

# Analiza serumskih koncentracija katestatina i GDF-15 u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19

---

**Kljaković-Gašpić, Toni**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

*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:171:982472>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-23**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**TONI KLJAKOVIĆ-GAŠPIĆ, dr. med.**

**ANALIZA SERUMSKIH KONCENTRACIJA KATESTATINA  
I GDF-15 U BOLESNIKA S TEŠKIM I KRITIČNIM  
OBLIKOM COVID-19**

**DOKTORSKI RAD**

**SPLIT, 2024.**

Ova doktorska disertacija izrađena je na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Split i Katedre za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Joško Božić, dr. med.

## Zahvala

*Hvala mom mentoru Jošku Božiću na stručnoj pomoći, savjetima i prijateljskoj podršci prilikom izrade ovog rada.*

*Hvala svim kolegama COVID stacionara koji su u dugom periodu pandemije bili moja druga obitelj.*

*Najveće hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci cijelo ovo vrijeme; trebalo je živaca za istrpiti me, priznajem.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Koronavirusna bolest .....	2
1.1.1. Etiologija i epidemiologija.....	3
1.1.2. Prijenos virusa i inkubacija.....	4
1.1.3. Patofiziologija COVID-19 .....	7
1.1.4. Klinička slika .....	9
1.1.4.1. Respiracijske manifestacije COVID-19.....	9
1.1.4.2. Manifestacije COVID-19 na druge organe .....	11
1.1.4.2.1. Kardiovaskularni sustav .....	11
1.1.4.2.2. Neurološki sustav .....	11
1.1.4.2.3. Urogenitalni sustav .....	12
1.1.4.2.4. Gastrointestinalni sustav .....	12
1.1.4.2.5. Endokrinološki sustav .....	12
1.1.5. Dijagnostičke metode .....	12
1.1.5.1. Radiološke pretrage .....	13
1.1.6. Liječenje.....	14
1.2. Katestatin .....	17
1.2.1. Katestatin i kardiovaskularni sustav .....	18
1.2.2. Katestatin i upalne bolesti crijeva.....	19
1.2.3. Katestatin i reumatoidni artritis .....	20
1.2.4. Katestatin i OSA .....	20
1.3. GDF-15 .....	21
1.3.1. GDF-15 i kardiovaskularni sustav .....	21
1.3.2. GDF-15 i maligna bolest.....	22
1.3.3. GDF-15 i metaboličke bolesti.....	23
1.3.4. GDF-15 i plućne bolesti.....	23
1.3.5. GDF-15 i bakterijske infekcije .....	23
1.3.6. GDF-15 i ostali organi .....	24
1.4. Vitamin D.....	25
1.4.1. Vitamin D i kardiovaskularni sustav .....	26
1.4.2. Antimikrobni učinci vitamina D .....	26
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	29

3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	31
3.1. Dizajn istraživanja i etička načela.....	32
3.2. Ispitanici.....	32
3.3. Postupci.....	34
3.3.1. Klinički pregled i antropometrijska mjerenja .....	34
3.3.2. Uzorkovanje krvi i laboratorijske analize .....	34
3.3.2.1. Određivanje serumskih koncentracija katestatina.....	35
3.3.2.2. Određivanje serumskih koncentracija GDF-15 .....	35
3.4. Statistički postupci .....	35
4. REZULTATI.....	37
4.1. Osnovne antropometrijske i kliničke karakteristike ispitanika .....	38
4.2. Klinički i laboratorijski pokazatelji .....	39
4.3. Razine katestatina, Vitamina D i GDF-15 u bolesnika sa teškim i kritičnim COVID-19 .....	40
4.3. Korelacija katestatina i laboratorijskih i kliničkih pokazatelja.....	42
4.4. Katestatin, vitamin D i GDF-15 u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 .....	44
5. RASPRAVA .....	50
6. ZAKLJUČCI.....	55
7. LITERATURA .....	57
8. SAŽETAK .....	78
10. ŽIVOTOPIS.....	84

## POPIS OZNAKA I KRATICA

**ACE 2** - Angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. *Angiotensin- converting enzyme 2*)

**AKI** - Akutno bubrežno zatajenje

**ATP** - Adenozin trifosfat

**ChgA** - Kromogranin A (engl. *Chromogranin A*)

**COVID-19** - Koronavirusna bolest 2019 (engl. *Coronavirus disease 2019*)

**CPAP** - Kontinuirani pozitivni tlak (engl. *Continuous positive airway pressure*)

**CRS** - Sindrom otpuštanja citokina (engl. *Cytokine release syndrome*)

**CST** - Katestatin (engl. *Catestatin*)

**CT** - Kompjutorizirana tomografija (engl. *Computerized tomography*)

**ECM** - Izvanstanični matriks (engl. *Extracellular matrix*)

**ECMO** - Vantjelesna membranska oksigenacija (engl. *extracorporeal mechanical oxygenation*)

**GDF-15** - Faktor diferencijacije rasta (engl. *Growth Differentiation Factor 15*)

**GFRAL** - Receptor obitelji GDNF (engl. *GDNF family receptor  $\alpha$ -like*)

**GGO** - poput mliječnog stakla (engl. *ground glass opacity*)

**HFNO** - Oksigenacija visokim protkom preko nosne kanile (engl. *High flow nasal oxygenation*)

**HRV** - varijabilnost srčane frekvencije (engl. *Heart rate variability*)

**IBD** - Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease*)

**JIL** - Jedinica intenzivnog liječenja

**LUS** - Ultrazvuk pluća (engl. *Lung ultrasound*)

**MERS-CoV** - Koronavirus bliskoistočnog respiratornog sindroma (engl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*)

**MIC** - Inhibirajući citokin makrofaga (engl. *Macrophage inhibitory cytokine 1*)

**nAChR** - Nikotinski kolinergični receptor (engl. *nicotinic acethylcoline receptor*)

**NAG-1** - Nesteroidni protuupalni gen induciran lijekom (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drug-inducible gene*)

**NIH** - Američki nacionalni institut za zdravlje (engl. *National Institute of Health*)

**OSA** - Apneja prilikom spavanja (engl. *Obstructive sleep apnea*)

**PLAB** - Morfogenetski protein placente (engl. *Placental bone morphogenetic protein*)

**pTGFB** - Transformirajući faktor rasta placente (engl. *Placental transforming growth factor-beta*)

**RA** - Reumatoidni artritis

**RAAS** - Renin angiotenzin aldosteron sustav

**RNK** - Ribonukleinska kiselina

**RT-PCR** - Lančana reakcija polimerazom reverznom transkripcijom (engl. *Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction*)

**SARS-CoV** - Koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus*)

**SARS-CoV-2** - Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

**RNK** - Ribonukleinska kiselina

**MERS-CoV** - Koronavirus bliskoistočnog respiratornog sindroma (engl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*)

**ssRNA+** - Pozitivna jednolančana ribonukleinska kiselina (engl. *single-stranded, positive-sense ribonucleic acid*)

**TGF-β** - Transformirajućeg faktora rasta (engl. *transforming growth factor beta*)

**WHO** - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)



## **1. UVOD**

## 1.1. Koronavirusna bolest

Koronavirusna bolest - COVID 19 je zarazna bolest uzrokovana SARS-CoV-2 virusom. Sami naziv uzročnika bolesti - SARS (engl. *Severe acute respiratory syndrome*) ukazuje da bolest prvenstveno uzrokuje simptome vezane za infekciju dišnog puta. Većina zaraženih osoba bolest preboli asimptomatski oblik bolesti ili blaži tip bolesti bez potrebe za aktivnim bolničkim liječenjem. Najugroženija skupina su stariji bolesnici sa komorbiditetima poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, kroničnim plućnim bolestima i malignim bolestima. Navedeni bolesnici češće razviju tešku kliničku sliku bolesti sa potencijalnim fatalnim ishodom. Međutim, ni osobe ostalih dobnih skupina nisu pošteđene loših ishoda, ali ipak u znatno manjem postotku (1).

Koronavirusi su RNK virusi s najvećim genom u skupini RNK virusa. Sam genom se nalazi unutar glikoproteinske ovojnice virusa. Pod elektronskim mikroskopom izgled te ovojnice podsjeća na krunu, te upravo zbog toga se ovi virusi nazivaju koronavirusima (lat. *corona* – kruna) (2).

Pripadaju obitelji *Coronaviridae* i dijele se na 4 roda: alfa koronavirusi, beta koronavirusi, gama koronavirusi i delta koronavirusi. Alfa i beta koronavirusi su odgovorni za infekcije sisavaca, dok su gama koronavirusi i delta koronavirusi odgovorni za infekcije sisavaca i ptica. Uobičajeno stanište koronavirusa su životinje: šišmiši, miševi, štakori, kokoši, psi, mačke, deve. Međutim pojedini koronavirusi su stekli sposobnost prelaska sa životinja na čovjeka. Do sada je zabilježeno 7 vrsta koronavirusa koji uzrokuju infekcije u čovjeka. Najčešće su to bolesti s blažim simptomima, poput infekcije gornjeg dišnog sustava u obliku obične prehlade. Međutim ponekad se mogu razviti i teži oblici poput teških i smrtonosnih infekcija. Od navedenih sedam, četiri (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, i HCoVHKU1) ih uzrokuje infekcije koje nalikuju prehladi. Ostale tri vrste humanog koronavirusa (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV2) mogu izazvati teške upale pluća s razvojem akutnog respiracijskog distress sindroma i nerijetko smrtnim posljedicama (3).

Koronavirus teškog akutnog respiracijskog sindroma (SARS-CoV) je identificiran u Južnoj Kini 2002. godine, gdje je izazvao epidemiju koja se raširila na više desetaka zemalja u svijetu. Ukupno je zabilježeno više od 8000 slučajeva bolesti sa simptomima blagih upala gornjeg dišnog puta do teških upala pluća. Procijenjena smrtnost je bila oko 7% (4).

Druga veća epidemija uzrokovana koronavirusom s teškom kliničkom slikom u obliku teške upale pluća sa smrtnim posljedicama zabilježena je na Bliskom istoku 2012. godine. Kao

uzročnik je identificiran MERS-CoV. Ukupno je zabilježeno 662 zaražena bolesnika sa smrtnošću većom od 35 % (5). Treća i najveća epidemija, kasnije i pandemija uzrokovana je novim koronavirusom akutnog respiratornog sindroma - SARS-CoV2 (5).

### **1.1.1. Etiologija i epidemiologija**

SARS-CoV-2 kao nepoznati beta koronavirus otkriven je u prosincu 2019. godine u uzorcima bronhoalveolarnog lavata kod bolesnika s upalom pluća nepoznatog uzroka u kineskom gradu Wuhanu, provinciji Hubei. (6). Još uvijek nije točno razjašnjeno, ali se sumnja na prijenos virusa sa životinje na čovjeka. Epidemija je započela u prosincu 2019. godine i brzo se proširila na cijeli svijet, te je izazvala velike probleme u funkcioniranju zdravstvenog sustava čitavog svijeta. Tijekom svih godina pandemije SARS-CoV-2 pokazao je sklonost mutacijama, te je virus mijenjao svoju strukturu. Samim time su se i kliničke slike ovisno o soju virusa razlikovale. Na taj način je virus izbjegavao već izgrađene imunološke mehanizme organizma i smanjio učinkovitost cjepiva (7).

SARS-CoV-2 pripada rodu Beta coronavirus, podobitelji Orthocoronavirinae u obitelji Coronaviridae i redu Nidovirile. Krioelektronskom tomografijom tj. elektronskim mikroskopom je utvrđena pleomorfnost virusne čestice, koja posjeduje nesegmentiranu pozitivnu jednolančanu ribonukleinsku kiselinu kao svoj genom - ssRNA+ (4).

Većina bolesnika u početnim fazama ove epidemije pokazivali su povezanost s južnokineskom tržnicom plodova mora, živom životinjskom ili tzv. "mokrom" tržnicom, što ukazuje na zoonotsko podrijetlo virusa (6,8,9). Početna procjena dinamike prijenosa u prvih 425 potvrđenih slučajeva pokazala je da je 55% slučajeva prije 1. siječnja 2020. bilo povezano s tržnicom, dok je samo 8,6% slučajeva nakon tog datuma bilo povezano s tržnicom. Navedeni podatak sugerira da se širenje s osobe na osobu događalo bliskim kontaktima sa zaraženima od sredine prosinca 2019. godine (6).

Zoonotsko podrijetlo virusa još uvijek nije potvrđeno. Neka istraživanja sugeriraju da bi SARS-CoV-2 mogao biti rekombinantni virus koronavirusa šišmiša i koronavirusa nepoznatog podrijetla, a kao mogući vektor između šišmiša i čovjeka se navodi pangolin. Međutim, trenutno nema dokaza koji bi pokazali mogući put prijenosa iz rezervoara šišmiša na ljude preko jedne ili nekoliko posredničkih životinjskih vrsta (10).

### 1.1.2. Prijenos virusa i inkubacija

SARS-CoV-2 se prenosi najčešće respiratornim putem, a blizina je ključna odrednica rizika prijenosa (11). Dostupni dokazi upućuju na to da do prijenosa između ljudi dolazi prvenstveno kada je zaražena osoba u bliskom kontaktu s drugom osobom. Virus se može širiti iz usta ili nosa zaražene osobe u malim česticama tekućine (u rasponu veličine od većih kapljica do manjih aerosola) kada osoba kašlje, kiše, pjeva, teško diše ili govori. Kontakt iz neposredne blizine može rezultirati udisanjem ili inokulacijom virusa kroz usta, nos ili oči (12).

Do prijenosa aerosolom može doći u zdravstvenim ustanovama tijekom postupaka koji stvaraju aerosol. Prijenos aerosolom moguć je u zatvorenim prostorima s lošom ventilacijom i velikim brojem ljudi (12,13). Rizik od prijenosa virusa puno je manji u vanjskim uvjetima u usporedbi sa zatvorenim prostorom, s ograničenim brojem studija koje procjenjuju stopu prijenosa od <1% (14).

Fekalno-oralni prijenos (ili respiratorni prijenos preko fecesa u obliku aerosola) može biti moguć, ali postoje samo ograničeni posredni dokazi koji podržavaju ovaj način prijenosa (11). Prijenos putem drugih tjelesnih tekućina (uključujući prijenos spolnim putem ili prijenos krvlju) nije zabilježen (11). Iako je virus otkriven u tjelesnim tekućinama (npr. sjemenoj tekućini, urinu, cerebrospinalnoj tekućini, očnim tekućinama), prisutnost virusa ili virusnih komponenti ne znači da je osoba infektivna. Postoje ograničeni podaci o riziku prijenosa s donora organa. Međutim, čini se da postoji nizak rizik od prijenosa virusa sa organa poput bubrega, jetre ili srca SARS-CoV-2 pozitivnih darivatelja, bez obzira na to ima li darivatelj simptome u vrijeme eksplantacije (15). Perinatalni (vertikalni) prijenos događa se rijetko, ali zabilježen je transplacentalni prijenos virusa (16). Virusni fragmenti otkriveni su u majčinom mlijeku; međutim, ovaj je nalaz neuobičajen i, kada se dogodi, povezan je s blagim simptomima u dojenčadi (17).

Srednje trajanje zaraznosti kod bolesnika s blagim oblikom COVID-19 bolesti je otprilike 5 dana (od 3 do 7 dana). Manje od 25% slučajeva izluči SARS-CoV-2 prije pojave simptoma. Dvije trećine slučajeva bile su zarazne 5 dana nakon pojave simptoma, a jedna trećina je bila zarazna 7 dana nakon pojave simptoma (18). Daljnji prijenos ovisi o specifičnom domaćinu i čimbenicima kontakta, te prirodi izloženosti.

Čimbenici povezani s povećanim prijenosom uključuju (19):

- Čimbenici okoline: zatvoreni prostor, loša ventilacija, gužva, neposredna blizina, zajednički prostori, niska temperatura okoline, niska vlažnost
- Čimbenici domaćina: nedavno zaraženi, visoko virusno opterećenje, teška bolest, dob, prisutnost komorbiditeta, imunokompromitirani bolesnici
- Čimbenici ponašanja: pjevanje/vikanje, kašljanje/kihanje, grljenje/ljubljenje, bonton maski, higijena ruku, trajanje kontakta
- Virusni čimbenici: promjene u virusnom genomu povezane s povećanom prijenosnošću.

Kod simptomatskih bolesnika prijenos se uglavnom događa putem respiratornih kapljica ili aerosola tijekom bliskog kontakta sa zaraženim simptomatskim slučajem. Prenosivost ovisi o količini virusa koju osoba izluči i izbaci, vrsti kontakta, okruženju i mjerama prevencije i kontrole infekcije koje su na snazi (20).

Procijenjeno trajanje inkubacije SARS-CoV-2 je između 1 i 14 dana s medijanom od 5 do 7 dana. Međutim, razdoblje inkubacije postupno se smanjivalo od Alpha varijante do Omikron varijante: divlji tip virusa - 5,2 dana; Alfa varijanta - 5 dana; Beta varijanta - 4,5 dana; Delta varijanta - 4,41 dana; Omikron varijanta - 3,42 dan (9).

Za vrijeme pandemije identificirano je pet varijanti SARS-CoV-2. Prvi val epidemije uzrokovala je Alfa varijanta virusa koja je potvrđena krajem 2020. godine. Beta varijanta je otkrivena također krajem 2020. godine i odgovorna je za drugi val epidemije. Gama varijanta je prvi put zabilježena u SAD-u početkom 2021. godine. Najznačajnija varijanta virusa koja je uzrokovala brzo širenje sa velikom zaraznošću je Delta varijanta. Prvi put je detektirana u Indiji krajem 2020. godine da bi u SAD-u uzrokovala probleme početkom proljeća 2021. godine. Vrlo brzo se proširila svijetom i uzrokovala značajne javnozdravstvene probleme. Ovo je ujedno varijanta virusa kojom su bili zaraženi bolesnici u ovom istraživanju. Omikron je varijanta virusa sa visokom sklonošću mutacijama, zaraznija od prethodnih varijanti, ali srećom s blažim kliničkim slikama (21–24).

SARS-CoV-2 je vrlo prenosiva bolest i reproduktivni broj ( $R_0$ ) koje bi zaražena osoba mogla potencijalno zaraziti iznosi od 3 do 5.  $R_0$  je vrijednost koja se koristi za kategoriziranje zaraznosti pojedine zarazne bolesti; što je broj veći to je i zaraznost veća. Recimo za usporedbu da je  $R_0$  za ospice 12-18, vodene kozice 8-9, a za rinoviruse 5-7 (25).

Čini se da je virusno opterećenje vodeći pokretač prijenosa virusa, a veća količina virusa povezana je i sa većim rizikom od razvoja simptomatske bolesti. Virusno opterećenje najveće

je u gornjim dišnim putovima odnosno u nazofarinksu i orofarinksu u ranom tijeku infekcije i obično dostiže vrhunac u prvom tjednu bolesti. Napredovanjem bolesti količina virusa se povećava u donjim dišnim putovima. Virusno opterećenje se smanjuje nakon pojave simptoma. Bolesnici s teškim oblikom COVID-a imaju veće virusno opterećenje u usporedbi s bolesnicima s blagim oblikom bolesti. Prosječno trajanje izlučivanja virusa ovisi o uzorku: 17 dana u gornjim dišnim putovima (maksimalno 83 dana); 14,6 dana u donjem respiracijskom traktu (najviše 59 dana); i 17,2 dana u stolici (najviše 126 dana). Za napomenuti je da izlučivanje virusa kod imunokompromitiranih osoba može potrajati i dva mjeseca (26,27).

Životni ciklus virusa s domaćinom može se podijeliti u 5 stadija: pričvršćivanje, prodiranje, biosinteza, sazrijevanje i oslobađanje. Nakon što se virusi vežu za receptor domaćina, endocitozom ili fuzijom membrane penetriraju u stanice domaćina. Po ulasku u stanicu virusni sadržaj se oslobađa, a virusna RNA ulazi u jezgru zbog replikacije. Virusna mRNA sudjeluje u stvaranju virusnih proteina što nazivamo biosintezom. Potom nove virusne čestice sazrijevaju i oslobađaju se čime je kompletiran životni ciklus virusa (28).

Koronavirusi se sastoje od četiri strukturalna proteina: protein S (engl. *spike* – šiljak), protein M (engl. *membrane* – membrana), protein E (engl. *envelop*, ovojnica), protein N (engl. *nucleocapsid*, nukleokapsida). Protein S se sastoji od transmembranskog trimetrijskog glikoproteina koji strši iz površine virusa, i upravo taj protein određuje raznolikost virusa i tropizam domaćina. Odgovoran je za imunološki odgovor organizma i aktivirajući endoplazmatski retikulum uključen je u virusnu patogenezu. Dvije funkcionalne podjedinice su sastavni dio šiljastog glikoproteina; S1 podjedinica je odgovorna za adheziju virusa za stanicu domaćina preko ACE2 receptora i S2 podjedinica koja je odgovorna za fuziju sa staničnom membranom domaćina (29,30). Kod ljudi, primarna fiziološka funkcija ACE2 je pretvaranje peptida angiotenzina I i II u angiotenzin 1-9 i angiotenzin 1-7, koji osiguravaju zaštitne kardiovaskularne funkcije kroz mehanizme koji uključuju vazodilataciju i kontrolu propusnosti endotela. Infekcija sa SARS-CoV-2 rezultira smanjenjem razine ACE2 i poremećajem u RAAS sustavu koji pojačava signalizaciju kroz put angiotenzina II što dovodi do potencijalno teške upalne i cirkulacijske disfunkcije (31).

Nakon vezanja SARS-CoV-2 na ACE2, S protein se aktivira putem cijepanja proteazom u dva koraka: početno cijepanje stabilizira S2 podjedinicu na mjestu vezanja, a naknadno cijepanje vjerojatno aktivira S protein uzrokujući promjene koje dovode do fuzije virusa i stanične membrane domaćina (32).

Postmembranskom fuzijom, virus ulazi u plućne alveolarne epitelne stanice oslobađajući virusni sadržaj. Unutar stanice domaćina pomoću već postojeće jednolančane

pozitivne RNA kroz aktivnost RNA polimeraze (*transkripcija*) virus prolazi replikaciju i formiranje negativnog lanca RNA. Ovaj novoformirani negativni lanac RNA služi za proizvodnju novih pozitivnih RNA lanaca koji zatim nastavljaju sintetizirati nove proteine u staničnoj citoplazmi. Virusni N protein veže novu genomsku RNA, a M protein olakšava integraciju na stanični endoplazmatski retikulum (ER). Ovi novoformirani nukleokapsidi su zatim zatvoreni u membranu ER i u tom obliku se transportiraju u lumen. Golgijevim tjelešcima se potom transportiraju do stanične membrane i zatim egzocitozom izlaze u izvanstanični prostor. Nove virusne čestice su potom spremne za invaziju na susjedne epitelne stanice kao i za širenje svježeg infektivnog materijala putem respiratornih kapljica (33).

### 1.1.3. Patofiziologija COVID-19

U početnoj fazi bolesti SARS-CoV-2 veže se za ACE2 receptore epitelnih stanica sluznice gornjeg dišnog puta te na taj način ulazi u organizam. Potom dolazi do migracije virusa iz nosnog epitela u gornje dišne putove. Zbog zahvaćenosti gornjih dišnih putova bolest se manifestira simptomima povišene temperature, malaksalosti i suhog kašlja. U vrijeme provedenog istraživanja kod jedne petine svih zaraženih bolesnika, bolest bi napredovala do najtežeg oblika bolesti sa razvijanjem ARDS-a (34).

Zadaća imunološkog sustava je prepoznati prisutnost štetnog uzročnika u organizmu, upalnim odgovorom pospješiti njegovu eliminaciju, podržavati popravak oštećenja i povratak u osnovno stanje. Sve je orkestrirano citokinima, „jezikom“ putem kojeg imunološke stanice međusobno komuniciraju i koordiniraju se. Složena mreža regulatornih mehanizama jamči ravnotežu između proizvodnje proupalnih i protuupalnih citokina tako da reakcija ostaje ograničena. Neuspjeh jednog ili više ovih mehanizama može dovesti do prekomjerne aktivacije imunološkog sustava i masivne proizvodnje citokina, uzrokujući upalnu reakciju koja više nije lokalizirana, već sustavna, sa štetnim posljedicama za cijeli organizam (35).

