

# Serumske koncentracije glijalnog fibrilarnog kiselog proteina i status spolnih hormona u bolesnika s teškim oblikom bolesti COVID-19

---

**Majić, Josip**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:445889>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-01**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Josip Majić**

**SERUMSKE KONCENTRACIJE GLIJALNOG FIBRILARNOG KISELOG  
PROTEINA I STATUS SPOLNIH HORMONA U BOLESNIKA S TEŠKIM  
OBLIKOM BOLESTI COVID-19**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2021./2022.**

**Izv. prof. dr. sc. Joško Božić, dr. med.**

**Split, srpanj 2022.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Josip Majić**

**SERUMSKE KONCENTRACIJE GLIJALNOG FIBRILARNOG KISELOG  
PROTEINA I STATUS SPOLNIH HORMONA U BOLESNIKA S TEŠKIM  
OBLIKOM BOLESTI COVID-19**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2021./2022.**

**Izv. prof. dr. sc. Joško Božić, dr. med.**

**Split, srpanj 2022.**

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 COVID-19 .....	2
1.1.1. SARS-CoV-2 i način širenja .....	2
1.1.2. Patogeneza .....	4
1.1.3. Simptomi i klinička slika .....	5
1.1.4. Teški oblik COVID-19 .....	7
1.1.5. Dijagnoza .....	8
1.1.6. Liječenje .....	9
1.1.7. Mjere prevencije .....	12
1.1.8. Prognoza .....	13
1.2. Spolni hormoni .....	14
1.2.1. Fiziologija spolnih hormona .....	14
1.2.2. Androgeni .....	15
1.2.3. Polipeptidni hormoni .....	16
1.3. Spolni hormoni u bolesnika s COVID-19 .....	16
1.4. Akutno neurološko oštećenje u bolesnika s COVID-19 .....	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	20
3. ISPITANICI I POSTUPCI .....	22
3.1. Ispitanici i kriteriji uključenja/isključenja .....	23
3.2. Klinički i laboratorijski postupci .....	23
3.3. Statistička analiza .....	24
4. REZULTATI .....	25
5. RASPRAVA .....	32
6. ZAKLJUČCI .....	36
7. LITERATURA .....	38
8. SAŽETAK .....	51
9. SUMMARY .....	53
10. ŽIVOTOPIS .....	55

## ZAHVALA

*„We have two lives, and the second begins when we realize we only have one.“*

*Confucius*

*Posebne zahvale mom mentoru izv. prof. dr. sc. Jošku Božiću na velikoj pomoći, posvećenom vremenu i podršci prilikom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojoj dragoj obitelji i prijateljima na neizmjerne potpori, strpljenju i podršci tijekom ovih šest godina studija. Hvala za svaki savjet i kritiku koje ste mi uputili.*

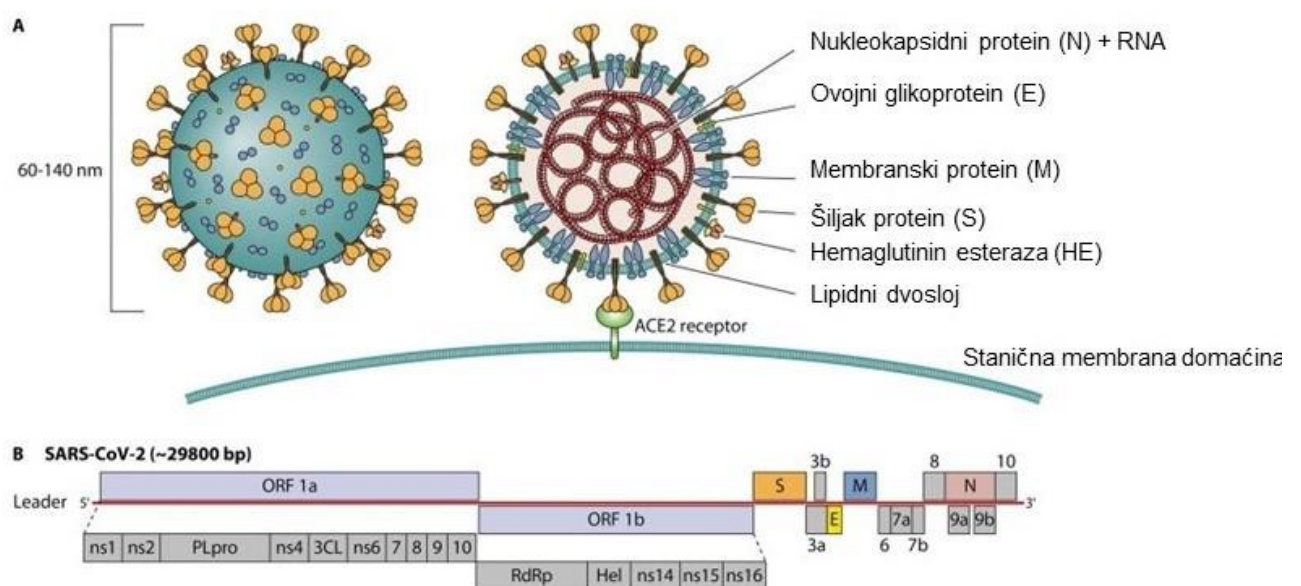
*S njihovom podrškom, završavam i ovo poglavlje mog života s jako lijepim uspomnama koje mi ostaju.*

## **1. UVOD**

## 1.1 COVID-19

### 1.1.1. SARS-CoV-2 i način širenja

COVID-19 (engl. *Coronavirus disease – 19*) je naziv za bolest dišnog sustava koja nastaje kao posljedica infekcije virusom SARS-CoV-2 (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) koji pripada skupini virusa lat. *Coronaviridae* veličine 60-140 nm. Radi se o jednolančanom RNA virusu, pozitivnog slijeda (ssRNA+), čiji genom sadrži 32 tisuće nukleotidnih slijedova što ga čini najvećim poznatim genomom RNA virusa (1). Koronavirusi sadrže četiri strukturalna proteina: šiljak (S), ovojni (E), membranski (M) i nukleokapsidni protein (N) (2). S-protein ima glavnu ulogu u vezivanju virusa i njegovoj internalizaciji u stanice domaćina (3). Virusni genom je obavijen s N-proteinom koji čini nukleokapsid (4). Takav nukleokapsid je ovijen lipidnom ovojnicom iz koje izlaze virusni proteini. Budući da virus ne može proizvesti lipidne sastavnice vlastite ovojnice, on iskorištava domaćinove lipidne čestice za daljnju diobu i morfogenezu. N-protein ima važnu ulogu u fazi morfogeneze viriona (4). Koronavirusi ime dobijaju s obzirom na oblik S-proteina koji na elektronskom mikroskopu daje oblik krune (Slika 1). Pri infekciji, iskorištavaju proteazne enzime domaćina koji omogućuju „čišćenje“ ostataka na S-proteinu prilikom čega induciraju konformacijske promjene važne za fuziju i unos virusa u stanicu (3). Ovakvo „čišćenje“ većinom je posljedica djelovanja enzima furina, koji se u značajnoj količini nalazi u plućima (5,6).



**Slika 1.** Na slici je prikazana temeljna građa koronavirusa. Na desnoj strani nalaze se proteini i lipidni dvosloj virusa. Na donjem dijelu je shematski prikaz genoma. Preuzeto i prilagođeno prema: Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B i sur. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. Clin Microbiol Rev. 2021;34.

SARS-CoV i MERS-CoV (engl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*) su zoonoze i povezani su s teškim oblicima bolesti. SARS-CoV se povezuje sa slučajevima teškog oblika plućne bolesti u kineskoj provinciji Guangdong tijekom 2002. i 2003. godine (7). MERS-CoV je povezan sa slučajevima teške plućne bolesti tijekom 2012. godine na Srednjem Istoku (8). Prvi slučajevi infekcije sa SARS-CoV-2 opisuju se u Wuhanu, gradu blizu kineske provincije Hubei. Većina prvih slučajeva se povezivala s gradskom tržnicom „Huanan Seafood Wholesale Market“, gdje se odvija prodaja morskih i drugih vrsta životinja za prehranu. Širenjem virusa SZO je 11. ožujka 2020. proglasila COVID-19 pandemijom (9).

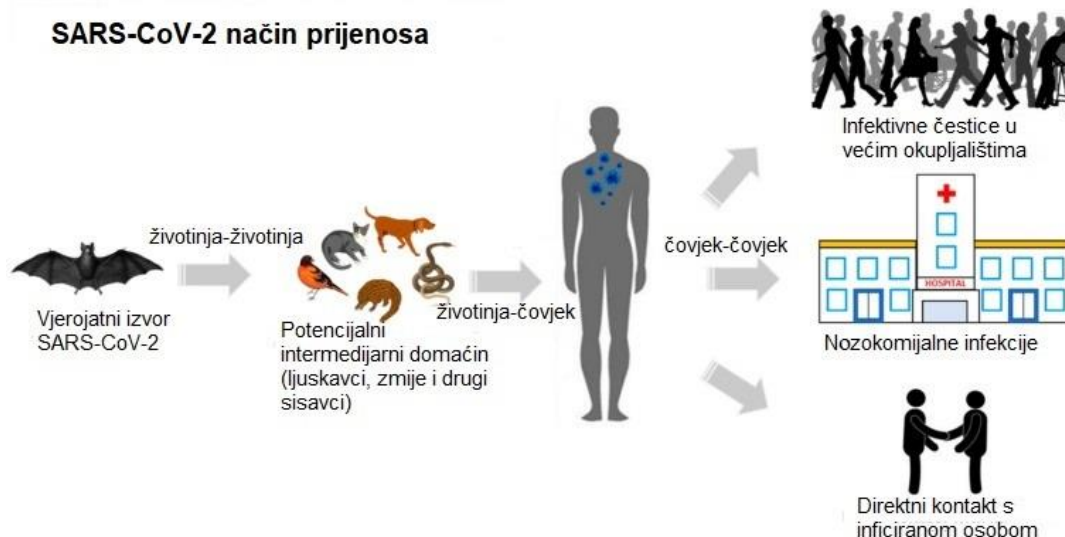
Razlikujemo četiri vrste koronavirusa od značenja: alfa, beta, gama i delta. Glavne varijante virusa koje inficiraju ljude su: 229E, NL63, OC43 i HKU1. Od tih varijanti, 229E i NL63 su alfakoronavirusi, dok OC43 i HKU1 su betakoronavirusi (10).

SZO je 26. studenog 2021. opisala pojavu nove varijante koronavirusa od značenja koju je nazvala omikron. Omikron sadrži 26-32 mutacije u S-proteinu koje su povezane s većom otpornošću na humoralnu imunost. Te mutacije se velikim dijelom nalaze u receptor vezujućoj regiji. Međutim, omikron pokazuje manju incidenciju težeg oblika bolesti. Njegov negativan efekt je lako širenje zaraze među populacijom čime dovodi u opasnost ranjive skupine i povećava opterećenje zdravstvenih ustanova (11).

Iako je prvotno smatrano da infekcija sa SARS-CoV-2 dolazi od šišmiša, kasnije je pokazano da uvijek mora postojati intermedijarni domaćin budući da, koronavirusi koji dolaze od šišmiša, rijetko inficiraju ljude (Slika 2). Također ista studija je pokazala da SARS-CoV-2 je vjerojatno nastao kao posljedica virusne rekombinacije između varijanti koronavirusa u ljuskavaca i šišmiša (12). Način prijenosa među ljudima je putem respiratornog aerosola koji se prenosi kašljanjem, kihanjem i šmrcanjem. Inhalacijom infektivnih čestica aerosola dolazi do ulaska virusa u plućni parenhim i time infekcije alveolarnih epitelnih stanica. Najčešća mjesta prijenosa su zatvoreni objekti gdje je smanjeno cirkuliranje zraka. Također, česte su i nozokomijalne infekcije budući da bolnice sadrže velik broj inficiranih osoba (13).



Širenje infekcije određuje se na temelju parametra  $R_0$  koji određuje broj ljudi koje inficirana osoba može zaraziti.  $R_0$  za SARS-CoV-2 je 2,24 – 3,58 što odgovara zaraznosti influenze, HIV-a (engl. *Human immunodeficiency virus*) i SARS-CoV, međutim znatno manje od prenosivosti ospica i varicele. Znatna je podatak da je u inficiranih osoba virus izoliran iz krvnog i fekalnog uzorka. Taj nalaz govori i o mogućim drugim načinima prijenosa (14-16).



**Slika 2.** Prikaz načina prijenosa SARS-CoV-2. Preuzeto i prilagođeno prema: Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A review on the novel Coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses*. 2021;13:202.

Period inkubacije je u prosjeku 1-14 dana, najčešće 3-7 dana. Virus se može detektirati u nosu pacijenta i nekoliko dana prije, pa i nakon trajanja simptoma. Potpuno asimptomatski pacijenti mogu imati razine virusa jednakima kao u simptomatskih pacijenata (15).

### 1.1.2. Patogeneza

Prilikom infekcije, SARS-CoV-2 većinom napada alveolarne epitelne stanice što rezultira respiratornim simptomima. Takva infekcija se može prezentirati kao asimptomatska ili simptomatska s razvojem simptoma koji dosta variraju u svake individue.

