

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJANA MIKAČIĆ**

**ANALIZA SERUMSKE KONCENTRACIJE CITOKINA TWEAK I  
TESTOSTERONA U BOLESNIKA S TEŠKIM OBLIKOM COVID-19**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2023**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJANA MIKAČIĆ**

**ANALIZA SERUMSKE KONCENTRACIJE CITOKINA TWEAK I  
TESTOSTERONA U BOLESNIKA S TEŠKIM OBLIKOM COVID-19**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2023**

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

Voditelj rada:

**Prof. dr. sc. Tina Tičinović Kurir, dr. med.**

## ZAHVALA

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Koronavirus .....	2
1.2. COVID-19.....	3
1.2.1. Epidemiologija.....	3
1.2.2. Genomska struktura SARS-CoV-2 .....	4
1.2.3. Imunopatogeneza .....	6
1.2.4. Klinička slika .....	8
1.2.5. Dijagnostika .....	10
1.2.6. Liječenje i prevencija .....	16
1.3. Uloga citokina TWEAK-a u COVID-19 .....	17
1.4. Povezanost testosterona i COVID-19 .....	20
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>23</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>26</b>
3.1. Ispitanici .....	27
3.2. Postupci .....	28
3.3. Uzorkovanje krvi i laboratorijska analiza .....	29
3.4. Statistička analiza podataka .....	30
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>32</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>48</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>54</b>
<b>7. SAŽETAK</b> .....	<b>57</b>
<b>8. SUMMARY</b> .....	<b>60</b>
<b>9. LITERATURA</b> .....	<b>63</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>78</b>

## OPIS OZNAKA I KRATICA

ACE2	angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (engl. <i>angiotensin-converting enzyme 2</i> )
Ang II	angiotenzin II (engl. <i>Angiotensin II</i> )
ARDS	akutni respiratorni distres sindrom (engl. <i>acute respiratory distress syndrome</i> )
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i> )
CoV	koronavirusi (engl. <i>coronavirus</i> )
COVID-19	koronavirusna bolest 2019 (engl. <i>Corona Virus Disease-19</i> )
CT	kompjuterizirana tomografija (engl. <i>Computed tomography</i> )
Fn14	čimbenikom rasta fibroblasta potaknut protein 14 (engl. <i>fibroblast growth factor-inducible protein 14</i> )
GCSF	čimbenik stimulacije kolonija granulocita (engl. <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> )
HCoV	humani koronavirus (engl. <i>human coronavirus</i> )
HI	Horowitzov indeks (engl. <i>Horowitz index</i> )
IL	interleukini (engl. <i>interleukins</i> )
MERS	Bliskoistočni respiratorni sindrom (engl. <i>middle east respiratory syndrome</i> )
MCP 1	Monocitni kemotaktički protein-1 (engl. <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i> )
MIP 1 $\alpha$	Makrofagni upalni protein-1 alfa (engl. <i>Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha</i> )
NF- $\kappa$ B	nuklearni čimbenik faktor- $\kappa$ B (engl. <i>Nuclear factor kappaB</i> )
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	omjer parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi i udjela kisika u udahnutoj smjesi
PCT	prokalcitonin (engl. <i>procalcitonin</i> )
RT-PCR	polimerazna lančana reakcija nakon obrnutog prepisivanja (engl. <i>real-time reverse transcription-polymerase chain reaction</i> )

RTG	radiografska snimka
SARS-CoV	koronavirus povezan s teškim akutnim respiratornim sindrom (engl. <i>severe acute respiratory syndrome</i> )
SAPS II	(engl. <i>Simplified Acute Physiology Score</i> )
SOSIC	(engl. <i>Survival of Severely Ill COVID</i> )
ssRNA	pozitivni jednolančani RNA virus (engl. <i>single-stranded RNA virus</i> )
TMPRSS2	transmembranske serinska proteaze tipa II (engl. <i>Transmembrane Serine Protease 2</i> )
TNF $\alpha$	čimbenik nekroze tumora alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
TWEAK	TNF-u sličan slab induktor apoptoze (engl. <i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i> )

## **1. UVOD**



## 1.1. Koronavirusi

Virusi su patogeni organizmi koji se sastoje od ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA) ili deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) unutar proteinske ili lipidne ovojnice. Virusi se mogu umnožavati samo unutar žive stanice koju koriste za replikaciju vlastitog genetskog materijala (1).

Koronavirusi (engl. *coronaviruse*, CoV) su jednolančani RNA virusi te u usporedbi s ostalim RNA virusima imaju najveći genom od 26 do 32 kilobaze. Pripadaju redu Nidovirales, porodici Coronaviridae te potporodici Orthocoronavirinae, koji se dijele na četiri roda: *alpha-CoV*, *beta-CoV*, *delta-CoV* i *gamma-CoV*(2). Do danas je poznato sedam humanih koronavirusa (engl. *human coronavirus*, HCoV) od kojih su dva iz roda *alpha-CoV*, dok ostali, koji uključuju koronavirus povezan s teškim akutnim respiratornim sindromom (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS-CoV), bliskoistočni respiratorni sindrom (engl. *Middle East respiratory syndrome*, MERS) te novi, koronavirus 2 povezan s teškim akutnim respiratornim sindromom (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus two*, SARS-CoV-2), pripadaju rodu *beta-CoV* (3,4). Genom virusa SARS-CoV-2, 96% identičan je otprije poznatom koronavirusu u šišmiša RaTG13, a 79,5% sličnosti ima s SARS-CoV virusom (2).

CoV je prvi put otkriven 1933. godine kao uzročnik akutne respiratorne infekcije pripitomljenih pilića, tada nazvan virus infektivnog bronhitisa, a danas je poznat kao ptičji koronavirus (4). Povijest HCoV započinje 1965. godine, kada su znanstvenici Tyrrell i Bynoe u uzorcima dobivenima iz respiratornog trakta odraslih osoba oboljelih od obične prehlade pronašli virus nazvan B814 (5). U isto vrijeme Hamre i Procknow uspjeli su uzgojiti virus nazvan 224E (6). Brzo se uočilo da ova dva virusa nisu imali karakteristike do sada poznatih mikso- ili paramiksovirusa. Promatrani pod elektronskim mikroskopom, šiljasti izdanci membrane ovih novih virusa nalikuju kruni (lat. *corona*) po čemu su dobili ime -

koronavirusi. Daljnjim istraživanjem virusa znanstvenici su utvrdili da se u područjima umjerene klime respiratorne infekcije uzrokovane koronavirusom češće javljaju zimi i u proljeće nego ljeti i u jesen (7). Prvi slučaj infekcije SARS-CoV zabilježen je u Kini, odakle se proširila na 29 zemalja diljem svijeta u razdoblju od 2002. do 2004. godine, uzrokujući 8437 oboljelih i 813 smrtnih slučajeva uz smrtnost u populaciji iznad 65 godina oko 65% (8). U rujnu 2012. godine u Saudijskoj Arabiji nastupa nova epidemija MERS-a uzrokovana MERS-CoV sa stopom smrtnosti od 34,5%, što ovaj virus čini iznimno smrtonosnim. MERS-CoV kao i SARS-CoV se primarno prenose sa životinje na čovjeka, a kasnije je glavni put transmisije bio bliski kontakt čovjeka s čovjekom (9). Za razliku od SARS-a, čiji slučajevi zaraze nisu zabilježeni od 2004. godine, MERS od 2012. godine kontinuirano bilježi nove slučajeve u zemljama Bliskog istoka. U usporedbi sa SARS-CoV i MERS-CoV, SARS-CoV-2 ima manju smrtnost i veću sposobnost transmisije (10).

## **1.2. COVID-19**

### **1.2.1. Epidemiologija**

Krajem prosinca 2019. godine u Wuhanu, u Kini, zabilježena je povećana hospitalizacija bolesnika s pneumonijom nepoznate etiologije. Genetskom analizom identificiran je, kao uzrok navedenih pneumonija, novi koronavirus (11). Ubrzo nakon Kine, virus se proširio na Tajvan, a potom i na cijeli svijet. Međunarodni odbor za taksonomiju virusa 11. veljače 2020. godine imenovao je novi koronavirus SARS-CoV-2, a Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) bolest koju uzrokuje službeno je nazvala COVID-19 (engl. *Corona Virus Disease-19*). WHO je 11. ožujka 2020. godine službeno proglasila pandemiju COVID-19 (12). Globalnoj epidemiji COVID-19 pridonijeli su visoka zaraznost virusa i brojna međunarodna putovanja. Pandemija koronavirusne bolesti proširila se na Hrvatsku krajem veljače 2020. godine. Do početka pandemije u Hrvatskoj je potvrđeno 1 275 762 slučajeva zaraze virusom, od čega je izliječeno 668 415 848, a umrlo 18 374 osoba (13).

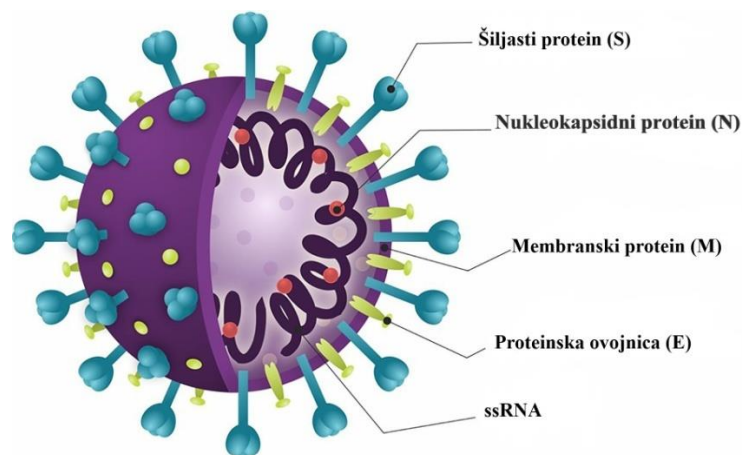
Smatra se da je SARS-CoV-2 životinjskog podrijetla (pangolin), budući da koronavirus koji inficira pangolina dijeli 85,5%–92,4% sličnosti sekvence s SARS-CoV-2 virusom. Isti načini prijenosa dogodio se i u prethodnim CoV pandemijama pa se smatra da je posrednik za pandemiju SARS-CoV virusa bila cibetka, a deva za MERS-CoV (14). Primarni način širenja SARS-CoV-2 virusa s čovjeka na čovjeka je respiratornim putem, ali i bliskim kontaktom s inficiranom osobom. Kako je SARS-CoV-2 zabilježen u uzorcima stolice kod zaraženih pacijenata neke studije podržavaju mogući fekalno-oralni prijenos virusa. Podršku za takvu hipotezu pruža prisutnost glavnog receptora za SARS-CoV-2, angiotenzin-konvertirajućeg enzima 2 (engl. *angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2), u ljudskim crijevima, olakšavajući replikaciju i preživljavanje samog virusa (15).

Istraživanja sugeriraju da je prosječna inkubacija kod SARS-CoV-2 infekcije od 6,57 dana (16). Ova se pandemija pokazala kao jedna od najozbiljniji zdravstvenih kriza u posljednjem desetljeću. Kao rezultat toga, zdravstveni su resursi u mnogim zemljama bili suočeni s velikim izazovima. To se pogotovo pokazalo dramatično u Jedinicama intenzivnog liječenja (JIL) s obzirom na visoku dnevnu učestalost bolesnika s akutnim respiratornim distres sindromom (engl. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) i potrebom za mehaničkom ventilacijom (MV). Sukladno postojećim podacima, ARDS se razvija u približno 1/3 (33%) hospitaliziranih bolesnika koji zahtijevaju intenzivno liječenje (17).

### **1.2.2. Genomska struktura SARS-CoV-2**

SARS-CoV-2 je omotani, pozitivni jednolančani RNA (engl. *single-stranded RNA*, *ssRNA*) virus, veličine 29,9 kB, te promjera oko 65-125 nm (**Slika 1**). Organizacija virusnog genoma tipična je za *beta*-CoV te su sekvence nukleotida identične 79% sa SARS-CoV te 50% s MERS-CoV (1,2). Genetski sastav SARS-CoV-2 na 5' kraju sastoji se od 13–15 otvorenih okvira čitanja (engl. *Open reading frame*, ORF) koji kodiraju 16 nestrukturiranih

proteina koji sudjeluju u procesu replikacije virusa. Na 3' kraju nalazi se genski slijed za pet strukturnih proteina: šiljasti (engl. *Spike*, S) protein, membranski protein (engl. *Membrane*, M), nukleokapsidni protein (engl. *Nucleocapsid*, N), protein ovojnice (engl. *Envelope*, E) i hemaglutinin esterazni protein (engl. *Hemagglutinin esteraza*, HE) (18). Monomer S proteina sastoji se od dvije podjedinice (S1 i S2). S1 podjedinica sadrži dvije domene i to N-terminalnu domenu (engl. *N-terminal domain*, NTD) i C-terminalnu domenu (engl. *C-terminal domain*, CTD) koja se veže za receptorsku domenu (engl. *Receptor binding domain*, RBD). Podjedinica S2 sadrži elemente za membransku fuziju, uključujući unutarnji membranski fuzijski peptid (engl. *fusion peptide*, FP), heptapeptid ponavljajuću sekvencu 1 i 2 (engl. *heptapeptide repeat sequence*, HR), transmembransku domenu (engl. *transmembrane domain*, TM) i domenu citoplazme. Životni ciklus SARS-CoV-2 počinje vezanjem RBD S1 podjedinice za stanicu domaćina uz pomoć ACE2 receptora na membrani stanice domaćina (19).



**Slika 1.** Struktura SARS-CoV-2 virusa. (Preuzeto i prilagođeno prema: Santos IA, Grosche VR, Bergamini FRG, Sabino-Silva R, Jardim ACG. Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 treatment? Front Microbiol. 2020;11:1818.)

Fuzija virusne membrane i membrane stanice domaćina rezultira otpuštanjem virusnog genoma. Nekoliko proteaza potpomažu ulasku virusa u stanicu: katepsin L, termolizin, plazmin i tripsin. Svi su ovi enzimi međutim uglavnom topljivi i ne mogu se zadržati u blizini ACE2 receptora. Istraživanja su pokazala da glavna proteaza koja pomaže endocitozu virusa u stanice domaćina je transmembranska serinska proteaza tipa II (engl. *Transmembrane Serine Protease 2*, TMPRSS2) (20). U citoplazmi domaćina enzim RNA-ovisna polimeraza koristi pozitivni lanac RNA kao kalup za sintezu komplementarnog novog genoma. Novosintetizirana RNA udružuje se s N-proteinom te zajedno formiraju nukleokapsid, a potom se u novu virusnu česticu ugrađuju ostali glikolizirani glavni strukturni proteini. U domaćinovom endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu, strukturni proteini i virusna RNA sazrijevaju u virione SARS-CoV-2. Okupljeni virioni putuju unutar vezikula prema staničnoj membrani domaćina te se oslobađaju egzocitozom (21).

### **1.2.3. Imunopatogeneza**

Glavni patofiziološki mehanizmi COVID-19 uključuju direktno virusno oštećenje endotela, poremećaj imunološkog sustava s povećanim upalnim odgovorom, hiperkoagulabilnost s posljedičnim trombotskim stanjem uz poremećenu aktivaciju ACE2 receptora (22).

Patogeneza SARS-CoV-2 infekcije počinje vezanjem virusa za ACE2 receptor, a posredovanjem TMPRSS2 proteaze (20). Budući da vrsta i veličina virusne ozljede tkiva je u korelaciji s raspodjelom i sadržajem receptora u tijelu, visoka ekspresija ACE2 receptora (oko 83%) na alveolarnim stanicama tipa 2 (AT2) predisponira razvoj u akutnu plućnu ozljedu (engl. *Acute Lung Injury*, ALI) i ARDS (23). U imunopatogenezi središnje mjesto ima aktivacija renin-angiotenzinskog sustav (engl. *renin-angiotensin system*, RAS). Veza SARS-CoV-2 s ACE2 receptorom onemogućava pretvorbu Ang II (engl. *angiotensin II*) u Ang 1-7 (engl. *angiotensin 1-7*) što dovodi do povećane aktivnosti Ang II. Povećana

prisutnost Ang II posljedično aktivira upalni odgovor uz pojačano stvaranje proupalnih citokina među kojima je najvažniji tumor nekrotizirajući faktor alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) i interleukin 6 (IL-6) (24).

ARDS je histološki karakteriziran difuznim alveolarnim oštećenjem s povećanom vaskularnom propusnosti i nakupljanjem tekućine u alveolama, oštećenjem pneumocita uz stvaranje naslaga fibrina u alveolama, a kao posljedica prisutan je poremećaj izmjene plinova s razvojem hipoksemije (24).

Brza replikacija SARS-CoV-2 potiče akutnu upalu i aktivira prirodni i stečeni imunološki odgovor. Brojne upalne stanice, poput neutrofila, makrofaga, a potom CD4+ limfocita, B limfocita, CD8+ limfocita T uz proupalne medijatore i citokine uključene su u imunološki odgovor. U teškom obliku COVID-19 dolazi do poremećaja u imunološkom odgovoru i razvoja citokinske oluje. Citokinska oluja je karakterizirana proizvodnjom velikih količina citokina kao što su IL-2, IL-7, IL-10, čimbeniku stimulacije kolonija granulocita (engl. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, GCSF), monocitni kemotaktički protein-1 (engl. *Monocyte Chemotactic Protein-1*, MCP 1), makrofagni upalni protein-1A (engl. *Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha*, MIP 1 $\alpha$ ) i TNF- $\alpha$  (25). SARS-CoV-2 ulaskom u stanicu dovodi do aktivacije brojnih signalnih puteva uključujući i transkripcijski čimbenik nuklearnog faktora- $\kappa$ B (engl. *Nuclear factor kappaB*, NF- $\kappa$ B) kao glavnog pokretača imunološkog odgovora na infekciju. U stanicama zaraženim SARS-CoV-2, aktivacija NF- $\kappa$ B dodatno stimulira pojačanu sintezu proupalnih citokina i kemokina, posebice IL-6. Daljnja pojačana migracija upalnih stanica uzrokuje dodatnu pojačavaju aktivaciju IL-6, a posljedično se razvija citokinska oluja (26).

