls (91%, $n = 91$), P -value = 0.001. In multivariate models administration of amantadine was independently associated with lower mortality rate (hazard ratio: 0.220, CI: 0.146–0.333 P -value = 0.001). Furthermore, survival was improved in patients who received amantadine; late administration of amantadine after 5th day was independently associated with lower mortality (hazard ratio: 0.560, CI: 0.313–0.999, P -value = 0.050).

Conclusion: In patients treated in ICU with severe respiratory failure, administration of amantadine is associated with lower mortality, which may be associated with the potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of this agent.

© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

1. Introduction

The first reports on the possible uses of amantadine were published as early as 1960s (Monto and Arden, 1992). Following initial reports on antiviral properties described in 1963, amantadine obtained approval for prophylaxis and treatment of influenza type A viruses infections in 1976 (Hubsher *et al.*, 2012); however, in the following decades it was withdrawn from influenza's treatment recommendations due to universal viral protein M2 resistance (Influenza Antiviral Drug Resistance, 2021).

Amantadine is currently classified as a neurostimulant and used for this purpose in neurologic indications. It passes the blood-brain barrier easily with adequate concentrations in the cerebrospinal

fluid (Hubsher *et al.*, 2012). As a neurostimulating agent, the drug modulates dopamine activity by increasing its extracellular release, blocking reuptake, and upregulating postsynaptic dopamine receptors (Gualtieri *et al.*, 1989). Amantadine binds to and acts as a $\sigma 1$ receptor agonist. Activation of the $\sigma 1$ receptor is related to dopaminergic (DA) effects of amantadine at therapeutically relevant concentrations (Peeters *et al.*, 2004). In addition, amantadine non-competitively inhibits the n-methyl-d-aspartate receptor and mediates stimulation of acetylcholine release (Stoof *et al.*, 1992). Despite the lack of a complete understanding of the molecular mechanisms of DA activity, amantadine has been successfully administered in a wide variety of consciousness alterations, memory, and cognitive functions (Geisler *et al.*, 1996; Kraus *et al.*, 2005; Stelmaschuk *et al.*, 2015). Amantadine increases dopamine levels, especially in the frontal lobe while exhibiting a moderate anti-inflammatory effect by inhibiting the secretion of

* Corresponding author. Tel.: +48-503707357.

E-mail address: Daniel.Chober@pum.edu.pl (D. Chober).

pro-inflammatory factors within the microglia (Jiménez-Jiménez et al., 2020). The neuroprotective effect is aided by the stimulation of neurotrophic factor expression, namely brain-derived neurotrophic factor and glial cell-derived neurotrophic factor (Zhong et al., 2020).

According to data obtained from research on traumatic brain injury, neurostimulants such as amantadine promote wakefulness and may increase patient participation in early rehabilitation (Ghalaenovi et al., 2018). Available studies indicate a beneficial effect of amantadine therapy on the state of consciousness in intensive care unit (ICU)-hospitalized traumatic brain injury patients whose treatment was started shortly after the injury (Giacino et al., 2012; Shafiee et al., 2022). It was also shown that early amantadine treatment was associated with a mortality decrease among conservatively treated large hemisphere infarction patients (Li et al., 2021). Finally, recently it was suggested that rapid initiation of amantadine during early care of patients admitted with ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, or subarachnoid hemorrhage is associated with improved wakefulness (Leclerc et al., 2021).

DA receptors are known to be involved as a gateway for the entry of various viruses (Gaskill et al., 2014; Simanjuntak et al., 2017). There are at least a few examples associating the potential effect of dopamine on viral infections *in vitro*. Elevated dopamine levels play a significant role in the early stage of Japanese encephalitis virus infection, increasing viral entry into dopamine D2 receptors-expressing cells through a signaling pathway mediated by phospholipase C (Simanjuntak et al., 2017). It was also shown that midbrain DA neurons are permissive to SARS-CoV-2 infection. SARS-CoV-2 triggers DA neuronal inflammatory and cellular senescence responses (Chen et al., 2021). In the studies published to date, the direct antiviral effect of amantadine in the SARS-CoV-2 infection treatment was discarded. Moreover, we wish to emphasize that in the current analysis antiviral effect of amantadine was not studied, and there is no substantive basis to pursue such an assumption further. However, the possible neurostimulatory and anti-inflammatory effect in patients treated in ICUs seems to be worth reporting also in patients with COVID-19. Therefore, the aim of the study was to investigate the effect of amantadine therapy on mortality in patients treated in ICU with COVID-19 and describe associated factors.

2. Methods

2.1. Patients and methods

Our database contains information about patients hospitalized at the Regional Hospital in Szczecin, Poland. Patients participating in the study were observed from March 4, 2020 to January 23, 2022 when the database was closed with a total of 4287 records. ICU data was collected between March 24, 2020 and May 29, 2021, and contained 241 entries. All data were fully anonymized before statistical analysis.

In this study, we retrospectively analyzed the dataset of patients with COVID-19 requiring mechanical ventilation, admitted to ICU. All patients included in this analysis presented with acute respiratory distress syndrome (ARDS) in the course of SARS-CoV-2 infection. Each time the final decision on admission to ICU was made by a consultant anesthesiologist. In every case, polymerase chain reaction for SARS-CoV-2 or antigen testing was performed using pharyngeal swabs confirming infection with this virus, and pneumonia was confirmed using chest computed tomography (CT). In the assessment of imaging examinations, the radiologist was supported by the artificial intelligence algorithm and analyzed the percentage of lung tissue affected by COVID-19. All laboratory tests were performed within 24 hours following hospital admittance.

The primary objective of this study was to determine the efficacy and safety of amantadine sulfate in patients with COVID-19 pneumonia treated in the ICU. A secondary goal of this study was to try to identify the risk factors associated with higher mortality. The tertiary aim of this study was to try to determine the correlation between amantadine and other immunomodulatory agent use. In order to answer the above questions, we established the following inclusion and exclusion criteria for the study:

Inclusion criteria for this study were as follows: (i) acute respiratory failure requiring mechanical ventilation; (ii) CT confirmed COVID-19-pneumonia; (iii) age >18 years; (iv) confirmed SARS-CoV-2 infection as an indication for in-hospital admittance.

Exclusion criteria: (i) active neoplastic disease.

Treatment was in line with the current knowledge, guidelines of the Polish Society of Epidemiologists and Infectious Diseases Specialists and product characteristics.

If given, the following concomitant medications were used: (i) the 5-day remdesivir course started within 7 days of onset of symptoms; if symptoms lasted longer, drug administration was not initiated. Remdesivir was administered intravenously (IV) once daily for 5 days, with a loading dose of 200 mg on day 1, followed by a maintenance dose of 100 mg; (ii) tocilizumab (TCZ) was administered IV at a dose of 8 mg/kg (maximum dose: 800 mg) twice, 12 hours apart. It was only used in patients with biochemically confirmed cytokine release storm (interleukin [IL]-6 >100 pg/ml). Before administering TCZ, we ruled out acute viral infections including cytomegalovirus, hepatitis B and C as well as human immunodeficiency virus based on standard serological methods. Acute *Toxoplasma gondii* was also excluded prior to TCZ administration; (iii) supportive treatment was applied to each of the patients; (iv) chloroquine or lopinavir were not used.

The supportive treatment included: (i) antibiotic therapy (Ceftriaxone was drug of choice but could vary depending on the patient's condition and was modified in the course of treatment); (ii) oxygen therapy (Only mechanical ventilation was used. Extracorporeal membrane oxygenation was not used.); (iii) IV rehydration; (iv) dexamethasone administered IV in a dose of at least 6 mg per day; (v) low-molecular-weight or non-fractionated heparin in prophylactic or therapeutic doses.

Amantadine sulfate was administered IV in two doses of 200 mg per day (each in 500 ml). After initiating therapy with amantadine, the drug was administered until extubating (unless the fluid and electrolyte imbalance required modification). Infusion of amantadine was based on the European Medicines Evaluation Agency drug registration; therefore, no ethical consent for this procedure was needed.

2.2. Ethical issues

The retrospective analysis was approved by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland (approval number: KB-0012/92/2020); however, no additional consent was necessary from the patients. The study was conducted in accordance with principles of the Declaration of Helsinki.

2.3. Sampling and data collection methodology

In this study, we collected clinical data from medical records, including age, sex, comorbidities, treatment history, duration of in-hospital stay, duration of treatment in the ICU, survival statistics, baseline blood oxygenation levels, chest CT scan results, and selected laboratory parameters. Comorbidities were assessed in terms of their incidence.

2.4. Statistics

Clinical and baseline laboratory characteristics were calculated for parametric and nonparametric statistics separately. Statistical comparisons were performed using the Mann-Whitney U test for nonparametric statistics. Multi-way tables were constructed with consideration of the chi-square test. CIs and Interquartile ranges (IQRs) are indicated where appropriate. Kaplan-Meier cumulative mortality was calculated with statistical significance of survival data analyzed using the log-rank test. Unadjusted and multivariate Cox proportional hazards models were used to assess the effect of the analyzed parameter on the risk of death and to calculate the hazard ratios (HRs); for the final model, the best fit based on Akaike's information criteria was selected. *P*-values of 0.05 were considered significant. Commercial software (Statistica 13.0 PL; Statsoft, Warsaw, Poland) was used for the statistical calculations.