Na površini virusa nalazi se S-glikoprotein koji se veže za ACE2 (engl. *Angiotensin-converting enzyme 2*) u plućima (17). Prilikom vezanja, dolazi do konformacijske promjene na S-glikoproteinu i proteolize što dovodi do internalizacije viriona (18). Replikacija virusa dovodi do oštećenja alveolarnih epitelnih stanica i razvoja upalnog odgovora putem T-pomagačkih stanica koje produciraju IFN- $\gamma$ , IL-2 i IL-12 (19). Takva produkcija upalnih citokina dovodi do razvoja „citokinske oluje“ koja može dovesti do teškog oštećenja organa i multi-organskog

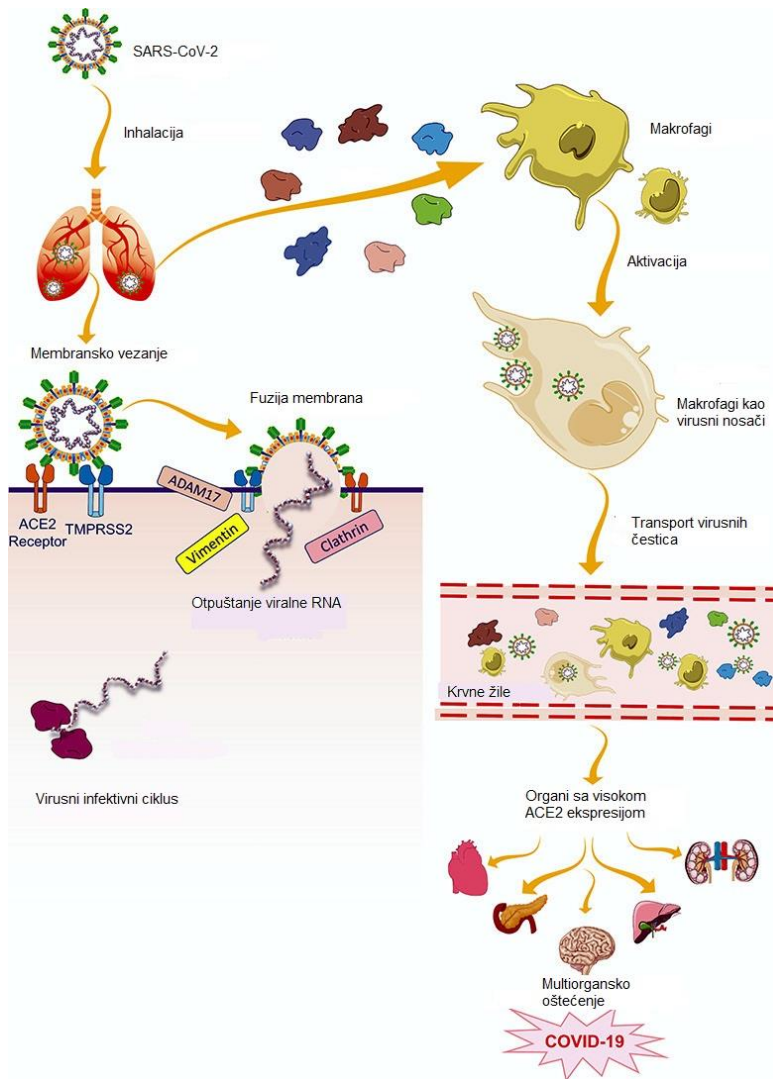
zatajenja (Slika 3) (19). Proinflamatorni citokini TNF- $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor- alfa*) i IL-1 $\beta$ , uzrokuju povećanu vaskularnu permeabilnost što može dovesti do plućnog edema (20). Njegovim razvojem, javljaju se simptomi dispneje kao posljedica oslabljenje oksigenacije krvi. Aktivacijom neutrofila dolazi do otpuštanja enzima čija je uloga oštećenje virusa. Međutim, njihovim djelovanjem dolazi do slabije produkcije surfaktanta što se očituje povećanom sklonošću kolapsa pluća (21). Prostaglandini, IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  potiču promjenu hipotalamičkog „termostata“ što dovodi do vrućice koja je učestali simptom u bolesnika s COVID-19 (22).

U bolesnika s teškim oblikom COVID-19, pronađene su povišene serumske vrijednosti proinflamatornih citokina: IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  i TGF- $\beta$  (engl. *Transforming growth factor-  $\beta$* ) te kemokina IL-8 (23). Oštećenje organa posljedica je kombinacije direktnog citopatskog učinka virusa i učinka „citokinske oluje“. Ta kombinacija ima destruktivni učinak u početku plućnog parenhima, a zatim širenje i na ostale organe s razvojem multi-organskog zatajenja. Također, povišena razina citokinskih faktora: TNF-  $\alpha$ , CXCL-10 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*), IL-6, IL-8; povezana je s lošijom prognozom i preživljenjem u bolesnika inficiranih sa SARS-CoV-2 (24).

### **1.1.3. Simptomi i klinička slika**

Infekcija sa SARS-CoV-2 može biti simptomatska i asimptomatska. Asimptomatske infekcije čine jednu trećinu ukupnog broja infekcija sa SARS-CoV-2. Longitudinalne studije pokazuju da tri četvrtine bolesnika koji imaju pozitivan PCR (engl. *Polymerase chain reaction*) test, a nemaju simptome, da će i ostati asimptomatski. To nam govori o visokoj učestalosti asimptomatskih bolesnika s COVID-19 (25). Od ukupnog broja, 80% bolesnika ima blagi oblik bolesti (26). Multi-organsko zatajenje često je posljedica prisutnosti ACE2 koji je još prisutan u srčanom tkivu, endotelu, renalnom tubularnom epitelu, crijevnom epitelu i pankreasu što omogućuje invaziju i navedenih organa (26,27). Povećan rizik infekcije imaju osobe s hipertenzijom (27-30%), dijabetesom (19%) i koronarnom bolesti srca (6-8%) (28).

Simptomi uključuju vrućicu, suhi kašalj, umor, anoreksiju, mijalgiju, dispneju i produkciju sputuma (29). Određen broj bolesnika razvija gastrointestinalne simptome u smislu dijareje i povraćanja. Pogoršanjem može doći do razvoja pneumonije i ARDS-a (engl. *Acute respiratory distress syndrome*) što zahtijeva intenzivno liječenje. Muškarci i žene su jednako podložni infekciji, međutim muškarci češće razvijaju teži oblik bolesti i imaju goru prognozu (30). Djeca su većinom asimptomatska ili se prezentiraju s blagim simptomima infekcije (31).



**Slika 3.** Na slici je prikazan ciklus ulaska virusa u stanicu vezanjem na ACE2 i TMPRSS2 (engl. *Transmembrane serine protease 2*) receptore te aktivacija makrofaga i imunološki odgovor. Preuzeto i prilagođeno prema: Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, Müller M, Drosten C, Pöhlmann S. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. bioRxiv. 2020.

Multisistemska upalna sindrom u djece jedna je od težih komplikacija koja se javlja nakon infekcije. Karakteriziran je vrućicom, sistemskom upalom i zahvaćanjem većeg broja organa. Smatra se da je patogeneza navedenog sindroma neodgovarajući imunološki odgovor na SARS-CoV-2 infekciju (31). Rezultati studije, koja je proučavala navedeni sindrom kod američke djece i adolescenata, govore da su najčešće zahvaćeni organski sustavi bili: gastrointestinalni (92%), kardiovaskularni (80%), hematološki (76%), mukokutani (74%) i respiratorni (70%). Većina pacijenata je zaprimljena na intenzivno liječenje (80%), dok je 20%

zahtijevalo mehaničku ventilaciju (31). Takvi rezultati govore u prilog da je multisistemski upalni sindrom životno opasna komplikacija infekcije u prethodno zdrave djece i adolescenata.

#### **1.1.4. Teški oblik COVID-19**

Teški oblik COVID-19 javlja se najčešće u dobi od 49 godina. Starije i imunokompromitirane osobe su podložnije težem obliku infekcije (32).

U nedavnoj studiji kojom su praćena 52 bolesnika s teškim oblikom COVID-19 utvrđeno je da je većina imala teška oštećenja organa tako da 67% je razvilo ARDS, 29% akutno bubrežno zatajenje, 23% srčano oštećenje, 29% disfunkciju jetre i 2% pneumotoraks. Mehaničku ventilaciju je zahtijevalo 71% bolesnika. Bolničko stečenu infekciju je imalo 7 bolesnika (33). Takva oštećenja posljedica su zastupljenosti ACE2 u navedenim organima uz imunološko oštećenje kao posljedica povišene razine citokina. Jedna trećina hospitaliziranih bolesnika razvija makrovaskularne trombotske komplikacije što uključuje vensku tromboemboliju, srčani i moždani udar (34).

Jedna od komplikacija koja se češće prikazuje u literaturi i koja je vezana uz brojne kontroverze je miokarditis. Budući da se ACE2 receptori nalaze i u srcu, virus ulazi i u kardiomiocite te može dovesti do direktnog citopatskog učinka. Uz navedeno, javlja se i posredni imunološki učinak zbog povišene razine citokina odnosno takozvane „citokinske oluje“. Često postavljeno pitanje je utjecaj ACE inhibitora uz infekciju na oštećenje srčanog mišića budući da povisuju ekspresiju ACE2 na kardiomiocitima. To nam govori o multifaktorskoj etiologiji razvoja miokarditisa u pacijenata s COVID-19 (31).

Određen broj bolesnika s težim oblikom COVID-19 razvija kožne manifestacije u obliku generalizirane urtikarije, eritematoznog osipa te osipa nalik varicela zoster infekciji. Većina kožnih lezija se nalazila na trupu bolesnika (35). Budući da se na ovarijima kod žena nalazi određena razina ACE2 receptora, može doći do smanjenja ovarijalne rezerve. Međutim, nejasno je kakav to ima učinak na funkciju ženskog reproduktivnog sustava (36). U muškaraca, ACE2 receptori nalaze se na površini Leydigovih, Sertolijevih i spolnih stanica koje na taj način mogu biti inficirane sa SARS-CoV-2 (37). Tim slijedom, bolesnicima je detektiran smanjen broj i pokretljivost spermija nakon preboljenja infekcije i do tri mjeseca. U rjeđim slučajevima, opisana je i bol u genitalnim regijama u određenog broja osoba (38).

Uz navedeno, opisuje se i povezanost razine glukoze u krvi i infekcije sa SARS-CoV-2. Pokazano je da 50% dijabetičara s COVID-19 ima višu razinu glukoze nego inače te da češće

razvijaju dijabetičku ketoacidozu. To se definira mogućnošću direktne invazije gušterače virusom (39).

Bolesnici oboljeli od COVID-19 mogu imati simptome zahvaćanja središnjeg živčanog sustava u smislu vrtoglavice i glavobolje. Drugi simptomi kao ataksija, gubitak svijesti, cerebrovaskularna bolest i promjene vida su rjeđe dokumentirani kod tih bolesnika. Veća učestalost neuroloških simptoma je vjerojatno posljedica cerebralne hipoksije zbog respiratornog zatajenja (40). Od simptoma perifernog živčanog sustava može se javiti hiposmija i anosmija te hipogeuzija i mišićna zamor (41).

Ekspresija ACE2 receptora je značajno povećana u bolesnika s upalnom bolesti crijeva. Navedena ekspresija je značajnije povećana u bolesnika s Crohnovom bolešću, u odnosu na bolesnike s ulceroznim kolitisom (42).

Koinfekcije imaju važnu ulogu na daljnji tijek bolesti budući da mijenjaju prognozu i težinu bolesti. Oboljeli od COVID-19 imaju veći rizik koinfekcije s različitim virusima, bakterijama i gljivicama što višestruko pogoršava prognozu. Primjerice povišen je rizik infekcije invazivnom aspergilozom u bolesnika na intenzivnom liječenju (43). Na taj način značajno se povećava morbiditet i mortalitet oboljelih.

### **1.1.5. Dijagnoza**

U dijagnostici COVID-19 najprihvaćeniji način uzimanja uzorka je uzimanje brisa nazofaringealne ili orofaringealne regije. Najviša razina virusa u uzorku se nalazi 2-3 dana od nastupa simptoma (44). U uznapredovalih oblika bolesti uzimanje uzorka iskašljaja ili bronhoalveolarne lavaže također daje visoke razine virusa. Također, u određenog broja bolesnika, virus se može detektirati iz uzorka fecesa posebice u uznapredovalim stadijima (45).

Najpouzdaniji laboratorijski način određivanja je putem RT-PCR (engl. *Real-time reverse transcription-PCR*) metode. Ovom metodom moguće je detektirati samo akutnu bolest u inficiranih, odnosno ne može detektirati je li osoba preboljela ili imala nedavnu infekciju virusom. Danas također postoji serološko određivanje protutijela koja važniju ulogu imaju u određivanju prethodnog preboljenja od akutne bolesti. Serološke metode imaju funkciju određivanja razine protutijela na S-protein virusa. Time dobivamo razinu IgM i IgG protutijela koja određuju vrijeme preboljenja. Od seroloških metoda najčešće se koristi ELISA (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Međutim, problem predstavlja križna reaktivnost protutijela na druge vrste koronavirusa (46,47).

Sve češće u uporabi su brzi antigenski testovi. Razlog tomu je brzina dobivanja rezultata i dostupnost. Također, prednost čini i njegova lakoća izvođenja tako da bolesnik ga može sam upotrijebiti i odrediti rezultat. Međutim, njihova osjetljivost nije zadovoljavajuća. Brzi antigenski testovi davaju pozitivan rezultat u prosječno 72% simptomatskih bolesnika i 58% asimptomatskih bolesnika. Test je najprecizniji kada se koristi u prvom tjednu od početka simptoma. Međutim, antigenski testovi u osoba koje nisu bolovala od COVID-19 davali su negativan rezultat u 99,5% simptomatskih i 98,9% asimptomatskih osoba, upućujući time na visoku specifičnost testova (48).

### 1.1.6. Liječenje

Liječenje ovisi o stadiju i težini bolesti. U prvom stadiju bolesti, razina virusa najveća je 2 do 3 dana prije ili nakon javljanja simptoma. U toj fazi najčešće se primjenjuju antivirusni lijekovi te protutijela specifična za virus. Drugu fazu bolesti označava proupalno stanje zbog hipercitokinemije te koagulopatija. Tada se primjenjuju protuupalni lijekovi, imunomodulatori te antikoagulansi (49).

Molnupiravir i remdesivir djeluju na RdRp (engl. *RNA-dependent RNA-polymerase*) enzim koji je važan za transkripciju i replikaciju virusne RNA. Remdesivir djeluje kao nukleozidni analog koji zatim blokira daljnju funkciju RdRp enzima. Molnupiravir je prvenstveno razvijen za liječenje influenze te alfavirusa: Zapadnog, Istočnog i Venezuelanskog konjskog encefalitisa. Učinak mu se temelji na povećanju broja mutacija iznad letalne granice u virusnom genomu. U blažim oblicima bolesti COVID-19, može značajno smanjiti progresiju bolesti te hospitalizaciju i smrtnost, ako se primjeni unutar 5 dana od nastupa simptoma (50). Bolesnici s visokim rizikom od progresije bolesti, nakon trodnevnog uzimanja remdesivira, imali su 87% smanjenje rizika od hospitalizacije i smrti (51). Paxlovid je oralna kombinacija ritonavira i nirmatrelvira. Na uzorku od 1219 bolesnika, smrtnost te rizik zaprimanja u bolnicu su 89% manji nego u kontrolnoj skupini ako se primjeni unutar 3 dana od nastupa simptoma (52). Hidroksiklorokin i klorokin, kojima je pridodan značaj na početku pandemije, nisu pokazali poboljšanje preživljenja ili smanjenje rizika hospitalizacije u odnosu na kontrolnu skupinu (53). Lopinavir/ritonavir je dvojna terapija koja se koristi u liječenju HIV-a. U početku pandemije, predložena je kao terapija koja bi mogla poboljšati ishode bolesnika s COVID-19. Međutim, nije prikazan značajniji učinak u odnosu na standardno liječenje bolesti COVID-19 (54). Ivermektin je antiparazitni lijek koji se koristi u liječenju bolesti COVID-19. Njegovo korištenje temelji se na inhibiciji replikacije SARS-CoV-2 (55). Međutim, pokazano je da u

blažem obliku bolesti, petodnevno uzimanje ivermektina nije dovelo do brže regresije simptoma bolesti (56).