Prethodne studije su pokazale da su SARS-CoV-1 i MERS sposobni izazvati citokinsku oluju (36). Stoga je, nakon pojave SARS-CoV-2, citokinska oluja zagovarana kao ključni patogenetski čimbenik u COVID-19. Istraživanja ukazuju su da se u COVID-19 bolesnika mogu očekivati povećane razine upalnih citokina, uključujući IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ -inducibilni protein 10 (IP-10), faktor stimulacije kolonija granulocitnih makrofaga (GM-CSF) i monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1) te da prisutnost tih citokina korelira sa težinom bolesti (8,37). Istraživanja su također pokazala prisutnost upalnih

infiltrata unutar različitih tkiva u bolesnika s COVID-19 (38,39). U većini slučajeva, bolest se sastoji od sindroma nalik gripi. Međutim, u predisponiranih osoba, infekcija plućnih stanica, posebno pneumocita tipa II, može izazvati nakupljanje upalnih stanica kao što su neutrofil, makrofagi, CD8+ i CD4+ T limfociti i potaknuti masivnu proizvodnju citokina, što dovodi do obostrane pneumonije, ARDS-a i oštećenja više organa (40).

Neadekvatan imunološki odgovor na virus mogući je mehanizam u razvoju citokinske oluje tijekom infekcije SARS-CoV-2 (41). Zaražene stanice pokazuju oslabljenu sposobnost proizvodnje interferona, ključnih medijatora za pravilan odgovor domaćina protiv virusnih infekcija, dok u isto vrijeme te zaražene stanice proizvode visoke razine kemokina koji regrutiraju neutrofile i makrofage (42).

Bolesnici s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 proizvode autoprotutijela na nekoliko imunomodulatornih proteina, a najznačajnija je prisutnost autoprotutijela na interferon tipa I (43). Lokalni RAAS sustav može posredovati u proupalnim, protrombotskim i profibrotičnim učincima, posredovanim aktivacijom receptora tipa 1 angiotenzina II (AT1) pomoću angiotenzina II. Međutim, ovi učinci su normalno uravnoteženi ACE2 receptorom, koji cijepa angiotenzin I i II, generirajući niz peptida s RAAS-antagonističkim učincima. Gubitak protuupalnih, antitrombotičkih i antifibrotičkih učinaka posredovanih ACE2, kao i istovremena relativna regulacija osovine angiotenzin II-AT1, može pridonijeti nastanku citokinske oluje i tromboupalnog stanja karakterističnog za COVID-19 (44).

Pneumociti tipa II su mjesto ulaska virusa, posredstvom ACE2 receptora domaćina. Čine mali posotak epitelnih stanica alveola, ali imaju važnu ulogu u fiziološkim procesima pluća. Naime pneumociti tipa II sudjeluju u proizvodnji surfaktanta i pneumocita tipa I. Nakon replikacije virusa dolazi do otpuštanja virusa u susjedne stanice i do apoptoze samih pneumocita. Oštećeni pneumociti otpuštaju citokine kao što su interleukini (IL-1, IL-6, IL-8, IL-120 i IL-12), faktor nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\lambda$  i IFN- $\beta$ , CXCL-10, monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1) i makrofagni upalni protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ). Kao posljedica nastaje oštećenje epitelnih stanica pluća i smanjuje se proizvodnja surfaktanta. Zbog navedenog povećava se površinska napetost u alveolama i nastaje poremećaj u izmjeni plinova (45).

U oštećenju plućnog parenhima sudjeluju i drugi patofiziološki procesi. ACE2 receptori su zastupljeni i u endotelnim stanicama krvnih žila čiji se integritet održava balansom prokoagulacijskih i antikoagulacijskih faktora endotela. Prodiranjem virusa u endotel dolazi do narušavanja istoga. Dominiraju prokoagulacijski faktori te mogu nastati mikroembolije krvnih žila pluća i posljedično hipoperfuzija okolnog parenhima. Sve to uzrokuje dodatno oštećenje



plućnog parenhima uz narušavanje normalne izmjene plinova. Posljedice oštećenja plućnog epitela su difuzno oštećenje alveola koje može dovesti do akutnog respiratornog distress sindroma (engl. *Acute respiratory distress syndrome*, ARDS) (46).

#### **1.1.4. Klinička slika**

Mnogi čimbenici mogu odrediti težinu COVID-19, uključujući virusno opterećenje, genetske čimbenike, prisutnost komorbiditeta, dob, spol, upotreba imunosupresiva i imunitet (47). Genetski čimbenici također igraju ulogu u ozbiljnosti COVID-19 jer gen za ACE2 receptor ima više polimorfizama, što znači da postoji više varijacija u odnosu između SARS-CoV-2 i ACE2 receptora prema etničkoj pripadnosti, a samim time i težine bolesti (48).

Osobe s komorbiditetima kao što su šećerna bolest, arterijska hipertenzija, KOPB, kronično bubrežno zatajenje, maligne bolesti i slab imunitet mogu imati veću sklonost prema teškim infekcijama i ozbiljnim komplikacijama COVID-19, a samim time i lošiji ishod (49). Kod mnogih bolesti postoji greška u ekspresiji ACE2 receptora i pretpostavka je da poremećaji u ravnoteži ACE1/ACE2 receptora mogu biti podloga za teži oblik bolesti (50). Istraživanja su pokazala da je ekspresija ACE2 veća u plućima starijih osoba nego u mlađih te su starije osobe sklonije težim oblicima COVID-19 kao i smrtnim ishodima (37,51–53).

Pretilost igra važnu ulogu u težini bolesti COVID-19 jer je ekspresija ACE2 veća u masnom tkivu (54). Pretili osobe imaju veći rizik od respiracijskog zatajenja i češći su kandidati za mehaničku ventilaciju, koja je također povezana s većom smrtnosti (55).

Klinički tijek bolesti se manifestira u 3 stadija. U ranoj viralnoj fazi bolesti kada je bolesnik bez simptoma ili tek s minimalnim simptomima, SARS-CoV-2 se replicira u najvećoj mjeri. Slijedi respiracijska faza bolesti u kojoj dolazi do upale pluća. U ovoj fazi prestaje replikacija virusa, ali je naznačen upalni odgovor organizma s jakim imunološkim odgovorom. Treća ili hiperinflamatorna faza, koja nastaje kao posljedica oslobađanja citokina i aktivacije koagulacijskog sustava, odgovorna je za protrombotsko stanje (56).

##### **1.1.4.1. Respiracijske manifestacije COVID-19**

Klinička slika COVID-19 bolesnika varira od asimptomatskog do simptomatskog oblika bolesti. Asimptomatski bolesnici su ujedno i glavni prenosioci bolesti, a njihov udio se ovisno o istraživanjima kreće između 18 i 33 % (57).

Velike zdravstvene organizacije kao što su WHO i NIH su izradili klasifikaciju COVID-19 ovisno o simptomima bolesti, laboratorijskim pokazateljima, radiološkim pretragama, hemodinamskim parametrima i funkciji ostalih vitalnih organa (58). Ove smjernice smo koristili u svakodnevnoj praksi u Jedinici intenzivnog liječenja za COVID bolesnike kako bi pravovremeno i ispravno koristili sve dijagnostičke i terapijske mogućnosti u zbrinjavanju najtežih bolesnika.

#### Klasifikacija težine COVID-19:

- *Asimptomatska ili presimptomatska infekcija:* Pojedinci s pozitivnim testom na SARS-CoV-2 bez ikakvih kliničkih simptoma u skladu s COVID-19.
- *Blagi oblik bolesti:* Bolesnici u ovoj fazi bolesti se prezentiraju s raznolikim simptomima poput kašlja, grlobolje, glavobolje, malaksalosti, bolova u mišićima, anosmije, povraćanja i proljeva. Bolesnici u ovoj fazi nemaju probleme s disanjem i na radiološkim pretragama pluća nema patoloških promjena.
- *Umjereno teški oblik bolesti:* Bolesnici s kliničkim simptomima ili radiološkim znakovima bolesti donjeg dišnog puta i saturacijom kisika na zraku (SpO<sub>2</sub>) ≥94%.
- *Teški oblik bolesti:* Bolesnici koji imaju SpO<sub>2</sub> manji od 94% na zraku u prostoriji, omjer parcijalnog tlaka arterijskog kisika i udjela udahnutog kisika (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) manji od 300, izrazitu tahipneju s frekvencijom disanja većom od 30/min, ili zahvaćenost pluća na RTG-u koji su veći od 50%.
- *Kritični oblik bolesti:* Bolesnici sa razvijenom kliničkom slikom akutnog zatajenja disanja, septičkog šoka ili disfunkcijom više organa. Bolesnici s teškim oblikom bolesti COVID-19 mogu postati kritično bolesni s razvojem ARDS-a.

Simptomi zahvaćenosti dišnog puta su karakteristični za COVID-19. Infekcija sa SARS-CoV-2 kod ljudi povezana je sa širokim spektrom kliničkih respiracijskih sindroma od blagih simptoma gornjih dišnih putova do progresivne virusne upale pluća opasne po život (56). Bolesnici s bolovima u prsima, otežanim i ubrzanim disanjem uz visoku temperaturu pokazuju znakove pneumonije, najčešće teške komplikacije COVID-19. Taj stupanj bolesti u većini slučajeva zahtjeva bolničko liječenje i u najgorem slučaju može doći i do razvoja ARDS-a kao najteže plućne komplikacije COVID-19 (59). Kliničkim pregledom i jednostavnijim dijagnostičkim alatima (SpO<sub>2</sub>, RTG pluća, plinska analiza krvi) lako se dijagnosticiraju najteži bolesnici.

### **1.1.4.2. Manifestacije COVID-19 na druge organe**

Kako je već opisano najvažniji organ zahvaćen infekcijom COVID-19 je dišni sustav, prvenstveno pluća. ACE2 receptori se nalaze i u drugim organima u tijelu stoga ni oni nisu pošteđeni u SARS-CoV 2 infekciji.

#### **1.1.4.2.1. Kardiovaskularni sustav**

Zbog povećane ekspresije ACE2 i katepsina B/L unutar kardiomiocita, fibroblasta i pericita SARS-CoV-2 ima i utjecaj na srce (60). Nishiga i suradnici su utvrdili da srčane stanice pokazuju pozitivnu korelaciju između prisutnosti katepsina B/L i progresije bolesti, ali se čini da je uloga ACE2 u srčanoj patogenosti znatno kompliciranija (61). Već se spominjala važna uloga ACE2 receptora u širenju SARS-CoV-2 i za očekivati je da će utjecaj SARS-CoV-2 biti najveći upravo na srcu, organu koji ima najviše ACE2 receptora. Međutim, navedeno istraživanje pokazuje da SARS-CoV-2 istodobno smanjuje ekspresiju ACE2 u kardiomiocitima. Kardiovaskularne komplikacije u obliku aritmija te miokarditisa nastaju direktnim utjecajem SARS-CoV-2 na srce. Međutim, ipak su češće komplikacije tromboembolijske prirode. Oštećenjem endotela koronarnih krvnih žila može nastati akutni koronarni sindrom (62).

#### **1.1.4.2.2. Neurološki sustav**

Neurotropnost SARS-CoV-2 objašnjava podatak da se više od 90% oboljelih od COVID-19 žalilo na blage neurološke simptome poput glavobolje, poremećaja okusa i mirisa, vrtoglavice i zbunjenost. Gubitak njuha je u početku epidemije bio jedan od prvih znakova zaraze virusom. Virus je tako detektiran u olfaktornoj sluznici olfaktornom živcu (63).

Neuroinvazivnost je još jedna značajka virusa. Virus invadira u endotel krvnih žila mozga te može, kao i u drugim organima uzrokovati vaskularne komplikacije. Zbog raspadanja endotelne stanice moguće su tromboembolijske komplikacije, a zbog narušavanja krvno-moždane može nastati i krvarenje u moždane strukture. Sve navedeno uzrokuje ozbiljne neurološke posljedice poput ishemijskog ili hemoragijskog moždanog udara. Također su moguće komplikacije perifernog živčanog sustava poput Guillain-Barreovog sindroma kao posljedica poremećenog imunološkog odgovora (64).

#### **1.1.4.2.3. Urogenitalni sustav**

Prisutnost ACE receptora u kanalnom sustavu bubrega odgovorno je za bubrežne komplikacije SARS-CoV-2 infekcije. Akutno bubrežno zatajenje (AKI) je nerijetka komplikacija teškog oblika COVID-19 i ujedno je povezana s visokom smrtnosti, a nastaje razaranjem stanica bubrega, pogotovo glomerula (65). Citokinska oluja u sklopu multiorganskog zatajenja odgovorna je za akutno bubrežno zatajenje u teškom i kritičnom obliku COVID-19. Hirsch i suradnici su u velikoj multicentričnoj kohortnoj studiji koja je uključivala oko 5500 hospitaliziranih bolesnika s COVID-19, 37% bolesnika razvilo akutno zatajenje bubrega, od čega je 14,3% bolesnika zahtijevalo nadomjesno bubrežno liječenje (66).

#### **1.1.4.2.4. Gastrointestinalni sustav**

Osnovni patofiziološki mehanizam za nastanak blagih gastroenteroloških simptoma poput mučnine, proljeva i povraćanja je afinitet virusa za vezanje na ACE2 receptore enterocita. Dolazi do razaranja endotelne stanice i brzog širenja virusa na susjedne stanice.

Oštećenja jetre i gušterače nastaju isključivo u teškom obliku COVID-19 zbog citokinske oluje u sklopu multiorganskog zatajenja organa (67).

#### **1.1.4.2.5. Endokrinološki sustav**

Mehanizam endokrinih manifestacija može biti posljedica prisutnosti ACE2 receptora kod nekih endokrinih organa, kao što su štitnjača i gušterača, ili može biti posljedica hiperimunog svojstva citokinske oluje (68).

### **1.1.5. Dijagnostičke metode**

Detekcija antigena i viriona se ostvaruje putem nazofaringealnog brisa ili uzoraka sline. Pošto su ACE2 receptori koji su vezno mjesto virusa za domaćina najviše zastupljeni u distalnom dijelu nosu, potrebno je uzorkovati navedeno mjesto dišnog puta. Smatra se da je zbog nepravilnog uzimanja brisa nazofarinksa prijavljeno oko 30% lažno negativnih rezultata (69–71).

U bolesnika u Jedinicama intenzivnog liječenja uzorci se mogu uzimati iz donjeg dišnog sustava; lavažom, iskašljajem ili aspiracijom, zatim iz krvi te likvora.

Polimerazna lančana reakcija (engl. *reverse-transcription Polymerase Chain Reaction*, PCR) je zlatni standard u dokazivanju infekcije SARS-CoV-2, a najviše je u primjeni inačica kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR), metoda koja analizira amplificirane cDNK tijekom samog procesa i koja ima visoku specifičnost i visoku osjetljivost u detekciji virusa. Zbog sve veće potrebe za provođenjem testiranja u vrijeme epidemije, započelo se s primjenom brzih antigenskih testova koji detektiraju pojedine dijelove proteina SARS-CoV-2. Takvi testovi su jeftiniji, dostupniji i nisu zahtijevali angažman zdravstvenog osoblja. Svjetska zdravstvena organizacija je dala naputak da osjetljivost testa mora biti minimalno 80%, uz specifičnost veću od 95% kako bi se test smatrao valjanim (72).

Serološki testovi za detekciju IgM i IgG protutijela, koji uključuju metode ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), CLIA (engl. *Chemiluminescence Immunoassay*) i LFIA (engl. *Lateral Flow Immunoassay*) koriste se u kliničkoj praksi, za dijagnozu akutne ili preboljele infekcije SARS-CoV-2 (47). Mjerenje razine protutijela je primjenjivo u procjeni uspješnosti cijepljenja (67).

#### **1.1.5.1. Radiološke pretrage**

Sumacijska snimka torakalnih organa je najjednostavnija i uz ultrazvuk pluća najdostupniji radiološki alat u procjeni plućne patologije u bolesnika s COVID-19. U početku pandemije približno 75% bolesnika je u vrijeme postavljanje dijagnoze imalo patološki nalaz sumacijske snimke torakalnih organa. Najčešći radiološki znakovi COVID-19 su obostrana intersticijska upala pluća s infiltratima poput mliječnog stakla (engl. *Ground glass opacity*, GGO), dok se u kasnijim stadijima bolesti razvijaju konsolidacije. Sumacijska snimka torakalnih organa je umjereno osjetljiva i umjereno specifična pretraga za dijagnozu COVID-19. Istraživanja su pokazala da je sumacijska snimka torakalnih organa ispravno dijagnosticirala COVID-19 kod 73% COVID-19 bolesnika, međutim, netočno je identificirano COVID-19 kod 27% osoba koje nisu imale tu bolest (73).

CT je najosjetljivija radiološka pretraga za potvrđivanje dijagnoze, međutim nije dostupna i jednostavna za provođenje pogotovo u vrijeme pandemije. Njezina primjena je ograničena za specifične slučajeve u kojima dijagnoza nije potvrđena antigenskim testom i sumacijskom snimkom torakalnih organa ili teškim slučajevima COVID-19 u kojima se sumnja na neku od plućnih komplikacija kao što su emfizem, pneumotoraks ili hematotoraks.

Prednost CT toraksa u COVID-19 bolesnika je što se promjene na plućima mogu detektirati veoma rano, pa čak i prije nastanka ozbiljnijih simptoma plućne bolesti. Najčešći nalaz je GGO koji je obostran i najčešće u donjim i stražnjim dijelovima pluća. U slučaju progresije bolesti razvija se slika ARDS-a sa teškom pneumonijom (74).

Ultrazvuk pluća (engl. *Lung ultrasound*, LUS) je osjetljiva metoda, ali nije specifičan za dijagnozu COVID-19. Rezultati istraživanja su pokazali su da je ultrazvuk pluća ispravno dijagnosticirao COVID-19 kod 87% bolesnika s COVID-19. Međutim, krivo je dijagnosticiran COVID-19 kod 24% ljudi koji nisu imali tu bolest. Stoga bi ultrazvuk mogao imati veću korist za isključivanje COVID-19 nego za njegovo razlikovanje od drugih uzroka respiracijskih bolesti (75).

Prednost LUS-a kao dijagnostičkog alata je njegova neinvazivnost, portabilnost te nepostojanje zračenja. Stoga se pretraga može izvoditi uz krevet bolesnika pa je tako najbolji izbor za detekciju promjena u COVID-19 bolesnika u hitnom službama i intenzivnim jedinicama. Karakteristični patološki pokazatelji u LUS-u su B-linija koje ukazuju na oštećenje plućnog parenhima. Prema broju i izgledu B-linija može se kategorizirati veličina oštećenja pluća. Ovom pretragom se također mogu lako i sa većom osjetljivošću od nativne radiološke pretrage prikazati pneumotoraks i pleuralni izljev koji su nerijetka komplikacija najtežih oblika COVID-19 (76).

### **1.1.6. Liječenje**

U samim počecima pandemije liječenje COVID-19 bolesnika se svodilo na simptomatsko i eksperimentalno liječenje. Prvi simptom koji je dovodio bolesnika na hitni bolnički prijem bila je dispneja s hipoksemijom koja se najčešće razvijala tjedan dana nakon prvih simptoma SARS-CoV-2 infekcije. Liječenje je bilo simptomatsko. Nakon potvrde infekcije, provedene trijaže bolesnika i primarnog zbrinjavanja, bolesnici su smješteni na COVID jedinice ovisno o stupnju težine COVID-19 bolesti.

Bolesnici sa blagom i srednje teškom kliničkom slikom su uz upute vraćeni na kućno liječenje dok su bolesnici s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 hospitalizirani. Ukoliko bolesnik na sobnom zraku nije u stanju postići ciljane vrijednosti zasićenosti arterijske krvi kisikom ( $SpO_2 > 92\%$ ) neophodna je primjena kisika. Ukoliko bolesnik spontano diše oksigenoterapija se započinje uobičajenim metodama primjenom kisika preko nosnog katetera uz protok do 6 L/min. Slijedeći korak je maska sa spremnikom kisika koja može isporučiti do

15 L kisika u minuti. Ukoliko bolesnik na primijenjene metode oksigenoterapije ne pokazuje kliničko poboljšanje odnosno i dalje ima izraženu lošu mehaniku disanja uz umaranje i  $SpO_2 < 92\%$ , potrebno je započeti s invazivnijim metodama oksigenacije, prvenstveno mehaničkom respiracijskom potporom.

U nekim slučajevima se prije samog respiratora pokušavalo sa manje invazivnim metodama oksigenoterapije kao što su HFNO (engl. *High flow nasal oxigenation*): uređaj koji pomoću nosnog katetera isporučuje kisik 21-100% uz visoke protoke do 50L/min te CPAP maska (engl. *Continuous positive airway pressure*). Kod oba uređaja je potrebno da bolesnik samostalno diše te se s visokim protocima kisika i stvaranjem pozitivnog tlaka na kraju ekspirija pokušava poboljšati izmjena plinova na alveokapilarnoj membrani. Međutim, kako se u većini slučaja radilo o bolesnicima koji, uz dokazani COVID-19, imaju određene komorbiditete te su smanjene metaboličke rezerve, ipak se kao zlatni standard liječenja kod teškog i kritičnog oblika COVID-19 pokazala pravovremena intubacija i mehanička ventilacija (77).

U početnom zbrinjavanju bolesnika na respiratoru potrebno je adekvatno zbrinuti dišni put, nekada i bronhoskopski potvrditi ispravan položaj endotrahealnog tubusa. Kvalitetna analgozsedacija i mišićna relaksacija su neophodne za kvalitetnu mehaničku ventilaciju. U prvih nekoliko dana mehaničke ventilacije se učestalo prate plinske analize krvi i korigiraju postavke respiratora. Dinamika liječenja se uz laboratorijske pokazatelje prati i slikovnim dijagnostičkim pretragama (sumacijska snimka torakalnih organa i CT-om ukoliko je potrebno).

U svih bolesnika na invazivnoj mehaničkoj potpori disanja primjenjuje se protektivna mehanička ventilacija definirana Berlinskom deklaracijom za ARDS (78). Ukoliko konvencionalna metoda mehaničke respiracijske potpore nije davala zadovoljavajuće rezultate, bolesnike je bilo potrebno postaviti u potrbušni (pronacijski) položaj. Na taj način se pokušalo povećati površinu pluća za izmjenu plinova, a samim time i oksigenaciju bolesnika (79).

Kao posljednja i najkompleksnija metoda kod liječenja bolesnika sa teškim ARDS-om važno je spomenuti i vantjelesnu respiracijsku potporu odnosno ekstrakorporalnu membransku oksigenaciju (engl. *Extracorporeal membrane oxygenation*, ECMO). Navedeni uređaj omogućava oksigenaciju krvi izvan organizma na način da se krv drenira iz velike vene te se nakon oksigenacije vraća u desni atrij. Tako već oksigenirana krv prolazi kroz plućni krvotok i na taj način „štedi“ pluća. Ovo je metoda koja zahtjeva dobro educirano osoblje ali ujedno ima veliki broj komplikacija. Uglavnom je rezervirano za najteže oblike COVID-19 kod mladih osoba bez značajnih komorbiditeta (80).

Za vrijeme pandemije smjernice za liječenje COVID-19 su se mijenjale kao i sam virus. Medikamentozna terapija je u početku bila ograničena na liječenje i ublažavanje simptoma bolesti. Istraživanjem patofizioloških mehanizama COVID-19, u samom početku pandemije empirijski se pokušalo s poznatim antivirusnim lijekovima te lijekovima koji utječu na imunološki odgovor organizma. U međuvremenu se radilo na istraživanju novih antivirusnih lijekova i cjepiva te drugim imunomodulatornim i protuupalnim lijekovima za liječenje najtežih oblika COVID-19. Kao prvi izbor ove vrste medikamentozne terapije su bili kortikosteroidi. Protuupalno djelovanje ostvaruju inhibirajući proliferaciju, diferencijaciju i funkciju makrofaga, neutrofila i fibroblasta, čime se suzbija sinteza i oslobađanje citokina kao što su interleukin-1, interleukin-6 i TNF- $\alpha$ . RECOVERY studija koja je provedena na 9000 bolesnika u 176 bolnica u Velikoj Britaniji ukazala je da je primjena deksametazona smanjila smrtnost u bolesnika koji su zahtjevali inhalacijsku potporu kisikom ili su bili ovisni o mehaničkoj respiracijskoj potpori. Također je skraćeno vrijeme hospitalizacije u iste skupine bolesnika (81).

