

АНОТАЦІЯ

Серякова І.Ю. Клініко-лабораторні маркери ураження нервової системи при COVID-19 у дітей. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії (PhD) з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 228 «Педіатрія». – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, Київ, 2024.

Зміст анотації

Дана дисертаційна робота присвячена проблемі розвитку ураження нервової системи у дітей при коронавірусній інфекції (COVID-19). Медико-соціальна значущість проблеми підкреслюється поширеністю COVID-19 та її ускладненнями з боку різних органів та систем. Ураження нервової системи при COVID-19 займає провідне місце в структурі ускладненого перебігу у дорослих та дітей. Зважаючи на тривалий перебіг пандемії та розвиток численних ускладнень внаслідок COVID-19, впровадження діагностичних підходів є нагальним для своєчасного виявлення ймовірних уражень з боку нервової системи.

Метою даної роботи є підвищення ефективності діагностики ураження нервової системи і ускладненого перебігу при коронавірусній інфекції у дітей на підставі дослідження біомаркерів та аналізу клінічних показників.

Завдання дослідження:

1. Вивчити особливості клінічної картини коронавірусної інфекції у дітей.
2. Визначити ускладнення з боку нервової системи при COVID-19.
3. Провести дослідження рівня нейробіомаркерів (нейрон-специфічної енолази (NSE), протеїну S100) та маркеру пошкодження ендотелію судин (Е-селектину) в сироватці крові дітей хворих на коронавірусну інфекцію.
4. Дослідити прогностичне значення рівня біомаркерів щодо ускладненого перебігу захворювання та розвитку симптомів ураження нервової системи у дітей з COVID-19.
5. Оцінити роль ендотелію в структурі ураження нервової системи у дітей з COVID-19 шляхом визначення зв'язку Е-селектину з маркерами ураження нервової системи (NSE та S100).

В цілому, до дослідження було залучено 945 дітей віком від 1 місяця до 18 років з лабораторно підтвердженим діагнозом COVID-19 методом ПЛР, які проходили стаціонарне лікування в КНП «Київська міська дитяча клінічна інфекційна лікарня» (КНП «КМДКІЛ»), м. Київ, Україна. Серед них, для проведення когортного, обсерваційного дослідження, у 88 пацієнтів в комплексі загально-клінічних обстежень в сироватці крові визначався рівень маркерів NSE, S100 та E-селектину. Інформована згода батьків та дітей була отримана. Дизайн даного дослідження був схвалений комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень при Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця.

Застосовувались наступні методи дослідження: клінічні (анамнестичний, аналіз медичної документації, клінічне обстеження); лабораторні (загальний аналіз крові, біохімічний, бактеріологічний, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція), інструментальні (рентгенографія грудної клітки), статистичні методи для обробки отриманих результатів (статистичний пакет «Statistical software EZR v. 1.54»).

Ми ретроспективно дослідили 945 випадків лабораторно підтвердженого COVID-19 у дітей з метою детального вивчення особливостей клінічної картини та структури ускладнень. Діти були госпіталізовані в період з червня 2020 року по лютий 2022 року. За час спостереження пандемії були виділені наступні періоди: 1 хвиля - з червня по листопад 2020 року (340 випадків); 2 хвиля - з лютого по травень 2021 року (191 випадок); 3 хвиля - період серпень - грудень 2021 року (334 випадки); 4 хвиля – січень - лютий 2022 року (80 випадків), які супроводжувались зростанням кількості випадків захворювання і асоціювалися з циркуляцією певних штамів коронавірусу. В якості результуючих змінних при проведенні інтервальної оцінки частоти прояву клінічних симптомів у дітей протягом 4 хвиля ми використали позначення W1 для першої хвилі, W2- для другої, W3- для третьої та W4 для періоду четвертої хвилі.

Аналізуючи 4 хвилі перебігу COVID-19, період третьої хвилі захворюваності видався найтяжчим, з точки зору частоти ускладнених випадків,

супутньої патології, клінічної симптоматики та рівня летальності. Ця хвиля відбувалась на тлі циркуляції варіанту дельта SARS-CoV2 і асоціювалась зі значним підвищенням показників госпіталізації в Україні. Щодо вікової структури, порівнюючи з попередніми хвилями, під час 4-ї хвилі істотно зменшилась частка дітей підліткового віку, (7,5% проти 24,7% під час 1-ї; 15,8%-2-ї та 14,7% 3-ї хвиль), $p < 0,05$ та зросла частота пацієнтів в віці від 1 до 12 місяці (50% під час 4-ї хвилі проти 25%, 21,6% та 21,8% попередніх спалахів), $p < 0,05$.