#### 1.2.4. Klinička slika

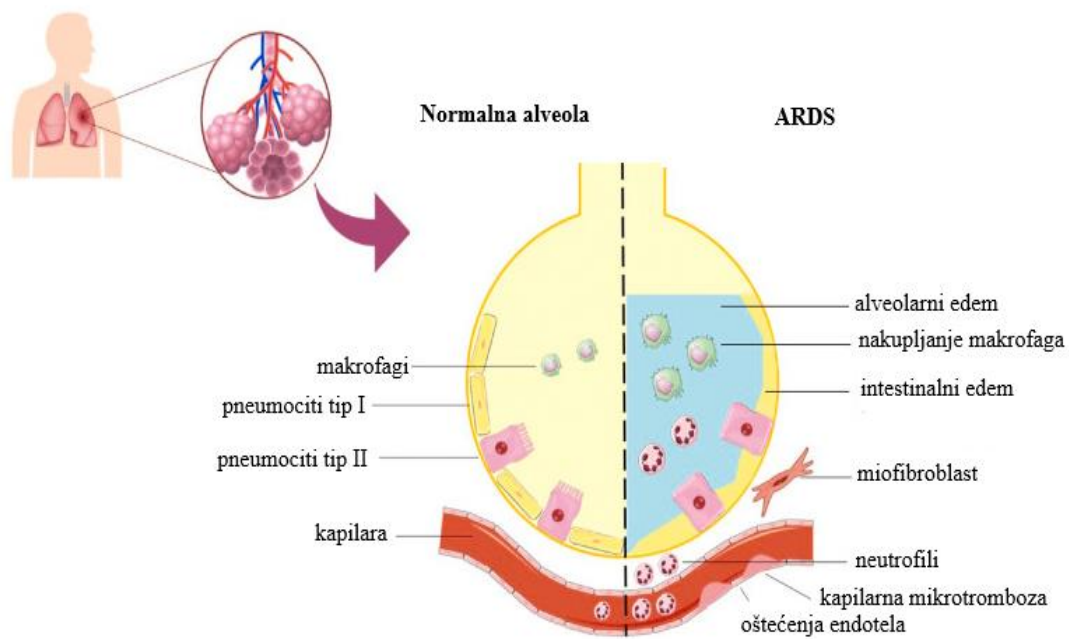
COVID-19 ima različitu kliničku prezentaciju, od asimptomatskog tijeka do blaže simptomatologije poput groznice, suhog kašalja, mialgije, grlobolje i glavobolje do ozbiljnih respiratornih komplikacija koji mogu dovesti do ALI-a i ARDS-a (**Tablica 1**). Osim respiratornih simptoma COVID-19 može imati i različite izvan plućne manifestacije poput akutnih srčanih i neuroloških poremećaja, te ozljeda gušterače, akutne ozljede bubrega i testisa (26).

**Tablica 1.** Stupanj težine COVID-19 bolesti

STUPANJ TEŽINE BOLESTI	
• <b>Srednje teška bolest</b>	• znakovi bolesti donjeg respiratornog sustava ( $SpO_2 \geq 94\%$ izmjerene pulsni oksimetrom).
• <b>Teška bolest</b>	• $SpO_2 < 94\%$ , $PaO_2/FiO_2 < 300$ mm Hg, frekvencija disanja $> 30$ udisaja/min, ili RTG promjene koje zahvaćaju $> 50\%$ plućnog parenhima.
• <b>Kritična bolest</b>	• ARDS, septični šok ili znakovi multiorganskog zatajenja.

**Preuzeto i prilagođeno prema:** Thabet L, Mhalla S, Naija H, Jaoua MA, Hannachi N, Fki-Berrajah L, Toumi A, Karray-Hakim H. SARS-CoV-2 infection virological diagnosis. Tunis Med. 2020;98:304-308. **Kratice:** ARDS, akutni respiratorni distress sindrom;  $FiO_2$ , udio udahnutog kisika;  $PaO_2$ , parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi;  $SpO_2$ , periferne zasićenosti kisikom.

Kao najteži stupanj COVID-19, ARDS se najčešće javlja između 8. i 12. dana od početka simptoma. Razvija se kroz nekoliko različitih faza od oštećenja alveolarnih kapilara, epitela alveola do fibroproliferativne faze. Oštećenje plućnog epitela i endotela karakterizirano je upalom, apoptozom i nekrozom uz povećanu alveolarno-kapilarnu propusnost s razvojem alveolarnog edema. Nastali edem sprječava pravilnu difuziju plinova u plućima, a kako rezultat toga razvija se hipoksija (**Slika 2**) (27,28).



**Slika 2.** Prikaz normalne alveole te alveole u ARDS-u. **Preuzeto i prilagođeno prema:** Mirmohammadi S, Kianmehr A, Arefi M, Mahrooz A. Biochemical parameters and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in vital organs: COVID-19 outbreak in Iran. *New Microbes New Infect.* 2020;38:100792. **Kratice:** ARDS, akutni respiratorni distress sindrom.

Prema Berlinskoj definiciji koja je donesena 2012. godine, a koristeći se vrijednostima omjera parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi i udjela udahnutog kisika ( $PaO_2/FiO_2$ ), ARDS se klasificira kao blagi, umjereni ili teški (**Tablica 2**) (29).



**Tablica 2.** Definicija akutnog respiratornog distres sindroma

<b>Berlinska definicija</b>	
<b>Vrijeme nastanka</b>	Početak unutar 1. tjedna od poznate ozljede ili novonastalo, ili pogoršanje respiratornih simptoma.
<b>RTG ili CT prsnog koša</b>	Obostrano zamućenje i/ili nodularni infiltrati, atelektaza/kolaps plućnog reznja i/ili plućnog krila.
<b>Podrijetlo edema</b>	Respiratorno zatajenje nije u sklopu zatajenja srca ili preopterećenjem tekućinom. Potrebna objektivna procjena (npr. ehokardiografija) ako nema čimbenika rizika.
<b>Oksigenacija</b>	
<b>Blaga</b>	$200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}^*$ s PEEP ili CPAP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$
<b>Umjerena</b>	$100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ s PEEP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$
<b>Teška</b>	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ s PEEP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$

\* PaO<sub>2</sub> u mmHg; FiO<sub>2</sub> u decimalnom razlomku. **Preuzeto i prilagođeno prema:** Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis.* 2013;5:326-34. **Kratice:** ARDS, akutni respiratorni distres sindrom; CPAP, stalni pozitivni tlak u dišnim putovima; FiO<sub>2</sub>, udio udahnutog kisika; PaO<sub>2</sub>, parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi; PEEP, pozitivan tlak na kraju izdisaja.

### 1.2.5. Dijagnostika COVID-19

Dijagnostički pristup SARS-CoV-2 sastoji se od kliničke sumnje, testiranja i prikupljanja uzoraka, a nakon potvrde infekcije potrebno je specifična laboratorijska i slikovna obrada kojom bi se procijenila težina kliničke slike (30). Za dijagnozu trenutne infekcije koristi se antigensko testiranje, metodom imunoesej koji detektira prisutnost specifičnog virusnog antigena, najčešće nukleokapsidnog proteina (N). Osim toga koriste se i molekularni testovi lančane reakcije polimeraze nakon obrnutog prepisivanja (engl. *Reverse-transcription Poymerase Chain Reaction*, RT-PCR), te test amplifikacije nukleinskih kiselina. Uzorci za

ovakve tipove testiranja su obrisak sluznice nazofarinksa ili nosa. Klinička učinkovitost ovih testova ovisi o vrsti i kvaliteti uzorka te trajanju bolesti u vrijeme testiranja. Zabilježena stopa lažno negativnih rezultata kreće se od 5% do 40%, ovisno o korištenom testu (31).

Serološke pretrage koriste se za dijagnozu prethodne infekcije ili infekcije koja je trajala najmanje 3 do 4 tjedna. Prvenstveno se detektiraju IgM i IgG protutijela koja su nastala kao odgovor imunološkog sustava na infekciju. Uzorak za testiranje je serum ili plazma. COVID-19 potiče IgG antitijela protiv N proteina koja se mogu detektirati u serum već 4. dan od početka bolesti, a u većine bolesnika serokonverzija se odvija do 14. dana bolesti. Negativna strana ovoga testa je to što je zabilježena križna reakcija s drugim koronavirusima (32).

Mnoge studije ukazuju na specifične laboratorijske biomarkere koji su povezani s lošim ishodima u hospitaliziranih bolesnika s COVID-19. S razvojem teže kliničke slike dolazi do pada broja limfocita, eozinofila, eritrocita, hemoglobina i hematokrita. Pokazalo se kako je omjer neutrofila i limfocita (engl. *Neutrophil-Lymphocyte Ratio*, NRL) jedan od najboljih hematoloških pokazatelja za praćenje tijeka bolesti (33). Biokemijski markeri upalnog odgovora poput C reaktivnog proteina (engl. *C-reactive protein*, CRP) i prokalcitonina (engl. *procalcitonin*, PCT) pokazali su značajnost u procjeni težine kliničke slike. U bolesnika s nekomplikiranom COVID-19, PCT može ostati u normalnim granicama, ali kontinuirano povećanje razine PCT-a može ukazivati na bakterijsku superinfekciju i napredovanje prema težim komplikacijama kao što su ALI i ARDS (34).

Pojačani upalni odgovor endotelnih stanica može dovesti do poremećaja koagulacije i fibrinolize pa sve do razvoja diseminirane intravaskularne koagulopatije (engl. *disseminated intravascular coagulation*, DIC) što prati i porast D-dimera u laboratorijskim nalazima. Studije su pokazale da razine D-dimera veća od 2,0 µg/mL je u korelaciji s intrahospitalnom

smrtnošću bolesnika s COVID-19, te da bolesnici s povišenom razinom D-dimera češće zahtijevaju liječenje u JIL-u, uz veću vjerojatnost razvoja embolije pluća (35).

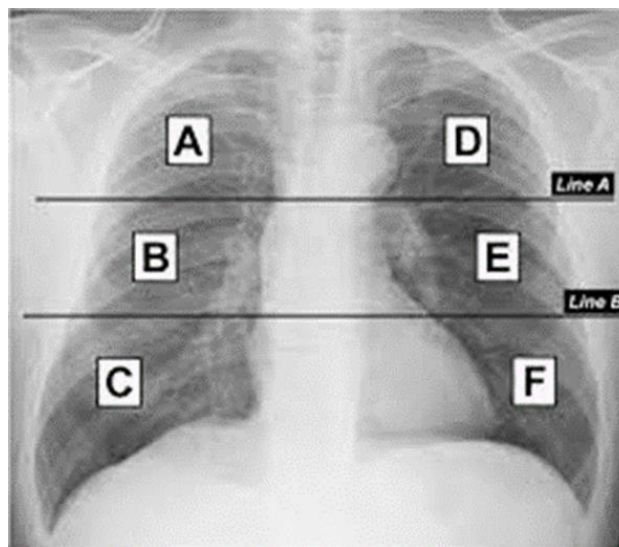
Mnoge studije izvijestile su o ozljedi miokarda kao jednoj od glavnih patogenih značajki COVID-19, s prevalencijom u oko 54% (36). Točan mehanizam ozljede miokarda još uvijek nije poznat, no kao mogući navodi se povećana prisutnost upalnih citokina te poremećena aktivacija ACE2 receptora s posljedičnim gubitkom kardioprotektivnog učinka Ang 1-7 (37). Vrijednosti srčanog biomarkera hs-TnI (engl. *high sensitivity troponin I*) su značajno veće u bolesnika s težom kliničkom slikom, dok je njegova visoka vrijednosti kod bolesnika liječenih u JIL-u pokazatelj multiorganskog zatajenja s lošijim ishodom liječenja (38).

Nedostatak vitamina D dugo se povezivalo sa smanjenom imunološkom funkcijom koja može biti čimbenik rizika za mnoge virusne infekcije (39). Kliničke studije ukazuju da bolesnici s COVID-19, kod kojih je prisutan nedostatak vitamina D, imaju povećan rizik za razvoj teže kliničke slike (39,40).

U studijama provedenim na bolesnicima s COVID-19 je otkriveno da visoka razina lakrat dehidrogenaze (engl. *lactate dehydrogenase*, LDH) u ranoj fazi bolesti može biti dobar prediktor ozljede pluća te je povezan s lošijim ishodom (41).

Laboratorijski pokazatelji multiorganskog oštećenja uključuju porast enzima aspartat aminotransferaza (engl. *aspartate aminotransferase*, AST), alanin aminotransferaza (engl. *alanine aminotransferase*, ALT), bilirubina, gama-glutamilttransferaza (engl. *gamma-glutamyltransferase*, GGT) i kreatinina. Studije su pokazale da je 76,3% bolesnika imalo patološke jetrene testove, dok je 21,5% razvilo oštećenje jetre tijekom hospitalizacije (42). U prospektivnoj kohortnoj studiji provedenoj na 701 COVID-19 bolesniku, otkriveno je da je tijekom hospitalizacije učestalost akutne ozljede bubrega (engl. *Acute kidney injury*, AKI) bila 5,1% (43).

Pneumonija u sklopu COVID-19 radiološki je karakterizirana obostranim infiltratima tipa mliječnog stakla (engl. *ground glass opacities*, GGO) u perifernim dijelovima plućnog parenhima (44). Nerijetko se vidi normalna radiografska snimka (RTG) pluća u simptomatskih bolesnika koji se prezentiraju u ranoj fazi bolesti (45). Za procjenu veličine zahvaćenosti plućnog parenhima na RTG-u pluća predložena je Brixia bodovna ljestvica (**Slika 3**) (46). U studiji Balbija i suradnika, navodi se da RTG pluća uz omjer PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> i vrijednosti SpO<sub>2</sub>, može predvidjeti smrtnost i potrebu za respiratornom potporom (47). Nadalje, studija Maroldi i suradnika je pokazala da rezultati Brixia bodovne ljestvice signifikantno koreliraju s ishodom COVID-19 (48). Kao što je prikazano na **slici 3**, izračun Brixia bodovne ljestvice se dobije podjelom snimke RTG-a pluća u 6 zona, po tri za svako plućno krilo: gornje zone A i D iznad donje stjenke luka aorte, srednje zone B i E ispod donje stjenke luka aorte i iznad donje stjenke desne donje plućne vene (tj. hilarne strukture) i donje zone C i F ispod donje stjenke desne donje plućne vene do plućnih baza (46).



**Slika 3.** Brixia bodovna ljestvica. **Preuzeta i prilagođeno prema:** Hanley M, Brosnan C, O'Neill D, Ni Mhuirheartaigh N, Logan M, et al. Modified Brixia chest X-ray severity scoring system and correlation with intubation, non-invasive ventilation and death in a hospitalised COVID-19 cohort. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2022;66:761-767.

Za svaku zonu dodijeljeni su rezultati u rasponu od 0 do 3 na temelju prisutnih promjena plućnog parenhima (0: nema promjena, 1: intersticijski infiltrat, 2: intersticijski (dominantni) i alveolarni infiltrat, 3: intersticijski i alveolarni (dominantni) infiltrat). Rezultat se dobije zbrojem s maksimalnim brojem od 18 (**Tablica 2**) (46).

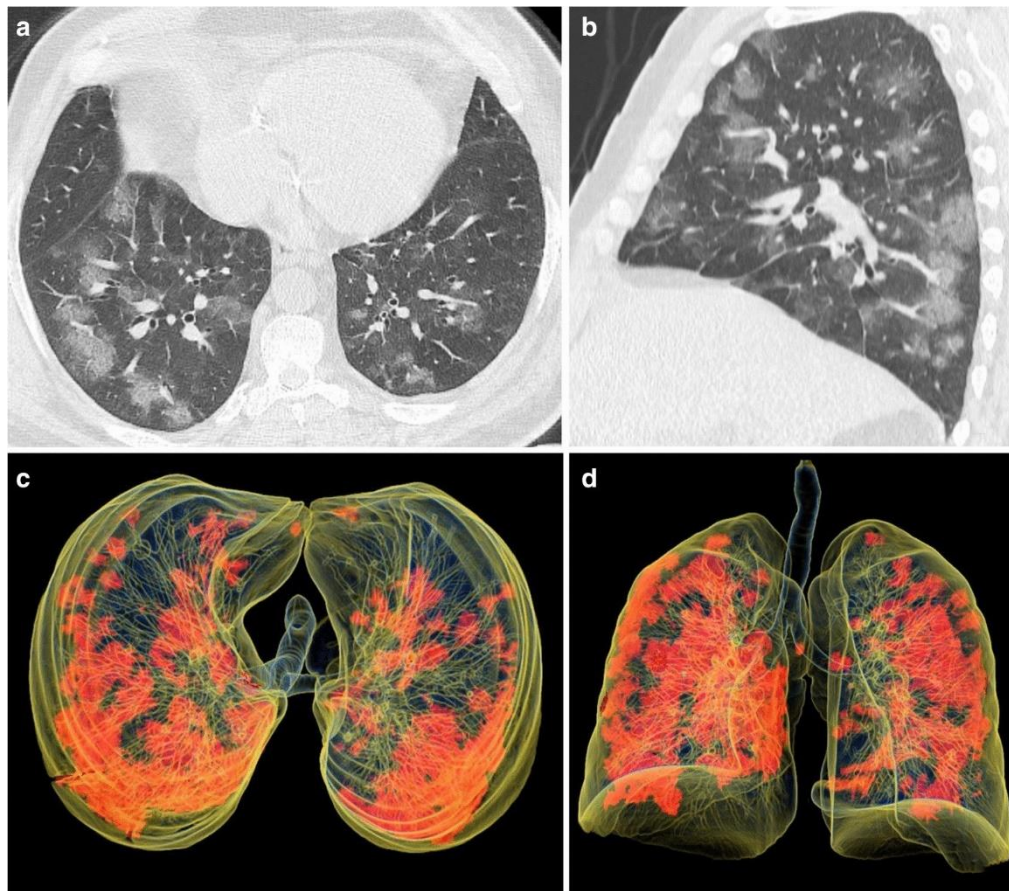
**Tablica 2.** Brixia bodovna ljestvica

Bodovi	Nalazi plućnog parenhima
0	Nema abnormalnosti pluća
1	Intersticijski infiltrati
2	Intersticijski i alveolarni infiltrati s intersticijskom dominacijom
3	Intersticijski i alveolarni infiltrati s alveolarnom dominacijom

**Preuzeto i prilagođeno prema:** Hanley M, Brosnan C, O'Neill D, Ni Mhuircheartaigh N, Logan M, et al. Modified Brixia chest X-ray severity scoring system and correlation with intubation, non-invasive ventilation and death in a hospitalised COVID-19 cohort. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2022;66:761-767.

Osim RTG-a pluća koristi se i kompjuterizirana tomografija (engl. *Computed tomography*, CT). Osjetljivost CT-a u dijagnostici COVID-19 pneumonije je od 85 do 98%, uzimajući u obzir korelaciju s PCR testovima (49,50). Obilježja COVID-19 pneumonije na snimkama CT-a nisu specifična, ali imaju karakteristične značajke. Najčešći i najraniji nalaz je uzorak GGO koji je u početku bolesti obično multifokalan, bilateralan i periferno raspodijeljen, dominantno u stražnjim i donjim dijelovima pluća. Uobičajeni nalaz u području zahvaćenosti plućnog parenhima su proširene krvne žile i bronhiektazije (51). Razvojem ARDS-a, CT nalaz opisuje opsežne promjene karaktera pneumonije u plućnom parenhimu, dok u fazi oporavka dolazi do regresije promjena uz često kasnije opisane fibrozne tračke (52). Za identifikaciju promjena u pleuri i plućnom parenhimu u bolesnika s COVID-19, ultrazvuk pluća je pokazao osjetljivost od 89,5% i negativnu prediktivnu vrijednost od 86,6%

(53,54). U dosadašnjim istraživanjima nalazi ultrazvuka pluća dobro koreliraju s nalazima CT-ova u bolesnika s COVID-19 pneumonijom (55).