3. Results

3.1. Clinical characteristics of patients with COVID-19 and factors associated with mortality

The final dataset included 241 adult patients with a median age of 65 (IQR 59–71) years. None of the patients analyzed in the study were vaccinated with the full dose of the SARS-CoV-2 vaccine. In 143 patients, we confirmed infection with the wild-type variant SARS-CoV-2, which accounted for 59% of all included in this analysis. The remaining 41% (*n* = 98) were infections with the Alpha (B.1.1.7) variant. The key biochemical parameters indicative of advanced inflammation were significantly elevated in the analyzed group. Namely, the median IL-6 was 104 pg/ml (IQR 51.80–167.00) with a concurrently low procalcitonin concentration [median 0.27 ng/ml (IQR 0.150–0.50)]. Body mass index (BMI) was calculated for each patient; median of BMI was 29.4 (IQR 26.57–34.41). Male gender dominated in the study group (*n* = 153; 63.5%). The most common concomitant disease was arterial hypertension, which was present in 129 (53.5%) cases. Obesity and diabetes were found in 97 (40.2%) and 81 (33.6%) cases, respectively. Chronic circulatory failure was observed in 24 (9.9%) cases. Key concomitant COVID-19 medication included dexamethasone which was administered IV in a dose of at least 6 mg per day (*n* = 241; 100%) in all cases, remdesivir was administered in 99 cases (41%), while TCZ was used in 127 patients (52.7%).

Overall mortality in our study was high (72.6%). (Table 1.) There were no statistically significant differences between survived/died groups regarding gender, height, weight, BMI, initial laboratory tests, comorbidities, administration of remdesivir, or TCZ. Groups differed significantly regarding percentage of lung involvement (survived 32.47% [16.09–51.57%] vs died 47.20% [31.74–59.68%]). Surviving patients were notably younger, with median age of 62 (IQR 55–68) years, compared to those who died (median: 67 [IQR: 60–72] years, *P*-value = 0.005).

3.2. Clinical and laboratory data on amantadine treated vs control group

The study group included 141 (58.5%) patients who received amantadine, and 100 (41.5%) controls treated without this agent. There were no statistically significant differences between groups regarding gender, height, weight, BMI, percentage of lung involvement, white blood cells count, hemoglobin levels, platelets count, C-reactive protein (CRP), procalcitonin, IL-6, creatinine levels, alanine aminotransferase (ALT) activity (Table 2). Patients re-

ceiving amantadine were notably older, with median age of 67 (IQR: 60–71) years, compared to non-amantadine groups (median: 63 [IQR: 58–68] years, *P*-value = 0.032), with slightly higher platelet counts (amantadine group $219.5 \times 10^3/\text{ul}$ [176.5–285.5] vs non-amantadine group $185 \times 10^3/\text{ul}$ [148–258] *P*-value = 0.014), and D-dimer (amantadine group 0.806 ug/l [0.413–1.566] vs non-amantadine group 0.522 [0.281–1.193] *P*-value = 0.025), at baseline. Arterial hypertension was statistically more common in the group treated with amantadine (59.5% vs 45%, *P*-value = 0.025). Of the 141 patients who received amantadine, 99 (70%) were infected with wild-type SARS-CoV-2, and 51 (30%) were infected with the Alpha variant. Of the 100 patients who were treated without amantadine, 44 (44%) were infected with wild-type SARS-CoV-2, and 56 (56%) were infected with the Alpha variant.

3.3. Amantadine associated general outcomes

Overall mortality was high and reached 72.6% (*n* = 175). Mortality in the amantadine group was notably lower [59.5% (*n* = 84)] compared to non-amantadine group (91% (*n* = 91), *P*-value < 0.001). The median overall length of hospital stay was 12.7 (IQR 6.9–23.4) days, 19.9 (IQR 11.3–29.6) days for the amantadine group, and 6.6 (IQR 2.6–10.0) days for non-amantadine. For those who survived, the median length of treatment was 30 (IQR 21.9–30) days for the amantadine group, and 10.9 (IQR 3.9–13.9) days for the non-amantadine. For those who died, the median length of treatment was 15.8 (IQR 10.1–21.6) days for the amantadine group, and 6.5 (IQR 2.2–9.8) days for the non-amantadine (Figure 1).

We constructed multivariate Cox proportional hazards models for all statistically significant factors, administration of amantadine in line with the main goal of our study, comorbidities in line with the secondary goal of the study, and administration of remdesivir and TCZ in line with the tertiary goal. In multivariate proportional Cox hazards models (Table 3), administration of TCZ was associated with higher mortality (HR: 1.731, CI: 1.183–2.532, *P*-value = 0.005), while administration of amantadine associated with lower risk of death (HR: 0.220, CI: 0.146–0.333, *P*-value = 0.001). Virus strain was not a statistically significant factor in Cox proportional hazards model for mortality.

3.4. Clinical characteristics of patients treated with tocilizumab depending on amantadine intake

In line with the additional goals of this analysis, to reflect the combined effect of the agents with immunomodulatory potential, we analyzed the TCZ treatment-associated variables among 127 patients who received this agent in the dataset of ICU-treated cases. Subsequently, we have calculated the differences among patients who received TCZ by amantadine use, with the only significant difference between the groups being older age among patients receiving amantadine and administration of remdesivir. The multivariate Cox proportional hazards models constructed similarity to the statistical models of amantadine alone with administration of amantadine being the only factor associated with differences of mortality among patients receiving TCZ with severe COVID-19 (HR: 0.205 [CI: 0.131 – 0.322], *P*-value = 0.001) (Table 4). Kaplan-Meier cumulative mortality was calculated with statistical significance of survival data (Figure 2).

3.5. Clinical characteristics of patients treated without tocilizumab depending on amantadine intake

Of the 114 patients who did not receive TCZ, 60 (53%) were treated with amantadine and 54 (47%) without it. Groups were

Table 1
Characteristic of study groups by survival outcomes.

	Survived N = 66 (27.4%)	Died N = 175 (72.6%)	P-value
Age, years, median (IQR)	62 (55–68)	67 (60–72)	0.005
Height, cm (IQR)	172 (162–178)	172 (164–178)	0.666
Weight, kg (IQR)	90 (75–103)	88 (79–100)	0.950
Body mass index, kg/m ² (IQR)	30.47 (26.12–34.41)	29.38 (27.16–34.29)	0.756
Percentage of lung involvement, % (IQR)	32.47 (16.09 – 51.57)	47.20 (31.74 – 59.68)	0.010
White blood cell, x10 ³ /ul (IQR)	7.73 (5.45–12.26)	7.67 (5.4–10.31)	0.545
Hemoglobin, g/dl (IQR)	13.7 (12.3–15)	13.55 (12–14.7)	0.651
Platelets, x10 ³ /ul (IQR)	221 (184–275)	199 (156–277)	0.139
C-reactive protein, mg/l (IQR)	123.06 (60.93–215.51)	126.54 (70.27–190.4)	0.894
Procalcitonin, ng/ml (IQR)	0.22 (0.13–0.54)	0.27 (0.16–0.48)	0.341
Interleukin-6, pg/ml (IQR)	86.5 (38.6–157)	107 (53.9–175)	0.162
Creatinine, mg/dl (IQR)	1.08 (0.8–1.46)	1.11 (0.86–1.52)	0.262
Alanine aminotransferase, U/l (IQR)	36 (23–58)	40 (23–62)	0.497
D-dimer, ug/l (IQR)	0.6 (0.39–1.67)	0.71 (0.35–1.37)	0.769
Gender, n (%)	35 (57%)	118 (66%)	0.251
Male			
Obesity, n(%)	28 (46%)	69 (38%)	0.297
Yes			
Diabetes, n(%)	16 (26%)	65 (36%)	0.157
Yes			
Hypertension, n(%)	35 (57%)	94 (52%)	0.485
Yes			
Heart failure, n(%)	5 (8%)	19 (11%)	0.594
Yes			
Remdesivir administration, n(%)	23 (38%)	76 (42%)	0.535
Yes			
Tocilizumab admission, n(%)	27 (44%)	100 (56%)	0.126
Yes			
Virus strain, n(%)	47 (71%)	96 (55%)	0.021
Wild/Alpha			

Abbreviation: IQR, Interquartile range.

P-values for gender, obesity, diabetes, hypertension, heart failure, remdesivir and tocilizumab admission and virus strain were received from Chi-square Pearson.

Table 2
Characteristic of groups by amantadine use.