При вивченні клінічної картини хворих на COVID-19 протягом чотирьох хвиль, встановлено прогресивне збільшення загальноінтоксикаційних симптомів та виявлена достовірна відмінність цих симптомів під час 1 хвилі в порівнянні з іншими ($p < 0,05$). Спостерігалось також збільшення частоти симптомів ураження верхніх дихальних шляхів, виявлена достовірна відмінність риніту під час 1 хвилі в порівнянні з трьома іншими хвилями ($p < 0,05$) та кашлю під час 1 хвилі в порівнянні з 3 та 4 хвилями ($p < 0,05$). Також спостерігалось поступове зростання частоти гастроінтестинальних проявів у дітей протягом 4 хвиль. Виявлена статистично значима відмінність частоти прояву діареї під час 1 хвилі в порівнянні з 3 та 4 хвилями ($p < 0,05$) та між 2 та 4 хвилями ($p < 0,05$), а також болю в животі між 1 хвилею в порівнянні з 3 та 4 хвилями ($p < 0,05$).

При інтервальній оцінці частоти прояву таких симптомів як лихоманка, слабкість, зниження апетиту та риніт, методом множинних порівнянь виявлено статистично значиму відмінність між групами: W1-W2; W1-W3; та W1-W4. Під час першої хвилі спостерігалась достовірно нижча частота прояву даних симптомів, в порівнянні з наступними хвилями, $p < 0,001$. Протягом 4 хвиль спостерігалось підвищення частоти прояву діареї, $p < 0,05$ та болю в животі, $p < 0,05$ в динаміці. Найбільша частота головного болю спостерігалась під час W2 та W3 – 33,7% та 31,9% відповідно. Статистично значима відмінність виявлена між групами: W1-W2 на рівні значимості $p = 0,003$ та W1-W3 на рівні значимості $p < 0,001$. При інтервальній оцінці частоти кашлю спостерігали статистично значиме зменшення частоти під час W2 (54,7%) в порівнянні з W3 (81,6%) та W4 (80%), $p < 0,001$. Також виявлена відмінність на рівні значимості $p < 0,001$ між хвилями W1-W3. Була виявлена статистично значима відмінність

частоти прояву задишки, $p=0,009$ для W3 в порівнянні з W1 та болю в горлі, $p=0,027$ для W3 в порівнянні з іншими спалахами.

Аналізуючи кількість та частоту ускладнених випадків COVID-19 серед госпіталізованих педіатричних пацієнтів, ми відмітили, що за цими характеристиками домінувала третя хвиля захворювання ($p<0,05$), під час якої спостерігалось 79 (23,7%) випадків, проти 7 (2,06%) з першої ($p<0,05$), 19 (9,9%) другої та 9 (11,3%) четвертої хвилі ($p<0,05$).

Ускладнення були представлені дихальною недостатністю 1-2 ступеня, тромбозом правої внутрішньої яремної вени, мультисистемним запальним синдромом. Серед зазначених станів превалювала дихальна недостатність на рівні 1-2 ступеню, частота якої була максимальною саме під час третьої хвилі (21,8% проти 1,2%, 8,4% та 8,75% інших спалахів, $p<0,05$).

У пацієнтів з COVID-19, які були під нашим спостереженням, ми провели оцінку результатів лабораторних та інструментальних досліджень. Ми встановили, що найвищі показники рівня прокальцитоніну спостерігались у пацієнтів під час 4 хвилі (медіана 0,242; МКІ 0,22-0,721), в порівнянні з попередніми трьома хвилями захворювання (W3 - медіана 0,1 (МКІ 0,066-0,206), W2 - медіана 0,053 (МКІ 0,036-0,067) та W1 - медіана 0,041 (МКІ 0,027-0,064), $p<0,05$. Найвищі показники Д-димеру ми відмічали у хворих під час другої хвилі захворювання (медіана 7,75; МКІ 2,95-9,6) в порівнянні з 3-ю та 4-ю хвилями (медіана 1,76; МКІ 0,74-5,25) та (медіана 2,32; МКІ 0,96-4) відповідно, $p<0,05$.

За результатами інструментальних обстежень, рентгенологічні зміни при дослідженні органів грудної клітки були виявлені у 289 (85%) пацієнтів під час першої хвилі, 156 (81,7%) - другої, 209 (64%) - третьої та 44 (55%) - четвертої хвилі. Для оцінки частоти рентгенологічних змін використали метод кутового перетворення Фішера та аналіз таблиць спряженості. При перших двох хвилях частота рентгенологічних змін була вищою в порівнянні з 3 та 4 хвилями ($p<0,001$).

Оскільки третя хвиля захворюваності COVID-19, що асоціювалась з поширенням варіанту Дельта, характеризувалась тяжчим перебігом, вищою частотою ускладнених випадків ($p<0,001$), та більшою часткою пацієнтів з

супутньою патологією ($p=0,0005$), ми вирішили провести оцінку залежності ускладненого перебігу коронавірусної інфекції у дітей від хвили захворюваності, порівнюючи 3 хвилю з двома попередніми хвилями COVID-19. Ми використали метод побудови моделей логістичної регресії і в якості результуючої змінної прогнозували період третьої хвилі, змінна «Wave»: $W=1$ (331 хворий, 3 хвиля), $W=0$ (530 пацієнти, 1,2 хвилі). Аналіз проводився для 14 факторів ризику: вік, стать, перебіг коронавірусної інфекції (бронхіт, пневмонія, гостра інфекція дихальних шляхів), наявність фонові/хронічної патології, неврологічні ускладнення, день захворювання, кількість ліжко днів, судоми, СРБ, прокальцитонін, Д-димер, креатинін, ПТІ, рентгенологічні зміни. Спочатку з використанням методу побудови однофакторних моделей логістичної регресії ми проаналізували кожен факторну ознаку, визначили коефіцієнти прогнозування залежності перебігу коронавірусної інфекції у дітей від хвили захворювання, рівень значимості відмінності коефіцієнту моделі від 0 та показник відношення шансів, (95% ДІ).