U rutinskoj primjeni u hospitaliziranih bolesnika se koristio intravenski deksametazon u dozi od 6 mg dnevno prvih 10 dana. Dalje bi se prema indikaciji i procjeni kliničara produljila terapija deksametazonom vodeći računa o mogućim nuspojavama. U primjeni su također bili i drugi kortikosteroidi poput metilprednizolona ili hidrokortizona (82).

Pokušavalo se i za drugim imunomodulatornim lijekovima kao što su Tocilizumab ili Sarilumab koji ipak nisu pokazali značajan doprinos u ishodu liječenja (83).

Prvi antivirusni lijek u liječenju blagih do umjerenih oblika COVID-19 bolesnika je remdesivir, inhibitor virusne RNA polimeraze koji sprječava razmnožavanje virusa unutar stanice. U početku epidemije koristio se redovito kod bolesnika sa težim oblikom bolesti naročito kod imunokompromitiranih bolesnika. Međutim, kasnije su velike studije pokazale da rutinska primjena ovog antivirotika širokog spektra nema utjecaja na pozitivan ishod u liječenju bolesnika sa najtežim oblikom COVID-19 (84–86).

U današnje vrijeme kombinacija antivirotika nirmatrelvira i ritonavira je indicirana za liječenje COVID-19 u odraslih osoba kojima nije potrebna nadomjesna terapija kisikom i koji imaju povećan rizik od razvoja teškog oblika bolesti (87)

Rekonvalescentna plazma je još jedna od korištenih metoda liječenja. Naime, bolesnicima koji su prebolili COVID-19 se izolira plazma puna protutijela na SARS-CoV-2. Učinkovitost primjene rekonvalescentne plazme se pokazala u imunokompromitiranih bolesnika sa srednjim i teškim oblikom COVID-19 dok nije dokazana korist u liječenju imunokompetentnih bolesnika (88,89).



Najvažniji trenutak u sprječavanju širenja pandemije i kontroliranja trenutnog stanja bila je pojava prvog cjepiva. Od tada se populacija, uz standardne higijensko-epidemiološke mjere, mogla zaštititi i sustavnim procjepljivanjem. Od početka pandemije istraživalo se više od stotinu cjepiva (uglavnom DNA i RNA cjepiva), a do današnjeg dana ipak su najčešće korištena mRNA cjepiva koja potiču domaćina na stvaranja autoprotutijela na šiljasti glikoprotein SARS-CoV-2 (90,91).

## 1.2. Katestatin

Katestatin (engl. *Catestatin*, CST) je uz nekoliko drugih bioaktivnih peptida produkt kromogranina A (engl. *Chromogranin A*, ChgA). Mahata i suradnici su ovaj endogeni peptid molekularne mase 48 kDa izolirali 1997. godine. Pohranjuje se u sekretornim granulama u endokrinim, neuroendokrinim i neuronskim tkivima gdje regulira sintezu i sekreciju različitih regulatornih molekula (92). Glavna uloga katestatina je negativna regulacija otpuštanja katekolamina koju ostvaruje nekompetitivnim i reverzibilnim antagoniziranjem nikotinskih kolinergičnih receptora (engl. *nicotinic acetylcholine receptor*, nAChR) (93). Također inhibira oslobađanje neuropeptida Y (NPY) i adenzin trifosfata (ATP) (94). Proteolizom ChgA nastaju aktivni peptidi: katestatin, vazostatin, pankreastatin, parastatin, prokromacin, serpinin, beta-granin, protein WE-14 i protein GE-25 (95). Dokazana je njihova uloga u zaštiti od infekcija, angiogenezi, srčanoj funkciji, metaboličkim bolestima, homeostazi elektrolita i autoimunim bolestima (96–98).

Vazostatin kao produkt ChgA djeluje negativno luzotropno i negativno inotropno u životinjskim modelima što ukazuje na pleiotropni učinak ChgA na regulaciju srčane funkcije. Imunohistokemijskim metodama je pokazana povećana ekspresija ChgA u kardiomiocitima s kroničnim zatajenjem srca, dilatacijskom kardiomiopatijom te ishemijskom kardiomiopatijom (99).

Nadalje, jedno istraživanje pokazuje da razina ChgA korelira s razinom konvencionalnog markera proBNP-a u dilatiranoj i hipertrofičnoj klijetki ljudskog srca (100). Zbog navedenih zaključaka razina ChgA u plazmi se može koristiti kao biomarker u stanjima kroničnog zatajenja srca, ali i poslužiti kao terapijsko mjesto djelovanja.

Enteroendokrine stanice raspoređene su kao pojedinačne stanice duž gastrointestinalne sluznice u kriptomama i resicama crijeva i predstavljaju najveći endokrini sustav ljudskog tijela. Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease*, IBD) potiču lučenje raznih peptida iz enteroendokrinih stanica, a među njima i ChgA kao prekursora katestatina (101). Studije

ukazuju da prisutnost i nekoliko drugih važnih peptida u stanicama debelog crijeva i plazmi u bolesnika s upalnom bolesti debelog crijeva (102,103). Istraživanje je pokazalo da je razina ChgA u bolesnika s IBD znatno niža u usporedbi s bolesnicima koji su liječeni s „konvencionalnom“ terapijom (104). Eissa i sur. su u svojem istraživanju na miševima s isključenim ChgA genom utvrdili da ChgA, modulirajući makrofage, ima značajno djelovanje na kolitis (104). Naime, dobiveni rezultati pokazali su da ChgA promovira M1 makrofage uz supresiju M2 makrofaga. Miševi s isključenim genom za ChgA su nakon induciranja kolitisa s dekstran-natrij-sulfatom imali pojačanu ekspresiju M2 makrofaga, a sniženu razinu M1 makrofaga. Ujedno su imali i značajno reduciranu razinu medijatora upale te težinu bolesti uz značajno povišenu razinu anti-inflamatornih citokina. U svojem novijem istraživanju Eissa je dokazala ulogu ChgA u ulceroznom kolitisu koji modulacijom epitela povećava propusnost barijere i time djeluje nepovoljno na osnovnu bolest (105).

### **1.2.1. Katestatin i kardiovaskularni sustav**

Uloga katestatina u regulaciji hipertenzije je istraživana u više studija. Na animalnom modelu Chga-KO miševa (miševi s ciljanom ablacijom CHGA gena) utvrđen je visoki krvni tlak i visoke razine kateholamina u plazmi. Primjenom katestatina dolazi do smanjenja arterijskog tlaka i frekvencije srca, a u plazmi se bilježe smanjene koncentracije kateholamina. Pretpostavka je da se antihipertenzivni učinak ostvaruje inhibicijom lučenja kateholamina, a vazodilatacijski učinak katestatin ostvaruje lučenjem histamina iz mastocita (106).

Gaede i suradnici su testirali učinke katestatina u leđnoj moždini intratekalnom injekcijom katestatina u kombinaciji s nikotinom i izoproterenolom u anestetiziranim štakora kako bi utvrdili funkcionalnu ulogu katestatina u središnjem živčanom sustavu. Katestatin je oslabio hipotenzivni učinak izoproterenola i hipertenzivni učinak nikotina na srednji arterijski tlak, aktivnost splanhničkog simpatičkog živca i smanjio srčanu frekvenciju (107). Kiranmayi i suradnici su dokazali utjecaj katestatina na lučenje dušičnog oksida unutar endotelnih stanica i na taj način ukazali na njegov utjecaj na regulaciju arterijskog tlaka. Na temelju gore navedenih saznanja, autori su zaključili da katestatin antagonizira i središnje nikotinske acetilkolinske receptore i  $\beta$ -adrenergične receptore koji su uključeni u kardiovaskularnu regulaciju in vivo (108,109).

Zabilježena je i snažna modulatorna uloga katestatina na autonomni živčani sustav, a posljedično i na kardiovaskularnu funkciju. Naime, Rao i sur. su dokazali da je katestatin

povećao parasimpatičko djelovanje prema srcu oko 2,5 puta modulirajući aktivnost baroreceptora, istovremeno smanjujući simpatičku djelovanje na srce i smanjujući bubrežnu ekskreciju noradrenalina i adrenalina. Kao rezultat navedenih procesa u eksperimentalnim uvjetima smanjio je srednji arterijski tlak za 6 mmHg (110).

Uloga katestatina je uvelike istraživana u bolestima srca i krvnih žila. Tako je u bolesnika sa zatajenjem srca utvrđena povezanost povišenih vrijednosti katestatina u bolesnika s težim oblikom bolesti (99,111).

Kao indikator interakcije simpatičkog i parasimpatičkog živčanog sustava koristi se varijabilnost srčane frekvencije (engl. *Heart rate variability*, HRV). U hipertenzivnih i hiperadrenergičnih Chga-KO miševa HRV indeks se normalizirao primjenom katestatina (112). Mahata je u svom istraživanju iz 2010. godine pokazao da osobe s genetskom mutacijom CST-Gly364Ser imaju manju sklonost hipertenziji zbog promjena u funkciji baroreceptora. Naime, povećava se parasimpatički odgovor baroreceptora na katestatin, a smanjuje se simpatički odgovor (110).

Osim navedenih patofizioloških uloga katestatina, nije zanemariva ni njegova kardioprotektivna uloga. Kod odraslih štakora izloženih ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi srca dokazano je izravno kardioprotektivno djelovanje katestatina. Vitalnost miocita je porasla za 65% uz smanjenje tlakova punjenja lijeve klijetke i poboljšanje funkcije lijeve klijetke nakon ishemije (113). Oksidativni stres uzrokovan ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom je ozbiljna komplikacija koja nastaje nakon infarkta miokarda. Katestatin djeluje protektivno u tom smislu aktiviranjem muskarinskih receptora miocita koji inhibiraju apoptotske mehanizme oštećenog miokarda. (114). Također je opisan mehanizam u kojem katestatin sprječava apoptozu miocita aktivacijom beta 2 receptora (115). Još jedna zanimljiva studija ukazuje na kardioprotektivni mehanizam djelovanja katestatina. Naime, katestatin u upalnim odgovorima organizma može djelovati i na neutrofile potičući ih na stvaranje proteina među kojima je i lipokain. Navedeni protein usmjerava makrofage prema reparativnoj funkciji i na taj način poboljšava postinfarktno cijeljenje srca (116).

### **1.2.2. Katestatin i upalne bolesti crijeva**

Katestatin ima sličnu ulogu kao i njegov prekursor ChgA u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Animalne studije su pokazale izrazito povišene razine katestatina u miševa s induciranim ulceroznim kolitisom (102,117). Također novija studija ukazuje na mogući terapijskim učinak katestatina koji svojim modulacijskim djelovanjem smanjuje intenzitet

bolesti i potencijalno može spriječiti relaps bolesti. Povoljan utjecaj katestatina na IBD očituje se promjenama poput infiltracije upalnih stanica, smanjenja edema i smanjenja upale sluznice (102).

Sva ova istraživanja provedena na životinjskim modelima sugeriraju da katestatin protektivno djeluje na upalne bolesti crijeva prvenstveno smanjujući upalni odgovor organizma inhibirajući M1 makrofage te ostale medijatore upale kao što su IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ . Bitna spoznaja je među ostalim da terapija katestatinom potpomaže homeostazu staničnih membrana u crijevima održavanjem proteina čvrste sveze (118).

### **1.2.3. Katestatin i reumatoidni artritis**

U patofiziološke procese RA uključen je i katestatin. Šimac i sur. su proveli istraživanje u kojem su dokazali da su bolesnici s RA imali povišene serumske razine katestatina u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika. Ujedno su utvrdili da je katestatin samostalni prediktor aktivnosti RA te funkcionalne onesposobljenosti spomenutih bolesnika (119–121). Imunomodulacijsko djelovanje katestatina je glavni razlog povišenih vrijednosti istoga u RA. Aktivacija makrofaga i smanjenje proupalnih stanica glavne su protektivne karakteristike katestatina u upalnim bolestima (122).

### **1.2.4. Katestatin i OSA**

Uloga katestatina je istraživana i u bolesnika s opstruktivskom apnejom tijekom spavanja (engl. *Obstructive sleep apnea*, OSA). U istraživanju kojeg su proveli Borovac i sur. dokazano je da odrasli muškarci s OSA imaju povišene razine katestatina u usporedbi sa zdravom populacijom. Isti rad je pokazao da razine katestatina pozitivno koreliraju s težinom OSA u podskupini bolesnika koji nisu pretili, te da negativno koreliraju s koncentracijama HDL kolesterola u OSA bolesnika (123). Poznato je da su bolesnici s OSA-om skloni arterijskoj hipertenziji i da imaju pojačanu aktivnost RAAS sustava (124). Stoga povišene vrijednosti plazmatskog katestatina ne čude s obzirom na pretjeranu simpatičku aktivnost. Čini se da katestatin pokušava održati homeostazu autonomnog živčanog sustava mehanizmima negativne povratne sprege (125). Zaključno se može kazati da povišene vrijednosti katestatina u bolesnika s OSA-om mogu ukazati na njegovu protektivnu ulogu, ali isto tako i ukazati na težinu bolesti.

### 1.3. GDF-15

Faktor diferencijacije rasta 15 (engl. *Growth Differentiation Factor 15*, GDF-15) je protein koji pripada superobitelji transformirajućeg faktora rasta (engl. *Transforming Growth Factor*, TGF- $\beta$ ). Također je poznat pod drugim nazivima kao što su MIC-1 (engl. *macrophage inhibitory cytokine 1*) PLAB (engl. *placental bone morphogenetic protein*), NAG-1 (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drug-inducible gene*) i pTGFB (engl. *placental transforming growth factor-beta*) (126–128).

GDF15 se izlučuje kao propeptid od 40 kDa, koji se cijepa kako bi se oslobodio aktivni cirkulirajući dimerni protein od 25 kDa. Lanac od 308 aminokiselina sastoji se od signalnog peptida (29 aminokiselina), pro-domene (167 aminokiselina) i zrelog GDF-15 od 112 aminokiselina (129,130). Dok je unutarstanična proteolitska obrada moguća, GDF-15 se uglavnom izlučuje kao pro-protein, a pro-domena ostaje vezana za izvanstanični matriks (engl. *Extracellular matrix*, ECM). Tako se stvaraju latentne stromalne zalihe koje omogućuju brzo otpuštanje značajnih količina GDF-15 nakon proteolitičkog cijepanja. Pro-domena koja ostaje u ECM-u može se obojiti poput površinskog proteina i stoga je postala poželjna meta za imunohistokemijsko otkrivanje GDF-15 (130).

Kod zdrave populacije povišene vrijednosti GDF-15 nalaze se jedino u trudnica jer se u tom stanju izlučuje iz placente. Stoga se povišene vrijednosti GDF-15 nalaze samo u patološkim procesima kao što su: pretilost, dijabetes, metabolički sindrom, zatajenje srca, ateroskleroza, upalne bolesti i karcinomi (129).

Stanice koje eksprimiraju GDF-15 uključuju kardiomiocite, adipocite, makrofage, endotelne i vaskularne glatke mišićne stanice u zdravim i bolesnim tkivima (131). Budući da je GDF-15 induciran stresnim odgovorom organizma, njegova regulacija je izrazito kompleksna i odvija se preko medijatora upale kao što su interleukin IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interleukin-2 i makrofag MCSF-1 (132). Ipak, kod zdravih osoba razine GDF-15 su niske čak i unutar tkiva koje lakše induciraju ekspresiju GDF-15. Možda i najbolji primjer toga je švedsko istraživanje provedeno na 836 blizanaca koje je pokazalo značajno nižu stopu preživljavanja blizanaca s povišenim razinama GDF-15, s omjerom izgleda od 3,38 za smrt unutar 14 godina (133).

#### 1.3.1. GDF-15 i kardiovaskularni sustav

Studija Kempf i sur. istraživala je GDF-15 kao biomarker povezan s povećanom smrtnosti u bolesnika s kroničnim srčanim zatajenjem te su pokazali kako je GDF-15 neovisan

prognostički biomarker smrtnosti u odnosu na standardne kliničke i biokemijske markere. Razine GDF-15 bile su značajno povećane u bolesnika s kroničnim zatajenjem srca i pokazale su stupnjevit odnos prema smrtnosti od svih uzroka (134).

Nadalje, eksperimentalna istraživanja na animalnim modelima pokazuju patofiziološki utjecaj GDF-15 na srčani mišić. Na modelu mišjeg srca pokazalo se da je ekspresija GDF-15 značajno povećava nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede (129,135). Nadalje, transgenični miševi s dilatacijskom kardiomiopatijom, pokazuju značajno povećane razine ekspresije GDF-15 u srcu (136). U tim životinjskim modelima GDF-15 potiče zaštitne učinke inhibicijom apoptoze, hipertrofije i remodeliranjem oštećenog srca. Situacija s GDF-15 donekle podsjeća na BNP, koji se izlučuje iz srca kao odgovor na ishemijsku ili povećani stresni odgovor, za koji se smatra da potiče blagotvorne učinke u životinjskim modelima i koji također pruža prognostičke informacije u bolesnika s kroničnim zatajenjem srca (135).

Novija istraživanja su istaknula važne uloge GDF-15 u srcu i po prvi put definirale funkcionalnu ulogu GDF-15 *in vivo*. Međutim, potrebno je istaknuti da GDF-15 nije citokin specifičan za srce (135). Već je spomenuto da i druge stanice osim kardiomiocita mogu proizvesti GDF-15 kao odgovor na stres i mogu pridonijeti povišenim razinama GDF-15 u bolesnika s kroničnim zatajenjem srca. Povišene cirkulirajuće razine GDF-15 zabilježene su tijekom trudnoće i u bolesnika s određenim zloćudnim bolestima (137,138). Sukladno tome, GDF-15 se ne može koristiti isključivo za dijagnozu zatajenja srca. Međutim, poput drugih važnih biomarkera u kroničnom srčanom zatajenju koji nisu specifični za srce (npr. bubrežna disfunkcija, anemija, hiperuricemija), mjerenje GDF-15 može pružiti značajne prognostičke informacije i patofiziološki uvid u bolesnika kojima je kronično srčano zatajenje dijagnosticirano korištenjem utvrđenih kriterija. Stoga se razine GDF-15 moraju tumačiti u kontekstu kardiološki specifičnih pokazatelja, kao što su LVEF ili NT-proBNP, kako bi se došlo do ukupne prognostičke procjene (139).

### **1.3.2. GDF-15 i maligna bolest**

Vrijednosti GDF-15 u plazmi povišene u bolesnika s karcinomom prostate i drugim karcinomima gdje sudjeluje u apoptozi tumorski promijenjenih stanica. Studije navode povećanu ekspresiju GDF-15 kod karcinoma prostate, debelog crijeva, pluća, dojke i nazofarinksa. Stoga je očito da postoji poveznica GDF-15 i tumorogeneze, napredovanja bolesti, prognoze, kliničke slike te odgovora na onkološko liječenje (140,141).

Nekoliko je istraživanja pokazalo izravnu korelaciju između razine GDF-15 i anoreksije i kaheksije. Ujedno je dokazana povezanost kaheksije kod karcinoma prostate s izrazito povišenim razinama GDF-15(142,143). U istraživanju Neary i sur. je dokazano da povišene vrijednosti GDF-15 izazivaju gladovanje u miševa (144).

### **1.3.3. GDF-15 i metaboličke bolesti**

Četiri neovisne studije su dokazale da receptor GFRAL (engl. *GDNF family receptor  $\alpha$ -like*) koji se nalazi u moždanom deblu posreduje u metaboličkim učincima GDF-15. To je ujedno i jedini receptor za kojeg se dokazano vezuje GDF-15 (142,145–147). Animalna studija je pokazala da je proizvodnja GDF-15 također inducirana najčešće propisivanjem antidijabetikom metforminom i da je upravo GDF-15 odgovoran za smanjenje pretilosti (143). Shodno saznanjima za pretpostaviti je da će buduća istraživanja biti usmjerena prema GDF-15 i GFRAL kao mogućim metama lijekova za regulaciju tjelesne težine.

### **1.3.4. GDF-15 i plućne bolesti**

Plućne epitelne stanice glavni su proizvođač GDF-15 u respiracijskom sustavu osobito tijekom hipoksije ili nakon izlaganja različitim alergenima, dimu cigareta i zagađivačima zraka (148,149). Kod kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB), koja je povezana s pušenjem cigareta, pronađena je pozitivna povezanost između povišenih razina GDF-15 i učestalosti egzacerbacija, kao i oštećenja plućne funkcije (127,150–152). Bolesnici s plućnom hipertenzijom imaju povišeni tlak u plućnoj arteriji i povišenu perifernu vaskularnu rezistenciju, a GDF-15 korelira sa težinom bolesti i smrtnošću(149,153). Osim toga, više razine GDF-15 također su pronađene u alveolarnim epitelnim stanicama u bolesnika s plućnom fibrozom (154,155). Oštećenje tkiva uslijed hiperoksije također je snažan poticaj lučenja GDF-15 od strane plućnih epitelnih i endotelnih stanica te je povezano s bronhopulmonalnom displazijom (154). Nasuprot tome, GDF-15 je pokazao zaštitnu ulogu u akutnoj ozljedi pluća uzrokovanu mehaničkom ventilacijom kod koje dolazi do pretjeranog nakupljanja trombocita i neutrofila (148).

### **1.3.5. GDF-15 i bakterijske infekcije**

Iako su manje proučavane, bakterijske infekcije također su povezane s povišenim razinama GDF-15, kako za Gram-pozitivne tako i za Gram-negativne bakterije (156). Slično

je utvrđeno da je GDF-15 povišen u bolesnika sa septičkim šokom, a plazmatske razine GDF-15 su bile u korelaciji s povećanom smrtnošću (157).

U istraživanju Abulizija i sur. u miševa divljeg tipa i miševa s prekomjernom ekspresijom GDF-15 izazvana je sepsa. Podaci pokazuju da nedostatak GDF-15 pojačava upalni odgovor i pogoršava oštećenje bubrega i srca izazvano sepsom, dok prekomjerna ekspresija GDF-15 štiti bubrege i srce od disfunkcije organa izazvane sepsom. Stoga ova studija naglašava terapijski potencijal GDF-15 u liječenju sepse izazvane endotoksinima (158)

### **1.3.6. GDF-15 i ostali organi**

GDF-15 je citokin čije lučenje potiču razni upalni procesi i nalazimo ga povišenog u različitim ozljedama tkiva. Na tom tragu su dva istraživanja na životinjskim modelima koja su pokazala kako ozljeda jetre potiče lučenje GDF-15 (159,160). U prvom istraživanju utvrđeno je da se ekspresija GDF-15 brzo i dramatično pojačava nakon različitih kirurških i kemijskih tretmana koji uzrokuju akutnu ozljedu i regeneraciju jetre (159). Drugo istraživanje je izvijestilo o povećanoj razini GDF-15 nakon oštećenja jetre uzrokovanog ugljikovim tetrakloridom (CCl<sub>4</sub>) ili alkoholom. Funkcionalno, proizvodnja GDF-15 u jetri ublažava upalu i fibrozu jetre. Jetra GDF-15 nokautiranih miševa pokazala je težu fibrozu i povećanu infiltraciju upalnih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T stanica, monocita i neutrofila (160).

U bolesnika koji su podvrgnuti kardiokirurškim operacijama na izvantjelesnom krvotoku, dokazana je povećana ekspresija GDF-15 nakon samog zahvata vjerojatno kao posljedica upalnog odgovora i smanjene lokalne prokrvljenosti srca (161).

Bolesnici koji pate od reumatoidnog artritisa često imaju povišene razine GDF-15, što je u korelaciji sa simptomima kao što su povišena razina sedimentacije eritrocita, jutarnja ukočenost, osjetljivost zglobova i zadebljanost stijenke karotidne arterije (162).

Zaključno možemo kazati kako je GDF-15 protein koji se izlučuje kao odgovor na mitohondrijski stres, oštećenje tkiva ili hipoksiju pa se ovaj citokin pokazao kao jedan od najjačih prediktora težine bolesti tijekom upalnih stanja, metaboličkih bolesti i karcinoma.