	Amantadine N = 141	Non-amantadine N = 100	P-value
Age, years	67 (60–71)	63 (58–68)	0.032
Height, cm	172 (164–178)	172 (165–178)	0.898
Weight, kg	88.5 (75–100)	88 (80–103)	0.747
Body mass index	29.705 (27.34–32.87)	29.38 (26.55–34.94)	0.904
Percentage of lung involvement, %	44.205 (25.065–58.79)	45.180 (25.230–56.410)	0.934
White blood cell, x10 ³ /ul	8.145 (5.94–11.365)	7.34 (5.02–9.77)	0.077
Hemoglobin, g/dl	13.6 (12.05–14.7)	13.4 (11.8–15.2)	0.736
Platelets, x10 ³ /ul	219.5 (176.5–285.5)	185 (148–258)	0.014
C-reactive protein, mg/l	121.285 (75.98–202.595)	127.23 (61.33–176.035)	0.199
Procalcitonin, ng/ml	0.285 (0.15–0.545)	0.24 (0.14–0.43)	0.183
Interleukin-6, pg/ml	109 (51.4–181)	95.2 (51.8–151)	0.313
Creatinine, mg/dl	1.05 (0.855–1.475)	1.12 (0.81–1.59)	0.426
Alanine aminotransferase, U/l	40 (25–62)	36.5 (20.5–59)	0.194
D-dimer, ug/l	0.806 (0.413–1.566)	0.522 (0.281–1.193)	0.025
Gender, n (%)	85 (60%)	68 (68%)	0.223
Male			
Obesity, n(%)	61 (43.2%)	36 (36%)	0.275
Yes			
Diabetes, n(%)	47 (33.3%)	34 (34%)	0.914
Yes			
Hypertension, n(%)	84 (59.5%)	45 (45%)	0.025
Yes			
Heart failure, n(%)	15 (10.5%)	9 (9%)	0.675
Yes			
Remdesivir administration, n(%)	54 (38.3%)	45 (45%)	0.297
Yes			
Tocilizumab admission, n(%)	81 (57.5%)	46 (46%)	0.079
Yes			
Mortality, n(%)	84 (59.5%)	91 (91%)	0.001
Died			
Virus strain, n(%)	99 (70%)	44 (44%)	0.001
Wild/Alpha			

P-values for gender, obesity, diabetes, hypertension, heart failure, remdesivir and tocilizumab admission and virus strain were received from Chi-square Pearson.

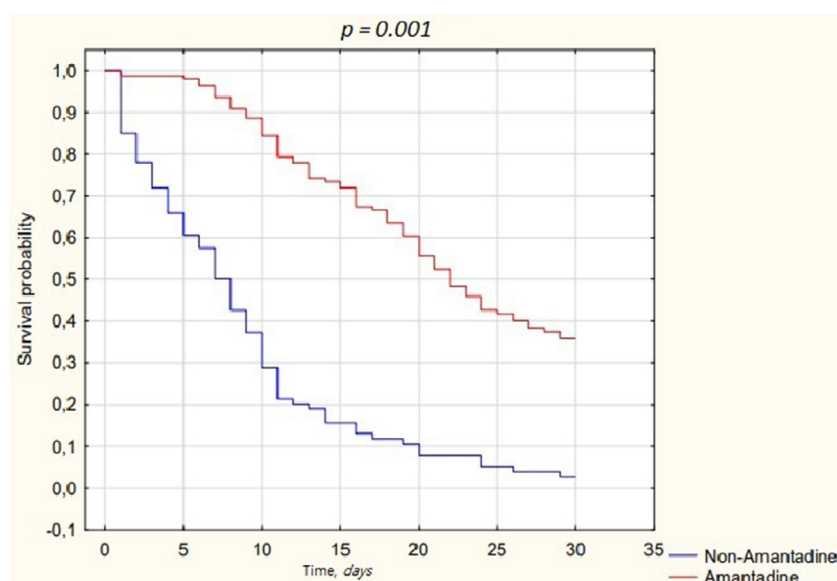


Figure 1. Kaplan-Meier curves displaying the estimated survival probability for amantadine related treatment.

Table 3

Cox proportional hazards model for mortality risk for all patients included in the study.

	Cox proportional hazards model for mortality			
	P-value	HR	Lower 95% CI HR value	Upper 95% CI HR value
Age, years	0.275	1.011	0.991	1.031
Platelets, $\times 10^3/\text{ul}$	0.174	0.999	0.996	1.001
D-dimer, ug/l	0.768	0.991	0.930	1.055
Percentage of lung involvement, %	0.395	1.004	0.995	1.013
Tocilizumab, Yes (reference)	0.005	1.731	1.183	2.532
Remdesivir admission, Yes (reference)	0.161	0.759	0.516	1.116
Amantadine admission, Yes (reference)	0.001	0.220	0.146	0.333
Gender, Male (reference)	0.114	1.368	0.927	2.019
Hypertension, Yes (reference)	0.269	1.248	0.843	1.847
Heart failure, Yes (reference)	0.671	1.139	0.624	2.079
Diabetes, Yes (reference)	0.978	1.006	0.683	1.481
Obesity, Yes (reference)	0.423	1.176	0.791	1.748
Virus strain, Wild (reference)	0.359	0.839	0.577	1.221

Abbreviation: HR, Hazard ratio.

homogenous in terms of age, gender, height, weight, BMI, white blood cell, hemoglobin, CRP, procalcitonin, IL-6, creatinine, ALT, and D-dimer. Patients treated with amantadine had significantly higher levels of platelets ($221 \times 10^3/\text{ul}$ [184–300] vs $182.5 \times 10^3/\text{ul}$ [144–258], P -value = 0.04). Obesity and hypertension were more common in amantadine group (33 [55%] vs 18 [33.3%], P -value = 0.02) and (38 [63.3%] vs 21 [38.9%], P -value = 0.009), respectively. In the multivariate Cox proportional hazards models constructed identically to Section 3.4, administration of amantadine was the only factor associated with differences in mortality among patients with severe COVID-19 treated without TCZ (HR: 0.224 [CI: 0.133–0.375], P -value = 0.001). Kaplan-Meier cumulative mortality was calculated with statistical significance of survival data (Figure 3).

3.6. Characteristics of patients treated with amantadine divided into two groups based on time of admission

The median time from ICU admission to amantadine administration was 3 days (IQR 0–6 days). The decision to administer amantadine rested with the attending physician. The decisive issue in most cases was the patient's hydration status and temporary contraindications to the administration of amantadine, such as: severe decompensated heart failure (New York Heart Association grade IV), cardiomyopathy, myocarditis, second or third-degree atrioventricular block, bradycardia. To reflect possible bias related to the timing of administration, we divided patients treated with amantadine into those who received the first dose within 5 days of admission ($n = 99$ [70.2%]) to the ICU and those who re-

Table 4

Cox proportional hazards model for mortality risk for patients treated with tocilizumab.

	Cox proportional hazards model for mortality			
	P-value	HR	Lower 95% CI HR value	Upper 95% CI HR value
Age, years	0.840	1.002	0.979	1.026
White blood cell	0.206	0.972	0.930	1.016
Remdesivir administration, Yes	0.405	1.207	0.775	1.878
Amantadine admission, Yes	0.001	0.205	0.131	0.322
Gender, Male	0.061	1.507	0.981	2.315
Hypertension, Yes	0.379	1.218	0.784	1.893
Heart failure, Yes	0.815	1.095	0.514	2.333
Diabetes, Yes	0.942	0.983	0.613	1.575
Obesity, Yes	0.504	1.159	0.752	1.788

Abbreviation: HR, Hazard ratio.

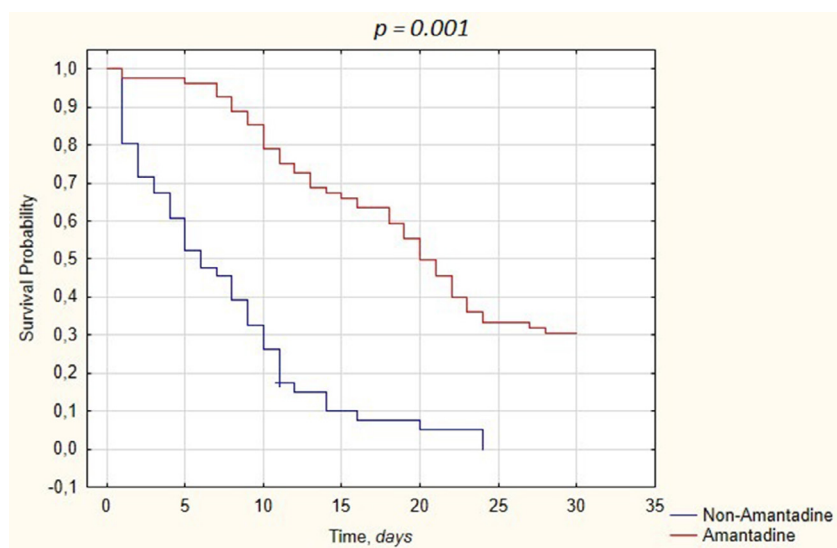
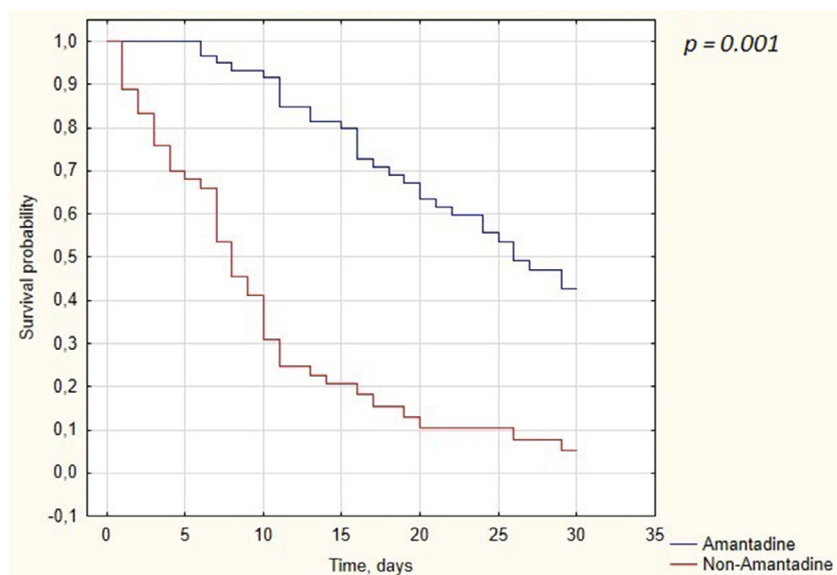
**Figure 2.** Kaplan-Meier curves displaying the estimated survival probability for patients treated with TCZ divided into amantadine dependant groups.**Figure 3.** Kaplan-Meier curves displaying the estimated survival probability for patients treated without TCZ divided into amantadine dependant groups.