На другому етапі аналізу, з використанням методу побудови багатофакторних моделей логістичної регресії, було проведено відбір ознак значимо пов'язаних з даною хвилею захворюваності на COVID-19. Для виділення мінімального набору значимих ознак використано критерій АІС. Було виділено 4 значимих ознаки: перебіг, рівень Д-димеру, прокальцитонін та рентгенологічні зміни та побудовано багатофакторну модель прогнозування зв'язку наведених ознак з періодом 3 хвилі захворюваності, модель адекватна (χ^2 -квадрат=73,7 при 6 ступенях свободи, $p<0,0001$). За результатом проведених розрахунків, було визначено найбільш значимі взаємопов'язані фактори, що впливали на ризик виникнення ускладнень у дітей - Д-димер, прокальцитонін та рентгенологічні зміни ($AUC=0,895$ (95% ДІ 0,81–0,98)).

Для вибору оптимального порогу багатофакторної моделі прогнозування ризику ускладненого перебігу коронавірусної інфекції у дітей під час 3 хвилі ми використали метод побудови кривих операційних характеристик. Площа під кривою операційних характеристик багатофакторної моделі, $AUC=0,895$ (95% ДІ 0,81–0,98), статистично значимо ($p<0,05$) перевищує 0,5, що є свідченням

адекватності побудови моделі. Якість моделі оцінена як дуже добра, оскільки $AUC \geq 0,8$.

Наступним етапом дослідження було проведення імуноферментного аналізу з метою визначення рівня біомаркерів NSE, S100 та E-селектину в сироватці крові у 88 пацієнтів з COVID-19. Для аналізу результатів дослідження біомаркерів пацієнти були розподілені на дві групи за перебігом захворювання: основна група, до якої увійшли 42 пацієнти з ускладненим перебігом COVID-19 та контрольна група - 46 пацієнтів з неускладненим перебігом захворювання. Між пацієнтами груп дослідження суттєвої різниці за гендерною та віковою характеристикою не спостерігалось. Середній вік пацієнтів основної групи склав $5,5 \pm 1,17$ років, контрольної – $5,3 \pm 0,97$ років. Розмежування пацієнтів на підгрупи за віковим фактором не проводилось, оскільки, за даними, наявними в літературі, досліджувані біомаркери не мають суттєвої залежності від віку в дитячій популяції.

Клінічні симптоми в контрольній та основній групах були однакові та в більшості випадків значимо не відрізнялись. Загальноінтоксикаційні симптоми (лихоманка, слабкість, зниження апетиту) спостерігались у всіх пацієнтів. Достовірної різниці між групами щодо симптомів риніту, діареї, задишки та болю в животі не спостерігалось. Кашель ($p=0,009$) та симптоми з боку нервової системи, а саме головний біль ($p<0,001$), міалгія ($p=0,002$) та агевзія/аносмія ($p=0,002$) та судоми ($p=0,008$) переважали у пацієнтів основної групи в порівнянні з групою контролю.

В структурі ускладненого перебігу у дітей основної групи переважали респіраторні ускладнення, які спостерігались в 29 (69%) випадках у вигляді бактеріальних пневмоній та стенозуючого ларинготрахеїту. У 1 пацієнта був гнійний туботит (2,4%). Також ми діагностували ускладнення з боку нервової системи: енцефалопатію з судомним синдромом у 4 (9,5%) дітей та ураження I та IX пар черепно-мозкових нервів у 8 (19,1%) пацієнтів.

Для статистичного аналізу абсолютних значень рівня маркерів E-селектину, S100 та NSE в групах дослідження у пацієнтів з COVID-19 ми провели розрахунок інтервальної оцінки біомаркерів. За даними розрахунків, у пацієнтів

основної групи спостерігались достовірно вищі значення біомаркерів NSE та E-селектину, в порівнянні з контрольною групою ($p=0,04$ для NSE та $p=0,03$ для E-селектину відповідно). Достовірної різниці між значеннями біомаркеру S100 контрольної та основної груп виявлено не було $p=0,5$.

Рівень NSE, S100 та E-селектину в досліджуваних когортах варіював в широких межах. Ми припустили існування залежності між рівнем біомаркерів та ризиком появи клінічних симптомів з боку нервової системи і ускладненого перебігу. Для перевірки даної гіпотези ми використали метод побудови кривих операційних характеристик (ROC-крива). Для вибору оптимального порогового значення маркерів NSE, S100 та E-селектину використано метод розрахунку Youden Index.