## 1.4. Vitamin D

Dva najvažnija oblika Vitamina D koja sudjeluju u fiziološkim procesima ljudskog organizma su: vitamin D2 (ergokalciferol) i vitamin D3 (kolekalciferol). Vitamin D2 se u organizam unosi hranom ne-životinjskog podrijetla i raznim dodacima prehrani. Vitamin D3 u organizam se može unijeti hranom životinjskog podrijetla, ali se nakon izlaganja sunčevim UV-B zrakama može sintetizirati u koži iz prekursora 7-dehidrokolesterola (engl. *7-dehydrocholesterol*, 7-DHC) (163).

Hormonsko djelovanje vitamina D povezano je s metabolizmom minerala i zdravljem kostiju. Vitamin D pospješuje crijevnu apsorpciju kalcija i fosfata, stimulira diferencijaciju osteoklasta i reapsorpciju kalcija iz kosti te potiče mineralizaciju koštanog matriksa. Prvi dokazi o pozitivnom učinku unosa vitamina D na ljudsko zdravlje došli su iz ranih studija o rahitisu i osteomalaciji (164). Ovaj najteži oblik nedostatka vitamina D rezultira teškim defektima mineralizacije kostura i hipokalcijemijom te obično pogađa bolesnike sa serumskom razinom vitamina D ispod 20 nmol/L (8 ng/mL) (165). Povijesna strategija dodavanja vitamina D dojenčadi s najmanje 200 IU (5 µg) dnevno značajno je smanjila učestalost rahitisa u svijetu. Unatoč tome, rahitis i dalje nije iskorijenjen (166,167). Nedostatak vitamina D također je povezan s razvojem kardiovaskularnih bolesti, raznih vrsta karcinoma i autoimunih poremećaja, kao što su dijabetes melitus tipa 1 (DM1), multipla skleroza (MS) i upalne bolesti crijeva (168).

Tijekom posljednjeg desetljeća, perspektiva o tome kako vitamin D utječe na ljudsko zdravlje dramatično se promijenila na temelju otkrića da su receptor vitamina D (engl. *Vitamin D Receptor*, VDR) i enzim 1- $\alpha$ -hidroksilaza (CYP27B1) koji aktivira vitamin D izraženi u stanicama koje nisu uključene u metabolizam kostiju i minerala, kao što su crijeva, gušterača, prostata i stanice imunološkog sustava (168,169). Čini se da imunomodulacijska svojstva slična citokinima vitamin D ostvaruje izvan bubrežnom sintezom aktivnog metabolita kalcitriola-1,25(OH) od strane imunoloških stanica i perifernih tkiva (165,170).

U ljudskoj koži kolekalciferol se sintetizira iz 7-dihidrokoolesterola nakon izlaganja UVB zračenju. Kolekalciferol je biološki neaktivan oblik vitamina D i potrebni su mnogi procesi aktivacije tog hormona. Tako neaktivan ulazi u cirkulaciju i hidroksilira se u jetri, kataliziran enzimima CYP2R1 i CYP27A1, što rezultira proizvodnjom neaktivnog vitamina D odnosno kalcidiola - 25(OH). On predstavlja glavni cirkulirajući metabolit vitamina D i najpouzdaniji je parametar za definiranje statusa vitamina D u ljudskom organizmu (171). Kalcidiol se potom u bubregu dalje pretvara u cirkulirajući biološki aktivan spoj kalcitriol -

(1,25(OH)<sub>2</sub>D) pomoću enzima 1- $\alpha$ -hidroksilaze (CYP27B1), a koji je pod strogom kontrolom paratiroidnog hormona i FGF-23 (engl. *fibroblast growth factor 23*) (172).

Osim bubrega, i druge stanice mogu aktivirati vitamin D, osobito makrofagi i dendritičke stanice koje proizvodnjom visokih koncentracija kalcitriola sudjeluju u imunomodulaciji (173).

Hormonsko djelovanje vitamina D je dokazano na gotovo svim organima. Ulaskom u jezgru stanice veže se na VDR tvoreći kompleks 1,25(OH)<sub>2</sub>D-VDR-RXR. U tom obliku se veže za DNA i regulira transkripciju gena i tako sudjeluje u sintezi *de novo* proteina (163).

#### **1.4.1. Vitamin D i kardiovaskularni sustav**

Vitamin D ima protuupalnu ulogu u kardiovaskularnim bolestima. U životinjskim modelima davanje vitamina D<sub>3</sub> smanjuje proizvodnju proupalnih citokina u makrofagima i smanjuje aterosklerozu i upalu u epikardijalnom masnom tkivu (174,175). Kod ljudi je opisana povezanost između niske razine 25(OH)D<sub>3</sub> i povećanog upalnog odgovora u epikardijalnom masnom tkivu u bolesnika s koronarnom bolesti srca (176). Nedostatak vitamina D povezan je s kardiovaskularnim bolestima ne samo modulacijom upalnih procesa, već i modulacijom funkcije endotela, djelujući nepovoljno na krutost arterija i potpomažući stvaranje aterosklerotskog plaka (177).

#### **1.4.2. Antimikrobni učinci vitamina D**

Novije studije pokazuju kako kalcitriol pojačava antimikrobne učinke makrofaga i monocita, koji su važne efektorske stanice, boreći se protiv patogena kao što je *Mycobacterium tuberculosis*. Osim poboljšanja kemotaksije i fagocitnih sposobnosti urođenih imunoloških stanica, kompleks kalcitriola, VDR-a i retinoidnog X receptora izravno aktivira transkripciju antimikrobnih peptida kao što su defensin  $\beta$ 2 (DEFB) i antimikrobnog peptida katelicidina (CAMP) (173,178,179).

Više istraživanja pokazalo je ulogu vitamina D kod infekcija. Tako su Georgieva i sur. ukazali na povećanu sklonost infekciji mokraćnog sustava djece s niskom razinom vitamina D zbog smanjene proizvodnje CAMP-a i DEFB (180,181). U bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti razine CAMP-a i drugih antimikrobnih peptida bile su povezane s povećanim rizikom od akutnih egzacerbacija (182). Liječenje s 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bilo je učinkovito u smanjenju respiratornih infekcija u bolesnika s astmom zahvaljujući povećanoj ekspresiji CAMP i modulaciji upalnih citokina (183). Podaci o ulozi statusa vitamina D i

suplementacije vitamina D u sepsi također su dostupni i u pedijatrijskih i u odraslih bolesnika: u pedijatrijskih bolesnika nije dokazana jasna uloga 25(OH)D3 i CAMP (184), dok je u odraslih niža razina 25(OH)D3 pronađene su kod sepse (185). Također, pokazano je kako visoka doza vitamina D3 povećava cirkulirajući CAMP i smanjuje upalne citokine kao što su IL-6 i IL-1 $\beta$  (184–186).

Opisana je uloga vitamina D u bolesnika s HIV infekcijom u kojoj su seronegativni HIV bolesnici imali poviše vrijednosti CAMP-a u oralnoj sluznici i perifernoj krvi. Također je detektirana povišena vrijednost CYP24A1 u vaginalnoj sluznici koja je ujedno indikator povišenih razina 1,25(OH)2D3 (187). Niska razina vitamina D u serumu povezana je s progresijom HIV/AIDS-a i smrtnošću (188).

Kao antimikrobni protektivni mehanizam spominje se i utjecaj 1,25(OH)2D3 na povećanu proizvodnju defensina  $\beta$ 2-4 iz monocita, što je dokazano u in vitro, i in vivo istraživanjima u djece (181,189,190).

Istraživanja su pokazala da vitamin D sudjeluje u jačanju integriteta epitelnih stanica rožnice i debelog crijeva povećavajući fagocitnu sposobnost imunoloških stanica (191). Stečeni imunitet je druga linija obrane od mikroorganizama u kojem sudjeluju T-limfociti i B-limfociti. Vitamin D3 djeluje inhibitorno na dendritičke stanice smanjujući proliferaciju T-limfocita. U eksperimentalnim modelima smanjuje imunološke odgovore posredovane T pomoćnim stanicama (Th1), čime se inhibira proizvodnja proupalnih citokina, kao što su interferon- $\gamma$  IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-2 i TNF- $\alpha$  (48,192).

Iako su eksperimentalna istraživanja in vitro i na životinjama dale ohrabrujuće rezultate o imunomodulatornom učinku 1,25(OH)2D3, u zadnjih nekoliko godina sve je više kliničkih studija na ljudskoj populaciji koje su potvrdile supresivni učinak vitamina D na Th1 stanice i stvaranje citokina u različitim bolestima, što govori u prilog potencijalnoj ulozi vitamina D u imunološkim zbivanjima unutar organizma (193–197). Vitamin D kao imunomodulator istraživali su i Athanassiou i Dhawan, te su ukazali na ulogu 1,25(OH)2D3 u povećanju sposobnosti urođenog imunološkog sustava da se bori protiv patogena (198,199). S druge strane podaci o učinku 1,25(OH)2D3 u modulaciji stečenog imunološkog sustava više su kontroverzni i potrebna su nova istraživanja za bolje razumijevanje uloge vitamina D u procesima stečene imunosti (200).

Sassija i sur. su istraživali utjecaj vitamina D u bolesnika na dijalizi i bolesnika s reumatoidnim artritismom. Usprkos primjeni velikih doza vitamina D3 (300 000 UI) nisu dokazali učinak vitamina D3 u modulaciji Th stanica (201).

U početku pandemije SARS-CoV2, u nedostatku drugih lijekova, poznavajući imunomodulatorna svojstva vitamina D, ublažavanje kliničke slike COVID-19 pokušavalo se postići pripravcima vitamina D. Petrelli i sur. su u svojoj studiji koja je uključivala 27 metaanaliza utvrdili povezanost niskih razina vitamina D i teškog i kritičnog oblika COVID-19. Također su bolesnici sa smrtnim ishodima imali niže razine vitamina D (202). Dissanayake i sur. su u svojoj multiploj opservacijskoj studiji koja je uključivala gotovo 2 milijuna bolesnika zaključili da su niske razine vitamina D povezane sa smrtnim ishodima najtežih COVID-19 bolesnika (203). Na tom tragu su Domazet i sur. napravili randomizirano kliničko ispitivanje koje je uključilo 155 bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 koji su liječeni u Jedinici intenzivnog liječenja i kojima se provodila mehanička ventilacija. Intervencijska skupina od 77 bolesnika je tijekom prvih 14 dana liječenja primala 10 000 i.j. vitamina D enteralnim putem. Studija nije pokazala značajnu razliku u trajanju mehaničke ventilacije između dvije ispitivane skupine (204).

Za sada ne postoji opći konsenzus o željenoj razini 25(OH)D3 za postizanje imunomodulacijskih učinaka, stoga trenutno nema indikacija za suplementaciju vitaminom D3 u bolesnika s infekcijama i/ili autoimunim bolestima.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

**Glavni ciljevi istraživanja:**

Napraviti usporedbu serumskih koncentracija katestatina u preživjelih i preminulih bolesnika u JIL-u s teškim i kritičnim oblikom COVID-19.

**Sporedni ciljevi istraživanja su:**

1. Usporediti serumske koncentracije GDF-15 u preživjelih i preminulih bolesnika u JIL-u s teškim i kritičnim oblikom COVID-19.
2. Usporediti serumske koncentracije vitamina D u preživjelih i preminulih bolesnika u JIL-u s teškim i kritičnim oblikom COVID-19.
3. Ispitati povezanost serumske koncentracije katestatina sa serumskim koncentracijama GDF-15.
4. Ispitati povezanost serumske koncentracije katestatina sa serumskim koncentracijama vitamina D.

**Hipoteze istraživanja su:**

1. Bolesnici s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 koji su preživjeli, imat će više serumske vrijednosti katestatina u odnosu na preminule bolesnike.
2. Bolesnici s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 koji su preživjeli, imat će više serumske razine vitamina D u odnosu na preminule bolesnike.
3. Bolesnici s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 koji su preživjeli imat će niže vrijednosti serumske razine GDF-15 u odnosu na preminule bolesnike.
4. Serumske razine katestatina pozitivno će korelirati sa serumskim razinama GDF-15.
5. Serumske razine katestatina pozitivno će korelirati sa serumskim razinama vitamina D.

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

### 3.1. Dizajn istraživanja i etička načela

Istraživanje je osmišljeno i provedeno na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Split i Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split je odobrilo istraživanjem pod brojem Klasa 500-03/21-01/14; Split 29. siječnja 2021. te je isto provedeno u skladu sa Etičkim načelima Helsinške deklaracije iz 2013. godine. Svi ispitanici su prije uključivanja u istraživanje upoznati o postupcima i ciljevima istraživanja. Potpisanim informiranim pristankom su potvrdili sudjelovanje u istraživanju.

### 3.2. Ispitanici

U istraživanje su uključena 152 bolesnika sa slikom teškog i kritičnog oblika COVID-19 koji su liječeni u Jedinici intenzivnog liječenja a za COVID bolesnike od rujna 2021. godine do veljače 2022. godine. Procjena težine kliničke slike bolesnika je prikazana u Tablici 1 i 2. Koristeći se MEWS kriterijima bolesnicima su dodijeljeni bodovi koji bi pomogli u razvrstavanju bolesnika ovisno o težini kliničke slike. Tako su bolesnici sa MEWS skorom 1-2 imali blagu do srednje tešku kliničku sliku COVID-19, bolesnici sa MEWS skorom 3 i 4 imali teški, a bolesnici sa skorom  $\geq 5$  kritični oblik COVID-19. Dijagnoza COVID-19 se temeljila na kliničkoj slici, laboratorijskim nalazima, pozitivnom PCR testu na SARS-CoV-2 dobivenim iz brisa nazofarinksa te radiološkim pretragama. Bolesnici su prvog dana liječenja zbog zatajenja disanja u Jedinici intenzivnog liječenja endotrahealno intubirani i priključeni na mehaničku ventilacijsku potporu.

Zatajenje disanja je glavni uzrok liječenja u vrijeme COVID pandemije u Jedinici intenzivnog liječenja. Hipoksija i hipoksemija su glavni razlozi potrebe za mehaničkom ventilacijom. Kriteriji za intubaciju i mehaničku respiracijsku potporu su: hipoksemija ( $\text{PaO}_2 < 50 \text{ mmHg}$  u arterijskoj krvi,  $\text{P/F} < 200 \text{ mmHg}$ ,  $\text{SpO}_2 < 90 \%$ ) usprkos neinvazivnoj potpori kisikom (HFNO – *high flow mechanical noninvasive oxygenation*, CPAP maska), zaduha i tahipneja (frekvencija disanja  $> 30/\text{min}$ ), acidoza ( $\text{pH} < 7,2$ ), suženo stanje svijesti i kardiocirkulacijski urušaj. Uz objektivne pokazatelje kao što su plinske analize krvi, ROX indeks, MEWS kriterije, Berlinska ljestvica procjene ARDS-a, u probiru bolesnika za mehaničku ventilaciju pouzdali smo se i u procjenu intenzivista o pogodnom vremenu intubacije. Kod svih ispitanika su primijenjena standardne metode liječenja kritičnih bolesnika, a najnovije metode liječenja COVID-19 primjenjivale su se sukladno dostupnim smjernica WHO i HZJZ.



Za napomenuti je da je u vrijeme provedenog istraživanja dominantan uzročnik bio Delta soj SARS-CoV-2 (B.1.617.2).

**Tablica 1.** Klinički oblik bolesti i definicija

Asimptomatska infekcija	<ul style="list-style-type: none"> <li>Osoba sa potvrđenom infekcijom SARS-CoV-2 bez kliničkih simptoma i znakova bolesti</li> </ul>
Blagi oblik bolesti (bez komplikacija)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nekomplicirana infekcija dišnog sustava uz vrućicu, opću slabost, grlobolju, kašalj, glavobolju, mialgiju i hunjavicu</li> <li>Bez prisutnih simptoma sepse i/ili zatajenja disanja</li> <li>MEWS score: <math>\leq 2</math></li> </ul>
Srednje teški oblik bolesti	<ul style="list-style-type: none"> <li>Teži simptomi respiratorne bolesti sa ili bez pneumonije,</li> <li>Bez kriterija za tešku pneumoniju</li> <li>Bez potrebe za oksigenoterapijom</li> <li>SpO<sub>2</sub> &gt; 93% na sobnom zraku</li> <li>MEWS score: 2</li> </ul>
Teški oblik bolesti	<ul style="list-style-type: none"> <li>Teška obostrana pneumonija</li> <li>frekvencija disanja &gt;30 udisaja/min,</li> <li>Zatajenje disanja</li> <li>Potreba za oksigenoterapijom</li> <li>SpO<sub>2</sub> <math>\leq</math> 93% na sobnom zraku</li> <li>MEWS score: 3–4</li> </ul>
Kritični oblik bolesti	<ul style="list-style-type: none"> <li>ARDS</li> <li>Sepsa i septički šok</li> <li>Koagulopatija</li> <li>Poremećaj svijesti</li> <li>Zatajenje bubrega</li> <li>MEWS score: <math>\geq 5</math></li> </ul>

MEWS score – indeks ranog upozorenja, engl. *Modified Early Warning Signal*

**Tablica 2.** Procjena težine bolesti prema Modified Early Warning Score (MEWS) kriterijima

<b>Bodovi</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Respiratorna frekvencija (udisaja/minuti)		< 9		9–14	15–20	21–29	> 30
Srčana frekvencija (puls/minuti)		< 40	41–50	51–100	101–110	111–129	> 130
Sistolički tlak (mmHg)	< 70	71–80	81–100	101–199		> 200	
Tjelesna temperatura (°C)		< 35		35,1–38,4		> 38,4	
Stanje svijesti				Budan	Odgovara na poziv	Odgovara na bol	Bez odgovora (GCS < 9)

Kriteriji uključenja u provedeno istraživanje su muški i ženski ispitanici stariji od 18 godina i mlađi od 90 godina s potvrđenom SARS-CoV-2 infekcijom, teškim i kritičnim oblikom COVID-19 i potrebom za mehaničkom ventilacijom.

Kriteriji isključenja su: bolesnici mlađi od 18 i stariji od 90 godina, bolesnici s aktivnom malignom i autoimunom bolesti, bolesnici s teškim bubrežnim ili jetrenim zatajenjem, bolesnici sa zatajenjem srca te politraumatizirani bolesnici koji zahtijevaju respiratornu mehaničku potporu i koji su pozitivni na SARS-CoV-2 infekciju.

### 3.3. Postupci

#### 3.3.1. Klinički pregled i antropometrijska mjerenja

Kod svakog uključenog ispitanika uzeti su anamnestički podaci ukoliko je zdravstveno stanje bolesnika to dopuštalo. S obzirom da se kod većine ispitanika radilo o žurnom zbrinjavanju heteroanamnestički podatci su prikupljeni od pratnje bolesnika ili pregledavajući medicinsku dokumentaciju.

#### 3.3.2. Uzorkovanje krvi i laboratorijske analize

Neposredno nakon akutnog zbrinjavanja svakom bi se ispitaniku uzorkovala arterijska i venska krv. Uzorci za analizu razine katestatina, GDF-15 i vitamina D su uzimani prilikom hospitalizacije bolesnika. Svi analizirani uzorci u referentnom bolničkom laboratoriju

obrađeni su od istog specijalista medicinske biokemije koji je poštovao smjernice dobre laboratorijske prakse. Dio uzoraka je analiziran svakodnevno, a dio centrifugiran (20 minuta na 2000 okretaja/minuti te na temperaturi od 4 °C), alikvotiran i skladišten u hladnjak na – 80 C te je korišten za naknadnu analizu serumskih koncentracija katestatina i GDF-15. Za vrijeme provođenja laboratorijskih analiza istraživači nisu bili upoznati kojoj skupini pripada koji ispitanik.

Razina visoko osjetljivog CRP-a (hs-CRP) određivana je lateks turbidimetrijskom metodom (Abbott Laboratories, Chicago, SAD). Druge biokemijske analize ukupni proteini, albumini, ureja, kreatinin, GUK, urati, AST, ALT, GGT, LDH, ALP ukupni i konjugirani bilirubin su određivane standardnim biokemijskim metodama na Abbott Architect c16200 platformi (Abbott, Chicago, SAD). Hematološki parametri (eritrociti, trombociti, leukociti, neutrofili, limfociti) su obrađeni na ADVIA 2120i platformi (Siemens AG, Erlangen, Njemačka).

### **3.3.2.1. Određivanje serumskih koncentracija katestatina**

Serumska koncentracija katestatina (kat. Br. EK-053-27CE, EIA kit, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, SAD) određena je dvostrukim enzimimunoadsorpcijskim testom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) po uputstvima koje je izdao proizvođač. Prema specifikacijama testa osjetljivost je iznosila 0,05 ng/mL s linearnim rasponom 0,05-0,92 ng/mL, mjerni raspon 0-100 ng/mL, križna reaktivnost za ljudski katestatin 100%, a koeficijent varijabilnosti bio je unutar testa.

### **3.3.2.2. Određivanje serumskih koncentracija GDF-15**

Serumska koncentracija GDF-15 je određena elektrokemiluminiscencijskim testom (engl. *electrochemiluminescence immunoassay*) na Cobas e8000 analizatoru (Elecsys, Roche Diagnostics) po uputstvima proizvođača. Prema specifikacijama testa osjetljivost je iznosila 400 pg/mL s linearnim rasponom 400–20,000 pg/mL.

## **3.4. Statistički postupci**

Statistički softver MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgija, verzija 20.110) smo koristili za analiziranje prikupljenih podataka. Sve kontinuirane kvantitativne varijable prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Nekontinuirane varijable prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon). Sve kvalitativne varijable prikazane su kao cijeli brojevi

i postoci. Normalnost distribucije procijenjena je Kolmogorov–Smirnovljevim testom. Usporedba kontinuiranih varijabli između skupina provedena je pomoću Studentovog t-testa, dok su nekontinuirane varijable uspoređivane pomoću Mann-Whitneyevog U-testa. Kategoričke varijable uspoređivane su između skupina pomoću hi-kvadrat testa. Korelacija je izračunata korištenjem Pearsonove korelacije za kontinuirane varijable i Spearmanove za nekontinuirane varijable. Dodatno, neovisni prediktori za preživljenje od COVID-19 procijenjeni su korištenjem multivarijantne logističke regresije, s prijavljenim OR (odds ratio), 95% CI (95% interval pouzdanosti) i p-vrijednošću. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Osnovne antropometrijske i kliničke karakteristike ispitanika

U studiju je uključeno 152 bolesnika sa teškim i kritičnim oblikom COVID-19 koje smo podijelili u dvije skupine. Prvu skupinu je činilo 105 (69 %) preživjelih bolesnika dok je drugu činilo 47 (31 %) preminulih bolesnika. Prosječna dob ispitivanog uzorka bila je  $76,4 \pm 8,6$  godina. Bilo je značajno više pušača u skupini preživjelih u usporedbi sa skupinom umrlih - 35 (33,3%) prema 7 (14,9%);  $p = 0,031$ . Nije bilo drugih značajnih razlika između skupine preživjelih i skupine umrlih u pogledu osnovnih karakteristika (Tablica 3).

**Tablica 3.** Antropometrijske i kliničke karakteristike ispitivanog uzorka.

Parametri	Ukupno (N = 152)	Skupina preživjelih (N = 105)	Skupina preminulih (N = 47)	<i>p</i>
Muški spol	82 (53,9)	56 (53,3)	26 (55,3)	0,959
Dob	$76,4 \pm 8,6$	$74,6 \pm 8,7$	$78,3 \pm 8,1$	0,074
Pušenje	42 (27,6)	35 (33,3)	7 (14,9)	0,031
DM	55 (36,2)	36 (34,3)	19 (40,4)	0,585
AH	74 (48,7)	47 (44,8)	27 (57,4)	0,203
Dislipidemija	29 (19,1)	21 (20,0)	8 (17,0)	0,834
CVD	39 (25,7)	23 (21,9)	16 (34,0)	0,166
Trajanje liječenja u bolnici	18 (14-26)	15 (12-22)	25 (17-32)	0,001
Trajanje boravka u JIL-u	$14,7 \pm 7,6$	$12,4 \pm 7,3$	$21,1 \pm 8,1$	0,001

podaci su prikazani kao cijeli broj (%), srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ili medijan (IQR).