Table 5

Cox proportional hazards model for mortality risk for patients treated with amantadine according to admission time groups.

	Cox proportional hazards model for mortality			
	P-value	HR	Lower 95% CI HR value	Upper 95% CI HR value
Remdesivir admission, Yes	0.649	1.114	0.700	1.774
Tocilizumab admission, Yes	0.099	0.668	0.414	1.078
Amantadine admission time, >5 day	0.050	0.560	0.313	0.999
Gender, Male	0.309	1.275	0.799	2.036
Hypertension, Yes	0.717	1.089	0.686	1.730
Heart failure, Yes	0.405	1.377	0.649	2.924
Diabetes, Yes	0.322	0.783	0.482	1.271
Obesity, Yes	0.361	1.235	0.785	1.942

Abbreviation: HR, Hazard ratio.

ceived it after 5 days from intensive care initiation (42 [29.8%]). We set this limit as for majority of antiviral agents benefit beyond 5 days following COVID-19 symptom onset is not observed, and also to exclude the bias for early ICU mortality. The analyzed groups were homogeneous in terms of age, gender, BMI, laboratory results, comorbidities, and concomitant treatment but differed significantly in terms of mortality (34% points to the advantage of receiving amantadine after 5 days from admittance, P -value = 0.05). In multivariate proportional Cox hazards models (Table 5) administration of amantadine after 5th day was independently associated with lower mortality (HR: 0.560 [CI: 0.313–0.999], P -value = 0.050).

3.7. Characteristic of patients treated in intensive care unit for at least 48 hours

In order to avoid a statistical error related to the enrollment of patients with immediate ICU mortality, we created an additional analysis excluding individuals with immediate (within 48 hours of ICU admission) mortality. The 48-hour period is based on the summary of product characteristics of amantadine, according to which amantadine achieves its full therapeutic effect after 48 hours ([How long does it take for amantadine to start working? 2022](#)). There were no statistically significant differences between particular groups regarding gender, age, height, weight, BMI, white blood cell count, hemoglobin levels, CRP, procalcitonin, IL-6, creatinine levels, and ALT activity. Patients receiving amantadine had slightly higher platelet counts and D-dimer at baseline. Arterial hypertension was statistically more common in the group treated with amantadine (59% vs 42%, P -value = 0.014).

In multivariate proportional Cox hazards models (Table 6), gender (HR: 1.526 [CI: 1.063–2.190], P -value = 0.023), and administration of TCZ was associated with higher mortality (HR: 1.543 [CI: 1.089–2.185], P -value = 0.015), while administration of amantadine associated with lower risk of death (HR: 0.242 [CI: 0.169–0.348], P -value = 0.001).

3.8. Characteristics of patients diagnosed with wild-type of SARS-CoV-2 depending on amantadine intake

We confirmed wild-type SARS-CoV-2 infection in 143 patients. Out of 143 patients, 99 (70%) received amantadine for treatment.

The groups differed in terms of BMI (amantadine 30.56 [26.67–35.15] vs non-amantadine 27.81 [26.39–29.92], P -value = 0.039). There were no statistical differences in terms of gender, age, height, weight, percentage of lung involvement, or basic laboratory tests. Obesity and arterial hypertension were much more common in the group treated with amantadine (45 [45%] vs 10 [23%], P -value = 0.009) and (58 [59%] vs 16 [36%], P -value = 0.014), respectively. The remaining comorbidities and administration of TCZ or remdesivir did not differ statistically. Mortality rate was significantly lower in group treated that amantadine (57% vs 91%, P -value = 0.001).

We constructed multivariate Cox proportional hazards models for all statistically significant factors, administration of amantadine in line with the main goal of our study, comorbidities in line with the secondary goal of the study, and administration of remdesivir and TCZ in line with the tertiary goal. In multivariate proportional Cox hazards models, administration of TCZ was associated with higher mortality (HR: 2.200 [CI: 1.248–3.876], P -value = 0.006), while administration of amantadine associated with lower risk of death (HR: 0.212 [CI: 0.123–0.365], P -value = 0.001).

3.9. Characteristics of patients diagnosed with Alpha strain of SARS-CoV-2 depending on amantadine intake

We confirmed Alpha (B.1.1.7) strain SARS-CoV-2 infection in 98 patients. Out of 98 patients in this group, 42 (43%) received amantadine for treatment. The groups differed in terms of D-dimer level (amantadine 0.855 [0.409–2.064] vs non-amantadine 0.512 [0.264–0.9715], P -value = 0.023). There were no statistical differences in terms of gender, age, height, weight, BMI, percentage of lung involvement, or basic laboratory tests. The comorbidities and administration of TCZ or remdesivir did not differ statistically. Mortality rate was significantly lower in group treated with amantadine (66% vs 91%, P -value = 0.002).

Similarly, we constructed multivariate Cox proportional hazards models for all statistically significant factors, administration of amantadine in line with the main goal of our study, comorbidities in line with the secondary goal of the study and administration of remdesivir and TCZ in line with the tertiary goal. In multivariate proportional Cox hazards models administration of amantadine associated with lower risk of death (HR: 0.216 [CI: 0.128–0.364], P -value = 0.001). Other factors were not statistically significant.

Table 6

Cox proportional hazards model for mortality risk for patients who survived first 48 hours after admission to intensive care unit.

	Cox proportional hazards model for mortality			
	P-value	HR	Lower 95% CI HR value	Upper 95% CI HR value
Platelets, $\times 10^3/\mu\text{l}$	0.049	0.998	0.996	1.000
D-dimer, $\mu\text{g/l}$	0.410	1.026	0.966	1.090
Remdesivir admission, Yes	0.417	1.156	0.816	1.638
Tocilizumab admission, Yes	0.015	1.543	1.089	2.185
Amantadine admission, Yes	0.001	0.242	0.169	0.348
Gender, Male	0.023	1.526	1.063	2.190
Hypertension, Yes	0.829	0.963	0.684	1.357
Heart failure, Yes	0.779	1.093	0.591	2.022
Diabetes, Yes	0.840	1.038	0.728	1.480
Obesity, Yes	0.397	0.860	0.607	1.220

Abbreviation: HR, Hazard ratio.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to investigate the survival effects of amantadine in ICU patients treated for severe COVID-19 respiratory failure and ARDS. Our study demonstrates the survival benefits of IV administration of amantadine sulfate in patients treated in ICU alone and in combination with immunomodulatory TCZ. The majority of admitted patients presented the laboratory features of cytokine storm, with the median IL-6 levels in the group exceeding 100 pg/ml, regardless of amantadine use, which strengthens the possibility for the immunomodulatory effect in the analyzed cases. Furthermore, survival was improved in patients who received amantadine late, after 5 days from ICU admission, and also when cases who died within 48 hours of admission were excluded, which strengthens the suggestion that the survival benefit is a relevant scientific finding. It must be emphasized that we discard the possibility of the direct antiviral but not immunomodulatory effect at this stage of the disease. Possible immunomodulatory properties of amantadine include effects on altered T cell function (Wandinger *et al.*, 1999), production of IL-2, reduction of the production of the pro-inflammatory cytokines, specifically interferon- γ and tumor necrosis factor- α (Kubera *et al.*, 2009).

In our study, a negative effect of TCZ on ICU survival was observed. It is most likely related to the more severe general condition of patients treated with TCZ. To avoid a sample selection bias, as TCZ has a proven therapeutic effect in the treatment of patients with COVID-19 in severe general condition and cytokine storm (Biran *et al.*, 2020; Chober *et al.*, 2022), we have created additional analyzes to show the effectiveness of amantadine in treating patients in the context of the use of other immunomodulatory drugs. Survival benefit associated with amantadine was retained in this group.