У пацієнтів з неускладненим перебігом середній рівень NSE в перший день стаціонарного лікування був $12,1 \pm 1,2$ мкг/л, S100 становив $164 \pm 8,2$ нг/л та E-селектину $12,02 \pm 1,7$ нг/мл. У пацієнтів з ускладненим перебігом середні рівні біомаркерів становили відповідно: $16,9 \pm 1,5$ мкг/л, $165,9 \pm 6,9$ нг/л та $15,04 \pm 1,9$ нг/мл. За результатами побудови кривих операційних характеристик, визначено прогностичне значення маркерів щодо ризику розвитку ускладненого перебігу та виникнення симптомів з боку нервової системи при COVID-19 у дітей. Для маркеру NSE пороговими значеннями для прогнозування ризику розвитку симптомів з боку нервової системи та ускладненого перебігу є $15,626$ мкг/л (чутливість - $65,8\%$, специфічність – $81,6\%$) та $16,477$ мкг/л (чутливість - $64,3\%$, специфічність – 87%) відповідно. Для маркеру S100 прогностичними є значення $156,268$ нг/л (чутливість - $92,9\%$, специфічність – $67,4\%$) для виникнення симптомів з боку нервової системи та $176,861$ нг/л (чутливість - $81,2\%$, специфічність – $83,9\%$) для ризику розвитку ускладненого перебігу COVID-19. Для E-селектину пороговими значеннями для прогнозування ризику розвитку симптомів з боку нервової системи та ускладненого перебігу є $13,827$ нг/мл (чутливість - $73,8\%$, специфічність – $71,7\%$) та $17,616$ нг/мл (чутливість - $68,8\%$, специфічність – $71,4\%$) відповідно.

Для оцінки ролі ендотелію в структурі ураження нервової системи у дітей з COVID-19 ми вирішили провести аналіз зв'язку E-селектину з маркерами

ураження нервової системи NSE та S100 шляхом розрахунку показника лінійної кореляції Пірсона. При проведенні дослідження кореляції був виявлений лінійний кореляційний зв'язок середнього ступеня вираженості між E-селектином та маркерами NSE ($r=0,435$, $p<0,0001$) та S100 ($r=0,525$, $p<0,0001$), що свідчить про участь ендотелію в патогенезі ураження нервової системи при COVID-19 у дітей.

Наукова новизна одержаних результатів

В ході виконання роботи було вивчено особливості клінічної картини COVID-19 у дітей викликаного різними серотипами вірусу (хвилі) та досліджені клінічні особливості ураження нервової системи при COVID-19 у дітей. Вперше вивчено доцільність використання біомаркерів (нейрон-специфічної енолази, протеїну S100 та E-селектину) при коронавірусній інфекції та визначено їх прогностичне значення щодо розвитку ураження нервової системи у дітей. Вперше показаний кореляційний зв'язок між рівнем біомаркерів та тяжкістю COVID-19 у дітей і визначені їх порогові значення для прогнозу появи клінічних симптомів ураження нервової системи та ускладненого перебігу. Вперше оцінена роль ендотелію в етіопатогенезі неврологічних ускладнень в контексті коронавірусної інфекції.

Практична значимість одержаних результатів

Базуючись на даних отриманих результатів дослідження, запропоновано залучити нейрон-специфічної енолазу, протеїн S100 та E-селектин до діагностичного алгоритму ведення пацієнтів з ускладненим перебігом COVID-19.

Запропонований спосіб діагностики сприяє прогнозуванню ризику виникнення симптомів з боку нервової системи та розвитку ускладненого перебігу COVID-19 у дітей. Підвищення рівня E-селектину в сироватці крові асоціюється також з ураженням судинної стінки при бактеріальних, вірусних захворюваннях та септичному шоці, тому це дозволяє розглядати його як корисний біомаркер для прогностичного значення ускладненого перебігу інфекційних захворювань у дітей.

Результати дослідження впроваджені в роботу КНП «Київська міська дитяча клінічна інфекційна лікарня». Теоретичні положення дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі на кафедрі дитячих інфекційних хвороб Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено нове вирішення актуального завдання в дитячій інфектології, а саме підвищення ефективності діагностики ураження з боку нервової системи при COVID-19 у дітей на підставі дослідження біомаркерів та аналізу клінічних показників.

1. При проведенні аналізу клінічної картини хворих на COVID-19 протягом чотирьох хвиль, встановлено прогресивне збільшення загальноінтоксикаційних симптомів ($p < 0,05$), симптомів ураження верхніх дихальних шляхів ($p < 0,05$) та поступове зростання частоти гастроінтестинальних проявів - діареї та болю в животі у дітей протягом 4 хвиль ($p < 0,05$).
2. Третя хвиля захворюваності COVID-19, що асоціювалась з поширенням варіанту Дельта, характеризувалась тяжчим перебігом та вищою частотою ускладнених випадків ($p < 0,05$).
3. Найбільш значимі фактори для прогнозування ризику виникнення ускладненого перебігу коронавірусної інфекції у дітей - Д-димер, прокальцитонін та рентгенологічні зміни ($AUC = 0,895$ (95% ДІ 0,81–0,98)).
4. Ускладнення з боку нервової системи при COVID-19 включали енцефалопатію з судомним синдромом та ураження I та IX пар черепно-мозкових нервів.
5. Встановлено прогностичне значення E-селектину, NSE та S100 у дітей з COVID-19 щодо ускладненого перебігу і симптомів ураження нервової системи.
6. Порогове значення E-селектину для прогнозування ризику виникнення симптомів з боку нервової системи при COVID-19 становить 13,827 нг/мл (чутливість – 73,8%, специфічність – 71,7%); для прогнозування ризику

розвитку ускладненого перебігу – 17,616 нг/мл (чутливість – 68,8%, специфічність – 71,4%), $p < 0,05$.