U novijim kliničkim studijama, istražuje se uloga neutralizirajućih protutijela u liječenju bolesti COVID-19. Konvalescentna plazma se koristi u liječenju hospitaliziranih bolesnika te u sprečavanju progresije bolesti u ne-hospitaliziranih bolesnika. Temelji se na prijenosu virusno specifičnih protutijela od osoba koje su preboljele COVID-19. Učinkovitost je potvrđena u brojnim kontrolnim studijama kao i sigurnost primjene (57). REGN-CoV-2 je mješavina dvaju neutralizirajućih IgG1 protutijela koja se vežu na različite epitope S-proteina. Casirivimab i Imdevimab snižavaju razinu i time patološke učinke u bolesnika s visokom razinom virusa (58). Bamlanivimab i Etesivimab su monoklonalna protutijela koja djeluju na S-protein. Bamlanivimab se dobija ekstrakcijom iz konvalescentne plazme bolesnika s COVID-19. Etesivimab se vezuje na različito mjesto i tako je djelotvoran na bamlanivimab-rezistentne sojeve virusa. Bamlanivimab/etesivimab u kombinaciji su povezani s značajnim smanjenjem razine virusa (59). Sotrovimab također djeluje na S-protein kao neutralizirajuće protutijelo. Tako su Gupta i sur. prikazali 85% smanjenje smrtnosti i rizika hospitalizacije nakon jedne doze sotrovimaba. Rezultati su određeni na visokorizičnim ne-hospitaliziranim bolesnicima s blažim do srednje teškim oblikom bolesti COVID-19 (60).

Kao što je već navedeno, teški oblik bolesti COVID-19 posljedica je upalnog stanja i hipercitokinemije koji dovode do akutnog plućnog oštećenja. RECOVERY studija (engl. *The randomized evaluation of COVID-19 therapy*) je pokazala da liječenje deksametazonom dovodi do smanjenja 28-dnevnog mortaliteta u bolesnika na mehaničkoj potpori. Stoga je deksametazon uz mogućnost remdesivira, standardan lijek u liječenju bolesnika na mehaničkoj potpori (61). Anakinra je antagonist receptora za IL-1. Primjena Anakinre se temelji na povišenoj razini IL-1 $\beta$  u teškom obliku bolesti COVID-19. Na uzorku od 52 bolesnika s teškim oblikom bolesti COVID-19, anakinra je smanjila smrtnost i potrebu za mehaničkom potporom (62). Smatra se da je IL-6 važan faktor proupalnog stanja povezanog s COVID-19. U reumatologiji se koriste 3 antagonista receptora za IL-6: tocilizumab, sarilumab i siltuximab. Prema studiji Rosas i sur., tocilizumab nije pokazao značajnije smanjenje smrtnosti i poboljšanje kliničkog statusa u odnosu na placebo (63). Na uzorku od 431 bolesnika, liječenje sarilumabom nije pokazalo značajne rezultate (64). Baricitinib je selektivni inhibitor Janus kinaze (JAK)1 i JAK2. Koristi se u liječenju teškog oblika reumatoidnog artritisa. S obzirom da blokira endocitozu SARS-CoV-2 u in vitro uvjetima te signalni put važan za proupalno stanje, ispituje se uloga u liječenju bolesti COVID-19 (65). Baricitinib u kombinaciji s

remdesivirom pokazuje značajne rezultate u smanjenju vremena oporavka te poboljšanja kliničke slike. Takvi rezultati su dominantno postignuti u bolesnika na potpori kisikom ili neinvazivnoj mehaničkoj ventilaciji (66). Ruxolitinib je, također, selektivni inhibitor JAK1 i JAK2. Koristi se u liječenju mijeloproliferativnih bolesti te steroid-rezistentnih GVHD (engl. *Graft-versus-host disease*). Na uzorku od 43 bolesnika, ruxolitinib nije pokazao statistički značajne rezultate u usporedbi sa standardnom skrbi. Međutim, nastupio je brži oporavak od limfopenije te značajan napredak u CT (engl. *Computed tomography*) nalazu (67). Tofacitinib je selektivni inhibitor JAK1 i JAK3. Koristi se u liječenju teških oblika reumatoidnog i psorijatičnog artritisa te ulceroznog kolitisa. U bolničko zaprimljenih bolesnika, tofacitinib je smanjio smrtnost i rizik respiratornog zatajenja u odnosu na placebo tijekom 28 dana (68). Acalabrutinib, ibrutinib i rilzabrutinib su inhibitori Brutonove tirozin kinaze. Reguliraju signaliranje makrofaga te se koriste u liječenju malignih hematoloških bolesti. Na malom uzorku od 19 bolnički zaprimljenih bolesnika, acalabrutinib je pokazao značajne rezultate u poboljšanju oksigenacije i smanjenju upalnog oštećenja. Potrebna su dodatna istraživanja uloge i učinkovitosti inhibitora Brutonove tirozin kinaze (69).

U slučaju blagog oblika bolesti COVID-19, preporuča se ambulantna kontrola sa suportivnim mjerama i izolacijom. Nisu potrebne laboratorijske i radiološke pretrage. U bolesnika s visokim rizikom progresije bolesti, preporuča se primjena REGN-CoV2 protutijela: bamlanivimab/etesivimab ili sotrovimab. Ne preporuča se primjena deksametazona (70).

U slučaju srednje teškog oblika bolesti COVID-19, svi bolesnici moraju biti hospitalizirani radi monitoriranja. Potrebna je suportivna skrb u smislu resuscitacije volumenom te potpore kisikom, u slučaju smanjene saturacije arterijske krvi kisikom. Remdesivir i deksametazon se mogu primijeniti u bolesnika koji zahtijevaju potporu kisikom (70).

U slučaju teškog oblika bolesti COVID-19, potrebna je hospitalizacija svih bolesnika. Važna je primjena antikoagulacije zbog visokog rizika trombotskog događaja. Nosna kanila s visokim protokom kisika te neinvazivna ventilacija pozitivnim tlakom, koriste se u bolesnika koji ne zahtijevaju endotrahealnu intubaciju. Preporuča se primjena deksametazona u kombinaciji s remdesivirom te tocilizumab ili baricitinib s deksametazonom. Ako nije moguća primjena deksametazona, tada se koristi remdesivir u kombinaciji s baricitinibom. Također preporuke su i primjena jedne intravenske doze tocilizumaba. U slučaju respiratornog zatajenja, intubira se bolesnika i primjenjuje invazivna mehanička ventilacija. Važno je održavanje srednjeg arterijskog tlaka iznad 60mmHg. U slučaju sumnje na bakterijsku superinfekciju,



empirijski se primjenjuju antibiotici. ECMO (engl. *Extracorporeal membrane oxygenation*) se primjenjuje u slučaju refrakternog zatajenja disanja (70).

### 1.1.7. Mjere prevencije

Centar za kontrolu i prevenciju bolesti predlaže niz mjera za smanjenje širenja bolesti. Mjere najčešće uključuju učestalo pranje ruku, pogotovo nakon kontakta s drugom osobom, izbjegavanje prostora s većim brojem ljudi te pokrivanje usta i nosa prilikom kašljanja odnosno kihanja. Preporuke također uključuju i socijalno distanciranje te mjere samoizolacije za osobe koje su bile u kontaktu s oboljelima. Socijalno distanciranje bi trebalo ograničiti širenje infektivnog aerosola i time spriječiti daljnje širenje infekcije (71). Rezultati pokazuju da je karantena najučinkovitija metoda za smanjenje morbiditeta i mortaliteta. Uključenjem rezultata iz 29 studija prikazano je da karantena može smanjiti broj inficiranih sa 81% na 44% te broj mrtvih sa 61% na 31% (72,73).

Osim javnozdravstvenih mjera za prevenciju širenja SARS-CoV-2, važan korak u smislu prevencije bolesti COVID-19 je cijepljenje.

BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) je cjepivo formulirano kao lipidna nanočestica, sadrži nukleozid-modificiranu RNA koja kodira membranski S-protein. Na uzorku od 43548 ispitanika, BNT162b2 je u 95% slučajeva prevenirao razvoj bolesti COVID-19. Ispitanici su primili dvije doze u razmaku od 21 dan. Učestalost nuspojava je bila jednaka kao u kontrolnoj skupini (74).

mRNA-1273 (Moderna) je također mRNA cjepivo koje sadrži nukleozid-modificiranu RNA koja kodira S-protein. Ispitanicima je u razmaku od 28 dana primijenjeno dvije doze cjepiva. Prikazana je 94,1% učinkovitost u prevenciji bolesti COVID-19 uz jednaku sigurnost kao u ostalih cjepiva (75).

Ad26.COV2.S (Johnson&Johnson) je rekombinantno cjepivo koje sadrži vektor humani adenovirus tip 26. Vektor nema mogućnost replikacije, već se transkripcijom i translacijom gena sintetizira S-protein. Primjenom jedne doze navedenog cjepiva, razvija se 73,1% učinkovitost u prevenciji bolesti COVID-19 (76).

ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) je cjepivo koje sadrži adenovirusni vektor čimpanze ChAdOx1, koji nema sposobnost replikacije, međutim sadrži gen koji kodira S-protein. Multicentrični RCT (engl. *Randomized control trial*) prikazao je učinkovitost u prevenciji

zaraze od 70,4% u ispitanika koji su primili dvije doze cjepiva te 64% u ispitanika koji su primili jednu dozu cjepiva. Također pokazao je prihvatljiv sigurnosni profil (77).

NVX-CoV2373 (Nuvaxovid, Novavax) je cjepivo koje sadrži rekombinantni pročišćeni S-protein virusa SARS-CoV-2. Na uzorku od 29000 ispitanika, primjenom jedne doze cjepiva pokazana je 92,6% učinkovitost prevencije zaraze bilo kojom varijantom od značenja (78).

Nekoliko dana nakon cijepljenja s ChAdOx1 nCoV-19 i Ad26.COV2.S, opisani su trombotski događaji u cerebralnom venskom sinusu i splahnničnim venama te slučajevi trombocitopenije. S obzirom na sličnost sa sindromom HIT (engl. *Heparin induced thrombocytopenia*), nazvan je VITT (engl. *Vaccine-induced immune thrombocytopenia*). Liječenje je slično kao i za HIT (79).

Prikazano je da nekoliko mjeseci od primljene druge doze cjepiva dolazi do slabljenja imunosti i povećanja osjetljivosti na infekciju. Stoga je uvođenje dodatne „booster“ doze dovelo do povećanja zaštite od zaraze. Zato su danas na snazi preporuke o primanju dodatne „booster“ doze u prevenciji bolesti COVID-19 (80,81).

### **1.1.8. Prognoza**

Vrijeme oporavka za bolesnike s blažim simptomima je otprilike 2 tjedna dok je kod težih oblika 3-6 tjedana. Kod određenog broja osoba s lakšim simptomima opaža se oporavak već 3 dana nakon samoizolacije i bez korištenja lijekova (82).

Prema novijim podacima, u Hrvatskoj se smrtni slučaj javlja u 390,28/100000 stanovnika, odnosno prikazana je smrtnost od 1,4% u oboljelih osoba (83). Smrt se dominantno javlja u bolesnika s kroničnim bolestima i u starijoj populaciji. Važno je napomenuti da su moguće koinfekcije s virusom influenze, RSV (engl. *Respiratory syncytial virus*) i rinovirusima. Koinfekcije bakterijama nisu toliko učestale. Takve koinfekcije značajno mogu pogoršati prognozu tih bolesnika (82).

Preko 90% djece preboli COVID-19 asimptomatski ili s lakšim simptomima. Također, u djece je učestalija pojava gastrointestinalnih simptoma u smislu proljeva (15%), mučnine, povraćanja (10%) i abdominalne boli. Kao i u odraslih, većina težih slučajeva povezana je s komorbiditetima. Jedna od teorija, koja objašnjava manji morbiditet i mortalitet u djece, temelji se na većoj pojavnosti ACE2 receptora u plućima djece. Ti receptori mogu imati protektivnu ulogu prilikom koinfekcije s RSV, budući da smanjuju oštećenje parenhima tim virusom. Također, imunološki sustav djece je prilagođen učestalim infekcijama s RSV tako da i to čini

značajni faktor u boljoj prognozi. Stoga, može se utvrditi da je multifaktorska etiologija bolje prognoze u djece (84).

Progresivno pogoršanje respiratorne funkcije je glavni uzrok smrti. Prevalencija hipoksičnog respiratornog zatajenja je 19%, koji značajno raste ako bolesnik razvije ARDS. Takvi bolesnici prosječno provedu 10,5 dana na mehaničkoj ventilaciji. Prognoza takvih bolesnika se drastično pogoršava s danom provedenim na mehaničkoj potpori (82).

## **1.2. Spolni hormoni**

### **1.2.1. Fiziologija spolnih hormona**

Spolni hormoni su skupina steroidnih hormona čija se uloga ostvaruje vežući se na steroidne receptore. Među njima razlikujemo androgene, estrogene i gestagene. U širem smislu u spolne hormone ubrajamo i polipeptidne hormone: folikulostimulacijski (FSH) i luteinizacijski hormon (LH). Navedene polipeptidne hormone izlučuje hipofiza uz regulaciju iz hipotalamusa putem gonadotropin-otpuštajućeg hormona (GnRH). Uloga spolnih hormona se očituje u normalnom razvoju sekundarnih spolnih oznaka, reproduktivskih funkcija te očitovanje na stanični metabolizam i druge funkcije tijela. Druga podjela je na muške i ženske spolne hormone. Time muški spolni hormoni obuhvaćaju androgene čija je uloga u razvoju muških sekundarnih spolnih karakteristika, dok ženski spolni hormoni obuhvaćaju estrogene i gestagene važne za razvoj ženskih spolnih karakteristika (85,86).

Androgene čine testosteron, dihidrotestosteron i androstendion. Sva tri hormona izlučuju testisi, međutim razine izlučenog testosterona značajno premašuju ostale hormone pa ga možemo smatrati glavnim hormonom testisa. Dihidrotestosteron dominantno nastaje pretvorbom iz testosterona na periferiji. Androstendion u određenoj mjeri izlučuje nadbubrežna žlijezda (85). Estrogene čine estron (E1), estradiol (E2) i estriol (E3). Estrogene dominantno izlučuju jajnici od kojih je estradiol najpotentniji hormon. Od gestagena, najvažniju ulogu ima progesteron. Međutim, određen učinak postiže i 17- $\alpha$ -hidroksiprogesteron koji se izlučuje u manjim količinama (86,88). Polipeptidni hormoni imaju važnu ulogu u regulaciji izlučivanja spolnih hormona. Kod žena reguliraju ovarijski ciklus i razvoj folikula. Iako po građi i užoj klasifikaciji ne pripadaju spolnim hormonima, imaju važnu ulogu u normalnoj spolnoj funkciji (85,86).