**Slika 3.** Karakteristične promjene plućnog parenhima u bolesnika s COVID-19 bolesti, prikazane CT (a i b) uz trodimenzionalne poluprozirne rekonstrukcije (c i d). **Preuzeta i prilagođeno prema:** Elmokadem AH, Batouty NM, Bayoumi D, Gadelhak BN, Abdel-Wahab RM, Zaky M, Abo-Hedibah SA, Ehab A, El-Morsy A. Mimickers of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) on chest CT: spectrum of CT and clinical features. *Insights Imaging.* 2021;12:12.

Ispitivanje plućne funkcije osnovni je postupak u procjeni težine COVID-19. Najjednostavniji način je mjerenje  $SpO_2$  pomoću pulsne oksimetrije, a vrlo koristan parametar je i  $FiO_2$  (56). Horowitzov indeks (engl. *Horowitz index*, HI) predstavlja omjer  $PaO_2/FiO_2$ , parametar koji se koristi za procjenu plućne funkcije. U zdravih osoba, HI iznosi između 350 i 450. Vrijednost ispod 300 upućuje na ozljedu pluća, vrijednosti 200 je

pokazatelj umjereno teške ozljede pluća, dok vrijednosti ispod 100 je kriteriji za tešku plućnu ozljedu. HI se koristi i za procjenu težine ARDS-a (27).

Postoji nekoliko bodovnih ljestvica koje se koriste u JIL-u za procjenu težine COVID-19. SAPS II bodovna ljestvica (engl. *Simplified Acute Physiology Score*) sustav je za klasifikaciju ozbiljnosti bolesti te procjenu rizika smrtnog ishoda za bolesnike hospitalizirane u JIL-u. Sastoji se od 17 varijabli: 12 fizioloških varijabli (npr. dob, vrsta prijema, planiran kirurški zahvat, neplaniran kirurški zahvat ili medicinski razlog prijema) i 3 varijable povezane s osnovnom bolešću (sindrom stečene imunodeficijencije, metastatski karcinom i hematološke maligne bolesti). Za fiziološke varijable koriste se najlošije vrijednosti tijekom protekla 24h od prijema u JIL (57). Neke studije su ukazale na nedostatak korištenja SAPS II bodovne ljestvice u bolesnika s COVID-19 jer uvrštavaju parametre unutra prvih 24h od prijema u JIL (58). Stoga je 2021. godine razvijen prognostički model zvan SOSIC (engl. *Survival of Severely Ill COVID*) kao sustav za procjenu vjerojatnosti 90-dnevnog preživljenja nakon prijema u JIL kod bolesnika s COVID-19 (59). Podatci se prikupljaju 1. (SOSIC-1), 7. (SOSIC-7), te 14. (SOSIC-14) dana hospitalizacije u JIL-u (60).

### **1.2.6. Liječenje i prevencija COVID-19**

U bolesnika s blagim simptomima bolesti pristupa se simptomatskom liječenju uz održavanje prehrane i hidratacije te kontroliranje kašlja i vrućice, dok bolesnici s teškom upalom pluća zahtijevaju hospitalizaciju. Najčešća je komplikacija SARS-CoV-2 infekcije upala pluća, stoga nadomjesna terapija kisikom čini veliki dio simptomatskog liječenja. Optimalna SpO<sub>2</sub> mjerena pulsnom oksimetrijom u odraslih s COVID-19 je od 92% do 96% (61). Ako dođe do progresije bolesti te razvoja akutne hipoksemije, konvencionalna terapija kisikom može biti nedostatna. Opcije za pružanje pojačane respiratorne potpore uključuje korištenje kisika kroz nosnu kanilu visokog protoka (engl. *High-flow nasal cannula*, HFNC),

neinvazivnu ventilaciju (engl. *noninvasive ventilation*, NIV), intubaciju uz MV ili ECMO (engl. *Extracorporeal Membrane Oxygenation*) (56).

Uz simptomatske mjere, liječenje COVID-19 sastoji se i od antivirusnih lijekova, imunomodulatora, neutralizirajućih protutijela te stanične i genske terapije. Upotreba kortikosteroida u liječenju COVID-19 se pokazala korisnom jer protuupalni lijekovi povećavaju ekspresiju protuupalnih molekula poput aneksina-1, interleukina-10, sekretornog inhibitora proteaze leukocita, a smanjuju ekspresiju proupalnih citokina IL-6 i IL-2 (62). U mjere prevencije infekcije SARS-CoV-2 ubrajaju se zaštitne maske za lice, redovita higijena i dezinfekcija svih površina s kojima se dolazi u kontakt te mjere socijalne distance (63). Cijepljenje je glavna mjera prevencije i zaštite od teškog oblika bolesti (64).

### **1.3. Uloga citokina TWEAK-a u COVID-19**

Citokini su velika i raznolika skupina proteina koji se vežu za receptore na površini stanice i time reguliraju mnoge važne biološke procese. Ti procesi uključuju proliferaciju, hematopoezu te upalu i imunološku reakciju. TNF- $\alpha$  i TNF receptori (engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily*, TNF-RSF) privukli su značajan interes kao potencijalni terapijski ciljevi za mnoge bolesti (65,66). Citokin TWEAK (engl. *TNF-like weak inducer of apoptosis*) je član superobitelji TNF- $\alpha$  koji se veže s fibroblastnim čimbenikom rasta potaknut protein 14 (engl. *fibroblast growth factor-inducible 14*, Fn14) i prisutan je na membrani brojnih stanica i tkiva (67,68). TWEAK je poznat pod nazivima TNFSF12 (engl. *Tumor Necrosis Factor Superfamily member 12*), a njegov receptor Fn14 kao TNF-RSF12A (engl. *TNF Receptor Superfamily member 12A*) (67). Prvi put se TWEAK spominje 1997. godine kada su Chicheportiche i suradnici izvijestili o identifikaciji novog proteina sličnog TNF-u koji je imao proapoptotičku aktivnost na ljudske stanice karcinoma debelog crijeva (69). U 2001. godine Wiley i suradnici otkrivaju receptor Fn14, kao jedini do sada poznati



receptor TWEAK-a (70). TWEAK je za razliku od ostalih članova superobitelji TNF- $\alpha$ , široko rasprostranjen citokin. On se inicijalno sintetizira kao transmembranski glikoprotein tipa II (engl. *membrane-anchored TWEAK*, mTWEAK) od 249 aminokiselina. Sastoji se od C-terminalne izvanstanične domene koja sadrži 206 aminokiselina, transmembranske domene koja se sastoji od 25 aminokiselina i N-terminalne intracelularne domena od 18 aminokiselina koja je u sklopu protein kinaze C. Mnoge stanice mogu eksprimirati mTWEAK i otopljenu formu sTWEAK-a (engl. *soluble TWEAK*) koja ostvaruje biološke učinke i može se odrediti u serumu i u urinu (71,72).

Fn14 je transmembranski protein tipa I koji sadrži 102 aminokiseline i najmanji je član TNF-RSF. Djelovanje TWEAK-a ovisi o ekspresiji Fn14 na stanicama, a pokazalo se da jedino primarni T i B limfociti nemaju receptor Fn14 (73). U istraživanjima se uočilo da vezno mjesto za TWEAK može biti CD163 koji se isključivo nalazi na monocitno/makrofagnoj lozi (74). Vezanjem TWEAK-a za Fn14 receptor aktivira se nekoliko različitih signalnih puteva kao što su MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*), Akt/PI3K (engl. *lipid kinase phosphoinositide-3-kinase signaling pathway*) i NF- $\kappa$ B. Aktivacija signalnog puta NF- $\kappa$ B potiče transkripciju gena za brojne proupalne medijatore, apoptozu i proliferaciju stanice (od čega je transkripcija gena tijekom upale dio složenog i dinamičnog procesa koji se događa u tkivima nakon traumatske, infektivne, toksične ili autoimune ozljede) (69,72,75). Aktivacija TWEAK/Fn14 potiče sintezu brojnih citokina, kao što je IL-6, GCSF (engl. *granulocyte stimulating factor*), MCP1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*), ICAM1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*) i VCAM1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) uz pojačanu ekspresiju i Fn14 receptora (67,68,75,76,77). Dokazano je da ekspresija Fn14 na stanicama je potaknuta i ozljedom stanice i okolnog tkiva (68).

Najveći broj istraživanja je dokazalo ulogu TWEAK-a u tumorogenezi i prekomjernu izraženost Fn14 u određenim solidnim tumorima kao što su karcinomi jetre, jednjaka, debelog crijeva, gušterače, pluća, jajnika, prostate kao i kod neuroblastoma (78-81).

Recentna istraživanja ukazuju da TWEAK ima važnu ulogu u patofiziologiji mnogih autoimunih i kroničnih upalnih bolesti kao što su sistemski lupus, reumatoidni artritis i multipla skleroza (82). Nadalje, pokazalo se da aktivacija TWEAK-a može imati važnu ulogu u razvoju inzulinske rezistencije u sklopu šećerne bolesti tipa 2 i metaboličkog sindroma. Smanjena razine sTWEAK-a s povećanjem razine mTWEAK-a, mogli bi pridonijeti protupalnom učinku u bolesnika s metaboličkim sindromom (83,84). Dosadašnja istraživanja su pokazala promjenu serumskih razina TWEAK-a u bolesnika s septičnim šokom te pozitivnu povezanost s mortalitetom bolesnika (77). Naime, aktivacija TWEAK/Fn14 osovine kao dio upalnog odgovora na infekciju, povećava lučenje mnogih proupalnih citokina uključujući IL-6, što kod nekih bolesnika može dovesti do razvoja teške kliničke slike s ARDS-om uz multiorgansko oštećenje, a u konačnici i do smrtnog ishoda (85,86). Dosada je provedena samo jedna studija koja je ispitala ulogu TWEAK-a u bolesnika s COVID-19. Statistički su zabilježene povišene serumske razine TWEAK-a u bolesnika s COVID-19 u odnosu na kontrolnu skupinu te veća razina TWEAK-a u skupini bolesnika koji su imali radiološki opisane promjene na plućima u odnosu na skupinu bolesnika koja nije imala radiološki opisane promjene na plućima (85).

Do sada nema objavljenih kliničkih studija koje su istraživale serumske vrijednosti TWEAK-a u bolesnika s teškim oblikom COVID-19, te povezanost razine TWEAK-a s razinom testosterona i smrtnošću bolesnika s teškim oblikom COVID-19.

#### 1.4. Povezanost testosterona i COVID-19

Testosteron ima značajnu ulogu u modulaciji upale. Brojna istraživanja na animalnim modelima su pokazala da su niske razine testosterona povezane sa sistemskim upalnim procesima i porastom proupalnih citokina (IL-6, IL-1b, TNF- $\alpha$ ) (87). Testosteron smanjuje proizvodnju slobodnih radikala kisika, oksidaciju neutrofila i ukupni oksidacijski stres, te utječe na funkciju makrofaga, monocita i T-limfocita u infekciji (88). Postoji „začarani krug“ u kojem muški hipogonadizam može dovesti do povećane upale, a isto tako, proupalni citokini, kao što su IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  mogu inhibirati lučenje testosterona modulacijom osovine hipotalamus-hipofiza-gonade (89,90). Sukladno tome, pokazalo se da terapija testosteronom u hipogonadalnih muškaraca može smanjiti upalni odgovor i sniziti razinu cirkulirajućih citokina (89). Razina testosterona se pokazala kao važnim čimbenikom u kroničnoj upali koja je bitna u patofiziologiji malignih i autoimunih bolesti (91). Snižene razine endogenog testosterona udružene su s povećanom masom masnog tkiva (posebice abdominalnog) te povećanim rizikom od razvoja metaboličkog sindroma (92,93). Naime, testosteron povećava aktivnost aromataze koja sudjeluje u pretvorbi testosterona u estradiol u abdominalnom masnom tkivu koji je izvor upalnih citokina uključujući IL-6, IL-1 $\beta$ , inhibitor aktivatora plazminogena i TNF- $\alpha$  (94,95,96). Konverzija testosterona uz povećanu razinu leptina izravno inhibira hipotalamičko-hipofiznu osovinu uz smanjenje lučenja luteinizirajućeg hormona (LH) te posljedično testosterona, te je stoga pretilost danas među najčešćim uzrocima muškog hipogonadizma (94).

Povezanost između testosterona i COVID-19 još uvijek nije dovoljno razjašnjena, s potencijalnom negativnom ili zaštitnom ulogom testosterona na različite aspekte bolesti. Meta analiza koja je uključila oko 3 milijuna osoba diljem svijeta sa COVID-19 je pokazala da nema razlike u riziku oboljenja s obzirom na spol, ali muškarci su imali gotovo tri puta veći rizik prijema u JIL (OR = 2,84; 95% CI= 2,06-3,92) i veći rizik smrtnosti (OR = 1,39;

95% CI= 1,31-1,47) u odnosu na žene (97). Slične podatke potvrđuju i ostale studije koje su analizirale rizik smrtnosti u muškaraca s COVID-19, te rizikom prijema u JIL (98,99). U dosadašnjim CoV epidemijama, sličan trend veće stope smrtnosti u muškaraca (52%) u odnosu na žene (23%) je uočeno kod bolesnika oboljelih od MESR-CoV infekcije (100).

U istraživanjima se pokazalo da testosteron ima značajnu ulogu u patogenezi COVID-19 budući da je vezanje virusa za ACE2 receptor ovisno o TMPRSS2 proteazi čija sinteza je pod izravnim utjecajem testosterona (101). Prekomjerna ekspresija TMPRSS2 potaknuta povećanom razinom testosterona u muškaraca ima potencijalnu ulogu u olakšanom ulasku SARS-CoV-2 u stanice i povećanim rizikom razvoja teže kliničke slike i smrtnosti (102,103).

Na modelu izoliranih humanih glatkih mišićnih stanica dišnih puteva pokazano je da testosteron značajno povećava ekspresiju ACE2 receptora (104). Isto tako, smanjen izražaj ACE2 receptora je utvrđen u starijih muškaraca što je sukladno sa smanjenjem sinteze androgena povezanim sa starenjem (105). Sukladno tome, istraživanje na humanim matičnim stanicama je ukazalo na zaštitnu ulogu antiandrogene terapije u SARS-CoV-2 infekciji jer smanjuje ekspresiju ACE2 receptora (104). No, zaštitna uloga antiandrogene terapije u SARS-CoV-2 infekciji pokazala su oprečne rezultate u dosadašnjim istraživanjima. Nekoliko studija koji su uključivale bolesnike s malignomom prostate pokazali su niži rizik za SARS-CoV-2 infekciju u bolesnika koji su primali antiandrogena terapiju, što podržava ulogu testosterona u patogenezi COVID-19 (106). Suprotno tome, u prospektivnoj kohortnoj studiji Klein i suradnika, statistički je veći udio bolesnika s COVID-19 koji nisu primali antiandrogenu terapiju u odnosu na bolesnike koji su istom liječeni (107).

S druge strane, smanjene razine testosterona su zabilježene u bolesnika s teškom kliničkom slikom COVID-19 (108,109). Budući da se ACE2 receptori nalaze na stanicama testisa, oštećenje Sertolijevih i Leydigovih stanica s posljedičnim smanjenjem sinteze

testosterona može biti u sklopu ozljede testisa samim virusom, pojačanom aktivnosti Ang II i/ili oštećenjem hipotalamus-hipofiza-gonade osovine (110).

Istraživanje razine ukupnog testosterona u muškaraca pri hospitalizaciji zbog COVID-19 u odnosu na kontrolne zdrave ispitanike su bile značajno niže, od čega je u 89,8% ispitanika, prema vrijednosti testosterona, bilo hipogonadalno, a postotak hipogonadizma u zdravih ispitanika je bio svega 14,9% (111). Također, meta analiza koja je promatrala hormonske parametre u više od 2000 bolesnika sa COVID-19, zabilježila je snižene vrijednosti ukupnog testosterona bez promjena u vrijednostima LH (112). Sukladno tome, prospektivna studija koja je uključila 358 bolesnika s COVID-19 i 92 bolesnika bez COVID-19 pokazala je nižu razinu ukupnog testosterona u bolesnika s COVID-19. Statistički se pokazalo da su vrijednosti testosterona bile niže u bolesnika s teškim oblikom COVID-19 te u onih kojima je bila potrebna intenzivna skrb u odnosu na one kojima ista nije bila potrebna (113,109). U istraživanju Salonia i suradnika, prati se porast razine testosterona u fazi oporavka (period praćenja sedam mjeseci), od čega je 50% bolesnika zadržalo snižene vrijednosti testosterona sukladne hipogonadizmu, a čak u 10% bolesnika bilježi daljnji pad razine testosterona za 10% (114). Također, navodi se da su 70% bolesnika koji su imali snižene razine testosterona u trenutku prijema u bolnicu, a uz daljnje smanjenje serumske razine testosterona, imali su učestalije pogoršanje kliničke slike uz razvoj ARDS-a (115,116). Slično zapažanje se navodi i u studiji učinjenoj 2021. godine od Camici i suradnika, koji su primijetili da su niske razine testosterona bile povezane s dužim boravkom u bolnici uz povećanu mogućnost razvoja hiperinflamatornog sindroma (117).

Uzimajući u obzir rezultate o ulozi i razini testosterona u bolesnika s COVID-19, cilj ovog istraživanja je bio ispitati i usporediti dinamiku serumskih koncentracija testosterona u bolesnika koji su preživjeli u odnosu na bolesnike koji su umrli od teškog oblika COVID-19.

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

**Glavni cilj istraživanja:**

Glavni cilj istraživanja bio je usporediti serumske razine TWEAK-a u skupini bolesnika koji su preživjeli teški oblik SARS-CoV-2 infekcije u odnosu na skupinu bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su preminuli.

**Sporedni ciljevi istraživanja su:**

1. Ispitati povezanost serumske razine TWEAK-a sa serumskom razinom testosterona.
2. Ispitati povezanost serumske razine TWEAK-a sa rizikom smrtnosti procijenjene SAPS II bodovnom ljestvicom.
3. Ispitati povezanost serumske razine TWEAK-a sa ozljedom pluća procijenjenom Brixia bodovnom ljestvicom.