7. Порогове значення NSE для прогнозування ризику виникнення симптомів з боку нервової системи при COVID-19 становить 15,626 мкг/л (чутливість – 65,8%, специфічність – 81,6%); для прогнозування ризику розвитку ускладненого перебігу – 16,477 мкг/л (чутливість – 64,3%, специфічність – 87%), $p < 0,05$.
8. Порогове значення S100 для прогнозування ризику виникнення симптомів з боку нервової системи при COVID-19 становить 156,268 нг/л (чутливість – 92,9%, специфічність – 67,4%); для прогнозування ризику розвитку ускладненого перебігу – 176,861 нг/л (чутливість – 81,2%, специфічність – 83,9%), $p < 0,05$.
9. Виявлений зв'язок E-селектину з маркерами NSE ($r=0,435$, $p < 0,0001$) та S100 ($r=0,525$, $p < 0,0001$) свідчить про участь ендотелію в патогенезі ураження нервової системи при COVID-19 у дітей.

Ключові слова: COVID-19, коронавірусна інфекція, коронавірусна хвороба, SARS-CoV-2, біомаркер, нейромаркер, NSE, S100, E-селектин, MIS-C, діти, пандемія, нервова система, діагностика, лабораторно-інструментальна діагностика.

ABSTRACT

Seriakova I.Yu. Clinical and laboratory markers of to the nervous system damage in children with COVID-19. – The qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

The thesis is submitted as a qualification paper for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of study 22 "Health", with a specialty of 228 "Pediatrics". - Bogomolets National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, 2024.

Abstract content

This dissertation is devoted to the problem of the development of the nervous system damage in children with coronavirus infection (COVID-19). The medical and social significance of the problem is emphasized by the prevalence of COVID-19 and its various organs` and systems` complications. Damage to the nervous system because of COVID-19 occupies a leading place in the structure of the complicated course in adults and children. Considering the long course of the pandemic and the development of numerous complications due to COVID-19, the implementation of diagnostic approaches is urgent for the timely detection of probable lesions of the nervous system.

The purpose of the research is to increase the effectiveness of diagnosis of nervous system damage and complicated course of coronavirus infection in children based on the study of biomarkers and analysis of the clinical indicators.

The objectives of the research are the follows:

1. To study the peculiarities of the clinical picture of coronavirus infection in children.
2. To determine complications of the nervous system due to COVID-19.
3. To conduct the research on the level of neurobiomarkers (neuron-specific enolase (NSE), S100 protein) and a marker of vascular endothelium damage (E-selectin) in the blood serum of children with coronavirus infection.
4. To investigate the prognostic value of the level of biomarkers regarding the complicated course of the disease and development of the symptoms of nervous system damage in children with COVID-19.
5. To assess the role of the endothelium in the structure of nervous system damage in children with COVID-19 by determining the relationship of E-selectin with markers of nervous system damage (NSE and S100).

In general, the study included 945 children aged 1 month to 18 years with a laboratory-confirmed diagnosis of COVID-19 by the PCR method who underwent inpatient treatment at the "Kyiv city children's clinical infectious disease hospital" in Kyiv, Ukraine. Among them, to conduct a cohort, observational, retrospective study, we determined the level of NSE, S100 and E-selectin markers in 88 patients in a complex of general clinical examinations in blood serum. Informed consent of parents and children was obtained. The design of this study was approved by the Commission

on Bioethical Expertise and Scientific Research Ethics of Bogomolets National Medical University.

The following research methods were used: clinical (amnestic, analysis of medical documentation, clinical examination); laboratory (general blood count, biochemical, bacteriological, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction), instrumental (chest radiography), statistical methods for processing the obtained results (statistical package "Statistical software EZR v. 1.54").

We retrospectively studied 945 cases of laboratory-confirmed COVID-19 in children to study in detail the features of the clinical picture and the structure of complications. Children were hospitalized in the period from June 2020 to February 2022. During the monitoring of the pandemic, the following periods were selected: 1st wave - from June to November 2020 (340 cases); 2nd wave - from February to May 2021 (191 cases); 3rd wave - the period August - December 2021 (334 cases); 4th wave - January - February 2022 (80 cases), which were accompanied by an increase in the number of cases of the disease and were associated with the circulation of certain strains of the coronavirus. As the resulting variables when conducting an interval assessment of the frequency of clinical symptoms in children during 4 waves, we used the designation W1 for the first wave, W2- for the second, W3- for the third and W4 for the period of the fourth wave.