\* hi-kvadrat test, t-test za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test

Kratice: DM – diabetes mellitus; AH – arterijska hipertenzija; CVD – kardiovaskularna bolest; JIL – jedinica intenzivnog liječenja

## 4.2. Klinički i laboratorijski pokazatelji

Skupina preživjelih bolesnika je imala značajno nižu razinu leukocita  $8,6 (5,8-11,2)$  u odnosu na  $11,8 (8,1-14,8) \times 10^9/L$ ;  $p = 0,002$ , neutrofila  $7,7 \pm 4,8$  prema  $10,1 \pm 6,7 \times 10^9 /L$ ;  $p = 0,014$ , LDH  $421,8 \pm 220,8$  naspram  $625,1 \pm 235,9$  umol/L;  $p < 0,001$  i hs-TnI  $(9,4 (6,0-14,1))$  naspram  $18,6 (9,2-30,8)$  ng/L;  $p < 0,001$ ).

Skupina preminulih je imala značajno nižu razinu limfocita  $0,9 (0,6-1,3)$  vs  $0,7 (0,3-1,0) \times 10^9 /L$ ;  $p = 0,002$  što je prikazano u Tablici 4.

**Tablica 4.** Klinički i laboratorijski pokazatelji prilikom prijema na bolničko liječenje

Parametar	Ukupno (N = 152)	Skupina preživjelih (N = 105)	Skupina preminulih (N = 47)	p
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	9,3 (6,1-12,3)	8,6 (5,8-11,2)	11,8 (8,1-14,8)	0,002
Neutrofili ( $\times 10^9/L$ )	$8,5 \pm 5,6$	$7,7 \pm 4,8$	$10,1 \pm 6,7$	0,014
Limfociti ( $\times 10^9/L$ )	0,7 (0,5-1,2)	0,9 (0,6-1,3)	0,7 (0,3-1,0)	0,002
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	$262,2 \pm 127,8$	$271,5 \pm 127,2$	$241,5 \pm 128,9$	0,183
hs-CRP (mmol/L)	$96,6 \pm 88,0$	$88,9 \pm 80,0$	$109,4 \pm 93,9$	0,171
Sistolički krvni tlak (mmHg)	$119,7 \pm 22,9$	$119,4 \pm 21,3$	$120,1 \pm 24,5$	0,858
Dijastolički krvni tlak (mmHg)	$83,0 \pm 12,9$	$82,5 \pm 12,1$	$83,9 \pm 14,2$	0,533
D-dimeri (mg/L)	$2,6 \pm 2,0$	$2,4 \pm 1,9$	$2,9 \pm 2,1$	0,148
LDH (umol/L)	$520,2 \pm 226,9$	$421,8 \pm 220,8$	$625,1 \pm 235,9$	<0,001
hs-TnI (ng/L)	12,1 (7,2-20,3)	9,4 (6,0-14,1)	18,6 (9,2-30,8)	<0,001

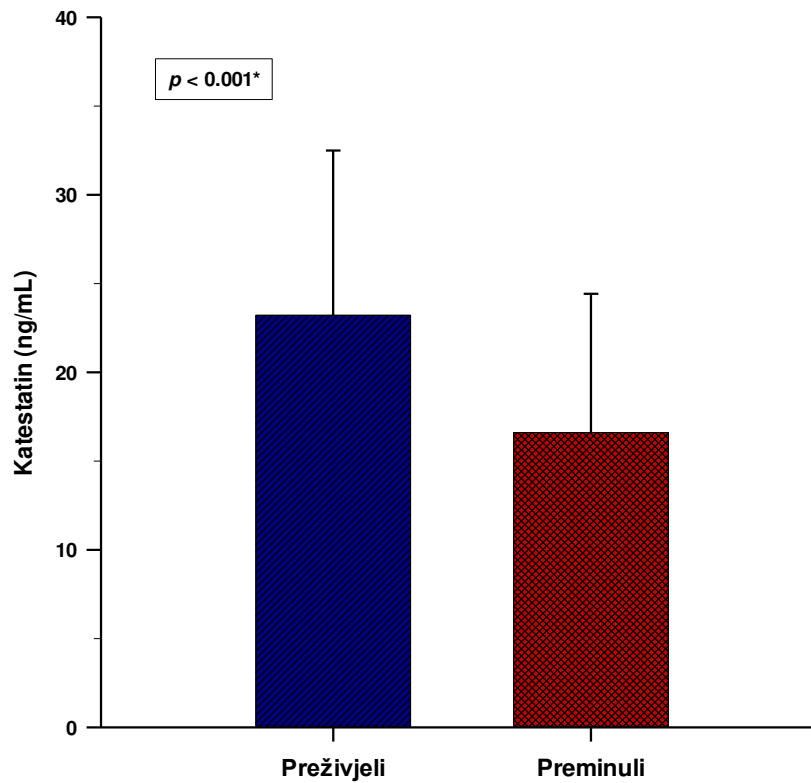
Podaci u tablici prikazani su kao cijeli broj (%), srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ili medijan (IQR).

\* hi-kvadrat test ili t-test za neovisne uzorke

Kratice: hs-CRP – C reaktivni protein visoke osjetljivosti; hs-TnI – troponin I visoke osjetljivosti.

### 4.3. Razine katestatina, Vitamina D i GDF-15 u bolesnika sa teškim i kritičnim COVID-19

Razine katestatina značajno su niže u skupini preminulih u usporedbi sa skupinom preživjelih bolesnika i to  $16,6 \pm 7,8$  naspram  $23,2 \pm 9,2$  ng/mL;  $p < 0,001$  (Slika 1).



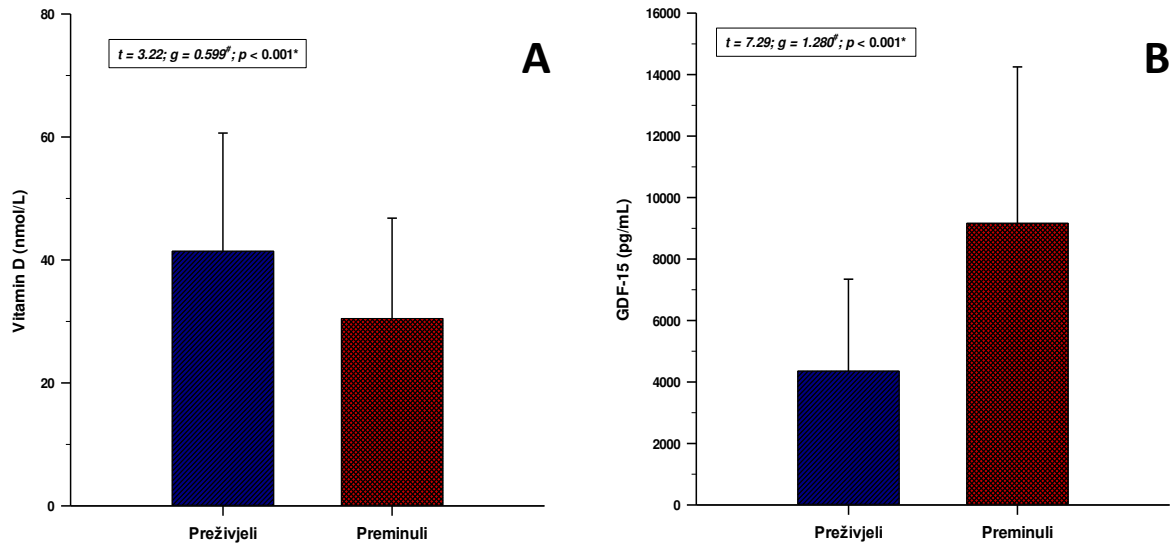
**Slika 1.** Usporedba razina katestatina u serumu između skupine preživjelih (N=105) i skupine preminulih (N=47).

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija

\*Studentov t-test



Razine vitamina D u serumu bile su značajno niže u skupini preminulih  $30,4 \pm 16,3$  nego u skupini preživjelih  $41,4 \pm 19,2$  nmol/L;  $p < 0,001$ , dok su razine GDF-15 bile značajno niže u skupini preživjelih ( $4354,2 \pm 2989,2$  nego u skupini preminulih  $9166,1 \pm 5086,5$  pg/mL;  $p < 0,001$  (Slika 2).



**Slika 2.** Usporedba razina (A) vitamina D i (B) GDF-15 između skupine preživjelih (N=47) i skupine preminulih (N=105).

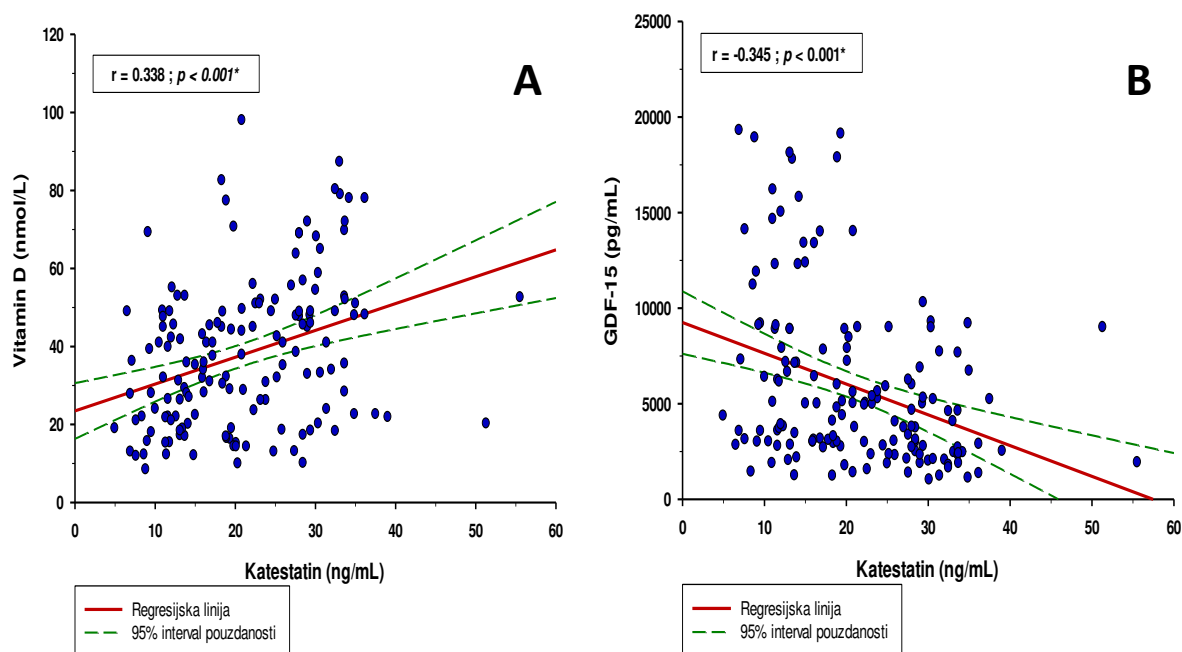
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Kratice: GDF-15 – Growth Differentiation Factor 15.

\* Studentov t-test

### 4.3. Korelacija katestatina i laboratorijskih i kliničkih pokazatelja

Bolesnici sa teškim i kritičnim oblikom COVID-19 imali su značajnu pozitivnu korelaciju između razina katestatina u serumu i razina vitamina D ( $r = 0,338$ ;  $p < 0,001$ ) i značajnu negativnu korelaciju između razina katestatina u serumu i razina GDF-15 ( $r = -0,345$ ;  $p < 0,001$ ) što je prikazano na Slici 3.



**Slika 3.** Korelacija katestatina s (A) vitaminom D i (B) GDF-15 u cijelom uzorku studije (N=152).

\* Pearsonov koeficijent korelacije

Nadalje, katestatin je imao značajnu pozitivnu korelaciju sa sistoličkim krvnim tlakom ( $r = 0,170$ ;  $p = 0,036$ ) i dijastoličkim krvnim tlakom ( $r = 0,201$ ;  $p = 0,013$ ) (Tablica 5).

**Tablica 5.** Korelacijska analiza katestatina i laboratorijskih i kliničkih pokazatelja

Parametar	$r^*$	$p$
Dob	-0,006	0,938
Trajanje liječenja u bolnici	-0,009	0,912
Trajanje liječenja u JILu	-0,045	0,581
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	0,037	0,652
Neutrofili ( $\times 10^9/L$ )	-0,013	0,872
Limfociti ( $\times 10^9/L$ )	0,112	0,169
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	0,081	0,321
hs-CRP (mmol/L)	-0,032	0,695
Sistolički krvni tlak (mmHg)	0,170	0,036
Dijastolički krvni tlak (mmHg)	0,201	0,013
D-dimeri (mg/L)	0,156	0,054
LDH (umol/L)	0,120	0,140
hs-TnI (ng/L)	-0,092	0,259

\* Perason's ili Spearman's korelacijski koeficijent

#### 4.4. Katestatin, vitamin D i GDF-15 u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19

Multivarijabilna logistička regresija pokazala je da su razine katestatina bile značajan negativan prediktor (OR 0,934, 95% CI 0,886-0,984,  $p = 0,010$ ) za smrtni ishod COVID-19. S druge strane, razine GDF-15 (OR 1,037, 95% CI 1,022-1,054,  $p < 0,001$ ) i broj leukocita (OR 1,077, 95% CI 1,003-1,157,  $p = 0,008$ ) bili su značajni pozitivni prediktori za smrtni ishod COVID-19. Druge izračunate neovisne varijable bile su dob, spol i razine vitamina D (Tablica 6).

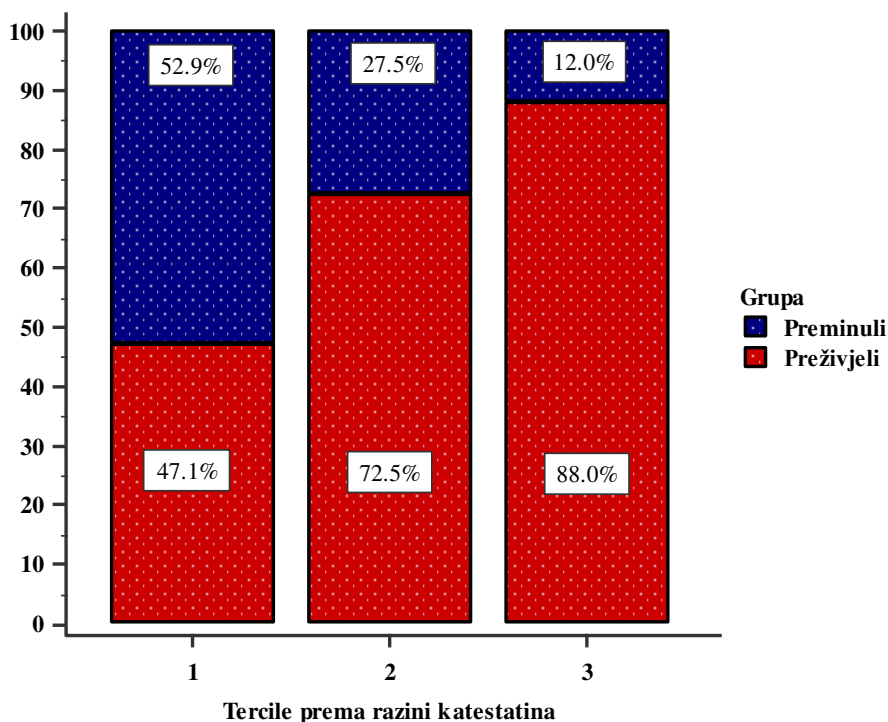
**Tablica 6.** Multivarijabilni logistički regresijski model neovisnih prediktora za smrtni ishod COVID-19.

Parametar	OR	95% CI	<i>p</i>
Dob	1,030	0,976 - 1,087	0,271
Muški spol*	1,172	0,497 - 2,761	0,716
Katestatin	0,934	0,886 - 0,984	0,010
GDF-15	1,037	1,022 - 1,054	<0,001
Vitamin D	1,006	0,979 - 1,034	0,640
Leukociti	1,077	1,003 - 1,157	0,040

Kratice: OR- multivarijabilni prilagođeni omjer izgleda; 95% CI- 95% interval pouzdanosti;

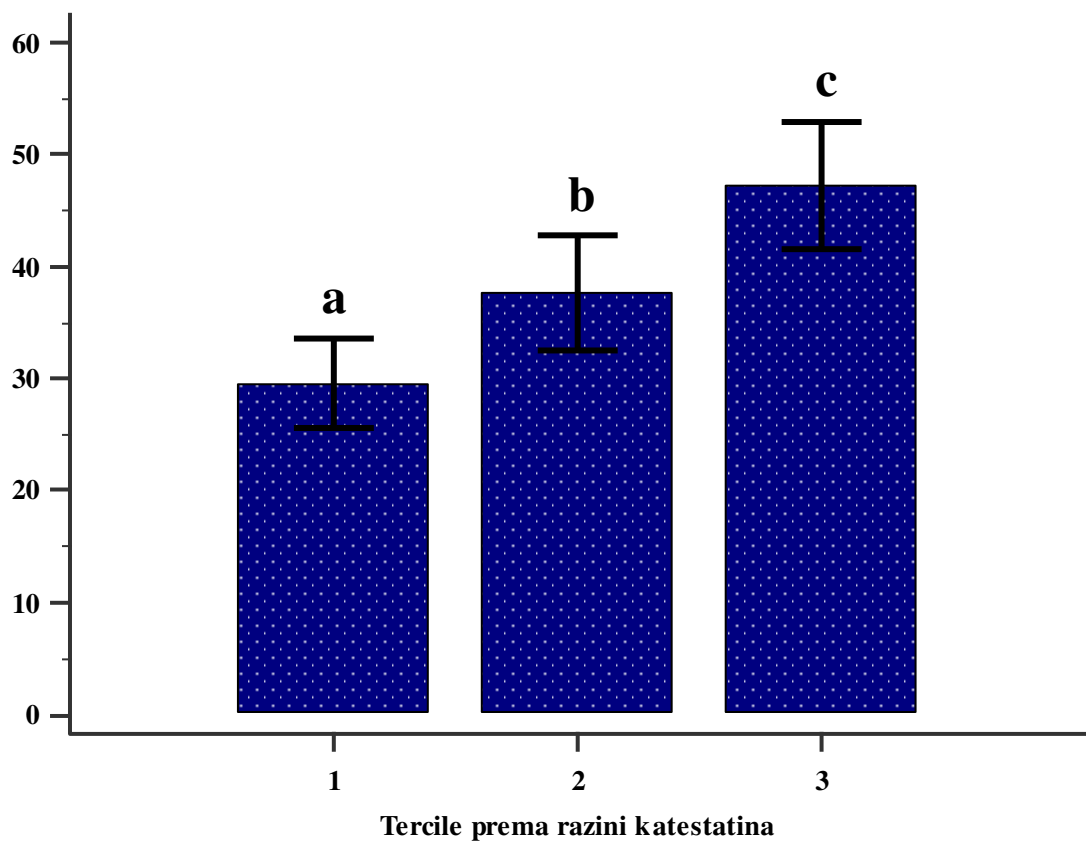
\* Ženski spol je bio referentna skupina

Nakon podjele ukupnog ispitivanog uzorka u tercile prema serumskoj razini katestatina dobile su se tri skupine s podjednakim brojem bolesnika. U prvoj tercili (N=51) je serumska razina katestatina bila <16 ng/mL, u drugoj tercili je bila 16-27 ng/mL dok je u trećoj tercili bila >27 ng/mL. (Slika 4).



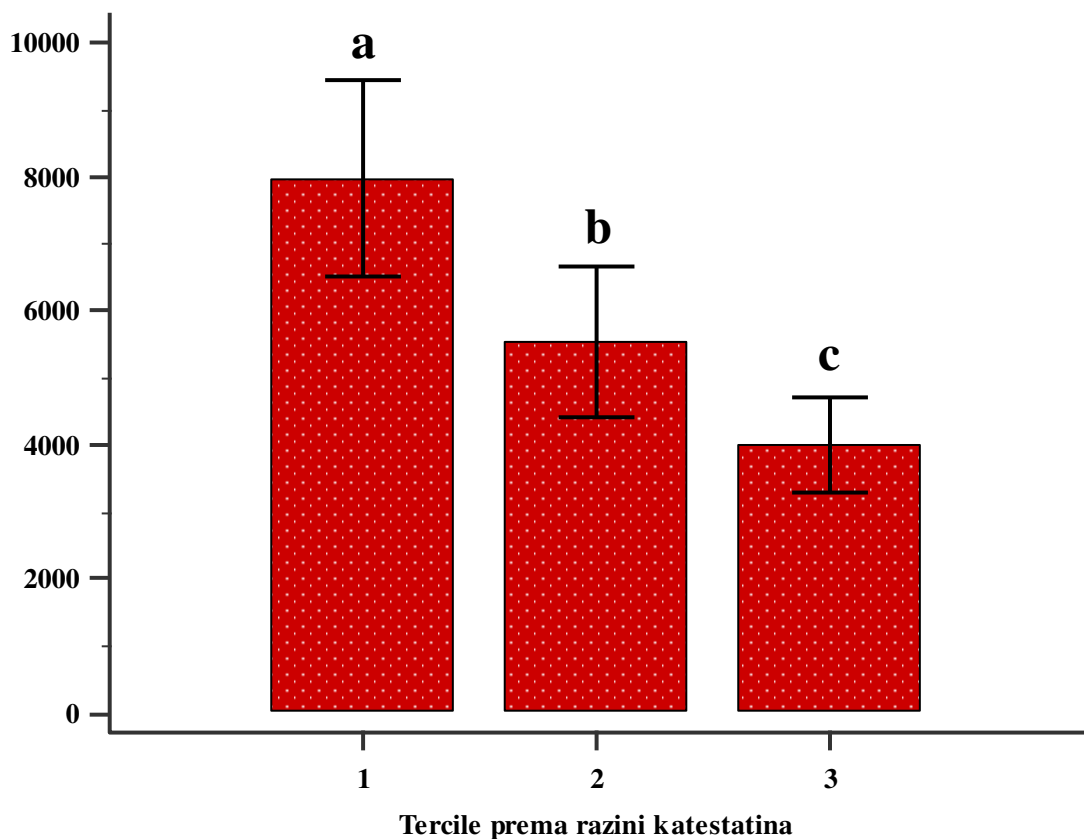
**Slika 4.** Usporedba broja preživjelih i preminulih ispitanika u ukupnom ispitivanom uzorku podijeljenom na tercile prema serumskim razinama katestatina.

Usporedbom broja preživjelih i broja preminulih bolesnika između tercila razine katestatina pronađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ). Naime, u prvoj tercili je bilo 27 preminulih te 24 preživjela, u drugoj tercili je bilo 14 preminulih i 37 preživjelih dok je u trećoj tercili bilo 6 preminulih i 44 preživjela pacijenta.