### **Hipoteze istraživanja su:**

1. Serumske razine TWEAK-a bit će manje u skupini bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su preživjeli u odnosu na skupinu bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su preminuli.
2. Serumske razine testosterona bit će manje u skupini bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su preživjeli u odnosu na skupinu bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su preminuli.
3. Serumske razine TWEAK-a pozitivno će korelirati s razinom testosterona u bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije.
4. Serumske razine TWEAK-a pozitivno će korelirati s rizikom smrtnosti procijenjene SAPS II bodovnom ljestvicom.
5. Serumske razine TWEAK-a pozitivno će korelirati s rizikom ozljede plućnog parenhima procijenjenog Brixia bodovnom ljestvicom.



### **3. ISPITANICI I METODE**

Istraživanje je u cijelosti osmišljeno na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, a provedeno je na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje (lokalitet Križine). Etičko odobrenje za istraživanje izdano je od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (Klasa: 500-03/21-01/185, Ur. Br.: 2181-147/01/06/M.S.-22-03, u Splitu, rješenje od 11.02.2022.). Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i kasnijim revizijama iste poštujući postulate dobre kliničke prakse. Svi ispitanici u studiji su dobrovoljno potpisali obrazac informiranog pristanka te su uz to i usmeno bili upoznati s ciljevima istraživanja prije početka sudjelovanja u istraživanju.

### **3.1. Ispitanici**

U istraživanju su uključeni muškarci u dobi od 18 do 65 godina s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su hospitalizirani u Respiracijskom intenzivističkom centru (RIC-u) pri Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje, Kliničkog bolničkog centra Split u razdoblju od prosinca 2021. do svibnja 2022. godine. U vrijeme provođenja istraživanja dominantna varijanta SARS-CoV-2 u Hrvatskoj je bila SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) (66). Prisutnost SARS-CoV-2 virusa je potvrđena imunokromatografskom metodom koristeći se COVID-19/FluA/FluB/RSV qPCR Kit na uređaju MIC qPCR cycler. U studiju su uključeni bolesnici s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije uz razvoj ARDS-a prema Berlinskim kriterijima (29) koji su verificirani od strane specijaliste anesteziologa. Po prijemu u RIC svi bolesnici su endotrahealno intubirani i priključeni na mehaničku ventilaciju. Standardnih kriterija za endotrahealnu intubaciju su bili: zaštita dišnog puta, teška acidoza ( $\text{pH} < 7,2$ ) uz tešku apsolutnu hipoksemiju ( $\text{PaO}_2 < 50$  mmHg ili  $\text{SpO}_2 < 90\%$ ) unatoč maksimalnoj neinvazivnoj respiratornoj potpori. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine ovisno o ishodu bolesti: skupinu bolesnika koji su preživjeli ( $n=53$ ) i skupinu bolesnika koji su preminuli za vrijeme hospitalizacije ( $n=18$ ). Odlučili smo se ne uključiti bolesnike

ženskog spola u istraživanje zbog određivanja razine testosterona i drugih parametara koji mogu biti pod utjecajem spola, te smo na taj način pokušali osigurati homogeniju skupinu bolesnika. Uključni i isključni kriteriji su prikazani u **Tablici 4**.

**Tablica 4.** Kriteriji uključenja i isključenja ispitanika u studiju

UKLJUČNI KRITERIJI	ISKLUČNI KRITERIJI
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muškarci stariji od 18 i mlađi od 65 godina</li> <li>• Teški oblik SARS-CoV-2 infekcije</li> <li>• Liječenje mehaničkom ventilacijom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ženski spol</li> <li>• Muškarci mlađi od 18 i stariji od 65 godina</li> <li>• maligne i autoimunosne bolesti</li> <li>• kardiovaskularne, plućne, jetrene i bubrežne bolesti</li> <li>• upotreba vitamina D.</li> </ul>

### 3.2. Postupci

Svim ispitanicima koji su uključeni u istraživanje, nakon uzimanja detaljnih anamnestičkih podataka i kliničkog pregleda, izvršena su mjerenja vitalnih parametara i acidobaznog statusa. Podatci o kroničnim bolestima i terapiji, vremenskom razdoblju od početka SARS-CoV-2 infekcije do hospitalizacije i od početka SARS-CoV-2 infekcije do hospitalizacije u RIC-u, cjepni status, tjelesna visina i tjelesna težina prikupljeni su iz bolničke baze podataka. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je kao tjelesna masa (kg) podijeljena s visinom na kvadrat ( $m^2$ ). Prekomjerna tjelesna težina je definirana kao  $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ , dok se pretilost definirala kao  $ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$  (118). Bolesnici s arterijskom hipertenzijom, šećernom bolesti tipa 2, dislipidemijom te hipotireozom definirani su kao oni koju su uzimali kroničnu terapiju za navedene dijagnoze.

RTG snimke pluća su učinjene u sklopu standardnog liječenja bolesnika u postero-anteriornoj poziciji u ležećem položaju. Za procjenu abnormalnosti plućnog parenhima koristili smo Brixia bodovnu ljestvicu (46). Vrijednost Brixia bodovne ljestve praćene su prvog, sedmog i četrnaestog dana hospitalizacije. Za klasifikaciju ozbiljnosti bolesti te procjena rizika smrtnog ishoda korištena je SAPS II bodovna ljestvica (57). Za procjenu vjerojatnosti 90-dnevnog preživljenja bolesnika s SARS-CoV-2 infekcije korištena je SOSIC bodovna ljestvica (60).

### **3.3. Uzorkovanje krvi i laboratorijska analiza**

Svim bolesnicima uključenim u studiju unutar prvih 24h od hospitalizacije u RIC-u uzorkovana je venska krv. Svi uzorci krvi analizirani su u istom biokemijskom laboratoriju na Zavodu za medicinsku-laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split od strane istog specijaliste medicinske biokemije koji je bio zaslijepljen u odnosu na skupinu ispitanika, poštujući smjernice dobre laboratorijske prakse. Svi laboratorijski parametri koji su bili od interesa u ovom istraživanju su određeni 1., 7. i 14. dana hospitalizacije. Acidobazni status i razine laktata analizirani su iz uzorka arterijske krvi na uređaju ABL 90 Flex uz krevet bolesnika. Dio uzoraka je svakodnevno analizirano, dok je dio bio centrifugiran (10 minuta na 3000 okretaja/minuti), alikvotiran i pohranjen na -80°C te je korišteno za analizu serumske razine TWEAK-a.

Hematološki parametri (leukociti, eritrociti, trombociti, neutrofili, limfociti, monociti, eozinofili) su obrađeni na ADIVA 2120i platformi (Siemens AG, Erlangen, Njemačka). Koncentracije elektrolita mjerene su standardnom potenciometrijskom laboratorijskom metodom na Roche Cobas ISE (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, Mannheim). CRP je odrađen imunoturbidimetrijskom metodom na Roche Cobas c702 (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, Mannheim). Koncentracije ureje,

kreatinina, glukoze te aktivnost LDH i hs-TnI analizirane su na analizatoru Roche Cobas c702 (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, Mannheim). Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), protrombinsko vrijeme izraženo u internacionalnom normirajućem omjeru (engl. *international normalized ratio*, INR), D-dimeri i fibrinogen analizirano je na Siemens Healthineers Atellica COAG 360 (Siemens AG, Erlangen, Njemačka). Imunokemijska metoda je korištena za mjerenje vrijednost ukupnog testosterona, tiroidnog stimulirajućeg hormona (TSH) i vitamina D na uređaju Roche Cobas i801 (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, Mannheim). Serumske razine testosterona su mjerene u 3 vremenske točke (prvog, sedmog i četrnaestog dana hospitalizacije), dok smo vrijednosti vitamina D mjerili samo prvog dana hospitalizacije.

Serumske razine TWEAK-a (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, SAD) određene su korištenjem komercijalno dostupnog ELISA kompleta. Uzorci seruma za analizu koji su bili pohranjeni na  $-80\text{ C}^{\circ}$  na dan analize su otopljeni na sobnoj temperaturi. Minimalna izmjerena razina TWEAK-a je bila  $62,5\text{ pg/mL}$  (koeficijent varijabilnosti unutar testa i među testovima bili su  $<10\%$ , odnosno  $<15\%$ ).

### **3.4. Statistička analiza podataka**

Veličina uzorka izračunali smo primjenom statističkog programa MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgium, version 17.4.1) na temelju pilot studije od 5 preživjelih bolesnika i 5 bolesnika koji su preminuli za vrijeme boravka u bolnici. Prosječna koncentracija TWEAK-a u serumu bila je  $130,2 \pm 82,4\text{ pg/mL}$  u preživjelih i u preminulih  $261,7 \pm 86,3\text{ pg/mL}$ . Na temelju definirane pogreške tipa I od 0,05, i snage istraživanja od 90%, izračunato je da je potrebno uključiti barem 10 ispitanika po skupini. Podaci su analizirani pomoću softvera MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgija, verzija 17.4.1) i Prism 6 za Windows® (verzija 6.01, GraphPad, La Jolla, CA, SAD). Kategorijski podaci prikazani su

kao apsolutni brojevi (N) i postoci (%), dok su kontinuirani podaci prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) ili medijan (interkvartilni raspon). Normalnost podataka procijenjena je Kolmogorov–Smirnovljevim testom. Za analizu kategorijskih varijabli korišten je hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test ili Fisherov egzaktni test. Osnovni podaci između glavnih ispitanih skupina (pacijenti koji su preživjeli do otpusta u odnosu na pacijente koji su umrli tijekom boravka u bolnici) uspoređeni su ili sa Studentovim t-testom ili Mann-Whitneyjevim U testom, prema potrebi. Nadalje, točnost TWEAK-a u predviđanju bolničke smrtnosti testirana je korištenjem ROC analize s izračunom površine ispod krivulje (AUC). Za usporedbu je li postojala statistički značajna razlika u razinama TWEAK-a u različitim vremenskim točkama od prijema, korišten je Friedmanov test s *post hoc* Conoverovim testom. Konačno, kako bismo ispitali korelaciju između serumskih razina TWEAK-a i razina hs-TnI, CRP-a, Brixia rezultata, SAPS-II rezultata, SOSIC rezultata, Horowitzova indeksa, razina TSH i vitamina D, upotrijebili smo Spearmanovu analizu korelacije rang-reda. U ovoj analizi generirani su r koeficijent korelacije (rho), vrijednosti dvostrane značajnosti (p) i odgovarajući korelacijski grafovi. *P*-vrijednost  $< 0,05$  smatrana je statistički značajnom za sve analize.

## **4. REZULTATI**

U istraživanje je uključeno 66 bolesnika muškog spola s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su hospitalizirani u RIC-u. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine ovisno o ishodu bolesti: skupina bolesnika koji su preživjeli (n=53) i skupina bolesnika koji su preminuli za vrijeme hospitalizacije (n=18). Pronađena je statistički značajna razlika u životnoj dobi između ispitivanih skupina ( $54,2 \pm 7,9$  vs.  $58,9 \pm 6,0$  godina,  $P=0,047$ ). Udio potpuno cijepljenih ispitanika je bio 18% i pušača 7,6% bez značajne razlike između ispitivanih skupina. Prosječna ITM u ispitanika je bio  $28,5 \pm 3,7$ , a najčešći komorbiditet je bila dislipidemija (68%) bez značajne razlike između ispitivanih skupina. U skupini bolesnika koji su preminuli u usporedbi sa skupinom bolesnika koji su preživjeli značajno češće je zastupljena šećerna bolest tipa 2 (15,4 vs. 3,8%,  $P<0,001$ ) i arterijska hipertenzija (38,5 vs. 26,4%,  $P<0,004$ ). Osnovna obilježja ispitanika prikazana su u **Tablici 7**.

**Tablica 7.** Osnovna obilježja ispitanika

Parametri	Preživjeli (n = 53)	Umrli (n = 13)	Ukupno (n = 66)	p *
Dob (godine)	$54,2 \pm 7,9$	$58,9 \pm 6,0$	$55,1 \pm 7,7$	<b>0,047</b>
ITM ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$28,6 \pm 3,9$	$28,2 \pm 2,7$	$28,5 \pm 3,7$	0,771
Potpuno cijepljeni (n, %)	10 (19%)	2 (15%)	12 (18%)	0,772
Pušači (n, %)	4 (7,6%)	1 (7,7%)	5 (7,6%)	0,852
Arterijska hipertenzija (n, %)	14 (26,4%)	5 (38,5%)	19 (28,8%)	<b>0,004</b>
Šećerna bolest (n, %)	2 (3,8%)	2 (15,4%)	4 (6,1%)	<b>&lt;0,001</b>
Dislipidemija (n, %)	33 (63%)	12 (54%)	45 (68%)	0,667
Hipotireoza (n, %)	2 (3,8%)	1 (7,8%)	3 (4,5%)	N/A

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, broj (postotak), hi-kvadrat test ili Studentov t-test. **Kratice:** ITM: indeks tjelesne mase.



Prosječna vrijednosti PaO<sub>2</sub> bile su 5,8±1,0 kPa, PaCO<sub>2</sub> 9,8±2,5 kPa, dok je prosječna vrijednosti SaO<sub>2</sub> iznosila 91,9 % (90,3-96,0). Nije bilo statistički značajne razlike u parametrima acidobaznog statusa između promatranih skupina pri prijemu u RIC (**Tablica 8**).

**Tablica 8.** Usporedba parametara acidobaznog statusa između preživjelih i umrlih bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije

Parametri	Preživjeli (n = 53)	Umrli (n = 13)	Ukupno (n = 66)	p *
SaO <sub>2</sub> (%)	93,0 (90,4-96)	94,0 (86,6-96,0)	91,9 (90,3-96,0)	0,472
pH (units)	7,35 ± 0,07	7,34 ± 0,06	7,35 ± 0,07	0,475
PaO <sub>2</sub> (kPa)	5,8 ± 1,1	6,0 ± 0,7	5,8 ± 1,0	0,507
PaCO <sub>2</sub> (kPa)	9,8 ± 2,6	9,6 ± 2,1	9,8 ± 2,5	0,858
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	25,9 ± 2,4	25,5 ± 2,1	25,8 ± 2,3	0,629

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ±SD, broj (postupak) ili medijan (interkvartilni raspon). \* Mann-Whitneyjev U test, hi-kvadrat test ili Studentov t-test.

**Kratice:** SaO<sub>2</sub>, zasićenje kisikom; PaO<sub>2</sub>, parcijalni tlak kisika u krvi; PaCO<sub>2</sub>, parcijalni tlak ugljičnog dioksida u krvi, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, bikarbonati.

U ukupnoj ispitivanoj populaciji broj neutrofila bio je povećan (88,6±4,2 %) uz snižen broj limfocita (7,2±3,3 %), te s prosječnom vrijednosti NLR-a od 13,0 (11,0-19,0) bez značajne razlike između ispitivanih skupina (**Tablica 9**).

**Tablica 9.** Usporedba laboratorijskih parametara između preživjelih i umrlih bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije

Laboratorijski parametri	Preživjeli (n = 53)	Umrli (n = 13)	Ukupno (n = 66)	p *
Hemoglobin (g/L)	133,9 ± 12,0	131,9 ± 12,3	133,5 ± 12,0	0,591
Trombociti (×10 <sup>9</sup> /L)	264,1 ± 84,6	217,3 ± 87,1	254,9 ± 86,7	0,081
Leukociti (×10 <sup>9</sup> /L)	10,0 ± 3,4	9,1 ± 4,6	9,8 ± 3,6	0,413
Neutrofili (%)	88,9 ± 3,9	87,2 ± 5,0	88,6 ± 4,2	0,161
Limfociti (%)	6,8 ± 2,9	8,7 ± 4,4	7,2 ± 3,3	0,070
Monociti (%)	3,51 ± 1,76	3,69 ± 1,72	3,5 ± 1,7	0,735
Eozinofili (%)	0,37 ± 0,24	0,35 ± 0,22	0,36 ± 0,23	0,832
NLR	13,0 (11,0-19,2)	11,0 (7,5-17,5)	13,0 (11,0-19,0)	0,184

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD, broj (postotak) ili medijan (interkvartilni raspon). \*Mann-Whitneyjev U test, hi-kvadrat test ili Studentov t-test.

**Kratice:** NLR, omjer neurofila i limfocita.

Od upalnih parametara bilježi se povećana vrijednosti CRP-a (86,5±61,7 mmol/L) te vrijednosti PCT 0,12 (0,08-0,19) prvog dana hospitalizacije u RIC-u, bez statistički značajne razlike između ispitivanih skupina. Izmjerena vrijednosti LDH bila je značajno viša u bolesnika koji su preminuli u odnosu na one koji su preživjeli (605,1±225,9 U/L vs. 445,8±221,8,  $P=0,024$ ). Prosječna vrijednosti D-dimera bila je 2,34 mg/L (1,63-4,19 mg/L), a fibrinogena 6,6±1,4 g/L, bez statistički značajne razlike između ispitivanih skupina. Bolesnici koji su preživjeli, imali su statistički značajno nižu vrijednost hs-TnI u odnosu na skupinu bolesnika koji su preminuli (9,1 (5,9-13,7) ng/L vs. 18,2 (9,9-32,8) ng/L,  $P<0,002$ ). Koncentracija vitamina D i albumina su u bile snižene u ukupnoj ispitivanoj populaciji u odnosu na referentne vrijednosti. U skupini bolesnika koji su preživjeli u odnosu na skupinu

bolesnika koji su preminuli izmjerene su statistički značajno više vrijednosti vitamina D ( $40,0 \pm 18,6$  vs.  $27,4 \pm 17,0$  nmol/L,  $P < 0,040$ ) i albumina ( $31,2$  ( $29,2-32,6$ )g/L vs.  $27,7$  ( $35,7-30,8$ ,) g/L,  $P=0,006$ ). Nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina u izmjerenim vrijednostima CRP-a, PCT, D-dimera, fibrinogena, INR, aPTT, glukoze, laktata, ureje i kreatinina, AST, ALT i GGT (**Tablica 10**).