Analyzing the 4 waves of the course of COVID-19, the period of the third wave of the disease appeared to be the most severe, in terms of the frequency of complicated cases, concomitant pathology, clinical symptoms and mortality rate. This wave occurred against the background of the circulation of the SARS-CoV2 delta variant and was associated with a significant increase in hospitalization rates in Ukraine. As for the age structure, compared to the previous waves, during the 4th wave the share of children of teenage age significantly decreased (7,5% against 24,7% during the 1st; 15,8% - the 2nd and 14,7 % of 3rd waves), $p < 0,05$ and an increased frequency of patients aged 1 to 12 months (50% during the 4th wave against 25%, 21,6% and 21,8% of previous outbreaks), $p < 0,05$.

When studying the clinical picture of patients with COVID-19 during four waves, a progressive increase in general intoxication symptoms was established, and a

significant difference between these symptoms was found during the 1st wave compared to the others ($p < 0,05$). There was also an increase in the frequency of upper respiratory tract symptoms, a significant difference was found in rhinitis during wave 1 compared to the other three waves ($p < 0,05$) and cough during wave 1 compared to waves 3 and 4 ($p < 0,05$). A gradual increase in the frequency of gastrointestinal manifestations in children was also observed during 4 waves. A statistically significant difference in the frequency of diarrhea during 1 wave compared to 3 and 4 waves ($p < 0,05$) and between 2 and 4 waves ($p < 0,05$), as well as abdominal pain between 1 wave compared to 3 and 4 waves ($p < 0,05$).

During the interval evaluation of the frequency of symptoms such as fever, weakness, decreased appetite and rhinitis, a statistically significant difference between the groups was revealed by the method of multiple comparisons: W1-W2; W1-W3; and W1-W4. During the first wave, a significantly lower frequency of these symptoms was observed, compared to subsequent waves, $p < 0,001$. During 4 waves, there was an increase in the frequency of diarrhea, $p < 0,05$ and abdominal pain, $p < 0,05$ in dynamics. The highest frequency of headache was observed during W2 and W3 – 33,7% and 31,9%, respectively. A statistically significant difference was found between groups: W1-W2 at the level of significance $p = 0,003$ and W1-W3 at the level of significance $p < 0,001$. At interval assessment of cough frequency, a statistically significant decrease in frequency was observed during W2 (54,7%) compared to W3 (81,6%) and W4 (80%), $p < 0,001$. A difference at the significance level of $p < 0,001$ was also found between waves W1-W3. A statistically significant difference was found in the frequency of dyspnea, $p = 0,009$ for W3 compared to W1 and sore throat, $p = 0,027$ for W3 compared to other outbreaks.

Analyzing the number and frequency of complicated cases of COVID-19 among hospitalized pediatric patients, we noted that these characteristics were dominated by the third wave of the disease ($p < 0,05$), during which 79 (23,7%) cases were observed, against 7 (2,06%) from the first ($p < 0,05$), 19 (9,9%) from the second and 9 (11,3%) from the fourth wave ($p < 0,05$).

Complications were represented by respiratory failure of the 1st-2nd degree, thrombosis of the right internal jugular vein, multisystem inflammatory syndrome.

Among the mentioned conditions, respiratory insufficiency at the level of 1-2 degree prevailed, the frequency of which was maximum during the third wave (21,8% against 1,2%, 8,4% and 8,75% of other outbreaks, $p < 0,05$).

In patients with COVID-19 who were under our observation, we evaluated the results of laboratory and instrumental studies. We found that the highest levels of procalcitonin were observed in patients during the 4th wave (median 0,242; IQR 0,22-0,721), in comparison with the previous three waves of the disease (W3 - median 0,1 (IQR 0,066-0,206), W2 - median 0,053 (IQR 0,036-0,067) and W1 - median 0,041 (IQR 0,027-0,064), $p < 0,05$. We noted the highest levels of D-dimer in patients during the second wave of the disease (median 7,75; IQR 2,95 -9,6) in comparison with the 3rd and 4th waves (median 1,76; IQR 0,74-5,25) and (median 2,32; IQR 0,96-4) respectively, $p < 0,05$.

According to the results of instrumental examinations, radiological changes during the examination of the chest organs were detected in 289 (85%) patients during the first wave, 156 (81,7%) - the second, 209 (64%) - the third, and 44 (55%) - fourth wave. To estimate the frequency of radiological changes, the method of Fisher's angular transformation and the analysis of conjugation tables were used. In the first two waves, the frequency of radiological changes was higher in comparison with the 3rd and 4th waves ($p < 0,001$).

Since the third wave of the incidence of COVID-19, which was associated with the spread of the Delta variant, was characterized by a more severe course, a higher frequency of complicated cases ($p < 0.001$), and a larger proportion of patients with concomitant pathology ($p = 0.0005$), we decided to evaluate the dependence of the complicated the course of the coronavirus infection in children from the wave of morbidity, comparing the 3rd wave with the two previous waves of COVID-19. We used the method of constructing logistic regression models and predicted the period of the third wave as the resulting variable, the "Wave" variable: W=1 (331 patients, 3 waves), W=0 (530 patients, 1,2 waves). The analysis was carried out for 14 risk factors: age, gender, course of coronavirus infection (bronchitis, pneumonia, acute respiratory tract infection), presence of background/chronic pathology, neurological complications, day of illness, number of bed days, convulsions, CRP, procalcitonin, D-

dimer, creatinine, PTI, radiological changes. First, using the method of building one-factor logistic regression models, we analyzed each factor characteristic, determined the coefficients of predicting the dependence of the course of the coronavirus infection in children on the wave of the disease, the level of significance of the difference of the coefficient of the model from 0 and the indicator of the odds ratio (95% CI).