Spolni hormoni ostvaruju učinak vežući se na steroidne receptore koji se nalaze unutarstanično. Zbog svoje steroidne građe, nesmetano prolaze staničnu membranu i ulaze u

citoplazmu. Prilikom vezanja na receptor, stvaraju kompleks koji zatim odlazi u jezgru i potiče transkripciju gena i sintezu bjelančevina. Tim putem, mijenjaju stanični metabolizam i utječu na rast stanica. Testosteron, poput drugih steroidnih hormona, ima određene negenomske učinke za koje nije nužna sinteza novih bjelančevina. Fiziološka uloga tih učinaka se još treba razjasniti (85,86).

### 1.2.2. Androgeni

Androgene čine testosteron, dihidrotestosteron i androstendion. Možemo reći da je testosteron odgovoran za većinu sekundarnih spolnih oznaka. Testosteron se stvara u intersticijskim Leydigovim stanicama koje čine 20% mase testisa odraslog muškarca. Leydigovih stanica ima najviše u muškog novorođenčeta prvih nekoliko mjeseci života te poslije puberteta. Kada se izluči, 97% testosterona se labavom vezom veže za albumin, dok ostatak se čvrstom vezom veže za beta-globulin. Taj beta-globulin nazivamo globulin koji veže spolne hormone. Takav cirkulira 30 minuta do nekoliko sati. Veliki dio testosterona se u stanicama na periferiji pretvara u dihidrotestosteron pod utjecajem enzima  $5\alpha$ -reduktaze. Razgradnja testosterona se odvija u jetri na androsteron i dehidroepiandrosteron te se istodobno konjugira u glukuronide i sulfate koji se izlučuju putem žuči ili bubrega (85).

Testosteron i FSH imaju važnu ulogu u kontroli spermatogeneze. Taj učinak ostvaruju putem Sertollijevih stanica. Testosteron je važan pri diobi spolnih stanica dok FSH ima važnu ulogu u modeliranju spermatida. Testosteron i inhibin, kojeg luče Sertollijeve stanice, imaju važnu ulogu u regulaciji izlučivanja LH i FSH. Testosteron negativnom povratnom spregom djeluje na LH dok inhibin na FSH. Perifernom pretvorbom iz testosterona nastaje estrogen putem enzima aromataze koji se dominantno nalazi u masnom tkivu. Tim putem nastaje estrogen kod muškaraca (87).

Funkcija testosterona očituje se tijekom fetalnog razvoja pri razvoju muških spolnih osobina. Također ima ulogu na spuštanje testisa u skrotum prije rođenja. Njegov učinak se također očituje u produbljenju glasa zbog hipertrofije glasnica te povećava i debljinu kože. Uz navedeno, ima ulogu u razvoju miškulature i koštanog matriksa te potiče zadržavanje kalcija. Također važnu ulogu ima u povećanju bazalnog metabolizma i regulacije ravnoteže vode i elektrolita. Za kraj, testosteron povećava broj eritrocita. Tim slijedom prikazana je važnost i funkcija testosterona (85).

Dihidrotestosteron nastaje perifernom konverzijom iz testosterona putem  $5\alpha$ -reduktaze. On se veže za receptorsku bjelančevinu u citoplazmi te odlazi u jezgru gdje potiče proces transkripcije DNA u RNA. Na taj način se ostvaruju genomski učinci. Dihidrotestosteron je snažan androgen. Androstendion se u najvećoj mjeri stvara u kori nadbubrežne žlijezde te ima slabiji androgeni učinak u odnosu na testosteron i DHT. Radi se o prekursoru u sintezi testosterona i estrogena iz dehidroepiandrosterona. On ima veću važnost kod žena te njegov androgeni učinak je važan za pubičnu i aksilarnu dlakavost (85).

### **1.2.3. Polipeptidni hormoni**

Polipeptidni hormoni su važni za regulaciju izlučivanja spolnih hormona. GnRH je peptidni hormon kojeg izlučuju arkuatne jezgre hipotalamusa. Njegovo izlučivanje je pulsatilno čime regulira hipofizu i izlučivanje FSH i LH. Takvo pulsatilno izlučivanje je u dobroj korelaciji sa izlučivanjem LH dok je izlučivanje FSH manje sklono kolebanjima. Sertollijeve stanice u muškarca su važne u stvaranju inhibina. FSH je važan u spermatogenezi dok LH ima važnu ulogu u stimulaciji Leydigovih stanica na proizvodnju testosterona (85).

Testosteron smanjuje izlučivanje LH i FSH djelujući direktno na hipofizu te posredno smanjujući lučenje GnRH. Tijekom djetinjstva hipotalamus ne luči znatne količine GnRH. Razlog tomu je što i najmanje lučenje spolnih hormona dovodi do snažnog inhibicijskog učinka na hipotalamičko lučenje. Tijekom puberteta ti inhibicijski signali više ne utječu na GnRH mehanizmom koji još nije jasan. Tada dolazi do naglog povećanja lučenja GnRH koji zatim stimulira hipofizu i nastupa razdoblje puberteta. Regulacija lučenja GnRH dolazi od raznih medijatora i neurotransmitera u arkuatnim jezgrama i preoptičkoj jezgri hipotalamusa (85-88).

## **1.3. Spolni hormoni u bolesnika s COVID-19**

Čest predmet istraživanja danas, je utjecaj spolnih hormona na težinu razvoja COVID-19. Iako nema značajne razlike prema spolu u učestalosti obolijevanja od bolesti, prikazana je povećana učestalost težeg oblika bolesti i smrti u muškaraca (89).

Unutar studije, koja je obuhvatila bolesnike u tri skupine (bolesnici s COVID-19, bolesnici s respiratornom infekcijom drugog uzroka i kontrolna skupina), Kadıhasanoğlu i sur. su prikazali značajne promjene razine spolnih hormona. Sukladno tome, prva skupina je imala udio od 74,2% bolesnika sa smanjenom razinom testosterona, druga skupina 53,3% te treća

37,8% bolesnika s deficijencijom. Razina LH i prolaktina je bila značajno veća u bolesnika s COVID-19 i respiratornom infekcijom drugog uzroka nego u kontrolnoj skupini. Time je prikazana i negativna korelacija između razine testosterona i vremena hospitalizacije bolesnika s COVID-19. Tim slijedom utvrđuje se da je COVID-19 udružen s nižom razinom testosterona te povišenim razinama prolaktina i LH. Niža razina testosterona je udružena s težim oblikom bolesti i duljom hospitalizacijom (90).

U muških bolesnika s teškim oblikom COVID-19, ustanovljena je viša razina estradiola te niža razina testosterona nego u kontrolnoj skupini. Međutim, nije pronađena statistički značajna razlika u razini spolnih hormona kod ženskih bolesnika sa teškim oblikom COVID-19 (91). Niža razina testosterona također je povezana s većom potrebom mehaničke ventilacije i time gorom kliničkom slikom. Postoji negativna korelacija između razine testosterona i razine CRP-a, pH, IL-6 te d-dimera (92).

U velikoj kohortnoj studiji, Cayan i sur. su obuhvatili 221 muškog bolesnika i pratili njihov ishod. Bolesnici su imali smanjenje razine testosterona od  $458 \pm 198$  ng/dl prije infekcije, do  $315 \pm 120$  ng/dl za vrijeme COVID-19. Od 46 bolesnika koji su bili asimptomatski, 30 (65,2%) je imalo smanjenje libida. Uočen je hipogonadizam u 113 (51,1%) muških bolesnika. Također prikazano je da sa smanjenjem razine testosterona, dolazi do porasta mogućnosti mortaliteta (93).

Veća učestalost težeg oblika bolesti i smrti u muškaraca može se objasniti učinkom androgena na TMPRSS2 receptor. Naime, androgeni povisuju ekspresiju TMPRSS2 receptora i time omogućuju vezanje S-proteina i veću osjetljivost na infekciju sa SARS-CoV-2 (94). Testosteron ima i važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora. Taj učinak se očituje inhibicijom NF- $\kappa$ B. Inhibicijom navedenog unutarstaničnog glasnika dolazi do smanjenja produkcije IL-6 i TNF- $\alpha$  (95). Testosteron povisuje razinu IL-10 (96). Ti učinci testosterona mogu djelovati protuupalno, spriječiti razvoj „citokinske oluje“ i objasniti veću osjetljivost muškaraca s hipogonadizmom na teži oblik bolesti. Utjecaj infekcije na mušku reproduktivnu sposobnost, tema je brojnih rasprava. Tako su Ling Ma i sur. na uzorku od 12 bolesnika prikazali kvalitetu sjemenog uzorka. Tako je 8 bolesnika imalo normalnu kvalitetu sjemena dok je ostatak imao promjene u morfologiji i motilitetu. Također utvrdili su višu razinu LH i nižu razinu testosterona u bolesnika s COVID-19 (97).

Veću učestalost težeg oblika bolesti i smrtnosti u muškaraca može se objasniti i većom svjesnosti žena o težini COVID-19. Tako su Galasso i sur. prikazali da 59,0% žena smatra

COVID-19 ozbiljnim javnozdravstvenim problemom naspram 48,7% muškaraca na uzorku od 21649 ispitanika (98). Tako možemo zaključiti da su žene više uključene u zaštitu od infekcije i mogućeg težeg oblika bolesti. Žene imaju višu razinu CD4+ T-pomagačkih stanica (99). Na taj način mogu razviti jači imunološki odgovor.

Testosteron ima važnu ulogu u inhibiciji sinteze pro-upalnih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ . Također ima inhibicijsku ulogu na upalne adipocitokine te ostvaruje pozitivan učinak na protuupalni adiponektin (95,100). Budući da IL-6 ima važnu ulogu u razvoju ARDS-a, niska razina testosterona je povezana s težim oblikom bolesti COVID-19 (101). Adiponektin ostvaruje protuupalni učinak smanjujući pretjeranu proizvodnju citokina i time oštećenje plućnog parenhima (102). Prema istraživanju Rastrelli i sur. prikazano je da niža razina ukupnog i slobodnog nevezanog testosterona je povezana s povišenim razinama LDH (engl. *Lactate dehydrogenase*), feritina i prokalcitonina te sniženim razinama limfocita uz povišenu razinu neutrofila. Međutim nije prikazana značajna razlika u razini D-dimera. Također utvrđeno je da snižena razina ukupnog i slobodnog testosterona je povezana s težim oblikom ARDS-a i prijemom u intenzivnu jedinicu skrbi (103).

Nakon infekcije sa SARS-CoV-2, dolazi do razvoja oksidativnog stresa kao posljedica peroksidacije lipida i proteina stanične membrane. Povišena razina neutrofila je usko vezana s oksidativnim stresom budući da je on posljedica povećane proizvodnje slobodnih kisikovih radikala aktivacijom neutrofila (104). Slobodni kisikovi radikali dovode do razvoja endotelne disfunkcije, tromboze, oštećenja eritrocita te povećavaju otpuštanje pro-upalnih citokina (105). Oksidativni stres aktivacijom mitogen-aktivne protein kinaze p38 (p38MAPK) dovodi do inhibicije sinteze testosterona mijenjajući gensku ekspresiju i metaboličku aktivnost. Tako povišena razina slobodnih kisikovih radikala dovodi do povišenja razine p38MAPK i time značajne inhibicije sinteze testosterona u Leydigovim stanicama (106). S druge strane, testosteron smanjuje oksidativni stres, smanjenjem proizvodnje kisikovih radikala iz neutrofila i produkata peroksidacije lipida te potiče aktivnost glutaciona (107). Stoga možemo reći da niske razine testosterona povećavaju oksidativni stres koji time dodatno snižava razinu testosterona vodeći u začarani krug.

Uloga testosterona u bolesnika s COVID-19 je dvojaka. S jedne strane, testosteron ima imunomodulacijski učinak snižujući proizvodnju proupalnih citokina te smanjujući oksidativni stres i endotelnu disfunkciju (100,107). Stoga bolesnici s hipogonadizmom razvijaju teži oblik bolesti (90,93). S druge strane, visoka razina testosterona može pogoršati prognozu bolesti

povisujući ekspresiju TMPRSS2 receptora koji ima važnu ulogu u vezanju S-proteina te unosu viriona u stanicu (94).

#### **1.4. Akutno neurološko oštećenje u bolesnika s COVID-19**

U bolesnika s teškim oblikom COVID-19 često dolazi do javljanja neuroloških simptoma koji se očituju u obliku glavobolje, vrtoglavice, delirija, gubitka svijesti, akutne cerebrovaskularne bolesti, ataksije i encefalopatije (108). Delirij se definira kao akutna promjena stanja svijesti prilikom koje dolazi do različitih promjena u pažnji i stupnju kognicije (109). U određivanju razine neurološkog oštećenja, Cooper i sur. su koristili 4 neurološka biomarkera: kiseli glijalni fibrilarni protein (GFAP) koji je astrocitni marker, neurofilamentni-laki lanac (NF-L) i tau protein (t-tau) koji su markeri aksonalnog oštećenja te ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1 (UCH-L1) koja je marker neuralnog oštećenja. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, bolesnici s COVID-19 su imali značajno višu razinu GFAP. Također razine GFAP, NF-L i UCH-L1 su usko povezane s javljanjem delirija u bolesnika s teškim oblikom COVID-19. Nije prikazana značajna povezanost razine neuroloških biomarkera s parametrima težine plućne bolesti i razinom citokina u krvi (110). Akutno neurološko oštećenje je dijelom posljedica vezivanja SARS-CoV-2 na ACE2 receptore na površini neurona (111). Uz navedeno, moguć je učinak smanjene oksigenacije kao posljedica kardiorespiracijskog zatajenja (112).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Glavni cilj istraživanja je usporediti serumske razine GFAP-a između bolesnika koji su preživjeli teški oblik COVID-19 i bolesnika koji su preminuli od iste za vrijeme boravka u bolnici. Nadalje, dodatni cilj je usporediti značajke hormonskog statusa između skupina. Konačno, cilj je utvrditi postoji li povezanost između serumskih razina GFAP-a te laboratorijskih parametara i zahvaćenosti plućnog parenhima u COVID-19 bolesnika.

Hipoteze:

1. Bolesnici koji nisu preživjeli teški oblik COVID-19 imaju veće serumske razine GFAP-a.
2. Bolesnici koji nisu preživjeli teški oblik COVID-19 imat će niže razine spolnih i tireoidnih hormona te vitamina D u krvi.
3. Serumske koncentracije GFAP-a pozitivno koreliraju s Brixia zbirom.
4. Serumske koncentracije GFAP-a negativno koreliraju sa serumskim razinama testosterona i vitamina D.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

Ova studija je provedena u Kliničkom bolničkom centru Split, na Jedinici za intenzivno liječenje, u razdoblju od prosinca 2021. do svibnja 2022. godine. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split te je provedeno u skladu sa svim etičkim principima. Svi ispitanici su upoznati s detaljima ovog istraživanja te su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istom.