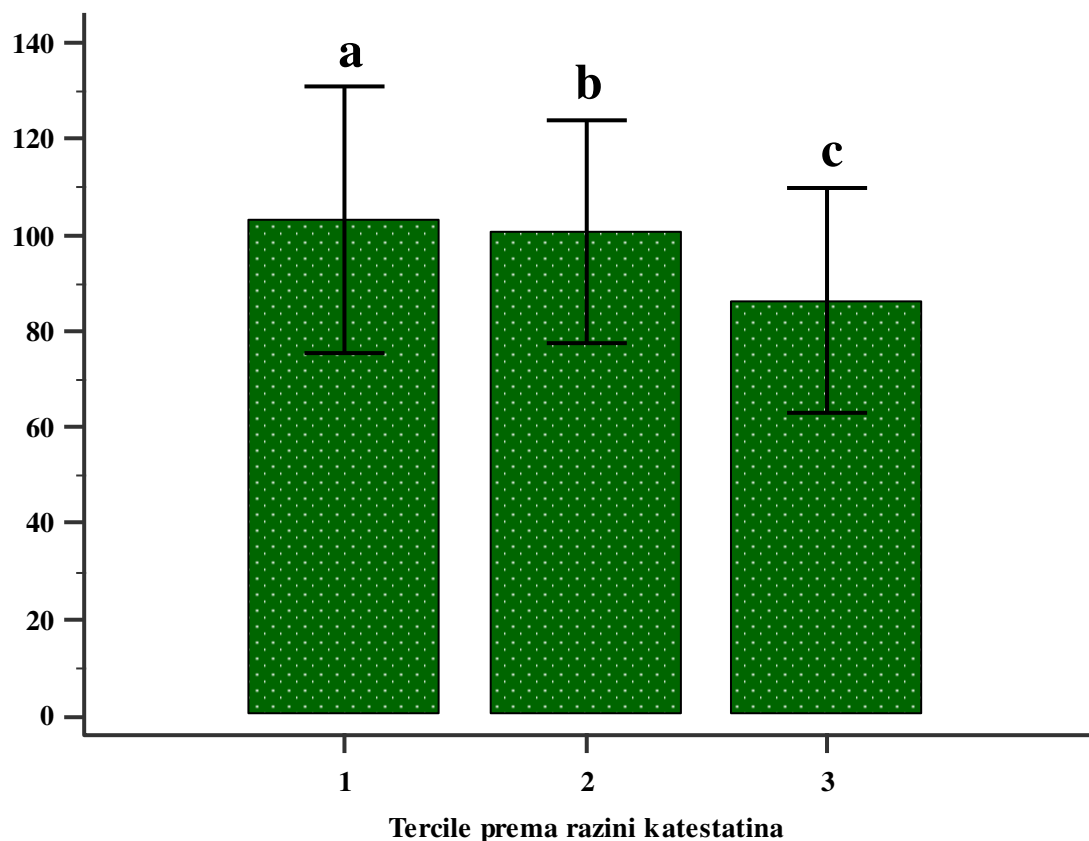
**Slika 5.** Usporedba serumskih razina vitamina D u ukupnom ispitivanom uzorku podijeljenom na tercile prema serumskim razinama katestatina.

Usporedbom serumskih razina vitamina D između tercila prema serumskoj razini katestatina pronađena je statistički značajna razlika ( $F = 12,67, p < 0,001$ ). Naime, bolesnici u trećoj tercili ( $47,2 \pm 20,1$  nmol/L) su imali statistički značajno niže razine vitamina D usporedno s drugom tercilom ( $37,5 \pm 18,3$  nmol/L) i prvom tercilom ( $29,5 \pm 14,1$  nmol/L) (Slika 5).



**Slika 6.** Usporedba serumskih razina GDF-15 u ukupnom ispitivanom uzorku podijeljenom na tercile prema serumskim razinama katestatina.

Također, pri usporedbi serumskih razina GDF-15 između tercila prema serumskoj razini katestatina pronađena je statistički značajna razlika ( $F = 12,32, p < 0.001$ ). Naime, prva tercila ( $7969 \pm 5195$  nmol/L) je imala statistički značajno više razine GDF-15 u usporedbi s drugom tercilom ( $5532 \pm 4018$  nmol/L) i trećom tercilom ( $3988 \pm 2503$  nmol/L) (Slika 6).



**Slika 7.** Usporedba serumskih razina hsCRP-a u ukupnom ispitivanom uzorku podijeljenom na tercile prema serumskim razinama katestatina.

Međutim, pri usporedbi serumskih razina hsCRP-a između tercila prema serumskoj razini katestatina nije pronađena statistički značajna razlika ( $F = 0,52$ ,  $p = 0,593$ ). Naime, treća terčila ( $86,3 \pm 82,3$  nmol/L) je imala najniže razine hsCRP-a, ali nije bilo statistički značajne razlike u usporedbi s drugom tercilom ( $100,5 \pm 82,8$  nmol/L) i trećom tercilom ( $103,0 \pm 98,8$  nmol/L) (Slika7).



**Tablica 7.** Multipli linearni regresijski model nezavisnih prediktora serumske razine katestatina.

Parametar	$\beta^*$	SE <sup>†</sup>	t-vrijednost	<i>p</i>
Dob (godine)	0,047	0,122	0,385	0,701
Sistolički tlak (mmHg)	0,026	0,041	0,643	0,522
Trombociti (10 <sup>9</sup> /L)	0,017	0,007	2,209	0,030
Leukociti (10 <sup>9</sup> /L)	-0,125	0,104	-1,199	0,235
Vitamin D (nmol/L)	0,136	0,058	2,332	0,022
hsCRP (mmol/L)	-0,024	0,010	-2,326	0,023

**Kratice:** hsCRP- visoko osjetljivi C-reaktivni protein

\* nestandardizirani koeficijent  $\beta$

† standardna pogreška

Multipla linearna regresijska analiza je pokazala da kao nezavisne varijable, serumska razina vitamina D ( $\beta \pm SE$ ,  $0,136 \pm 0,058$ ,  $p = 0,022$ ) te broj trombocita ( $0,017 \pm 0,007$ ,  $p = 0,030$ ) imaju pozitivnu prediktivnu vrijednost na serumske razine katestatina kao zavisnu varijablu. Također, isti linearni regresijski model je pokazao da kao nezavisna varijabla serumska razina hsCRP-a ( $-0,024 \pm 0,010$ ,  $p = 0,023$ ) ima negativnu prediktivnu vrijednost na serumske razine katestatina kao zavisnu varijablu (Tablica 7).

## **5. RASPRAVA**

Rezultati naše studije pokazuju da su razine katestatina u serumu, u bolesnika liječenih u Jedinici intenzivnog liječenja bile značajno niže u skupini COVID-19 bolesnika sa smrtnim ishodom u usporedbi s COVID-19 bolesnicima bez smrtnog ishoda. Nadalje, postojala je značajna pozitivna korelacija između razina katestatina i razina vitamina D te značajna negativna korelacija između razina katestatina i razina GDF-15 u serumu ispitivanih bolesnika. Model logističke regresije pokazao je da je katestatin značajan negativan prediktor smrtnog ishoda u bolesnika sa COVID-19 u našem istraživanju. Po dostupnoj literaturi, ovo je prvo istraživanje koje je proučavalo razine katestatina u serumu bolesnika sa teškim i kritičnim oblikom COVID-19.

Zanimljiva studija Schriedera i sur. objavljena nakon naše studije također je istraživala razine katestatina i kromogranina A u bolesnika sa COVID-19 liječenih u Jedinici intenzivnog liječenja (JIL), te su uspoređeni s dvije skupine; COVID-19 bolesnicima s blažom kliničkom slikom koji su liječeni na drugim odjelima te sa zdravom kontrolnom skupinom. Uzorak za analizu uzet je pri dolasku bolesnika na hitni prijem. Rezultati njihove studije pokazali su da su bolesnici s COVID-19 imali značajno više razine katestatina i kromogranina A u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu pri prijemu. Ono što su autori naglasili je da su se bolesnici uključeni u studiju javljali na hitni prijem na samom početku simptoma, odnosno prije eventualne potrebe za liječenjem u JIL-u. U tom svjetlu moguće je objasniti razlike u rezultatima između ovih dviju studija, s obzirom da su naši bolesnici uglavnom obrađivani preko hitnih prijema, te liječeni neinvazivnim metodama prije primitka u JIL. Samim time, moguće je pretpostaviti kako katestatin ima svoju dinamiku u COVID-19, ovisno o samoj fazi bolesti (205).

Do sada je utvrđeno u brojnim prethodnim studijama kako katestatin ima važnu imunomodulatornu ulogu (206–209). Točnije, način na koji se objašnjava protuupalno djelovanje katestatina je njegov učinak na supresiju migracije i infiltracije monocita u tkiva kao i supresija upale izazvane makrofagima (210).

Ishodi ove studije pokazali su kako su razine katestatina u serumu bile više u bolesnika sa smrtnim ishodom i bolesnika bez smrtnog ishoda s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 koji su bili liječeni u Jedinici intenzivnog liječenja u usporedbi s referentnim vrijednostima zdravih kontrolnih ispitanika odgovarajuće dobi i spola u ranijim studijama (116,122,211–215). Međutim, iako je bio viši od referentnih vrijednosti, katestatin je još uvijek bio značajno niži u skupini sa smrtnim ishodom nego u skupini bez smrtnog ishoda. Iako se ovo čini paradoksalnim zbog činjenice da je katestatin obično viši u upalnim stanjima, neke od prethodno provedenih studija također su pokazale da su razine katestatina u serumu niže u

određenim stanjima (206,211,216–218). Jedno od objašnjenja za ovakve rezultate može se prikazati u svijetlu novih pretpostavki koji govore u prilog negativnoj povratnoj spregi kod makrofaga, koji proizvode katestatin. Naime, povišena aktivnost katestatina dokazana je u stanjima kao što su preeklampsija, srčano zatajenje i akutna plućna embolija u usporedbi sa zdravim kontrolama. Međutim, stanja kao što su hipertenzija i pretilost su stanja kod kojih je pokazano da su razine katestatina snižene. Prema tome, nove pretpostavke sugeriraju kako proizvodnja katestatina u makrofazima zapravo ovisi o samoj fazi upale, te da katestatin može služiti kao čimbenik autosupresije makrofaga. Međutim, da bi se ove pretpostavke utvrdile potrebno je provesti dodatna istraživanja (210).

Dosadašnja istraživanja pokazala su kako katestatin smanjuje ekspresiju liganda integrina na endotelnim stanicama (117,207,218). Njegov učinak pokazuje smanjenje migracije monocita dok se makrofagi usmjeravaju prema protuupalnom fenotipu što posljedično dovodi do pojačane regulacije protuupalnih markera i povećane proizvodnje IL-10 i IL-4 (102,206). Nadalje, pokazalo se da je kasnija ekspresija proupalnih citokina ozbiljno smanjena (117,206). Novi dokazi upućuju da je endotelna ozljeda posredovana SARS-CoV-2 važan efektor virusa, uključujući čak i preklapanje s ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom (219,220). S druge strane, pokazalo se da katestatin stimulira put NO-cGMP inhibirajući receptor endotelina-1, čime se dodatno potvrđuje da promjena u razinama katestatina u serumu odražava oštećenje vaskularnog endotela (221).

Jedno od obilježja teške infekcije COVID-19 je sindrom oslobađanja citokina (engl. *Cytokine release syndrome*, CRS) (222). U nekoliko je studija utvrđeno da su razine proupalnih citokina bile više u bolesnika s COVID-19 u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima, dok su kod zaraženih COVID-19 bolesnika bile značajno više u bolesnika liječenih u intenzivnim jedinicama nego u onih koji nisu liječeni u intenzivnim jedinicama (223). Ovi rezultati sugeriraju da je prekomjerna proizvodnja citokina povezana s težinom bolesti COVID-19. Štoviše, brojne su studije pokazale da su razine katestatina niže kod DM i pretilosti (206,211,216,217). Ta se stanja smatraju komorbiditetima visokog rizika za tešku infekciju COVID-19. Moguće je da bi katestatin mogao biti jedna od poveznica između teške infekcije COVID-19 i CRS-a. Međutim, ovom bi se hipotezom trebalo pozabaviti budućim većim studijama.

Kao što je gore spomenuto, rezultati ove studije pokazuju negativnu korelaciju između serumskih razina katestatina i GDF-15. Prethodne studije su dobro utvrdile povezanost između GDF-15 i razvoja i napredovanja brojnih bolesti zbog svoje metaboličke regulacije (224). Štoviše, nedavne studije provedene na bolesnicima sa COVID-19 otkrile su da oštećenje tkiva

i hipoksija dovode do značajnog porasta aktivnosti GDF-15 (46,225,226). Svi ovi dokazi ukazali su na to da bi GDF-15 mogao biti snažan prediktor težine i nepovoljnih ishoda COVID-19.

Naši rezultati se mogu usporediti sa sličnim studijama. Alserawan i sur. istraživali su povezanost razina GDF-15 u bolesnika s teškim COVID-19 te su njihovi rezultati pokazali kako su razine GDF-15 povišene u istraživanoj skupini te da koreliraju s težinom bolesti. Nadalje, njihovo istraživanje je pokazalo kako GDF-15 pozitivno korelira s razinom hipoksemije i ozljedom plućnog tkiva, uspoređujući  $SpO_2/FiO_2$  omjere (227).

Također, istraživanja su pokazala kako endotelna disfunkcija potiče pojačanu ekspresiju GDF-15. S obzirom da endotelne stanice predstavljaju izravnu metu SARS-CoV-2 te da endotelna disfunkcija igra važnu ulogu u patogenezi COVID-19, pojačana ekspresija GDF-15 može se objasniti kao posljedica oštećenja endotelnih stanica uzrokovanih upalom i oksidativnim stresom (228,229).

Kao što je gore spomenuto, katestatin svojim imunomodulatornim učincima smanjuje ekspresiju integrinskih liganada na endotelnim stanicama za koje je poznato da smanjuju endotelnu disfunkciju (230). Stoga se čini da ova dva peptida vjerojatno imaju suprotne, ali velike učinke na upalu koju uzrokuje COVID-19. Štoviše, moguće je da bi njihova međusobna povezanost u složenim patofiziološkim putovima mogla biti jedan od razloga zašto rezultati ove studije pokazuju značajno niži katestatin u skupini COVID-19 bolesnika sa smrtnim ishodom u usporedbi sa COVID-19 bolesnicima bez smrtnog ishoda. Ipak, naš model logističke regresije pokazao je da su oba značajni prediktori ishoda bolesti COVID-19.

Još jedan važan rezultat ove studije je pozitivna korelacija između serumskih razina katestatina i vitamina D. Vitamin D je temeljito istražen u pogledu njegove povezanosti s dobrim ishodom infekcije COVID-19 (231). Pretpostavlja se da je to zbog sposobnosti vitamina D u modulaciji različitih aspekata urođenog i stečenog imunološkog sustava, kao i antivirusnog učinka na viruse s ovojnicom kroz regulaciju antimikrobnih peptida (232–235). Štoviše, svojim protuupalnim djelovanjem ublažava akutnu ozljedu pluća izazvanu COVID-19 i posljedično smanjuje ozbiljnost bolesti (236,237). Stoga je moguće da nedostatak vitamina D pridonosi indukciji CRS-a, kao i neadekvatnoj zaštiti i popravku epitelnih stanica pluća, što sve na kraju uzrokuje visoku ranjivost pluća na smrtonosnu imunološku disregulaciju (238–240).

Budući da prema dosadašnjim studijama i katestatin pokazuje sličan protuupalni učinak, moguće je da postoji međusobna povezanost njihovih učinaka. Nadalje, dvije studije na životinjama pokazale su da su lučenje i sinteza kromogranina A u paratireoidnoj žlijezdi

izravno stimulirani povećanom koncentracijom vitamina D (241,242). To bi moglo implicirati da nedostatak vitamina D vjerojatno smanjuje izlučivanje kromogranina A i posljedično nižu razinu katestatina. Ipak, to treba potvrditi u budućim studijama.

Kada ispitivane bolesnike podjelimo prema tercilama, u skupini s najvećim brojem preživjelih bolesnika (treća tercila), razine katestatina bile su značajno više u odnosu na preostale tercile. Takva podjela potvrđuje rezultate naše studije koji govore u prilog potencijalnoj protektivnoj ulozi katestatina u sklopu COVID-19 infekcije. Nadalje, kada bolesnike podjelimo u tercile prema razinama katestatina te promatramo razine vitamina D, bolesnici u trećoj tercili s najvišom razinom katestatina imali su značajno više razine vitamina D u odnosu na ostale bolesnike. Ovi rezultati također potvrđuju pozitivnu korelaciju katestatina i vitamina D. Naši rezultati su u skladu s istraživanjima koji su dokazali kako su bolesnici s COVID-19 imali značajno niže razine vitamina D te da je imunomodulatorna osovina u bolesnika s COVID-19 značajno narušena. Kada kroz tercile promatramo odnos katestatina i GDF-15, skupina bolesnika s najnižom razinom katestatina imala je najviše razine GDF-15. Ti rezultati su također u skladu s našim drugim rezultatima, ali i istraživanjima drugih studija koje govore u prilog tome da je GDF-15 prediktor lošijeg ishoda u bolesnika s COVID-15. Nadalje, promatrajući razine hsCRP prema tercilama razine katestatina, iako je treća tercila imala najniže razine hsCRP-a, nije pronađena statistički značajna razlika.

Postoji nekoliko ograničenja ove studije. Osim što je istraživanje ograničeno relativno malim uzorkom, bitno je napomenuti kako je istraživanje provedeno u jednom kliničkom centru. Za bolje razumijevanje ovih biomarkera i utvrđivanje njihovih dijagnostičkih i terapijskih mogućnosti, ovakvu studiju bi bilo poželjno provesti u više različitih centara s jedinicama intenzivnog liječenja. Nadalje, s obzirom da se radi o presječnoj studiji, nije moguće utvrditi bilo kakvu uzročnu povezanost, kao što je duljina trajanja simptoma same bolesti te njena implikacija na naše rezultate. Iako je katestatin dobro istražen biomarker u upalnim stanjima i moguće je usporediti rezultate s drugim studijama, jedan od bitnih ograničavajućih čimbenika ovog istraživanja je nedostatak zdrave kontrolne skupine, čime bi se dodatno potvrdili dobiveni rezultati. U ovoj studiji, virusno opterećenje nije procijenjeno, a takav aspekt potencijalno može biti relevantan za razine katestatin i GDF-15 u serumu. Na kraju, nismo mogli eliminirati sve zbunjujuće učinke koji bi utjecali na rezultate studije.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Razine katestatina bile su značajno niže u skupini preminulih usporedno sa skupinom preživjelih bolesnika s teškim ili kritičnim oblikom COVID-19 liječenih u JIL-u.
2. Razine vitamina D u serumu bile su značajno niže u skupini preminulih nego u skupini preživjelih bolesnika s teškim ili kritičnim oblikom COVID-19 liječenih u JIL-u.
3. Razine GDF-15 bile su značajno niže u skupini preživjelih bolesnika s teškim ili kritičnim oblikom COVID-19 liječenih u JIL-u.
4. U bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 postojala je značajna pozitivna korelacija između katestatina i vitamina D.
5. Utvrđena je značajna negativna korelacija između katestatina i GDF-15.
6. Utvrđena je pozitivna korelacija katestatina sa sistoličkim i dijastoličkim tlakom.
7. Razine katestatina u serumu bile su značajan negativan prediktor za smrtni ishod.
8. Razine GDF-15 i broj leukocita bili su pozitivni prediktori za smrtni ishod COVID-19.



## **7. LITERATURA**

1. Coronavirus [Internet]. [citirano 09. siječanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>
2. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020;26:450–2.
3. Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS i sur. Coronavirus disease 2019–COVID-19. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33:e00028-20.
4. Palacios Cruz M, Santos E, Velázquez Cervantes MA, León Juárez M. COVID-19, a worldwide public health emergency. *Rev Clin Esp.* 2021;221:55–61.
5. 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.
6. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y i sur. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *N Engl J Med.* 2020;382:1199–207.
7. Cosar B, Karagulleoglu ZY, Unal S, Ince AT, Uncuoglu DB, Tuncer G i sur. SARS-CoV-2 mutations and their viral variants. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2022;63:10–22.
8. 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.
9. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y i sur. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study. *Lancet.* 2020;395:507–13.
10. WHO-convened global study of the origins of SARS-CoV-2 [Internet]. [citirano 18. siječanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/m/item/who-convened-global-study-of-the-origins-of-SARS-CoV-2>
11. Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE. Transmission of SARS-CoV-2: A review of viral, host, and environmental factors. *Ann Intern Med.* 2021;174:69–79.
12. Advice on the use of masks in the community, during home care and in healthcare settings in the context of the novel coronavirus (COVID-19) outbreak [Internet]. [citirano 18. siječanj 2024.]. Dostupno na: [https://www.who.int/publications-detail-redirect/advice-on-the-use-of-masks-in-the-community-during-home-care-and-in-healthcare-settings-in-the-context-of-the-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-outbreak](https://www.who.int/publications-detail-redirect/advice-on-the-use-of-masks-in-the-community-during-home-care-and-in-healthcare-settings-in-the-context-of-the-novel-coronavirus-(2019-ncov)-outbreak)
13. Duval D, Palmer JC, Tudge I, Pearce-Smith N, O’Connell E, Bennett A i sur. Long distance airborne transmission of SARS-CoV-2: rapid systematic review. *BMJ.* 2022;377:e068743.

14. Razani N, Malekinejad M, Rutherford GW. Clarification regarding “outdoor transmission of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses: A systematic review”. *J Infect Dis.* 2021;224:925–6.
15. Martinez-Reviejo R, Tejada S, Cipriano A, Karakoc HN, Manuel O, Rello J. Solid organ transplantation from donors with recent or current SARS-CoV-2 infection: A systematic review. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2022;41:101098.
16. WHO-2019-ncov-mother-to-child-transmission-2021.1-eng.pdf [Internet]. [citirano 18. siječanj 2024.]. Dostupno na: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/339422/WHO-2019-nCoV-mother-to-child-transmission-2021.1-eng.pdf?sequence=1>
17. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C i sur. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020;8:420–2.
18. Hakki S, Zhou J, Jonnerby J, Singanayagam A, Barnett JL, Madon KJ i sur. Onset and window of SARS-CoV-2 infectiousness and temporal correlation with symptom onset: a prospective, longitudinal, community cohort study. *Lancet Respir Med.* 2022;10:1061–73.
19. Johnston C, Hughes H, Lingard S, Hailey S, Healy B. Immunity and infectivity in COVID-19. *BMJ.* 2022;378:e061402.
20. WHO. Use of mask in community [Internet]. [citirano 18. siječanj 2024.]. Dostupno na: [https://www.who.int/publications/i/item/advice-on-the-use-of-masks-in-the-community-during-home-care-and-in-healthcare-settings-in-the-context-of-the-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-outbreak](https://www.who.int/publications/i/item/advice-on-the-use-of-masks-in-the-community-during-home-care-and-in-healthcare-settings-in-the-context-of-the-novel-coronavirus-(2019-ncov)-outbreak)
21. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L i sur. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage b.1.1.7 in England. *Nature.* 2021;593:266–9.
22. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J i sur. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature.* 2021;592:438–43.
23. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S i sur. Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *medRxiv.* 2021;2021.02.26.21252554.
24. Callaway E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. *Nature.* 2021;600:21.

25. Ahammed T, Anjum A, Rahman MM, Haider N, Kock R, Uddin MJ. Estimation of novel coronavirus (COVID-19) reproduction number and case fatality rate: A systematic review and meta-analysis. *Health Sci Rep.* 2021;4:e274.
26. Aydillo T, Gonzalez-Reiche AS, Aslam S, van de Guchte A, Khan Z, Obla A i sur. Shedding of viable SARS-CoV-2 after immunosuppressive therapy for cancer. *N Engl J Med.* 2020;383:2586–8.
27. Stokel-Walker C. How long does SARS-CoV-2 stay in the body? *BMJ.* 2022;377:o1555.
28. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: a review. *Clin Immunol.* 2020;215:108427.
29. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The coronavirus spike protein is a class i virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol.* 2003;77:8801–11.
30. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA i sur. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426:450–4.
31. Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for sars coronavirus. a first step in understanding sars pathogenesis. *J Pathol.* 2004;203:631–7.
32. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses.* 2012;4:1011–33.
33. Yang N, Shen HM. Targeting the endocytic pathway and autophagy process as a novel therapeutic strategy in COVID-19. *Int J Biol Sci.* 2020;16:1724–31.
34. Da Rosa MR, Francelino LC, Santos FM, Farias de Oliveira T, Campos Alcântara R, Monteiro Arnozo G i sur. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. *Wien Klin Wochenschr.* 2021;133:377–82.
35. Schulert GS, Grom AA. Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine- directed therapies. *Annu Rev Med.* 2015;66:145–59.
36. Maiese A, Bolino G, Mastracchio A, Frati P, Fineschi V. An immunohistochemical study of the diagnostic value of trem-1 as marker for fatal sepsis cases. *Biotech Histochem.* 2019;94:159–66.
37. Chen Y, Li L. SARS-CoV-2: Virus dynamics and host response. *Lancet Infect Dis.* 2020;20:515–6.
38. Manetti AC, Maiese A, Paolo MD, De Matteis A, La Russa R, Turillazzi E i sur. MicroRNAs and sepsis-induced cardiac dysfunction: a systematic review. *Int J Mol Sci.* 2020;22:321.