At the second stage of the analysis, using the method of building multivariate logistic regression models, the selection of signs significantly associated with this wave of the incidence of COVID-19 was carried out. The AIC criterion was used to select the minimum set of significant features. We singled out 4 significant signs: course, D-dimer level, procalcitonin and radiological changes, and constructed a multivariate model for predicting the relationship of the given signs with the period of the 3rd wave of morbidity, the model is adequate (Chi-square = 73,7 with 6 degrees of freedom, $p < 0,0001$). According to the results of the calculations, the most significant interrelated factors affecting the risk of complications in children were determined - D-dimer, procalcitonin and radiological changes (AUC= 0.895 (95% CI 0.81–0.98)).

To choose the optimal threshold of the multifactorial model for predicting the risk of manifestations of coronavirus infection in children during the 3rd wave, we used the method of constructing operating characteristic curves. The area under the curve of the operational characteristics of the multifactor model, AUC= 0,895 (95% CI 0,81–0,98), is statistically significantly ($p < 0,05$) greater than 0,5, which is evidence of the adequacy of the model construction. The quality of the model is rated as very good, as $AUC \geq 0,8$.

The next stage of the study was to perform an enzyme-linked immunosorbent assay to determine the level of NSE, S100 and E-selectin biomarkers in the blood serum of 88 patients with COVID-19. To analyze the results of the biomarker study, patients were divided into two groups according to the course of the disease: the main group, which included 42 patients with a complicated course of COVID-19, and a control group - 46 patients with an uncomplicated course of the disease. There was no significant difference in gender and age between the patients of the study groups. The average age of patients in the main group was $5,5 \pm 1,17$ years, the control group was $5,3 \pm 0,97$ years. Patients were not divided into subgroups based on the age factor, since,

according to the data available in the literature, the investigated biomarkers do not have a significant dependence on age in the pediatric population.

Clinical symptoms in the control and main groups were the same and, in most cases, did not differ significantly. General intoxication symptoms (fever, weakness, decreased appetite) were observed in all patients. There was no significant difference between the groups regarding the symptoms of rhinitis, diarrhea, shortness of breath, and abdominal pain. Cough ($p=0,009$) and nervous system symptoms, such as headache ($p<0,001$), myalgia ($p=0,002$) and ageusia/anosmia ($p=0,002$) and convulsions ($p=0,008$) were more prevalent in patients in the main group compared to the control group.

In the structure of the complicated course in the children of the main group, respiratory complications prevailed, observed in 29 (69%) cases in the form of bacterial pneumonia and stenotic laryngotracheitis. One patient had purulent tubotitis (2,4%). We also diagnosed the nervous system damage: encephalopathy with convulsive syndrome in 4 (9,5%) children and damage to I and IX pairs of cranial nerves in 8 (19,1%) patients.

For the statistical analysis of the absolute values of the level of E-selectin, S100 and NSE markers in the study groups in patients with COVID-19, we calculated the interval assessment of biomarkers. According to the calculations, significantly higher values of NSE and E-selectin biomarkers were observed in patients of the main group, compared to the control group ($p=0,04$ for NSE and $p=0,03$ for E-selectin, respectively). No significant difference was found between the S100 biomarker values of the control and main groups ($p=0,5$).

The level of NSE, S100 and E-selectin in the studied cohorts varied widely. We assumed the existence of a relationship between the level of biomarkers and the risk of clinical symptoms from the nervous system and a complicated course. To test this hypothesis, we used the method of constructing operating characteristic curves (ROC curve). The Youden Index calculation method was used to select the optimal threshold value for NSE, S100 and E-selectin markers.

In patients with an uncomplicated course, the average level of NSE on the first day of inpatient treatment was $12,1\pm 1,2$ $\mu\text{g/l}$, S100 - $164\pm 8,2$ ng/l , E-selectin 12,

02±1,7 ng/ml. In patients with a complicated course, the average levels of biomarkers were, respectively: 16,9±1,5 µg/L, 165,9±6,9 ng/L, and 15,04±1,9 ng/mL. According to the results of construction of operational characteristics curves, the prognostic value of markers regarding the risk of developing a complicated course and the occurrence of symptoms from the nervous system in children with COVID-19 was determined. For the NSE marker, the threshold values for predicting the risk of developing symptoms from the nervous system and a complicated course are 15,626 µg/L (sensitivity – 65,8%, specificity – 81,6%) and 16,477 µg/L (sensitivity – 64,3%, specificity – 87%) respectively. For the marker S100, the values of 156,268 ng/L (sensitivity – 92,9%, specificity – 67,4%) for the occurrence of symptoms from the nervous system and 176,861 ng/L (sensitivity – 81,2%, specificity – 83,9%) are predictive %) for the risk of developing a complicated course of COVID-19. For E-selectin, the threshold values for predicting the risk of developing symptoms from the nervous system and a complicated course are 13,827 ng/ml (sensitivity – 73,8%, specificity – 71,7%) and 17,616 ng/ml (sensitivity – 68,8% , specificity – 71,4%), respectively.