### **3.1. Ispitanici i kriteriji uključanja/isključanja**

U istraživanje je uključeno 50 muškaraca, u dobi od 18-65 godina, koji boluju od teškog oblika bolesti COVID-19. Prilikom prijema u Jedinici za intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Split, svi ispitanici su intubirani i postavljeni na mehaničku ventilaciju. Za vrijeme provođenja istraživanja, u Hrvatskoj je najzastupljenija varijanta od interesa SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta varijanta). Primjena endotrahealne intubacije se temeljila na zaštiti dišnih puteva, teškoj dekompenziranoj acidozi ( $\text{pH} < 7,2$ ) i teškoj hipoksemiji ( $\text{PaO}_2 < 50 \text{ mmHg}$  i  $\text{SaO}_2 < 90\%$ ) unatoč maksimalnoj neinvazivnoj potpori disanju. U istraživanje su uključeni isključivo muškarci, budući da je temeljni pristup bio određivanje odnosa hormonskog statusa testosterona te drugih varijabli od interesa i teškog oblika bolesti COVID-19. Kriteriji isključenja su: maligna i autoimuna bolest, suplementacija vitaminom D, te srčano, jetreno i bubrežno zatajenje.

### **3.2. Klinički i laboratorijski postupci**

Za svakog ispitanika, anamneza i relevantne informacije o prošloj terapiji, su uzete iz medicinske dokumentacije. Sve analize su rađene i uzorkovane na dan prijema u Jedinicu intenzivnog liječenja.  $\text{SaO}_2$  i vitalni znakovi su kontinuirano praćeni od prijema. Tjelesna masa i visina su ustanovljene iz medicinske dokumentacije te je BMI (engl. *Body mass index*) izračunat iz navedenih vrijednosti. Određivanje acidobaznog statusa iz arterijske krvi te ostalih laboratorijskih parametara (broj eritrocita i leukocita, razina laktat dehidrogenaze, C-reaktivnog proteina i d-dimera), provedena su prilikom prijema na te svakog idućeg dana. Određivanje svih laboratorijskih parametara je provedeno prema standardnoj proceduri na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split.

Za određivanje rizika, korištene su različite bodovne ljestvice. Brixia bodovna ljestvica se koristi za stratifikaciju rizika bolesnika s teškim oblikom bolesti COVID-19, putem 18-bodovne ljestvice oštećenja plućnog parenhima na temelju CT nalaza (113). Snimanje CT nalaza je korišteno u svih ispitanika prilikom prijema u Jedinicu za intenzivno liječenje. SOSIC

bodovna ljestvica (engl. *Survival of Severely Ill COVID*) je formirana za određivanje 90-dnevnog mortaliteta na osnovu 15 parametara iz jedinice intenzivnog liječenja. Tako razlikujemo SOSIC-1, SOSIC-7, SOSIC-14 ljestvice s obzirom na dan koji su uzete određene varijable. One služe za određivanje rizika progresije bolesti i smrtnog ishoda bolesnika s teškim oblikom bolesti COVID-19 (114). Tako su varijable, za navedenu bodovnu ljestvicu, određivane na 1., 7. i 14. dan od prijema. Pri određivanju smrtnosti, korištena je SAPS II (engl. *Simplified Acute Physiology Score*) bodovna ljestvica koja sadrži 12 varijabli te 3 parametra vezane uz bolest (115). Horowitz indeks se koristi za određivanje plućne funkcije te se računa kao omjer  $SaO_2$  i  $FiO_2$  (116). U liječenju ispitanika su korištene najnovije smjernice te terapijski protokoli što uključuje: kortikosteroide, antivirusne lijekove, antikoagulanse, potporu kisikom i suportivnu terapiju. Svi ispitanici su praćeni do kraja ostanka u bolnici ili razvoja smrtnog ishoda. To uključuje vrijeme provedeno na Odjelu za intenzivnu medicinu te druge bolničke odjele.

### 3.3. Statistička analiza

Svi podaci su analizirani pomoću programa MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgium, verzija 20.4.1) i Prism 6 za Windows (verzija 6.01, GraphPad, La Jolla, CA, USA). Kategorički podaci su prikazani kao apsolutni broj (N) ili postotak (%), dok su kontinuirani podaci prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD) ili medijan (interkvartilni raspon). Kolmogorov-Smirnovljev test se koristio za testiranje normalnosti distribucije kvantitativnih podataka. Pri analizi određenih kategoričkih podataka, korišteni su hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) i Fischerov egzaktni test. Za usporedbu podataka između skupina preživjelih i umrlih korišteni su Studentov t-test i Mann-Whitney U test. Pri određivanju povezanosti skupina podataka, korišten je Pearsonov koeficijent korelacije. Prikazani su grafovi povezanosti zajedno s koeficijentom korelacije  $r$  ( $\rho$ ) i  $P$ -vrijednošću. U svim analizama,  $P$ -vrijednost manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

## **4. REZULTATI**

U istraživanje je uključeno 50 ispitanika koji boluju od teškog oblika bolesti COVID-19. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, s obzirom na ishod bolesti. Tako je u prvoj skupini 37 ispitanika u kojih nije nastupio smrtni ishod, dok u drugoj skupini je 13 ispitanika u kojih je došlo do smrtnog ishoda. Utvrđena je statistički značajno viša dob unutar skupine bolesnika u kojih je nastupio smrtni ishod ( $P=0,037$ ). Međutim, nema značajne razlike između skupina s obzirom na: BMI ( $P=0,679$ ), trajanje bolesti pri prijemu u bolnicu ( $P=0,690$ ), trajanje bolesti pri prijemu u jedinicu intenzivnog liječenja ( $P=0,606$ ) te duljinu hospitalizacije ( $P=0,195$ ). Također, pokazana je statistički značajna razlika između skupina s obzirom na: duljinu boravka u jedinici intenzivnog liječenja ( $P<0,001$ ), vrijeme provedeno na mehaničkoj ventilaciji ( $P<0,001$ ), razvoj nozokomijalne infekcije ( $P<0,001$ ), arterijsku hipertenziju ( $P=0,010$ ) te šećernu bolest ( $P<0,001$ ) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Prikaz demografskih i kliničkih karakteristika bolesnika hospitaliziranih zbog teškog oblika COVID-19 infekcije.

Parametri	Bez smrtnog ishoda (n=37)	Smrtni ishod (n=13)	Ukupno (n=50)	P
Dob (godine)	53,1 ± 7,7	57,9 ± 6,2	55,2 ± 7,4	0,037*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,7 ± 3,9	28,2 ± 2,7	28,5 ± 3,6	0,679*
Trajanje bolesti pri prijemu u bolnicu (dani)	9,1 ± 2,5	8,6 ± 3,4	8,7 ± 2,8	0,690*
Trajanje bolesti pri prijemu u JIL (dani)	11,3 ± 3,3	10,5 ± 5,3	11,4 ± 3,7	0,606*
Duljina hospitalizacije (dani)	16 (13 – 21)	22 (14 – 35)	17 (13 – 23)	0,195†
Duljina boravka u JIL (dani)	11,5 ± 6,7	20,3 ± 8,5	13,2 ± 7,5	<0,001*
Vrijeme provedeno na mehaničkoj ventilaciji (dani)	7,0 ± 4,8	19,2 ± 8,6	9,4 ± 7,6	<0,001*
Nozokomijalne infekcije (n, %)	18 (49%)	10 (77%)	28 (56%)	<0,001‡
Potpuna cijepljenost (n, %)	10 (27%)	2 (15%)	12 (24%)	0,777‡
Aktivno pušenje (n, %)	4 (7,6%)	1 (7,7%)	5 (10%)	0,846‡
Arterijska hipertenzija (n, %)	14 (26,4%)	5 (38,5%)	19 (38%)	0,010‡
Dijabetes mellitus (n, %)	2 (5,4%)	2 (15,4%)	4 (8%)	<0,001‡
Dislipidemija (n, %)	25 (68%)	12 (54%)	45 (90%)	0,554‡

\*Studentov t-test, †Mann-Whitney U test, ‡Fisherov egzaktni test

Kratice: BMI - Indeks tjelesne mase od engl. *Body mass index*, JIL- Jedinica intenzivnog liječenja

Unutar skupine bolesnika u kojih je nastupio smrtni ishod, utvrđena je statistički viša razina: laktat dehidrogenaze ( $P=0,034$ ), visoko-osjetljivog Troponina I ( $P=0,003$ ), SOSIC-1 ( $P=0,016$ ), SOSIC-7 ( $P<0,001$ ), SOSIC-14 ( $P<0,001$ ) i Brixia zbira ( $P=0,004$ ). Ostali laboratorijski parametri i klinički zbirovi od interesa nisu se značajno razlikovali među skupinama (Tablica 2).



**Tablica 2.** Laboratorijski parametri i klinički zbirovi u bolesnika uključenih u istraživanja

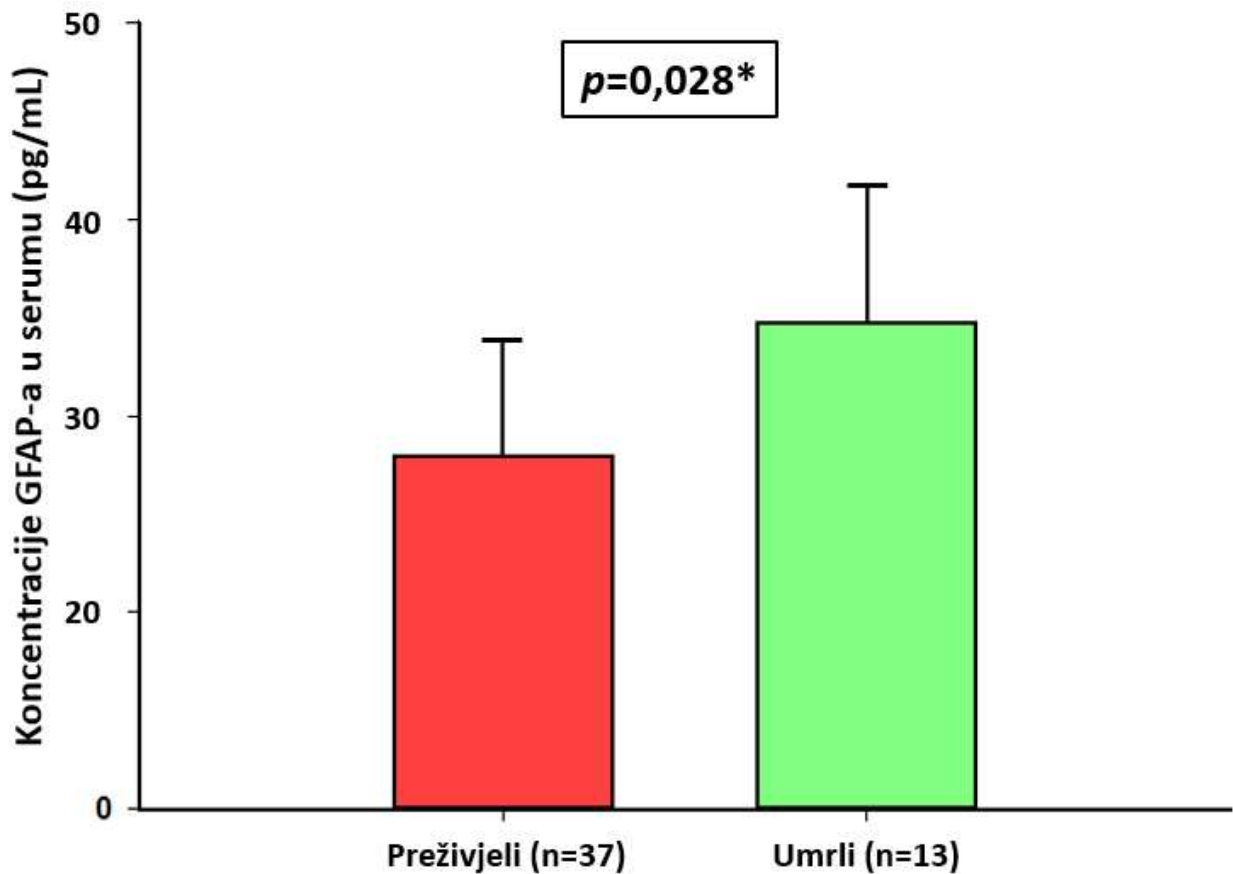
Parametri	Bez smrtnog ishoda (n=37)	Smrtni ishod (n=13)	Ukupno (n=50)	P
SaO <sub>2</sub> (%)	93,0 (90,4 – 96)	94,0 (86,6 – 96,0)	91,9 (90,3 – 96,0)	0,461*
pH (jedinice)	7,35 ± 0,07	7,34 ± 0,06	7,35 ± 0,07	0,469†
pO <sub>2</sub> (kPa)	5,9 ± 1,2	6,1 ± 0,7	5,8 ± 1,1	0,507†
pCO <sub>2</sub> (kPa)	9,7 ± 2,5	9,6 ± 2,2	9,8 ± 2,4	0,859†
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	26,6 ± 2,4	25,7 ± 2,1	25,7 ± 2,4	0,626†
Hemoglobin (g/L)	134,5 ± 12,0	130,9 ± 12,1	133,3 ± 12,1	0,393†
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	264,6 ± 84,6	217,3 ± 87,1	254,9 ± 86,7	0,095†
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	10,4 ± 3,4	9,1 ± 4,6	9,8 ± 3,6	0,513†
CRP (mmol/L)	86,6 ± 56,9	85,9 ± 36,2	87,5 ± 42,7	0,846†
LDH (μmol/L)	435,9 ± 215,6	615,1 ± 215,7	469,2 ± 212,9	0,034†
D-dimeri (mg/L)	2,12 (1,53 – 4,03)	3,18 (1,67 – 6,75)	2,24 (1,64 – 4,29)	0,309*
hsTnI (ng/L)	10,3 (4,9 – 12,7)	18,1 (9,8 – 31,7)	10,9 (5,2 – 17,3)	0,003*
Glukoza (mmol/L)	9,7 ± 2,5	10,6 ± 5,4	9,8 ± 3,4	0,208†
Urea (mmol/L)	7,7 ± 2,2	8,6 ± 4,6	8,1 ± 2,6	0,478†
Kreatinin (mmol/L)	76,8 ± 14,4	82,2 ± 27,4	77,7 ± 19,6	0,156†
Horowitz indeks	91,1 ± 30,9	84,1 ± 24,9	89,7 ± 29,7	0,475†
SAPS II	28 (26 – 31,5)	31 (28 – 35)	29 (26 – 33)	0,156*
SOSIC -1	27,5 (21,2 – 35,9)	35,3 (31,8 – 42,9)	30,4 (22,8 – 37,4)	0,016*
SOSIC -7	6,3 (3,3 – 26,8)	37,5 (32,1 – 42,4)	12,9 (3,9 – 33,1)	<0,001*
SOSIC -14	4,5 (2,1 – 12,9)	48,7 (45,9 – 54,9)	28,1 (2,7 – 48,1)	<0,001*
Brixia score	12,5 ± 3,9	13,9 ± 2,8	12,3 ± 3,8	0,004†

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD, broj (postotak) ili medijan (interkvartilni raspon).