**Tablica 10.** Usporedba laboratorijskih parametara između preživjelih i umrlih bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije

Laboratorijski parametri	Preživjeli (n = 53)	Umrli (n = 13)	Ukupno (n = 66)	p *
CRP (mmol/L)	87,2 ± 66,9	84,9 ± 35,2	86,5 ± 61,7	0,868
PCT (ng/mL)	0,12 (0,08-0,17)	0,17 (0,08-0,33)	0,12 (0,08-0,19)	0,286
D-dimeri (mg/L)	2,17 (1,51-4,01)	3,08 (1,77-6,65)	2,34 (1,63-4,19)	0,305
Fibrinogen (g/L)	6,7 ± 1,3	6,5 ± 1,3	6,6 ± 1,4	0,507
INR	0,96 ± 0,06	0,99 ± 0,11	0,96 ± 0,07	0,199
aPTT (s)	22,2 ± 3,4	22,6 ± 3,2	22,3 ± 3,3	0,647
hs-TnI (ng/L)	9,1 (5,9-13,7)	18,2 (9,9-32,8)	9,9 (6,2-16,3)	<b>0,002</b>
Glukoza (mmol/L)	9,5 ± 2,6	10,8 ± 5,2	9,8 ± 3,3	0,206
Laktati (mmol/L)	1,5 (1,1-2,0)	1,4 (1,08-1,55)	1,5 (1,1-2,0)	0,235
Urea (mmol/L)	7,9 ± 2,1	8,8 ± 4,4	8,1 ± 2,7	0,289
Kreatinin (mmol/L)	75,6 ± 15,4	84,2 ± 28,4	77,3 ± 18,7	0,142
AST (U/L)	52 (32,0-80,2)	56 (44,7-113,2)	52 (33-84)	0,168
ALT (U/L)	51 (31,6-76,0)	35 (27,2-75,5)	47 (31-75)	0,265
GGT (U/L)	67 (42,5-101,7)	65,0 (23,0-116,7)	67 (40-104)	0,589
LDH (U/L)	445,8 ± 221,8	605,1±225,9	477,2±222,9	<b>0,024</b>
Albumini (g/L)	31,2 (29,2-32,6)	27,7 (25,7-30,8)	30,5 (28,4-32,4)	<b>0,006</b>
Vitamin D	40,0 ± 18,6	27,4 ± 17,0	37,7 ± 18,8	<b>0,040</b>
TSH (mIU/L)	0,34 (0,19-0,64)	0,25 (0,17-0,62)	0,33 (0,18-0,63)	0,699

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD, broj (postotak) ili medijan (interkvartilni raspon). \*Mann-Whitneyjev U test, hi-kvadrat test ili Studentov t-test.

**Kratice:** CRP, C-reaktivni protein; LDH, laktat dehidrogenaza; hs-TnI, visokosenzitivni srčani troponin I; INR, protrombinsko vrijeme; aPTT, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; AST, aspartat aminotransferaza; ALT, alanin aminotransferaza; GGT, gama glutamil transferaza; PCT, prokalcitonin; LDH, laktat dehidrogenaza; TSH, tiroidni stimulirajući hormon.

Dinamika laboratorijskih parametara je pokazala značajno niže vrijednosti 14. dana hospitalizacije u odnosu na 1. dan hospitalizacije u vrijednostima CRP-a ( $P=0,004$ ), NLR ( $P<0,001$ ) i LDH ( $P<0,001$ ). Vrijednost hs-TnI je značajno veća 14. dan u odnosu na 1. dan hospitalizacije ( $P<0,001$ ) (**Tablica 11**).

**Tablica 11.** Dinamika laboratorijskih parametara tijekom hospitalizacije

Parametri	1. dan hospitalizacije	7. dan hospitalizacije	14. dan hospitalizacije	$P^*$
CRP (mmol/L)	65,9 (48,1-109,3)	46,6 (24,5-100,8)	25,9 (7,9-90,3)	<b>0,004</b>
NLR	13,0 (10,2-16,0)	10,0 (8,0-13,7)	6,0 (5,0-10,0)	<b>&lt;0,001</b>
hs-TnI (ng/L)	10,6 (7,8-16,9)	10,9 (8,1-15,2)	14,6 (11,7-22,7)	<b>&lt;0,001</b>
LDH (U/L)	441 (346-575)	332 (285-373)	244 (203-297)	<b>&lt;0,001</b>

Podaci su izraženi kao medijan (interkvartilni raspon). \*Friedman test.

**Kratice:** CRP, C-reaktivni protein; LDH, laktat dehidrogenaza; hs-TnI, visokosenzitivnog srčanog troponina I; NLR, omjer neurofila i limfocita.

Prosječna serumska razina testosterona u bolesnika prvog dana hospitalizacije u RIC-u je bila 0,77 (0,44-1,49) nmol/L što je niže od preporučenih referentnih vrijednosti (6,68-25,70 nmol/L), ali bez značajne razlike između ispitivanih skupina ( $P=0,732$ ) (**Tablica 12**).

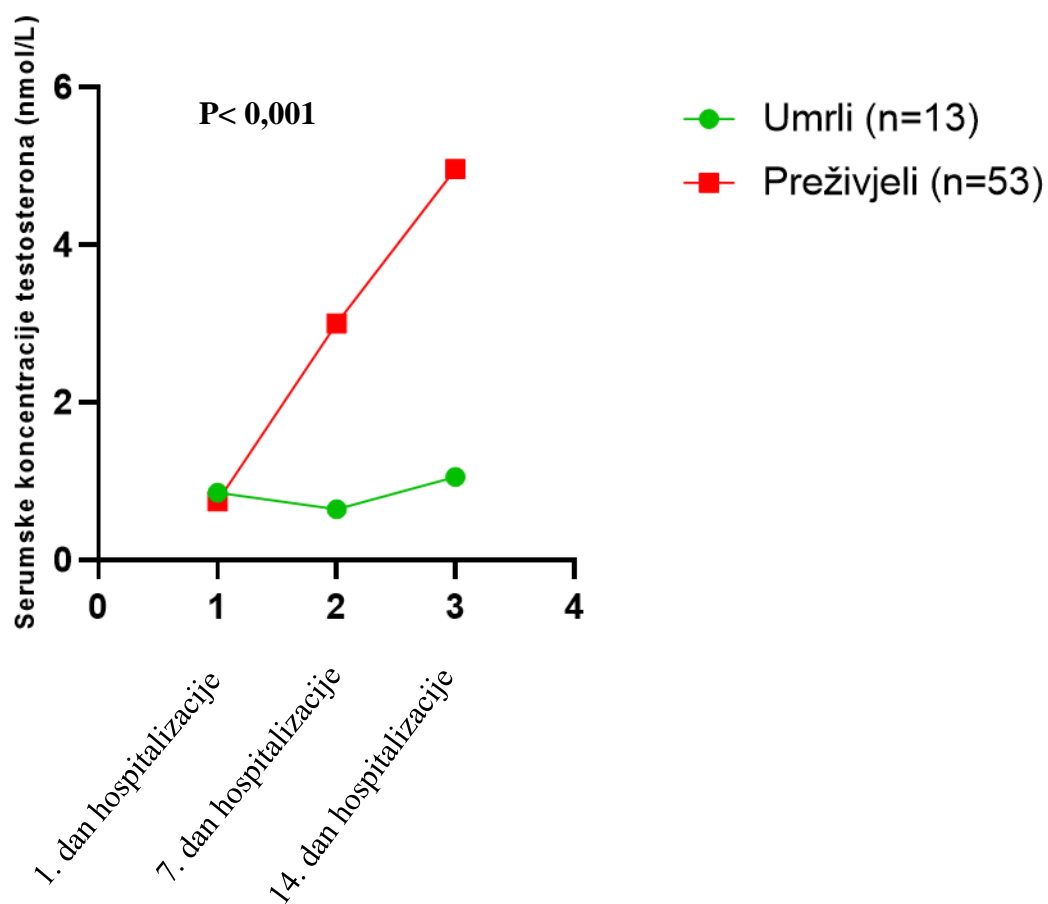
**Tablica 12.** Usporedba serumske razine testosterona između preživjelih i umrlih bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije

Parametri	Preživjeli (n = 53)	Umrli (n = 13)	Ukupno (n = 66)	p *
Testosteron (nmol/L)	0,74 (0,44–1,49)	0,85 (0,60–1,50)	0,77 (0,44–1,49)	0,723

Podaci su izraženi kao medijan (interkvartilni raspon).

\*Mann-Whitneyjev U test.

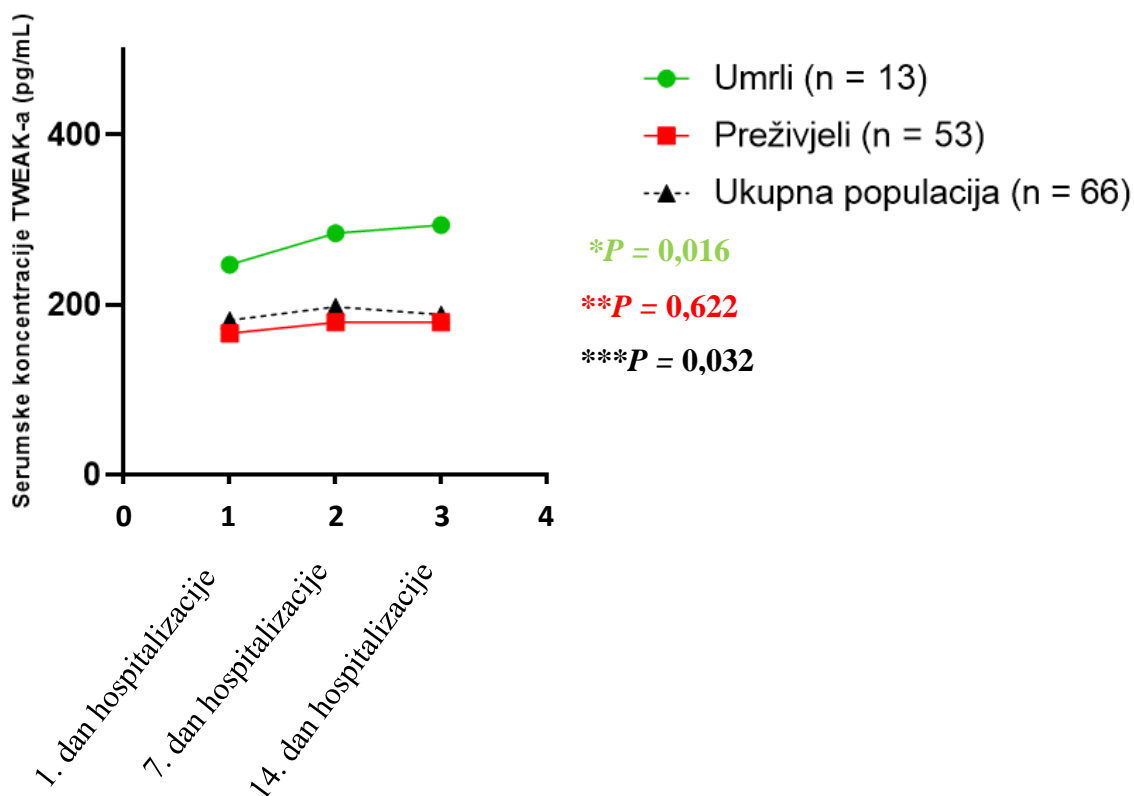
Značajno veće serumska razina testosterona bilježe se 14. dana hospitalizacije u bolesnika koji su preživjeli u usporedbi s bolesnicima koji su preminuli (4,96 (2,7-9,20) nmol/L vs. 1,05 (0,60-1,20) nmol/L, P <0,001) (Slika 3).



**Slika 3.** Dinamika serumske razine testosterona tijekom hospitalizacije.

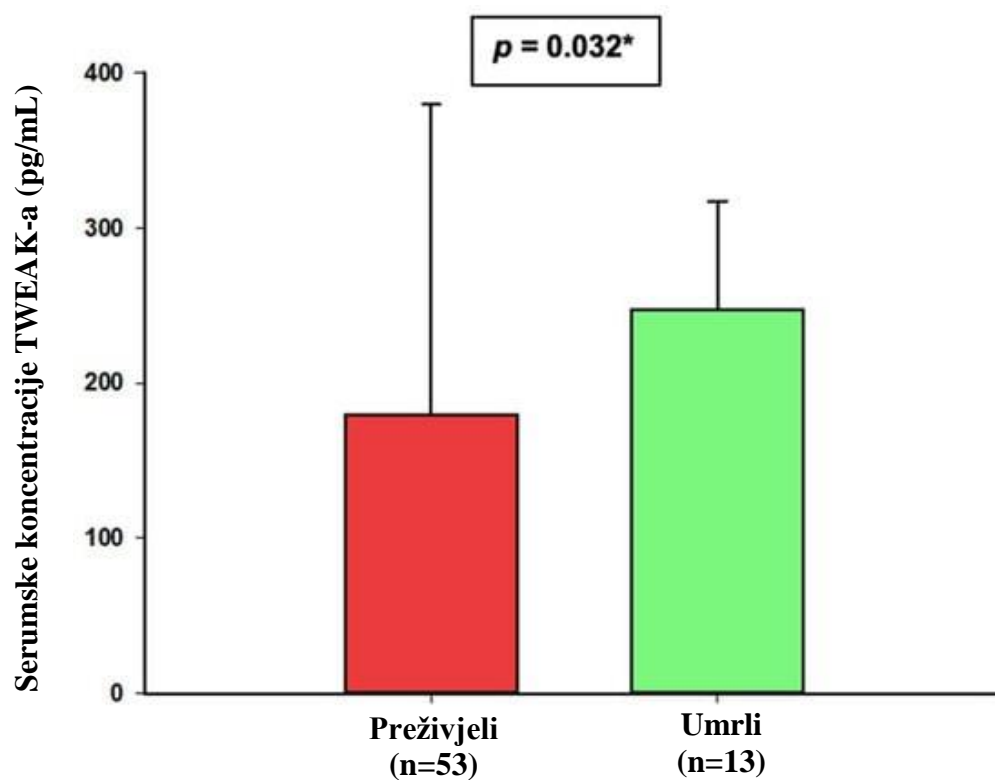
\*Friedman test s *post hoc* Connoverovim testom.

U ukupnoj ispitivanoj populaciji bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije, serumske razine TWEAK-a su značajno više 7. dana hospitalizacije, a potom se bilježi pad 14. dana hospitalizacije, ali još uvijek značajno je veća prosječna vrijednosti u odnosu na vrijednosti 1. dana hospitalizacije (181,85 (95,90-348,17) pg/mL vs. 197,77 (136,03-471,52) pg/mL vs. 188,55 (139,71-377,51) pg/mL,  $P=0,032$ ). U skupini bolesnika koji su preminuli, dinamika razine TWEAK-a u serumu je pokazala značajno veće koncentracije 7. i 14. dana hospitalizacije (247,2 (89,7-326,8) pg/mL vs. 284,20 (157,64-582,86) pg/mL vs. 293,80 (188,55-640,51) pg/mL,  $P=0,016$ ). U skupini bolesnika koji su preživjeli nije bilo statistički značajne dinamike porasta serumske razine TWEAK-a ( $P=0,622$ ) (Slika 4).



**Slika 4.** Dinamika serumske razine TWEAK-a tijekom hospitalizacije  
 \*Friedman test s post hoc Connoverovim testom.

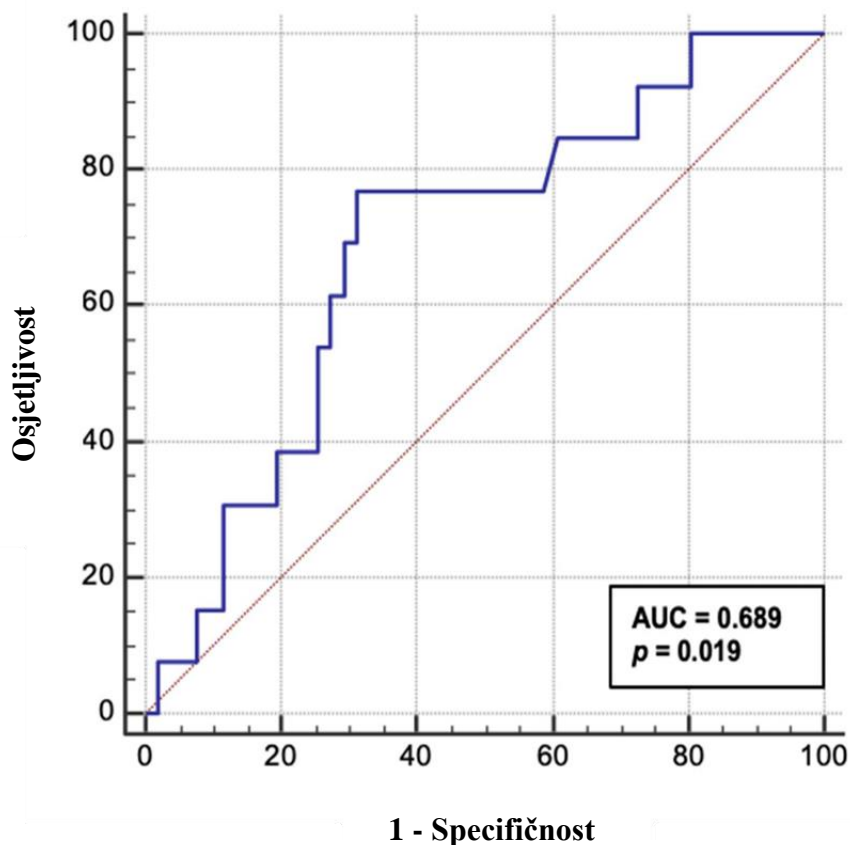
Serumske razine TWEAK-a prvog dana hospitalizacije bile su značajno niže u skupini bolesnika koji su preživjeli u usporedbi sa skupinom bolesnika koji su preminuli (179,3 (86,6-375,5) pg/mL vs. 247,2 (89,7-326,8) pg/mL,  $P= 0,037$ ) (**Slika 5**).



**Slika 5.** Usporedba serumske razine TWEAK-a između preživjelih i umrlih bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije. Podatci su prikazani kao medijan i 75 percentil.  
\* Mann-Whitneyjev U test.



Serumska razina TWEAK-a na dan prijemu u RIC statistički se pokazala kao signifikantni prediktor smrtnosti u bolnici (AUC=0,689,  $P=0,019$ ) (Slika 6).



**Slika 6.** Prediktivna vrijednosti TWEAK-a za intrahospitalnu smrtnost. Receiver-operator characteristics (ROC). **Kratice:** AUC, površina ispod krivulje.

Statističkom obradom nije uočena razlika između ispitivanih skupina u duljini trajanja SARS-CoV-2 infekcije prije hospitalizacije, duljini trajanja SARS-CoV-2 infekcije pri prijemu u RIC te duljini trajanja hospitalizacije. U skupini bolesnika koji su preminuli statistički značajno je veći broj dana hospitalizacija u RIC-u ( $11,5 \pm 6,7$  vs.  $20,3 \pm 8,5$  dan) i broj dana na mehaničkoj ventilaciji ( $7,0 \pm 4,8$  vs.  $19,2 \pm 8,6$  dana) ( $P < 0,001$ ). Prisutnost bolničkih infekcija bila je značajno veća u skupini bolesnika koji su preminuli u odnosu na skupinu bolesnika koji su preživjeli ( $P < 0,001$ ) (Tablica 13).