There are no published data on the amantadine treatment in patients with COVID-19 and ARDS requiring mechanical ventilation and ICU treated; however, amantadine has been widely used as a neurostimulant in the intensive care setting before, for reasons other than severe COVID-19 respiratory failure. The study by Leclerc *et al.* (2021) examined the effect of neurostimulants such as amantadine and modafinil on the treatment effects of patients hospitalized for intracerebral hemorrhage, ischemic stroke, or subarachnoid hemorrhage. A total of 87 patients were assessed over the 3.7 year study period. Of the 62 patients treated with amantadine monotherapy, 34 (55%) were considered treatment re-

sponders. Respondents were more likely to be discharged home or for emergency rehabilitation compared to non-responders. The results of our studies cannot be directly compared, while both studies showed a positive effect of the use of amantadine in patients hospitalized in the ICU. Furthermore, in the study by Rahman Abbasivash *et al.*, the effect of oral administration of amantadine on the neurological outcomes of patients with diffuse axonal injury in the ICU was evaluated (Abbasivash *et al.*, 2019). All patients in this study were intubated and received mechanical ventilation. They were divided into two groups: patients receiving amantadine and placebo. There were no significant differences in the duration of mechanical ventilation, hospitalization and mortality in both groups. The study found no effect of amantadine on the final results, probably due to the small group of patients studied, and the low overall mortality among the patients studied ($n = 5$; 7%). In an analysis by Saniova *et al.* (2004), patients with severe brain injuries treated with amantadine sulfate in addition to standard therapy had a lower mortality rate and higher Glasgow Coma Scale than those treated with standard therapy alone. These studies demonstrate the favorable effects of amantadine in the ICU setting, but cannot be directly translated into the COVID-19 patients.

The main advantage of our analysis is a large dataset of patients characterized by high homogeneity, which allows the impact of the drug under study to be assessed. The collection of data from one center allowed us to exclude the possibility of an error related to different standards of individual care. Being an observational study, we are aware of the high risk of information bias which could be the cause of unexpected results. Paradoxical results (regardless of their statistical significance) raise doubts about the accuracy of the data. As examples for repeated unexpected results: The presence of heart failure decreases the hazard of death by 10% ($\text{HR} = 0.9$), presence of diabetes mellitus lower the hazard of death by 30%, and presence of hypertension decrease the hazard of death by 13% ($\text{HR} = 0.83$). A further randomized clinical trial is needed to approve or disapprove our results. This can be considered as a pilot study. A randomized clinical trial is needed to confirm the utility of amantadine in treatment of COVID-19 patients.

5. Conclusion

Patients treated in ICUs due to severe respiratory failure may benefit from the initiation of amantadine sulfate treatment. The

significantly lower mortality among patients who started treatment later in hospitalization suggests no effect of amantadine on the acute phase of SARS-CoV-2 infection. The exact way the medicine works is unknown and requires further studies. It seems justified to conduct further studies, including a randomized controlled trial, especially due to the low cost of possible treatment if the effectiveness is confirmed.

6. Limitations

Our research has several limitations that we are aware of. They mainly concern with its retrospective nature, lack of randomization of the treatment groups, and the lack of clear criteria for inclusion in the administration of amantadine. However, our analyzes were multidirectional and point to a potential survival signal, and therefore seem highly valuable basis for future considerations.

Also, the administration of amantadine was based on the independent decision of the clinician, which may introduce a decision bias. For this purpose, analyses excluding early mortality patients were performed.

Funding

The study was funded by the National Centre For Research and Development, Agreement No. SZPITALE-JEDNOIMIENNE/27/2020, November 20, 2020, for implementation and financing of a non-competitive project (PREVENTION AND TREATMENT: COVID-19) titled: “Development of modern laboratory technologies, IT and bioinformatics dedicated to the diagnosis and prevention of SARS-CoV-2 infections” implemented as part of the recruitment “Support for homonymous hospitals in combating the spread of SARS-CoV-2 infection and treating COVID-19”.

Institutional review board statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and protocol was approved by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland (approval number: KB-0012/92/2020).

Data availability statement

The original anonymous dataset is available on request from the corresponding author at Daniel.chober@pum.edu.pl.

Declaration of competing interest

The authors have no competing interests to declare.

CRediT authorship contribution statement

Daniel Chober: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration. **Zenon Czajkowski:** Conceptualization, Validation, Resources, Supervision, Project administration. **Bogusz Aksak-Wąs:** Resources. **Katarzyna Dalewska-Kucharczyk:** Resources. **Katarzyna Hołubczak:** Resources. **Sylvia Karasińska-Milchert:** Resources. **Mateusz Jaremko:** Resources. **Miłosz Skowron:** Resources. **Malwina Karasińska-Cieślak:** Resources. **Miłosz Parczewski:** Validation, Resources, Supervision, Project administration.

Acknowledgments

We would like to acknowledge all the medical personnel involved in the care of COVID-19 patients.

References

- Abbasivash R, Valizade Hasanloei MA, Kazempour A, Mahdikhah A, Shaaf Ghor-eishi MM, Akhavan Masoumi G. The effect of oral administration of amantadine on neurological outcome of patients with diffuse axonal injury in ICU. *J Exp Neurol* 2019;13.
- Biran N, Ip A, Ahn J, Go RC, Wang S, Mathura S, et al. Tocilizumab among patients with COVID-19 in the intensive care unit: a multicentre observational study. *Lancet Rheumatol* 2020;2:e603–12.
- Chen S, Han Y, Yang L, Kim T, Nair M, Harschnitz O, Wang P, Zhu J, Koo SY, Tang X, Lacko L, Chandar V, Bram Y, Zhang T, Zhang W, He F, Caicedo J, Huang Y, Evans T, van der Valk P, Titulaer MJ, Spoor JKH, Furler RL, Canoll P, Goldman J, Przedborski S, Schwartz R, Ho D, Studer L. SARS-CoV-2 infection causes dopaminergic neuron senescence. *Research Square* 21 May 2021 <https://www.researchsquare.com/article/rs-513461/v1>. (accessed DD Month YYYY).
- Chober D, Aksak-Wąs B, Bobrek-Lesiakowska K, Budny-Finster A, Holda E, Mieżyńska-Kurtycz J, Jamro G, Parczewski M. Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study. *J Clin Med* 2022;11:2286.
- Gaskill PJ, Yano HH, Kalpana GV, Javitch JA, Berman JW. Dopamine receptor activation increases HIV entry into primary human macrophages. *PLoS One* 2014;9.
- Geisler MW, Sliwinski M, Coyle PK, Masur DM, Doscher C, Krupp LB. The effects of amantadine and pemoline on cognitive functioning in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1996;53:185–8.
- Ghalaenovi H, Fattahi A, Koohpayehzadeh J, Khodadost M, Fatahi N, Taheri M, et al. The effects of amantadine on traumatic brain injury outcome: a double-blind, randomized, controlled, clinical trial. *Brain Inj* 2018;32:1050–5.
- Giacino JT, Whyte J, Bagiella E, Kalmar K, Childs N, Khademi A, et al. Placebo-controlled trial of amantadine for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med* 2012;366:819–26.
- Gualtieri T, Chandler M, Coons TB, Brown LT. Amantadine: a new clinical profile for traumatic brain injury. *Clin Neuropharmacol* 1989;12:258–70.
- How long does it take for amantadine to start working? *Drugs.com*. <https://www.drugs.com/medical-answers/long-amantadine-start-working-3546573/>, 2022 (accessed 22 May 2022).
- Hubsher G, Haider M, Okun MS. Amantadine: the journey from fighting flu to treating Parkinson disease. *Neurology* 2012;78:1096–9.
- Influenza antiviral drug resistance, Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/flu/treatment/antiviralresistance.htm>, 2021 (accessed 22 May 2022).
- Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, García-Martín E, Agúndez JAG. Anti-inflammatory effects of amantadine and memantine: possible therapeutics for the treatment of Covid-19? *J Pers Med* 2020;10:1–15.
- Kraus MF, Smith GS, Butters M, Donnell AJ, Dixon E, Yilong C, et al. Effects of the dopaminergic agent and NMDA receptor antagonist amantadine on cognitive function, cerebral glucose metabolism and D2 receptor availability in chronic traumatic brain injury: a study using positron emission tomography (PET). *Brain Inj* 2005;19:471–9.
- Kubera M, Maes M, Budziszewska B, Basta-Kaim A, Leśkiewicz M, Grygier B, et al. Inhibitory effects of amantadine on the production of pro-inflammatory cytokines by stimulated in vitro human blood. *Pharmacol Rep* 2009;61:1105–12.
- Leclerc AM, Riker RR, Brown CS, May T, Nocella K, Cote J, et al. Amantadine and modafinil as neurostimulants following acute stroke: a retrospective study of intensive care unit patients. *Neurocrit Care* 2021;34:102–11.
- Li J, Zhang P, Liu Y, Wu S, Yi X, Zhang S, et al. Early amantadine treatment reduces the risk of death in patients with large hemisphere infarctions: a Chinese hospital-based study. *BMC Neurol* 2021;21:419.
- Monto AS, Arden NH. Implications of viral resistance to amantadine in control of influenza. *Clin Infect Dis* 1992;15:362–7 discussion 368–9.
- Peeters M, Romieu P, Maurice T, Su TP, Maloteaux JM, Hermans E. Involvement of the sigma 1 receptor in the modulation of dopaminergic transmission by amantadine. *Eur J Neurosci* 2004;19:2212–20.
- Saniova B, Drobný M, Kneslova L, Minarik M. The outcome of patients with severe head injuries treated with amantadine sulphate. *J Neural Transm (Vienna)* 2004;111:511–14.
- Shafiee S, Ehteshami S, Moosazadeh M, Aghapour S, Haddadi K. Placebo-controlled trial of oral amantadine and zolpidem efficacy on the outcome of patients with acute severe traumatic brain injury and diffuse axonal injury. *Caspian J Intern Med* 2022;13:113–21.
- Simanjuntak Y, Liang JJ, Lee YL, Lin YL. Japanese encephalitis virus exploits dopamine D2 receptor-phospholipase C to target dopaminergic human neuronal cells. *Front Microbiol* 2017;8:651.
- Stelmaschuk S, Will MC, Meyers T. Amantadine to treat cognitive dysfunction in moderate to severe traumatic brain injury. *J Trauma Nurs* 2015;22:194–203 quiz E1–2.
- Stoof JC, Booij J, Drukarch B. Amantadine as N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist: new possibilities for therapeutic applications? *Clin Neurol Neurosurg* 1992;94:S4–6.
- Wandinger KP, Hagenah JM, Klüter H, Rothermundt M, Peters M, Vieregge P. Effects of amantadine treatment on in vitro production of interleukin-2 in de-novo patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 1999;98:214–20.
- Zhong J, Li J, Ni C, Zuo Z. Amantadine alleviates postoperative cognitive dysfunction possibly by preserving neurotrophic factor expression and dendritic arborization in the hippocampus of old rodents. *Front Aging Neurosci* 2020;12:427.