\*Mann-Whitney U test, † Studentov t-test

Kratice: CRP - C-reaktivni protein, LDH - Laktat dehidrogenaza, hsTnI - Visoko-osjetljivi troponin I od engl. *High-sensitivity Troponin I*, SAPS - Prema engl. *Simplified Acute Physiology Score*, SOSIC - Prema engl. *Survival of Severely Ill COVID*

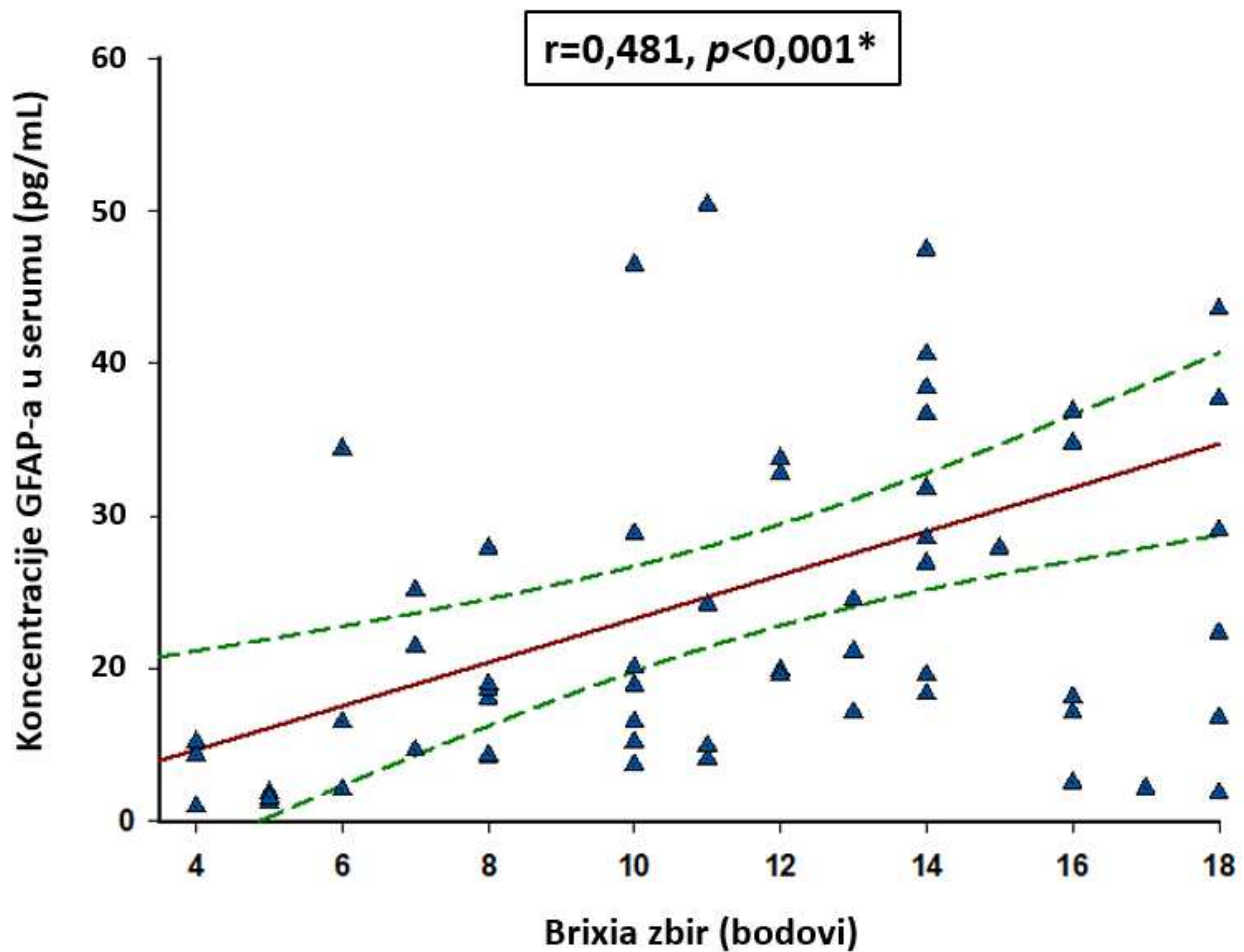
Pronađena je statistički značajno niža razina serumskog GFAP-a u preživjelih u odnosu na ispitanike koji su preminuli tijekom boravka u bolnici ( $27,5 \pm 7,2$  pg/mL vs.  $34,9 \pm 8,3$  pg/mL,  $P=0,028$ ) (Slika 4).



**Slika 4.** Usporedba serumskih koncentracija GFAP-a između bolesnika s teškim oblikom COVID-19 koji su preživjeli i bolesnika koji su umrli tijekom boravka u bolnici.

\*Studentov t-test

Pronađena je pozitivna korelacija između serumske razine GFAP-a i Brixia zbira u bolesnika hospitaliziranih zbog teškog oblika bolesti COVID-19 ( $r=0,481$ ,  $P<0,001$ ) (Slika 5).



**Slika 5.** Korelacija između serumskih koncentracija GFAP-a i Brixia zbira u bolesnika hospitaliziranih zbog teškog oblika COVID-19.

\*Pearsonov koeficijent korelacije

Usporedbom hormonskog statusa u bolesnika koji su preživjeli te onih koji su umrli, utvrđena je statistički značajno viša razina vitamina D u preživjelih ispitanika ( $40,2 \pm 18,6$  vs  $27,4 \pm 17,0$  nmol/L,  $P=0,040$ ). Međutim nije pronađena značajna razlika s obzirom na razine: testosterona ( $P=0,623$ ), TSH ( $P=0,899$ ),  $fT_3$  ( $P=0,453$ ) te  $fT_4$  ( $P=0,578$ ) (Tablica 3).

**Tablica 3.** Usporedba hormonskog statusa između bolesnika koji su preživjeli i bolesnika koji su umrli tijekom boravka u bolnici.

Parametri	Bez smrtnog ishoda (n=37)	Smrtni ishod (n=13)	Ukupno (n=50)	P*
Testosteron (nmol/L)	0,75 (0,43 – 1,47)	0,86 (0,61 – 1,52)	0,75 (0,46 – 1,48)	0,623*
TSH (mIU/L)	0,35 (0,16 – 0,63)	0,26 (0,18 – 0,61)	0,31 (0,17 – 0,63)	0,899*
ft3 (pmol/L)	2,48 ± 0,40	2,47 ± 0,91	2,40 ± 0,44	0,453†
ft4 (pmol/L)	15,57 ± 3,45	13,14 ± 3,21	15,42 ± 3,32	0,578†
Vitamin D (nmol/L)	40,2 ± 18,6	27,4 ± 17,0	37,7 ± 18,8	0,040†

\*Mann-Whitney U test, †Studentov t-test

Kratice: TSH - Tiroidni stimulirajući hormon, ft3 - Slobodni trijodtironin od engl. *free triiodothyronine* (T3), ft4 - Slobodni tiroksin od engl. *free thyroxine* (T4)

Također, pokazana je statistički značajna pozitivna korelacija između serumskih koncentracija GFAP i testosterona ( $r=-0,310$ ,  $P=0,036$ ). Međutim nije pronađena značajna povezanost GFAP-a s razinama C-reaktivnog proteina ( $P=0,713$ ), visoko-osjetljivog Troponina I ( $P=0,125$ ), TSH ( $P=0,421$ ), vitamina D ( $P=0,628$ ) i SAPS-II bodovne ljestvice ( $P=0,064$ ) (Tablica 4).

**Tablica 4.** Korelacija između serumskih koncentracija GFAP-a i varijabli od interesa u bolesnika hospitaliziranih zbog teškog oblika COVID-19.

Parametri	r*	P
CRP (mmol/L)	0,410	0,713
hs-TnI (ng/L)	0,463	0,125
Testosteron (nmol/L)	-0,310	0,036
TSH (mIU/L)	-0,125	0,421
Vitamin D (nmol/L)	-0,012	0,628
SAPS-II	0,233	0,064

\*Pearsonov koeficijent korelacije

Kratice: CRP - C-reaktivni protein, hsTnI - Visoko-osjetljivi troponin I od engl. high-sensitivity Troponin I, TSH - Tiroidni stimulirajući hormon, SAPS-II - Prema engl. Simplified Acute Physiology Score

## **5. RASPRAVA**

U ovom istraživanju, na ispitanicima s teškim oblikom bolesti COVID-19, ustanovljeno je da su bolesnici koji nisu preživjeli bili značajno stariji u odnosu na bolesnike koji su preživjeli. Casas-Deza i sur. su postigli slične rezultate, na uzorku od 61993 bolesnika, pokazali su veću učestalost hospitalizacije, težu kliničku sliku i češći nastup smrtnog ishoda. Bolesnici s višom životnom dobi, direktno su povezani s višim rizikom smrtnog ishoda neovisno o prisutnosti komorbiditeta (117). Također, Henkens i sur. su pokazali da je dob glavna odrednica visokog rizika mortaliteta bolesnika s teškim oblikom COVID-19 (118).

Uz životnu dob, u bolesnika sa smrtnim ishodom pronađeno je da su imali veću duljinu hospitalizacije u jedinici intenzivnog liječenja te dulje vrijeme provedeno na mehaničkoj ventilaciji. Uzrok ovoj opservaciji je činjenica da bolesnici koji su umrli za vrijeme boravka u bolnici nisu imali značajno poboljšanje kliničke slike koje bi dovelo do prelaska s mehaničke na neinvazivne oblike ventilacije. Uz to, sa svakim danom provedenim u jedinici intenzivnog liječenja ili na mehaničkoj ventilaciji, veća je šansa za razvoj pogubnih nozokomijalnih infekcija. Najčešći uzročnik je *Pseudomonas Aeruginosa*, ali u KBC Split u kojem je provedeno istraživanje, važan uzročnik je *Acinetobacter baumannii* (119). Na uzorku od 140 bolesnika, Bardi i sur. su prikazali veći rizik smrtnog ishoda te dulji boravak u jedinici intenzivnog liječenja nakon razvoja nozokomijalne infekcije (43,120). Sukladno tomu, u ovom istraživanju smo prikazali veći broj bolesnika, unutar skupine preminulih, koji su razvili nozokomijalnu infekciju.

Sustavni pregledni rad, na uzorku od 213 članaka na odabranu temu, je pokazao znatno veći rizik smrtnog ishoda u bolesnika s teškim oblikom bolesti COVID-19 koji su kao komorbiditet imali arterijsku hipertenziju (121). Podaci upućuju na to da osobe koje boluju od arterijske hipertenzije ili šećerne bolesti imaju i veći rizik infekcije sa SARS-CoV-2, a uzroci ove povezanosti su mnogobrojni (28). Nadalje, sustavni pregled je pokazao veći rizik smrtnog ishoda u bolesnika s teškim oblikom COVID-19 koji su kao komorbiditet imali šećernu bolest (122). U okviru ovog istraživanja također je pronađeno da su bolesnici sa smrtnim ishodom značajno češće kao komorbiditet imali arterijsku hipertenziju ili šećernu bolest. Također, 50% osoba sa šećernom bolesti koja oboli od COVID-19 ima višu razinu glukoze nego inače te češće razvija dijabetičku ketoacidozu. Smatra se da je to posljedica direktne invazije gušterače virusom (39,122).

Prema rezultatima ovog istraživanja, pronađeno je da su bolesnici sa smrtnim ishodom imali značajno više vrijednosti LDH u usporedbi sa skupinom bolesnika koji su preživjeli. Takvom prikazu u prilog govore i rezultati istraživanja, koji pokazuju da povišene vrijednosti

LDH su udružene sa šest puta većim rizikom razvoja teškog oblika bolesti COVID-19. Također, visoke vrijednosti LDH su udružene sa 16 puta većim rizikom smrtnog ishoda. Iako su povišene vrijednosti LDH otkrivene kao posljedica oštećenja srčanog mišića još 1960. godine, visoke vrijednosti mogu nastati kao posljedica multiplog oštećenja različitih organa i povišenja aktivnosti glikolitičkog puta. Tako infekcije mogu uzrokovati citokinima-posredovano oštećenje organa i time otpuštanje viših razina LDH (103,123).

Visoke razine hs-TnI (engl. *high-sensitivity Troponin I*) povezane su s visokim mortalitetom bolesnika s teškim oblikom bolesti COVID-19. Stoga troponin postaje važan biomarker u određivanju prognoze i mogućeg smrtnog ishoda svakog bolesnika. Troponin predstavlja važan biomarker srčanog oštećenja u bolesnika s COVID-19. Direktna invazija virusa putem ACE2 receptora te učinak „citokinske oluje“ dovodi do oštećenja kardiomiocita i otpuštanja troponina (31,124). U ovom istraživanju smo pokazali značajno više razine hs-TnI unutar skupine preminulih nego u skupini preživjelih. Rezultati ove studije u skladu su s rezultatima Salvaticija i sur., postignutih na uzorku od 523 bolesnika. Navedeni autori su utvrdili značajno više serumske razine hs-TnI unutar skupine bolesnika u kojih je nastupio smrtni ishod (124).

GFAP se posljednjih godina koristi kao marker astrocitnog oštećenja. Visoke razine GFAP su povezane sa češćim javljanjem delirantnog stanja te visokim rizikom smrtnog ishoda (110,125). Na uzorku od 50 ispitanika prikazali smo znatno više vrijednosti GFAP unutar skupine bolesnika u kojih je nastupio smrtni ishod. Također, pronađena je korelacija između serumske razine GFAP i bodovnog zbira Brixia ljestvice. Naime više serumske koncentracije GFAP-a povezane su s većim Brixia zbirom i time lošijom prognozom i većim rizikom smrtnog ishoda u bolesnika s teškim oblikom COVID-19.

Bolesnici s nižim razinama testosterona razvijaju težu kliničku sliku i imaju veći rizik nastupa smrtnog ishoda (90-93). Podaci upućuju da je razvitak teže kliničke slike i lošijih ishoda posljedica imunomodulatornog učinka testosterona, budući da je u prisutnosti nižih razina testosterona, otpuštanje proupalnih citokina povećano, a favorizira se razvitak „citokinske oluje“ i endotelne disfunkcije (100,107). S druge strane, visoke razine testosterona povisuju ekspresiju TMPRSS2 receptora čime omogućuje lakše vezanje S-proteina na receptor i veću osjetljivost na infekciju sa SARS-CoV-2, zbog čega većina autora zagovara dualnu ulogu testosterona u COVID-19 (94). Međutim, u ovom istraživanju nismo dobili statistički značajne rezultate koji bi pokazali jasnu razliku u razini testosterona između bolesnika u kojih je nastupio smrtni ishod i bolesnika koji su preživjeli. Međutim, u ovom istraživanju, smo pronašli

negativnu korelaciju između serumskih razina GFAP i testosterona. Uzimajući u obzir neuroprotektivne učinke testosterona, ovakav rezultat bismo mogli objasniti većim neuralnim oštećenjem, na što upućuje visoka koncentracija GFAP-a, u bolesnika s nižim razinama testosterona.