**Tablica 13.** Usporedba obilježja teškog oblika SARS-CoV-2 infekcije između preživjelih i umrlih bolesnika

Parametri	Preživjeli (n = 53)	Umrli (n = 13)	Ukupno (n = 66)	p *
Trajanje bolesti pri prijemu u bolnicu (dana)	9,0 ± 2,6	8,6 ± 3,4	8,9 ± 2,8	0,690
Trajanje bolesti pri prijemu u JIL (dana)	11,1 ± 3,2	10,5 ± 5,3	11,0 ± 3,7	0,607
Trajanje hospitalizacije (dana)	16 (14–20)	23 (15–35)	17 (14–23)	0,199
Duljina boravka u JIL-u (dana)	11,5 ± 6,7	20,3 ± 8,5	13,2 ± 7,9	<b>&lt;0,001</b>
Trajanje mehaničke ventilacije (dana)	7,0 ± 4,8	19,2 ± 8,6	9,4 ± 7,5	<b>&lt;0,001</b>
Bolničke infekcije (n, %)	18 (34%)	10 (77%)	28 (42%)	<b>&lt;0,001</b>

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD, broj (postotak) ili medijan (interkvartilni raspon). \* Mann-Whitneyjev U test, hi-kvadrat test ili Studentov t-test.

Horowitzov indeks je u ukupnoj populaciji ispitanika bio snižen s prosječnom vrijednosti od 89,7±29,7, no bez statistički značajne razlike između ispitivanih skupina ( $P=0,499$ ). Prosječni rezultat SAPS II bodovna ljestvice je iznosio 29 (27–34), bez statistički značajne razlike između ispitivanih skupina ( $P=0,168$ ). Nadalje, vjerojatnost 90-dnevnog preživljenja procijenjenog bodovnom ljestvicama SOSIC 1., 7. i 14. dana hospitalizacije u RIC pokazala je značajno bolji rezultati u skupini bolesnika koji su preživjeli u odnosu na skupinu koja je preminula ( $P=0,013$ ,  $P<0,001$  i  $P<0,001$ ). Zbroj Brixia bodovne ljestvice bio je veći u skupini bolesnika koji su preminuli u odnosu na skupinu bolesnika koji su preživjeli (11,5±3,8 vs. 14,9±2,7,  $P=0,004$ ) (**Tablica 14**).

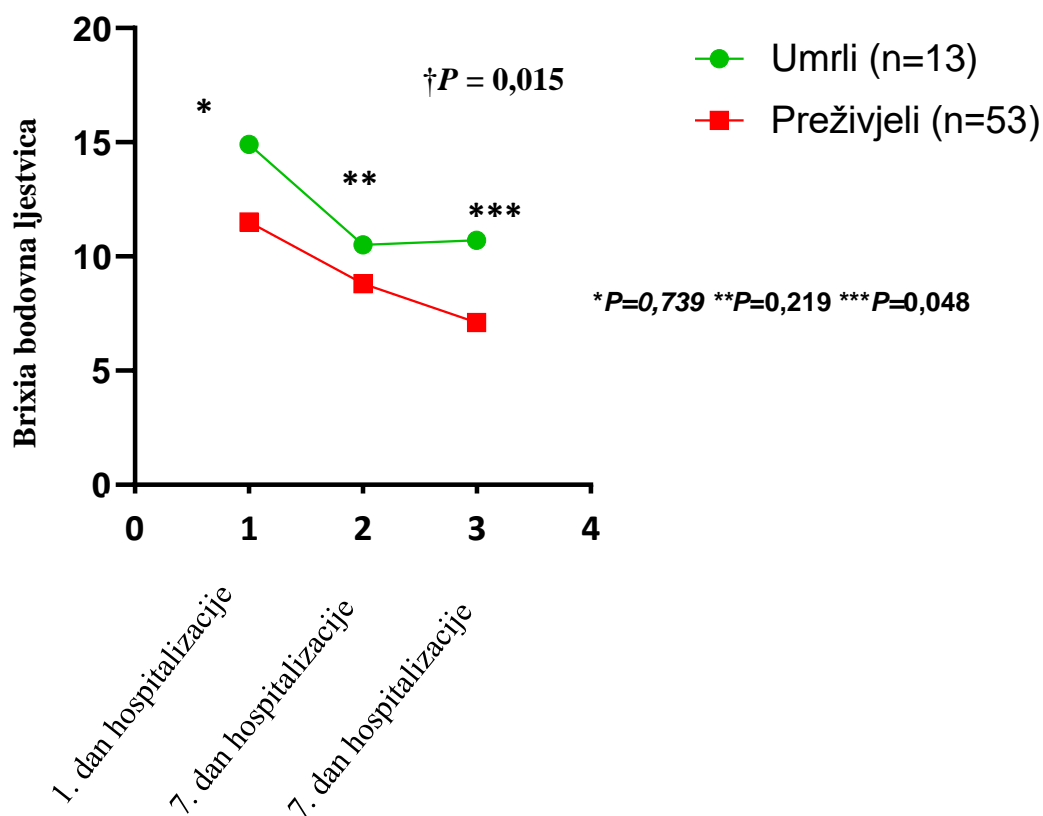
**Tablica 14.** Usporedba bodovnih ljestvica teškog oblika SARS-CoV-2 infekcije između preživjelih i umrlih bolesnika

Parametri	Preživjeli (n = 53)	Umrli (n = 13)	Ukupno (n = 66)	p
Horowitz indeks	91,1 ± 30,9	84,1 ± 24,9	89,7 ± 29,7	0,449 †
SAPS II	29 (27–32,5)	32 (29–34)	29 (27–34)	0,168 *
SOSIC-1	27,6 (21,1–36,0)	35,4 (31,7–41,9)	30,3 (22,9–36,4)	<b>0,013</b> *
SOSIC-7	6,4 (3,2–25,8)	38,5 (31,1–43,4)	12,9 (3,9–33,1)	<b>&lt;0,001</b> *
SOSIC-14	4,4 (2,0–11,9)	48,9 (46,0–55,4)	27,6 (2,8–48,0)	<b>&lt;0,001</b> *
Brixia bodovna ljestvica	11,5 ± 3,8	14,9 ± 2,7	12,2 ± 3,9	<b>0,004</b> †

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ±SD, broj (postotak) ili medijan (interkvartilni raspon). \*Mann-Whitneyjev U test, hi-kvadrat test ili †Studentov t-test.

**Kratice:** SAPS II, (engl. *Simplified Acute Physiology Score*); SOSIC, (engl. *Survival of Severely Ill COVID*).

U bolesnika koji su preživjeli, dinamika vrijednosti zbira za ozljedu plućnog parenhima procijenjenog Brixia bodovnom ljestvicom je značajno veća u odnosu na skupinu bolesnika koja je preminula ( $P=0,015$ ) (Slika 7).



**Slika 7.** Rezultati Brixia bodovne ljestvice tijekom hospitalizacije u ispitivanih skupina  
 Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD  
 \*Studentov t-test, †Repeated Measure ANOVA

Pronađena je značajna pozitivna korelacija između serumske razine TWEAK-a mjerenih prvog dana hospitalizacije i razine CRP-a ( $r = 0,410$ ,  $P=0,002$ ) i hs-TnI ( $r = 0,463$ ,  $P=0,001$ ). Nadalje, pronađena je statistički slaba negativna povezanost serumske razine TWEAK-a i testosterona mjerenih prvog dana prijema u RIC-u ( $r = -0,310$ ,  $P=0,036$ ). Nije utvrđena statistički značajna povezanost prosječnih serumskih razina TWEAK-a s rezultatima bodovnih ljestvica: SAPS II ( $r= 0,233$ ,  $P=0,064$ ), SOSIC-1. dan ( $r = -0,072$ ,  $P = 0,574$ ), SOSIC-7. dan ( $r = 0,115$ ,  $P=0,387$ ) i SOSIC-14.dan ( $r = 0,440$ ,  $P=0,054$ ) kao i Horowitzovog indeksa ( $r = -0,122$ ,  $P=0,335$ ), serumske razine TSH ( $r = -0,125$ ,  $P=0,326$ ), te serumske razine vitamina D ( $r = -0,012$ ,  $P=0,928$ ) (**Tablica 15**).

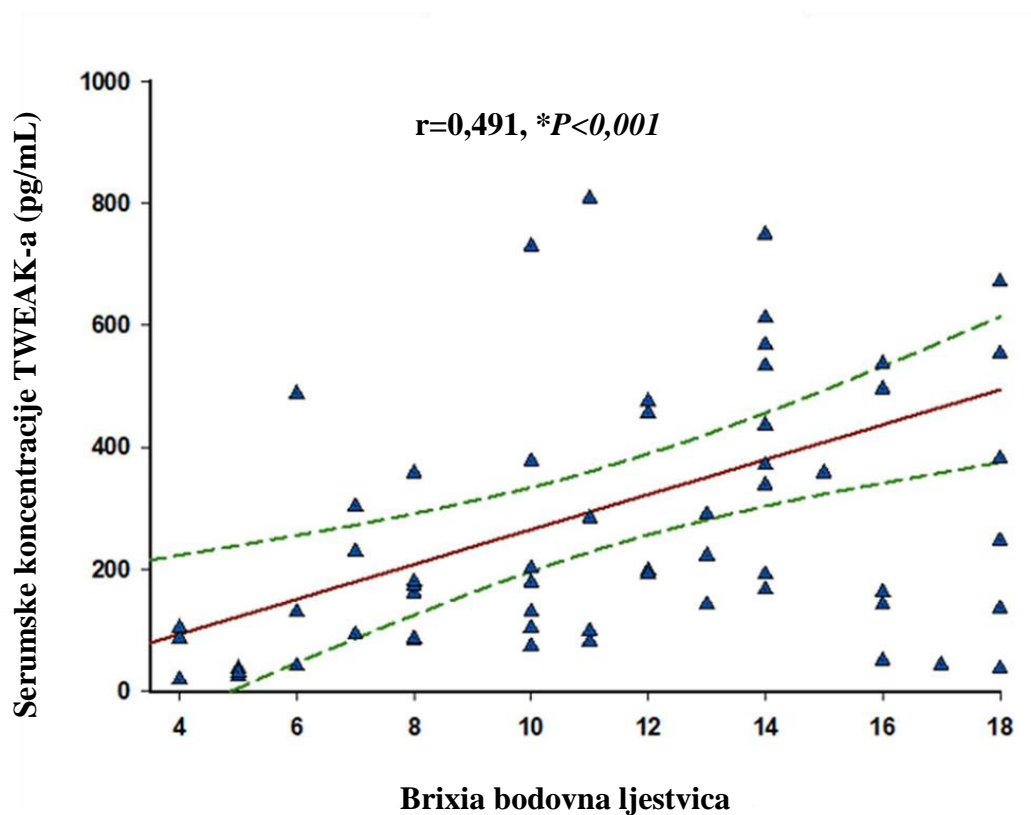
**Tablica 15.** Korelacija između serumske razine TWEAK-a i varijabli od interesa

Parametri	r *	p
CRP (mmol/L)	0,410	<b>0,002</b>
hs-TnI (ng/L)	0,463	<b>0,001</b>
Horowitz indeks	-0,122	0,335
SAPS II	0,233	0,064
SOSIC-1	-0,072	0,574
SOSIC-7	0,115	0,387
SOSIC-14	0,440	0,054
Testosteron (nmol/L)	-0,310	<b>0,036</b>
TSH (mIU/L)	-0,125	0,326
Vitamin D (nmol/L)	-0,012	0,928

\*Spermanov koeficijent korelacije.

**Kratice:** SAPS II, (engl. *Simplified Acute Physiology Score*); SOSIC, (engl. *Survival of Severely Ill COVID*); TSH, tiroidni stimulirajući hormon; CRP, C-reaktivni protein; hs-TnI, visokosenzitivnog srčanog troponina I.

Utvrđena je značajna pozitivna povezanost između serumske razine TWEAK-a i prosječnog zbira Brixia bodovne ljestvice ( $r=0,491$ ,  $P<0,001$ ) (Slika 8).



**Slika 8.** Korelacija između zbira Brixia bodovne ljestvice i razine TWEAK-a u serumu. Crvena linija predstavlja liniju korelacije, isprekidane zelene linije predstavljaju 95% interval pouzdanosti, a plavi trokuti predstavljaju pojedinačne vrijednosti ispitanika. \*Spermanov koeficijent korelacije

## **5. RASPRAVA**

Glavni cilj istraživanja bio je usporediti serumske razine TWEAK-a u skupini bolesnika koji su preživjeli teški oblik SARS-CoV-2 infekcije u odnosu na skupinu bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su preminuli. Pokazalo se da su serumske razine TWEAK-a prvog dana hospitalizacije u RIC-u bile niže u podskupini bolesnika koji su preživjeli u usporedbi s bolesnicima koji su preminuli za vrijeme hospitalizacije. Nadalje, pokazalo se da je serumska razina TWEAK-a na dan prijema u RIC signifikantni prediktor smrtnosti od teškog oblika SARS-CoV-2 infekcije. Rezultati ovog istraživanja po prvi put su potvrdili potencijalnu ulogu citokina TWEAK-a u bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije, te pozitivnu povezanost razine TWEAK-a sa smrtnošću bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije. Naime, aktivacija TWEAK/Fn14 osovine jedna je od pokretača signalnog puta NF- $\kappa$ B i pojačanog upalnog odgovora u bolesnika s teškom oblikom SARS-CoV-2 infekcije. Naime, SARS-CoV-2 ulaskom u stanicu dovodi do aktivacije mnogih signalnih puteva, a posljedično tome stimulira se pojačana sinteza proupalnih citokina i kemokina te pojačana migracija upalnih stanica koja dodatno proizvodi proupalne čimbenike s posljedičnim razvojem citokinske oluje (26). U ovom istraživanju serumske razine TWEAK-a prvog dana hospitalizacije u RIC-u bile su niže u bolesnika koji su preživjeli u usporedbi s bolesnicima koji su preminuli, što upućuje da je upalni odgovor u bolesnika koji su preživjeli bio manji. Praćenjem dinamike serumske razine TWEAK-a, u ovom istraživanju, uočeno je da su u podskupini bolesnika koji su preminuli, razine TWEAK-a u serumu porasle u prvih 7 dana, ali vrijednosti nisu padale u sljedećem tjednu hospitalizacije, dok su serumske razine TWEAK-a pale na početne vrijednosti u skupini bolesnika koji su preživjeli. Sukladno tome, u studiji Kergerta i suradnika statistički se prati dinamika porasta serumske razine IL-6 petog dana hospitalizacije u bolesnika koji su razvili ARDS u usporedbi s bolesnicima koji nisu razvili teži upalni odgovor (86).



Do sada je provedena samo jedna studija koja je ispitala ulogu TWEAK-a u bolesnika s SARS-CoV-2 infekcijom (85). U studiji se bilježe povišene serumske razine TWEAK-a u bolesnika s SARS-CoV-2 infekcijom u odnosu na kontrolnu skupinu, te značajno veću razinu TWEAK-a u skupini bolesnika koji su imali RTG opisane promjene na plućima, u odnosu na skupinu bolesnika koja nije imala RTG opisane promjene (85). U našem istraživanju pokazano je da serumske razine TWEAK-a statistički značajno i pozitivno koreliraju s rezultatima Brixia bodovnom ljestvicom. Također je utvrđeno da je skupina bolesnika koji su preživjeli imala značajno manji zbroj Brixia bodovne ljestvice izmjeren 14. dana hospitalizacije u odnosu na skupinu bolesnika koja je preminula. Nadalje, rezultati su potvrdili da su serumske razine TWEAK-a statistički značajno i pozitivno korelirale sa serumskim razinama CRP-a i hs-TnI.

U ovom istraživanju skupina bolesnika koji su preminuli u usporedbi sa skupinom koja je preživjela bila je značajno starije životne dobi i značajno većim udjelom komorbiditeta (šećerna bolest tipa 2 i arterijska hipertenzija). Ovi rezultati su komplementarni s dosadašnjim istraživanjima koja su potvrdila kao važne rizične čimbenike za razvoj teškog oblika SARS-CoV-2 infekcije su: starija životna dob, muški spol, arterijska hipertenzija, šećerna bolest tipa 2 i pretilost (8,17,119). Arterijska hipertenzija je u ovom istraživanju prisutna u 28,8% bolesnika što se podudara s prevalencijom arterijske hipertenzije u bolesnika s SARS-CoV-2 infekcijom i u drugim studijama. U studijama provedenim u Kini arterijska hipertenzija je zabilježena u 27-30% bolesnika, dok je u velikoj studiji koja je promatrala više od 12.500 ljudi u New Yorku postotak bolesnika s arterijskom hipertenzijom bio 34,6% (120,121). Prosječna dob bolesnika, u ovom istraživanju bila je  $55,1 \pm 7,7$  godina uz značajno stariju životnu dob bolesnika koji su preminuli. Meta analiza s više od pola milijuna pacijenata s SARS-CoV-2 infekcijom iz različitih zemalja naglašava odlučujući učinak dobi na smrtnost s relevantnim pragovima za dob  $>50$  godina, a posebno u bolesnika

>60 godina starosti (122). Prosječna ITM bolesnika u ovom istraživanju je bio  $28,5 \pm 3,7$  kg/m<sup>2</sup>. Veliko istraživanje provedeno u Ujedinjenom Kraljevstvu na više od 6 milijuna ispitanika pokazalo je da ITM veći od 23 kg/m<sup>2</sup> povećava rizik od hospitalizacije u JIL i smrti kod oboljelih od COVID-19 (123). U našem istraživanju u skupini bolesnika koji su preminuli u odnosu na skupinu bolesnika koji su preživjeli bio je značajno veći udio šećerne bolesti tipa 2. To je u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja su potvrdila da šećerna bolest tipa 2 povećava rizik za razvoj teškog oblika bolesti i smrti (124). Studija iz Kine, koja je retrospektivno analizirala 7337 bolesnika s COVID-19, među kojima su 952 osobe imale šećernu bolest tipa 2, izvijestila je o povezanosti šećerne bolesti tipa 2 s povećanom stopom smrtnosti (125). Meta analiza koja je uključivala 30 studija s ukupno 6452 bolesnika navodi da je šećerna bolest tipa 2 udružena s povećanim kompozitnim ishodom koji uključuje: smrt, teški oblik SARS-CoV-2 infekcije, ARDS, hospitalizaciju u JIL-u te progresiju bolesti (126). Naime, niz studija je pokazalo da šećerna bolest povećava ekspresiju ACE2 na epitelnim stanicama pluća i povećava upalni citokinski odgovor što povećava rizik za razvoj ARDS-a i smrtnog ishoda u COVID-19 (125).