39. Maiese A, Passaro G, Matteis AD, Fazio V, Raffaele LR, Paolo MD. Thromboinflammatory response in SARS-CoV-2 sepsis. *Med Leg J.* 2020;88:78–80.
40. Domingo P, Mur I, Pomar V, Corominas H, Casademont J, de Benito N. The four horsemen of a viral apocalypse: the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection (COVID-19). *EBioMedicine.* 2020;58:102887.
41. Frisoni P, Neri M, D’Errico S, Alfieri L, Bonuccelli D, Cingolani M i sur. Cytokine storm and histopathological findings in 60 cases of COVID-19-related death: from viral load research to immunohistochemical quantification of major players IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15 and TNF- $\alpha$ . *Forensic Sci Med Pathol.* 2022;18:4–19.
42. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R i sur. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell.* 2020;181:1036-1045.e9.
43. Wang EY, Mao T, Klein J, Dai Y, Huck JD, Jaycox JR i sur. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature.* 2021;595:283–8.
44. Bastard P, Gervais A, Le Voyer T, Rosain J, Philippot Q, Manry J i sur. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths. *Sci Immunol.* 2021;6:eabl4340.
45. Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, Ruiz C, Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;54:62.
46. Notz Q, Schmalzing M, Wedekink F, Schlesinger T, Gernert M, Herrmann J i sur. Pro- and anti-inflammatory responses in severe COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome-an observational pilot study. *Front Immunol.* 2020;11:581338.
47. Luo Y, Liu C, Guan T, Li Y, Lai Y, Li F i sur. Association of ACE2 genetic polymorphisms with hypertension-related target organ damages in South Xinjiang. *Hypertens Res.* 2019;42:681–9.
48. Xie Z, Chen J, Zheng C, Wu J, Cheng Y, Zhu S i sur. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. *Immunology.* 2017;152:414–24.
49. Jordan RE, Adab P, Cheng KK. COVID-19: Risk factors for severe disease and death. *BMJ.* 2020;368:m1198.

50. Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright M i sur. Convergence of il-1 $\beta$  and vdr activation pathways in human tlr2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS ONE*. 2009;4:e5810.
51. Zhou Z, Kang H, Li S, Zhao X. Understanding the neurotropic characteristics of SARS-CoV-2: From neurological manifestations of COVID-19 to potential neurotropic mechanisms. *J Neurol*. 2020;267:2179–84.
52. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N i sur. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: A model-based analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020;20:669–77.
53. Wei C, Liu Y, Liu Y, Zhang K, Su D, Zhong M i sur. Clinical characteristics and manifestations in older patients with COVID-19. *BMC Geriatr*. 2020;20:395.
54. Ryan DH, Ravussin E, Heymsfield S. COVID 19 and the patient with obesity - the editors speak out. *Obes Silver Spring Md*. 2020;28:847.
55. Peng YD, Meng K, Guan HQ, Leng L, Zhu RR, Wang BY i sur. Clinical characteristics and outcomes of 112 cardiovascular disease patients infected by 2019-ncov. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2020;48:450–5.
56. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F i sur. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. *N Engl J Med*. 2020;383:120–8.
57. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the diamond princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveill*. 2020;25:2000180.
58. Salahshoori I, Mobaraki-Asl N, Seyfaee A, Mirzaei Nasirabad N, Dehghan Z, Faraji M i sur. Overview of COVID-19 disease: virology, epidemiology, prevention diagnosis, treatment, and vaccines. *Biologics*. 2021;1:2–40.
59. Yang AP, Liu J ping, Tao W qiang, Li H ming. The diagnostic and predictive role of nlr, d-nlr and plr in COVID-19 patients. *Int Immunopharmacol*. 2020;84:106504.
60. Azevedo RB, Botelho BG, Hollanda JVG de, Ferreira LVL, Junqueira de Andrade LZ, Oei SSML i sur. COVID-19 and the cardiovascular system: A comprehensive review. *J Hum Hypertens*. 2021;35:4–11.
61. Nishiga M, Wang DW, Han Y, Lewis DB, Wu JC. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17:543–58.
62. Soumya RS, Unni TG, Raghu KG. Impact of COVID-19 on the cardiovascular system: A review of available reports. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021;35:411–25.

63. Tokic D, Mikacic M, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Rancic I, Martinovic D, i sur. Association between Brain Injury Markers and Testosterone in Critically-Ill COVID-19 Male Patients. *Microorganisms*. 2022;10:2095.
64. Harapan BN, Yoo HJ. Neurological symptoms, manifestations, and complications Associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19). *J Neurol*. 2021;268:3059–71.
65. Martinez-Rojas MA, Vega-Vega O, Bobadilla NA. Is the kidney a target of SARS-CoV-2? *Am J Physiol Ren Physiol*. 2020;318:F1454–62.
66. Hirsch JS, Ng JH, Ross DW, Sharma P, Shah HH, Barnett RL i sur. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int*. 2020;98:209–18.
67. Mitsuyama K, Tsuruta K, Takedatsu H, Yoshioka S, Morita M, Niwa M i sur. Clinical features and pathogenic mechanisms of gastrointestinal injury in COVID-19. *J Clin Med*. 2020;9:3630.
68. Clarke SA, Abbara A, Dhillo WS. Impact of COVID-19 on the endocrine system: a mini-review. *Endocrinology*. 2022;163:bqab203.
69. Pondaven-Letourmy S, Alvin F, Boumghit Y, Simon F. How to perform a nasopharyngeal swab in adults and children in the COVID-19 era. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2020;137:325–7.
70. Kinloch NN, Ritchie G, Brumme CJ, Dong W, Dong W, Lawson T i sur. Suboptimal biological sampling as a probable cause of false-negative COVID-19 diagnostic test results. *J Infect Dis*. 2020;222:899–902.
71. Piras A, Rizzo D, Uzzau S, De Riu G, Rubino S, Bussu F. Inappropriate nasopharyngeal sampling for SARS-CoV-2 detection is a relevant cause of false-negative reports. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020;163:459–61.
72. Filchakova O, Dossym D, Ilyas A, Kuanysheva T, Abdizhamil A, Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*. 2022;244:123409.
73. Martínez Chamorro E, Díez Tascón A, Ibáñez Sanz L, Ossaba Vélez S, Borrueal Nacenta S. Radiologic diagnosis of patients with COVID-19. *Radiologi´a*. 2021;63:56–73.
74. Kwee TC, Kwee RM. Chest ct in COVID-19: What the radiologist needs to know. *RadioGraphics*. 2020;40:1848–65.
75. El Homsy M, Chung M, Bernheim A, Jacobi A, King MJ, Lewis S i sur. Review of chest CT manifestations of COVID-19 infection. *Eur J Radiol Open*. 2020;7:100239.

76. Skopljanac I, Ivelja MP, Barcot O, Brdar I, Dolic K, Polasek O i sur. Role of lung ultrasound in predicting clinical severity and fatality in COVID-19 pneumonia. *J Pers Med.* 2021;11:757.
77. Khan ZH, Maki A, Varpaei HA, Mohammadi M. Various aspects of non-invasive ventilation in COVID-19 patients: A narrative review. *Iran J Med Sci.*2022;47:194-209.
78. Grasselli G, Cattaneo E, Florio G, Ippolito M, Zanella A, Cortegiani A i sur. Mechanical ventilation parameters in critically ill COVID-19 patients: A scoping review. *Crit Care.* 2021;25:115.
79. Behesht Aeen F, Pakzad R, Goudarzi Rad M, Abdi F, Zaheri F, Mirzadeh N. Effect of prone position on respiratory parameters, intubation and death rate in COVID-19 patients: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2021;11:14407.
80. Lorusso R, De Piero ME, Mariani S, Di Mauro M, Folliguet T, Taccone FS i sur. In-hospital and 6-month outcomes in patients with COVID-19 supported with extracorporeal membrane oxygenation (EuroECMO-COVID): A multicentre, prospective observational study. *Lancet Respir Med.* 2023;11:151–62.
81. 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.
82. Maia R, Melo L, Mendes JJ, Freitas PT. Corticosteroids in COVID-19: A double-edged sword – a retrospective study. *Med Intensiva.* 2022;46:229–31.
83. Rizk JG, Kalantar-Zadeh K, Mehra MR, Lavie CJ, Rizk Y, Forthal DN. Pharmac-immunomodulatory therapy in COVID-19. *Drugs.* 2020;80:1267–92.
84. Grundeis F, Ansems K, Dahms K, Thieme V, Metzendorf MI, Skoetz N i sur. Remdesivir for the treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev.* 2023;1:CD014962.
85. Amstutz A, Speich B, Mentré F, Rueegg CS, Belhadi D, Assoumou L i sur. Effects of remdesivir in patients hospitalised with COVID-19: A systematic review and individual patient data meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Respir Med.* 2023;11:453–64.
86. Chokkalingam AP, Hayden J, Goldman JD, Li H, Asubonteng J, Mozaffari E i sur. Association of remdesivir treatment with mortality among hospitalized adults with COVID-19 in the united states. *JAMA Netw Open.* 2022;5:e2244505.
87. Hashemian SMR, Sheida A, Taghizadieh M, Memar MY, Hamblin MR, Bannazadeh Baghi H i sur. Paxlovid (nirmatrelvir/ritonavir): A new approach to COVID-19 therapy? *Biomed Pharmacother.* 2023;162:114367.



88. Rusic D, Vilovic M, Bukic J, Leskur D, Seselja Perisin A, Kumric M, i sur. Implications of COVID-19 Pandemic on the emergence of antimicrobial resistance: adjusting the response to future outbreaks. *Life (Basel)*. 2021;11:220.
89. Senefeld JW, Franchini M, Mengoli C, Cruciani M, Zani M, Gorman EK i sur. COVID-19 convalescent plasma for the treatment of immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2023;6:e2250647.
90. Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, Jiskoot W, Mastrobattista E. Addressing the cold reality of mrna vaccine stability. *J Pharm Sci*. 2021;110:997–1001.
91. Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. MRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther Deliv*. 2016;7:319–34.
92. Fothergill LJ, Callaghan B, Hunne B, Bravo DM, Furness JB. Costorage of enteroendocrine hormones evaluated at the cell and subcellular levels in male mice. *Endocrinology*. 2017;158:2113–23.
93. Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H i sur. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. a discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest*. 1997;100:1623–33.
94. Kennedy BP, Mahata SK, O'Connor DT, Ziegler MG. Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin a fragment catestatin in vivo. *Peptides*. 1998;19:1241–8.
95. Troger J, Theurl M, Kirchmair R, Pasqua T, Tota B, Angelone T i sur. Granin-derived peptides. *Prog Neurobiol*. 2017;154:37–61.
96. Bandyopadhyay GK, Mahata SK. Chromogranin A Regulation of obesity and peripheral insulin sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:20.
97. Helle KB, Corti A. Chromogranin a: a paradoxical player in angiogenesis and vascular biology. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72:339–48.
98. Tota B, Angelone T, Cerra MC. The surging role of Chromogranin A in cardiovascular homeostasis. *Front Chem*. 2014;2:64.
99. Borovac JA, Glavas D, Susilovic Grabovac Z, Supe Domic D, Stanisic L, D'Amario D i sur. Right ventricular free wall strain and congestive hepatopathy in patients with acute worsening of chronic heart failure: a catstat-hf echo substudy. *J Clin Med*. 2020;9:1317.
100. Pieroni M, Corti A, Tota B, Curnis F, Angelone T, Colombo B i sur. Myocardial production of chromogranin a in human heart: A new regulatory peptide of cardiac function. *Eur Heart J*. 2007;28:1117–27.
101. Yu Y, Yang W, Li Y, Cong Y. Enteroendocrine cells: sensing gut microbiota and regulating inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;26:11.

102. Rabbi MF, Eissa N, Munyaka PM, Kermarrec L, Elgazzar O, Khafipour E i sur. Reactivation of intestinal inflammation is suppressed by catestatin in a murine model of colitis via m1 macrophages and not the gut microbiota. *Front Immunol.* 2017;8:985.
103. Choi Y, Miura M, Nakata Y, Sugawara T, Nissato S, Otsuki T i sur. A common genetic variant of the chromogranin a-derived peptide catestatin is associated with atherosclerosis and hypertension in a Japanese population. *Endocr J.* 2015;62:797–804.
104. Eissa N, Hussein H, Kermarrec L, Ali AY, Marshall A, Metz-Boutigue MH i sur. Chromogranin-a regulates macrophage function and the apoptotic pathway in murine dss colitis. *J Mol Med Berl.* 2018;96:183–98.
105. Eissa N, Hussein H, Tshikudi DM, Hendy GN, Bernstein CN, Ghia JE. Interdependence between chromogranin-a, alternatively activated macrophages, tight junction proteins and the epithelial functions. a human and in-vivo/in-vitro descriptive study. *Int J Mol Sci.* 2020;21:7976.
106. Kumric M, Vrdoljak J, Dujic G, Supe-Domic D, Ticinovic Kurir T, Dujic Z, Bozic J. Serum Catestatin levels correlate with ambulatory blood pressure and indices of arterial stiffness in patients with primary hypertension. *Biomolecules.* 2022;12:1204.
107. Gaede AH, Lung MSY, Pilowsky PM. Catestatin attenuates the effects of intrathecal nicotine and isoproterenol. *Brain Res.* 2009;1305:86–95.
108. Gayen JR, Gu Y, O'Connor DT, Mahata SK. Global disturbances in autonomic function yield cardiovascular instability and hypertension in the chromogranin a null mouse. *Endocrinology.* 2009;150:5027–35.
109. Fung MM, Salem RM, Mehtani P, Thomas B, Lu CF, Perez B i sur. Direct vasoactive effects of the chromogranin a (ChgA) peptide catestatin in humans in vivo. *Clin Exp Hypertens N Y N 1993.* 2010;32:278–87.
110. Rao F, Wen G, Gayen JR, Das M, Vaingankar SM, Rana BK i sur. Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A352–372). *Circulation.* 2007;115:2271–81.
111. Bozic J, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Urlic H, Martinovic D, Vilovic M, i sur. Catestatin as a biomarker of cardiovascular diseases: a clinical perspective. *Biomedicines.* 2021;9:1757.
112. Dev NB, Gayen JR, O'Connor DT, Mahata SK. Chromogranin A and the autonomic system: decomposition of heart rate variability and rescue by its catestatin fragment. *Endocrinology.* 2010;151:2760–8.

113. Penna C, Alloatti G, Gallo MP, Cerra MC, Levi R, Tullio F i sur. Catestatin improves post-ischemic left ventricular function and decreases ischemia/reperfusion injury in heart. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30:1171–9.
114. Liao F, Zheng Y, Cai J, Fan J, Wang J, Yang J i sur. Catestatin attenuates endoplasmic reticulum induced cell apoptosis by activation type 2 muscarinic acetylcholine receptor in cardiac ischemia/reperfusion. *Sci Rep.* 2015;5:16590.
115. Sy C, F P, J W, L L, L M, J Z i sur. Catestatin in defense of oxidative-stress-induced apoptosis: a novel mechanism by activating the beta2 adrenergic receptor and pkb/akt pathway in ischemic-reperfused myocardium. *Peptides [Internet].* 2020 [citirano 08. listopad 2024.];123. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31730792/>
116. Krüger PG, Mahata SK, Helle KB. Catestatin (cga344-364) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides. *Regul Pept.* 2003;114:29–35.
117. Rabbi MF, Labis B, Metz-Boutigue MH, Bernstein CN, Ghia JE. Catestatin decreases macrophage function in two mouse models of experimental colitis. *Biochem Pharmacol.* 2014;89:386–98.
118. Sugimoto K. Role of stat3 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:5110–4.
119. Di Comite G, Previtali P, Rossi CM, Dell'Antonio G, Rovere-Querini P, Praderio L i sur. High blood levels of chromogranin a in giant cell arteritis identify patients refractory to corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:293–5.
120. Theurl M, Schgoer W, Albrecht K, Jeschke J, Egger M, Beer AGE i sur. The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *Circ Res.* 2010;107:1326–35.
121. Muntjewerff EM, Dunkel G, Nicolassen MJT, Mahata SK, van den Bogaart G. Catestatin as a target for treatment of inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2199.
122. Simac P, Perkovic D, Bozic I, Matijas M, Gugo K, Martinovic D i sur. Serum catestatin levels in patients with rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2022;12:3812.
123. Borovac JA, Dogas Z, Supe-Domic D, Galic T, Bozic J. Catestatin serum levels are increased in male patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath.* 2019;23:473–81.
124. Loh HH, Sukor N. Primary aldosteronism and obstructive sleep apnea: What do we know thus far? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:976979.
125. Narkiewicz K, Somers VK. Sympathetic nerve activity in obstructive sleep apnoea. *Acta Physiol Scand.* 2003;177:385–90.

126. Hromas R, Hufford M, Sutton J, Xu D, Li Y, Lu L. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr.* 1997;1354:40–4.
127. Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY i sur. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the  $\text{tgf-}\beta$  superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:11514–9.
128. Lawton LN, Bonaldo MF, Jelenc PC, Qiu L, Baumes SA, Marcelino RA i sur. Identification of a novel member of the  $\text{tgf-}\beta$  superfamily highly expressed in human placenta. *Gene.* 1997;203:17–26.
129. Li JJ, Liu J, Lupino K, Liu X, Zhang L, Pei L. Growth differentiation factor 15 maturation requires proteolytic cleavage by  $\text{pcsk3}$ , -5, and -6. *Mol Cell Biol.* 2018;38:e00249-18.
130. Li S, Wang Y, Cao B, Wu Y, Ji L, Li Y xia i sur. Maturation of growth differentiation factor 15 in human placental trophoblast cells depends on the interaction with matrix metalloproteinase-26. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E2277-87.
131. Tsai VWW, Husaini Y, Sainsbury A, Brown DA, Breit SN. The MIC-1/GDF15-GFRAL pathway in energy homeostasis: implications for obesity, cachexia, and other associated diseases. *Cell Metab.* 2018;28:353–68.
132. Adela R, Banerjee SK. GDF-15 as a target and biomarker for diabetes and cardiovascular diseases: Atranslational prospective. *J Diabetes Res.* 2015;2015:490842.
133. Wiklund FE, Bennet AM, Magnusson PK, Eriksson UK, Lindmark F, Wu L i sur. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): A new marker of all-cause mortality. *Aging Cell.* 2010;9:1057–64.
134. Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W i sur. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1054–60.
135. Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J i sur. The transforming growth factor- $\beta$  superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2006;98:351–60.
136. Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, i sur. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res.* 2006;98:342-50.
137. Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, Bauskin AR, Brown PK, Munier MLC i sur. The transforming growth factor- $\beta$  superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is

- present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4781–8.
138. Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA, Zahurak ML, Sato N, Fukushima N i sur. Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2386–92.
  139. Gürgöze MT, van Vark LC, Baart SJ, Kardys I, Akkerhuis KM, Manintveld OC, i sur. Multimarker analysis of serially measured GDF-15, NT-proBNP, ST2, GAL-3, cTnI, Creatinine, and prognosis in acute heart failure. *Circ Heart Fail.* 2023;16:e009526.
  140. Mimelaut M, Batra SK. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. *J Cell Physiol.* 2010;224:626–35.
  141. Modi A, Dwivedi S, Roy D, Khokhar M, Purohit P, Vishnoi J i sur. Growth differentiation factor 15 and its role in carcinogenesis: an update. *Growth Factors.* 2019;37:190–207.
  142. Mullican SE, Lin-Schmidt X, Chin CN, Chavez JA, Furman JL, Armstrong AA i sur. GFRAL is the receptor for gdf15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nat Med.* 2017;23:1150–7.
  143. Patel S, Alvarez-Guaita A, Melvin A, Rimmington D, Dattilo A, Miedzybrodzka EL i sur. GDF15 provides an endocrine signal of nutritional stress in mice and humans. *Cell Metab.* 2019;29:707-718.e8.
  144. Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;60:153–60.
  145. Emmerson PJ, Wang F, Du Y, Liu Q, Pickard RT, Gonciarz MD i sur. The metabolic effects of gdf15 are mediated by the orphan receptor gfral. *Nat Med.* 2017;23:1215–9.
  146. Hsu JY, Crawley S, Chen M, Ayupova DA, Lindhout DA, Higbee J i sur. Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15. *Nature.* 2017;550:255–9.
  147. Yang L, Chang CC, Sun Z, Madsen D, Zhu H, Padkjær SB i sur. GFRAL is the receptor for gdf15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand. *Nat Med.* 2017;23:1158–66.
  148. Herter JM, Kraft F, Aken HV, Meersch M, Zarbock A, Rossaint J. GDF-15 prevents ventilator-induced lung injury by inhibiting the formation of platelet-neutro-phil aggregates. *Thromb Haemost.* 2015;114:434–7.

149. Al-Mudares F, Reddick S, Ren J, Venkatesh A, Zhao C, Lingappan K. Role of Growth Differentiation Factor 15 in Lung disease and senescence: potential role across the lifespan. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:594137.
150. Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou MF i sur. Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and hif-1. *Oncogene*. 2002;21:4212–9.
151. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest*. 2009;135:505–12.
152. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D i sur. An official American thoracic society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:693–718.
153. Nickel N, Jonigk D, Kempf T, Bockmeyer CL, Maegel L, Rische J i sur. GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells. *Respir Res*. 2011;12:62.
154. Zhang Y, Jiang M, Nouraie M, Roth MG, Tabib T, Winters S i sur. GDF15 is an epithelial-derived biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2019;317:510–21.
155. Odler B, Foris V, Gunzl A, Müller V, Hassoun PM, Kwapiszewska G, Olschewski H, Kovacs G. Biomarkers for pulmonary vascular remodeling in systemic sclerosis: a pathophysiological approach. *Front Physiol*. 2018;9:587.
156. Li H, Tang D, Chen J, Hu Y, Cai X, Zhang P. The Clinical Value of GDF15 and Its Prospective Mechanism in Sepsis. *Front Immunol*. 2021;12:710977.
157. Santos I, Colaço HG, Neves-Costa A, Seixas E, Velho TR, Pedroso D i sur. CXCL5-mediated recruitment of neutrophils into the peritoneal cavity of GDF15-deficient mice protects against abdominal sepsis. *Proc Natl Acad Sci*. 2020;117:12281–7.
158. Abulizi P, Loganathan N, Zhao D, Mele T, Zhang Y, Zwiép T i sur. Growth differentiation factor-15 deficiency augments inflammatory response and exacerbates septic heart and renal injury induced by lipopolysaccharide. *Sci Rep*. 2017;7:1037.
159. Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, Sebald SM, Huynh TV, Lee SJ. Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor  $\beta$  superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol*. 2000;20:3742–51.

160. Chung HK, Kim JT, Kim HW, Kwon M, Kim SY, Shong M i sur. GDF15 deficiency exacerbates chronic alcohol- and carbon tetrachloride-induced liver injury. *Sci Rep.* 2017;7:17238.
161. Guenancia C, Kahli A, Laurent G, Hachet O, Malapert G, Grosjean S i sur. Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery. *Int J Cardiol.* 2015;197:66–71.
162. Tanrıku O, Sarıyıldız MA, Batmaz İ, Yazmalar L, Polat N, Kaplan İ i sur. Serum gdf-15 level in rheumatoid arthritis: relationship with disease activity and subclinical atherosclerosis. *Acta Reumatol Port.* 2017;42:66–72.
163. Bikle DD. Vitamin D: production, metabolism and mechanisms of action. [Internet]. MDText.com, Inc.; 2021 [citirano 08. listopad 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278935/>
164. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF i sur. Vitamin d and human health: lessons from vitamin d receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008;29:726–76.
165. Hewison M. An update on vitamin d and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76:315–25.
166. Walker VP, Modlin RL. The vitamin D connection to pediatric infections and immune function. *Pediatr Res.* 2009;65:106–13.
167. Mughal MZ. Rickets. *Curr Osteoporos Rep.* 2011;9:291–9.
168. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266–81.
169. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr.* 2013;52:429–41.
170. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin d. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:471–8.
171. Heaney RP. Vitamin d — baseline status and effective dose. *N Engl J Med.* 2012;367:77–8.
172. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92:4–8.
173. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10:482–96.
174. Gunasekar P, Swier VJ, Flegel JP, Boosani CS, Radwan MM, Agrawal DK. Vitamin D and macrophage polarization in epicardial adipose tissue of atherosclerotic swine. *PloS One.* 2018;13:e0199411.