U okviru ovog rada pronađene su značajno niže razine vitamina D u skupini preminulih bolesnika u odnosu na preživjele. Takvi rezultati su sukladni s rezultatima koje su postigli Seal i sur. na uzorku od 4599 američkih veterana. Navedeni autori su pokazali da je razina 25(OH)D obrnuto proporcionalno povezana s duljinom hospitalizacije i visinom rizika smrtnog ishoda (126). Također, Borsche i sur. su prikazali da je vitamin D prediktor ishoda, a ne samo nuspojava COVID-19. Primjerice, u navedenoj studiji smrtnost je bila niža u bolesnika u kojih su razine serumskog 25(OH)D3 bile veće od 50 ng/mL (125 nmol/L). Vitamin D, osim uloge u normalnoj funkciji skeletnog sustava, ima važnu ulogu u ishodu mnogih infektivnih i autoimunih bolesti. Veliki stupanj upalnog odgovora i time razvoj respiratornog zatajenja su u uskoj svezi s razinom vitamina D. Na primjer, utvrđeno je da je razina vitamina D od 125 nmol/L povezana s najvećim stupnjem inhibicije razvoja nekontroliranog upalnog odgovora (127). Uz to, Campi i sur. su pokazali da je razina 25(OH)D obrnuto proporcionalna razini IL-6, važnog proupalnog citokina koji predstavlja jednu od terapijskih meta u COVID-19 (63,128). Time se razina vitamina D dovodi u usku vezu s upalnim parametrima i jačinom upalnog odgovora. Stoga, niske razine vitamina D su povezane s većim rizikom infekcije te razvojem progresivnog respiratornog zatajenja uz visoki rizik smrtnog ishoda (128).

Ograničenje ovog istraživanja je mali uzorak ispitanika (N=50), stoga se rezultati ne mogu primijeniti na sve bolesnike s teškim oblikom bolesti COVID-19, već su potrebna dodatna istraživanja.



## **6. ZAKLJUČCI**

1. Bolesnici koji nisu preživjeli teški oblik bolesti COVID-19 imaju veće serumske koncentracije GFAP-a u usporedbi s bolesnicima koji su preživjeli.
2. Nije pronađena značajna razlika u razinama spolnih hormona između skupine bolesnika s i bez smrtnog ishoda, dok su pronađene značajno manje koncentracije vitamina D u skupini bolesnika sa smrtnim ishodom.
3. Serumska koncentracija GFAP-a pozitivno korelira s Brixia zbirom.
4. Serumska koncentracija GFAP-a negativno korelira sa serumskom razinom testosterona, dok s vitaminom D nije utvrđena povezanost.

## **7. LITERATURA**

1. Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG. A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol.* 2007;81:20–9.
2. Kim D, Lee J-Y, Yang J-S, Kim JW, Kim VN, Chang H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell.* 2020;181:914–921.e10.
3. Duan L, Zheng Q, Zhang H, Niu Y, Lou Y, Wang H. The SARS-CoV-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: Implications for the design of spike-based vaccine immunogens. *Front Immunol.* 2020;11:576622.
4. Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese M, Zila V, McKeane L i sur. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature.* 2020;588:498–502.
5. Millet JK, Whittaker GR. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:15214–9.
6. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B i sur. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34.
7. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon, Xie ZH, Chan KH i sur. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People’s Republic of China, in February, 2003. *Lancet.* 2003;362:1353–8.
8. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 2012;367:1814–20.
9. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020 [Indeks]. Who.int. Dostupno na: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
10. Human Coronavirus Types [Indeks]. Cdc.gov. 2021. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>
11. Enhancing response to Omicron SARS-CoV-2 variant [Indeks]. Who.int. Dostupno na: [https://www.who.int/publications/m/item/enhancing-readiness-for-omicron-\(b.1.1.529\)-technical-brief-and-priority-actions-for-member-states](https://www.who.int/publications/m/item/enhancing-readiness-for-omicron-(b.1.1.529)-technical-brief-and-priority-actions-for-member-states)

12. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou J-J i sur. Isolation and Characterization of 2019-nCoV-like Coronavirus from Malayan Pangolins. *bioRxiv*. 2020.
13. Carlos WG, Dela Cruz CS, Cao B, Pasnick S, Jamil S. Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201:P7–8.
14. Zhou T, Liu Q, Yang Z, Liao J, Yang K, Bai W i sur. Preliminary prediction of the basic reproduction number of the Wuhan novel coronavirus 2019-nCoV. *J Evid Based Med*. 2020;13:3–7.
15. Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik F Jr. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2021;14:601–21.
16. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A review on the novel Coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses*. 2021;13:202.
17. Yi Y, Lagniton PNP, Ye S, Li E, Xu R-H. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *Int J Biol Sci*. 2020;16:1753–66.
18. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, Müller M, Drosten C, Pöhlmann S. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *bioRxiv*. 2020.
19. Liu J, Zheng X, Tong Q, Li W, Wang B, Sutter K i sur. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *J Med Virol*. 2020;92:491–4.
20. Fahey E, Doyle SL. IL-1 family cytokine regulation of vascular permeability and angiogenesis. *Front Immunol*. 2019;10:1426.
21. Gonzales JN, Lucas R, Verin AD. The acute Respiratory Distress Syndrome: Mechanisms and perspective therapeutic approaches. *Austin J Vasc Med*. 2015;2.
22. Robb CT, Goepf M, Rossi AG, Yao C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. *Br J Pharmacol*. 2020;177:4899–920.
23. Wong CK, Lam CWK, Wu AKL, Ip WK, Lee NLS, Chan IHS i sur. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2004;136:95–103.

24. Kong SL, Chui P, Lim B, Salto-Tellez M. Elucidating the molecular physiopathology of acute respiratory distress syndrome in severe acute respiratory syndrome patients. *Virus Res.* 2009;145:260–9.
25. Oran DP, Topol EJ. The proportion of SARS-CoV-2 infections that are asymptomatic : A systematic review: A systematic review. *Ann Intern Med.* 2021;174:655–62.
26. Chai X, Hu L, Zhang Y, Han W, Lu Z, Ke A i sur. Specific ACE2 expression in cholangiocytes may cause liver damage after 2019-nCoV infection. *bioRxiv.* 2020.
27. Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Zuo W. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the receptor of SARS-CoV-2. *bioRxiv.* 2020.
28. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z i sur. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395:1054–62.
29. Singhal T. A review of Coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr.* 2020;87:281–6.
30. Jin J-M, Bai P, He W, Wu F, Liu X-F, Han D-M i sur. Gender differences in patients with COVID-19: Focus on severity and mortality. *Front Public Health.* 2020;8:152.
31. Feldstein LR, Rose EB, Horwitz SM, Collins JP, Newhams MM, Son MBF i sur. Multisystem inflammatory syndrome in U.s. children and adolescents. *N Engl J Med.* 2020;383:334–46.
32. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y i sur. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395:497–506.
33. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H i sur. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* 2020;8:475–81.
34. Gąsecka A, Borovac JA, Guerreiro RA, Giustozzi M, Parker W, Caldeira D i sur. Thrombotic complications in patients with COVID-19: Pathophysiological mechanisms, diagnosis, and treatment. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2021;35:215–29.
35. Recalcati S. Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34:e212–3.

36. Ding T, Wang T, Zhang J, Cui P, Chen Z, Zhou S i sur. Analysis of ovarian injury associated with COVID-19 disease in reproductive-aged women in Wuhan, China: An observational study. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:635255.
37. Shen Q, Xiao X, Aierken A, Yue W, Wu X, Liao M i sur. The ACE2 expression in Sertoli cells and germ cells may cause male reproductive disorder after SARS-CoV-2 infection. *J Cell Mol Med*. 2020;24:9472–7.
38. Guan W-J, Liang W-H, Zhao Y, Liang H-R, Chen Z-S, Li Y-M i sur. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J*. 2020;55:2000547.
39. Thaweerat W. Current evidence on pancreatic involvement in SARS-CoV-2 infection. *Pancreatology*. 2020;20:1013–4.
40. Ahmad I, Rathore FA. Neurological manifestations and complications of COVID-19: A literature review. *J Clin Neurosci*. 2020;77:8–12.
41. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q i sur. Neurologic manifestations of hospitalized patients with Coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol*. 2020;77:683–90.
42. Kumric M, Ticinovic Kurir T, Martinovic D, Zivkovic PM, Bozic J. Impact of the COVID-19 pandemic on inflammatory bowel disease patients: A review of the current evidence. *World J Gastroenterol*. 2021;27:3748–61.
43. Koehler P, Cornely OA, Böttiger BW, Dusse F, Eichenauer DA, Fuchs F i sur. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2020;63:528–34.
44. Ejima K, Kim KS, Ludema C, Bento AI, Iwanami S, Fujita Y i sur. Estimation of the incubation period of COVID-19 using viral load indeks. *Epidemics*. 2021;35:100454.
45. Tang Y-W, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *J Clin Microbiol*. 2020;58.
46. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109:365–79.
47. Anawa. SARS-CoV-2 (Covid-19): Diagnosis by IgG/IgM Rapid Test [Indeks]. Anawa.ch. Dostupno na: <https://www.anawa.ch/read/newsletter-26/sars-cov-2-covid-19-diagnosis-by-2264.html>

48. Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C i sur. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;3:CD013705
49. Gandhi RT, Lynch JB, Del Rio C. Mild or moderate covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383:1757–66.
50. Singh AK, Singh A, Singh R, Misra A. Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. *Diabetes Metab Syndr.* 2021;15:102329.
51. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G i sur. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med.* 2022;386:305–315.
52. Mahase E. Covid-19: Pfizer’s paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. *BMJ.* 2021;375:n2713.
53. The RECOVERY Collaborative Group. Effect of hydroxychloroquine in hospitalized patients with covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383:2030–40.
54. Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;382:1787–99.
55. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res.* 2020;178:104787.
56. López-Medina E, López P, Hurtado IC, Dávalos DM, Ramirez O, Martínez E i sur. Effect of Ivermectin on Time to Resolution of Symptoms Among Adults With Mild COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2021;325:1426–1435.
57. Klassen SA, Senefeld JW, Senese KA, Johnson PW, Wiggins CC, Baker SE i sur. Convalescent plasma therapy for COVID-19: A graphical mosaic of the worldwide evidence. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:684151.
58. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R i sur. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384:238–51.
59. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, Boscia J, Heller B, Morris J i sur. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to



moderate COVID-19: A randomized clinical trial: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2021;325:632–44.

60. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, Crespo Casal M, Moya J, Falci DR i sur. Early treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab. *N Engl J Med*. 2021;385:1941–50.

61. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL i sur. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:693–704.

62. Huet T, Beaussier H, Voisin O, Jouveshomme S, Dauriat G, Lazareth I i sur. Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. *Lancet Rheumatol*. 2020;2:e393–400.

63. Rosas IO, Bräu N, Waters M, Go RC, Hunter BD, Bhagani S i sur. Tocilizumab in hospitalized patients with severe Covid-19 pneumonia. *N Engl J Med*. 2021;384:1503–16.

64. Lescure F-X, Honda H, Fowler RA, Lazar JS, Shi G, Wung P i sur. Sarilumab in patients admitted to hospital with severe or critical COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2021;9:522–32.

65. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A i sur. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet*. 2020;395:e30–1.

66. Kalil AC, Patterson TF, Mehta AK, Tomashek KM, Wolfe CR, Ghazaryan V i sur. Baricitinib plus remdesivir for hospitalized adults with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:795–807.

67. Cao Y, Wei J, Zou L, Jiang T, Wang G, Chen L i sur. Ruxolitinib in treatment of severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A multicenter, single-blind, randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146:137–146.e3.

68. Guimarães PO, Quirk D, Furtado RH, Maia LN, Saraiva JF, Antunes MO i sur. Tofacitinib in patients hospitalized with Covid-19 pneumonia. *N Engl J Med*. 2021;385:406–15.

69. Roschewski M, Lionakis MS, Sharman JP, Roswarski J, Goy A, Monticelli MA i sur. Inhibition of Bruton tyrosine kinase in patients with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020;5:eabd0110.

70. Alhazzani W, Møller MH, Arabi YM, Loeb M, Gong MN, Fan E i sur. Surviving Sepsis Campaign: Guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Crit Care Med.* 2020;48:e440–69.
71. CDC. How to protect yourself & others [Indeks]. Centers for Disease Control and Prevention. 2022. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/prevention.html>
72. Güner R, Hasanoğlu I, Aktaş F. COVID-19: Prevention and control measures in community. *Turk J Med Sci.* 2020;50:571–7.
73. Nussbaumer-Streit B, Mayr V, Dobrescu AI, Chapman A, Persad E, Klerings I i sur. Quarantine alone 45ri n combination with other public health measures to control COVID-19: a rapid review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;4:CD013574.
74. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S i sur. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383:2603–15.
75. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R i sur. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384:403–16.
76. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B i sur. Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384:2187–201.
77. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK i sur. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet.* 2021;397:99–111.
78. Dunkle LM, Kotloff KL, Gay CL, Áñez G, Adelglass JM, Barrat Hernández AQ i sur. Efficacy and safety of NVX-CoV2373 in adults in the United States and Mexico. *N Engl J Med.* 2022;386:531–43.
79. Aleem A, Nadeem AJ. StatPearls [Indeks]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): 2021. Coronavirus (COVID-19) Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT)
80. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, Bodenheimer O, Freedman L, Haas EJ i sur. Waning immunity after the BNT162b2 vaccine in Israel. *N Engl J Med.* 2021;385:e85.