Statistički se u ovom istraživanju bilježe veće serumske razine hs-TnI i LDH u bolesnika koji su preminuli, što govori u prilog višeorganskog oštećenja u bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije. U skupini bolesnika koji su preminuli nađena je značajno manja serumska razina vitamina D što je sukladno dosadašnjim istraživanjima koja su potvrdila povezanost nedostatka vitamina D i povećanog rizika razvoja težeg oblika SARS-CoV-2 infekcije (39,40).

Prosječna serumska razina testosterona prvog dana hospitalizacije u RIC-u bila je niža od referentnih vrijednosti i negativno je korelirala sa serumskom razinom TWEAK-a. Utjecaj testosterona na tijek SARS-CoV-2 infekcije ostaje nedovoljno razjašnjen aspekt u patofiziologiji COVID-19. Dosadašnja istraživanja su pokazala da muški spol predstavlja

čimbenik rizika za razvoj težeg oblika SARS-CoV-2 infekcije i smrtnosti (30). S jedne strane, testosteron potiče ulazak virusa u stanice domaćina jer povećava ekspresiju TMPRSS2 i posljedičnu aktivaciju ACE2 receptora, no s druge strane testosteron smanjuje sistemski upalni odgovor, razinu proupalnih citokina, oksidativni stres i endotelnu disfunkciju (101,102,103). Istraživanja su pokazala da smanjene razine testosterona u sklopu teškog oblika COVID-19 mogu biti posljedice direktnog virusnog oštećenja stanica testisa u kojima su prisutni ACE2 receptori, pojačane aktivnosti Ang II ili pak u sklopu oštećene hipotalamus-hipofiza-gonade osovine (110). Rezultati našeg istraživanja sukladni su rezultatima dosadašnjih istraživanja koja su pokazala da niska razina ukupnog testosterona u muškaraca pri hospitalizaciji zbog teškog oblika SARS-CoV-2 infekcije negativno korelira s ishodima bolesti (115,116). Smanjenje upalnog odgovora u ovom istraživanju prati se statistički značajno većom prosječnom serumskom razinom testosterona 14. dana hospitalizacije u bolesnika koji su preživjeli u odnosu na one koji su preminuli. To se podudara s dosadašnjim istraživanjima koja navode da je porast razine testosterona u fazi oporavka udružen sa smanjenjem upalnog odgovora (114).

Kao u dosadašnjim istraživanjima provedenim kod bolesnika s COVID-19 liječenih u JIL-u (58), i u ovom istraživanju nije pokazana statistička razlika između ispitivanih skupina u SAPS II bodovnoj ljestvici. Nije utvrđena statistički značajna povezanost serumskih razina TWEAK-a sa SOSIC-1, SOSIC-7 i SOSIC-14 bodovnim ljestvicama, ali se pokazala statistički značajna razlika između ispitivanih skupina s obzirom na preživljenje u SOSIC bodovnoj ljestvici mjerene u sve tri točke, što se podudara sa dosadašnjim istraživanjima (59,60).

Dobivenim rezultatima istraživanja pokušali smo doprinijeti boljem razumijevanju povezanosti upalnog odgovora prvenstveno uloge TWEAK-a u kliničkom tijeku i ishodima u bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije. Uz to, ovom smo disertacijom nastojali

doprinijeti novim saznanjima o potencijalnoj uporabi TWEAK-a u dijagnostici, prognozi i liječenju teških oblika SARS-CoV-2 infekcije.

Ova studija ima nekoliko ograničenja. Iako su veličine uzorka u ispitivanim skupinama bile dovoljno velike da prikažu statističku značajnost među njima, dodatne studije s većim brojem ispitanika bile bi korisne u smislu doprinosa tumačenju rezultata ovog istraživanja.

Budući da naša studija nije uključivala ispitanike ženskog spola, dobiveni rezultati se ne mogu primijeniti na sve bolesnike s COVID-19. Nadalje, istraživanje nije uključilo podatke o vrijednostima testosterona i TWEAK-a prije hospitalizacije u RIC. Kao dio standardne terapije svi bolesnici su bili liječeni kortikosteroidima, koja može utjecati na alteraciju i dinamiku promjena razine testosterona i TWEAK-a u bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije. Potrebna su daljnja klinička istraživanja na većem broju ispitanika i različitim pristupom u mjerenju TWEAK-a i testosterona, a sa ciljem da se razjasne precizne promjene i kompleksni utjecaj razine TWEAK-a i testosterona u bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Serumske razine TWEAK-a prvog dana hospitalizacije u RIC-u bile su niže u podskupini bolesnika koji su preživjeli u usporedbi s bolesnicima koji su preminuli.
2. U ukupnoj populaciji bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije, serumske razine TWEAK-a porasle su tijekom prvog tjedna, dok je pad na početne vrijednosti primijećen u drugom tjednu nakon prijema u RIC.
3. U podskupini bolesnika koji su preminuli, serumske razine TWEAK-a porasle su u prvih 7. dana, ali nisu pale u sljedećem tjednu.
4. U podskupini bolesnika koji su preživjeli nije bilo statistički značajnije dinamike u serumskim razinama TWEAK-a.
5. Serumska razina TWEAK-a prvog dana hospitalizacije u RIC-u statistički se pokazala kao signifikantni prediktor smrtnosti.
6. Prosječna serumska razina testosterona prvog dana hospitalizacije u RIC-u u ukupnom uzorku ispitanika bila je značajno niža od referentnih vrijednosti, ali bez razlike između ispitivanih skupina.
7. Utvrđena je statistički značajna razlika serumske razine testosterona 14. dana hospitalizacije u bolesnika koji su preživjeli u odnosu na one koji su preminuli.
8. Serumska razina TWEAK-a statistički slabo i negativno korelira s serumskom razinom testosterona mjerenom prvog dana hospitalizacije u RIC-u.
9. Utvrđena je statistički značajna razlika u duljini trajanja hospitalizacije i dana provedenih na mehaničkoj ventilaciji kod skupine bolesnika koji su preminuli.
10. Prisutnost bolničkih infekcija bila je statistički značajno veća u skupini bolesnika koji su preminuli.
11. Serumske razina TWEAK-a statistički značajno i pozitivno korelirale s serumskim razinama CRP-a i hs-TnI.

12. Nije utvrđena statistički značajna povezanost serumskih razina TWEAK-a sa SAPS II bodovnom ljestvicom.
13. Nije utvrđena statistički značajna povezanost serumskih razina TWEAK-a sa SOSIC-1, SOSIC-7 i SOSIC-14 bodovnim ljestvicama, iako se pokazala statistički značajna razlika između ispitivanih skupina s obzirom na preživljenje u SOSIC bodovnoj ljestvici mjerenom u sve tri točke.
14. Utvrđena je statistički razlika između ispitivanih skupina i Brixia bodovne ljestvice mjerene 14. dana hospitalizacije.
15. Serumaska razina TWEAK-a statistički značajno i pozitivno korelira s rezultatima Brixia bodovne ljestvice.

## **7. SAŽETAK**



**Uvod:** Glavni patofiziološki mehanizam teškog oblika SARS-CoV-2 infekcije je poremećaj imunološkog odgovora s razvojem citokinske oluje posredovane lučenjem brojnih proupalnih citokina. Mnoge studije su pokazale da povišene razine proupalnih citokina pozitivno koreliraju s ishodom bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije. Također, istraživanja su pokazala uzajamni utjecaj COVID-19 i poremećaja sinteze testosterona. Dosad nije istražena uloga citokina TWEAK-a (engl. *TNF-like weak inducer of apoptosis*) te njegova povezanost s razinom testosterona i smrtnošću bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije.

**Ciljevi istraživanja:** Glavni cilj istraživanja bio je usporediti serumske razine TWEAK-a u skupini bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su preživjeli u odnosu na skupinu bolesnika koji su preminuli. Sporedni ciljevi istraživanja su bili ispitati povezanost serumske razine TWEAK-a sa serumskom razinom testosterona te rizikom smrtnosti u bolesnika sa teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije.

**Ispitanici i metode:** U istraživanje je uključeno 66 muškaraca u dobi od 18 do 65 godina s dijagnosticiranim teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije koji su hospitalizirani u Respiracijskom intenzivističkom centru (RIC) u razdoblju od prosinca 2021. do svibnja 2022. godine. Serumske razine testosterona i TWEAK-a su mjerene u tri vremenske točke: prvog, sedmog te četrnaestog dana hospitalizacije u RIC-u.

**Rezultati:** Serumske razine TWEAK-a prvog dana hospitalizacije u RIC-u bile su značajno niže u skupini bolesnika koji su preživjeli u usporedbi s bolesnicima koji su preminuli za vrijeme hospitalizacije (179,3 (86,6-375,5) pg/mL vs. 247,2 (89,7-326,8) pg/mL,  $P=0,037$ ). Serumna razina TWEAK-a na dan prijemu u RIC pokazala se kao signifikantni prediktor smrtnosti (AUC=0,689,  $P=0,019$ ) i negativno je korelirala sa serumskom razinom

testosterona ( $r = -0,310$ ,  $P = 0,036$ ). Serumska razina TWEAK-a je značajno i pozitivno korelirala s rezultatima Brixia bodovne ljestvice ( $r = 0,491$ ,  $P < 0,001$ ).

**Zaključci:** Naša studija pokazala je da su serumske razine TWEAK-a u bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije niže u skupini bolesnika koji su preživjeli u usporedbi s bolesnicima koji su preminuli. Serumske razine TWEAK-a na dan prijemu u RIC su se pokazale znakovitim prediktor smrtnosti od teškog oblika SARS-CoV-2 infekcije uz negativnu povezanost sa serumskim razinama testosterona. Dobivenim rezultatima potvrdili smo dokaze o ulozi i povezanosti TWEAK-a i testosterona s kliničkim tijekom i ishodima u bolesnika s teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije.

## **8. SUMMARY**

## **TITLE:**

### **ANALYSIS OF SERUM CONCENTRATION OF TWEAK CYTOKIN AND TESTOSTERONE IN PATIENTS WITH SEVERE FORM OF COVID-19**

**Introduction:** The main pathophysiological mechanism of the severe form of SARS-CoV-2 infection is the disruption of the immune response with the development of a cytokine storm mediated by the secretion of numerous pro-inflammatory cytokines. Many studies have shown that elevated levels of pro-inflammatory cytokines positively correlate with the outcome of patients with a severe form of SARS-CoV-2 infection. Also, research has shown the mutual impact of COVID-19 and testosterone synthesis disorders. The role of the cytokine TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) and its association with testosterone levels and mortality in patients with a severe form of SARS-CoV-2 infection have not yet been investigated.

**Research objectives:** The main aim of the research was to compare the serum levels of TWEAK in the group of patients with a severe form of SARS-CoV-2 infection who survived compared to the group of patients who died. The secondary objectives of the study were to examine the relationship between the serum level of TWEAK and the serum level of testosterone and the risk of mortality in patients with a severe form of SARS-CoV-2 infection.

**Subjects and methods:** 66 men aged 18 to 65 with a diagnosed severe form of SARS-CoV-2 infection who were hospitalized in the Respiratory Intensive Care Center (RIC) between December 2021 and May 2022 were included in the study. Serum levels of testosterone and TWEAK were measured at three time points: the first, seventh and fourteenth days of hospitalization in the RIC.

**Results:** Serum TWEAK levels on the first day of hospitalization in RIC were significantly lower in the group of patients who survived compared to patients who died during hospitalization (179.3 (86.6-375.5) pg/mL vs. 247.2 (89.7-326.8) pg/mL, P=0.037). The serum level of TWEAK on the day of admission to the RIC proved to be a significant predictor of mortality (AUC=0.689, P=0.019) and was negatively correlated with the serum level of testosterone ( $r = -0.310$ , P=0.036). The serum level of TWEAK was significantly and positively correlated with the results of the Brixia score scale ( $r = 0.491$ , P<0.001).

**Conclusions:** Our study showed that serum levels of TWEAK in patients with severe SARS-CoV-2 infection were lower in the group of patients who survived compared to patients who died. Serum levels of TWEAK on the day of admission to the RIC proved to be a significant predictor of mortality from a severe form of SARS-CoV-2 infection with a negative association with serum testosterone levels. With the obtained results, we have confirmed the evidence of the role and association of TWEAK and testosterone with the clinical course and outcomes in patients with a severe form of SARS-CoV-2 infection.

## **9. LITERATURA**

1. Araf Y, Faruqui NA, Anwar S, Hosen MJ. SARS-CoV-2: a new dimension to our understanding of coronaviruses. *Int Microbiol.* 2021;24(1):19-24.
2. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, Liu W, Bi Y, Gao GF. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502.
3. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, i sur. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(20):1967-76.
4. Fabricant J. The Early History of Infectious Bronchitis. *Avian Dis.* 1998;42(4):648–50.
5. Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet.* 1966;1(7428):76-7.
6. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966;121(1):190-3.
7. Tyrrell DA, Almeida JD, Cunningham CH, i sur. Coronaviridae. *Intervirol.* 1975;5(1-2):76-82.
8. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon, Xie ZH, Chan KH, i sur. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet.* 2003;362(9393):1353-8.
9. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, i sur. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med.* 2020;28(2):174-84.
10. Esper F, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J Infect Dis.* 2005;191(4):499 –502.

11. Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med.* 2020;27(2):taaa008.
12. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.* 2020;91(1):157-160.
13. KORONAVIRUS.HR | Hrvatski zavod za javno zdravstvo [Internet]. Dostupno sa: <https://www.koronavirus.hr/preporuke-hzjz/990>
14. Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2018;100:163-188.
15. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, i sur. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507-13.
16. Nishiura H, Mizumoto K, Ejima K, Zhong Y, Cowling B, Omori R. Incubation period as part of the case definition of severe respiratory illness caused by a novel coronavirus. *Euro Surveill.* 2012;17(42):20296.
17. Karagiannidis C, Mostert C, Hentschker C, Voshaar T, Malzahn J, i sur. Case characteristics, resource use, and outcomes of 10 021 patients with COVID-19 admitted to 920 German hospitals: an observational study. *Lancet Respir Med.* 2020;8(9):853-62.
18. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, i sur. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395(10224):565-74.
19. Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, i sur. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(7):765-7.



20. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, i sur. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol*. 2011;85(9):4122-34.
21. Li W, Su YY, Zhi SS, Huang J, Zhuang CL, i sur. Virus shedding dynamics in asymptomatic and mildly symptomatic patients infected with SARS-CoV-2. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(11):1556.e1-.e6.
22. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol*. 2020;215:108427.
23. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(1):3-20.
24. Murakami M, Kamimura D, Hirano T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity*. 2019;50(4):812-31.
25. He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *J Med Virol*. 2020;92(7):719-25.
26. Aimrane A, Laaradia MA, Sereno D, Perrin P, Draoui A, i sur. Insight into COVID-19's epidemiology, pathology, and treatment. *Heliyon*. 2022;8(1):e08799.
27. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342(18):1334-49.
28. Mirmohammadi S, Kianmehr A, Arefi M, Mahrooz A. Biochemical parameters and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in vital organs: COVID-19 outbreak in Iran. *New Microbes New Infect*. 2020;38:100792.
29. Li X, Ma X. Acute respiratory failure in COVID-19: is it “typical” ARDS? *Crit Care*. 2020;24(1):1–5.

30. COVID-19: Diagnosis-UpToDate [Internet]. Dostupno na:  
<https://www.uptodate.com/contents/covid-19-diagnosis>
31. Thabet L, Mhalla S, Naija H, Jaoua MA, Hannachi N, Fki-Berrajah L, Toumi A, Karray-Hakim H. SARS-CoV-2 infection virological diagnosis. *Tunis Med.* 2020;98(4):304-8.
32. Du Z, Zhu F, Guo F, Yang B, Wang T. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *J Med Virol.* 2020;92(10):1735-8.
33. Wang F, Hou H, Luo Y, Tang G, Wu S, Huang M, i sur. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. *JCI Insight.* 2020;5(10):e137799.
34. Liu F, Li L, Xu M, Wu J, Luo D, Zhu Y, Li B, Song X, Zhou X. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J Clin Virol.* 2020;127:104370.
35. Yu B, Li X, Chen J, Ouyang M, Zhang H, i sur. Evaluation of variation in D-dimer levels among COVID-19 and bacterial pneumonia: a retrospective analysis. *J Thromb Thrombolysis.* 2020;50(3):548-57.
36. Laouan Brem F, Chaymae M, Rasras H, Merbouh M, Bouazzaoui MA, i sur. Acute Myocardial Injury Assessed by High-Sensitive Cardiac Troponin Predicting Severe Outcomes and Death in Hospitalized Patients with COVID-19 Infection. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2022;28:10760296221090227.
37. Velavan TP, Meyer CG. Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers. *Int J Infect Dis.* 2020;95:304-7.
38. Lippi G, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F. Cardiac troponin I in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence from a meta-analysis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2020;63(3):390-1.

39. Notz Q, Herrmann J, Schlesinger T, Kranke P, Sitter M, Helmer P, i sur. Vitamin D deficiency in critically ill COVID-19 ARDS patients. *Clin Nutr.* 2022;41(12):3089-95.
40. Zaidan J., Wang X. High-dose vitamin D3 for critically ill vitamin D-deficient patients. *N Engl J Med.* 2020;382(17):1669.
41. Henry BM, Aggarwal G, Wong J, Benoit S, Vikse J, Plebani M, Lippi G. Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis. *Am J Emerg Med.* 2020;38(9):1722-6.
42. Feng G, Zheng KI, Yan QQ, Rios RS, Targher G, et al. COVID-19 and Liver Dysfunction: Current Insights and Emergent Therapeutic Strategies. *J Clin Transl Hepatol.* 2020;8(1):18-24.
43. Cheng Y, Luo R, Wang K, Zhang M, Wang Z, Dong L, i sur. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int.* 2020;97(5):829-38.
44. Cozzi D, Albanesi M, Cavigli E, Moroni C, Bindi A, i sur. Chest X-ray in new Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) infection: findings and correlation with clinical outcome. *Radiol Med.* 2020;125(8):730-7.
45. Litmanovich DE, Chung M, Kirkbride RR, Kicska G, Kanne JP. Review of Chest Radiograph Findings of COVID-19 Pneumonia and Suggested Reporting Language. *J Thorac Imaging.* 2020;35(6):354-60.
46. Hanley M, Brosnan C, O'Neill D, Ni Mhuirheartaigh N, Logan M, i sur. Modified Brixia chest X-ray severity scoring system and correlation with intubation, non-invasive ventilation and death in a hospitalised COVID-19 cohort. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2022;66(6):761-7.