175. Yin K, You Y, Swier V, Tang L, Radwan MM, Pandya AN i sur. Vitamin D protects against atherosclerosis via regulation of cholesterol efflux and macrophage polarization in hypercholesterolemic swine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:2432–42.
176. Dozio E, Briganti S, Vianello E, Dogliotti G, Barassi A, Malavazos AE i sur. Epicardial adipose tissue inflammation is related to vitamin d deficiency in patients affected by coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25:267–73.
177. Apostolakis M, Armeni E, Bakas P, Lambrinouadaki I. Vitamin d and cardiovascular disease. *Maturitas.* 2018;115:1–22.
178. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J i sur. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin d3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression1. *J Immunol.* 2004;173:2909–12.
179. White JH. Vitamin d metabolism and signaling in the immune system. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012;13:21–9.
180. Övünç Hacıhamdioğlu D, Altun D, Hacıhamdioğlu B, Çekmez F, Aydemir G, Kul M i sur. The association between serum 25-hydroxy vitamin d level and urine cathelicidin in children with a urinary tract infection. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2016;8:325–9.
181. Georgieva V, Kamolvit W, Herthelius M, Lüthje P, Brauner A, Chromek M. Association between vitamin d, antimicrobial peptides and urinary tract infection in infants and young children. *Acta Paediatr.* 2019;108:551–6.
182. Persson LJP, Aanerud M, Hardie JA, Miodini Nilsen R, Bakke PS, Eagan TM i sur. Antimicrobial peptide levels are linked to airway inflammation, bacterial colonisation and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2017;49:1601328.
183. Ramos-Martínez E, López-Vancell MR, Fernández de Córdova-Aguirre JC, Rojas-Serrano J, Chavarría A, Velasco-Medina A i sur. Reduction of respiratory infections in asthma patients supplemented with vitamin d is related to increased serum IL-10 and ifn $\gamma$  levels and cathelicidin expression. *Cytokine.* 2018;108:239–46.
184. Mathias E, Tangpricha V, Sarnaik A, Farooqi A, Sethuraman U. Association of vitamin d with cathelicidin and vitamin d binding protein in pediatric sepsis. *J Clin Transl Endocrinol.* 2017;10:36–8.
185. Greulich T, Regner W, Branscheidt M, Herr C, Koczulla AR, Vogelmeier CF i sur. Altered blood levels of vitamin d, cathelicidin and parathyroid hormone in patients with sepsis—a pilot study. *Anaesth Intensive Care.* 2017;45:36–45.



186. Quraishi SA, De Pascale G, Needleman JS, Nakazawa H, Kaneki M, Bajwa EK i sur. Effect of cholecalciferol supplementation on vitamin d status and cathelicidin levels in sepsis: a randomized, placebo-controlled trial. *Crit Care Med.* 2015;43:1928–37.
187. Aguilar-Jimenez W, Zapata W, Rugeles MT. Antiviral molecules correlate with vitamin d pathway genes and are associated with natural resistance to hiv-1 infection. *Microbes Infect.* 2016;18:510–6.
188. Coussens AK, Naude CE, Goliath R, Chaplin G, Wilkinson RJ, Jablonski NG. High-dose vitamin d3 reduces deficiency caused by low uvb exposure and limits hiv-1 replication in urban southern africans. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112:8052–7.
189. Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Cutting edge: vitamin d-mediated human antimicrobial activity against mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol.* 2007;179:2060–3.
190. Castañeda-Delgado JE, Araujo Z, Gonzalez-Curiel I, Serrano CJ, Rivas Santiago C, Enciso-Moreno JA i sur. Vitamin d and l-isoleucine promote antimicrobial peptide hbd-2 production in peripheral blood mononuclear cells from elderly individuals. *Int J Vitam Nutr Res.* 2016;86:56–61.
191. Shin DM, Yuk JM, Lee HM, Lee SH, Son JW, Harding CV i sur. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via tlr2/1/cd14 and a functional vitamin d receptor signalling. *Cell Microbiol.* 2010;12:1648–65.
192. Carvalho JTG, Schneider M, Cuppari L, Grabulosa CC, T Aoike D, Q Redublo BM i sur. Cholecalciferol decreases inflammation and improves vitamin d regulatory enzymes in lymphocytes in the uremic environment: a randomized controlled pilot trial. *PloS One.* 2017;12:e0179540.
193. Zhou SH, Wang X, Fan MY, Li HL, Bian F, Huang T i sur. Influence of vitamin d deficiency on t cell subsets and related indices during spinal tuberculosis. *Exp Ther Med.* 2018;16:718–22.
194. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in esrd. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:353–61.
195. Drozdenko G, Heine G, Worm M. Oral vitamin d increases the frequencies of cd38+ human b cells and ameliorates il-17-producing t cells. *Exp Dermatol.* 2014;23:107–12.
196. Bendix-Struve M, Bartels LE, Agnholt J, Dige A, Jørgensen SP, Dahlerup JF. Vitamin d3 treatment of crohn’s disease patients increases stimulated t cell il-6 production and proliferation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32:1364–72.

197. Buondonno I, Rovera G, Sassi F, Rigoni MM, Lomater C, Parisi S i sur. Vitamin d and immunomodulation in early rheumatoid arthritis: a randomized double-blind placebo-controlled study. *PLoS One*. 2017;12:e0178463.
198. Dhawan M, Priyanka, Choudhary OP. Immunomodulatory and therapeutic implications of vitamin d in the management of COVID-19. *Hum Vaccines Immunother*. 2022;18:2025734.
199. Athanassiou L, Mavragani CP, Koutsilieris M. The immunomodulatory properties of vitamin d. *Mediterr J Rheumatol*. 2022;33:7–13.
200. Wei R, Christakos S. Mechanisms underlying the regulation of innate and adaptive immunity by vitamin d. *Nutrients*. 2015;7:8251–60.
201. Sassi F, Tamone C, D’Amelio P. Vitamin d: nutrient, hormone, and immunomodulator. *Nutrients*. 2018;10:1656.
202. Petrelli F, Oldani S, Borgonovo K, Cabiddu M, Dognini G, Ghilardi M i sur. Vitamin d3 and COVID-19 outcomes: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Antioxidants*. 2023;12:247.
203. Dissanayake HA, de Silva NL, Sumanatilleke M, de Silva SDN, Gamage KKK, Dematapitiya C i sur. Prognostic and therapeutic role of vitamin d in COVID-19: systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022;107:1484–502.
204. Domazet Bugarin J, Dosenovic S, Ilic D, Delic N, Saric I, Ugrina I i sur. Vitamin d supplementation and clinical outcomes in severe COVID-19 patients—randomized controlled trial. *Nutrients*. 2023;15:1234.
205. Schneider F, Le Borgne P, Herbrecht JE, Danion F, Solis M, Hellé S i sur. Assessment of plasma catestatin in COVID-19 reveals a hitherto unknown inflammatory activity with impact on morbidity-mortality. *Front Immunol*. 2022;13:985472.
206. Ying W, Mahata S, Bandyopadhyay GK, Zhou Z, Wollam J, Vu J i sur. Catestatin inhibits obesity-induced macrophage infiltration and inflammation in the liver and suppresses hepatic glucose production, leading to improved insulin sensitivity. *Diabetes*. 2018;67:841–8.
207. Kojima M, Ozawa N, Mori Y, Takahashi Y, Watanabe-Kominato K, Shirai R i sur. Catestatin prevents macrophage-driven atherosclerosis but not arterial injury-induced neointimal hyperplasia. *Thromb Haemost*. 2018;118:182–94.
208. Radek KA, Lopez-Garcia B, Hupe M, Niesman IR, Elias PM, Taupenot L i sur. The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1525–34.

209. Ying W, Tang K, Avolio E, Schilling JM, Pasqua T, Liu MA i sur. Immunosuppression of macrophages underlies the cardioprotective effects of CST (catestatin). *Hypertension*. 2021;77:1670–82.
210. Muntjewerff EM, Christoffersson G, Mahata SK, van den Bogaart G. Putative regulation of macrophage-mediated inflammation by catestatin. *Trends Immunol*. 2022;43:41–50.
211. O'Connor DT, Kailasam MT, Kennedy BP, Ziegler MG, Yanaihara N, Parmer RJ. Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*. 2002;20:1335–45.
212. Zivkovic PM, Matetic A, Tadin Hadjina I, Rusic D, Vilovic M, Supe-Domic D i sur. Serum catestatin levels and arterial stiffness parameters are increased in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Med*. 2020;9:628.
213. Borovac JA, Glavas D, Susilovic Grabovac Z, Supe Domic D, D'Amario D, Bozic J. Catestatin in acutely decompensated heart failure patients: insights from the catstat-hf study. *J Clin Med*. 2019;8:1132.
214. Luketin M, Mizdrak M, Boric-Skaro D, Martinovic D, Tokic D, Vilovic M i sur. Plasma catestatin levels and advanced glycation end products in patients on hemodialysis. *Biomolecules*. 2021;11:456.
215. Corti A, Marcucci F, Bachetti T. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch*. 2018;470:199–210.
216. Simunovic M, Supe-Domic D, Karin Z, Degoricija M, Paradzik M, Bozic J i sur. Serum catestatin concentrations are decreased in obese children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2019;20:549–55.
217. O'Connor DT, Zhu G, Rao F, Taupenot L, Fung MM, Das M i sur. Heritability and genome-wide linkage in us and australian twins identify novel genomic regions controlling chromogranin A: implications for secretion and blood pressure. *Circulation*. 2008;118:247–57.
218. Pei Z, Ma D, Ji L, Zhang J, Su J, Xue W i sur. Usefulness of catestatin to predict malignant arrhythmia in patients with acute myocardial infarction. *Peptides*. 2014;55:131–5.
219. Grześk E, Darwish N, Stolarek W, Wiciński M, Malinowski B, Burdziński I i sur. Effect of reperfusion on vascular smooth muscle reactivity in three contraction models. *Microvasc Res*. 2019;121:24–9.
220. Alonso MN, Mata-Forte T, García-León N, Vullo PA, Ramirez-Olivencia G, Estébanez M i sur. Incidence, characteristics, laboratory findings and outcomes in acro-ischemia in COVID-19 patients. *Vasc Health Risk Manag*. 2020;16:467–78.

221. Mazza R, Gattuso A, Mannarino C, Brar BK, Barbieri SF, Tota B i sur. Catestatin (chromogranin a344-364) is a novel cardiosuppressive agent: inhibition of isoproterenol and endothelin signaling in the frog heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:113–22.
222. Que Y, Hu C, Wan K, Hu P, Wang R, Luo J i sur. Cytokine release syndrome in COVID-19: A major mechanism of morbidity and mortality. *Int Rev Immunol*. 2022;41:217-30.
223. Bassetti M, Vena A, Giacobbe DR. The novel chinese coronavirus (2019-ncov) infections: challenges for fighting the storm. *Eur J Clin Invest*. 2020;50:e13209.
224. Luan HH, Wang A, Hilliard BK, Carvalho F, Rosen CE, Ahasic AM i sur. GDF15 is an inflammation-induced central mediator of tissue tolerance. *Cell*. 2019;178:1231-1244.e11.
225. Teng X, Zhang J, Shi Y, Liu Y, Yang Y, He J i sur. Comprehensive profiling of inflammatory factors revealed that growth differentiation factor-15 is an indicator of disease severity in COVID-19 patients. *Front Immunol*. 2021;12:662465.
226. Gisby J, Clarke CL, Medjeral-Thomas N, Malik TH, Papadaki A, Mortimer PM i sur. Longitudinal proteomic profiling of dialysis patients with COVID-19 reveals markers of severity and predictors of death. *Elife*. 2021;10:e64827.
227. Alserawan L, Peñacoba P, Orozco Echevarría SE, Castillo D, Ortiz E, Martínez-Martínez L i sur. Growth differentiation factor 15 (gdf-15): a novel biomarker associated with poorer respiratory function in COVID-19. *Diagnostics*. 2021;11:1998.
228. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. GDF15: an emerging modulator of immunity and a strategy in COVID-19 in association with iron metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2021;32:875–89.
229. Saheb Sharif-Askari N, Saheb Sharif-Askari F, Mdkhana B, Hussain Alsayed HA, Alsafar H, Alrais ZF i sur. Upregulation of oxidative stress gene markers during SARS-CoV-2 viral infection. *Free Radic Biol Med*. 2021;172:688–98.
230. Chen H, Liu D, Ge L, Wang T, Ma Z, Han Y i sur. Catestatin prevents endothelial inflammation and promotes thrombus resolution in acute pulmonary embolism in mice. *Biosci Rep*. 2019;39:22-36.
231. Yisak H, Ewunetei A, Kefale B, Mamuye M, Teshome F, Ambaw B i sur. Effects of vitamin d on COVID-19 infection and prognosis: A systematic review. *Risk Manag Healthc Policy*. 2021;14:31–8.
232. Beard JA, Bearden A, Striker R. Vitamin d and the anti-viral state. *J Clin Virol*. 2011;50:194–200.

233. Sturman LS. I. structural proteins: effects of preparative conditions on the migration of protein in polyacrylamide gels. *Virology*. 1977;77:637–49.
234. Baeke F, Etten EV, Overbergh L, Mathieu C. Vitamin d3 and the immune system: maintaining the balance in health and disease. *Nutr Res Rev*. 2007;20:106–18.
235. van Halteren AGS, Tysma OM, van Etten E, Mathieu C, Roep BO. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin d3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive t cells via the selective induction of apoptosis. *J Autoimmun*. 2004;23:233–9.
236. Glinsky GV. Tripartite combination of candidate pandemic mitigation agents: vitamin d, quercetin, and estradiol manifest properties of medicinal agents for targeted mitigation of the COVID-19 pandemic defined by genomics-guided tracing of SARS-CoV-2 targets in human cells. *Biomedicines*. 2020;8:129.
237. Marik PE, Kory P, Varon J. Does vitamin d status impact mortality from SARS-CoV-2 infection? *Med Drug Discov*. 2020;6:100041.
238. Spanier JA, Nashold FE, Mayne CG, Nelson CD, Hayes CE. Vitamin d and estrogen synergy in VDR-expressing CD4(+) t cells is essential to induce helios(+)foxp3(+) Tcells and prevent autoimmune demyelinating disease. *J Neuroimmunol*. 2015;286:48–58.
239. Kho AT, Sharma S, Qiu W, Gaedigk R, Klanderman B, Niu S i sur. Vitamin d related genes in lung development and asthma pathogenesis. *BMC Med Genomics*. 2013;6:47.
240. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S i sur. Epidemic influenza and vitamin d. *Epidemiol Infect*. 2006;134:1129–40.
241. Mouland AJ, Hendy GN. 1,25-dihydroxycholecalciferol regulates chromogranin-a translatability in bovine parathyroid cells. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1992;6:1781–8.
242. Ritchie CK, Cohn DV, Fitzpatrick LA. Chromogranin-a secretion from individual parathyroid cells: effects of 1,25-(oh)<sup>2</sup> vitamin d3 and calcium. *Bone Miner*. 1992;18:31–40.

## **8. SAŽETAK**

**Uvod:** Krajem 2019. godine prvi put opisana koronavirusna bolest 2019 (COVID-19) brzo je postala veliki svjetski javnozdravstveni problem. Uzročnik bolesti je identificiran kao SARS-Co-2 virus koji je u početku pandemije uzrokovao katastrofalne posljedice s lošim ishodima, prvenstveno zbog početnog nerazumijevanja patofizioloških procesa koji uzrokuje sama infekcija. Postupno se došlo do zaključka da je pretjerani imunološki odgovor organizma glavni uzrok najtežih komplikacija poput ARDS-a i zatajenja drugih vitalnih organa. Katestatin je pleotropni peptid i jedan od produkata kromogranina A, uključen u mnoge procese organizma od regulacije sekrecije katekolamina, imunoregulacije, vazodilatacije, inzulinske rezistencije pa čak i antimikrobnog djelovanja. Zbog poremećene imunoregulacije u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 i sudjelovanja katestatina u imunomodulacijskim procesima odlučili smo istražiti povezanost katestatina sa COVID-19. Također smo pokušali naći poveznicu između vitamina D i GDF-15 s ishodima liječenja teških i kritičnih oblika COVID-19 u JIL-u.

**Metode:** Studija je provedena u Jedinici intenzivnog liječenja za COVID bolesnike Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBC Split u razdoblju od rujna 2021. do veljače 2022. godine. Uključivala je 152 bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 u dobi od 18 do 90 godina starosti koji su zbog zatajenja disanja zahtijevali mehaničku respiracijsku potporu od prijema u JIL. Svim bolesnicima je nakon primarnog zbrinjavanja krv uzorkovana za laboratorijske pretrage. Dio uzoraka je svakodnevno analiziran, a dio centrifugiran (20 minuta na 2000 okretaja/minuti te na temperaturi od 4 °C), alikvotiran i skladišten u hladnjak na – 80 C te je korišten za naknadnu analizu serumskih koncentracija katestatina i GDF-15. Pretrage su napravljene po uputama proizvođača.

**Rezultati:** Razine katestatina bile su značajno niže u skupini preminulih usporedno sa skupinom preživjelih bolesnika ( $p < 0,001$ ). Razine vitamina D u serumu bile su značajno niže u skupini preminulih nego u skupini preživjelih ( $p < 0,001$ ), dok su razine GDF-15 bile značajno niže u skupini preživjelih nego u skupini preminulih ( $p < 0,001$ ). U bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 postojala je značajna pozitivna korelacija između razina katestatina u serumu i razina vitamina D ( $r = 0,338$ ;  $p < 0,001$ ) i značajna negativna korelacija između razina katestatina u serumu i razina GDF-15 ( $r = -0,345$ ;  $p < 0,001$ ). Multivarijabilna logistička regresija pokazala je da su razine katestatina bile značajan negativan prediktor za smrtni ishod COVID-19. Razine GDF-15 ( $p < 0,001$ ) i broj leukocita ( $p = 0,008$ ) bili su značajni pozitivni prediktori za smrtni ishod COVID-19.

**Zaključak:** Razine katestatina i vitamina D bile su značajno niže u skupini preminulih usporedno sa skupinom preživjelih bolesnika sa teškim ili kritičnim oblikom COVID-19

liječenih u JIL-u, dok su razine GDF-15 bile snižene u skupini preživjelih bolesnika. U bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 postojala je značajna pozitivna korelacija između katestatina i vitamina D, dok je u istih bolesnika utvrđena negativna korelacija između katestatina i GDF-15. Katestatin se pokazao značajan negativan prediktor za smrtni ishod COVID-19 dok je GDF-15 i razina leukocita značajan pozitivni prediktori za smrtni ishod COVID-19.



## **9. SUMMARY**

## **Analysis of serum concentrations of catestatin and GDF-15 in patients with severe and critical form of COVID-19**

**Background:** First described in late 2019, coronavirus disease 2019 (COVID-19) has quickly become a major global public health problem. The causative agent of the disease was identified as the SARS-Co-2 virus, which at the beginning of the pandemic caused catastrophic consequences with poor outcomes, primarily due to the initial misunderstanding of the pathophysiological processes caused by the infection itself. The conclusion was gradually reached that the body's excessive immune response is the main cause of the most severe complications such as ARDS and failure of other vital organs. Catestatin is a pleiotropic peptide and one of the products of chromogranin A, involved in many processes of the organism from the regulation of catecholamine secretion, immunoregulation, vasodilation, insulin resistance and even antimicrobial action. Due to the disturbed immunoregulation in patients with severe and critical form of COVID-19 and the participation of catestatin in immunomodulation processes, we decided to investigate the connection of catestatin with COVID-19. We also tried to find a link between vitamin D and GDF-15 with treatment outcomes of severe and critical forms of COVID-19 in the ICU.

**Methods:** This study was conducted in the Intensive Care Unit for COVID patients of the Anesthesiology, Reanimation and Intensive Care Clinic of University Hospital of Split in the period from September 2021 to February 2022. It included 152 patients with a severe and critical form of COVID-19 between the ages of 18 and 90 who, due to respiratory insufficiency, required mechanical respiratory support from admission to the ICU. All patients were sampled for laboratory tests after primary care. Part of the samples was analyzed daily, and part was centrifuged (20 minutes at 2000 revolutions/minute and at a temperature of 4 °C), aliquoted and stored in a refrigerator at -80 C and was used for subsequent analysis of serum concentrations of catestatin and GDF-15. All tests were performed according to the manufacturer's instructions.

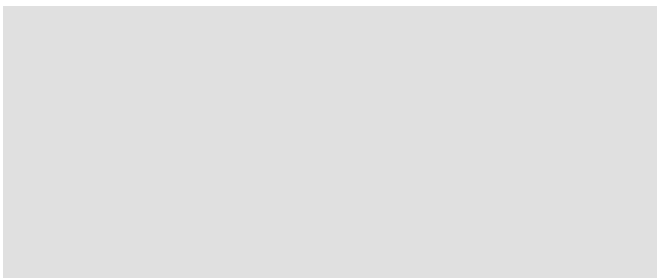
**Results:** Catestatin levels were significantly lower in the group of deceased compared to the group of surviving patients ( $p < 0.001$ ). Serum vitamin D levels were significantly lower in the deceased group than in the survivor group ( $p < 0.001$ ), while GDF-15 levels were significantly lower in the survivor group than in the deceased group ( $p < 0.001$ ). In patients with severe and critical form of COVID-19, there was a significant positive correlation between serum catestatin levels and vitamin D levels ( $r = 0.338$ ;  $p < 0.001$ ) and a significant negative correlation between serum catestatin levels and GDF-15 levels ( $r = -0.345$ ;  $p < 0.001$ ). Multivariable logistic regression showed that catestatin levels were a significant negative

predictor of COVID-19 mortality. GDF-15 levels ( $p < 0.001$ ) and leukocyte count ( $p = 0.008$ ) were significant positive predictors for COVID-19 mortality.

**Conclusion:** The levels of catestatin and vitamin D were significantly lower in the group of deceased compared to the group of surviving patients with severe or critical form of COVID-19 treated in the ICU, while the levels of GDF-15 were decreased in the group of surviving patients. In patients with a severe and critical form of COVID-19, there was a significant positive correlation between catestatin and vitamin D, while in the same patients a negative correlation was found between catestatin and GDF-15. Catestatin proved to be a significant negative predictor for the fatal outcome of COVID-19, while GDF-15 and the level of leukocytes were significant positive predictors for the fatal outcome of COVID.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Ime i prezime: Toni Kljaković-Gašpić



**OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:**

2007. doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

**RADNO ISKUSTVO:**

2008. - 2009. pripravnik doktor medicine, KBC Split

2009. - 2010. liječnik opće medicine, Zavod za hitnu medicinu SDŽ

2010. - 2015. specijalizant anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja, KBC Split

2015. - danas; specijalist anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja, KBC Split

**NASTAVNA AKTIVNOST:**

2015.- danas, vanjski suradnik, Katedra za anesteziologiju (studij medicine, studij dentalne medicine, studij medicine na engleskom jeziku), Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

**STRANI JEZICI:**

Engleski jezik (napredno)

**PUBLIKACIJE:**

1. **Kljakovic-Gaspic T**, Tokic D, Martinovic D, Kumric M, Supe-Domic D, Stojanovic Stipic S, Delic N, Vrdoljak J, Vilovic M, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Prognostic Value of Catestatin in Severe COVID-19: An ICU-Based Study. J Clin Med. 2022;11(15):4496.
2. **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. 2021;11:735
3. Delić N, Matetic A, Domjanović J, **Kljaković-Gašpić T**, Šarić L, Ilić D, Došenović S, Domazet J, Kovač R, Runjić F. Effects of Different Inhalation Therapy on Ventilator-Associated Pneumonia in Ventilated COVID-19 Patients: A Randomized Controlled Trial. Microorganisms.2022;10:1118

4. Frankic M, Stojanovic Stipic S, **Kljakovic Gaspic T**, Carev M. Personalized medicine—parenteral ketogenic diet in pyruvate dehydrogenase deficiency in the ICU; what do we need to know about it? *Liječnički vjesnik*. 2022;144: 71-76.
5. Meštrović J, Petrić J, **Kljaković-Gašpić T**, Bulić M, Lah-Tomulić K, Markić J, Polić B. Tercijarna prevencija: Poučavanje djece u osnovnim školama o oživljavanju *Paediatrica Croatica*. 2016. 143:174-6