81. Saiag E, Goldshmidt H, Sprecher E, Ben-Ami R, Bomze D. Immunogenicity of a BNT162b2 vaccine booster in health-care workers. *Lancet Microbe*. 2021;2:e650.
82. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez-Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC i sur. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;98:115094.
83. Mortality analyses [Indeks]. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/indeks/mortality>
84. Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, Jiang Z. Epidemiological Characteristics of 2143 Pediatric Patients With 2019 Coronavirus Disease in China. *Pediatrics*. 2020;145:1–15.
85. Vilovic T, Bozic J, Zuzic Furlan S, Vilovic M, Kumric M, Martinovic D i sur. Mental Health Well-Being and Attitudes on Mental Health Disorders among Family Physicians during COVID-19 Pandemic: A Connection with Resilience and Healthy Lifestyle. *J Clin Med*. 2022;11:438.
86. Guyton AC, Hall JE. Female Physiology Before Pregnancy and Female Hormones. U: Guyton AC, Hall JE, urednici. *Textbook of Medical Physiology*. 13. izdanje. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. str. 1037–54.
87. Sherwood L. The Reproductive System. U: Sherwood L., urednici. *Human Physiology From Cells to Systems*. 8. izdanje. Florence, KY: Brooks/Cole; 2015. str. 735–94.
88. Konar H. DC Dutta's textbook of gynecology. 8. izdanje. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical; 2020. 606 str.
89. Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn LR i sur. Male indeks identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun*. 2020;11:6317.
90. Kljakovic Gaspic T, Pavicic Ivelja M, Kumric M, Matetic A, Delic N, Vrkic I, Bozic J. In-Hospital Mortality of COVID-19 Patients Treated with High-Flow Nasal Oxygen: Evaluation of Biomarkers and Development of the Novel Risk Score Model CROW-65. *Life (Basel)*. 2021;11:735.
91. Schroeder M, Schaumburg B, Mueller Z, Parplys A, Jarczak D, Roedl K i sur. High estradiol and low testosterone levels are associated with critical illness in male but 46ri n46

female COVID-19 patients: a retrospective cohort study. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10:1807–18.

92. Salciccia S, Del Giudice F, Gentile V, Mastroianni CM, Pasculli P, Di Lascio G i sur. Interplay between male testosterone levels and the risk for subsequent invasive respiratory assistance among COVID-19 patients at hospital admission. *Endocrine.* 2020;70:206–10.

93. Çayan S, Uğuz M, Saylam B, Akbay E. Effect of serum total testosterone and its relationship with other laboratory parameters on the prognosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in SARS-CoV-2 infected male patients: a cohort study. *Aging Male.* 2020;23:1493–503.

94. Mikacic M, Kumric M, Baricevic M, Tokic D, Stojanovic Stipic S, Cvitkovic I i sur. Dynamic of serum TWEAK levels in critically ill COVID-19 male patients. *J Clin Med.* 2022;11:3699.

95. Mikacic M, Kumric M, Baricevic M, Tokic D, Stojanovic Stipic S, Cvitkovic I, Supe Domic D, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Dynamic of Serum TWEAK Levels in Critically Ill COVID-19 Male Patients. *J Clin Med.* 2022 Jun 27;11:3699.

96. D'agostino P, Milano S, Barbera C, Bella G, Rosa M, Ferlazzo V i sur. Indeks hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophagesa. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;876:426–9.

97. Ma L, Xie W, Li D, Shi L, Ye G, Mao Y i sur. Evaluation of indeks-related hormones and semen characteristics in reproductive-aged male COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2021;93:456–62.

98. Galasso V, Pons V, Profeta P, Becher M, Brouard S, Foucault M. Gender differences in COVID-19 attitudes and behavior: Panel evidence from eight countries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117:27285–91.

99. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA i sur. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med.* 1995;1:1279–83.

100. Rusic D, Vilovic M, Bukic J, Leskur D, Seselja Perisin A, Kumric M, Martinovic D, Petric A, Modun D, Bozic J. Implications of COVID-19 Pandemic on the Emergence of Antimicrobial Resistance: Adjusting the Response to Future Outbreaks. *Life (Basel).* 2021;11:220.

101. Papadopoulos V, Li L, Samplaski M. Why does COVID-19 kill more elderly men than women? Is there a role for testosterone? *Andrology.* 2021;9:65–72.

102. Messina G, Polito R, Monda V, Cipolloni L, Di Nunno N, Di Mizio G i sur. Functional Role of Dietary Intervention to Improve the Outcome of COVID-19: A Hypothesis of Work. *Int J Mol Sci.* 2020;21:3104.
103. Rastrelli G, Di Stasi V, Inglese F, Beccaria M, Garuti M, Di Costanzo D i sur. Low testosterone levels predict clinical adverse outcomes in SARS-CoV-2 pneumonia patients. *Andrology.* 2021;9:88–98.
104. Ntyonga-Pono MP. COVID-19 infection and oxidative stress: an under-explored approach for prevention and treatment? *Pan Afr Med J.* 2020;35:12.
105. Laforge M, Elbim C, Frère C, Hémadi M, Massaad C, Nuss P i sur. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative 48ri n48sin COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020;20:515–516.
106. Han A, Zou L, Gan X, Li Y, Liu F, Chang X i sur. ROS generation and MAPKs activation contribute to the Ni-induced testosterone synthesis disturbance in rat Leydig cells. *Toxicol Lett.* 2018;290:36–45.
107. Marin DP, Bolin AP, dos Santos Rde C, Curi R, Otton R. Testosterone suppresses oxidative 48ri n48sin human neutrophils. *Cell Biochem Funct.* 2010;28:394–402.
108. Asadi-Pooya AA, Simani L. Central nervous system manifestations of COVID-19: A systematic review. *J Neurol Sci.* 2020;413:116832.
109. Thom RP, Levy-Carrick NC, Bui M, Silbersweig D. Delirium. *Am J Psychiatry.* 2019;176:785–93.
110. Cooper J, Stukas S, Hoiland RL, Fergusson NA, Thiara S, Foster D i sur. Quantification of neurological blood-based biomarkers in critically ill patients with Coronavirus disease 2019. *Crit Care Explor.* 2020;2:e0238.
111. Baig AM, Khaleeq A, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11:995–998.
112. Baig AM. Neurological manifestations in COVID-19 caused by SARS-CoV-2. *CNS Neurosci Ther.* 2020;26:499–501.

113. Agrawal N, Chougale SD, Jedge P, Iyer S, Dsouza J. Brixia Chest X-ray scoring system in critically ill patients with COVID-19 pneumonia for determining outcomes. *J Clin Diagn Res.* 2021.
114. Schmidt M, Guidet B, Demoule A, Ponnaiah M, Fartoukh M, Puybasset L i sur. Predicting 90-day survival of patients with COVID-19: Survival of Severely Ill COVID (SOSIC) scores. *Ann Intensive Care.* 2021;11:170.
115. Allyn J, Ferdynus C, Bohrer M, Dalban C, Valance D, Allou N. Simplified Acute Physiology Score II as predictor of mortality in Intensive care Units: A Decision Curve Analysis. *PloS One.* 2016;11:e0164828.
116. Scherer C, Lüsebrink E, Joskowiak D, Feuchtgruber V, Petzold T, Hausleiter J i sur. Mortality in cardiogenic shock patients is predicted by Pao<sub>2</sub>/Fio<sub>2</sub> (Horowitz indeks) measured on ICU after venoarterial extracorporeal membrane oxygenation implantation. *Crit Care Explor.* 2021;3:e0540.
117. Casas-Deza D, Bernal-Monterde V, Aranda-Alonso AN, Montil-Miguel E, Julián-Gomara AB, Letona-Giménez L i sur. Age-related mortality in 61,993 confirmed COVID-19 cases over three epidemic waves in Aragon, Spain. Implications for vaccination programmes. *PloS One.* 2021;16:e0261061.
118. Henkens MTHM, Raafs AG, Verdonschot JAJ, Linschoten M, van Smeden M, Wang P i sur. Age is the main determinant of COVID-19 related in-hospital mortality with minimal impact of pre-existing comorbidities, a retrospective cohort study. *BMC Geriatr.* 2022;22:184.
119. Nseir S, Di Pompeo C, Pronnier P, Beague S, Onimus T, Saulnier F i sur. Nosocomial tracheobronchitis in mechanically ventilated patients: incidence, aetiology and outcome. *Eur Respir J.* 2002;20:1483–9.
120. Bardi T, Pintado V, Gomez-Rojo M, Escudero-Sanchez R, Azzam Lopez A, Diez-Remesal Y i sur. Nosocomial infections associated to COVID-19 in the intensive care unit: clinical characteristics and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40:495–502.
121. Zuin M, Rigatelli G, Zuliani G, Rigatelli A, Mazza A, Roncon L. Arterial hypertension and risk of death in patients with COVID-19 infection: Systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2020;81:e84–6.

122. Huang I, Lim MA, Pranata R. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia – A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14:395–403.
123. Henry BM, Aggarwal G, Wong J, Benoit S, Vikse J, Plebani M i sur. Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis. *Am J Emerg Med.* 2020;38:1722–6.
124. Salvatici M, Barbieri B, Cioffi SMG, Morenghi E, Leone FP, Maura F i sur. Association between cardiac troponin I and mortality in patients with COVID-19. *Biomarkers.* 2020;25:634–40.
125. Aamodt AH, Høgestøl EA, Popperud TH, Holter JC, Dyrhol-Riise AM, Tonby K i sur. Blood neurofilament light concentration at admittance: a potential prognostic marker in COVID-19. *J Neurol.* 2021;268:3574–83.
126. Seal KH, Bertenthal D, Carey E, Grunfeld C, Bikle DD, Lu CM. Association of vitamin D status and COVID-19-related hospitalization and mortality. *J Gen Intern Med.* 2022;37:853–61.
127. Borsche L, Glauner B, von Mendel J. COVID-19 mortality risk correlates inversely with vitamin D3 status, and a mortality rate close to zero could theoretically be achieved at 50 ng/mL 25(OH)D3: Results of a systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2021;13:3596.
128. Campi I, Gennari L, Merlotti D, Mingiano C, Frosali A, Giovanelli L i sur. Vitamin D and COVID-19 severity and related mortality: a prospective study in Italy. *BMC Infect Dis.* 2021;21:566.

## **8. SAŽETAK**



**Cilj istraživanja:** Glavni cilj istraživanja je usporediti serumske razine GFAP-a između bolesnika koji su preživjeli teški oblik COVID-19 i bolesnika koji su preminuli od iste za vrijeme boravka u bolnici. Nadalje, dodatni cilj je usporediti značajke hormonskog statusa između skupina. Konačno, cilj je utvrditi postoji li povezanost između serumskih razina GFAP-a te laboratorijskih parametara i zahvaćenosti plućnog parenhima u COVID-19 bolesnika.

**Ispitanici i postupci:** Istraživanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru Split, u Jedinici intenzivnog liječenja (JIL), u razdoblju od prosinca 2021. do svibnja 2022. godine. U istraživanje je uključeno 50 muškaraca, u dobi od 18-65 godina, koji boluju od teškog oblika bolesti COVID-19. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine. U prvoj skupini su bolesnici bez smrtnog ishoda ( $n=37$ ), dok u drugoj skupini su oni u kojih je nastupio smrtni ishod ( $n=13$ ). Određivanje svih laboratorijskih parametara je provedeno prema standardnoj proceduri na Odjelu za laboratorijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split. Sva uzorkovanja su izvršena na dan prijema u JIL.

**Rezultati:** Utvrđena je statistički značajno niža razina serumskog GFAP-a u preživjelih u odnosu na ispitanike koji su preminuli tijekom boravka u bolnici ( $27,5 \pm 7,2$  pg/mL vs.  $34,9 \pm 8,3$  pg/mL,  $P=0,028$ ). Usporedbom hormonskog statusa, utvrđena je statistički značajno viša razina vitamina D u preživjelih ispitanika ( $40,2 \pm 18,6$  vs  $27,4 \pm 17,0$  nmol/L,  $P= 0,040$ ). Nije pronađena značajna razlika u razinama spolnih hormona između skupine bolesnika s i bez smrtnog ishoda. Određena je statistički značajna pozitivna korelacija između serumskih koncentracija GFAP i testosterona ( $r=-0,310$ ,  $P=0,036$ ). Također, pronađena je pozitivna korelacija između serumske razine GFAP-a i Brixia zbiru ( $r=0,481$ ,  $P<0,001$ ).

**Zaključci:** Naše istraživanje je pokazalo da su veće serumske koncentracije GFAP unutar skupine bolesnika u kojih je nastupio smrtni ishod. Nije pronađena značajna razlika u razini spolnih hormona, dok je razina vitamina D značajno niža unutar skupine bolesnika u kojih je nastupio smrtni ishod. Serumska koncentracija GFAP pozitivno korelira s Brixia zbirom te negativno korelira sa serumskom razinom testosterona.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Serum concentrations of glial fibrillar acid protein and hormonal status of sex hormones in male patients with severe form of COVID-19

**Objectives:** The main aim of the study is to compare the serum levels of GFAP between patients with a severe form of COVID-19 in whom the fatal outcome occurred and patients who survived. Also, an additional goal was to determine the characteristics of the hormonal status between the mentioned groups. In addition to the above, the goal was to determine the relationship between serum GFAP levels, laboratory parameters and lung parenchyma involvement with COVID-19.

**Subjects and procedures:** The research was conducted at the University Hospital of Split, in the Intensive Care Unit (ICU), in the period from December 2021 to May 2022. The study included 50 men, aged 18-65, who suffer from a severe form of COVID-19. The respondents were divided into two groups. The first group includes patients without a fatal outcome (n=37), while the second group includes those with a fatal outcome (n=13). The determination of all laboratory parameters was carried out according to the standard procedure at the Department of Laboratory Medicine of the University Hospital of Split. All samplings were performed on the day of admission to the ICU.

**Results:** A statistically significantly lower level of serum GFAP was found in survivors compared to subjects who died during hospital stay ( $27.5 \pm 7.2$  pg/mL vs.  $34.9 \pm 8.3$  pg/mL,  $P = 0.028$ ). Comparing the hormonal status, a statistically significantly higher level of vitamin D was found in the surviving subjects ( $40.2 \pm 18.6$  vs  $27.4 \pm 17.0$  nmol/L,  $P = 0.040$ ). No significant difference was found in sex hormone levels between the group of patients with and without a fatal outcome. A statistically significant positive correlation was determined between serum concentrations of GFAP and testosterone ( $r = -0.310$ ,  $P = 0.036$ ). Also, a positive correlation was found between serum GFAP level and Brixia score ( $r = 0.481$ ,  $P < 0.001$ ).

**Conclusions:** Our research has shown that higher serum concentrations of GFAP were found in the group of patients who had a fatal outcome. No significant difference was found in the level of sex hormones, while the level of vitamin D was significantly lower in the group of patients who died. The serum concentration of GFAP positively correlates with the Brixia score and negatively correlates with the serum level of testosterone.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI**

Ime i prezime: Josip Majić

Datum rođenja: 15. travnja 1998.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

Državljanstvo: Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Pujanke 61, Split

## **OBRAZOVANJE**

2004. – 2012. Osnovna škola Pujanke, Split

2012. – 2016. IV. Gimnazija „Marko Marulić“, Split

2016. – 2022. Medicinski fakultet, studij medicina, Sveučilište u Splitu

## **VJEŠTINE**

Aktivno korištenje engleskog te razumijevanje talijanskog jezika

Vozačka dozvola B kategorije

Dobitnik Dekanove nagrade

Informatička pismenost