47. Balbi M, Caroli A, Corsi A, Milanese G, Surace A, Di Marco F, i sur. Chest X-ray for predicting mortality and the need for ventilatory support in COVID-19 patients presenting to the emergency department. *Eur Radiol.* 2021;31(4):1999–2012.
48. Maroldi R, Rondi P, Agazzi GM, Ravanelli M, Borghesi A, Farina D. Which role for chest x-ray score in predicting the outcome in COVID-19 pneumonia? *Eur Radiol.* 2021;31(6):4016-22.
49. Borakati A, Perera A, Johnson J, Sood T. Diagnostic accuracy of X-ray versus CT in COVID-19: a propensity-matched database study. *BMJ Open.* 2020;10(11):e042946.
50. Kovacs A, Palasti P, Vereb D, Bozsik B, Palko A, Kincses ZT. The sensitivity and specificity of chest CT in the diagnosis of COVID-19. *Eur Radiol* 2021;31(5):2819-24.
51. Benmalek E, Elmhamdi J, Jilbab A. Comparing CT scan and chest X-ray imaging for COVID-19 diagnosis. *Biomed Eng Adv.* 2021;1:100003.
52. Pontone G, Scafuri S, Mancini ME, i sur. Role of computed tomography in COVID-19. *J Cardiovasc Comput Tomogr* 2021;15(1):27-36.
53. Ottaviani S, Franc M, Ebstein E, i sur. Lung ultrasonography in patients with COVID-19: comparison with CT. *Clin Radiol* 2020;75(11):877 e1-e6.
54. Lu W, Zhang S, Chen B, i sur. A Clinical Study of Noninvasive Assessment of Lung Lesions in Patients with Coronavirus Disease-19 (COVID-19) by Bedside Ultrasound. *Ultraschall Med* 2020;41(3):300-7.
55. Nouvenne A, Zani MD, Milanese G, i sur. Lung Ultrasound in COVID-19 Pneumonia: Correlations with Chest CT on Hospital admission. *Respiration* 2020;99(7):617-24.
56. D'Silva C. Oxygenation Indices in Noninvasive Ventilation: Could They Predict Mortality in COVID-19? *Indian J Crit Care Med.* 2021;25(8):841-2.
57. Stephens JR, Stümpfle R, Patel P, Brett S, Broomhead R, Baharlo B, Soni S. Analysis of Critical Care Severity of Illness Scoring Systems in Patients With Coronavirus

- Disease 2019: A Retrospective Analysis of Three U.K. ICUs. *Crit Care Med.* 2021;49(1):e105-e107.
58. Vicka V, Januskeviciute E, Miskinyte S, Ringaitiene D, Serpytis M, Klimasauskas A, Jancoriene L, Sipylaite J. Comparison of mortality risk evaluation tools efficacy in critically ill COVID-19 patients. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):1173.
59. Schmidt M, Guidet B, Demoule A, Ponnaiah M, Fartoukh M, Puybasset L, Combes A, Hajage D; COVID-ICU Investigators. Predicting 90-day survival of patients with COVID-19: Survival of Severely Ill COVID (SOSIC) scores. *Ann Intensive Care.* 2021;11(1):170.
60. Survival Of Severely Ill COVID patients. Assistance publique, Hopitaux de Paris. [Internet]. Dostupno sa: <https://sotic.shinyapps.io/shiny/>
61. Jin YH, Cai L, Cheng ZS, Cheng H, Deng T, Fan YP, i sur. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Mil Med Res.* 2020;7(1):4.
62. Ni YN, Chen G, Sun J, Liang BM, Liang ZA. The effect of corticosteroids on mortality of patients with influenza pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2019;23(1):99.
63. Lotfi M, Hamblin MR, Rezaei N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clin Chim Acta.* 2020;508:254-66.
64. COVID -19. Informacije o odobrenim cjepivima. HALMED [Internet]. Dostupno sa: <https://www.halmed.hr/COVID-19/Informacije-o-odobrenim-cjepivima/>
65. McGonagle D, Ramanan AV, Bridgewood C. Immune cartography of macrophage activation syndrome in the COVID-19 era. *Nat Rev Rheumatol.* 2021;17(3):145-57.
66. Foster D, Parrish-Novak J, Fox B, Xu W. Cytokine–receptor pairing: accelerating discovery of cytokine function. *Nature Rev. Drug Discov* 2004;3(2):160-70.

67. Bodmer J, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci* 2002;27(1):19-26.
68. Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, Fortin SP, Winkles JA, i sur. Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. *Cancer Res.* 2006;66(19):9535-42.
69. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem* 1997;272(51):32401-10.
70. Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles JA, i sur. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity.* 2001;15(5):837-46.
71. Sanz AB, Izquierdo MC, Uceró AC, Sanchez nino MD, Egido J, Ortiz A. TWEAK as a Biomarker. *Recent Patents on Biomarkers.* 2011;1(3):213-21.
72. Wang H, Wang S, Li L, Wang X, Liu C, Lu M, Xia Y, Liu Y. Involvement of the cytokine TWEAK in the pathogenesis of psoriasis vulgaris, pustular psoriasis, and erythrodermic psoriasis. *Cytokine.* 2021;138:155391.
73. Nakayama M, Ishidoh K, Kayagaki N, Kojima Y, Yamaguchi N, i sur. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J. Immunol* 2002;168(2):734-43.
74. Bover LC, Cardó-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, i sur. A previously unrecognized protein–protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J. Immunol* 2007;178(12):8183-94.
75. Girgenrath M, Weng S, Kostek CA, Browning B, Wang M, i sur. TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J.* 2006;25(24):5826-39.

76. Burkly LC, Michaelson JS, Hahm K, Jakubowski A, Zheng TS. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 2007;40(1):1-16.
77. Guo Y, Ren M, Ge L, Sun C, Li R, Ma C, Sui S. Increased Serum Concentrations of TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis Predict Higher 28-Day Mortality in Patients with Sepsis. *Emerg Med Int.* 2019;2019:7238705.
78. Hu G, Zeng W, Xia Y. TWEAK/Fn14 signaling in tumors. *Tumour Biol.* 2017;39(6):1010428317714624.
79. Yoriki R, Akashi S, Sho M, i sur. Therapeutic potential of the TWEAK/Fn14 pathway in intractable gastrointestinal cancer. *Exp Ther Med.* 2011;2(1):103-8.
80. Gu L, Dai L, Cao C, i sur. Functional expression of TWEAK and the receptor Fn14 in human malignant ovarian tumors: possible implication for ovarian tumor intervention. *PloS One* 2013;8(3):e57436.
81. Pettersen I, Baryawno N, Abel F, i sur. Expression of TWEAK/Fn14 in neuroblastoma: implications in tumorigenesis. *Int J Oncol* 2013;42(4):1239-48
82. Bertin D, Stephan D, Khrestchatisky M, Desplat-Jégo S. Is TWEAK a Biomarker for Autoimmune/Chronic Inflammatory Diseases? *Front Immunol.* 2013;4:489.
83. Vendrell J, Chacón MR. TWEAK: A New Player in Obesity and Diabetes. *Front Immunol.* 2013;4:488.
84. Ratajczak W, Atkinson SD, Kelly C. The TWEAK/Fn14/CD163 axis-implications for metabolic disease. *Rev Endocr Metab Disord.* 2022;23(3):449-62.
85. Yalçın Kehribar D, Cihangiroğlu M, Sehmen E, Avcı B, Çapraz M, Boran M, Günaydin C, Özgen M. The assessment of the serum levels of TWEAK and prostaglandin F2 $\alpha$  in COVID – 19. *Turk J Med Sci.* 2020;50(8):1786-91.

86. Kerget B, Kerget F, Koçak AO, Kızıltunç A, Araz Ö, Uçar EY, Akgün M. Are Serum Interleukin 6 and Surfactant Protein D Levels Associated with the Clinical Course of COVID-19? *Lung*. 2020;198(5):777-84.
87. Sun X, Wang T, Cai D, Hu Z, Chen J, Liao H, et al. Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;53:38-42.
88. Marin DP, Bolin AP, dos Santos Rde C, Curi R, Otton R. Testosterone suppresses oxidative stress in human neutrophils. *Cell Biochem Funct*. 2010;28(5):394-402.
89. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, et al. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(7):3313-18.
90. Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM, et al. Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(2):546-54.
91. Mohamad NV, Wong SK, Wan Hasan WN, Jolly JJ, Nur-Farhana MF, Ima-Nirwana S, Chin KY. The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. *Aging Male*. 2019;22(2):129-40.
92. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9(2):191-200.
93. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
94. Fui MNT, Dupuis P, Grossmann M. Lowered testosterone in male obesity: mechanisms, morbidity and management. *Asian J Androl*. 2014;16(2):223-31.
95. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr*. 2011;106(3):5-78.



96. Burney BO, Hayes TG, Smiechowska J, i sur. Low testosterone levels and increased inflammatory markers in patients with cancer and relationship with cachexia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(5):700-9.
97. Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, i sur. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun.* 2020;11(1):6317.
98. Scully EP, Haverfield J, Ursin RL, Tannenbaum C, Klein SL. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(7):442-7.
99. Karlberg J, Chong DS, Lai WY. Do men have a higher case fatality rate of severe acute respiratory syndrome than women do? *AmJ Epidemiol.* 2004;159(3):229-31.
100. Alghamdi IG, Hussain I, Almalki SS, Alghamdi MS, Alghamdi MM, El-Sheemy MA. The pattern of Middle East respiratory syndrome coronavirus in Saudi Arabia: a descriptive epidemiological analysis of data from the Saudi Ministry of Health. *Int J Gen Med.* 2014;7:417-23.
101. Kalidhindi RSR, Borkar NA, Ambhore NS, Pabelick CM, Prakash YS, Sathish V. Sex steroids skew ACE2 expression in human airway: a contributing factor to sex differences in COVID-19? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2020;319(5):843-7.
102. Leach DA, Mohr A, Giotis ES, i sur. The antiandrogen enzalutamide downregulates TMPRSS2 and reduces cellular entry of SARS-CoV-2 in human lung cells. *Nat Commun.* 2021;12(1):4068.
103. Clinckemalie L, Spans L, Dubois V, et al. Androgen regulation of the TMPRSS2 gene and the effect of a SNP in an androgen response element. *Mol Endocrinol.* 2013;27(12):2028-40.

104. Samuel RM, Majd H, Richter MN, i sur. Androgen signaling regulates SARS-CoV-2 receptor levels and is associated with severe COVID-19 symptoms in men. *Cell Stem Cell*. 2020;27(6):876-89.
105. Chen J, Jiang Q, Xia X, Liu K, Yu Z, Tao W, Gong W, Han JJ. Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation. *Aging Cell*. 2020;19(7):e13168.
106. Montopoli M, Zumerle S, Vettor R, i sur. Androgen-deprivation therapies for prostate cancer and risk of infection by SARS-CoV-2: a population-based study (N = 4532). *Ann Oncol*. 2020;31(8):1040-45.
107. Klein EA, Li J, Milinovich A, i sur. Androgen deprivation therapy in men with prostate cancer does not affect risk of infection with SARS-CoV-2. *J Urol*. 2021;205(2):441-3.
108. Rowland SP, O'Brien Bergin E. Screening for low testosterone is needed for early identification and treatment of men at high risk of mortality from Covid-19. *Crit Care*. 2020;24(1):367.
109. Yassin A, Sabsigh R, Al-Zoubi RM, Aboumarzouk OM, Alwani M, Nettleship J, Kelly D. Testosterone and Covid-19: An update. *Rev Med Virol*. 2023;33(1):e2395.
110. Yang M, Chen S, Huang B, Zhong JM, Su H, Chen YJ, i sur. Pathological Findings in the Testes of COVID-19 Patients: Clinical Implications. *Eur Urol Focus*. 2020;6(5):1124-29.
111. Salonia A, Pontillo M, Capogrosso P, i sur. Severely low testosterone in males with COVID-19: a case-control study. *Andrology*. 2021;9(4):1043-52.
112. Corona G, Vena W, Pizzocaro A, Pallotti F, Paoli D, i sur. Andrological effects of SARS-Cov-2 infection: a systematic review and meta-analysis. *J Endocrinol Invest*. 2022;45(12):2207-19.

113. Cinislioglu AE, Cinislioglu N, Demirdogen SO, i sur. The relationship of serum testosterone levels with the clinical course and prognosis of COVID-19 disease in male patients: a prospective study. *Andrology*. 2022;10(1):24-33.
114. Salonia A, Pontillo M, Capogrosso P, i sur. Testosterone in males with COVID-19: a 7-month cohort study. *Andrology*. 2022;10(1):34-41.
115. Liu B, Li M, Zhou Z, Guan X, Xiang Y. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *J Autoimmun*. 2020;111:102452.
116. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immuno-suppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033-4.
117. Camici M, Zuppi P, Lorenzini P, Scarnecchia L, Pinnetti C, i sur. Role of testosterone in SARS-CoV-2 infection: A key pathogenic factor and a biomarker for severe pneumonia. *Int J Infect Dis*. 2021;108:244-51.
118. Nuttall FQ. Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutr Today*. 2015;50(3):117-28.
119. Apicella M, Campopiano MC, Mantuano M, Mazoni L, Coppelli A, Del Prato S. COVID-19 in people with diabetes: understanding the reasons for worse outcomes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(9):782-92.
120. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, i sur. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with covid-19 in wuhan, china: A retrospective cohort study. *Lancet (London, England)*. 2020;395(10229):1054-62.
121. Reynolds HR, Adhikari S, Pulgarin C, Troxel AB, Iturrate E, i sur. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors and Risk of Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;382(25):2441-8.

122. Bonanad C, García-Blas S, Tarazona-Santabalbina F, Sanchis J, Bertomeu-González V, i sur. The Effect of Age on Mortality in Patients With COVID-19: A Meta-Analysis With 611,583 Subjects. *J Am Med Dir Assoc.* 2020;21(7):915-18.
123. Gao M, Piernas C, Astbury NM, Hippisley-Cox J, O'Rahilly S, Aveyard P, Jebb SA. Associations between body-mass index and COVID-19 severity in 6.9 million people in England: a prospective, community-based, cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021;9(6):350-9.
124. Apicella M, Campopiano M, Montuano M, Mazoni L, Coppelli A, Del Prato S. COVID-19 in people with diabetes: understanding the reasons for worse outcomes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(9):782-92.
125. Li G, Chen Z, Lv Z, i sur. Diabetes Mellitus and COVID-19: Associations and Possible Mechanisms. *Int J Endocrinol* 2021;2021:7394378.
126. Huang I, Lim MA, Pranata R. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia - a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(4):395-403.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OPĆI PODATCI:**

**Ime i prezime:** Marijana Mikačić

**Datum rođenja:** 05. studenog 1981. Stepinčeva 14

**Adresa stanovanja:** Stepinčeva 14, 21000 Split

**E-mail:** [mmikacic@kbsplit.hr](mailto:mmikacic@kbsplit.hr)

## **OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:**

2019.                      Subspecijalistica intenzivne medicine, KBC Split  
                                    Poslijediplomski doktorski studiji, Medicinski fakultet u Splitu
2011.                      Specijalistica opće interne medicine, KBC Mostar
2009.                      Poslijediplomski znanstveni studiji, Medicinski fakulteta  
                                    Sveučilišta u Mostaru, magistar znanosti
2006.                      doktorica medicine, Medicinski fakultet u Mostaru

## **RADNO ISKUSTVO:**

- 2015.-                      Klinički bolnički centar Split, Klinika za unutarnje bolesti  
                                    Zavod za hitnu, intenzivnu medicinu i kliničku farmakologiju s  
                                    toksikologijom
- 2008.-2015.                Klinički bolnički centar Mostar, Odjel za plućne bolesti
- 2007.-2008.                Dom zdravlja Mostar, Hitna medicina

## POPIS PUBLIKACIJA:

1. M.Šimović, I.Vasilj, Z Šarac.“The Degree of Gravity of Change of Diabetic Retinopathy in Patients Dependent and Independent of Insulin- Historical Prospective Study” *Health MED*; 6(7):2588-92.
2. M.Mikačić, I.Vasilj, M. Vasilj, D. Bevanda, M. Šimović, K. Galić.“Tumor Marker Ca 125 in the Diagnosis of Acute Pneumonia Tuberculosis. A study of Adults in Mostar, BiH. *Psychiatr Danub*. 2017; 29(4):841-44.
3. Ž. Ninčević, D. Lasić, T. Glavina, M. Mikačić, M. Carev, K. Podrug.”Quetiapin Poisoning Associated with Neuroleptic Malignant Syndrome, Rhabdomyolysis and Renal Failure: A Case Report. *Psychiatr Danub*. 2017;29(1):84-6.
4. Mikacic M, Kumric M, Baricevic M, Tokic D, Stojanovic Stipic S, Cvitkovic I, Supelic D, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Dynamic of Serum TWEAK Levels in Critically Ill COVID-19 Male Patients. *J Clin Med*. 2022;11(13):3699.
5. Tokic D, Mikacic M, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Rancic I, Martinovic D, Bukic J, Vrdoljak J, Lizatovic IK, Stipic SS, Supelic D, Bozic J. Association between Brain Injury Markers and Testosterone in Critically-Ill COVID-19 Male Patients. *Microorganisms*. 2022;10(11):2095.
6. Mikačić M, Glavaš D, Borovac JA. Patients presenting with acute myocardial infarction and no apparent cardiovascular risk factors: are they wolves in sheep's clothing?// *Cardiologia Croatica*. 2022;17:157.
7. Jelacic I, Kovacic V, Luketin M, Mikacic M, Skaro DB. Atypical HUS with multiple complement system mutations triggered by synthetic psychoactive drug abuse: a case report. *J Nephrol*. 2023;5:1–3.

8. Kovacic V, Kwartuc L, Mikacic M, Jerkovic I, Begovic TI, Maras M, Nazlic J.

Clinical and demographic features with outcome predictors of adult patients with acute intoxication admitted to a medical intensive care unit in the Mediterranean part of Croatia// Toxicology Research, 2023;tfad054:1-9.

## **SUDJELOVANJE U STUDIJAMA**

VIP 2 study group (kolaboracija)

1. B. Guidet, D. Lange, A. Boumendil, et al. "The Contribution of Frailty, Cognition, Activity of Daily Life and Comorbidities on Outcome in Acutely Admitted Patients over 80 years in European ICUs: The VIP2 study." Intensive Care Med. 2020 Jan;46(1):57-69.

## **PREDAVANJE NA STRUČNIM SKUPOVIMA**

1. "Bolesnici s akutnim infarktom miokarda bez kardiovaskularnih rizičnih čimbenika: radi li se o vukovima u ovčjim kožama? / Patients presenting with acute myocardial infarction and no apparent cardiovascular risk factors: are they wolves in the sheep's clothing?"  
14<sup>th</sup> CONGRESS OF THE CROATIAN CARDIAC SOCIETY WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION NOVEMBER, 24 - 27, 2022.g.
2. "Hemoadsorption with CytoSorb® for treatment of severe rhabdomyolysis after exertional heat stroke: A Case Report", International conference on Extracorporeal Organ Support, 4-6.5.2023. g.