11. Streszczenie w języku polskim

Zakażenie Covid-19 wiąże się z szeroką gamą objawów klinicznych, w dużej mierze powiązanych z replikacją wirusa, odpowiedzią immunologiczną i uszkodzeniem naczyń. Wczesna replikacja wirusa wiąże się z typową gamą objawów ostrej infekcji wirusowej, po których może nastąpić burza cytokin, która rozwija się w późniejszych stadiach infekcji, ponad 5-7 dni od początkowych objawów. Zmienność wariantów wirusa znacząco zmieniała przebieg choroby w czasie pandemii z istotnymi różnicami w kolejnych falach infekcji SARS-CoV-2.

Burza cytokin związana z COVID-19 (CS) jest unikalną formą odpowiedzi hiperzapalnej, którą scharakteryzowano w związku z zakażeniem SARS CoV-2. Burza cytokinowa spowodowana nadmiernym wydzielaniem cytokin prowadzi do ostrej ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej. Początek burzy cytokinowej przypomina zespół ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej (SIRS) z brakiem równowagi między odpowiedziami prozapalnymi i przeciwzapalnymi. Do rozwoju burzy cytokinowej dochodzi najczęściej na początku 2. tygodnia infekcji w trzecim stadium choroby. W tym okresie leczenie immunomodulujące ma największą skuteczność.

Celem pracy doktorskiej była ocena skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania tocilizumabu oraz amantadyny jako leków immunomodulacyjnych w COVID-19. W dotychczasowym piśmiennictwie brakowało klarownej informacji na temat skuteczności tocilizumabu u pacjentów przynajmniej 50% zajęciem płuc oraz wykładnikami biochemicznymi burzy cytokinowej. Bezpieczeństwo stosowania tocilizumabu u pacjentów z COVID-19 oraz zatorowością płucną nie było szerzej dyskutowane w dotychczasowej literaturze. Działanie immunomodulacyjne amantadyny było w ostatnich latach badane w

schorzeniach neurologicznych oraz pourazowych uszkodzeniach mózgu wymagających leczenia w OIT. Postanowiliśmy ocenić skuteczność takiego leczenia u pacjentów hospitalizowanych w OIT z powodu zapalenia płuc związanego z COVID-19.

Badania powstały na bazie dużego zbioru danych o pacjentach obserwowanych w Samodzielnym Publicznym Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym w Szczecinie. Baza danych zawierała informację o 4 287 pacjentach hospitalizowanych z zakażeniem SARS-CoV-2. W badaniu zebraliśmy dane kliniczne z dokumentacji medycznej (wiek, płeć, historię leczenia, czas pobytu w szpitalu, czas trwania leczenia na OIT, statystyki przeżycia, wyjściowe poziomy utlenowania krwi, wyniki tomografii komputerowej klatki piersiowej oraz wybrane parametry laboratoryjne).

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. W leczeniu pacjentów z ciężkim lub krytycznym zapaleniem płuc związanym z COVID-19, u których rozwija się burza cytokinowa wyrażona wysokim poziomem interleukiny-6 (>100 pg/ml), podawanie tocilizumabu wraz ze standardowym leczeniem (opartym na deksametazonie, antybiotykoterapii i heparynie drobnocząsteczkowej) zapewnia znacznie lepszy efekt terapeutyczny od samego standardowego leczenia pod względem przeżycia, konieczności zastosowania wentylacji mechanicznej i przyjęcia na OIT.
2. W przypadku pacjentów z ostrą zatorowością płucną z radiologicznie potwierdzonym co najmniej umiarkowanym zajęciem płuc związanym z COVID-19 podanie tocilizumabu wraz ze standardowym leczeniem (opartym na deksametazonie, antybiotykoterapii) daje znacznie gorszy efekt pod względem przeżycia niż samo leczenie standardowe.

Dysfunkcjonalna odpowiedź immunologiczna na SARS-COV-2 prowadząca do burzy cytokinowej może przyczynić się do wcześniejszego wystąpienia ostrego udaru

niedokrwienności lub zatorowości płucnej. Tocilizumab jest lekiem z wyboru u pacjentów wymagających terapii immunomodulacyjnej w celu zmniejszenia nadmiernej produkcji cytokin. Należy go jednak stosować ze szczególną ostrożnością, szczególnie u pacjentów z potwierdzonym epizodem choroby zakrzepowo-zatorowej

3. Pacjenci leczeni na oddziałach intensywnej terapii z powodu ciężkiej niewydolności oddechowej mogą odnieść korzyść z rozpoczęcia leczenia siarczanem amantadyny. Istotnie niższa śmiertelność wśród pacjentów, którzy rozpoczęli leczenie w późniejszym okresie hospitalizacji, sugeruje brak wpływu amantadyny na ostrą fazę zakażenia SARS-CoV-2. Dokładny sposób działania leku jest nieznany i wymaga dalszych badań. Zasadne wydaje się przeprowadzenie dalszych badań, w tym randomizowanego badania kontrolowanego, zwłaszcza ze względu na niski koszt ewentualnego leczenia w przypadku potwierdzenia skuteczności.

12. Streszczenie w języku angielskim

Covid-19 infection is associated with a wide variety of clinical symptoms, largely related to viral replication, immune response, and vascular damage. Early viral replication is associated with the typical gamut of symptoms of acute viral infection, which may be followed by a cytokine storm that develops in the later stages of infection, more than 5-7 days after the onset of symptoms. The variability of virus variants significantly changed the course of the disease during the pandemic, with significant differences in successive waves of SARS-CoV-2 infection.

The COVID-19-related cytokine storm is a unique form of the hyperinflammatory response that has been characterized in association with SARS CoV-2 infection. A cytokine storm caused by the excessive secretion of cytokines leads to an acute systemic inflammatory response. The onset of a cytokine storm resembles a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) with an imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory responses. The development of a cytokine storm usually occurs at the beginning of the second week of infection in the third stage of the disease. During this period, immunomodulating therapy is most effective.

The aim of this study was to evaluate the efficacy and safety of tocilizumab and amantadine as immunomodulatory drugs in COVID-19. The literature available so far lacked clear information on the efficacy of tocilizumab in patients with at least 50% lung involvement and biochemical markers of cytokine storm. The safety of tocilizumab in patients with COVID-19 and pulmonary embolism has not been widely discussed in the literature to date. In recent years, the immunomodulatory effect of amantadine has been investigated in neurological diseases and traumatic brain injuries requiring ICU treatment.

We decided to evaluate the effectiveness of such treatment in patients hospitalized in the ICU due to COVID-19 pneumonia.

The researches were created on the basis of a large set of data on patients observed in the Independent Public Provincial Complex Hospital in Szczecin. The database contained information on 4,287 patients hospitalized with SARS-CoV-2 infection. In the study, we collected clinical data from medical records (age, sex, treatment history, hospital stay, duration of ICU treatment, survival statistics, baseline blood oxygenation levels, chest computed tomography results, and selected laboratory parameters).