To evaluate the role of the endothelium in the structure of the nervous system damage in children with COVID-19, we decided to analyze the relationship of E-selectin with the markers of nervous system damage NSE and S100 by calculating the Pearson linear correlation index. When conducting a correlation study, a linear correlation of medium degree of severity was found between E-selectin and markers NSE ($r=0,435$, $p<0,0001$) and S100 ($r=0,525$, $p<0,0001$), which indicates the involvement endothelium in the pathogenesis of damage to the nervous system in children with COVID-19.

The Scientific Novelty of the Research

In the course of the work, the features of the clinical picture of COVID-19 in children caused by different serotypes of the virus (waves) were studied, and the clinical features of damage to the nervous system in children with COVID-19 were investigated. For the first time, the expediency of using biomarkers (neuron-specific enolase, S100 protein, and E-selectin) in coronavirus infection was studied and their

prognostic value for the development of nervous system damage in children was determined. For the first time, a correlation between the level of biomarkers and the severity of COVID-19 in children was shown, and their threshold values for the prediction of the appearance of clinical symptoms of nervous system damage and a complicated course were determined. For the first time, the role of the endothelium in the etiopathogenesis of neurological complications in the context of coronavirus infection was assessed.

The Practical Significance of the Research

Based on the data obtained from the research results, it is proposed to involve neuron-specific enolase, protein S100 and E-selectin in the diagnostic algorithm for managing patients with severe forms of COVID-19.

The proposed method of diagnosis helps to determine the presence of the nervous system damage in children with COVID-19, as well as to confirm endothelial dysfunction and permeability of the BBB. An increase in the level of E-selectin in the blood serum is also associated with damage to the vascular wall in bacterial, viral diseases, and septic shock, so it allows us to consider them as useful biomarkers for the diagnostic and prognostic value of the complicated course of infectious diseases in children.

The results of the study are implemented in the work of the Kyiv City Children's Clinical Infectious Disease Hospital. The theoretical provisions of the research are used in the educational process at the Department of Children's Infectious Diseases of Bogomolets National Medical University.

CONCLUSIONS

The dissertation offers a novel approach to an urgent issue in pediatric infectology, namely, increasing the effectiveness of diagnosing the nervous system damage in children with COVID-19 based on the study of biomarkers and analysis of clinical indicators.

1. When analyzing the clinical picture of patients with COVID-19 during four waves, a progressive increase in general intoxication symptoms ($p < 0,05$) upper respiratory tract symptoms ($p < 0,05$) and a gradual increase in the frequency of

gastrointestinal manifestations - diarrhea and abdominal pain in children during 4 waves ($p<0,05$) was established.

2. The third wave of the incidence of COVID-19, which was associated with the spread of the Delta variant, characterized by a more severe course and a higher frequency of complicated cases ($p<0,05$).

3. The most significant factors for predicting the risk of a complicated course of coronavirus infection in children are D-dimer, procalcitonin and radiological changes (AUC= 0.895 (95% CI 0.81–0.98)).

4. Nervous system complications of COVID-19 included encephalopathy with convulsive syndrome and lesions of I and IX pairs of cranial nerves.

5. The prognostic value of E-selectin, NSE and S100 in children with COVID-19 regarding the complicated course and symptoms of damage to the nervous system was established.

6. The threshold value of E-selectin for predicting the risk of symptoms from the nervous system in COVID-19 is 13,827 ng/ml (sensitivity – 73,8%, specificity – 71,7%); for predicting the risk of developing a complicated course - 17,616 ng/ml (sensitivity – 68,8%, specificity – 71,4%), $p<0,05$.

7. The threshold value of NSE for predicting the risk of symptoms from the nervous system during COVID-19 is 15,626 $\mu\text{g/L}$ (sensitivity – 65,8%, specificity – 81,6%); for predicting the risk of developing a complicated course – 16,477 $\mu\text{g/l}$ (sensitivity – 64,3%, specificity - 87%), $p<0,05$.

8. The threshold value of S100 for predicting the risk of symptoms from the nervous system during COVID-19 is 156,268 ng/l (sensitivity – 92,9%, specificity - 67,4%); for predicting the risk of developing a complicated course - 176,861 ng/l (sensitivity – 81,2%, specificity – 83,9%), $p<0.05$.

9. The revealed relationship of E-selectin with the markers NSE ($r=0,435$, $p<0,0001$) and S100 ($r=0,525$, $p<0,0001$) indicates the involvement of the endothelium in the pathogenesis of damage to the nervous system in COVID-19 children.

Keywords: COVID-19, coronavirus infection, coronavirus disease, SARS-CoV-2, biomarker, neuromarker, NSE, S100, E-selectin, MIS-C, children, pandemic, nervous system, diagnostics, laboratory-instrumental diagnostics.