Based on the researches, the following conclusions were drawn:

1. For the treatment of patients with severe or critical COVID-19 pneumonia who develop a cytokine storm expressed by high levels of interleukin-6 (> 100 pg / ml), administration of tocilizumab along with standard treatment (based on dexamethasone, antibiotic therapy and low molecular weight heparin) provides a much better therapeutic effect than standard treatment alone in terms of survival, the need for mechanical ventilation and admission to the ICU.

2. In patients with acute pulmonary embolism with radiographically confirmed at least moderate lung involvement associated with COVID-19, administration of tocilizumab along with standard therapy (based on dexamethasone, antibiotics) has a significantly worse survival effect than standard therapy alone. A dysfunctional immune response to SARS-CoV-2 leading to a cytokine storm may contribute to the earlier onset of acute ischemic stroke or pulmonary embolism. Tocilizumab is the drug of choice for patients requiring immunomodulatory therapy to reduce excessive cytokine production. However, it should be

used with extreme caution, especially in patients with a confirmed episode of thromboembolism

3. Patients treated in intensive care units with severe respiratory failure may benefit from initiating amantadine sulfate therapy. Significantly lower mortality among patients who started treatment later in hospitalization suggests no effect of amantadine on the acute phase of SARS-CoV-2 infection. The exact way the medicine works is unknown and requires further research. It seems justified to conduct further studies, including a randomized controlled trial, especially due to the low cost of possible treatment if effectiveness is confirmed.

13. Piśmiennictwo

- [1] C. Marques-Pereira *et al.*, "SARS-CoV-2 Membrane Protein: From Genomic Data to Structural New Insights," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 6, Mar. 2022, doi: 10.3390/IJMS23062986.
- [2] "WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data." <https://covid19.who.int/> (accessed Mar. 12, 2022).
- [3] W. Shang, Y. Yang, Y. Rao, and X. Rao, "The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines," *npj Vaccines* 2020 51, vol. 5, no. 1, pp. 1–3, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41541-020-0170-0.
- [4] N. Zhu *et al.*, "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019," *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, no. 8, pp. 727–733, Feb. 2020, doi: 10.1056/NEJMOA2001017/SUPPL_FILE/NEJMOA2001017_DISCLOSURES.PDF.
- [5] "Ludzkie koronawirusy • Postępy Nauk Medycznych 4b/2015 • Czytelnia Medyczna BORGIS." <http://www.czytelniamedyczna.pl/5165,ludzkie-koronawirusy.html> (accessed May 28, 2022).
- [6] H. L. Murphy and H. Ly, "Understanding the prevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in companion, captive, wild, and farmed animals," *Virulence*, vol. 12, no. 1, pp. 2777–2786, 2021, doi: 10.1080/21505594.2021.1996519.
- [7] R. Grant *et al.*, "Impact of SARS-CoV-2 Delta variant on incubation, transmission settings and vaccine effectiveness: Results from a nationwide case-control study in France," *Lancet Reg. Heal. - Eur.*, vol. 13, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.LANEPE.2021.100278.

- [8] J. S. Song *et al.*, “Serial Intervals and Household Transmission of SARS-CoV-2 Omicron Variant, South Korea, 2021 - Volume 28, Number 3—March 2022 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 28, no. 3, pp. 756–759, Mar. 2022, doi: 10.3201/EID2803.212607.
- [9] L. Jansen *et al.*, “Investigation of a SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant Cluster — Nebraska, November–December 2021,” *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 70, no. 5152, pp. 1782–1784, Dec. 2021, doi: 10.15585/MMWR.MM705152E3.
- [10] W. Ni *et al.*, “Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19,” *Crit. Care*, vol. 24, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2020, doi: 10.1186/S13054-020-03120-0/FIGURES/3.
- [11] N. Khan, X. Chen, and J. D. Geiger, “Role of Endolysosomes in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Infection and Coronavirus Disease 2019 Pathogenesis: Implications for Potential Treatments,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, p. 1739, Oct. 2020, doi: 10.3389/FPHAR.2020.595888/BIBTEX.
- [12] M. Hoffmann *et al.*, “SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor,” *Cell*, vol. 181, no. 2, pp. 271–280.e8, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.CELL.2020.02.052.
- [13] B. A. Johnson *et al.*, “Furin Cleavage Site Is Key to SARS-CoV-2 Pathogenesis,” *bioRxiv*, p. 2020.08.26.268854, Aug. 2020, doi: 10.1101/2020.08.26.268854.
- [14] J. Lan *et al.*, “Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor,” *Nat. 2020 5817807*, vol. 581, no. 7807, pp. 215–220, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.

- [15] N. Shahhosseini, G. Wong, G. P. Kobinger, and S. Chinikar, "SARS-CoV-2 spillover transmission due to recombination event," *Gene Reports*, vol. 23, p. 101045, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.GENREP.2021.101045.
- [16] P. Forster, L. Forster, C. Renfrew, and M. Forster, "Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 17, pp. 9241–9243, Apr. 2020, doi: 10.1073/PNAS.2004999117/SUPPL_FILE/PNAS.2004999117.SD01.XLSX.
- [17] A. Rambaut *et al.*, "A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology," *Nat. Microbiol.* 2020 511, vol. 5, no. 11, pp. 1403–1407, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0770-5.
- [18] S. Piplani, P. K. Singh, D. A. Winkler, and N. Petrovsky, "In silico comparison of SARS-CoV-2 spike protein-ACE2 binding affinities across species and implications for virus origin," *Sci. Reports* 2021 111, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-92388-5.
- [19] "SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions."
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
(accessed Apr. 12, 2023).
- [20] J. Wise, "Covid-19: New coronavirus variant is identified in UK," *BMJ*, vol. 371, p. m4857, Dec. 2020, doi: 10.1136/BMJ.M4857.
- [21] F. Campbell *et al.*, "Increased transmissibility and global spread of SARSCoV- 2 variants of concern as at June 2021," *Eurosurveillance*, vol. 26, no. 24, pp. 1–6, Jun. 2021, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509/CITE/PLAINTEXT.

- [22] Q. Ma *et al.*, "Global Percentage of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infections Among the Tested Population and Individuals With Confirmed COVID-19 Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis," *JAMA Netw. Open*, vol. 4, no. 12, pp. e2137257–e2137257, Dec. 2021, doi: 10.1001/JAMANETWORKOPEN.2021.37257.
- [23] R. Flisiak *et al.*, "Management of SARS-CoV-2 infection: recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of April 26, 2021," *Polish Arch. Intern. Med.*, vol. 131, no. 5, pp. 48–496, May 2021, doi: 10.20452/PAMW.15979.
- [24] R. Flisiak *et al.*, "Tocilizumab Improves the Prognosis of COVID-19 in Patients with High IL-6," *J. Clin. Med.*, vol. 10, no. 8, Apr. 2021, doi: 10.3390/JCM10081583.
- [25] O. Abani *et al.*, "Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial," *Lancet*, vol. 397, no. 10285, pp. 1637–1645, May 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(21)00676-0/ATTACHMENT/7079F7FB-CB08-4ACC-87C0-D40759EB5CF0/MMC1.PDF.
- [26] D. Zarębska-Michaluk *et al.*, "<p>Effectiveness of Tocilizumab with and without Dexamethasone in Patients with Severe COVID-19: A Retrospective Study</p>," *J. Inflamm. Res.*, vol. 14, pp. 3359–3366, Jul. 2021, doi: 10.2147/JIR.S322645.
- [27] B. Long *et al.*, "Clinical update on COVID-19 for the emergency and critical care clinician: Medical management," *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 56, pp. 158–170, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.AJEM.2022.03.036.
- [28] L. Yang *et al.*, "COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics," *Signal Transduct. Target. Ther. 2020 51*, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, Jul. 2020, doi:

10.1038/s41392-020-00243-2.

- [29] “Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1 - PubMed.” <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8442093/> (accessed Apr. 12, 2023).
- [30] J. R. Tisoncik, M. J. Korth, C. P. Simmons, J. Farrar, T. R. Martin, and M. G. Katze, “Into the Eye of the Cytokine Storm,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 76, no. 1, p. 16, Mar. 2012, doi: 10.1128/MMBR.05015-11.
- [31] Q. Liu, Y. H. Zhou, and Z. Q. Yang, “The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 13, no. 1, p. 3, Jan. 2016, doi: 10.1038/CMI.2015.74.
- [32] P. Song, W. Li, J. Xie, Y. Hou, and C. You, “Cytokine storm induced by SARS-CoV-2,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 509, p. 280, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.CCA.2020.06.017.
- [33] N. Mangalmurti and C. A. Hunter, “Cytokine Storms: Understanding COVID-19,” *Immunity*, vol. 53, no. 1, pp. 19–25, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2020.06.017.
- [34] J. P. Hussman, “Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, Jul. 2020, doi: 10.3389/FPHAR.2020.01169.
- [35] J. Gómez-Rial *et al.*, “Increased Serum Levels of sCD14 and sCD163 Indicate a Preponderant Role for Monocytes in COVID-19 Immunopathology,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 2436, Sep. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.560381/BIBTEX.
- [36] N. Moradian *et al.*, “Cytokine release syndrome: inhibition of pro-inflammatory cytokines as a solution for reducing COVID-19 Śmiertelność,” doi: 10.1684/ecn.2020.0451.

- [37] “Zalecenia dotyczące postępowania w zakażeniach SARS-CoV-2 Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych z 23 lutego 2022 roku - Lek przeciwwirusowy - COVID-19 - Medycyna Praktyczna dla lekarzy.”
<https://www.mp.pl/covid19/lekm/293053,zalecenia-dotyczace-postepowania-w-zakazeniach-sars-cov-2-polskiego-towarzystwa-epidemiologow-i-lekarzy-chorob-zakaznych-z-23-lutego-2022-roku> (accessed Oct. 09, 2022).
- [38] “Implications of Viral Resistance to Amantadine in Control of Influenza A on JSTOR.”
<https://www.jstor.org/stable/4456601> (accessed Mar. 20, 2022).
- [39] G. Hubsher, M. Haider, and M. S. Okun, “Amantadine,” *Neurology*, vol. 78, no. 14, pp. 1096–1099, Apr. 2012, doi: 10.1212/WNL.0B013E31824E8F0D.
- [40] “Influenza Antiviral Drug Resistance | CDC.”
<https://www.cdc.gov/flu/treatment/antiviralresistance.htm> (accessed May 22, 2022).
- [41] T. Gualtieri, M. Chandler, T. B. Coons, and L. T. Brown, “Amantadine: a new clinical profile for traumatic brain injury,” *Clin. Neuropharmacol.*, vol. 12, no. 4, pp. 258–270, 1989, doi: 10.1097/00002826-198908000-00003.
- [42] M. Peeters, P. Romieu, T. Maurice, T. P. Su, J. M. Maloteaux, and E. Hermans, “Involvement of the sigma1 receptor in the modulation of dopaminergic transmission by amantadine,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 19, no. 8, pp. 2212–2220, Apr. 2004, doi: 10.1111/J.0953-816X.2004.03297.X.
- [43] J. C. Stoof, J. Booij, and B. Drukarch, “Amantadine as N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist: new possibilities for therapeutic applications?,” *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 94 Suppl, no. SUPPL., pp. 4–6, 1992, doi: 10.1016/0303-

8467(92)90006-O.

- [44] M. W. Geisler, M. Sliwinski, P. K. Coyle, D. M. Masur, C. Doscher, and L. B. Krupp, "The Effects of Amantadine and Pemoline on Cognitive Functioning in Multiple Sclerosis," *Arch. Neurol.*, vol. 53, no. 2, pp. 185–188, Feb. 1996, doi: 10.1001/ARCHNEUR.1996.00550020101021.
- [45] M. F. Kraus *et al.*, "Effects of the dopaminergic agent and NMDA receptor antagonist amantadine on cognitive function, cerebral glucose metabolism and D2 receptor availability in chronic traumatic brain injury: A study using positron emission tomography (PET)," <https://doi.org/10.1080/02699050400025059>, vol. 19, no. 7, pp. 471–479, 2009, doi: 10.1080/02699050400025059.
- [46] S. Stelmaschuk, M. C. Will, and T. Meyers, "Amantadine to treat cognitive dysfunction in moderate to severe traumatic brain injury," *J. Trauma Nurs.*, vol. 22, no. 4, pp. 194–203, Jul. 2015, doi: 10.1097/JTN.0000000000000138.
- [47] F. J. Jiménez-Jiménez, H. Alonso-Navarro, E. García-Martín, and J. A. G. Agúndez, "Anti-Inflammatory Effects of Amantadine and Memantine: Possible Therapeutics for the Treatment of Covid-19?," *J. Pers. Med.*, vol. 10, no. 4, pp. 1–15, Nov. 2020, doi: 10.3390/JPM10040217.
- [48] H. Ghalaenovi *et al.*, "The effects of amantadine on traumatic brain injury outcome: a double-blind, randomized, controlled, clinical trial," <https://doi.org/10.1080/02699052.2018.1476733>, vol. 32, no. 8, pp. 1050–1055, Jul. 2018, doi: 10.1080/02699052.2018.1476733.
- [49] J. T. Giacino *et al.*, "Placebo-Controlled Trial of Amantadine for Severe Traumatic

- Brain Injury,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 9, pp. 819–826, Mar. 2012, doi: 10.1056/NEJMOA1102609/SUPPL_FILE/NEJMOA1102609_DISCLOSURES.PDF.
- [50] J. Li *et al.*, “Early amantadine treatment reduces the risk of death in patients with large hemisphere infarctions:a Chinese hospital-based study,” *BMC Neurol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12883-021-02444-W/FIGURES/2.
- [51] A. M. Leclerc *et al.*, “Amantadine and Modafinil as Neurostimulants Following Acute Stroke: A Retrospective Study of Intensive Care Unit Patients,” *Neurocrit. Care*, vol. 34, no. 1, pp. 102–111, Feb. 2021, doi: 10.1007/S12028-020-00986-4/FIGURES/3.
- [52] R. Flisiak *et al.*, “Management of SARS-CoV-2 infection: recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of March 31, 2020,” *Polish Arch. Intern. Med.*, vol. 130, no. 4, pp. 352–357, Apr. 2020, doi: 10.20452/PAMW.15270.
- [53] C. Jalaber, T. Lapotre, T. Morcet-Delattre, F. Ribet, S. Jouneau, and M. Lederlin, “Chest CT in COVID-19 pneumonia: A review of current knowledge,” *Diagn. Interv. Imaging*, vol. 101, no. 7–8, pp. 431–437, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.DIII.2020.06.001.

14. Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach

14.1 Tytuł oryginału: Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału
Chober Daniel	Konceptualizacja, metodologia, pozyskiwanie i analiza danych, nadzór nad badaniem, zredagowanie i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji
Aksak-Wąs Bogusz	Pozyskiwanie danych
Bobrek-Lesiakowska Katarzyna	Pozyskiwanie danych
Budny-Finster Anna	Pozyskiwanie danych
Hołda Ewa	Pozyskiwanie danych
Mieżyńska-Kurtycz Joanna	Pozyskiwanie danych
Jamro Grzegorz	Pozyskiwanie danych
Parczewski Miłosz	Konceptualizacja, nadzór na badaniem, zredagowanie i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji

14.2. Tytuł oryginału: Tocilizumab use among patients who developed pulmonary embolism in the course of cytokine release storm and COVID-19 pneumonia - a retrospective study.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału
Chober Daniel	Konceptualizacja, metodologia, pozyskiwanie i analiza danych, nadzór nad badaniem, zredagowanie i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji
Aksak-Wąs Bogusz	Pozyskiwanie danych
Niścigorska-Olsen Jolanta	Pozyskiwanie danych
Niekrasz Małgorzata	Pozyskiwanie danych
Parczewski Miłosz	Konceptualizacja, nadzór na badaniem, zredagowanie i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji

14.3. Tytuł oryginału: Improved survival in ICU in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału
Chober Daniel	Konceptualizacja, metodologia, pozyskiwanie i analiza danych, nadzór nad badaniem, zredagowanie i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji
Czajkowski Zenon	Konceptualizacja, metodologia, pozyskiwanie danych, nadzór nad badaniem, zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji
Aksak-Wąs Bogusz	Pozyskiwanie danych
Dalewska-Kucharczyk Katarzyna	Pozyskiwanie danych
Hołubczak Katarzyna	Pozyskiwanie danych
Karasińska-Milchert Sylwia	Pozyskiwanie danych
Jaremko Mateusz	Pozyskiwanie danych
Skowron Miłosz	Pozyskiwanie danych
Karasińska-Cieślak Malwina	Pozyskiwanie danych
Parczewski Miłosz	Konceptualizacja, nadzór na badaniem, zredagowanie i zatwierdzenie ostatecznej wersji publikacji

Szczecin 16.04.2023

Prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski

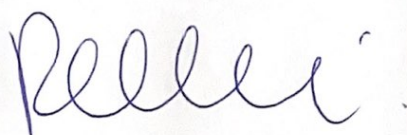
Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i NNI

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Oświadczenie współautora

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Daniela Chobera publikacji „Effectiveness of tocilizumab in patients with severe or critical lung involvement in COVID-19: a retrospective study.” w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

KIEROWNIK
Kliniki Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski



Szczecin 16.04.2023

Prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski

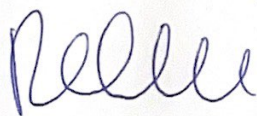
Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i NNI

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Oświadczenie współautora

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Daniela Chobera publikacji „Tocilizumab use among patients who developed pulmonary embolism in the course of cytokine release storm and COVID-19 pneumonia - a retrospective study.” w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

KIEROWNIK
Kliniki Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski



Szczecin 16.04.2023

Prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski

Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i NNI

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Oświadczenie współautora

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Daniela Chobera publikacji „Improved survival in ICU in severe COVID-19 associated with amantadine use - retrospective study.” w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

KIEROWNIK
Kliniki Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski

