

POVEZANOST SERUMSKE AKTIVNOSTI KALPAINA 1 I KONCENTRACIJE INTERLEUKINA 33 S RAZVOJEM AKUTNOG RESPIRATORNOG DISTRES SINDROMA U BOLESNIKA S PNEUMONIJOM UZROKOVANOM SARS-CoV-2 VIRUSOM

Loinjak, Domagoj

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:493423>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Domagoj Loinjak

POVEZANOST SERUMSKE AKTIVNOSTI KALPAINA 1 I KONCENTRACIJE
INTERLEUKINA 33 S RAZVOJEM AKUTNOG RESPIRATORNOG DISTRES
SINDROMA U BOLESNIKA S PNEUMONIJOM UZROKOVANOM SARS-CoV-2
VIRUSOM

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Domagoj Loinjak

POVEZANOST SERUMSKE AKTIVNOSTI KALPAINA 1 I KONCENTRACIJE
INTERLEUKINA 33 S RAZVOJEM AKUTNOG RESPIRATORNOG DISTRES
SINDROMA U BOLESNIKA S PNEUMONIJOM UZROKOVANOM SARS-CoV-2
VIRUSOM

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Mentor rada: prof. dr. sc. Robert Smolić, dr. med.

Komentorica rada: doc. dr. sc. Lana Maričić, dr. med.

Rad ima 122 stranice.

PREDGOVOR RADU

Zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Robertu Smoliću te komentorici, doc. dr. sc. Lani Maričić na bezuvjetnoj pomoći, podršci i poticanju pri provođenju istraživanja i izradi ove doktorske disertacije.

Također, veliko hvala mom dragom prijatelju i kumu, dr. sc. Damiru Mihiću na nesebičnoj pomoći i podršci od početka istraživanja pa sve do izrade disertacije.

Zahvaljujem se i dr. sc. Ines Šahinović na velikoj pomoći u provedbi laboratorijskog dijela istraživanja kao i na svim savjetima koje mi je davala.

Zahvaljujem se i svima ostalima koji su pridonijeli u provedbi istraživanja i izradi doktorske disertacije: prof. dr. sc. Mariji Heffer, prof. dr. sc. Branimiru Hackenbergeru, Bojanu Tovjaninu, Siniši Petković te Mariji Škaro-Czigler.

I naposljetku, posebno hvala mojoj obitelji, supruzi Sanji te sinovima Josipu i Luki. Hvala im na nesebičnoj ljubavi i velikom razumijevanju u svakom trenutku.

Ovo istraživanje financirano je iz sredstava Institucionalnog istraživačkog projekta Medicinskog fakulteta Osijek , IP-14-MEFOS-2021 pod nazivom "Uloga interleukina 33 i kalpain proteaze 1 u razvoju akutnog distress sindroma u bolesnika s pneumonijom uzrokovanom SARS-CoV-2 virusom" voditelja prof. dr. sc. Roberta Smolića, dr. med.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Opće karakteristike ARDS-a.....	1
1.2. Pojavnost ARDS-a u COVID-19 bolesnika.....	5
1.3. Kliničke karakteristike ARDS-a u COVID-19 bolesnika.....	9
1.4. Imunopatogeneza ARDS-a i COVID-19 bolesti.....	13
1.5. Uloga interleukina 33 i kalpaina 1 u razvoju ARDS-a.....	16
1.6. Dosadašnje spoznaje o ulozi IL-33 i kalpaina 1 u COVID-19 bolesti.....	22
2. Hipoteza	25
3. Ciljevi istraživanja	26
4. Ispitanici i metode	27
4.1. Etička načela istraživanja.....	27
4.2. Ustroj istraživanja.....	27
4.3. Ispitanici uključeni u istraživanje.....	27
4.3.1. Ispitivana skupina.....	28
4.3.2. Kontrolna skupina.....	29
4.3.3. Isključni kriteriji.....	29
4.4. Metode istraživanja.....	29
4.4.1. Prikupljanje kliničkih podataka i parametara.....	29
4.4.2. Uzorkovanje krvi.....	32
4.4.3. Laboratorijske analize.....	33
4.4.4. Standardne laboratorijske analize.....	34
4.4.5. Određivanje aktivnosti kalpaina 1.....	35
4.4.6. Određivanje koncentracije IL-33.....	36
4.5. Statističke metode.....	37
5. Rezultati	38
5.1. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s pojavnost i težinom ARDS-a.....	40
5.2. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s markerima akutnog upalnog odgovora.....	42
5.3. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s ostalim laboratorijskim parametrima.....	44

5.4. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s oksigenoterapijom i mehaničkom ventilacijom.....	54
5.5. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s duljinom trajanja bolesti.....	58
5.6. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s kroničnim komorbiditetima.....	59
5.7. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s težinom bolesti COVID-19	63
5.8. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s radiološkim nalazom COVID-19 pneumonije.....	65
5.9. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s načinom liječenja bolesti COVID-19.....	66
5.10. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s ishodom bolesti COVID-19.....	72
6. Rasprava	73
6.1. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s pojavnost i težinom ARDS-a.....	73
6.2. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s markerima akutnog upalnog odgovora.....	75
6.3. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s ostalim laboratorijskim parametrima.....	77
6.4. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s oksigenoterapijom i mehaničkom ventilacijom.....	81
6.5. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s duljinom trajanja bolesti.....	84
6.6. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s kroničnim komorbiditetima.....	84
6.7. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s težinom bolesti COVID-19.....	85
6.8. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s radiološkim nalazom COVID-19 pneumonije.....	86
6.9. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s načinom liječenja bolesti COVID-19.....	86

6.10.	Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s ishodom bolesti COVID-19.....	88
6.11.	Ograničenja i znanstveni doprinos istraživanja.....	88
7.	Zaključak	90
8.	Sažetak	91
9.	Summary	92
10.	Literatura	93
11.	Životopis	120

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACE-2	Angiotenzin-konvertirajući enzim 2
ALP	Alkalna fosfataza
ALT	Alanin-aminotransferaza
APACHE	Od engl. <i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i>
aPTV	Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
ARDS	Akutni respiratorni distres sindrom
AST	Aspartat-aminotransferaza
BiPAP	Dvofazna ventilacija pozitivnim tlakom
CO ₂	Ugljični dioksid
COVID-19	Koronavirusna bolest 2019
CPAP	Kontinuirano pozitivan tlak u dišnim putevima
CRP	C-reaktivni protein
DAMP	Od engl. <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
ΔP	Od engl. „ <i>driving pressure</i> “
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ECCO ₂ R	Od engl. <i>Extracorporeal Carbon Dioxide Removal</i>
FiO ₂	Frakcija inspiriranog kisika
GGO	Od engl. <i>Ground-Glass Opacification</i>
GGT	Gama glutamil-transferaza
HbA1c	Glikozilirani hemoglobin A1c
HDL	Lipoprotein visoke gustoće
HFNC	Od engl. <i>High Flow Nasal Cannula</i>
HFNO	Od engl. <i>High Flow Nasal Oxygen</i>
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IκB	Inhibitor nuklearnog faktora κB
IL	Interleukin
KOPB	Kronična opstruktivna plućna bolest
LDL	Lipoprotein niske gustoće
LPS	Lipopolisaharid
MERS-CoV	Bliskoistočni respiratorni sindrom koronavirus
MEWS	Od engl. <i>Modified Early Warning Score</i>

MMV	Minutna mandatorna ventilacija
NET	Od engl. <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF- κ B	Nuklearni faktor κ B
NTproBNP	N-terminalni propeptid natriuretskog moždanog peptida
O ₂	Kisik
PaCO ₂	Parcijalni tlak ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi
PAMP	Od engl. <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PaO ₂	Parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi
PCR	Polimerazna lančana reakcija
PEEP	Pozitivni tlak na kraju ekspirija
PIP	Vršni inspiratorni tlak
PRR	Od engl. <i>Pattern Recognition Receptors</i>
PS	Inspiratorna tlačna potpora
PV	Protrombinsko vrijeme
RBD	Receptor vezajuća domena
RNA	Ribonukleinska kiselina
SaO ₂	Saturacija hemoglobina kisikom arterijske krvi
SARS-CoV	Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus
SARS-CoV-2	Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2
SIMV	Sinkronizirana intermitentna mandatorna ventilacija
SIRS	Sindrom sistemskog upalnog odgovora
SOFA	Od engl. <i>The Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
TGF- β 1	Transformirajući čimbenik rasta β 1
TLR	Receptor sličan Toll receptoru <i>Drosophila</i> vrste
TNF- α	Čimbenik tumorske nekroze α
VV-ECMO	Veno-venska ekstrakorporalna membranska oksigenacija

1. UVOD

1. UVOD

Akutni respiratorni distress sindrom (ARDS) klinički je termin koji se primjenjuje za širi spektar stanja koja imaju određene zajedničke kliničko-patološke karakteristike kao što su 1) povećana propusnost alveolokapilarne membrane s posljedičnim nastankom upalnog edema i smanjenjem plućne popustljivosti te 2) poremećena difuzija plinova (O_2 , CO_2) i povećanje mrtvog prostora koji rezultiraju razvojem hipoksemije i hiperkapnije (1).

ARDS prvi su put opisali 1967. Ashbaugh i suradnici koji su pisali o 12 bolesnika s novonastalom hipoksemijom refraktorom na oksigenoterapiju, obostranim mekotkivnim infiltratima na radiografskim snimkama pluća te smanjenom plućnom popustljivosti, a kojima su glavne patohistološke karakteristike na plućima bile intersticijski edem, upalni infiltrat te stvaranje hijalnih membrana na površini alveola (2). Od tada, pa sve do danas, definicija ARDS-a mijenjala se više puta, pri čemu su one ponajprije usredotočene na radiološki nalaz pluća te težinu poremećaja oksigenacije krvi izražene kroz omjer parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi i udjela primijenjenog kisika u smjesi zraka koja se isporučuje bolesniku (PaO_2/FiO_2 omjer) (1).

Ukupno gledano prema epidemiološkim studijama prije pandemije bolesti COVID-19, ARDS je u razvijenim zemljama bio odgovoran za oko 10 % hospitalizacija bolesnika u jedinicu intenzivnog liječenja, a od 20 do 25 % bolesnika koji su bili na mehaničkoj ventilaciji zadovoljili su kriterije za postavljanje dijagnoze ARDS-a (3). Ozbilnost ARDS-a zrcali se i u njegovoj visokoj stopi smrtnosti koja se kreće između 35 i 45 %, a kod oboljelih od COVID-a i više (4).

Razumijevanje nastanka, razvoja te odgovora bolesnikâ na terapijske opcije koje se primjenjuju u liječenju ARDS-a, u velikoj mjeri ostaju nepoznate te su predmetom brojnih eksperimentalnih i kliničkih istraživanja.

1.1. Opće karakteristike ARDS-a

Do ARDS-a mogu dovesti različite bolesti i stanja koja primarno mogu zahvaćati pluća (pulmonarni ARDS), ali i one koje primarno ne zahvaćaju pluća (ekstrapulmonarni ARDS). Svima njima glavno je i temeljeno patofiziološko obilježje razvoj sindroma

1. UVOD

sistemskeg upalnog odgovora (SIRS, engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*). Najčešće bolesti i stanja koja dovode do nastanka ARDS-a prikazani su u Tablici 1.1. (5).

Tablica 1.1. Etiologija ARDS-a

Bolesti i stanja koja primarno zahvaćaju pluća
Upala pluća (bakterijska, virusna, gljivična)
Aspiracija želučanog sadržaja
Kontuzija pluća (trauma prsišta)
Akutne intersticijske bolesti pluća
Inhalacijske ozljede, lijekovi, radijacija, gušenje vodom
Bolesti i stanja koja primarno ne zahvaćaju pluća
Sepsa i septički šok
Akutni pankreatitis
Politrauma, krvarenje i masivna transfuzija
Opsežne opekline
Predoziranje lijekovima

Razvoju ARDS-a pridonose i različiti čimbenici rizika bolesnika. Iako se sve više govori o genskoj predispoziciji razvoja ARDS-a u prisutnosti navedenih bolesti i stanja, ona do danas nije u cijelosti jasna i predmetom je brojnih istraživanja (6, 7). Od poznatih rizičnih čimbenika koji pogoduju razvoju ARDS-a navode se kronične plućne bolesti (kronična opstruktivna plućna bolest, astma, bolesti plućnog intersticija), kronični nikotizam, kronični alkoholizam, malnutricija, uznapredovala životna dob, pretilost te druge kronične nezarazne bolesti, kao što su arterijska hipertenzija, šećerna bolest i dr. (8).

Osnovu patofiziološkog zbivanja u nastanku ARDS-a čini poremećaj na razini alveolokaplarne membrane. Ozljeda endotela plućnih kapilara i/ili oštećenje alveolarnog epitela osnovni je i početni događaj u razvoju ARDS-a (9 – 11). On može biti uzorkovan izravnim učinkom različitih patogena (virusi, bakterije) i/ili njihovih toksina, aktiviranim stanicama urođenog imunskog odgovora (poglavito neutrofila), kao i brojim drugim čimbenicima (oksidativni stres, mehaničko oštećenje, djelovanje kemijskih toksina i sl.) (12, 13). Aktivacija stanica urođene imunosti rezultira pojačanim stvaranjem i lučenjem proupalnih medijatora koji dalje pojačavaju upalni odgovor te tako dovode do hiperinflamatornog stanja za koji se smatra da je glavni ključ u progresiji plućnog oštećenja i težine ARDS-a (5, 14). Aktivirane stanice urođene imunosti luče i različite lizosomalne proteinaze koje su odgovorne za izravno stanično oštećenje. Navedeno oštećenje alveolokaplarne membrane rezultirat će pojačanom permeabilnosti, pri čemu dolazi do

1. UVOD

nastanka intersticijskog i alveolarnog plućnog edema koji ugrožava normalnu izmjenu plinova i vodi prema hipoksemiji i hiperkapniji (15). Osim toga, oštećenje endotela plućnih kapilara povezano je i s pojačanom sklonosti nastanku tromboza, što dodatno pogoršava plućnu funkciju stvaranjem ventilacijsko-perfuzijskog nesklada (16, 17). U nastanku oštećenja pluća u ARDS-u veliku ulogu ima i fibrin. On se pojačano stvara kao odgovor na oštećenje epitelnih stanica i lučenja tkivnog faktora koji vodi aktivaciji koagulacijskog puta koji u krajnjoj fazi rezultira njegovim stvaranjem iz fibrinogena. Fibrin stvara fibrinske niti, ujedinjuje upalni eksudat (nastanak konsolidacije) te stvara preduvjet za fibrozu pluća koja je glavna histološka odlika završne faze ARDS-a (18). U procesu difuznog alveolarnog oštećenja, osim proteaza koje luče stanice urođene imunosti, ulogu imaju i druge, endogene proteaze. Najpoznatije su cistinske proteaze ovisne o kalciju koje nazivamo kalpainima, među kojima se najviše ističe kalpain 1 (19, 20). On se fiziološki nalazi u citoplazmi različitih stanica u neaktivnom stanju, a njegovu aktivaciju potiče povišena razina unutarstaničnog kalcija, što često predstavlja i prvu biokemijsku promjenu u staničnom oštećenju (21). Osim proteolitičkog djelovanja kalpaina koji vodi stanice u apoptozu, važna uloga kalpaina očituje se i u njegovu proinflamatornom učinku, kao i u njegovu profibrotičkom učinku koji može imati ulogu u napredovanju, tj. nastanku fibroze u kasnim fazama ARDS-a (22, 23).

Uzimajući u obzir gore opisani patofiziološki slijed, kao i promjene dokumentirane obdukcijom preminulih bolesnika s ARDS-om, razlikuju se tri histološka stadija ARDS-a. Prvi stadij predstavlja ranu eksudativnu fazu koja traje prvih 7 do 10 dana bolesti, a koju karakterizira edem intersticija s upalnom infiltracijom koju dominantno čine neutrofilni te alveole ispunjene upalnom tekućinom uz stvaranje hijalinskih membrana uz njihov rub. Drugi stadij bolesti predstavlja rana fibroproliferativna faza koju karakterizira proliferacija stanica alveolarnog epitela tipa 2 te proliferacija fibroblasta u kojoj dolazi smanjena plućna popustljivost, a koja može napredovati u treći stadij – kasnu fibroproliferativnu fazu koju karakterizira taloženje kolagena te organizacija intersticijske fibroze (24 – 28). Nastanak plućne fibroze povezan je s ireverzibilnim gubitkom plućne funkcije (29).

Razvoj plućne fibroze nije nužan kod svih bolesnika. Istraživanja iz vremena prije pandemije bolesti COVID-19 sugeriraju da se fibroza kao krajnja manifestacija ARDS-a kod preživjelih bolesnika javlja u oko 40 % slučajeva (30). Kod ostalih bolesnika dolazi do potpune rezolucije patološkog supstrata. Alveolarni edem (tekućina i solubilni proteini) povlači se zbog vektorskog prijenosa natrija i klora iz alveola u intersticij na temelju nastalog

1. UVOD

osmotskog gradijenta, a ono se zbiva kroz posebne kanale – akvaporine. Iz intersticija tekućina se dijelom drenira putem limfe, a dijelom se resorbira u krvotok (31 – 33). Nesolubilne proteine iz alveola odstranjuju alveolarni makrofazi, a neutrofili nestaju zbog apoptoze (34, 35). Alveolarne epitelne stanice tipa 2 služe kao progenitorske stanice iz kojih kreće reparacija i rezolucija patomorfoloških promjena nastalih tijekom ARDS-a (36).

Budući da je uočen različit tijek i terapijski odgovor kod bolesnikâ s ARDS-om, više radnih skupina pokušalo je ARDS podijeliti u nekoliko fenotipova. Tako najčešće razlikujemo izravni i neizravni, hipo i hiperinflamatorni te H i L fenotip ARDS-a (37). Najstarija je podjela na izravni i neizravni fenotip ARDS-a. Izravni (tzv. pulmonarni ARDS) uzrokovan je plućnom bolesti, a histološki dominira oštećenje alveolarnog epitela, dok je neizravni (tzv. ekstrapulmonarni ARDS) uzrokovan izvanplućnom bolesti, a histološki dominira oštećenje endotela plućnih kapilara. Ova fenotipizacija nema veće reperkusije na klinički tijek i ishode ARDS-a (38). Na temelju podataka iz nekoliko studija koje su ispitivale serumske biomarkere u ARDS-u, identificiran je poseban fenotip koji je nazvan hiperinflamatorni jer je kod tih bolesnika nađena viša koncentracija proupalnih medijatora (39). Ova skupina bolesnika obilježena je većom učestalosti razvoja šoka, acidoze te većim mortalitetom (40). U terapijskom pogledu ovi bolesnici imali su bolji odgovor na primjenu PEEP-a tijekom mehaničke ventilacije, ali i veći mortalitet pri konzervativnoj u odnosu na liberalnu primjenu tekućine (39, 41). S obzirom na plućnu elastičnost i popustljivost, razlikuju se dva fenotipa ARDS-a. H fenotip obilježen je visokom plućnom elastičnošću, a smanjenom popustljivošću, većim intrapulmonalnim šantom i izraženijom kongestijom, zbog čega bolesnici imaju veću korist od primjene nižih disajnih volumena i višeg PEEP-a tijekom mehaničke ventilacije. Nasuprot tome, L fenotip ARDS-a obilježen je smanjenom plućnom elastičnošću i povećanom popustljivošću, manjim intrapulmonalnim šantom i manje izraženom kongestijom te bolesnici imaju veću korist od viših disajnih volumena i nižeg PEEP-a tijekom mehaničke ventilacije (42, 43). Većina autora smatra da je podjela ARDS-a na pojedine fenotipove uvjetna te da je riječ o istom sindromu u različitim fazama razvoja. Tako se objašnjava da L fenotip ARDS-a predstavlja ranu fazu bolesti dok se H fenotip javlja u kasnijem tijeku i predstavlja klasični oblik ARDS-a (42).

U kliničkom smislu, osnovu liječenja čini etiološko liječenje, odnosno djelovanje na uzrok koji je doveo do ARDS-a, dok su respiratorna potpora i drugi specifični oblici liječenja samo suportivne mjere kojima se nastoji osigurati dovoljna oksigenacija tkiva i organa.

1. UVOD

Respiratorna potpora uključuje spektar od klasične oksigenoterapije, visokoprotočnog kisika, neinvazivne i invazivne mehaničke ventilacije do ekstrakorporalnih metoda, kao što su ekstrakorporalna eliminacija CO₂ (ECCO₂R, eng. *Extracorporeal Carbon Dioxide Removal*) i veno-venska ekstrakorporalna membranska oksigenacija (VV-ECMO, engl. *Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation*) (44). Izbor metode respiratorne potpore ovisi o težini ARDS-a, tako da se kod bolesnikâ s blagim ARDS-om najčešće primjenjuje visokoprotočni kisik ili neinvazivna mehanička ventilacija, dok se kod bolesnikâ s umjerenim i teškim ARDS-om indicira invazivna mehanička ventilacija (45). Kod primjene invazivne mehaničke ventilacije, preporučuje se tzv. protektivna mehanička ventilacija, pri kojoj se primjenjuju dišni volumeni od 6 ml/kg idealne tjelesne mase uz održavanje tlaka platoa ≤ 30 cmH₂O (1). Primjena te strategije mehaničke ventilacije niskim dišnim volumenima u odnosu na konvencionalnu (10 – 15 ml/kg) znatno je smanjila smrtnost bolesnika s ARDS-om, ponajprije zbog smanjenja negativnih učinaka mehaničke ventilacije na plućni parenhim (46). Dodatna optimizacija oksigenacije može se postići rekrutment manevrima i optimizacijom PEEP-a, kao i stavljanjem bolesnika u pronacijski položaj (47 – 49). U slučaju da se invazivnom mehaničkom ventilacijom, uz druge potporne metode (pronacija, rekrutment), ne može postići odgovarajuća oksigenacija, u obzir dolazi primjena postupka VV-ECMO poštujući njezine indikacije i kontraindikacije (50, 51).

Bezobzira na današnje mogućnosti liječenja, ARDS je bolest s visokom stopom smrtnosti (4). Studija LUNG SAFE iz 2016. izvijestila je o ukupnoj 40 %-tnoj bolničkoj smrtnosti bolesnika koji su primljeni u jedinicu intenzivnog liječenja zbog ARDS-a ili su ga razvili tijekom prvih 48 sati boravaka. Smrtnost se razlikovala u ovisnosti o težini bolesti te je iznosila 34,9 % za bolesnike s blagim ARDS-om, 40,3 % za bolesnike s umjerenim ARDS-om te 46,1 % za bolesnike s teškim ARDS-om (52).

1.2.Pojavnost ARDS-a kod oboljelih od COVID-a

Virusne upale pluća jedan su od najčešćih uzroka nastanka ARDS-a. Od virusa koji se najčešće povezuju s nastankom teških oblika upala pluća povezanih s razvojem ARDS-a izdvajaju se virusi influence (tip A i B), adenovirusi, respiratorni sincicijski virusi, rinovirusi, humani metapneumovirusi i virus parainfluence. U posljednjih petnaest godina, a prije pojave pandemije bolesti COVID-19, nekoliko je virusa privuklo posebnu pozornost s obzirom na njihovu epidemijsku pojavnost i povezanost s teškim upalama pluća i razvojem ARDS-a. To

1. UVOD

su virusi influenze A (H1N1, H5N1) te dva koronavirusa - SARS-CoV i MERS-CoV (53). Virusi influenze odgovorni su za sezonsku pojavnost respiratornih infekcija u zimskim mjesecima koja u rizične populacije može rezultirati sporadičnim razvojem ARDS-a, a dva su se soja istaknula kao opasnija jer je njihova pojavnost bila povezana s češćim razvojem teških (fulminantnih) oblika pneumonije i ARDS-a, a to su virus ptičje gripe (H5N1) 2002. i virus svinjske gripe (H1N1) 2009. Smrtnost od ARDS-a uzrokovana ovim virusima bila je visoka i kretala se i do 50 % (54, 55). I dok većina koronavirusa, kao i virusi influence, uzrokuju blage sezonske respiratorne infekcije (56), identificirana su dva soja koja su bila povezana s razvojem teških pneumonija i ARDS-om, a imala su i epidemijski potencijal (57). Godine 2002. u Kini je identificiran koronavirus povezan s razvojem teškog respiratornog distres sindroma koji je nazvan SARS-CoV (od engl. SARS, *Severe Acute Respiratory Syndrome*), koji se proširio na 29 zemalja te zarazio oko 8000 osoba. Smrtnost od ovog virusa kretala se između 10 i 15 % (58). Deset godina poslije, 2012. godine u Jordanu, izoliran je sličan koronavirusu, koji je nazvan MERS-CoV (od engl. MERS, *Middle East Respiratory Syndrome*) jer je najviše poharao bliskoistočne zemlje, a zabilježeno je oko 2500 zaraženih osoba te je njegova smrtnost bila veća i kretala se između 30 i 35 % (59).

Ponovnu pozornost koronavirusi doživljavaju 2019. kada se u prosincu u Wuhanu u Kini pojavljuje novi koronavirus koji slično kao i prethodni SARS-CoV i MERS-CoV ima karakteristiku izazivanja teških oblika pneumonija i ARDS-a. Virus je nazvan SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2*), a bolest koju uzrokuje koronavirusna bolest 2019 ili COVID-19 (engl. *Coronavirus Disease 2019*) (60). Vrlo brzo shvaćena je njegova sklonost brzom širenju među ljudima pa je i Svjetska zdravstvena organizacija na temelju epidemiološke slike u ožujku 2020. proglasila COVID-19 pandemijom (61).

SARS-CoV-2 virus pripada skupini koronavirusa koji su dobili ime prema svom karakterističnom vanjskom izgledu nalik na krunu (lat. *corona*), a koju čine šiljaste proteinske strukture (šiljasti proteini) koje se izbočuju s površine virusne ovojnice (62). Genom SARS-CoV-2 virusa čini jednolančana RNK molekula veličine 30 kb koja nosi gensku informaciju za stvaranje strukturnih i nestrukturnih proteina. Strukturni proteini služe za stvaranje nove virusne čestice, a to su protein ovojnice (protein E), šiljasti protein (protein S), membranski protein (protein M), nukleokapsidni protein (protein N) te pomoćni proteini. Geni za ove proteine čine jednu trećinu ukupnog genoma virusa. Preostale dvije trećine genoma čine geni

1. UVOD

koji služe za replikaciju virusne RNK, a nazivaju se nestrukturani proteini (63). Sama virusna čestica sastoji se od ovojnice koju u najvećem dijelu čine M, S i E proteini te unutrašnjosti u kojoj nalazimo molekulu RNK vezanu na N protein (64). Šiljasti protein ima ključnu ulogu u procesu internalizacije virusne čestice u stanice domaćina, a što je posredovano interakcijom s ACE2 receptorom (engl. *Angiotensin-Converting Enzyme 2*) koji se nalazi na površini stanica domaćina, posebice epitela dišnog sustava (65). Posljedično interakciji šiljastog proteina i ACE2 receptora dolazi do fuzije virusne ovojnice s membranom stanice domaćina, pri čemu se virusna RNK oslobađa unutar stanice domaćina. To će omogućiti nastanak proteina potrebnih za stvaranje novih virusnih čestica koje se zatim izbacuju i koje pri tome mogu inficirati okolne stanice (66). Budući da je genom SARS-CoV-2 virusa varijabilan zbog učestalih mutacija, brzo se stvaraju nove podinačice virusa (sojevi) koje mogu utjecati na virulentnost i patogenost virusa. Tako razlikujemo virusne sojeve koji su povezani s težim i virusne sojeve koji su povezani s blažim oblicima bolesti. Također, određeni virusni sojevi lakše se prenose unutar populacije od drugih. Do sada je poznato više od 20 sojeva virusa SARS-CoV-2 (67).

Glavni i najčešće zahvaćeni organski sustav kod bolesti COVID-19 jest dišni sustav, iako je ona u svojoj naravi multisistemska bolest i može zahvatiti različite organske sustave. Ovo se tumači samom činjenicom da se virus dominantno prenosi kapljičnim putem kao i bogatom zastupljenosti ACE2 receptora na površini epitelnih stanica dišnih putova (68, 69). Bolest se najčešće manifestira kao obična prehlada ili gripa, a često prolazi i asimptomatski. Ipak, kod određenih pojedinaca ona napreduje prema težem obliku, razvoju pneumonije te ARDS-a (70). Iako je predvidljivost razvoja ARDS-a kod oboljelih od COVID-a u velikom dijelu bila niska, s napredovanjem pandemije identificirani su određeni rizični čimbenici koji su predisponirali njegov mogući razvoj. Kao najčešći rizični čimbenici navode se starija životna dob, muški spol te kronični komorbiditeti, među kojima su glavni arterijska hipertenzija, pretilost i šećerna bolest (71 – 73). Od laboratorijskih nalaza, limfopenija, visoke vrijednosti C-reaktivnog proteina, interleukina 6 i laktat dehidrogenaze pokazali su se kao najbolji prognostički čimbenici razvoja ARDS-a kod zaraženih bolesnika (74). Najčešće spominjani rizični čimbenici za razvoj ARDS-a kod oboljelih od COVID-a prikazani su u Tablici 1.2. (75).

1. UVOD

Tablica 1.2. Rizični čimbenici povezani s razvojem ARDS-a kod oboljelih od COVID-a

Demografski čimbenici
Starija životna dob (dob \geq 60 godina)
Muški spol
Kronični komorbiditeti
Arterijska hipertenzija
Šećerna bolest
Pretilost i metabolički sindrom
Kronične bolesti pluća, bubrega i jetre
Maligne bolesti
Prirođena ili stečena imunodeficijencija
Laboratorijski i klinički parametri
SaO ₂ <93% na sobnom zraku
Više vrijednosti bodovnog sustava SOFA
Limfopenija
Povišene vrijednosti CRP-a, LDH, IL-6 i feritina

Legenda. SaO₂ – saturacija arterijske krvi kisikom; SOFA (engl. *The Sequential Organ Failure Assessment Score*); CRP – C-reaktivni protein; LDH – laktat dehidrogenaza; IL-6 – interleukin 6.

Genska predispozicija za razvoj ARDS-a također je ispitivana kod ovih bolesnika te su provedena istraživanja povezanosti cijelog genoma, kao i gena kandidata povezanih s većom osjetljivošću za razvoj ARDS-a (76). U istraživanju cijelog genoma nekoliko je lokusa identificirano kao moguća poveznica s razvojem težih oblika bolesti COVID-19, pa tako i ARDS-a, a najčešće se spominju lokusi 3p21.31 i 9q34.2 na kojima nalazimo gene za mnoge proupalne citokine (77, 78). Kao genski prediktori razvoja ARDS-a ispitivani su i polimorfizmi gena koji sudjeluju u procesu ulaska virusa u stanicu (najčešće polimorfizmi gena za serinsku transmembransku proteazu 2), kao i gena koji kodiraju stvaranje proupalnih citokina (interleukin 6, interleukin 1 β , čimbenik tumorske nekroze i dr.). Dobiveni rezultati nisu potpuno ujednačeni i u jednom su dijelu kontradiktorni (79, 80).

Početa izvješća upućivala su na visok postotak razvoja teških pneumonija i ARDS-a kod zaraženih bolesnika te su se ona procjenjivala u rasponu od 15 do 30 %, a smrtnost kod te skupine bolesnika bila je i do 80 % (71). Metaanaliza iz 2020., koja je obuhvatila 10.815 bolesnika s COVID-19 ARDS-om iz sedam europskih zemalja, pokazala je ukupno procijenjenu smrtnost od 39 %. Ta se smrtnost široko razlikovala u pojedinim zemljama te je bila najveća u Poljskoj (73 %), a najniža u Njemačkoj (13 %) (81). Visoke stope smrtnosti ponajprije su pripisivane sekundarnim bakterijskim infekcijama i s njima povezanim sepsama, a ne samim ARDS-om (82). Kako je vrijeme prolazilo i kako je zaraženih bilo sve više, a uz

1. UVOD

pojavu slabije patogenih virusnih sojeva, razvoja imunosti, bilo prirodnim putem ili procjepljivanjem, tako je i pojavnost težih oblika COVID-a, a time i ARDS-a, opadala, stoga da se ona sada procjenjuje na 3 do 5 % (83). Ukupno gledano, prema dosadašnjim izvješćima, smrtnost od COVID-19 ARDS-a široko varira od 3,4 do 88,3 %. Na ove brojeve treba gledati s više potencijalnih ograničenja, a dva su ključna – ujednačenost izbora ispitanika koji su ulazili u istraživanja (proučavana populacija) te čimbenici zdravstvenog sustava (mogućnosti i opterećenost ustanova koje su zbrinjavale najteže bolesnike) (84 – 87).

1.3. Kliničke karakteristike ARDS-a kod oboljelih od COVID-a

ARDS predstavlja najtežu i najozbiljniju komplikaciju bolesti COVID-19 (88). Današnja je službena definicija ARDS-a tzv. berlinska definicija iz 2012. koja, unatoč širokoj primjeni, ima sve više manjkavosti te zahtijeva novo redefiniranje (89). Ova se definicija oslanja na nekoliko osnovnih kriterija: vrijeme nastanka, radiološki nalaz pluća (klasični radiogram ili kompjutorizirana tomografija) te patofiziološko podrijetlo plućnog edema. Kriteriji za postavljanje dijagnoze ARDS-a prema ovoj definiciji jesu: 1) razvoj unutar sedam dana od početka djelovanja mogućeg uzroka, odnosno nastanka novih ili naglog pogoršanja postojećih respiratornih smetnji; 2) prisutnost bilateralnih, difuznih radioloških infiltrata koji se ne povezuju s atelektazom, plućnim nodusima ili efuzijom te 3) kliničko stanje bolesnika koje se ne povezuje sa srčanim popuštanjem ili volumnim opterećenjem (novonastalo akutno srčano popuštanje ili pogoršanje kroničnog srčanog popuštanja) (90). Jedna od osnovnih pretpostavki ove definicije jest i primjena navedenih kriterija samo na bolesnike kod kojih se u trenutku postavljanja dijagnoze primjenjuje pozitivni tlak na kraju ekspiririja (PEEP, engl. *Positive End-Expiratory Pressure*) od 5 ili više cmH_2O , što znači da su u trenutku postavljanja dijagnoze bolesnici već na mehaničkoj ventilacijskoj potpori (neinvazivnoj ili invazivnoj). Također, navedena definicija podrazumijeva i jasnu objektivizaciju, odnosno dijagnostičku procjenu, kao što je ehokardiografija, kako bi se isključio hidrostatski edem pluća (kardiogeni edem) kao uzrok respiratornog distresa kod bolesnika koji nemaju prisutan jasan čimbenik rizika koji može rezultirati razvojem ARDS-a. Kao i u prijašnjim definicijama, sama težina bolesti određena je $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ omjerom, tako da se na osnovi njega razlikuju tri stupnja težine ARDS-a: blagi ($200 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ uz $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$), umjereni ($100 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ uz $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$) te teški ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ uz $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$) (91).

1. UVOD

Dvije su najveće zamjerke kriterijima berlinske definicije ARDS-a u primjeni kod oboljelih od COVID-a, a to su kriterij prisutnosti PEEP-a pri postavljanju dijagnoze te vremenska odrednica postavljanja dijagnoze ARDS-a.

Zbog činjenice da se danas teški oblici respiratorne insuficijencije, koji mogu zadovoljiti berlinske kriterije definicije ARDS-a, liječe visokoprotocnim kisikom (HFNO, engl. *High Flow Nasal Oxygen*) i visokim FiO₂ bez primjene PEEP-a, jedan dio autora smatra se da kriterij prisutnosti primjene PEEP-a od najmanje 5 cmH₂O treba izbaciti iz aktualne definicije ARDS-a kako bi se ta dijagnoza mogla postaviti i ovoj skupini bolesnika (92). To bi značilo da dijagnoza ARDS-a ne mora biti nužno vezana uz primjenu neinvazivne ili invazivne mehaničke ventilacije, nego se može proširiti i na bolesnike koji se tretiraju visokoprotocnim kisikom, a što je najviše dolazilo do izražaja baš kod oboljelih od COVID-a kod kojih je ta metoda respiratorne potpore bila široko primjenjivana. Neki autori zagovaraju da, osim PEEP-a, iz definicije ARDS-a kod oboljelih od COVID-a treba isključiti i naziv uređaja koji se koristi za isporuku kisika kako bi se omogućila dijagnoza ARDS-a i u uvjetima i lokacijama koji nemaju mogućnost pristupa visokoprotocnom kisiku ili mehaničkoj ventilaciji. Iako je opravdano u uvjetima kao što je pandemija bolesti COVID-19, to bi moglo dovesti i do ublažavanja težine kliničkog stanja označenog kao ARDS jer bi se potencijalno mogli uključivati i bolesnici s boljom prognozom, odnosno lakšim oblikom respiratornog distresa, što bi pak dovelo do nerealne objektivizacije kliničke težine ovog stanja (93).

Također, pitanje definiranja vremenskog okvira u kojemu bolesnici moraju ispuniti kriterije za postavljanje dijagnoze ARDS-a ostaje predmetom rasprave. Razvoj, kao i trajanje ARDS-a, uvjetovano je višestrukim čimbenicima, ponajprije samim uzrokom i individualnim odgovorom bolesnika na njega (1). S obzirom na prirodan i relativno predvidiv tijek koronavirusne infekcije, vremenski okvir od 7 dana za postavljanje dijagnoze ARDS-a, prema berlinskim kriterijima, nije u cijelosti prihvatljiv. Prosječno, od početka simptoma do intubacije i početka mehaničke ventilacije kod oboljelih od COVID-a kod kojih je to bilo potrebno, prošlo bi 8 i pol dana, što je u skladu s drugim izvješćima i studijama u kojima se navodi da se ARDS najčešće razvijao kod ovih bolesnika između 8. i 14. dana od početka simptoma (94 – 97).

1. UVOD

Iz gore opisanih činjenica, koje pak mogu utjecati na postavljanje dijagnoze ARDS-a kod oboljelih od COVID-a, danas se sve više govori o potrebi za redefiniranjem vrijedećih berlinskih kriterija iz 2012. (98). Također, iz toga razloga mnogi su autori u svojim radovima pri definiranju dijagnoze ARDS-a kod oboljelih od COVID-a u obzir uzimali i ove čimbenike, osobito kriterij prisutnosti PEEP-a za postavljanje dijagnoze te vremenski okvir razvoja ARDS-a, tako da su uključivali bolesnike i kojima nije nužno primjenjivan PEEP i one kojima se respiratorni distres razvijao i nakon sedam dana (99).

Velik broj studija i radova upućuje na određene kliničke razlike između klasičnog ARDS-a i ARDS-a koji vidamo kod oboljelih od COVID-a (100). U kliničkom pogledu kod bolesnikâ s COVID-19 ARDS-om do izražaja dolazi nekonzistentnost laboratorijskih i radioloških nalaza s kliničkim manifestacijama. Temeljno kliničko obilježje kod ovih bolesnika bila je tzv. tiha hipoksija (engl. *Silent Hypoxia*). Bolesnici bi s niskim vrijednostima PaO₂ i opsežnim radiološkim nalazima dobro tolerirali takvo stanje, ne bi imali izraženu dispneju i/ili tahipneju, a laktati bi bili uredni. Međutim, takvi bolesnici imaju tendenciju naglog pogoršanja, zbog čega zahtijevaju pojačani nadzor (97, 101). Radiološki, ARDS kod ovih bolesnika češće obilježava pojavnost uzorka zrnatog stakla (GGO, engl. *Ground-Glass Opacification*) s perifernom bilateralnom raspodjelom u odnosu na konsolidacije plućnog parenhima koji se češće viđaju u klasičnom ARDS-u (102). S razvojem i progresijom COVID-19 ARDS-a, opseg zahvaćenosti pluća povećava se te se formiraju konsolidacijska žarišta koja postaju multifokalna i jače izražena u donjim dijelovima pluća (103).

Također, ovi bolesnici razlikovali su se od onih s klasičnim ARDS-om i u pitanju plućne popustljivosti koja je kod većine bolesnika bila relativno normalna i očuvana (100). U klasičnom ARDS-u od samih početaka dominira H fenotip, dok je ARDS kod oboljelih od COVID-a pretežno L fenotipa, a tek u kasnijim fazama poprima karakteristike H fenotipa, odnosno dolazi do smanjenja plućne popustljivosti (104). Budući da L fenotip karakterizira normalna ili povišena plućna popustljivost, količina plinova u plućima gotovo je normalna i oni nemaju veću korist od primjene PEEP-a, štoviše, on može dovesti do dodatnih oštećenja pluća (105). Također, važna karakteristika ovih bolesnika jest i gubitak sposobnosti regulacije perfuzije, tj. hipoksične vazokonstrikcije, zbog čega venska primjesa krvi u arterijskom dijelu plućne cirkulacije može iznositi i do 50 % te su ti bolesnici pogodni za liječenje visokim FiO₂. Zbog ovih karakteristika ti bolesnici dobro toleriraju primjenu visokoprotocnog kisika (106). Progresijom upalnog zbivanja i oštećenjem endotela plućnih

1. UVOD

kapilara, dolazi do povećanja permabilnosti alvelokapilarne stijenke, eksudacije i nastanka plućnog edema. Posljedično tome, dolazi do pada plućne popustljivosti i smanjenja volumena plinova u plućima, što je osnovna karakteristika H fenotipa ARDS-a. Zbog toga, ti bolesnici imaju veću korist od primjene PEEP-a jer sama oksigenacija (FiO_2) neće biti dovoljna za ispravljanje nastale hipoksemije (107). Poznavanje ovih karakteristika od velike je važnosti u kliničkoj praksi zbog ispravnog izbora metode respiratorne potpore. Bolesnici s L fenotipom pogodni su za liječenje visokoprotočnim kisikom, ali često se i pozorno moraju pratiti zbog sklonosti nagloj progresiji u H fenotip, koji zahtijeva primjenu PEEP-a, što pak omogućava mehanička ventilacija (104). Dodatnu korist u postizanju bolje oksigenacije imali su bolesnici s H fenotipom ARDS-a pri primjeni rekrutment manevara i ventilacije bolesnika u pronacijskom položaju s obzirom na to da ti bolesnici imaju povećani opseg neventiliranih alveola. Rekrutment manevrima primjenjuju se visoki tlakovi u dišnim putovima u kraće vrijeme čime se postiže otvaranje neventiliranih alveola, a postavljanjem bolesnika u pronacijski položaj, dolazi do redistribucije plućnog edema iz dorzalnih u ventralne dijelove pluća, uklanja se težina srca s pluća te se smanjuje intrapulmonalni mimotok (šant) (108, 109).

Također, dodatne spoznaje o povezanosti težine COVID-a s hiperinflamatornim stanjem (citokinskom olujom), kao i pojačanom koagulabilnosti, imale su utjecaj na formiranje stavova o primjeni kortikosteroida i antikoagulantnih lijekova kod ovih bolesnika (110). Početne preporuke za primjenu sistemskih kortikosteroida kod teških oblika COVID-a temeljene su na manjim serijama slučajeva (111, 112), a prva veća studija bila je RECOVERY iz lipnja 2020. Riječ je o velikoj randomiziranoj multicentričnoj studiji koja je pokazala jasnu korist od primjene sistemskog kortikosteroida (deksametazon) u pogledu smanjenja smrtnosti, osobito kod bolesnika koji su zahtijevali mehaničku ventilaciju (113). S obzirom na pojedine studije koje sugeriraju da je primjena metilprednizolona imala veću korist u pogledu smanjenja smrtnosti u odnosu na deksametazon kod bolesnika koji su mehanički ventilirani (114, 115), većina je kliničara kod tih bolesnika češće primjenjivala metilprednizolon u odnosu na deksametazon. Iako su često primjenjivane visoke doze metilprednizolona kod najteže oboljelih, one nisu bile povezane s boljim kliničkim ishodima (116). Učestalost je tromboembolijskih incidenata kod bolesnika s COVID-om povišena, a patohistološki preparati pluća obduciranih bolesnika upućuju na veću učestalost mikrotromba i mikroangiopatije u plućnim kapilarama (117, 118). Ovo se tumači činjenicom povećanog izražaja ACE2 receptora na endotelnim stanicama i time povezanim tropizmom virusa SARS-

1. UVOD

CoV-2 prema njima, što rezultira generaliziranom endotealnom disfunkcijom i hiperkoagulabilnim stanjem (119). Rano uvođenje profilaktičke primjene antikoagulantnih lijekova kod oboljelih od COVID-a, u usporedbi s bolesnicima koji ih nisu dobivali, pokazalo je smanjenje stope smrtnosti od 27 % na uzorku od gotovo 5.000 bolesnika (120), dok uvođenje antikoagulantne terapije u trenu primanja bolesnika u jedinicu intenzivnog liječenja nije donijelo takve rezultate (121). Na temelju tih i sličnih istraživanja, antikoagulantno liječenje postalo je standardom liječenja oboljelih od COVID-a, i to ne samo onih koji su razvijali najteže oblike i završavali u jedinicama intenzivnog liječenja (122).

1.4. Imunopatogeneza ARDS-a i COVID-a

Infekcija virusom SARS-CoV-2 dovodi do poremećaja imunskog odgovora, osobito stanica urođene imunosti, što kod najtežih oblika COVID-a rezultira njihovom prekomjernom aktivacijom i pojačanim stvaranjem proupalnih citokina, što vodi u hiperinflamatorno stanje koje nazivamo citokinska oluja (123). Danas je sve više dokaza da je ARDS uzrokovan virusima te da je njegova progresija usko povezana s određenim imunskim obrascima kao što su: pojačana aktivacija stanica urođene imunosti, smanjeni broj limfocita T, smanjeni broj NK stanica, pojačana proizvodnja proupalnih citokina i dr. (124). Razumijevanje i otkrivanje molekula uključenih u te složene interakcije pomaže razumijevanju razvoja i progresije ARDS-a, a predstavljaju i potencijalne farmakoterapijske ciljeve.

Inicijalni događaj u imunopatogenzi infekcijom koronavirusa ulazak je virusa u stanice domaćina i aktivacija stanica urođene imunosti. Ulazak virusa SARS-CoV-2 u stanice domaćina posredovan je endocitozom posredovanom ACE2 receptorom. Nakon ulaska virusne čestice u stanicu domaćina, razgrađuje se virusna ovojnica i oslobađa virusna RNK u citoplazmu (125). Kako je već rečeno, visoka ekspresija ACE2 receptora na površini epitelnih stanica dišnog sustava čini ovaj sustav glavnim mjestom ulaska virusa, kao i posljedičnog oštećenja (126). Vezanje virusa za ACE2 receptor omogućava šiljasti protein virusne ovojnice. On se sastoji od dvije podjedinice: S1 i S2. S1 podjedinica omogućava prepoznavanje ACE2 receptora, pri čemu glavnu ulogu ima receptor vezajuća domena (RBD, engl. *Receptor-Binding Domain*), a S2 podjedinica posreduje procese spajanja (fuzije) virusne ovojnice i stanične membrane. Kako bi u konačnici došlo do internalizacije virusne čestice u stanicu domaćina, mora doći do cijepanja tih dviju podjedinica, a što omogućavaju enzimi transmembranska serinska proteaza 2 te membranska proteaza furin koje su, kao i ACE2

1. UVOD

receptor, eksprimirane na samoj površini stanica (127). Prema tome, osim pojačane ekspresije ACE2 receptora na površini epitelnih stanica dišnog sustava, za bolju prijemчивost virusa odgovorna je i pojačana ekspresija transmembranske serinske proteaze 2, koja je najveća u donjem dijelu dišnog sustava (na površini alveolarnih epitelnih stanica tipa 2) (128). Nakon ulaska virusa u stanice i oslobađanja virusne RNK molekule, dolazi do translacije gena u strukturne i nestrukturne proteine koji formiraju nove virusne čestice koje se putem egzocitoze izbacuju iz zaraženih stanica i imaju sposobnost zaražavanja okolnih stanica (129).

Sljedeći korak u imunopatogenezi difuznog alveolarnog oštećenja koji vodi u ARDS jest aktivacija stanica urođenog imunskog odgovora, posebice neutrofila, makrofaga, mastocita i dendritičkih stanica (130). Taj proces započinje još u citoplazmi zaražene stanice domaćina. U njihovoj citoplazmi nalazimo PRR receptore (engl. *Pattern Recognition Receptors*) koji prepoznaju molekule tipične za patogene (PAMP, engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), a što su u ovom slučaju dugi lanci virusne RNK koji nastaju u procesu replikacije (131). Glavni PRR receptori koji prepoznaju RNK virusa SARS-CoV-2 jesu TLR receptori (engl. *Toll-Like Receptors*), među kojima je ključan MDA5 receptor (132, 133). Aktivacija TLR receptora pokreće unutarstanične signalizacijske putove (interferonski regulatorni faktor, nuklearni faktor- κ B) koji potiču gensku ekspresiju i transkripciju interferona I i III te proupalnih citokina i kemokina koji se zatim luče i dovode do kemotaksije i aktivacije stanica urođene imunosti (134, 135). Aktivirane stanice urođene imunosti dovode do fagocitoze i uništenja zaraženih stanica, što čini prvu crtu obrane organizma od virusa SARS-CoV-2. Osim virusne RNK, i šiljasti protein (protein S) djeluje kao snažna PAMP molekula koja može aktivirati TLR receptore, posebice TLR2 koji je, osim u citoplazmi, eksprimiran i na površini epitelnih stanica, kao i makrofaga. Tako se TLR receptori mogu aktivirati i bez samog ulaska virusa u stanice domaćina (136). Imunogena svojstva ostalih strukturnih proteina virusne čestice, osobito kada je riječ o aktivaciji TLR receptora, nisu toliko istražena (137). Treba napomenuti da TLR receptori, osim u aktivaciji imunskog odgovora, imaju i izravno antivirusno djelovanje. Stvaranje interferona I i III aktivacijom TLR-a govori u prilog antivirusnoj ulozi TLR receptora. Iako je ukupno gledano izražaj TLR-a povišen kod bolesnika s infekcijom koronavirusom (138), kod onih s teškim oblicima bolesti oni su sniženi (139, 140). Također, u prilog antivirusnoj ulozi TLR receptora govori i istraživanje Totura i suradnika, koji su pokazali da miševi kojima nedostaje gen za TLR3 receptor imaju veću stopu smrtnosti od zaraze koronavirusom (141).

1. UVOD

Međutim, aktivacija TLR-a može djelovati kao dvosjekli mač s obzirom na to da njihova nekontrolirana aktivacija vodi u hiperinflamatorno stanje koje dovodi do opsežnog oštećenja tkiva, u ovom pogledu alveolarnog epitela (142). Njihovoj nekontroliranoj aktivaciji pridonosi i činjenica da ih mogu aktivirati i molekule povezane s oštećenjem tkiva (DAMP, engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*), a to su ponajprije raspadnuti dijelovi mitohondrija stanica domaćina (143). Tako se stvara začarani krug u kojemu se sve snažnije aktiviraju stanice urođene imunosti koje otpuštaju velike količine proupalnih citokina (citokinska oluja), koji, osim u posredovanju nastanka ARDS-a, imaju ulogu i u nastanku višeorganskog zatajenja koje se viđa kod kritično oboljelih od COVID-a (144). U serumu bolesnika oboljelih od teških oblika bolesti COVID-19 nalazimo povišeni široki spektar proupalnih citokina i medijatora: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-7, G-CSF, MCP-1, TNF- α i dr. (145). Takvo stanje citokinske oluje pomaže u regrutiranju cirkulirajućih makrofaga, neutrofila i mastocita na mjesto ozljede uzrokujući opsežna oštećenja epitela i endotela pluća te nastanak difuznog alveolarnog oštećenja i ARDS-a (146). Overmyer i suradnici dokazali su, koristeći se masenom spektrometrijom visoke rezolucije, da je aktivacija neutrofila izravno povezana s težinom bolesti COVID-19 i nastalim difuznim alveolarnim oštećenjem (147). Aktivirani neutrofil mijenjaju svoju strukturu citoskeleta, migriraju kroz kapilare u intersticij i alveole te luče brojne proteaze koje dovode do oštećenja alveolokapilarne membrane i pridonose nastanku edema (148). Oni mogu oslobađati i retikularnu strukturu s dvolančanom molekulom DNK koja sadržava niz baktericidnih proteina, koja se naziva NET struktura (engl. *Neutrophil Extracellular Traps*). Ona učinkovito sudjeluje u eliminaciji patogena, kao i domaćih stanica zaraženih patogenima (149). Zuo i suradnici pronašli su povišene razine NET struktura u serumu kod bolesnikâ s COVID-19 ARDS-om, a njihova povećana razina nađena i je u tkivu pluća obduciranih bolesnika (150, 151). Također, aktivirani neutrofil oštećuju i endotelne stanice, što pridonosi aktivaciji koagulacijskog slijeda, nastanku tromboze i taloženju fibrina, a što su bitne patohistološke karakteristike kod ovih bolesnika (152).

Osim pojačane aktivacije stanica urođene imunosti i s njima povezanog hiperinflamatornog stanja i citokinske oluje, kod oboljelih od COVID-a nalazimo i druge poremećaje imuniteta. Limfopenija je jedna od ključnih značajki teže oboljelih od COVID-a te bolesnici koji su na početku bolesti imali jače izraženu limfopeniju imali su teži klinički tijek i lošije ishode. Mehanizam nastanka limfopenije kod ovih bolesnika nije poznat (153). Kod bolesnikâ s COVID-om nalazimo smanjenje broja CD4+, CD8+ te NK stanica (154).

1. UVOD

Studije su pokazale da kod teško oboljelih postoji znatno sniženi broj citotoksičnih limfocita T u bronhoalveolarnom lavatu, odnosno tkivu pluća obduciranih bolesnika. To bi moglo biti posljedica hiperaktivacije T stanica ili pojačane ekspresije CD95 molekule i kaspaze 3 koje predstavljaju proapoptotične molekule (155, 156). Citotoksični CD8+ limfociti T glavni su efektori stanično posredovanog odgovora imunskog sustava na virus SARS-CoV-2 (157). Iako je jasna uloga limfocita B u produkciji specifičnih protutijela (IgG i IgM), njihova točna uloga u pogledu nastanka težih oblika COVID-a i ARDS-a nije opisana (158). Zhang i suradnici pokazali su da su povećane koncentracije IgG protutijela bile povezane s težim oblicima bolesti (159), a slično su prikazali i Zhao i suradnici (160). To upućuje na to da je aktivacija i proliferacija limfocita B kod oboljelih od COVID-a, a osobito kod onih s težim oblicima, povezana s lošijim kliničkim ishodima (161).

Zaključno, imunopatogenezu COVID-a čini ulazak virusa SARS-CoV-2 u stanice domaćina, što najprije dovodi do aktivacije stanica urođene imunosti koje prepoznaju patogene i zaražene stanice te proizvode proupalne medijatore. Taj korak prate i aktivacija stanica stečene imunosti, limfocita T koji imaju izravan citotoksični učinak, kao i limfocita B, koji proizvode protutijela specifična za virus SARS-CoV-2. Kada je riječ o nastanku difuznog alveolarnog oštećenja i ARDS-a kod ovih bolesnika, prema dosadašnjim istraživanjima, ima aktivacija stanica urođene imunosti, osobito neutrofila i s njima povezano nastajanje hiperinflamatornog stanja zvanog citokinska oluja (123).

1.5.Uloga interleukina 33 i kalpaina 1 u razvoju ARDS-a

Poznavanje molekula i molekularnih mehanizama odgovornih za nastanak hiperinflamatornog stanja u razvoju ARDS-a predmet je mnogih radova i istraživanja, a osim u pogledu razumijevanja patofiziologije, one imaju i farmakološku važnost jer su mnoge od njih i potencijalni terapijski ciljevi. Interleukin 33 (IL-33) jedan je od važnijih citokina čija se uloga ispituje u razvoju ARDS-a. U više istraživanja dokazana je njegova povišena razina u serumu i bronhoalveolarnom lavatu životinja kod kojih je izazvan razvoj ARDS-a (162, 163), a njegove povišene razine nađene su i kod osoba oboljelih od ARDS-a, što upućuje na njegovu patofiziološku ulogu i karakteristike (164). Kalpainski sustav, osobito cisteinska proteaza kalpain 1, također je predmetom ispitivanja u razvoju ARDS-a. Njegova uloga u nastanku ARDS-a povezuje se s njegovom ulogom induktora apoptoze te proinflamatornim i profibrotičkim učinkom (19). Također, sve je više istraživanja koja ispituju potencijalnu

1. UVOD

međusobnu povezanost IL-33 i kalpaina 1 s obzirom na to da je dokazana uloga kalpaina u proteolitičkom cijepanju i aktivaciji IL-33 (165).

IL-33 protein je veličine 31 kDa sastavljen od 270 aminokiselina koji pripada obitelji citokina IL-1, a koji se oslobađa iz stanica kao odgovor na različita oštećenja te se stoga ubraja u tzv. stanične alarmine (166). Svi članovi obitelji IL-1 citokina (ukupno njih jedanaest) dijele sličnu molekularnu strukturu, kodirani su genima smještenim na drugom kromosomu (osim IL-33 čiji se gen nalazi na devetom kromosomu i IL-18 čiji se gen nalazi na jedanaestom kromosomu) te djeluju kao proupalni medijatori koji posreduju lokalni i sistemski upalni odgovor (167). IL-33 otkriven je 2003. kao nuklearni faktor podrijetlom iz endotelnih stanica, no danas se zna za njegovu široku rasprostranjenost u organizmu te pleomorfne učinke. IL-33 sudjeluje i u fiziološkim homeostatskim mehanizmima i u patološkim stanjima, posebno u nastanku upale i tumora (168). Osim u endotelnim stanicama, izvor IL-33 nalazimo i u fibroblastima, glatkim mišićnim stanicama, osteoblastima, adipocitima i imunskim stanicama kao što su makrofazi i dendritičke stanice (169). Humani IL-33 ima specifičnu molekularnu organizaciju, tako da se sastoji od tri funkcionalne domene: nuklearne domene, središnje domene i domene slične citokinu IL-1. Nuklearnu domenu čini prvih 65 aminokiselina, a ona omogućava vezanje IL-33 za kromatin interakcijom s dimerom histona H2A-H2B. Ta domena osigurava djelovanje IL-33 kao nuklearnog faktora, odnosno omogućava njegove učinke unutar jezgre (endogeni učinak). Središnju domenu čine sljedećih 45 aminokiselina (aminokiseline 66 - 111), a ona predstavlja mjesto proteolitičkog cijepanja koje posreduju proteaze iz neutrofila i mastocita (neutrofilna elastaza i proteaza, katepsin G, kimaza, triptaza i dr.). Na taj se način odvaja nuklearna domena od domene slične citokinu IL-1 koju čini završni aminokiselinski slijed (aminokiseline 112-270) i koja se veže na specifične receptore na površini drugih stanica putem kojih ostvaruje svoje proupalne i druge učinke (egzogeni učinak) (170). IL-33 u svojoj punoj strukturi, koja se sastoji od ove tri domene, predstavlja neaktivnih oblik koji se naziva pro-IL-33, a on postaje aktivan tek nakon navedenog proteolitičkog cijepanja. Danas se smatra da kalpaini imaju važnu ulogu u tom proteolitičkom cijepanju, osobito u najranijim fazama staničnog oštećenja jer je potrebno vrijeme da se pojave aktivirani neutrofil i mastociti. Ovu ulogu kalpaina dokazali su Hayakawa i suradnici na modelima humanih epitelnih stanica, a isto su dokazali i Scott i suradnici na animalnom mišjem modelu akutne ozljede pluća (165, 171). Aktivni IL-33 posreduje svoj učinak vezanjem ST-2 receptora koji dolazi u dva oblika: transmembranski (ST2L) i solubilni (sST2). ST2L receptore nalazimo na membranama različitih upalnih

1. UVOD

stanica čijom se aktivacijom pokreće slijed unutarstaničnih mehanizama koji će u konačnici rezultirati povećanom proizvodnjom drugih proupalnih medijatora, dok vezanje IL-33 na sST2 receptor smanjuje njegov učinak jer sST2 djeluje kao receptor mamac (engl. *decoy receptor*) koji na sebe veže IL-33 i posreduje njegovu sekvestraciju i inaktivaciju (172 – 174). IL33/ST2L kompleks pokreće unutarstaničnu kaskadu koja uključuje ubikvitarni IL-1R pridodani protein (IL-1RAcP, engl. *IL-1R Accessory Protein*) rezultirajući aktivacijom različitih transkripcijskih faktora, kao što je NF- κ B te proizvodnjom proupalnih medijatora (173). Iako je jasno da IL-33 djeluje i kao nuklearni faktor te da ima sposobnost vezanja za molekulu DNK unutar jezgre, specifični transkripcijski ciljevi i biološki učinci tog vezanja nisu do kraja poznati (175). IL-33 više je autora prepoznalo kao snažni aktivator stanica urođene imunosti, osobito neutrofila i makrofaga, a koji imaju glavnu ulogu u razvoju ARDS-a (176 – 178).

Uloga IL-33 opisana je u više radova i istraživanja u pogledu nastanka i razvoja upale pluća (179 – 181). Na temelju tih spoznaja, kao i spoznaja o učincima IL-33, ispitivana je i njegova uloga u vezi nastanka ARDS-a na animalnim modelima. Fu i suradnici dokazali su povišene razine IL-33 u serumu, bronhoalveolarnom lavatau i plućnom tkivu miševa kojima je izazvan ARDS primjenom lipopolisaharida u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, povišene vrijednosti IL-33 pozitivno su korelirale i s vrijednostima drugih proupalnih citokina (162). Slične rezultate dobili su Lei i suradnici koji su također našli povišenu razinu IL-33 u serumu i bronhoalveolarnom lavatu miševa kod kojih je izazvan ARDS, a njihove vrijednosti pozitivno su korelirale s transkripcijskim faktorom NF- κ B, koji je dio prije opisanog IL33/ST2L signalnog puta (163). Cheng i suradnici dokazali su u svom radu u kojemu su korišteni *knockout* miševi za IL-33 da je nedostatak IL-33 ublažio akutnu ozljedu pluća u LPS-induciranom ARDS-u (182). Također, u radu Tana i suradnika, miševi koji su imali blokirane ST2 receptore imali su manju plućnu ozljedu i bržu regeneraciju u odnosu na kontrolnu skupinu (183). U radu Martinez-Gonzaleza i suradnika, u kojemu su primjenjivali mezenhimalne matične stanice derivirane iz masnog tkiva koje su na svojoj površini imale povećanu ekspresiju sST2 receptora kod miševa kod kojih su prethodno izazvali ARDS, dokazana je smanjena koncentracija IL-33 u serumu i bronhoalveolarnom lavatu, kao i blaže patohistološke promjene na plućima, što potvrđuje ulogu IL-33 u razvoju ARDS-a (184). Postoje i radovi koji sugeriraju na moguću protektivnu ulogu IL-33 u kontroli lokalne upale nakon plućne ozljede. Liu i suradnici opisali su da je lučenje IL-13 posredovano IL-33 i ST2 receptorima na T regulatornim stanicama nakon ozljede pluća uzrokovane belomicinom kod

1. UVOD

miševa povezano s boljim ishodima u odnosu na miševe s nedostatkom IL-33 (185). Povišene vrijednosti IL-33 nađene su i kod bolesnika koji su imali ARDS. Lin i suradnici dokazali su povišene serumske razine IL-33 kod bolesnika s ARDS-om u odnosu na kontrolnu skupinu (zdravi dobrovoljci), ali se radilo o relativno malom uzorku (164). Halat i suradnici na većem uzorku koji je obuhvaćao 130 politraumatiziranih bolesnika dokazali su da su povišene serumske vrijednosti IL-33 bile povezane s nastankom traumatskog ARDS-a (186). Povišenu razinu IL-33 u serumu i/ili bronhoalveolarnom lavatu nalazimo i kod bolesnika s drugim upalnim plućnim oboljenjima, kao što su astma, kronična opstruktivna plućna bolest te akutna eozinofilna pneumonija (187) te plućnom fibrozom (188).

Kalpainski sustav čini veliku skupinu cistinskih proteaza ovisnih o kalciju, smještenih u citoplazmi stanice. Od ukupno 15 enzima, najstariji i najistraživaniji jesu klain 1 i kalpain 2, a u ovisnosti o vrijednosti kalcija koje su potrebne za njihovu aktivaciju, kalpain 1 naziva se još i „ μ “ kalpain (mikromolarna koncentracija), a kalpain 2 „ m “ kalpain (milimolarna koncentracija) (189). Iako su oba kalpaina ubikvitarna i nalaze se gotovo u svim stanicama, kalpain 1 češće je ispitan u pogledu plućne patologije. Većina ostalih kalpaina tkivno su specifična (190 – 193).

Kalpain 1 heterodimer građen je od dviju podjedinica: veće (katalitičke) i manje (regulatorne). Veća podjedinica (80 kDa) sastoji se od četiri domene: domene I ili N-terminalne domene, domene II ili katalitičke domene, koja je podijeljena u dvije globularne jezgrine poddomene (PC1 i PC2), domene III, koja se naziva još i kalpainskom β -sendvič domenom te domene IV koja sadržava penta-EF izdanak. Domena I sudjeluje u održavanju inaktivnog stanja kalpaina, domena II omogućava proteolitičko djelovanje koje je posredovano aminokiselinskim slijedom cistein-histidin-asparagin (katalitička trijada), domena III ima sposobnost vezanja kalcija i sudjeluje u regulaciji enzimske aktivnosti dok domena IV ima važnu ulogu u aktivaciji samog enzima. Manja podjedinica (28 kDa) sastoji se od dvije domene (domena V i IV) koje služe za vezanje na domenu IV velike podjedinice stvarajući tako stabilni heterodimer (190, 194). Kalpain 1 nalazi se u citoplazmi kao neaktivni proenzim, što mu omogućava njegov endogeni inhibitor – kalpastatin za koji je kompetitivno vezan (195). Kalpastatin specifično inhibira aktivnost kalpaina 1 i 2, dok mu nije utvrđena uloga kao inhibitora drugih proteaza. Radi se o proteinskom monomeru koji je kodiran genom koji se nalazi na dugom kraku petog kromosoma, a dolazi u više izoformi koje se razlikuju po svojoj molekularnoj težini, ali ne i funkciji (196). Također, u posredovanju vezanja kalpaina i

1. UVOD

kalpastatina važnu ulogu ima kalcij, ali koncentracija kalcija koja je potrebna da se kalpaini vežu za kalpastatin znatno je niža od one koja je potrebna za proteolitičku aktivaciju kalpaina (189). Vežanje kalpastatina na kalpain 1 dovodi do njegove konformacijske promjene koja ga čini inaktivnim i nesposobnim za proteolitičko djelovanje (197).

Aktivacija kalpaina složen je proces u kojemu glavnu ulogu imaju ioni kalcija, a što je dokazano prikazima kristalne strukture kalpaina s vezanim kalcijem i bez njega. Time je dokazano da je aktivnost kalpaina izravno povezana s konformacijskim stanjem molekule koja uvjetuje izražaj katalitičke trijade. Konformacijsko stanje kalpaina razlikuje kada je na nju vezan kalcij (omogućava izražaj katalitičke trijade) i kada na sebi nema vezan kalcij (198 – 200). Klasični kalpaini, kakav je i kalpain 1, zahtijevaju visoke unutarstanične vrijednosti kalcija kako bi se aktivirali. Pri aktivaciji, dva iona kalcija vežu se za katalitičku domenu (domena II), jedan na PC1, a drugi na PC2 poddomenu, što dovodi do promjene konformacije β -sendvič domene (domena III). To uvjetuje cjelokupnu konformacijsku promjenu kalpaina, pri čemu se formira katalitička trijada cistein-histidin-asparagin koja ima proteolitičko djelovanje (201, 202). Osim toga, nakon vežanja kalcija za kalpain 1 na opisanim mjestima dolazi i do odvajanja te autolize N-terminalne domene (domena I) od ostatka molekule, što omogućava odvajanje od kalpastatina te razdvajanje katalitičke i regulatorne podjedinice, čime kalpain 1 postaje aktivan enzim (198). S obzirom na nisku intracelularnu koncentraciju kalcija koja je nedovoljna za aktivaciju kalpaina, oni su uglavnom inhibirani, a aktiviraju se u stanjima priljeva kalcija iz izvanstaničnog prostora ili unutarstaničnih skladišta (endoplazmatski retikulum) (203, 204). Osim kalcija, koji ima ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti kalpaina 1, neki radovi pokazuju da i drugi čimbenici mogu utjecati na njegovu aktivnost. Tako je opisano da se posttranslacijska obrada kalpaina 1 može odraziti na njegovu kasniju aktivnost, osobito fosforilacija koja može poticati njegovu aktivnost (205). Također, opisuje se i utjecaj dušikova oksida na smanjenje aktivnosti kalpaina 1, ali ona nije do kraja razjašnjena (206). Neizravno, na aktivnost kalpaina 1 utječu i njihovi inhibitori. Opisano je da fosforilacija kalpastatina smanjuje sposobnost inhibicije kalpaina 1 (207).

Jednom aktivirani kalpaini posreduju unutarstaničnu proteolitičku aktivnost koja djeluje modulatorno ili degradacijski na ciljane proteine (kalpainske mete) dovodeći do aktivacije signalnih molekula, što će u konačnici rezultirati pokretanjem unutarstaničnog puta i specifičnim učinkom. Razne su molekule supstrati za kalpain 1, uključujući proteine vezane uz citoplazmatsku membranu i citoskelet, proteine koji su sastavni dijelovi unutarstaničnih

1. UVOD

signalnih putova te transkripcijski čimbenici, što upućuje na njihov širok raspon uloga u fiziološkim uvjetima (189). Među prvim opisanim fiziološkim funkcijama kalpaina bilo je sudjelovanje u remodelaciji staničnog citoskeleta utjecajem na proteolitičku degradaciju citoskeletnih proteina (spektrin, kortaktin, ezrin, β -katenin). Dokazano je da ovo uvjetuje i staničnu pokretljivost, posebice fibroblasta i trombocita. Također, jedna od bitnijih funkcija kalpaina jeste i proapoptotička uloga pri pojačanom utoku kalcija u staničnu citoplazmu koja se obično događa zbog različitih staničnih inzulta, a sve više se govori o kalpainima u kontekstu modulatora upalnog odgovora (208). Povezanost kalpaina 1 i upalnog procesa ogleda se u njegovoj sposobnosti da razgradi I κ B, endogenog inhibitora nuklearnog faktora NF- κ B koji je odgovoran za ekspresiju brojnih proupalnih citokina i medijatora. Pri pojačanoj aktivaciji kalpaina dolazi i do pojačane razgradnje I κ B, što omogućava prekomjernu aktivnost NF- κ B i s time povezano povećano stvaranje proupalnih citokina (209). Virlos i suradnici opisali su antiinflamatorni učinak inhibitora kalpaina 1 prevenirajući aktivaciju NF- κ B u mišjem modelu akutnog pankreatitisa (210). Imunomodularni učinak kalpaina 1 u smislu pojačavanja upalnog odgovora i nastanka citokinske oluje, osim preko opisanog I κ B, ostvaruje se i na već opisan način putem IL-33. Kalpain 1 sudjeluje u proteolitičkom cijepanju pro-IL-33 u aktivni oblik IL-33 koji povećava ekspresiju NF- κ B (165, 211).

Uloga kalpaina proučava se u kontekstu brojnih patoloških stanja. Prekomjerna aktivacija kalpaina u patološkim uvjetima, kao što je bolest ili oštećenje tkiva, rezultat je poremećene i neregulirane homeostaze kalcija unutar stanica (212). Uloga kalpaina 1 najviše se ogleda u kontekstu povezanosti s upalnim stanjima, onkogenezom te nastankom fibroze, osobito plućne (209, 213, 214). Studije i istraživanja u kojima su korišteni inhibitori kalpaina sugeriraju da je aktivnost kalpaina uključena u patogenezu upalnih bolesti te da su inhibitori kalpaina imali zaštitnu ulogu (215). Uloga kalpaina opisana je u različitim bolestima te patofiziološkim mehanizmima (neurodegenerativne bolesti, posttraumatska ozljeda mozga, kardiomiopatija, ateroskleroza, astma, kronična opstruktivna plućna bolest, idiopatska plućna fibroza, karcinom pluća, metabolički sindrom i šećerna bolest, dermatomiozitis i dr.) (216).

Oštećenje epitelnih i endotelnih stanica tijekom difuznog alveolarnog oštećenja koje nalazimo u ARDS-u rezultirat će povećanjem intracelularne koncentracije kalcija. Dio kalcija otpušta se iz endoplazmatskog retikuluma, a dio zbog poremećaja specifičnih kalcijevih kanala unutar staničnih membrana, što je posljedica aktivacije TLR receptora (217). Ulogu povećanja intracitoplazmatske koncentracije kalcija u razvoju akutnog plućnog oštećenja

1. UVOD

opisali su Gandhirajan i suradnici na animalnom mišjem modelu ARDS-a (218). Također, povećanje intracitoplazmatske koncentracije kalcija nalazimo i u uvjetima pojačanog oksidativnog stresa koji je dio patofizioloških zbivanja u ARDS-u (219, 220). Prema tome, povećana aktivnost kalpaina 1 u ARDS-u uvjetovana je povišenjem intracitoplazmatske koncentracije kalcija.

Peng-Ran Du i suradnici dokazali su povećanu aktivnost kalpaina 1 kod štakora s induciranim akutnim oštećenjem pluća u odnosu na kontrolnu skupinu te upozorili na njegovu ulogu u pogledu pojačanja upalnog zbivanja te oštećenja stanične membrane (proteoliza membranskog skeleta) (221). Yi i suradnici kalpain 1 opisali su kao potencijalni novi biomarker akutnog oštećenja pluća nakon kardiopulmonalnog premoštenja. Bolesnici koji su imali povišene vrijednosti kalpaina 1 češće su razvijali postoperativni ARDS i imali su lošije kliničke ishode (222). Uloga kalpaina 1 u posredovanju nastanka ARDS-a ogleda se u nekoliko važnih koraka. Aktivirani kalpain 1 posreduje stanično oštećenje i vodi stanice u apoptozu, potiče upalni odgovor i proizvodnju proupalnih citokina te potiče proliferaciju fibroblasta i nastanak plućne fibroze koje karakterizira krajnji stadij ARDS-a. Jednom aktivirani, kalpaini razgrađuju membranske i citoplazmatske proteine, što dovodi do razgradnje stanične arhitekture i stanicu vodi u smrt (223). Kako je već opisano, pojačana aktivnost kalpaina 1 povezana je s degradacijom I κ B, čime izostaje inhibicija nuklearnog faktora NF- κ B, što rezultira pojačanom transkripcijom gena koji kodiraju brojne proupalne medijatore, čime se povećava upalno zbivanje i podržava nastanak citokinske oluje (209). U konačnici, kalpain 1 povećava aktivnost transformirajućeg čimbenika rasta β 1 (TGF- β 1), a on je jedan od ključnih čimbenika u nastanku plućne fibroze. Razvoj fibroze u kasnijoj fazi ARDS-a povezan je s lošijim kliničkim ishodima i povećanom smrtnosti (23, 192).

Na temelju navedenog, vidljivo je da IL-33, kao i kalpain 1, ima svoje mjesto u patofiziologiji razvoja ARDS-a, svaki zasebno, a vjerojatno i međusobnim djelovanjem, što ih čini važnim čimbenicima i predmetom daljnjih istraživanja i studija.

1.6. Dosadašnje spoznaje o ulozi IL-33 i kalpaina 1 u bolesti COVID-19

S obzirom na prijašnje radove koji su opisivali ulogu IL-33 i kalpaina u pogledu upalnih bolesti i imunomodulatornih učinaka, s pojavom pandemije bolesti COVID-19 oni su postali zanimljivi i kao mogući patofiziološki čimbenici i kao nove terapijske mete u bolesti

1. UVOD

COVID-19. Većina objavljenih radova jesu pregledni članci, a sve je veći broj radova koji su ispitivali ove čimbenike i na oboljelima od COVID-a.

U više je preglednih radova IL-33 istaknut kao mogući ključni čimbenik u razvoju citokinske oluje, iako točan učinak IL-33 na COVID-19 i temeljne imunopatogeneske mehanizme nije u cijelosti istražen i opisan (224). Gao i suradnici opisuju ulogu IL-33 u pogledu proliferacije, migracije i invazije neutrofila u pluća zaraženih osoba preko IL-33/ST2 signalnog puta, što pogoduje difuznom alveolarnom oštećenju, ali opisuju i utjecaj na smanjeni izražaj γ -interferona, što može utjecati na smanjenu sposobnost ograničavanja širenja virusa. Također, opisuju i stimulacijski utjecaj IL-33 na TGF- β , što može pogodovati napredovanju ARDS-a u fibroproliferativnu fazu (225). Furci i suradnici, također, IL-33 stavljaju na središnje mjesto u nastanku citokinske oluje kod oboljelih od COVID-a. Opisuju da se IL-33 oslobađa iz epitelnih stanica zaraženih virusom SARS-CoV-2, a koji vodi do disregulacije neutrofila i slabljenja antivirusne aktivnosti. IL-33 opisuju kao protagonista u održavanju i napredovanju upale pluća prema ARDS-u, što je praćeno stvaranjem i oslobađanjem brojnih proupalnih citokina (226). Zizzo i suradnici također upućuju na ulogu IL-33 u progresiji COVID-a, kao i progresiji ARDS-a te nastanku plućne fibroze. Također, opisuju i IL-33 kao prokoagulantni čimbenik, čime tumače povećanu učestalost tromboembolijskih incidenata kod ovih bolesnika (227). Liang je u svom radu prvi opisao utjecaj virusa SARS-CoV-2 na pojačanu ekspresiju IL-33 koristeći modele humanih epitelnih stanica koje su zarazili virusom SARS-CoV-2. Virusna proteaza slična papinu (PLpro) identificirana je kao ključna molekula u ovoj indukciji IL-33 (228). Nekolicina istraživača ispitivala je koncentracije IL-33 kod bolesnika oboljelih od COVID-a. Marković i suradnici uspoređivali su serumske vrijednosti IL-33 s težinom bolesti, kao i s radiografskim i kliničkim nalazima oboljelih od COVID-a. U navedenom radu našli su znatno više razine serumskog IL-33 kod bolesnikâ s težim oblicima COVID-a te su one pozitivno korelirale s drugim proupalnim citokinima (TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23). Opisali su IL-33 kao obećavajući prognostički marker te novi terapijski cilj u liječenju COVID-a (229). Moustava i suradnici također su našli povišene razine serumskog IL-33 u odnosu na zdrave dobrovoljce, a kod oboljelih, vrijednosti su rasle što je klinička slika bila teža (230). Slične rezultate dobili su i Majjed i suradnici koji su također u svom zaključku naveli da IL-33 može imati važnu prognostičku vrijednost u razvoju težih oblika COVID-a (231). Stanczak i suradnici detektirali su cirkulirajuće mononuklearne stanice u perifernoj krvi seropozitivnih bolesnika nakon preboljevanja COVID-a, a koje još uvijek imaju sposobnost i povećano stvaraju IL-33.

1. UVOD

Vrijednosti IL-33 kod tih ispitanika bile su više što je bolest bila teža (232). S obzirom na sve, IL-33 postao je zanimljiv i kao farmakološki cilj u liječenju oboljelih od COVID-a. ACCORD-2 klinička studija faze 2a ispitala je primjenu tozorakimaba, monoklalnog anti-IL-33 protutijela kod 97 hospitalno liječenih bolesnika s COVID-om (53 bolesnika primala su lijek, a 44 placebo). Rizik od razvoja respiratorne insuficijencije i smrti bio je niži kod bolesnika koji su dobivali tozorakimab, što ga stavlja u poziciju potencijalnog lijeka u liječenju oboljelih od COVID-a, a što zahtijeva daljnje studije faze 3 (233).

Manje je radova koji su ispitali odnos kalpaina 1 i bolesti COVID. Juibari i suradnici opisali su ulogu kalpaina u razvoju težih oblika COVID-a, posebice citokinske oluje i plućne fibroze. Pretpostavili su da primjena inhibitora kalpaina može imati ulogu u boljoj kontroli bolesti i prevenciji teških kliničkih oblika (19). Inal i suradnici opisali su potencijalnu ulogu kalpeptina, inhibitora konvencionalnih kalpaina u liječenju oboljelih od COVID-a. Njihova hipoteza temelji se na učinku kalpeptina u pogledu ometanja internalizacije virusa u stanice, smanjenju upalnog odgovora kao i sprječavanju nastanka plućne fibroze (234). Oslanjajući se na prethodna istraživanja, većina istraživanja u pogledu COVID-a temelji se na primjeni inhibitora kalpaina kao potencijalnih antivirusnih lijekova jer kalpaini mogu imati ulogu i u procesuiranju virusnih proteina (235, 236).

2. HIPOTEZA

2. HIPOTEZA

Povećana serumska aktivnost kalpaina 1 i serumska koncentracija IL-33 pridonose razvoju ARDS-a kod bolesnika s pneumonijom uzrokovanom SARS-CoV-2 virusom.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja jesu:

- Ispitati odnos aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u serumu ispitivane skupine koju čine bolesnici oboljeli od pneumonije uzrokovane SARS-CoV-2 virusom koji su razvili ARDS;
- Usporediti aktivnost kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u serumu bolesnika ispitivane skupine s vrijednostima istih u kontrolnoj skupini koju čine bolesnici oboljeli od pneumonije uzrokovane SARS-CoV-2 virusom, a koji nisu razvili ARDS;
- Ispitati povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u serumu s vrijednostima markera akutnog upalnog odgovora (C-reaktivni protein, feritin, fibrinogen, interleukin 6);
- Usporediti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u serumu unutar ispitivane skupine u ovisnosti o tome je li primijenjena mehanička ventilacija ili nije (bolesnici liječeni oksigenoterapijom).

4. ISPITANICI I METODE

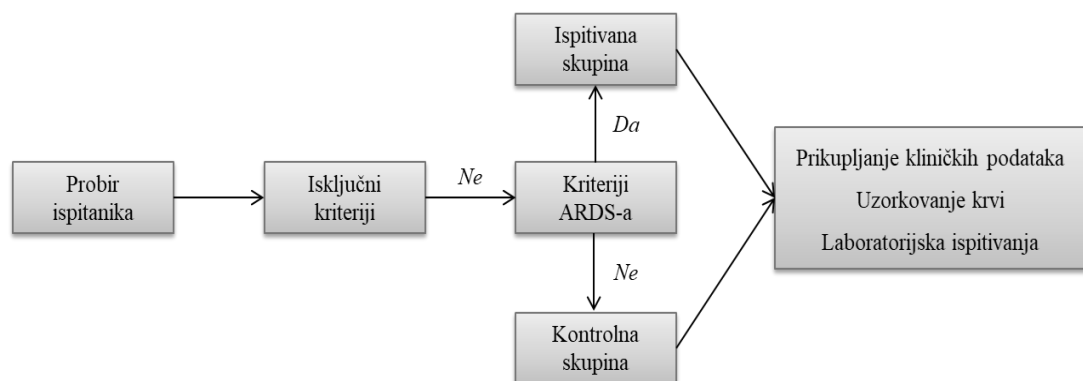
4. ISPITANICI I METODE

4.1. Etička načela istraživanja

Provedeno istraživanje, s ciljem izrade ove doktorske disertacije, odobreno je od strane nadležnih etičkih povjerenstava: Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Osijek (R-208/201) te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (2158-61-07-21-141). Istraživanje je provedeno u skladu s važećim pravnim aktima i dokumentima: Helsinška deklaracija, Kodeks medicinske etike i deontologije Hrvatske liječničke komore, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske te Zakon o zaštiti prava pacijenata Republike Hrvatske. Tijekom i nakon završenog istraživanja osobni identitet bolesnikâ koji su uključeni u ovo istraživanje ostao je anonimn i zaštićen.

4.2. Ustroj istraživanja

Istraživanje je postavljeno kao istraživanje parova (engl. *case-control study*), a koje je provedeno tijekom drugog i trećeg epidemijskog vala COVID-19 bolesti u Republici Hrvatskoj (siječanj – rujn 2021. godine). Ustroj i protokol istraživanja prikazani su shematski na slici 4.1.



Slika 4.1. Ustroj i protokol istraživanja

Izvor: izradio autor rada

4.3. Ispitanici uključeni u istraživanje

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 80 bolesnika starijih od 18 godina oba spola s potvrđenom dijagnozom pneumonije uzrokovanom SARS-CoV-2 virusom temeljenom na

4. ISPITANICI I METODE

pozitivnom testu lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction, PCR*) i radiološkim nalazom pluća (prisutnost upalnih infiltrata), a koji su zahtijevali daljnje liječenje; ambulantno (dnevna bolnica) ili hospitalno. Radi se o bolesnicima čije je liječenje provedeno na Klinici za infektologiju te Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Osijek. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: ispitivana i kontrolna, a svaka je imala po 40 ispitanika.

4.3.1. Ispitivana skupina

Ispitivanu skupinu činili su hospitalizirani bolesnici oboljeli od COVID-19 pneumonije, a kod kojih je došlo do razvoja ARDS-a te su u svom liječenju zahtijevali liječenje mehaničkom ventilacijom (neinvazivna ili invazivna) ili primjenu kisika, bilo u obliku klasične oksigenoterapije ili visokoprotočnog kisika (engl. *high flow nasal cannula, HFNC*). Postavljanje dijagnoze ARDS-a temeljeno je na općeprihvaćenoj univerzalnoj berlinskoj definiciji iz 2012. godine uzimajući u obzir karakteristike COVID-19 bolesnika i njihova liječenja po uzoru na druga, slična istraživanja i preporuke vodećih stručnjaka (98).

Prema berlinskoj definiciji iz 2012. godine dijagnoza ARDS-a može se postaviti ako su ispunjeni sljedeći kriteriji: 1) razvoj unutar 7 dana od početka djelovanja mogućeg uzroka, odnosno nastanka novih ili naglog pogoršanja postojećih respiratornih smetnji; 2) prisutnost bilateralnih, difuznih radioloških infiltrata koji se ne povezuju s atelektazom, plućnim nodusima ili izljevima te 3) kliničko stanje bolesnika koje se ne povezuje sa srčanim popuštanjem ili volumnim opterećenjem. Navedeni kriteriji odnose se na bolesnike kod kojih se primjenjuje PEEP od najmanje 5 cmH₂O (91).

S obzirom na klinički tijek i karakteristike COVID-19 bolesti, kao i široke primjene visokoprotočnog kisika u liječenju ovih bolesnika, u ispitivanu skupinu uključeni su i bolesnici kod kojih nije ispunjen kriterij primjene PEEP-a od najmanje 5 cmH₂O (bolesnici koji su liječeni visokoprotočnim kisikom ili klasičnom oksigenoterapijom) te bolesnici koji su razvijali kriterije ARDS-a i nakon sedmog dana bolesti, budući da se on najčešće kod COVID-19 bolesnika razvijao između 8 i 14. dana bolesti (92, 99).

4. ISPITANICI I METODE

4.3.2. Kontrolna skupina

Kontrolnu skupinu činili su bolesnici oboljeli od COVID-19 pneumonije, a koji nisu imali kriterije za postavljanje dijagnoze ARDS-a niti su ih razvili tijekom daljnjeg praćenja i liječenja. Radi se o bolesnicima koji su liječeni i praćeni ambulantno, putem dnevne bolnice i nisu zahtijevali primjenu kisika.

4.3.3. Isključni kriteriji

U istraživanje nismo uključili sljedeće bolesnike: 1) bolesnici u životnoj dobi većoj od 80 godina; 2) bolesnici s poznatom anamnezom proširene maligne bolesti ili maligne bolesti u aktivnom liječenju; 3) bolesnici s akutnim koronarnim ili cerebrovaskularnim zbivanjem (akutni koronarni sindrom, akutni cerebrovaskularni inzult) te 4) bolesnici s prisutnom nozokomijalnom infekcijom (povišene vrijednosti prokalcitonina i/ili pozitivne mikrobiološke kulture). Također u istraživanje nismo uključili ispitanike koji su primili cjepivo protiv SARS-CoV-2 virusa.

4.4. Metode istraživanja

Metodologija istraživanja uključivala je prikupljanje kliničkih podataka i parametara o ispitanicima, uzorkovanja krvi te laboratorijskih analiza.

4.4.1. Prikupljanje kliničkih podataka i parametara

Prikupljanje kliničkih podataka uključivalo je uzimanje anamneze, fizikalni pregled ispitanika te pregled postojeće medicinske dokumentacije, što je uključivalo temperature liste i epikrizu te podatke dostupne u bolničkom informatičkom sustavu.

Anamneza je uključivala uzimanje podataka od samih ispitanika (autoanamneza) ili iz postojeće dokumentacije i medicinskog osoblja (heteroanamneza), ukoliko težina bolesti to nije dopuštala (ispitanici na mehaničkoj ventilaciji). Podaci dobiveni ovim putem jesu osnovni sociodemografski podaci (spol i dob), prisutnost komorbiditeta, početak i trajanje bolesti te podatak o cijepljenju.

4. ISPITANICI I METODE

Fizikalni pregled ispitanika podrazumijevao je mjerenje tjelesne temperature, određivanje srčane i dišne frekvencije, mjerenje krvnog tlaka, određivanje periferne saturacije venske krvi kisikom te određivanje stanja svijesti. Tjelesna temperatura mjerena je alkoholnim termometrom u aksilarnoj regiji, krvni tlak automatskim oscilometrijskim tlakomjerom s manžetom postavljenom na lijevoj nadlaktici, a periferna saturacija venske krvi pulsni oksimetrom s kažiprsta lijeve ruke. Pri određivanju stanja svijesti korištena je AVPU metoda: „A“ (engl. *alert*) označava budno stanje bolesnika koji je u kontaktu, „V“ (engl. *verbal*) označava stanje u kojemu se bolesnik odaziva na poziv, „P“ (engl. *pain*) označava stanje u kojemu bolesnik reagira samo na bolni podražaj, dok „U“ (engl. *unresponsive*) označava stanje bolesnika koji ne reagira ni na kakav podražaj.

Kod ispitanika s respiratornom potporom zabilježena je vrsta: klasična oksigenoterapija (primjena kisika preko nosnog katetera ili preko maske za nos i usta), primjena visokoprotocnog kisika (HFNC) te neinvazivna ili invazivna mehanička ventilacija. Kod svih njih zabilježen je podatak o udjelu kisika u smjesi zraka koja se isporučuje bolesniku (FiO_2 – frakcija inspiriranog kisika). Kod mehanički ventiliranih bolesnika zabilježen je ventilacijski modalitet te sljedeći parametri: pozitivni tlak na kraju ekspirija (engl. *Positive End Expiratory Pressure, PEEP*); inspiratorna tlačna potpora (engl. *Pressure Support, PS*); vršni inspiratorni tlak (engl. *Peak Inspiratory Pressure, PIP*) te razlika između tlaka platoa i PEEP-a poznata kao „*driving pressure*“ (ΔP).

Iz medicinske dokumentacije (temperaturne liste i epikrize) zabilježeni su podaci o radiološkom nalazu pluća (intersticijski uzorak, fokalna konsolidacija, multifokalna konsolidacija) te načinu liječenja i primjeni lijekova (kortikosteroidna terapija, remdesivir, tocilizumab, imunoglobulini, hemoperfuzija citokina).

Na osnovi zabilježenih podataka podijelili smo ispitanike u ispitivanu ili kontrolnu skupinu u ovisnosti o tome jesu li zadovoljeni gore opisani kriteriji za ARDS. Procjena težine bolesti izvršena je na nekoliko načina.

Kod svih ispitanika određena je težina bolesti temeljem preporučenog MEWS bodovnog sustava (engl. *Modified Early Warning Score*). On se temelji na bodovanju osnovnih životnih funkcija kao što su dišna i srčana frekvencija izražena u broju respiracija, odnosno otkucaja u jednoj minuti, sistolički krvni tlak izražen u milimetrima žive (mmHg),

4. ISPITANICI I METODE

tjelesna temperatura izražena u stupnjevima Celzijusa (°C) te stanje svijesti određeno AVPU metodom kako je to prikazano u Tablici 4.1. Ukupni bodovni zbroj od ≤ 2 označava blagi ili srednje teški oblik, bodovni zbor 3 – 4 teški oblik, a bodovni zbroj ≥ 5 kritični oblik bolesti (237).

Tablica 4.1. MEWS bodovni sustav

Parametar/bod	3	2	1	0	1	2	3
Dišna frekvencija / min		<9		9-14	15-20	21-29	>30
Srčana frekvencija / min		≤ 40	41-50	51-100	101-110	111-129	>130
Sistolički krvni tlak (mmHg)	≤ 70	71-80	81-100	101-199		>200	
Tjelesna temperatura (°C)		≤ 35	35.1-36	36.1-38	38.1-38.5	>38.5	
Stanje svijesti	Bez odgovora	Odgovor na bol	Odgovor na poziv	Budan	Agitacija		

Kod bolesnika koji su imali ARDS dodatno smo procjenjivali njegovu težinu na osnovi podjele iz berlinske definicije te računali APACHE IV bodovni sustav (engl. *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*).

Prema berlinskoj definiciji težina ARDS određena je omjerom $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ te tako razlikujemo blagi ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 200$), umjereni ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 100 - 200$) te teški ARDS ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$), što smo izračunali i zabilježili za svakog ispitanika s ARDS-om.

APACHE IV bodovni sustav koristi se u jedinici intenzivnog liječenja za kvantifikaciju težine kliničkog stanja bolesnika, a kojim se procjenjuje rizik od smrtnog ishoda izraženog u postotku. Za potrebe ovog bodovnog sustava boduju se dob, vitalni znaci (tjelesna temperatura, srednji arterijski krvni tlak, srčana i dišna frekvencija, diureza, stanje svijesti), primjena mehaničke ventilacije i FiO_2 , laboratorijski parametri (parcijalni tlak kisika i ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi, pH arterijske krvi, natrij, urea, kreatinin, albumin, bilirubin, hematokrit, leukociti), kao i prisutnost kroničnih komorbiditeta te vodeća dijagnoza pri prijemu (238, 239). Svim ispitanicima s ARDS-om određen je APACHE IV bodovni sustav.

4. ISPITANICI I METODE

4.4.2. Uzorkovanje krvi

Uzorkovanje krvi provedeno je istodobno kada je provedeno i prikupljanje kliničkih podataka i parametara od ispitanika, između 10. i 20. dana bolesti, pri čemu je prvi dan bolesti definiran kao prvi dan pojave simptoma. Za potrebe ovog istraživanja ispitanicima je uzorkovana venska i arterijska krv, a analizirani parametri prikazani su u Tablici 4.2.

Tablica 4.2. Analizirani parametri iz uzoraka venske i arterijske krvi

Uzorak	Analizirani parametri
Venska krv	Hematološke analize
	<i>Broj eritrocita, hemoglobin, broj trombocita, broj leukocita</i>
	Koagulacijske analize
	<i>Protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, fibrinogen, D-dimeri</i>
	Biokemijske analize
Arterijska krv	<i>Aspartat-aminotransferaza, alanin-aminotransferaza, gama-glutamiltransferaza, alkalna fosfataza, bilirubin, albumin, C-reaktivni protein, prokalcitonin, interleukin 6, feritin, urea, kreatinin, natrij, kalij, glukoza, ukupni, HDL i LDL kolesterol, trigliceridi, troponin I, N-terminalni propeptid natriuretskog moždanog peptida, glikozilirani hemoglobin</i>
	Aktivnost kalpaina 1
	Koncentracija IL-33
	Acidobazni status
Arterijska krv	<i>pH arterijske krvi</i>
	Plinske analize
	<i>Parcijalni tlak kisika</i>
	<i>Parcijalni tlak ugljičnog dioksida</i>
	<i>Saturacija arterijske krvi kisikom</i>

Venska krv dobivena je punkcijom perifernih vena ili iz središnjeg venskog katetera, ukoliko su ga ispitanici imali (oni koji su liječeni u jedinici intenzivnog liječenja). Za potrebe biokemijskih analiza venska je krv uzorkovana u dvije epruvete volumena 5 mL bez antikoagulansa; u jednu epruvetu volumena 4 mL s antikoagulansom (EDTA) za potrebe analize hematoloških parametara te jednu epruvetu volumena 2,7 mL s citratnim antikoagulansom za izradu koagulacijskih analiza. Krv za sve epruvete dobivena je iz jedne venepunkcije periferne vene za što je korišten jednokratni vakuumski sustav (Becton-Dickinson International, USA). Ukoliko je krv uzorkovana iz kraka središnjeg venskog katetera, krak je najprije ispran fiziološkom otopinom, potom je odstranjeno 5 mL krvi iz njega, a tek nakon toga uzorkovana je krv koja je inokulirana u navedene epruvete.

4. ISPITANICI I METODE

Arterijska krv dobivena je punkcijom perifernih arterija (radijalna ili ulnarna arterija) ili iz arterijske kanile, ukoliko je bila postavljena u sklopu invazivnog praćenja vrijednosti arterijskog krvnog tlaka kod ispitanika liječenih u jedinici intenzivnog liječenja. Punkcija perifernih arterija izvršena je korištenjem posebnog sustava koji se sastoji od igle i štrcaljke u kojoj se nalazi heparin (BD Preset, USA), a nakon lokalne anestezije špricanjem lidokinskog spreja na mjesto punkcije. Pri uzorkovanju krvi iz arterijske kanile, ona je najprije isprana fiziološkom otopinom, iz nje je odstranjeno 5 mL krvi te je potom izvršeno uzorkovanje u prethodno hepariniziranu štrcaljku. Za potrebe plinskih analiza i određivanja acidobaznog statusa uzorkovan je 1 mL arterijske krvi.

Uzorkovanje arterijske i venske krvi provedeno je uz pridržavanje svih uobičajenih mjera antiseptike. Uzorkovana krv dostavljena je u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku pri Kliničkom bolničkom centru Osijek unutar sat vremena od provedenog uzorkovanja.

4.4.3. Laboratorijske analize

Laboratorijske analize obavljene su u laboratorijima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek te laboratoriju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Nakon zaprimanja uzoraka krvi u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek odmah su učinjene hematološke, koagulacijske i standardne biokemijske analize, kao i analiza arterijske krvi za potrebe određivanja acidobaznog statusa i plinskih analiza, dok su analize aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 izvršene naknadno, nakon prikupljanja uzoraka svih ispitanika.

Uzorci venske krvi potrebni za biokemijske analize centrifugirani su na 3500 okretaja u minuti na temperaturi od 25°C kroz vremenski period od 10 minuta kako bi se odvojio serum od stanične sastavnice krvi. Uzorci seruma za potrebe određivanja aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 odvojeni su u posebne mikroeprovete koje su pohranjene u medij na -80°C, gdje su čuvani do dana njihove analize.

4. ISPITANICI I METODE

4.4.4. Standardne laboratorijske analize

Hematološke analize (broj leukocita, eritrocita i trombocita te koncentracija hemoglobina) izvršene su na hematološkom brojaču Sysmex XN-2000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) metodom protočne citometrije s fluorescentnim bojama.

Biokemijske analize rađene su na specifičnim analizatorima, a vrsta analizatora i metode kojima su izvršene pojedine analize prikazane su zbirno u Tablici 4.3.

Tablica 4.3. Analize biokemijskih parametara

Analizator	Metoda	Parametar
Biokemijski analizator Olympus AU680 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD)	Spektrofotometrija	Urea, Kreatinin, Bilirubin, Albumin. Kolesterol
	UV fotometrija	Aspartat-aminotransferaza, Alanin-aminotransferaza, Trigliceridi, Glukoza
	Kontinuirana fotometrija	Alkalna fosfataza, Gama- glutamil transferaza
	Lateks-imunoturbidimetrija	C-reaktivni protein, Feritin
	Indirektna potenciometrija	Natrij, Kalij
Imunobiokemijski analizator Dimension ExL (Siemens Healthineers AG, Erlangen, Njemačka)	Imunoinhibicijska turbidimetrija	Glikozilirani hemoglobin
	Homogeni „sendvič“ luminiscentni imunotest	Troponin I
Imunokemijski analizator Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka)	Elektrokemiluminiscentna imunoanaliza	Prokalcitonin, N-terminalni propeptid natriuretskog moždanog peptida, Interleukin 6

Koagulacijske analize izvršene su na koagulometru BCS XP (Siemens Healthineers AG, Erlangen, Njemačka). Protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme te fibrinogen određeni su koagulometrijskom metodom, dok su D-dimeri određeni imunoturbidimetrijskim testom s mikročesticama.

Plinske analize i acidobazni status arterijske krvi izrađen je na ABL 800 analizatoru (Radiometer Medical Aps, Brønshø, Danska). pH arterijske krvi, kao i parcijalni tlak ugljičnog dioksida određen je metodom potenciometrije, parcijalni tlak kisika metodom amperometrije, a saturacija arterijske krvi kisikom izračunata je matematički.

4.4.5. Metoda određivanja aktivnosti kalpaina 1

Uzorci seruma ispitanika razrijeđeni su ekstrakcijskim puferom u omjeru 1:2. Ekstrakcijski pufer sprječava autoaktivaciju enzima kalpaina tijekom postupka analize. Test određivanja aktivnosti kalpaina temelji se na oslobađanju 7-amino-4-trifluorometilkumarina (AFC) iz supstrata Ac-LLY-AFC (acil-leucil-leucil-tirozin vezan sa 7-amino-4-trifluorometilkumarinom). Ac-LLY-AFC emitira plavu svjetlost s maksimumom emisije na valnoj duljini od 400 nm, dok slobodan AFC emitira žutozelenu svjetlost s maksimumom fluorescencije na 505 nm. Reakcija se odvijala u crnoj mikrotitarskoj ploči (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) kako bi se spriječio gubitak nastale fluorescencije. U jažice mikrotitarske ploče dodano je 85 μ L razrijeđenih uzoraka, standarda te pozitivna i negativna kontrola. Prema preporuci proizvođača, negativnu kontrolu činio je nasumično odabrani serum ispitanika u koji je dodan inhibitor kalpaina Z-LLY-FMK (benzoilkarbonil-leucil-leucil-tirozin fluorometilketon). Nakon dodatka uzoraka, na ploču je pipetirano 10 μ L reakcijskog pufera i 5 μ L kalpain supstrata Ac-LLY-AFC. Reakcijska ploča inkubirana je 1h na 37°C zaštićena od svjetla na horizontalnoj miješalici Thermoshake (C.Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Njemačka). Fluorescencija je mjerena na ekscitacijskoj valnoj duljini od 400 nm i emisijskoj valnoj duljini od 505 nm na fluorimetru Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Aktivnost kalpaina izračunata je iz kalibracijske krivulje i izražena kao izmjerene relativne jedinice fluorescencije, RFU (engl. *Relative Fluorescence Units*) po mikrolitru reakcijske smjese u vremenu inkubacije od jednog sata (RFU/ μ L/h).



Slika 4.2. Fluorescentni spektrofotometar Cary Eclipse

Izvor: fotografirao autor

4.4.6. Metoda određivanja koncentracije IL-33

IL-33 je određen u uzorku seruma „sendvič“ ELISA metodom (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) pomoću reagensa Human Interleukin-33 ELISA (BioVendor, Brno, Češka). Uzorci su razrijeđeni u omjeru 1:2 sa dilentom za uzorke. Na dnu mikrotitarske pločice vezano je protutijelo koje specifično veže IL-33. Nakon dodatka otopina standarda i uzoraka ispitanika, IL-33 se vezao na specifično protutijelo. Nakon inkubacije reakcijske smjese kroz dva sata na sobnoj temperaturi na Thermoshake miješalici, u šest koraka ispiranja uklonjene su moguće interferencije iz uzoraka seruma. U sljedećem koraku dodano je 100 μ L sekundarnog protutijela koje također prepoznaje IL-33, a vezano je s biotinom. Reakcijska smjesa je inkubirana jedan sat na sobnoj temperaturi na Thermoshake miješalici. Nastao je kompleks primarno protutijelo – IL-33 – sekundarno protutijelo s biotinom. Nakon ponovnog ispiranja u šest koraka ispirane se višak sekundarnog protutijela i u reakcijsku smjesu dodaje streptavidin vezan s enzimom peroksidazom. Specifično prepoznavanje i vezanje biotina i streptavidina omogućuje dokazivanje nastalog imunokompleksa s IL-33 pomoću kemijske reakcije. Nakon ispiranja viška streptavidina vezanog s peroksidazom, u reakcijsku smjesu dodaje se supstrat 3,3', 5.5'-tetrametilbenzidin (TMB). Enzim peroksidaza oksidira TMB u radikal-kation koji boji reakcijsku smjesu u plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku, kroz 30 min, na horizontalnoj miješalici. Dodatkom stop otopine (1M fosfatna kiselina), TMB radikal-kation oksidira se u dimin koji boji reakcijsku smjesu u žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija).



Slika 4.3. ELISA procesor EtiMax 3000

Izvor: fotografirao autor

4.5. Statističke metode

Temeljem ranijih istraživanja o kalpainu 1 i IL-33 veličina uzorka potrebna za ovo istraživanje procijenjena je temeljem G-power 3.1. statističkog programa. Prema tom izračunu 80 ispitanika daje statističku snagu od 85% pri pragu značajnosti $\alpha = 0,05$. Priprema prikupljenih podataka za statističku obradu odrađena je u programu Microsoft Excel. Kategorijski podaci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Za usporedbu skupina na kategorijskim varijablama korišten je hi-kvadrat test. Numerički podaci su prikazani u ovisnosti o tipu distribucije aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, odnosno medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalitet raspodjele numeričkih podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Za usporedbu skupina s numeričkim varijablama korišten je Studentov t-test (dvije skupine) ili analiza kovarijance (ANCOVA) (tri i više skupina) uz Bonferronijevu korekciju (razina značajnosti/broj istovremenih testiranja). Kao mjera veličine učinka za statistički značajne razlike utvrđene analizom kovarijance korištena je parcijalna kvadrirana eta (η_p^2), a za one utvrđene Studentovim t-testom korišten je Cohenov d indeks. Statistička značajnost postavljena je na $p < 0,05$, za korelacijsku analizu $p < 0,01$. Pri statističkoj analizi korišten je program IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

5. REZULTATI

U istraživanje je ukupno uključeno 80 ispitanika ($N = 80$) podijeljenih u dvije skupine, odnosno kontrolnu skupinu ($n = 40$) i ispitivanu skupinu ($n = 40$). Prema spolu, 40 % bilo je žena, a 60 % muškaraca. Na razini cijelog uzorka dob ispitanika kretala se između 36 i 78 godina, odnosno prosječna dob iznosila je $60,47 \pm 10,79$ godina. Pri tome se muškarci ($61,33 \pm 11,06$ godina) i žene ($59,19 \pm 10,46$ godina) nisu statistički značajno razlikovali s obzirom na dob, $t(78) = 0,870$, $p = 0,387$. U Tablici 5.1. prikazani su osnovni podaci o ispitanicima uključenima u ovo istraživanje.

U ispitivanu skupinu uključeno je 40 ispitanika ($n = 40$), pri čemu je 37,5 % bilo žena. Radi se o ispitanicima koji su imali razvijenu COVID-19 pneumoniju te su zadovoljavali kriterije za postavljanje dijagnoze ARDS-a, a u svom liječenju zahtijevali primjenu kisika ili mehaničke ventilacije. Dob ispitanika u ispitivanoj skupini kretala se od 48 do 78 godina, odnosno prosječna dob iznosila je $64,68 \pm 8,34$ godine. Muškarci ($66,36 \pm 7,35$ godina) i žene ($61,87 \pm 9,34$ godina) nisu se statistički značajno razlikovali s obzirom na dob, $t(38) = 1,689$, $p = 0,099$.

U kontrolnoj skupini također je uključeno 40 ispitanika ($n = 40$), pri čemu je 42,5 % bilo žena. Radi se o ispitanicima koju su imali razvijenu COVID-19 pneumoniju, ali nisu zadovoljavali kriterije za postavljanje dijagnoze ARDS-a te u svom liječenju nisu zahtijevali primjenu kisika ili mehaničke ventilacije. Dob ispitanika u kontrolnoj skupini kretala se od 36 do 78 godina, odnosno prosječna dob iznosila je $56,28 \pm 11,42$ godina. Pri tome se, kao i u ispitivanoj skupini muškarci ($55,87 \pm 11,83$ godina) i žene ($56,82 \pm 11,09$ godina) nisu statistički značajno razlikovali s obzirom na dob, $t(38) = 0,258$, $p = 0,798$.

Kontrolna i ispitivana skupina uspoređivane su s obzirom na spol i dob. Hi-kvadrat testom nije utvrđena statistički značajna razlika s obzirom na broj muškaraca i žena u dvjema ispitivanim skupinama, $\chi^2(1, N = 80) = 0,21$, $p = 0,648$. No, ispitivane su se skupine statistički značajno razlikovale s obzirom na dob. Ispitanici u ispitivanoj skupini bili su značajno stariji ($64,68 \pm 8,33$ godina) od onih iz kontrolne skupine ($56,28 \pm 11,42$ godina), $t(38) = 3,757$, $p = 0,001$. Sukladno tome, prilikom usporedbi kontrolne i ispitivane skupine dob će biti kovarijat, odnosno kontrolirat će se učinci dobi na ispitivane razlike i/ili odnose.

4. ISPITANICI I METODE

Tablica 5.1. Osnovni podaci o ispitanicima

Varijabla	Svi ispitanici (N = 80)	Kontrolna skupina (n = 40)	Ispitivana skupina (n = 40)	Usporedba kontrolne i ispitivane skupine	P vrijednost
Spol					
<i>Muško</i>	48 (60,0 %)	23 (57,5 %)	25 (62,5 %)	0,21	0,648
<i>Žensko</i>	32 (40,0 %)	17 (42,5 %)	15 (37,5 %)		
Dob (godine)	60,47 ± 10,79	56,28 ± 11,42	64,68 ± 8,34	3,76	0,001
Dobne skupine					
<i><40</i>	4 (5,0 %)	4 (10,0 %)	0 (0,0 %)	16,05	0,003
<i>41-50</i>	14 (17,5 %)	12 (30,0 %)	2 (5,0 %)		
<i>51-60</i>	22 (27,5 %)	11 (27,5 %)	11 (27,5 %)		
<i>62-70</i>	25 (31,3 %)	8 (20,0 %)	17 (42,5 %)		
<i>71-80</i>	15 (18,8 %)	5 (12,5 %)	10 (25,0 %)		
Komorbidity					
<i>Bez komorbiditeta</i>	14 (17,5 %)	11 (27,5 %)	3 (7,5 %)	5,54	0,019
<i>S komorbiditetima</i>	66 (82,5 %)	29 (72,5 %)	37 (92,5 %)		
Težina bolesti					
<i>MEWS 2</i>	32 (40,0 %)	32 (80,0 %)	0 (0,0 %)	80,00	0,001
<i>MEWS 3</i>	8 (10,0 %)	8 (20%)	0 (0,0 %)		
<i>MEWS 4</i>	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)		
<i>MEWS 5</i>	40 (50,0 %)	0 (0,0 %)	40 (100 %)		
Ishod					
<i>Preživio</i>	52 (65,0 %)	40 (100 %)	12 (30,0 %)	43,08	0,001
<i>Umro</i>	28 (35,0 %)	0 (0,0 %)	28 (70,0 %)		

Legenda. MEWS (engl. *Modified Early Warning Score*)

5. REZULTATI

S obzirom na navedene ciljeve istraživanja, rezultate smo podijelili u 10 potpoglavlja u kojima smo ispitivali povezanost kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s pojedinim ispitivanim parametrima: 1) pojavnosti i težinom ARDS-a, 2) markerima akutnog upalnog odgovora, 3) hematološkim, koagulacijskim i biokemijskim laboratorijskim parametrima te parametrima plinske analize i acidobaznog statusa, 4) primjenom kisika, načinom i postavkama mehaničke ventilacije; 5) danom uzorkovanja krvi, 6) prisutnosti kroničnih komorbiditeta, 7) težinom COVID-19 bolesti, 8) radiološkim nalazom pluća ispitanika, 9) načinom liječenja COVID-19 bolesti te 10) konačnim ishodom bolesti COVID-19.

Svako potpoglavlje podijeljeno je u dva dijela. U prvom su dijelu prikazane prosječne vrijednosti i prevalencija pojedinih parametara, kao i njihova usporedba između ispitivanih skupina, dok se u drugom dijelu ispituje odnos aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s različitim parametrima, kako među svim ispitanicima, tako i između ispitivanih skupina.

5.1. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s pojavnosti i težinom ARDS-a

Prosječne vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 kod svih ispitanika prikazane su u Tablici 5.2. Korelacija između aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 iznosila je $r = 0,96$ ($p = 0,001$), odnosno porastom aktivnosti kalpaina 1 rasla je i koncentracija IL-33.

Tablica 5.2. Prosječne vrijednosti, korelacije i veličina učinaka između aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33

Faktori	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)		ANCOVA	Veličina učinka
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>F-omjer</i>	η_p^2
Kalpain 1 (RFU/μL)	2,72	2,41	0,99	0,35	4,46	2,33	66,24***	0,462
IL-33 (μg/L)	5,28	1,49	4,12	0,55	6,45	1,18	95,83***	0,554

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; M = medijan; SD = standardna devijacija; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

5. REZULTATI

Kao što se može vidjeti u Tablici 5.2., a nakon kontrole učinaka dobi, aktivnost kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile su statistički značajno niže u kontrolnoj, nego u ispitivanoj skupini, pri čemu su veličine učinaka za ove razlike bile velike. Unatoč toj razlici, u obje skupine veličina i smjer povezanosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bili su gotovo identični. Tako je u kontrolnoj skupini korelacija između aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 iznosila $r = 0,97$ ($p = 0,001$), dok je u ispitivanoj skupini iznosila $r = 0,95$ ($p = 0,001$). U obje skupine porastom aktivnosti kalpaina 1 rasla je i koncentracija IL-33.

Također, ispitali smo povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33, u odnosu na težinu ARDS-a kod ispitanikâ iz ispitivane skupine. Ukupno gledano dvoje ispitanika (5 %) imalo je blagi oblik ARDS-a, njih 21 (52,5 %) umjereni oblik ARDS-a, a njih 17 (42,5 %) teški oblik ARDS-a. Prosječne vrijednosti i usporedba aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 navedenih skupina prikazane su u Tablici 5.3.

Tablica 5.3. Prosječne vrijednosti i usporedba aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s obzirom na težinu ARDS-a

Faktori	Blagi ARDS (n = 2)		Umjereni ARDS (n = 21)		Teški ARDS (n = 16)		ANCOVA <i>F</i> -omjer	Post hoc test Bonferroni
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>		
Kalpain 1 (RFU/μL)	2,39	0,41	3,23	1,02	6,09	2,44	12,45***	Teški > Blagi* Teški > Umjereni***
IL-33 (μg/L)	5,21	0,15	5,81	0,64	7,35	1,12	14,86***	Teški > Blagi** Teški > Umjereni***

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; *M* = medijan; *SD* = standardna devijacija; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Kao što se može vidjeti u Tablici 5.3., nakon kontrole učinaka dobi, najviše vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 utvrđene su u skupini ispitanika s teškim oblikom ARDS-a, a najmanje u skupini ispitanika s blagim oblikom ARDS-a. Osim toga, skupina ispitanika s teškim oblikom ARDS-a značajno se razlikovala s obzirom na vrijednosti i aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na skupine ispitanika s umjerenim i blagim ARDS-om. Pri tome je za značajne razlike utvrđena velika veličina učinka i za aktivnost kalpaina 1 ($\eta_p^2_{\text{kalpain 1}} = 0,415$) i za koncentraciju IL-33 ($\eta_p^2_{\text{IL-33}} = 0,459$). Suprotno tome, ispitanici iz skupina s blagim i umjerenim oblikom ARDS-a nisu se međusobno značajno razlikovali s obzirom na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33.

5. REZULTATI

U sve tri skupine, nakon kontrole učinaka dobi, povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bila je statistički značajna, pozitivna i visoka. U skupini ispitanika s blagim oblikom ARDS-a ona je iznosila je $r = 0,95$, $p = 0,001$, u skupini ispitanika s umjerenim oblikom ARDS-a iznosila je $r = 0,98$, $p = 0,001$, a u skupini ispitanika s teškim oblikom ARDS-a iznosila je $r = 0,94$, $p = 0,001$. Svakako treba napomenuti da su skupinu ispitanika s blagim oblikom ARDS-a činila dva ispitanika, zbog čega bi ove rezultate trebalo uzeti s oprezom.

5.2.Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s markerima akutnog upalnog odgovora

U istraživanju smo ispitivali i odnose serumske aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s markerima akutnog upalnog odgovora: C-reaktivnim proteinom (CRP), feritinom, fibrinogenom, interleukinom 6 (IL-6) te omjerima interleukina 33 i interleukina 6 (IL-33/IL-6) te interleukina 33 i C-reaktivnog proteina (IL-33/CRP). U Tablici 5.4. prikazana je deskriptivna statistika te usporedbe kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na vrijednosti markera akutnog upalnog odgovora.

Tablica 5.4. Prosječne vrijednosti te usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na vrijednosti markera akutnog upalnog odgovora

Faktori	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)		ANCOVA	Veličina učinka
	M	SD	M	SD	M	SD	F-omjer	η_p^2
CRP (mg/L)	120,12	71,33	70,34	20,77	169,90	69,24	60,13***	0,439
Feritin (μg/L)	692,65	358,08	444,24	148,18	941,05	333,47	67,18***	0,466
Fibrinogen (g/L)	5,62	2,41	3,64	1,51	7,60	1,20	128,89***	0,626
IL-6 (ng/L)	279,60	237,14	124,17	44,29	435,04	249,79	45,25***	0,370
Omjer IL-33/IL-6	28,45	15,99	37,01	13,26	19,89	13,84	18,46***	0,193
Omjer IL-33/CRP	0,51	0,18	0,62	0,17	0,41	0,10	30,62***	0,285

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; M = medijan; SD = standardna devijacija; CRP – C-reaktivni protein, IL-6 – interleukin 6; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

5. REZULTATI

Usporedbom ispitanikâ kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na koncentracije markera akutnog upalnog odgovora analizom kovarijance, uz kontrolu učinaka dobi, utvrđena je statistički značajna razlika u svim mjerenim markerima akutnog upalnog odgovora. Specifično, u ispitivanoj skupini zabilježene su značajno više vrijednosti C-reaktivnog proteina, feritina, fibrinogena i interleukina 6, kao i značajno niže vrijednosti omjera IL-33/IL-6 i omjera IL-33/CRP od vrijednosti koje smo zabilježili kod ispitanika kontrolne skupine. Veličine učinaka za sve utvrđene razlike bile su velike.

Odnos vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s markerima akutnog upalnog odgovora ispitan je parcijalnom korelacijskom analizom, uz kontrolu učinka dobi. Odnos je ispitan, kako za sve ispitanike, tako i unutar ispitivane i kontrole skupine. Rezultati su prikazani u Tablici 5.5.

Tablica 5.5. Interkorelacije aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s markerima akutnog upalnog odgovora

	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
CRP (mg/L)	0,78***	0,80**	0,39*	0,43**	0,61***	0,64***
Feritin (µg/L)	0,63***	0,64***	0,21	0,20	0,33*	0,27
Fibrinogen (g/L)	0,67***	0,74***	0,57***	0,59***	0,38*	0,36*
IL-6 (ng/L)	0,69***	0,69***	0,72***	0,67***	0,47**	0,44**
Omjer IL-33/IL-6	-0,29**	-0,36**	-0,49***	-0,40**	0,08	0,06
Omjer IL-33/CRP	-0,45***	-0,49***	-0,06	-0,09	-0,25	-0,26

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; „—“ = autokorelacija; CRP – C-reaktivni protein; IL-6 – interleukin 6; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Kao što se može vidjeti u Tablici 5.5., na razini svih ispitanika aktivnost kalpaina 1 bila je značajno, nisko do visoko povezana sa svim markerima akutnog upalnog odgovora. To znači da bezobzira na prisutnost ARDS-a, ispitanici koji su imali više vrijednosti kalpaina 1, imali su i značajno više vrijednosti C-reaktivnog proteina, feritina, fibrinogena i interleukina 6

5. REZULTATI

te značajno niže vrijednosti omjera IL-33/IL-6 te omjera IL-33/CRP. Slične rezultate dobili smo i za odnos vrijednosti koncentracije IL-33 s navedenim markerima akutnog upalnog odgovora.

Kada se promatraju ispitivane skupine, u kontrolnoj skupini vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su povezane s gotovo svim markerima akutnog upalnog odgovora. Izuzeci su korelacije s feritinom i omjerom IL-33/CRP. U ispitivanoj skupini vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 nisu bile značajno povezane samo s omjerima IL-33/IL-6 i IL-33/CRP. Dakle, u obje skupine veće vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su povezane s višim koncentracijama C-reaktivnog proteina, fibrinogena i interleukina 6, dok je u kontrolnoj skupini, uz značajne prethodno spomenute korelacije, veća vrijednost aktivnosti kalpaina 1 bila povezana i s nižom vrijednosti omjera IL-33/IL-6. U ispitivanoj skupini, za razliku od kontrolne skupine, više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su povezane i s višom razinom feritina, ali ne i s omjerima IL-33/IL-6 i IL-33/CRP.

Kada se radi o vrijednosti koncentracije IL-33, u kontrolnoj skupini utvrđene su značajne i pozitivne, umjerene do visoke korelacije s koncentracijama C-reaktivnog proteina, fibrinogena, interleukina 6 te negativna i umjerena korelacija s omjerom IL-33/IL-6. Također, u ovoj skupini obrasci povezanosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s različitim markerima akutnog upalnog odgovora bili su gotovo identični. Slično tome, u ispitivanoj skupini više vrijednosti koncentracije IL-33 bile su značajno povezane s višim vrijednostima C-reaktivnog proteina, fibrinogena i interleukina 6.

5.3.Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s ostalim laboratorijskim parametrima

Osim s markerima akutnog upalnog odgovora, u ovom istraživanju ispitali smo povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 i s drugim laboratorijskim parametrima: 1) parametri plinske analize i acidobaznog statusa (pH, parcijalni tlak kisika i ugljičnog dioksida te saturacija kisikom arterijske krvi); 2) parametri krvne slike (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, broj trombocita, broj leukocita); 3) koagulacijski parametri (protrombinsko vrijeme izraženo kao PV udio, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme i D-dimeri); 4) srčani markeri (N-terminalni propeptid natriuretskog moždanog peptida i kardioselektivni enzim troponin I); 5) biokemijski parametri (aspartat-

5. REZULTATI

aminotransferaza, alanin-aminotransferaza, alkalna fosfataza, gama-glutamil transferaza, bilirubin, albumin, urea, kreatinin, natrij, kalij, glukoza) te 6) lipidogram (ukupni kolesterol, LDL i HDL kolesterol, trigliceridi) te glikozilirani hemoglobin A1c.

Deskriptivna statistika te usporedbe između kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na vrijednosti navedenih laboratorijskih parametara prikazana je u Tablici 5.6., 5.7., 5.8., 5.9., 5.10. i 5.11.

Kako je vidljivo u Tablici 5.6., što se tiče parametara plinske analize i acidobaznog statusa arterijske krvi, utvrđena je statistički značajna razlika među dvjema ispitivanim skupinama u svim ispitivanim markerima. Pri tome su u ispitivanoj skupini utvrđene značajno niže vrijednosti pH, parcijalnog tlaka kisika i saturacije kisikom te značajno viša vrijednost parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida, nego u kontrolnoj skupini. Veličine učinaka za utvrđene razlike bile su velike.

Tablica 5.6. Prosječne vrijednosti te usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na parametre plinske analize i acidobaznog statusa arterijske krvi

Faktori	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)		ANCOVA <i>F</i> -omjer	Veličina učinka η_p^2
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>		
pH (1)	7,36	0,07	7,39	0,04	7,33	0,07	17,11***	0,18
PaO₂ (kPa)	10,15	1,86	11,38	1,37	8,93	1,44	50,80***	0,40
PaCO₂ (kPa)	6,06	2,37	4,96	1,17	7,16	2,75	16,90***	0,18
SaO₂ (%)	88,70	8,04	94,56	1,09	82,84	7,70	70,81***	0,48

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; *M* = medijan; *SD* = standardna devijacija; PaO₂ – parcijalni tlak kisika, PaCO₂ – parcijalni tlak ugljičnog dioksida, SaO₂ – saturacija kisikom arterijske krvi; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; ****p* < 0,001; ***p* < 0,01; **p* < 0,05

U Tablici 5.7. prikazane su usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na parametre krvne slike. U tablici je vidljivo da su ispitanici iz ispitivane skupine imali značajno niže vrijednosti trombocita i značajno više vrijednosti leukocita od ispitanika iz kontrolne skupine. Za oba parametra utvrđene su velike veličine učinka.

5. REZULTATI

Tablica 5.7. Prosječne vrijednosti te usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na parametre krvne slike

Faktori	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)		ANCOVA	Veličina učinka
	M	SD	M	SD	M	SD	F-omjer	η_p^2
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4,73	0,73	4,89	0,78	4,56	0,64	3,55	—
Hemoglobin (g/L)	144,86	16,22	148,80	15,11	140,93	16,52	2,69	—
Trombociti ($\times 10^9/L$)	194,04	96,77	253,73	88,21	134,35	62,31	42,27***	0,35
Leukociti ($\times 10^9/L$)	13,14	5,51	9,92	4,82	16,36	4,12	27,28***	0,26

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; M = medijan; SD = standardna devijacija; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Pri usporedbi ispitivanih skupina u pogledu koagulacijskih parametara (Tablica 5.8.), statistički značajna razlika utvrđena je samo za vrijednosti D-dimera, pri čemu su one značajno više bile u ispitivanoj skupini. Veličina učinka bila je srednja.

Tablica 5.8. Prosječne vrijednosti te usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na koagulacijske parametre

Faktori	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)		ANCOVA	Veličina učinka
	M	SD	M	SD	M	SD	F-omjer	η_p^2
PV udjel (1)	1,06	0,21	0,22	0,21	1,05	0,22	0,22	—
aPTV (1)	1,01	0,29	0,99	0,28	1,02	0,30	2,19	—
D-dimeri ($\mu g/L$)	1235,51	1967,62	595,18	490,19	1875,85	2600,18	8,73**	0,10

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; M = medijan; SD = standardna devijacija; PV – protrombinsko vrijeme, aPTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Ispitivane skupine značajno su se razlikovale i u vrijednostima srčanih markera (Tablica 5.9.), pri čemu su nađene kod ispitanika ispitivane skupine značajno više vrijednosti i N-terminalnog propeptida natriuretskog moždanog peptida i troponina I od vrijednosti

5. REZULTATI

ispitanika iz kontrolne skupine. Veličina učinka za N-terminalni propeptid natriuretskog moždanog peptida bio je velik, a za troponin I srednje velik.

Tablica 5.9. Prosječne vrijednosti te usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na srčane markere

Faktori	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)		ANCOVA	Veličina učinka
	M	SD	M	SD	M	SD	F-omjer	η_p^2
NTproBNP (ng/L)	211,01	214,98	113,10	37,42	308,93	269,36	17,96***	0,19
Troponin I (ng/L)	75,99	76,57	42,82	32,08	109,17	92,69	10,31**	0,12

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; M = medijan; SD = standardna devijacija; NTproBNP - N-terminalni propeptid natriuretskog moždanog peptida; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

U Tablici 5.10. prikazane su usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na biokemijske parametre. Od dvanaest ispitanih biokemijskih markera statistički značajne razlike među dvjema skupinama utvrđene su za njih sedam. Ispitanici iz ispitivane skupine imali su značajno više vrijednosti aspartat-aminotransferaze, alanin-aminotransferaze, omjera C-reaktivnog proteina i albumina (CRP/alb), uree, kreatinina i glukoze te značajno nižu vrijednost albumina od ispitanika u kontrolnoj skupini. Veličine učinaka za utvrđene razlike kretale su se od umjerenih do velikih.

5. REZULTATI

Tablica 5.10. Prosječne vrijednosti te usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na biokemijske parametre

Faktori	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)		ANCOVA	Veličina učinka
	M	SD	M	SD	M	SD	F-omjer	η_p^2
AST (U/L)	47,66	26,90	38,70	22,37	56,63	28,29	6,25*	0,08
ALT (U/L)	68,41	28,84	55,68	23,66	81,15	28,15	11,81**	0,13
ALP (U/L)	104,63	33,84	103,28	26,13	105,98	40,41	0,80	—
GGT (U/L)	47,15	16,97	45,78	11,07	48,53	21,38	1,30	—
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	17,83	8,54	16,30	6,15	19,35	10,25	2,27	—
Albumin (g/L)	37,26	7,59	41,79	5,79	32,73	6,42	29,10***	0,27
Omjer CRP/alb	3,60	2,68	1,73	0,61	5,47	2,64	57,63***	0,48
Urea (mmol/L)	11,55	7,62	8,69	5,28	14,40	8,55	8,87**	0,10
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	152,28	78,18	119,03	58,16	185,53	82,04	12,59**	0,14
Natrij (mmol/L)	139,54	7,53	139,48	5,67	139,60	9,10	1,25	—
Kalij (mmol/L)	4,34	0,90	4,36	0,69	4,32	1,08	0,48	—
Glukoza (mmol/L)	8,09	2,49	7,03	2,23	9,16	2,29	14,66***	0,16

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; M = medijan; SD = standardna devijacija; AST – aspartat-aminotransferaza, ALT – alanin-aminotransferaza, ALP – alkalna fosfataza, GGT – gama-glutamil transferaza, CRP – C-reaktivni protein, alb – albumin; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Usporedbom ispitivanih skupina u odnosu na vrijednosti lipidograma i glikoziliranog hemoglobina (Tablica 5.11.) utvrđeno je da su ispitanici iz ispitivane skupine imali značajno više vrijednosti triglicerida i glikoziliranog hemoglobina te značajno niže vrijednosti ukupnog kolesterola te LDL i HDL kolesterola od ispitanika iz kontrolne skupine. Veličine učinaka kretale su se od srednjih do velikih veličina.

5. REZULTATI

Tablica 5.11. Prosječne vrijednosti te usporedbe ispitivanih skupina s obzirom na lipidogram i glikozilirani hemoglobin A1c

Faktori	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)		ANCOVA	Veličina učinka
	M	SD	M	SD	M	SD	F-omjer	η_p^2
Kolesterol (mmol/L)	5,15	1,69	6,31	1,27	3,99	1,19	72,03***	0,48
LDL (mmol/L)	2,95	1,14	3,40	1,20	2,49	0,89	14,60***	0,16
HDL (mmol/L)	0,91	0,27	1,01	0,26	0,80	0,25	8,77**	0,10
Trigliceridi (mmol/L)	2,11	1,11	1,85	0,78	2,37	1,32	6,14*	0,07
HbA1c (%)	5,93	2,11	5,10	1,12	6,76	2,52	12,08**	0,14

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; M = medijan; SD = standardna devijacija; LDL – lipoprotein niske gustoće, HDL – lipoprotein visoke gustoće, HbA1c – glikozilirani hemoglobin A1c; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Odnos vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s pojedinim laboratorijskim parametrima ispitan je parcijalnom korelacijskom analizom, uz kontrolu efekta dobi. Odnos je ispitan kako za sve ispitanike, tako i unutar ispitivane i kontrole skupine. Rezultati su prikazani u Tablici 5.12. (parametri plinske analize i acidobaznog statusa arterijske krvi), 5.13. (parametri krvne slike), 5.14. (koagulacijski parametri), 5.15. (srčani markeri), 5.16. (biokemijski parametri) i 5.17. (lipidogram i glikozilirani hemoglobin).

5. REZULTATI

Tablica 5.12. Interkorelacije aktivnosti kalpain 1 i koncentracije IL-33 s parametrima plinske analize i acidobaznog statusa arterijske krvi

	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
pH (1)	-0,35**	-0,36**	0,31	0,37*	-0,12	-0,15
PaO₂ (kPa)	-0,62***	-0,62***	0,20	0,23	0,49**	-0,51**
PaCO₂ (kPa)	0,34***	0,35**	-0,02	-0,05	0,08	0,07
SaO₂ (%)	-0,66***	-0,69***	0,03	0,03	-0,37*	-0,39*

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; „—“ = autokorelacija; PaO₂ – parcijalni tlak kisika, PaCO₂ – parcijalni tlak ugljičnog dioksida, SaO₂ – saturacija kisikom arterijske krvi; ****p* < 0,001; ***p* < 0,01; **p* < 0,05

Tablica 5.13. Interkorelacije aktivnosti kalpain 1 i koncentracije IL-33 s parametrima krvne slike

	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
Eritrociti (x10 ¹² /L)	-0,27*	-0,23*	0,10	0,08	-0,29	-0,23
Hemoglobin (g/L)	-0,20	-0,17	0,07	0,04	-0,15	-0,10
Trombociti (x10 ⁹ /L)	-0,42***	-0,43***	0,14	0,23	-0,08	-0,06
Leukociti (x10 ⁹ /L)	0,46***	0,49***	-0,09	-0,09	0,28	0,32*

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; „—“ = autokorelacija; ****p* < 0,001; ***p* < 0,01; **p* < 0,05

5. REZULTATI

Tablica 5.14. Interkorelacije aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s koagulacijskim parametrima

	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
PV udjel (1)	-0,04	0,01	0,32*	0,27	-0,18	-0,16
aPTV (1)	0,08	0,10	0,17	0,11	-0,08	-0,09
D-dimeri (µg/L)	0,40***	0,38**	0,17	0,16	0,27	0,23

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; „—“ = autokorelacija; PV – protrombinsko vrijeme, aPTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Tablica 5.15. Interkorelacije aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 sa srčanim markerima

	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
NTproBNP (ng/L)	0,62***	0,64***	-0,30	-0,32*	0,52**	0,57**
Troponin I (ng/L)	0,26*	0,25*	-0,21	-0,23	0,05	0,02

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; „—“ = autokorelacija; NTproBNP - N-terminalni propeptid natriuretskog moždanog peptida; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

5. REZULTATI

Tablica 5.16. Interkorelacije aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s biokemijskim parametrima

	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
AST (U/L)	0,42***	0,41***	0,14	0,14	0,42**	0,41**
ALT (U/L)	0,39***	0,42***	0,32*	0,29	0,25	0,23
ALP (U/L)	0,03	0,03	-0,01	0,06	0,02	-0,02
GGT (U/L)	0,28*	0,26*	-0,09	-0,09	0,31*	0,32*
Bilirubin (μmol/L)	0,28*	0,28*	0,01	0,03	0,27	0,27
Albumin (g/L)	-0,48***	-0,56***	-0,48**	-0,52**	-0,22	-0,26
Omjer CRP/alb	0,79***	0,82***	0,55***	0,59***	0,69***	0,68***
Urea (mmol/L)	0,40***	0,39***	-0,16	-0,19	0,32*	0,35*
Kreatinin (μmol/l)	0,41***	0,44***	-0,09	-0,10	0,29	0,32*
Natrij (mmol/L)	0,04	0,11	0,29	0,23	-0,10	-0,05
Kalij (mmol/L)	-0,06	-0,04	-0,01	0,01	-0,01	0,04
Glukoza (mmol/L)	0,38**	0,43***	0,44**	0,44**	0,18	0,18

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; „—“ = autokorelacija; AST – aspartat-aminotransferaza, ALT – alanin-aminotransferaza, ALP – alkalna fosfataza, GGT – gama-glutamil transferaza, CRP – C-reaktivni protein, alb – albumin; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

5. REZULTATI

Tablica 5.17. Interkorelacije aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s lipidogramom i glikoziliranim hemoglobinom A1c

	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
Kolesterol (mmol/L)	-0,32**	-0,41***	-0,07	-0,05	0,42***	0,38**
LDL (mmol/L)	0,14	-0,17	0,06	0,04	0,32*	0,34*
HDL (mmol/L)	-0,03	-0,04	0,27	0,22	0,38*	0,42**
Trigliceridi (mmol/L)	0,10	0,12	0,30	0,28	-0,16	-0,20
HbA1c (%)	0,32**	0,31**	0,02	0,06	0,11	0,08

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; „—“ = autokorelacija; LDL – lipoprotein niske gustoće, HDL – lipoprotein visoke gustoće, HbA1c – glikozilirani hemoglobin A1c; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Na razini svih ispitanika vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su statistički značajno povezane s nizom laboratorijskih parametara. Tako su više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile povezane s nižim vrijednostima pH arterijske krvi, parcijalnog tlaka kisika arterijske krvi, saturacijom kisika arterijske krvi, eritrocita, trombocita, albumina i ukupnog kolesterola. Također, više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su povezane s višim vrijednostima parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida arterijske krvi, N-terminalnim propeptidom natriuretskog moždanog peptida, troponina, leukocita, aspartat-aminotransferaze, alanin-aminotransferaze, gama-glutamil transferaze, bilirubina, omjera C-reaktivnog proteina i albumina, uree, kreatinina, glukoze te glikoziliranim hemoglobinom A1c. Identični odnosi, odnosno korelacije utvrđene su i za vrijednosti koncentracija IL-33 među svim ispitanicima.

Ako se gleda prema ispitivanim skupinama, kod ispitanikâ kontrolne skupine više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su povezane s višim vrijednostima PV udjela, alanin-aminotransferazom, omjerom C-reaktivnog proteina i glukoze te nižom vrijednošću albumina. Viša vrijednost IL-33 bila je značajno povezana s višim vrijednostima pH arterijske krvi, omjerom C-reaktivnog proteina i albumina te glukozom i nižim vrijednostima N-terminalnog propeptida natriuretskog moždanog peptida i albumina.

5. REZULTATI

U ispitivanoj skupini više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su značajno povezane s višim koncentracijama parcijalnog tlaka kisika arterijske krvi, N-terminalnog propeptida natriuretskog moždanog peptida, aspartat-aminotransferaze, gama-glutamil transferaze, omjerom C-reaktivnog proteina i albumina, uree, ukupnog kolesterola te LDL i HDL kolesterola. Kod istih ispitanika vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su značajno povezane i s nižim vrijednostima saturacije kisikom arterijske krvi. Slično tome, vrijednosti koncentracija IL-33 bile su povezane s višim vrijednostima N-terminalnog propeptida natriuretskog moždanog peptida, leukocita, aspartat-aminotransferaze, gama-glutamil transferaze, omjera C-reaktivnog proteina i albumina, uree, kreatinina, ukupnog te LDL i HDL kolesterola te nižom vrijednosti saturacije kisika arterijske krvi, kao i kod povezanosti s aktivnosti kalpaina 1.

Uspoređujući ispitivane skupine, čini se da su pojedini laboratorijski parametri pokazatelji teže kliničke slike, odnosno pojavnosti ARDS-a jer su uočljiviji kod ispitanika ispitivane skupine, dok je kod ispitanika s lakšom kliničkom slikom (ispitanici kontrole skupine bez ARDS-a) njihova uloga manje uočljiva.

5.4.Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s oksigenoterapijom i mehaničkom ventilacijom

U ovom istraživanju ispitivali smo i povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s primjenom kisika (oksigenoterapija) te načinom i postavkama mehaničke ventilacije, ukoliko je ona primjenjivana. Nitko od ispitanika iz kontrolne skupine nije liječen kisikom niti je primijenjena mehanička ventilacija, dok su svi ispitanici iz ispitivane skupine zahtijevali određeni stupanj respiratorne potpore. Od 40 ispitanika iz te skupine, 16 ispitanika primalo je kisik (oksigenoterapija), bilo da se radilo o klasičnoj oksigenoterapiji ili visokoprotocnom kisiku, dok je njih 24 bilo na mehaničkoj ventilaciji.

Pacijenti koji nisu primali kisik, statistički su se značajno razlikovali s obzirom na dob od onih koji su mehanički ventilirani, $F(2, 77) = 7,51$, $p = 0,001$, $\eta_p^2 = 0,163$. Konkretno, prosječna dob u skupini ispitanika koji nisu primali kisik iznosila je $56,28 \pm 11,42$ godina, dok je prosječna dob mehanički ventiliranih ispitanika bila $65,92 \pm 8,81$ godina. Prosječna dob onih koji su primali oksigenoterapiju iznosila je $62,81 \pm 7,46$ te se ova skupina ispitanika nije značajno razlikovala od preostale dvije. S obzirom na navedeno, u analizama se

5. REZULTATI

kontrolirao učinak dobi ispitanika. Deskriptivna statistika (prosječne vrijednosti) te usporedba vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s obzirom na respiratornu potporu prikazana je u Tablici 5.18.

Tablica 5.18. Prosječne vrijednosti te usporedba vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s obzirom na respiratornu potporu

Faktori	Ispitanici bez kisika (n = 40)		Ispitanici na oksigenoterapiji (n = 16)		Ispitanici na mehaničkoj ventilaciji (n = 24)		ANCOVA	Veličina učinka
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>F</i> -omjer	η_p^2
Kalpain 1 (RFU/μL)	0,99	0,35	2,60	0,51	5,71	2,24	84,18***	0,69
IL-33 (μg/L)	4,12	0,55	5,40	0,27	7,16	1,02	117,16***	0,76

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; *M* = medijan; *SD* = standardna devijacija; η_p^2 = parcijalna kvadrirana eta/veličina uzorka: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednji učinak, 0,14 = veliki učinak; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Post-hoc analizom (Bonferroni) utvrđene su statistički značajne razlike među svim trima skupinama ispitanika: ispitanici koji nisu primali kisik, ispitanici na oksigenoterapiji te ispitanici na mehaničkoj ventilaciji. Ispitanici koji su bili na mehaničkoj ventilaciji imali su značajno više vrijednosti i aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na ispitanike koji su bili na oksigenoterapiji ($p_{kalpain\ 1} = 0,001$ i $p_{IL-33} = 0,001$), kao i od ispitanika koji nisu primali kisik ($p_{kalpain\ 1} = 0,001$ i $p_{IL-33} = 0,001$). Slično tome, ispitanici koji su bili na oksigenoterapiji imali su značajno više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 od ispitanika koji nisu primali kisik ($p_{kalpain\ 1} = 0,001$ i $p_{IL-33} = 0,001$). Veličine učinaka za utvrđene razlike bile su velike.

Kod ispitanika koji su mehanički ventilirani ($n = 24$) ispitali smo povezanost vrijednosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s osnovnim respiracijskim postavkama, kao i modalitetom mehaničke ventilacije koji je primjenjivan u trenutku uzorkovanja krvi.

Ispitivanjem povezanosti vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 s frakcijom inspiriranog kisika (FiO_2), pozitivnim tlakom na kraju ekspirija (PEEP) i inspiratornom tlačnom potporom (PS) statistički značajnu korelaciju dobili smo samo s FiO_2 ($r = 0,41$, $p = 0,05$), ali ne i s PEEP ($r = 0,09$, $p = 0,694$) i PS ($r = 0,17$, $p = 0,413$). Slično tome, i vrijednosti koncentracije IL-33 bile su značajno povezane samo s FiO_2 ($r = 0,42$, $p = 0,04$), ali ne i s PEEP ($r = 0,12$, p

5. REZULTATI

= 0,589) i PS ($r = 0,22$, $p = 0,301$). Ukupno uzevši, više vrijednosti i aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile su povezane s višim vrijednostima primijenjenog FiO_2 , ali ne i vrijednostima PEEP i PS za vrijeme mehaničke ventilacije.

Također, ispitali smo razlikuju se vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 kod ispitanika koji su ventilirani većim FiO_2 ($n = 12$), od onih koji su ventilirani višim PEEP-om ($n = 8$). Pri tome smo definirali da su ispitanici koji su ventilirani većim FiO_2 oni koji su u trenu uzorkovanja ventilirani s $FiO_2 \geq 60\%$ te PEEP-om ≤ 10 mbar, a ispitanici ventilirani većim PEEP-om oni koji su trenu uzorkovanja ventilirani s PEEP-om ≥ 10 mbar i $FiO_2 \leq 60\%$. Četiri ispitanika u trenu uzorkovanja krvi ventilirani su i s FiO_2 većim od 60% i PEEP-om većim od 10 mbar te ih nismo uzeli u obzir pri ovom ispitivanju odnosa. Iako je prosječna vrijednost aktivnosti kalpaina 1 bila veća kod ispitanika koji su ventilirani većim FiO_2 ($6,36 \pm 2,72$ RFU/ μ L), u odnosu na ispitanike koji su ventilirani većim PEEP-om ($4,74 \pm 1,01$ RFU/ μ L), t-testom za nezavisne uzorke nije utvrđena statistički značajna razlika između ovih skupina, $t(15,03) = 1,87$, $p = 0,081$. Slično tome, nije utvrđena statistički značajna razlika između dviju skupina, a ni s obzirom na vrijednost koncentracije IL-33, $t(18) = 1,36$, $p = 0,192$. Prosječna vrijednost koncentracije IL-33 u skupini ispitanika ventiliranih s većim FiO_2 iznosila je $7,44 \pm 1,25$ μ g/L, a kod ispitanika ventiliranih s većim PEEP-om $6,78 \pm 0,62$ μ g/L. Dobiveni rezultati ukazuju na to da činjenica je li je ispitanik ventiliran većim FiO_2 ili većim PEEP-om nije imalo učinke na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33.

Ispitana je i povezanost vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s postignutim vršnim inspiratornim tlakom (PIP) i „*driving pressure*“ (ΔP) za vrijeme mehaničke ventilacije. Korelacijskom analizom utvrđena je značajna povezanost aktivnosti kalpaina 1 i s postignutim PIP-om ($r = 0,66$, $p = 0,001$) i s postignutim ΔP ($r = 0,67$, $p = 0,001$). Slični rezultati utvrđeni su i za povezanost između vrijednosti koncentracije IL-33 i PIP-a ($r = 0,69$, $p = 0,001$) te ΔP ($r = 0,64$, $p = 0,001$). Drugim riječima, više vrijednosti i aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile su povezane i s višim PIP-om i ΔP .

Također, kako je ranije navedeno ispitali smo postoji li statistički značajna razlika u vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na modalitet mehaničke ventilacije koji je primjenjivan u trenu uzorkovanja krvi. Najčešći modaliteti ventilacije među ispitanicima koji su mehanički ventilirani bili su sinkronizirana intermitentna mandatorna

5. REZULTATI

ventilacija (SIMV) koju smo zabilježili kod 13 ispitanika (54 %) i dvofazna ventilacija pozitivnim tlakom (BiPAP) koju smo zabilježili kod 6 ispitanika (25 %). Minutna mandatorna ventilacija (MMV) zabilježena je kod 3 ispitanika (12,5 %), a kontinuirana primjena pozitivnog tlaka uz inspiratornu tlačnu potporu (CPAP + PS) kod dva ispitanika (8,5 %). Deskriptivna statistika za aktivnost kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na modalitet mehaničke ventilacije prikazana je u Tablici 5.19.

Tablica 5.19. Prosječne vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na modalitet mehaničke ventilacije

Mod mehaničke ventilacije	Broj ispitanika	Kalpain 1 (RFU/ μ L)		IL-33 (μ g/L)	
		<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>
CPAP + PS	2	1,95	0,07	5,10	0,00
BiPAP	6	5,92	2,26	7,23	0,74
SIMV	13	5,82	2,42	7,24	1,23
MMV	3	5,70	2,69	7,02	0,89

Legenda. *M* = medijan; *SD* = standardna devijacija; CPAP + PS – kontinuirana primjena pozitivnog tlaka uz inspiratornu tlačnu potporu, BiPAP – dvofazna ventilacija pozitivnim tlakom, SIMV – sinkronizirana intermitentna mandatorna ventilacija, MMV – minutna mandatorna ventilacija

S obzirom na vrlo male poduzorke nisu provedene statističke analize, ali usporedbom aritmetičkih sredina može se uočiti da su vrijednosti i aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile najniže kada je kao modalitet ventilacije korišten CPAP + PS. No, treba napomenuti da se radi o samo dva ispitanika. Generalno se može zaključiti da su vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile podjednake kod različitih modaliteta mehaničke ventilacije.

U konačnici, ispitali smo i povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s promjenom respiratorne potpore u skupini ispitanika iz ispitivane skupine. Od 16 ispitanika koji su u vrijeme uzorkovanja krvi bili na oksigenoterapiji, kod njih se 7, zbog pogoršanja respiratorne insuficijencije u daljnjem tijeku bolesti, primijenila mehanička ventilacija, dok je njih 9 ostalo na oksigenoterapiji. Sukladno tome, ove smo ispitanike podijelili u dvije skupine: ispitanici s nepromijenjenom respiratornom potporom ($n = 24$; oni koji su od početka na mehaničkoj ventilaciji) i ispitanici s promijenjenom respiratornom potporom ($n = 7$; oni koji su početno bili na oksigenoterapiji, a kasnije su zahtijevali mehaničku ventilaciju u daljnjem liječenju). Ove dvije skupine nisu se značajno razlikovale s obzirom na dob, $F(1, 29) = 0,36$, $p = 0,554$, odnosno prosječna dob ispitanika s promijenjenom respiratornom

5. REZULTATI

potporom iznosila je $63,71 \pm 7,61$ godina, dok je prosječna dob ispitanika s nepromijenjenom respiratornom potporom iznosila $65,92 \pm 8,81$ godina. Deskriptivna statistika i usporedba vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na promjenu respiratorne potpore prikazana je u Tablici 5.20.

Tablica 5.20. Prosječne vrijednosti i usporedba vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na promjenu respiratorne potpore

Faktori	Nepromijenjen respiratorni status (n = 24)		Promijenjen respiratorni status (n = 7)		t-test
	M	SD	M	SD	t-vrijednost
Kalpain 1 (RFU/ μ L)	5,71	2,23	2,90	0,44	5,78***
IL-33 (μ g/L)	7,15	1,01	5,53	0,27	6,00***

Legenda. M = medijan; SD = standardna devijacija; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Kao što se može vidjeti u Tablici 5.20., ispitanici iz ispitivane skupine koji su imali nepromijenjen respiratorni status (od početka su mehanički ventilirani), imali su značajno više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 od ispitanika koji su promijenili respiratorni status tijekom liječenja (početno su bili na oksigenoterapiji).

5.5.Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s duljinom trajanja bolesti

U istraživanju smo ispitivali i mogući utjecaj dana uzorkovanja, tj. duljine trajanja bolesti na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Dan bolesti pri uzorkovanju krvi na razini cijelog uzorka kretao se između 10. i 19. dana s prosječnom vrijednosti $13,66 \pm 2,32$ dana. Kada se radi o odnosu vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 i dana uzorkovanja, nisu utvrđene značajne korelacije. Tako je korelacija vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 s danom uzorkovanja iznosila $r = 0,19$, $p = 0,087$, a vrijednosti koncentracije IL-33 $r = 0,18$, $p = 0,089$. Prema tome, vrijednosti obaju faktora bile su podjednake neovisne o danu bolesti pri uzorkovanju krvi.

Ako se promatraju ispitivane skupine, kontrolna i ispitivana skupina značajno su se razlikovale s obzirom na dan bolesti pri uzorkovanju, $t(78) = 2,33$, $p = 0,022$. U kontrolnoj skupini ispitanici su prilikom uzorkovanja krvi bili kraće bolesni ($13,98 \pm 2,28$ dana) od ispitanika iz ispitivane skupine ($14,25 \pm 2,23$ dana). Unatoč tome, vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 nisu bile značajno povezane s danom uzorkovanja ni u

5. REZULTATI

kontrolnoj ni u ispitivanoj skupini. U kontrolnoj skupini korelacija aktivnosti kalpaina 1 i dana uzorkovanja iznosila je $r = 0,06$ ($p = 0,706$), a korelacija vrijednosti koncentracije IL-33 i dana uzorkovanja iznosila je $r = 0,08$ ($p = 0,614$). Slično tome, u ispitivanoj skupini korelacija dana uzorkovanja s vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 iznosila je $r = 0,01$ ($p = 0,967$), a s vrijednostima koncentracije IL-33 $r = 0,06$ ($p = 0,716$).

5.6. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s kroničnim komorbiditetima

Prevalencija komorbiditeta među svim ispitanicima, kao i između ispitivanih skupina prikazana je u Tablici 5.21. Od komorbiditeta među svim ispitanicima najčešće su bili arterijska hipertenzija koja je prisutna kod više od polovine ispitanika, nakon čega slijede pretilost, šećerna bolest te hiperlipidemija. Njih 17,5 % ($n = 14$) bez komorbiditeta je, pri čemu je njih 78,6 % ($n = 11$) iz kontrolne skupine.

Tablica 5.21. Prevalencija komorbiditeta među ispitanicima i usporedba između ispitivanih skupina

Komorbiditet	Svi ispitanici (N = 80)	Kontrolna skupina (n = 40)	Ispitivana skupina (n = 40)	χ^2
Hipertenzija	53,8%	37,5%	70,0%	8,50***
Hiperlipidemija	20,0%	12,5%	27,5%	2,81
Šećerna bolest	31,3%	15,0%	47,5%	9,83**
Pretilost	42,5%	27,5%	57,5%	7,36**
Stabilna koronarna bolest	16,3%	10,0%	22,5%	2,30
Kronična kardiomiopatija	16,3%	7,5%	25,0%	4,50*
Fibrilacija atrijska	11,3%	7,5%	15,0%	—
KOPB	11,3%	7,5%	15,0%	—
Astma	7,5%	10,0%	5,0%	—
Alergijsko oboljenje	16,3%	12,5%	20,0%	0,83
Kronična bolest bubrega	21,3%	12,5%	30,0%	3,70*
Autoimuno oboljenje	15,0%	12,5%	17,5%	0,39
Maligna bolest†	7,5%	2,5%	12,5%	—
Ostali komorbiditeti	12,5%	10,0%	15,0%	—

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; †preboljena maligna bolesti ili maligna bolest u remisiji

5. REZULTATI

Hi-kvadrat testom utvrđene su značajne razlike među ispitivanim skupinama s obzirom na arterijsku hipertenziju, šećernu bolest, pretilost, kroničnu kardiomiopatiju i kroničnu bolest bubrega koji su bili prisutniji u ispitanika ispitivane skupine u odnosu na ispitanike kontrolne skupine. I drugi komorbiditeti bili su prisutniji u ispitivanoj skupini. Jedini izuzetak predstavlja astma koja je bila češća u kontrolnoj skupini.

Deskriptivna statistika za vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 za sve komorbiditete prikazana je u Tablici 5.22. i 5.23.

Korelacijskom analizom, uz kontrolu učinaka dobi, ispitan je odnos vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s različitim komorbiditetima (Tablica 5.24.).

Kada se radi o odnosu pojedinih komorbiditeta s vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 na razini cijelog uzorka, značajne korelacije utvrđene su sa šećernom bolesti, kroničnom kardiomiopatijom i preboljenom malignom bolesti ili malignom bolesti u remisiji. Pri tome su više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 izmjerene kod osoba s prethodno navedenim komorbiditetima. Slični rezultati dobiveni su i za koncentraciju IL-33, pri čemu je viša vrijednost, uz već spomenute komorbiditete povezane s aktivnosti kalpaina 1, utvrđena i kod pretilih osoba. Veličine korelacija bile su slične za oba parametra. Kod ispitanikâ kontrolne skupine vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile su značajno i negativno povezane sa stabilnom koronarnom bolešću. Za razliku od toga, u ispitivanoj skupini, više vrijednosti ovih dvaju faktora izmjerene su kod ispitanika s preboljenom malignom bolesti ili malignom bolesti u remisiji, dok je značajno viša vrijednost koncentracije IL-33 utvrđena i kod ispitanika s kroničnom kardiomiopatijom. Općenito, korelacije komorbiditeta s vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u obje su skupine u pravilu niske, što je vjerojatno posljedica malih poduzoraka, posebice kada se radi o pojedinim komorbiditetima.

5. REZULTATI

Tablica 5.22. Prosječne vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 (RFU/ μ L) za sve komorbiditete

Komorbiditet	Prisutnost	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
		Ne/Da	M	SD	M	SD	M
Hipertenzija	Ne	2,21	0,37	0,92	0,36	4,23	1,91
	Da	3,17	0,34	1,10	0,32	4,57	2,51
Hiperlipidemija	Ne	2,53	2,20	0,99	0,36	4,39	2,05
	Da	3,53	3,06	1,00	0,34	4,68	3,06
Šećerna bolest	Ne	2,17	1,93	1,02	0,35	4,04	1,97
	Da	3,96	2,91	0,84	0,35	4,94	2,64
Pretilost	Ne	2,24	2,19	0,96	0,36	4,41	2,30
	Da	3,40	2,56	1,06	0,34	4,51	2,40
Stabilna koronarna bolest	Ne	2,64	2,44	0,97	0,36	4,57	2,39
	Da	3,19	2,29	1,15	0,26	4,10	2,19
Kronična kardiomiopatija	Ne	2,39	2,09	0,98	0,35	4,13	2,01
	Da	4,48	3,21	1,18	0,30	5,47	3,00
Fibrilacija atrijsa	Ne	2,57	2,29	0,98	0,35	4,31	2,24
	Da	3,96	3,09	1,17	0,32	5,36	2,86
KOPB	Ne	2,73	2,47	1,00	0,33	4,61	2,42
	Da	2,71	1,94	0,83	0,60	3,65	1,64
Astma	Ne	2,76	2,42	0,99	0,37	4,43	2,36
	Da	2,39	2,39	0,98	0,22	5,21	2,11
Alergijsko oboljenje	Ne	2,69	2,51	0,95	0,35	4,60	2,47
	Da	2,92	1,84	1,30	0,15	3,93	1,65
Kronična bolest bubrega	Ne	2,45	2,09	1,03	0,34	4,23	2,01
	Da	3,75	3,21	0,69	0,27	5,02	2,99
Autoimuno oboljenje	Ne	2,72	2,50	0,98	0,35	4,57	2,48
	Da	2,76	1,88	1,06	0,37	3,96	1,51
Maligna bolest†	Ne	2,50	2,10	1,00	0,35	4,17	1,97
	Da	5,54	4,14	0,46	—	6,56	3,70
Ostali komorbiditeti	Ne	2,81	2,52	1,01	0,36	4,71	2,42
	Da	2,18	1,43	0,82	0,28	3,08	1,08

Legenda. M = medijan; SD = standardna devijacija; „—“ = podaci nisu dostupni/nema ispitanika ili je samo jedan ispitanik te nije moguće izračunati standardnu devijaciju; KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest; †preboljena maligna bolesti ili maligna bolest u remisiji

5. REZULTATI

Tablica 5.23. Prosječne vrijednosti koncentracije IL-33 ($\mu\text{g/L}$) za sve komorbiditete

Komorbiditet	Prisutnost	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
		Ne/Da	M	SD	M	SD	M
Hipertenzija	Ne	4,77	1,32	4,01	0,56	6,35	0,99
	Da	5,73	1,50	4,29	0,51	6,50	1,27
Hiperlipidemija	Ne	5,16	1,40	4,11	0,56	6,42	1,01
	Da	5,79	1,76	4,14	0,57	6,54	1,60
Šećerna bolest	Ne	4,94	1,25	4,15	0,55	6,22	0,96
	Da	6,04	1,72	3,91	0,54	6,71	1,37
Pretilost	Ne	4,92	1,36	4,07	0,56	6,36	1,06
	Da	5,79	1,54	4,24	0,54	6,53	1,29
Stabilna koronarna bolest	Ne	5,21	1,53	4,09	0,56	6,52	1,23
	Da	5,66	1,25	4,36	0,42	6,23	1,04
Kronična kardiomiopatija	Ne	5,07	1,33	4,10	0,56	6,26	0,99
	Da	6,41	1,79	4,37	0,52	7,03	1,55
Fibrilacija atrijsa	Ne	5,20	1,48	4,10	0,55	6,40	1,20
	Da	5,94	1,52	4,33	0,59	6,74	1,12
KOPB	Ne	5,28	1,50	4,14	0,53	6,51	1,21
	Da	5,35	1,49	3,81	0,90	6,12	1,04
Astma	Ne	5,31	1,49	4,13	0,57	6,43	1,19
	Da	4,97	1,63	4,01	0,45	6,89	1,26
Alergijsko oboljenje	Ne	5,22	1,55	4,05	0,55	6,51	1,23
	Da	5,61	1,13	4,60	0,20	6,24	1,00
Kronična bolest bubrega	Ne	5,14	1,32	4,18	0,54	6,34	0,99
	Da	5,81	1,95	3,64	0,44	6,72	1,55
Autoimuno oboljenje	Ne	5,26	1,53	4,09	0,56	6,49	1,22
	Da	5,45	1,33	4,26	0,53	6,29	1,02
Maligna bolest†	Ne	5,16	1,34	4,13	0,54	6,30	0,99
	Da	6,83	2,42	3,36	—	7,52	1,93
Ostali komorbiditeti	Ne	5,33	1,54	4,14	0,56	6,58	1,21
	Da	4,99	1,11	3,89	0,49	5,72	0,67

Legenda. M = medijan; SD = standardna devijacija; „—“ = podaci nisu dostupni/nema ispitanika ili je samo jedan ispitanik te nije moguće izračunati standardnu devijaciju; KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest; †preboljena maligna bolest ili maligna bolest u remisiji

5. REZULTATI

Tablica 5.24. Interkorelacije aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s pojedinim komorbiditetima

Komorbiditeti	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	Kalpain 1	IL-33	Kalpain 1	IL-33	Kalpain 1	IL-33
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
Hipertenzija	0,21	0,23*	0,08	0,08	0,07	0,06
Hiperlipidemija	0,09	0,07	-0,13	-0,11	0,04	0,01
Šećerna bolest	0,35**	0,36**	0,04	0,07	0,19	0,20
Pretilost	0,20	0,25*	0,04	0,06	0,03	0,08
Stabilna koronarna bolest	-0,06	-0,08	-0,33*	-0,32*	-0,10	-0,14
Kronična kardiomiopatija	0,26*	0,26*	-0,24	-0,27	0,26	0,33*
Fibrilacija atriya	0,13	0,10	-0,06	-0,11	0,16	0,11
KOPB	-0,03	-0,02	-0,16	-0,20	-0,16	-0,13
Astma	0,07	0,09	0,25	0,17	0,10	0,13
Alergijsko oboljenje	0,04	0,11	0,23	0,23	-0,08	-0,04
Kronična bolest bubrega	0,24	0,21	-0,24	-0,23	0,15	0,15
Autoimuno oboljenje	-0,01	0,04	0,15	0,18	-0,10	-0,08
Maligna bolest†	0,38**	0,36**	-0,15	-0,12	0,36*	0,37*
Ostali komorbiditeti	-0,06	-0,04	-0,08	-0,04	-0,25	-0,26

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; „—“ = autokorelacija; KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; †preboljena maligna bolesti ili maligna bolest u remisiji

5.7. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s težinom bolesti COVID-19

U ovom istraživanju ispitali smo i povezanost vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s težinom bolesti COVID-19. Na razini svih ispitanika (kontrolna i ispitivana skupina) ispitali smo povezanost s obzirom na općeprihvaćenu podjelu težine bolesti COVID-19 prema MEWS bodovnom sustavu, a na razini ispitanika unutar kontrolne skupine (kritično oboljeli ispitanici) s obzirom na APACHE IV bodovni sustav.

U Tablici 5.25. prikazana je deskriptivna statistika i usporedba vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s obzirom na težinu bolesti prema MEWS bodovnom sustavu koja je određena za sve ispitanike (kontrola i ispitivana skupina). S obzirom na MEWS bodovni sustav, njih 40 % imalo je blagi ili srednje teški oblik bolesti ($n_{ukupno} = 32$; $n_{kontrolna}$

5. REZULTATI

skupina = 32; $n_{ispitivana\ skupina} = 0$), njih 10 % imalo je teški oblik bolesti ($n_{ukupno} = 8$; $n_{kontrolna\ skupina} = 8$; $n_{ispitivana\ skupina} = 0$), a njih 50 % kritični oblik bolesti ($n_{ukupno} = 40$; $n_{kontrolna\ skupina} = 0$; $n_{ispitivana\ skupina} = 40$). Usporedbom kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na MEWS bodovni sustav, očekivano, utvrđena je statistički značajna razlika, $\chi^2(2, N = 80) = 80,00, p = 0,001$.

Tri skupine ispitanika temeljene na težini bolesti prema MEWS bodovnom sustavu nisu se značajno razlikovale s obzirom na spol, ali su se razlikovale s obzirom na dob, $F(2, 77) = 12,88, p = 0,001$. U skupini ispitanika s teškim oblikom bolesti bili su najstariji ispitanici ($65,75 \pm 5,84$ godina), nakon čega slijede ispitanici s kritičnim oblikom bolesti ($64,68$ godina $\pm 8,34$ godina) te ispitanici s blagim ili srednje teškim oblikom bolesti ($53,91 \pm 11,29$ godina). Prema tome, prilikom analiza ovih ispitivanih skupina kontrolirat će se učinak dobi.

Tablica 5.25. Prosječne vrijednosti i usporedba aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s obzirom na težinu COVID-19 bolesti temeljeno na MEWS bodovnom sustavu

Faktori	Blagi/srednje teški oblik (n=32)		Teški oblik (n = 8)		Kritični oblik (n = 40)		ANCOVA	Post hoc test
	M	SD	M	SD	M	SD	F-omjer	Bonferroni
Kalpain 1 (RFU/μL)	0,88	0,31	1,41	0,05	4,47	2,33	43,65***	Kritični > Blagi*** Kritični > Teški***
IL-33 (μg/L)	3,96	0,50	4,75	0,08	6,45	1,18	70,12***	Kritični > Blagi*** Kritični > Teški***

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; M = medijan; SD = standardna devijacija; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Kao što se može vidjeti u Tablici 5.25., i nakon kontrole učinaka dobi, najviše vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 utvrđene su u skupini ispitanika s kritičnim oblikom bolesti, koja se značajno razlikovala s obzirom na vrijednost oba parametra od drugih dviju skupina. Pri tome je za značajne razlike utvrđena velika veličina učinka ($\eta_p^2_{kalpain\ 1} = 0,534$ te $\eta_p^2_{IL-33} = 0,534$). Suprotno tome, ispitanici s blagim ili srednje teškim oblikom bolesti i oni s teškim oblikom bolesti nisu se međusobno značajno razlikovali.

Ispitan je i odnos između vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u pojedinim skupinama temeljenim na težini bolesti s obzirom na MEWS bodovni sustav, također, uz kontrolu učinaka dobi. U sve tri skupine korelacije između vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile su gotovo identične. Tako je ona u skupini s blagim ili

5. REZULTATI

srednje teškim oblikom bolesti i u skupini s teškim oblikom bolesti iznosila $r = 0,97$, $p = 0,001$, a u skupini s kritičnim oblikom bolesti $r = 0,96$, $p = 0,001$. Dakle, više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 bile su povezane i s višim koncentracijama IL-33 u svim skupinama.

APACHE IV bodovni sustav računat je samo za ispitivanu skupinu jer su ti ispitanici ulazili u kategoriju kritično oboljelih bolesnika. Raspon vrijednosti APACHE IV zbroja kretao se od 45 do 91, s prosječnom vrijednosti $75,85 \pm 10,67$. Nakon kontrole učinaka dobi, korelacija APACHE IV zbroja i vrijednosti aktivnosti kaplaina 1 bila je statistički značajna, pozitivna i umjerena ($r = 0,50$, $p = 0,001$), a slični rezultati su utvrđeni i za koncentracije IL-33 ($r = 0,54$, $p = 0,001$). U oba slučaja viši rezultat APACHE IV zbroja bio je povezan i s višim vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33.

5.8.Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s radiološkim nalazom COVID-19 pneumonije

U ovom istraživanju ispitali smo prosječne vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 te njihovu povezanost s radiološkim nalazom opisane COVID-19 pneumonije: intersticijski uzorak, fokalna konsolidacija i multifokalna konsolidacija, a što je prikazano u Tablici 5.26. i 5.27. Kod 51 % ispitanika utvrđena je multifokalna konsolidacija od kojih je većina bila u ispitivanoj skupini. Nakon toga, slijedi intersticijski uzorak koji je utvrđen kod 34 % ispitanika koji su većinom bili u kontrolnoj skupini. Fokalna konsolidacija utvrđena je kod preostalih ispitanika koji su svi bili u kontrolnoj skupini.

Tablica 5.26. Prosječne vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 (RFU/ μ L) u odnosu na radiološki nalaz

Radiološki nalaz	Svi ispitanici (N = 80)			Ispitivana skupina (n = 40)			Ispitivana skupina (n = 40)		
	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>
Intersticijski uzorak	27	1,43	1,09	21	0,90	0,35	6	3,29	0,60
Fokalna konsolidacija	11	1,11	0,36	11	1,11	0,36	—	—	—
Multifokalna konsolidacija	41	4,04	2,64	7	1,00	0,32	34	4,67	2,46

Legenda. M = medijan; SD = standardna devijacija; „—“ = podaci nisu dostupni/nema ispitanika ili je samo jedan ispitanik te nije moguće izračunati standardnu devijaciju

5. REZULTATI

Tablica 5.27. Prosječne vrijednosti koncentracije IL-33 ($\mu\text{g/L}$) u odnosu na radiološki nalaz

Radiološki nalaz	Svi ispitanici (N = 80)			Ispitivana skupina (n = 40)			Ispitivana skupina (n = 40)		
	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>
Intersticijski uzorak	27	4,39	0,92	21	4,00	0,55	6	5,79	0,43
Fokalna konsolidacija	12	4,30	0,55	11	4,30	0,55	—	—	—
Multifokalna konsolidacija	41	6,15	1,47	8	4,11	0,54	34	6,57	1,23

Legenda. M = medijan; SD = standardna devijacija; „—“ = podaci nisu dostupni/nema ispitanika ili je samo jedan ispitanik te nije moguće izračunati standardnu devijaciju

Na razini cijelog uzorka, analizom kovarijance (uz kontrolu učinaka dobi) provjereno je razlikuju li se ispitanici s različitim radiološkim nalazima s obzirom na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Pri tome je utvrđena statistički značajna razlika kako za aktivnost kalpaina 1 [$F(2, 79) = 13,59, p = 0,001$] tako i za koncentraciju IL-33 [$F(2, 79) = 15,89, p = 0,001$]. Ispitanici kojima je utvrđena multifokalna konsolidacija na radiološkom nalazu imali su značajno više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 od ispitanika kojima su utvrđeni intersticijski uzorak ($p < 0,001$) ili fokalna konsolidacija ($p < 0,001$). Suprotno tome, pacijenti s radiološki nađenim intersticijskim uzorkom i fokalnom konsolidacijom nisu se značajno razlikovali s obzirom na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Analize su ponovljene i u pojedinim skupinama ispitanika. U kontrolnoj skupini, ispitanici s različitim radiološkim nalazima nisu se statistički značajno razlikovale ni s obzirom na vrijednost aktivnosti kalpaina 1 [$F(1, 39) = 1,62, p = 0,212$] ni s obzirom na vrijednost koncentracije IL-33 [$F(1, 39) = 1,36, p = 0,269$]. Slični rezultati utvrđeni su i u ispitivanoj skupini, odnosno ispitanici kod kojih je utvrđen intersticijski uzorak te ispitanici kod kojih je utvrđena multifokalna konsolidacija nisu se statistički značajno razlikovali ni s obzirom na vrijednost aktivnosti kalpaina 1 [$F(1, 37) = 1,78, p = 0,190$] ni s obzirom na vrijednost koncentracije IL-33 [$F(1, 37) = 2,28, p = 0,140$].

5.9. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s načinom liječenja bolesti COVID-19

S obzirom da su u trenutku uzorkovanja krvi ispitanici bili liječeni specifičnim lijekovima ili postupcima, ispitali smo i njihov utjecaj na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Tablica 5.28. prikazuje prevalenciju primjene pojedinih lijekova i

5. REZULTATI

postupaka u liječenju COVID-19 bolesti i usporedbu između ispitanika kontrolne i ispitivane skupine.

Tablica 5.28. Prevalencija načina liječenja COVID-19 bolesti među ispitanicima i usporedba između ispitivanih skupina

Način liječenja	Svi ispitanici (N = 80)	Kontrolna skupina (n = 40)	Ispitivana skupina (n = 40)	χ^2
Deksametazon	38,8%	70,0%	7,0%	32,92***
Metilprednizolon	60,0%	27,5%	92,5,5%	35,21***
Remdesivir	37,5%	32,5%	42,5%	0,85
Tocilizumab	6,3%	0,0%	12,5%	5,33*
Imunoglobulini	5,0%	0,0%	10,0%	4,21*
Hemoperfuzija citokina	7,5%	0,0%	15,0%	6,49*
Kortikosteroid + Remdesivir	37,5%	32,5%	42,5%	0,85

Legenda. Analiza je provedena uz kontrolu dobi ispitanika; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Kao što se može vidjeti u Tablici 5.28. među svim ispitanicima najčešće primjenjivani lijek jest metilprednizolon, nakon čega slijede deksametazon, remdesivir te kombinacija kortikosteroida i remdesivira. Općenito, u ispitivanoj skupini češće je primjenjivan metilprednizolon, a u kontrolnoj skupini deksametazon od kortikosteroida. Usporedbom dviju skupina hi-kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razlika za sve lijekove i načine liječenja, osim za remdesivir i kombinaciju kortikosteroida i remdesivira.

Tablica 5.29. i 5.30. prikazuju prosječne vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 na razini svih ispitanika, kao i u pojedinim ispitivanim skupinama u ovisnosti o primjeni lijekova i postupaka, odnosno načinu liječenja COVID-19 bolesti.

U Tablici 5.31. prikazane su povezanosti vrijednosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s pojedinim lijekovima i postupcima, odnosno načinom liječenja bolesti COVID-19.

5. REZULTATI

Tablica 5.29. Prosječne vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 (RFU/ μ L) u ovisnosti o načinu liječenja bolesti COVID-19

Način liječenja	Prisutnost	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
		M	SD	M	SD	M	SD
Deksametazon	Ne	3,72	2,58	1,02	0,28	4,59	2,38
	Da	1,17	0,71	0,98	0,38	2,96	0,44
Metilprednizolon	Ne	1,17	0,69	0,99	0,38	2,96	0,44
	Da	3,77	2,59	1,00	0,29	4,59	2,38
Remdesivir	Ne	2,97	2,74	1,10	0,27	5,15	2,73
	Da	2,34	1,68	0,76	0,39	3,54	1,20
Tocilizumab	Ne	2,50	2,16	0,99	0,35	4,22	2,08
	Da	6,18	3,47	—	—	6,18	3,47
Imunoglobulini	Ne	2,55	2,26	0,99	0,35	4,28	2,23
	Da	6,17	2,87	—	—	6,17	2,87
Hemoperfuzija citokina	Ne	2,41	2,08	0,99	0,35	4,07	2,04
	Da	6,72	2,79	—	—	6,72	2,79
Kortikosteroid + Remdesivir	Ne	2,97	2,74	1,10	0,27	5,15	2,73
	Da	2,34	1,68	0,76	0,39	3,54	1,20

Legenda. M = medijan; SD = standardna devijacija; „—“ = podaci nisu dostupni/nema ispitanika ili je samo jedan ispitanik te nije moguće izračunati standardnu devijaciju

5. REZULTATI

Tablica 5.30. Prosječne vrijednosti koncentracije IL-33 ($\mu\text{g/L}$) u ovisnosti o načinu liječenja bolesti COVID-19

Način liječenja	Prisutnost	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
		M	SD	M	SD	M	SD
Deksametazon	Ne	5,93	1,50	4,10	0,52	6,53	1,20
	Da	4,26	0,70	4,12	0,57	5,57	0,36
Metilprednizolon	Ne	4,27	0,69	4,13	0,57	5,57	0,36
	Da	5,96	1,50	4,07	0,53	6,53	1,20
Remdesivir	Ne	5,43	1,57	4,29	0,44	6,76	1,33
	Da	5,05	1,35	3,75	0,59	6,04	0,80
Tocilizumab	Ne	5,14	1,36	4,12	0,55	6,31	1,01
	Da	7,44	1,87	—	—	7,44	1,87
Imunoglobulini	Ne	5,19	1,45	4,12	0,55	6,38	1,19
	Da	7,16	0,97	—	—	7,16	0,97
Hemoperfuzija citokina	Ne	5,08	1,30	4,12	0,55	6,22	0,96
	Da	7,80	1,49	—	—	7,80	1,49
Kortikosteroid + Remdesivir	Ne	5,43	1,57	4,29	0,44	6,76	1,33
	Da	5,05	1,35	3,75	0,59	6,04	0,80

Legenda. M = medijan; SD = standardna devijacija; „—“ = podaci nisu dostupni/nema ispitanika ili je samo jedan ispitanik te nije moguće izračunati standardnu devijaciju

5. REZULTATI

Tablica 5.31. Interkorelacije aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u ovisnosti o načinu liječenja COVID-19 bolesti

Način liječenja	Svi ispitanici (N = 80)		Kontrolna skupina (n = 40)		Ispitivana skupina (n = 40)	
	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>	<i>Kalpain 1</i>	<i>IL-33</i>
<i>IL-33</i>	0,97***	—	0,95***	—	0,97***	—
Deksametazon	-0,47***	-0,49***	-0,11	-0,01	-0,17	-0,19
Metilprednizolon	0,49***	0,53***	-0,17	0,06	0,17	0,19
Remdesivir	-0,14	-0,15	-0,36*	-0,35*	-0,39*	-0,38
Tocilizumab	0,41***	0,45***	—	—	0,32*	0,38*
Imunoglobulini	0,29*	0,23*	—	—	0,23	0,18
Hemoperfuzija citokina	0,49***	0,59***	—	—	0,42*	0,51**
Kortikosteroid + Remdesivir	-0,14	-0,15	-0,36*	-0,35*	-0,39*	-0,38*

Legenda. „—“ = autokorelacija; „—“ = podaci nisu dostupni/nema ispitanika ili je samo jedan ispitanik te nije moguće izračunati korelacije; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Kao što se može vidjeti u Tablici 5.31., na razini cijelog uzorka vrijednost aktivnosti kalpaina 1 bila je značajno, nisko do umjereno povezana s nizom lijekova i postupaka liječenja. Konkretno, više koncentracije aktivnosti kalpaina 1 bile su izmjerene kod onih koji su liječeni metilprednizolonom, tocilizumabom i imunoglobulinima te onima kojima je rađena hemoperfuzija citokina. Suprotno tome, ispitanici koji su liječeni deksametazonom imali su značajno niže vrijednosti aktivnosti kalpaina 1. Kada se radi o pojedinim skupinama ispitanika, u kontrolnoj skupini vrijednost aktivnosti kalpaina 1 bila je značajno i negativno povezana s primjenom remdesivira i kombinacijskim liječenjem kortikosteroidom i remdesivirom. Slični rezultati utvrđeni su i u ispitivanoj skupini. Osim toga, u toj skupini utvrđene su značajne i pozitivne korelacije s primjenom tocilizumaba i postupkom hemoperfuzije citokina.

Također, kako je vidljivo u Tablici 5.31., vrijednosti koncentracija IL-33, slično vrijednosti aktivnosti kalpaina 1, bila je značajno, nisko do umjereno povezana s nizom lijekova i postupkom hemoperfuzije citokina na razini svih ispitanika. Konkretno, više koncentracije IL-33 bile su izmjerene kod onih koji su liječeni metilprednizolonom, tocilizumabom, imunoglobulinima te postupkom hemoperfuzije citokina, dok su niže izmjerene kod onih koji su liječeni deksametazonom. U kontrolnoj skupini vrijednosti koncentracije IL-33 bile su negativno povezane s primjenom remdesivira i kombinacijskog liječenja kortikosteroida i remdesivira. Slični rezultati utvrđeni su i u ispitivanoj skupini gdje

5. REZULTATI

su, osim toga, utvrđene i značajne pozitivne korelacije s primjenom tocilizumaba i postupkom hemoperfuzije citokina.

U obje skupine vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile su niže kod ispitanika koji su liječeni remdesivirom i kombinacijom kortikosteroida i remdesivira, dok su u skupini ispitanika s ARDS-om izmjerene više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i IL-33 kod ispitanika koji su primali tocilizumab i kojima je rađena hemoperfuzija citokina.

Naposljetku, provjerili smo postoje li razlike unutar ispitanika koji su mehanički ventilirani (skupina ispitanika s ARDS-om) u vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 te markera akutnog upalnog odgovora (interleukin 6, C-reaktivni protein i feritin) u ovisnosti provedbe postupka hemoperfuzije citokina. U skupini mehanički ventiliranih ispitanika ($n = 24$) kod njih šest (25 %) rađen je postupak hemoperfuzije citokina. Opisna statistika i usporedba ovih skupina prikazana je u Tablici 5.32.

Tablica 5.32. Prosječne vrijednosti i usporedba vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 te markera akutnog upalnog odgovora u odnosu na primjenu hemoperfuzije citokina kod mehanički ventiliranih ispitanika

Faktori	Nije rađena hemoperfuzija citokina (n = 18)		Rađena je hemoperfuzija citokina (n = 6)		t-test
	M	SD	M	SD	t-vrijednost
Kalpain 1 (RFU/μL)	5,37	2,00	6,72	2,78	1,29
IL-33 (μg/L)	6,94	0,74	7,80	1,49	1,88
IL-6 (ng/L)	517,12	236,61	488,66	399,61	0,21
CRP (mg/L)	184,25	64,69	236,51	93,81	1,53
Feritin (μg/L)	1042,55	282,50	765,86	544,42	1,63

Legenda. M = medijan; SD = standardna devijacija; IL-6 – interleukin 6, CRP – C-reaktivni protein; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Kod mehanički ventiliranih ispitanika kojima je rađena hemoperfuzija citokina izmjerene su više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 te koncentracije IL-33 i C-reaktivnog proteina te niže vrijednosti interleukina 6 i feritina. No, nijedna od razlika nije bila značajna na razini rizika od 5 %, što je vjerojatno posljedica vrlo malih poduzoraka. Razlika u koncentraciji IL-33 bila je značajna na razini rizika od 10 % ($p = 0,073$).

5.10. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s ishodom bolesti COVID-19

U konačnici, dodatno su ispitane vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u dvjema skupinama ispitanika koje su se razlikovale s obzirom na konačni ishod, odnosno onima koji su preživjeli i onima koji su umrli. Od 80 ispitanika, njih je 52 (65,0 %) preživjelo. Pri tome, oni koji su preživjeli bili su većinom iz kontrolne skupine u kojoj su svi ispitanici preživjeli ($n = 40$). U ispitivanoj skupini njih 28 (70 %) je umrlo. Dvije skupine različitog ishoda (preživjeli i umrli) značajno su se razlikovale s obzirom na dob, $t(78) = 7,86$, $p = 0,001$. Pri tome je skupina umrlih ispitanika bila starija ($64,82 \pm 9,08$) od skupine preživjelih ($58,13 \pm 10,99$ godina). Sukladno tome, vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u dvjema skupinama usporedit će se uz kontrolu dobi.

Na razini svih ispitanika, oni koji su umrli imali su više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 ($4,76 \pm 2,40$ RFU/ μ L) od onih koji su preživjeli ($1,63 \pm 1,55$ RFU/ μ L) te je ta razlika, nakon kontrole dobi, bila statistički značajna, $F(2, 77) = 39,13$, $p = 0,001$, $\eta_p^2 = 0,334$. Slično tome, dvije su se skupine statistički značajno razlikovale i po vrijednosti koncentracija IL-33, $F(2, 77) = 48,85$, $p = 0,001$, $\eta_p^2 = 0,389$. Prosječna vrijednost koncentracije IL-33 u skupini umrlih iznosila je $6,63 \pm 1,21$ μ g/L, a u skupini preživjelih $4,56 \pm 1,07$ μ g/L.

Kako bi se dodatno ispitala uloga vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u konačnom ishodu, uspoređeni su ispitanici koji su umrli, odnosno preživjeli, ali s istom težinom kliničke slike, odnosno samo iz ispitivane skupine (ispitanici s razvijenim ARDS-om). Da podsjetimo, iz ove je skupine njih 12 preživjelo (30 %), a 28 (70 %) umrlo. Prosječna vrijednost aktivnosti kalpaina 1 u skupini umrlih iznosila je $4,77 \pm 2,40$ RFU/ μ L, a u skupini preživjelih $3,77 \pm 2,07$ μ g/L, pri čemu ta razlika nije bila statistički značajna, $t(38) = 1,25$, $p = 0,218$. Slično tome, razlika između dviju skupina s obzirom na vrijednost koncentracije IL-33, također nije bila statistički značajna, $t(38) = 1,44$, $p = 0,159$. Konkretno, prosječna vrijednost koncentracije IL-33 u skupini umrlih iznosila je $6,63 \pm 1,21$ μ g/L, a u skupini preživjelih $6,05 \pm 1,04$ μ g/L.

6. RASPRAVA

Difuzno oštećenje alveola koje nalazimo u ARDS-u, osim proteazama i drugim enzimima oslobođenim iz upalnih stanica, može biti uzrokovano i aktivacijom vlastitih, endogenih proteaza koje nalazimo u plućnim epitelnim i endotelnim stanicama (240). U ovom pogledu, u našem istraživanju ispitali smo povezanost endogene cisteinske, kalcij ovisne proteaze – kalpaina 1 i interleukina 33 (IL-33), citokina koji djeluje kao alarmin i sudjeluje u pokretanju imunološkog odgovora s razvojem ARDS-a kod bolesnikâ s pneumonijom uzrokovanom SARS-CoV-2 virusom.

Raspravu, u kojoj tumačimo i uspoređujemo naše rezultate s rezultatima drugih istraživača podijelili smo u potpoglavlja koja slijede opisane rezultate u prethodnom poglavlju.

6.1. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s pojavnosti i težinom ARDS-a

Prosječne vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile su statistički značajno više u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno bile su više među ispitanicima koji su razvili ARDS na postojeću COVID-19 pneumoniju. Ovi su rezultati u skladu s ranije opisanim ulogama kalpaina 1 i IL-33 u pogledu razvoja ARDS-a. Uloga kalpaina 1 u razvoju ARDS-a ogleda se u njegovoj sposobnosti da izazove izravno oštećenje epitelnih i endotelnih stanica alveolokapilarne membrane izravnim proteolitičkim i proapoptotičkim djelovanjem (193, 241). Osim toga, kalpain 1 potiče i stvaranje i oslobađanje proupalnih citokina te na taj način pridonosi nastanku hiperinflamatornog stanja i citokinske oluje, ali posreduje i u nastanku plućne fibroze djelujući na profibrotičke faktore (TGF- β) i fibroblaste, što ima bitnu ulogu u nastanku fibroproliferativne faze ARDS-a (23, 242). Iako je dosta istraživanja provedeno na animalnim modelima i humanim epitelnim stanicama *in vitro*, u pogledu ispitivanja uloge kalpaina 1 u razvoju ARDS-a i plućnog oštećenja (22, 221, 241, 243), malo je istraživanja provedeno na ljudima, odnosno bolesnicima s razvijenim plućnim oštećenjem, odnosno ARDS-om. Oslanjajući se na ove opisane uloge kalpaina u pogledu razvoja ARDS-a, Yi i suradnici u svom istraživanju iz 2022. godine ispitivali su serumsku aktivnost kalpaina kod bolesnika koji su podvrgnuti kardiokirurškom zahvatu te su zabilježili njihove povišene vrijednosti kod onih bolesnika koji su razvili postoperativno akutno

6. RASPRAVA

oštećenje pluća. Na temelju serijskih praćenja serumskih vrijednosti aktivnosti kalpaina, zaključili su da je razina aktivnosti kalpaina sat vremena nakon završenog zahvata predstavljala neovisni prediktor za razvoj postoperativnog akutnog oštećenja pluća. Tako su serumsku razinu kalpaina predložili kao potencijalni biomarker u predviđanju razvoja akutnog oštećenja pluća nakon kardiokirurških zahvata (222). Zheng i suradnici u svom istraživanju, u kojemu su ispitivali serumsku aktivnost kalpaina kod bolesnikâ sa sistemskom sklerozom, našli su pozitivnu korelaciju između aktivnosti kalpaina i zahvaćenosti pluća (fibroza). Naime, bolesnici sa sistemskom sklerozom koji su imali zahvaćena pluća, imali su statistički značajno više razine serumske aktivnosti kalpaina, što također sugerira na njihovu ulogu u razvoju fibroze, bitne sastavnice u patogenezi kasne faze ARDS-a (244).

Povišene koncentracije IL-33 u serumu bolesnika oboljelih od akutnog plućnog oštećenja opisali su i drugi istraživači, što je u skladu i s našim rezultatima. Halat i suradnici opisali su povišene vrijednosti serumskog IL-33 kod bolesnika koji su imali ozljedu prsnog koša, a koji su razvili ARDS u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. To su bili bolesnici s ozljedom prsnog koša koji nisu razvili ARDS. S obzirom da su početne vrijednosti serumskog IL-33 bile posebno visoke kod bolesnika koji su razvili ARDS, predložili su ovaj citokin kao mogući prediktor razvoja ARDS-a. Ove početne visoke vrijednosti serumskog IL-33 objasnili su njegovom ulogom kao staničnog alarmina, odnosno čimbenika koji se oslobađa u prisutnosti oštećenja stanica i koji djeluje kao nuklearni faktor koji će poticati transkripciju citokina odgovornih za aktivaciju stanica urođene imunosti (186). Lin i suradnici također su našli povišene vrijednosti serumskog IL-33 kod bolesnikâ s razvijenim ARDS-om, u odnosu na zdrave dobrovoljce. Te su rezultate usporedili i s rezultatima animalnog modela ARDS-a. Kod miševa kod kojih su izazvali nastanak ARDS-a, našli su povišene razine IL-33 u serumu i plućnom tkivu, a primjena neutralizirajućih anti-IL-33 antitijela smanjila je oštećenje plućnog parenhima (164). Serumske koncentracije ispitivane su i kod oboljelih od COVID-a. Marković i suradnici 2021. godine objavili su rad u kojemu su pokazali da su povišene serumske razine IL-33 kod oboljelih od COVID-a bile povezane s težim oblicima bolesti COVID-19 te povećanom razinom proupalnih citokina sugerirajući na ulogu IL-33 u razvoju citokinske oluje kod bolesti COVID-19, a koja je ključni element za razvoj ARDS-a (229). I drugi autori opisivali su moguću povezanost IL-33 s razvojem hiperinflamatornog stanja oboljelih od COVID-19 (224, 226, 227). Uspoređujući vrijednosti IL-33 u serumima ispitanika oboljelih od COVID-a i kontrolne skupine koju su činili zdravi ispitanici, Moustafa i suradnici dobili su značajno više vrijednosti IL-33 u serumu oboljelih ispitanika, a njihove

6. RASPRAVA

vrijednosti pozitivno su korelirale s težinom bolesti (230). Majeed i suradnici također su na osnovi određivanja serumskih vrijednosti IL-33 kod oboljelih COVID-a opisali njegovu prognostičku važnost u razvoju težih oblika bolesti (231).

S obzirom na gore opisane rezultate istraživača o pozitivnoj povezanosti između vrijednosti i aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s težinom ARDS-a i plućnog oštećenja, kako kod oboljelih COVID-a, tako i kod ne-COVID-19 bolesnika, odredili smo njihove prosječne vrijednosti i usporedili ih s obzirom na težinu ARDS-a, temeljeno na klasifikaciji iz berlinske definicije. Naši rezultati poklapaju se s opisanim povezanostima. Oba parametra bila su najviša kod ispitanika koji su imali teški ARDS, potom kod ispitanika koji su imali umjereni ARDS, a najniže vrijednosti bile su kod ispitanika s blagim ARDS-om. Pri tome su se ispitanici s teškim ARDS-om statistički značajno razlikovali i od ispitanika s blagim i od ispitanika s umjerenim ARDS-om, dok se ispitanici s blagim i umjerenim ARDS-om nisu međusobno statistički značajno razlikovali u vrijednostima ovih parametara. Iz ovoga se može zaključiti da i aktivnost kalpaina 1 i koncentracije IL-33 mogu imati značajnu ulogu u patofiziologiji ARDS-a kod oboljelih od COVID-a, posebice u njegovim najtežim oblicima. Kako je poznata uloga kalpaina u posttranslacijskoj obradi neaktivne forme pro-IL-33 u aktivnu formu IL-33, što su Hayakawa i suradnici opisali kao jedan od ključnih koraka u aktivaciji IL-33 *in vivo* (165), ispitali smo korelaciju između aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Naši rezultati pokazali su njihovu međusobnu pozitivnu korelaciju, odnosno porastom aktivnosti kalpaina 1, rasla je i koncentracija IL-33, kako na razini svih ispitanika, tako i na razini ispitivanih skupina, što ide u prilog ulozi kalpaina u aktivaciji IL-33. O potrebi posttranslacijske obrade nativnog IL-33 da bi ostvario svoj potpuni proupalni učinak, pisali su i drugi istraživači (245, 246). Budući da nema istraživanja koja su ispitivala vrijednosti i međusobnu povezanost ovih dvaju parametra na bolesnicima s kojima bismo usporedili naše rezultate, teško je tumačiti ovu povezanost u kontekstu nastanka i patofiziologije ARDS-a te bi za ovakve zaključke trebalo provesti dodatna istraživanja koja bi uključivala bolesnike oboljele od ARDS-a.

6.2. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s markerima akutnog upalnog odgovora

Hiperinflamatorno stanje i citokinska oluja opisani su kao osnova za razvoj teških kliničkih oblika, pa tako i ARDS-a kod oboljelih od COVID-a (247 – 249). Kako je

6. RASPRAVA

hiperinflamatorno stanje obilježeno povišenim vrijednostima markera akutnog upalnog odgovora ispitali smo prosječne vrijednosti C-reaktivnog proteina, feritina, fibrinogena, interleukina 6 te omjera IL-33/interleukin 6 i IL-33/C-reaktivni protein unutar ispitivanih skupina, međusobno ih usporedili te ispitali njihovu povezanost s vrijednostima serumske aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33.

U našem istraživanju utvrdili smo statistički značajno povišene vrijednosti navedenih markera akutnog upalnog odgovora kod ispitanikâ iz ispitivane skupine, odnosno onih koji su imali razvijeni ARDS, u odnosu na ispitanike koji nisu imali razvijeni ARDS. C-reaktivni protein, feritin, fibrinogen i interleukin 6 dobro su poznati serumski biljezi težine COVID-19 bolesti (250 – 253) te je za očekivati da COVID-19 bolesnici s razvijenim ARDS-om imaju više vrijednosti ovih markera od onih koji nemaju razvijeni a, a što se slaže i s našim rezultatima. Povišene serumske vrijednosti feritina ističu se kao bitan prediktor razvoja ARDS-a te su njegove vrijednosti povišene u ARDS-u jer proupalni citokini povećavaju njegovu sintezu (254 – 256). Vrijednosti markera akutnog upalnog odgovora kod bolesnika s COVID-19 ARDS-om slični našima, dobili su i drugi istraživači. Povišene serumske vrijednosti C-reaktivnog proteina i feritina kod bolesnika s COVID-19 ARDS-om opisali su Shakaroun i suradnici, a povišene vrijednosti fibrinogena Di Micco i suradnici (252, 257). Također, povišene razine interleukina 6 zabilježene su u brojnim radovima koji su uključivali bolesnike s COVID-19 ARDS-om (258). U konačnici, interleukin 6 predložen je kao glavni prediktivni čimbenik razvoja težih oblika bolesti COVID-19 i citokinske oluje (259).

Omjeri interleukina 33 s interleukinom 6 (IL-33/IL-6) te C-reaktivnim proteinom (IL-33/CRP) do sada nisu ispitivani u pogledu povezanosti s težinom bolesti COVID-19 ni s težinom ARDS-a. S obzirom da smo u našem istraživanju dobili statistički značajno niže vrijednosti i omjera IL-33/IL-6 i omjera IL-33/CRP kod ispitanikâ s razvijenim ARDS-om u odnosu na one koji nisu imali razvijeni ARDS, ova dva omjera mogli bi poslužiti također kao markeri težine bolesti COVID-19, ali za to je potrebno provesti dodatna istraživanja na većem broju uključenih ispitanika.

Ispitivanjem povezanosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s navedenim markerima akutnog upalnog odgovora na razini svih ispitanika dobili smo značajne, nisko do visoko pozitivne korelacije gotovo sa svim markerima, što znači da bezobzira na prisutnost ARDS-a, ispitanici koji su imali više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33,

6. RASPRAVA

imali su i više vrijednosti markera akutnog upalnog odgovora. Negativne korelacije zabilježene su samo s omjerima IL-33/IL-6 i IL-33/CRP. Slične rezultate dobili smo i unutar ispitivanih skupina. Ovi su rezultati u skladu s ranije opisanim proinflammatorym učincima kalpaina 1 i IL-33. Oba parametra zasebno, a vjerojatno i međusobnim djelovanjem potiču aktivnost stanica urođene imunosti i razvoj hiperinflammatorynog stanja (209, 226, 260), a što se reflektira u laboratorijskim nalazima u pogledu povišenja markera akutnog upalnog odgovora, osobito feritina i interleukina 6 (261, 262). Posebno se ističe uloga IL-33 u posredovanju stvaranja i lučenja interleukina 6 koji se smatra jednim od glavnih proupalnih citokina kod teških kliničkih oblika bolesti COVID-19, a pozitivne korelacije između ovih dvaju interleukina dobili su i drugi istraživači (225, 229, 263). Naši rezultati, također, podržavaju ovu pozitivnu međusobnu interkorelaciju dvaju interleukina. Shieh i suradnici opisali su povezanost povišenih serumskih razina IL-33 i interleukina 6 kod miševa kod kojih su izazvali ozljedu pluća intratrahealnom primjenom belomicina, a kod kojih je došlo do razvoja plućne fibroze (264). S druge strane, na povezanost kalpaina i interleukina 6 ukazuju Ji i suradnici opisujući njihovu ulogu u aktivaciji obitelji IL-1 citokina u koju se ubraja i IL-33, a koji potiču stvaranje i lučenje interleukina 6, dok su Iguchi-Hashimoto i njegovi suradnici dokazali da prekomjerna ekspresija kalpastatina, endogenog inhibitora kalpaina u primarnim fibroblastima potiskuje proizvodnju interleukina 6 (209, 265). Ove zaključke podržavaju i naši nalazi jer su ispitanici koji su imali povišene vrijednosti aktivnosti kalpaina 1, imali i veće serumske koncentracije interleukina 6.

6.3. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s ostalim laboratorijskim parametrima

U našem istraživanju ispitali smo prosječne vrijednosti i drugih laboratorijskih parametara (parametri plinske analize i acidobaznog statusa arterijske krvi, parametri krvne slike, koagulacijski parametri, srčani markeri, biokemijski parametri te lipidogram i glikozilirani hemoglobin A1c), usporedili njihove vrijednosti između ispitivanih skupina te utvrdili povezanost s aktivnosti kalpaina 1 i koncentracijom interleukina 33.

S obzirom na plinske analize i acidobazni status arterijske krvi, očekivano smo dobili statistički značajno niže vrijednosti pH, parcijalnog tlaka kisika i saturacije arterijske krvi kisikom te statistički značajno više vrijednosti parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u ispitivanoj skupini, u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovo je očekivano jer se radi o skupini

6. RASPRAVA

ispitanika s razvijenim ARDS-om i posljedično oštećenom respiratornom funkcijom koja nije kod svih ispitanika u potpunosti korigirana oksigenoterapijom ili mehaničkom ventilacijom.

Gledajući na parametre krvne slike, statistički značajno dobili smo povišene vrijednosti leukocita i snižene vrijednosti trombocita kod ispitanikâ s razvijenim ARDS-om, u odnosu na kontrolnu skupinu. Općenito gledano, leukocitoza, limfopenija i trombocitopenija najčešće su hematološke abnormalnosti koje se nalaze kod oboljelih od COVID-a (266). Meta analiza Huanga i suradnikâ koja je obuhvatila deset studija u kojima je ispitivana klinička značajnost leukocita u kod oboljelih od COVID-a, pokazala je da su teži oblici bolesti COVID-19 bili obilježeni izraženijom leukocitozom (267). Trombocitopenija bilježi se kod gotovo jedne trećine oboljelih od bolesti COVID-19 (268) te također postaje izraženijom, što je bolest teža (269). Naši rezultati podupiru ove opisane nalaze o povezanosti leukocitoze i trombocitopenije s težim oblicima bolesti COVID-19. Korelacijskom analizom utvrdili smo značajnu povezanost aktivnosti kalpaina 1 i IL-33 s brojem leukocita i trombocita na razini svih ispitanika. I aktivnost kalpaina 1 i koncentracija IL-33 bila je u pozitivnoj korelaciji s vrijednosti leukocita i negativnoj s vrijednostima trombocita. Negativnu korelaciju između IL-33 i broja trombocita dobili su i Appelman i suradnici koji su ispitivali učinak trombocitpenije na disregulaciju imunološkog odgovora i smrtnost kod oboljelih od COVID-a u istraživanju koje je uključivalo preko šest tisuća bolesnika (270). Tyagi i suradnici opisali su pojačanu aktivnost klapaina u uvjetima hipoksije koja je povezana s pojačanom aktivacijom trombocita i nastankom tzv. „protrombotičkog fenotipa“ koja vodi u trombocitopeniju (271), a što se može povezati s nalazom mikrotrombotskih incidenata u plućnoj mikrocirkulaciji bolesnika s COVID-19 ARDS-om (272).

U pogledu koagulacijskih parametara, statistički značajna razlika utvrđena je samo za vrijednosti D-dimera koje su značajno više bile kod ispitivane skupine, iako su povišene vrijednosti nađene i kod ispitanika iz kontrolne skupine. Ovaj nalaz podudara se i s drugim istraživanjima koja su utvrdila povišene razine D-dimera kod oboljelih od COVID-a i njihovu pozitivnu korelaciju s težinom bolesti (273 – 275). Ispitivanjem povezanosti, našli smo pozitivnu korelaciju između aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 na razini svih ispitanika, a što možemo povezati s prokoagulantnim učinkom IL-33 (276, 277), kao i samog kalpaina (278, 279).

6. RASPRAVA

Kod ispitanika s razvijenim ARDS-om, u našem istraživanju našli smo i statistički značajno više koncentracije srčanih markera: N-terminalnog propeptida natriuretskog moždanog peptida i troponina I. Ovo je u skladu s pojavnosti oštećenja miokarda i miokarditisa kod težih oblika bolesti COVID-19 (280). García de Guadiana-Romualdo i suradnici na uzroku su od više od 1200 oboljelih ispitanika od COVID-a ispitali vrijednosti troponina I te zaključili da njegove povišene vrijednosti predstavljaju neovisan prediktor tridesetodnevne smrtnosti (281). Ulogu povišenih vrijednosti N-terminalnog propeptida natriuretskog moždanog peptida u težim kliničkim oblicima bolesti COVID-19 i kao prediktora smrtnosti opisali su Caro-Codón i suradnici u svom istraživanju na uzorku od 400 ispitanika, pri čemu su isključili bolesnike s koegzistentnom bolesti srca. U tumačenju povišenih vrijednosti ovog markera u našem istraživanju treba imati na umu da je prevalencija kronične kardiomiopatije kod ispitanika s ARDS-om bila statistički značajno veća, nego u kontrolnoj skupini. Ispitivajući povezanost vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s navedenim srčanim markerima, nađena je pozitivna korelacija, što može upućivati na njihovu involviranost u nastanku oštećenja miokarda kod bolesti COVID-19.

Uzimajući u obzir biokemijske parametre, valja istaknuti statistički značajno povišene markere jetrenog (aspartat-aminotransferaza i alanin-aminotransferaza) te bubrežnog oštećenja (urea i kreatinin) kod ispitanika s razvijenim ARDS-om, u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovi nalazi također se mogu objasniti povezanošću težine bolesti COVID-19 i pojavom drugih manifestacija hiperinflamatornog stanja kakvi su akutna jetrena lezija i akutno bubrežno oštećenje. Povišene jetrene transaminaze nađu se i kod preko 50 % oboljelih od COVID-a, dok pravu jetrenu leziju koju definiramo trostrukim porastom bazalnih vrijednosti jetrenih transaminaza nađemo kod 5 do 10 %, uglavnom teže oboljelih od COVID-a (282, 283). Velika studija iz 2023. godine ukazala je na relativno visoku stopu razvoja akutnog bubrežnog oštećenja kod bolesnika s COVID-19 ARDS-om. Na uzorku od 18 tisuća ispitanika, kod njih 1700 došlo je do razvoja akutnog bubrežnog oštećenja. Tridesetodnevni mortalitet bio je veći za ispitanike koji su razvili akutno bubrežno oštećenje drugog i trećeg stupnja (284). Također, kod tumačenja povišenih nalaza uree i kreatinina u našem istraživanju treba imati na umu da je prevalencija kronične bolesti bubrega također bila viša u ispitivanoj skupini (30 %) u odnosu na kontrolnu skupinu (12,5 %). Za istaknuti je i pozitivna korelacija između vrijednosti koncentracije IL-33 i serumskih vrijednosti uree i kreatinina u ispitivanoj skupini, a čemu u prilog idu i radovi koji opisuju patofiziološku ulogu IL-33 u razvoju akutnog bubrežnog oštećenja (285, 286).

6. RASPRAVA

Wei i suradnici u svojoj retrospektivnoj studiji procjenjivali su lipidogram oboljelih od COVID-a te zaključili da su razine LDL kolesterola, HDL kolesterola i triglicerida bile značajno niže u odnosu na zdrave pojedince, osobito kod teže oboljelih, a slične rezultate dobili su i H i suradnici. Ovo su tumačili smanjenom biosintezom LDL-a posljedično jetrenoj disfunkciji, promijenjenim metabolizmom lipida u upali te povišenom razinom kisikovih spojeva koji dovode do razgradnje lipida (287, 288). Naši se rezultati djelomično preklapaju s ovim rezultatima, jer su u našem istraživanju teže oboljeli (ispitivana skupina) imali snižene vrijednosti ukupnog, LDL i HDL kolesterola, ali ne i triglicerida koji su bili povišeni. Svakako je za napomenuti da je hiperlipidemija bila jedan od najčešćih kroničnih komorbiditeta s prevalencijom od 20 % među svim našim ispitanicima te da je opisani izmijenjen metabolizam lipida kod bolesti COVID-19 imao značajan učinak na dobivene rezultate. Od velike koristi bila bi buduća istraživanja koja bi pratila kretanje vrijednosti lipida tijekom bolesti na većem uzroku ispitanika kako bi imali jasnije spoznaje o utjecaju bolesti na vrijednosti lipidograma.

Klein i suradnici u svom su istraživanju u kojemu se određivali vrijednosti glikoziliranog hemoglobina HbA1c kod oboljelih od COVID-a, koji su zahtijevali mehaničku ventilaciju, našli neuobičajeno visoke vrijednosti ovog parametara, kako kod bolesnika koji su imali šećernu bolest, tako i kod onih koji je nisu imali, s time da su vrijednosti kod tih ispitanika bile niže. U navedenom radu, kod 85 % ispitanika vrijednosti su glikoziliranog hemoglobina bile više od 5,7 %. Povećani rizik od mortaliteta imali su ispitanici s vrijednostima većim od 6,5 % (289). Slično ovim nalazima, i naši ispitanici s razvijenim ARDS-om imali su značajno više vrijednosti glikoziliranog hemoglobina A1c u odnosu na ispitanu skupinu, a u velikom se dijelu to može tumačiti i značajno većom prevalencijom šećerne bolesti kod ispitanikâ ove skupine (47,5 %) u odnosu na kontrolnu skupinu (15 %). Pozitivnu korelaciju između vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s glikoziliranim hemoglobinom A1c našli smo samo na razini svih ispitanika. Nađeno je da bolesnici oboljeli od šećerne bolesti tipa 2 imaju veću ekspresiju gena za IL-33 u odnosu na zdravu populaciju, a što je povezano s razvojem inzulinske rezistencije i smanjenom utilizacijom glukoze u adipocite (290).

Ukupno gledajući, pojedini laboratorijski markeri jasnije su izraženi kod ispitanika koji su razvili ARDS (ispitivana skupina), u odnosu na kontrolnu skupinu, što ukazuje na

6. RASPRAVA

njihovu ulogu kao pokazatelja težine kliničke slike i posljedice hiperinflamatornog stanja te s njime povezanog višeorganskog zatajenja.

6.4. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s oksigenoterapijom i mehaničkom ventilacijom

S obzirom da su se ispitivane skupine, osim po prisutnosti ARDS-a, a time i težinom bolesti razlikovali i u odnosu na liječenje respiratorne insuficijencije, u našem smislu istraživanju ispitali odnos aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na primjenu kisika (oksigenoterapiju) te način i postavke mehaničke ventilacije, ukoliko je ona primijenjena. Nitko od ispitanika iz kontrolne skupine nije liječen kisikom niti je bio na mehaničkoj ventilaciji, dok je 16 ispitanika iz ispitivane skupine liječeno kisikom (klasična oksigenoterapija ili visokoprotlačni kisik), a 24 ispitanika bila su na mehaničkoj ventilaciji.

Ispitanici koji su bili na mehaničkoj ventilaciji imali su značajno više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u odnosu na ispitanike koji su liječeni oksigenoterapijom i ispitanike koji nisu primali kisik. Također, ispitanici koji su liječeni oksigenoterapijom imali su statistički značajno više vrijednosti oba ispitivana parametra u odnosu na ispitanike koji nisu primali kisik. Dijelom ove rezultate možemo povezati s prisutnosti i težinom ARDS-a, budući da ispitanici koji nisu primali kisik nisu ni imali ARDS, a da su ispitanici koji su mehanički ventilirani imali teški oblik ARDS-a. Ipak, ove rezultate treba staviti u kontekst drugih istraživanja koja su ispitivala povezanost ovih parametara s mehaničkom ventilacijom.

Liu i suradnici u svom istraživanju na miševima, kod kojih je prethodno izazvana sepsa te koji su podvrgnuti mehaničkoj ventilaciji, ispitivali su ulogu IL-33 u razvoju akutnog plućnog oštećenja izazvanog mehaničkom ventilacijom. Miševi koji su mehanički ventilirani imali su više razine IL-33 u bronhoalveolarnom lavatu i plućnom tkivu, od onih koji su spontano disali. Također, *knock-out* miševi za IL-33 ili njegov receptor ST2 imali su manja plućna oštećenja izazvana mehaničkom ventilacijom. Ovo ukazuje da mehanička ventilacija pojačava ekspresiju IL-33 i s njime povezano plućno oštećenje (291). Također, Ding i suradnici ispitivali su koncentraciju IL-33 i ST2 receptora kod miševa koji su ventilirani različitim dišnim volumenima: umjerenim (10 ml/kg) i niskim (6 ml/kg). Pokazali su da je razina IL-33 i ST2 receptora kao i plućnog oštećenja bila veća kod miševa koji su ventilirani

6. RASPRAVA

većim dišnim volumenom, u odnosu na one koji ventilirani manjim. Budući da je lučenje IL-33 povezano s mehaničkim stresom (istezanjem alveola), može se zaključiti da protektivna mehanička ventilacija može spriječiti plućnu ozljedu izazvanu mehaničkom ventilacijom supresijom ekspresije IL-33 (292). Da mehanički stres i istezanje alveolarne stijenke potiče ekspresiju IL-33 pokazali su i Chang i suradnici koji su na modelu uzgojenih mišjih alveolarnih epitelnih stanica dokazali da njihovo mehaničko istezanje dovodi do povećanja intracelularne koncentracije IL-33 (293). Također, Yang i suradnici u istraživanju ventilatorom uzrokovanog plućnog oštećenja na animalnom modelu štakora pronašli su povećanu koncentraciju IL-33 u serumu, bronhoalveolarnom lavatu i plućnom tkivu štakora koji su razvili ventilatorom uzrokovano plućno oštećenje, kao i povećanu koncentraciju ST2 receptora u staničnim membranama alveolarnih epitelnih stanica (294).

Navedeni rezultati dobiveni istraživanjima utjecaja mehaničke ventilacije na vrijednosti IL-33 na animalnim modelima podržavaju naše rezultate, jer smo najviše koncentracije IL-33 našli kod ispitanika koji su bili mehanički ventilirani. Kako bismo dodatno utvrdili utjecaj mehaničke ventilacije na vrijednost koncentracije IL-33 u skupini bolesnika s teškim ARDS-om, ispitanike smo podijelili u dvije skupine: ispitanici koji su od početka bili mehanički ventilirani i ispitanici koji su početno bili na oksigenoterapiji, ali su zbog pogoršanja respiratornog statusa zahtijevali mehaničku ventilaciju u svom daljnjem tijeku liječenja. Na taj smo način dobili što sličnije ispitanike po težini ARDS-a unutar ispitivane skupine (ispitanici koji su liječeni oksigenoterapijom i koji nisu zahtijevali primjenu mehaničke ventilacije, imali su blaži ili umjereni oblik ARDS-a). Naši rezultati ove usporedbe pokazali su da su ispitanici koji su od početka bili na mehaničkoj ventilaciji imali značajno više vrijednosti koncentracije IL-33 od onih koji su najprije liječeni oksigenoterapijom, što također ukazuje na povezanost između mehaničke ventilacije i koncentracije IL-33, odnosno njenom doprinosu povišenim vrijednostima IL-33 kod najteže oboljelih od COVID-a.

Serumske koncentracije aktivnosti kalpaina 1 identično prate obrazac koncentracije IL-33: aktivnost je bila najviše izražena kod ispitanika koji su bili na mehaničkoj ventilaciji, a bile su i više kod ispitanika koji su od početka mehanički ventilirani u odnosu na one koji su najprije liječeni oksigenoterapijom. Kao i kod tumačenja vrijednosti IL-33, ovo se može povezati s težinom same bolesti, ali postoje i radovi koji ukazuju da mehanička ventilacija može imati utjecaj i na kalpainsku aktivnost. Liu i suradnici ispitivali su ulogu kalpaina 1 i 2 u

6. RASPRAVA

nastanku akutnog oštećenja pluća izazvano mehaničkom ventilacijom na modelima miševa koje su podvrgnuli mehaničkoj ventilaciji visokim dišnim volumenima (28 ml/kg) tijekom dva sata, u odnosu na miševe koje su ventilirali malim dišnim volumenima (7 ml/kg). Mehanička ventilacija visokim dišnim volumenima izazvala je brzu i trajnu aktivaciju kalpaina, a histološki nalazi ukazivali su na jače izražene patohistološke promjene (infiltracija neutrofila, permeabilnost kapilara). U skupini miševa koji ventilirani visokim dišnim volumenima, a kod kojih su primijenjeni inhibitori kalpaina, navedene patohistološke promjene bile su slabije izražene. Ovi rezultati ukazuju na ulogu kalpaina 1 u nastanku plućnog oštećenja potaknutog mehaničkom ventilacijom (241). Temeljem ovoga rada i naših rezultata, možemo tumačiti utjecaj mehaničke ventilacije na povišenje razine aktivnosti kalpaina 1 kod teško oboljelih od COVID-a. Također, istosmjerna pozitivna korelacija aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u pogledu usporedbe skupina mehanički ventiliranih bolesnika ukazuje na njihovu međusobnu povezanost kako smo ranije opisali.

Uspoređujući modalitete mehaničke ventilacije s vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33, nismo dobili statistički značajne razlike, odnosno njihove vrijednosti bile su podjednake kod različitih modaliteta mehaničke ventilacije. Nasuprot tome, statistički značajne povezanosti dobili smo u pogledu određenih postavki i parametara mehaničke ventilacije. Ovo je i očekivano jer se modaliteti mehaničke ventilacije ponajprije razlikuju s obzirom na udio spontanog disanja bolesnika, a manje u odnosu na postavke i parametre mehaničke ventilacije koji su praktično jednaki kod svih modaliteta. Vrijednosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 pozitivno su korelirale s frakcijom inspiriranog kisika, vršnim inspiratornim tlakom i „*driving pressure*“.

Povezanost vršnog inspiratornog tlaka i „*driving pressure*“ s povišenom aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 očekivani je rezultat i u skladu je s gore opisanim utjecajem mehaničke ventilacije na vrijednosti ovih parametara. Oba parametra mehaničke ventilacije povezana su s mehaničkim stresom alveolarnih epitelnih stanica, stoga mogu pridonijeti pojačanoj aktivnosti kalpaina 1 i ekspresiji IL-33 (295 – 297). Suprotno očekivanjima, nismo našli statistički značajnu poveznicu između pozitivnog tlaka na kraju ekspiriraja i inspiratorne tlačne potpore s vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Pozitivnu korelaciju između frakcije inspiriranog kisika i aktivnosti kalpaina 1 te interleukina 33 povezali smo s utjecajem oksidativnog stresa na njihove vrijednosti. Povišena frakcija inspiriranog kisika u smjesi zraka koja se isporučuje bolesniku tijekom mehaničke ventilacije

6. RASPRAVA

pojačava oksidativni stres (298). Pojačani oksidativni stres izaziva pojačanu serumsku aktivnost kalpaina 1 kao i ekspresiju IL-33 (299 – 301). U konačnici smo usporedili aktivnosti kalpaina 1 i koncentracija IL-33 u ovisnosti o strategiji mehaničke ventilacije: ispitanici koji su ventilirani višim pozitivnim tlakom na kraju ekspirija ($PEEP \geq 10$ mbar, $FiO_2 \leq 60$ %) u odnosu na one koju su ventilirani višom frakcijom inspiriranog kisika ($FiO_2 \geq 60$ %, $PEEP \leq 10$ mbar). Statistički nismo dobili značajne poveznice između ovih skupina ispitanika i vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33, što ukazuje na podjednaku važnost uloge tlačnog opterećenja i oksidativnog stresa na vrijednosti ovih parametara.

6.5.Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s duljinom trajanja bolesti

Ispitivajući utjecaj duljine trajanja bolesti ravnajući se prema danu početka simptoma i dana uzorkovanja krvi u odnosu na aktivnost kalpaina 1 i koncentracije IL-33, na razini svih ispitanika nismo dobili statistički značajnu povezanost, odnosno vrijednosti oba parametra bila su neovisna o duljini trajanja bolesti. Iako je kod ispitanika iz kontrolne skupine bolest kraće trajala prema danu uzorkovanja krvi od ispitanika iz ispitivane skupine, vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 nisu bile značajno povezane s danom uzorkovanja, odnosno trajanjem bolesti ni u jednoj skupini. Iz ovoga se može zaključiti da duljina trajanja bolesti nije imala utjecaj na dobivene vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33.

6.6.Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s kroničnim komorbiditetima

S obzirom na mogućnost utjecaja kroničnih komorbiditeta na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 naših ispitanika ispitali smo njihovu prevalenciju unutar ispitivanih skupina te usporedili njihov odnos s ispitivanim parametrima. Najčešći komorbiditeti među našim ispitanicima bili su arterijska hipertenzija, pretilost, šećerna bolest i hiperlipidemija. Svi su komorbiditeti bili prisutniji u ispitivanoj u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Prevalencija komorbiditeta kod naših ispitanika slaže se literaturnim podacima o prevalenciji kroničnih komorbiditeta kod bolesti COVID-19 (302, 303). Usporedbom komorbiditeta s vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 za istaknuti je ona sa šećernom bolesti. Ispitanici koji su imali šećernu bolest, imali su i statistički značajno povišene vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Uloga oba parametra već je istraživana u pogledu patofiziologije šećerne bolesti. Iako se spominje

6. RASPRAVA

kalpain 1, kalpain 10 najviše se spominje u pogledu povezanosti s razvojem šećerne bolesti i njenih komplikacija (304, 305). IL-33 opisuje se kao protektivni čimbenik u razvoju šećerne bolesti tipa 1, ali isto tako kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 opisuju se njegove povišene serumske koncentracije i povezanost s inzulinskom rezistencijom i poremećenom utilizacijom glukoze u stanice (290, 306).

Ukupno gledajući, korelacije pojedinih komorbiditeta s vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 niske su, a što je ponajprije posljedica malih poduzoraka. Na temelju toga možemo zaključiti da prisutnost pojedinih komorbiditeta nije značajno mogla utjecati na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 kod naših ispitanika i zaključaka o njihovoj povezanosti s težinom bolesti i razvojem ARDS-a.

6.7. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s težinom bolesti COVID-19

Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 ispitali smo i u ovisnosti na težinu bolesti temeljeno na MEWS bodovnom sustavu za sve ispitanike kao i APACHE IV bodovnom sustavu za ispitanike s razvijenim ARDS-om. S obzirom na MEWS bodovni sustav, 40 % ispitanika imalo je blagi ili srednje teški oblik bolesti, 10 % imalo je teški oblik bolesti, a 50 % kritični oblik bolesti. Očekivano, najviše vrijednosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 našli smo kod ispitanika s kritičnim oblikom bolesti. Također, viši rezultat APACHE IV bodovnog sustava bio je povezan i s višim vrijednostima ispitivanih parametara.

Ovi su rezultati u skladu s ranije opisanom povezanosti vrijednosti ovih parametara s razvojem i težinom ARDS-a, jer su oni bili najviši kod bolesnika s razvijenim ARDS-om, i to u skupini ispitanika s teškim oblikom ARDS-a, a u koju ubrajamo kritično oboljele prema MEWS bodovnom sustavu i koji imaju najviše vrijednosti APACHE IV bodovnog sustava. Prema tome, uspoređujući težinu bolesti COVID-19 s aktivnosti kalpaina 1 i koncentracijom IL-33 temeljno na navedenim bodovnim sustavima, možemo zaključiti da oba parametra imaju bitnu ulogu u razvoju teških oblika bolesti.

6.8. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s radiološkim nalazom COVID-19 pneumonije

U našem istraživanju ispitali smo i povezanost vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s radiološkim nalazom COVID-19 pneumonije. Kod 51 % ispitanika opisana je multifokalna konsolidacija te je ovaj radiološki nalaz dominirao u ispitivanoj skupini, odnosno skupini bolesnika s ARDS-om, što je i očekivano jer radiološki nalaz ARDS-a uključuje bilateralne multifokalne konsolidacije (307). Najviše vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 nađene su kod ispitanika kod kojih je opisana multifokalna konsolidacija, a to i jesu većinom ispitanici s razvijenim ARDS-om kod kojih smo i našli najviše vrijednosti ispitivanih parametara. Markovic i suradnici u svom radu u kojemu su ispitali korelacije IL-33 s težinom, radiološkim i kliničkim nalazima, dobili su rezultate slične našima – više koncentracije IL-33 u serumu zabilježene su kod ispitanika s izraženijim konsolidacijskim žarištima (fokusima) (229). Fokalnu konsolidaciju i intersticijski uzorak najčešće smo nalazili kod ispitanika iz kontrolne skupine (ispitanici bez ARDS-a), stoga je i za očekivati da su ovi radiološki nalazi povezani s nižim vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracijama IL-33.

6.9. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s načinom liječenja bolesti COVID-19

S obzirom na mogući utjecaj lijekova i primijenjenih postupaka (hemoperfuzija citokina) na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33, ispitali smo i njihovu međusobnu povezanost. Pri tome smo najveću pozornost usmjerili na kortikosteroide jer su se oni u najvećoj mjeri primjenjivali kod ovih bolesnika sukladno preporukama vodećih društava (308). Postoje i radovi koji ukazuju na moguću poveznicu između njih i ispitivanih parametara. Wang i suradnici utvrdili su citoprotektivni učinak prednizolona na animalnom modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede jetre koji se temeljio na supresiji aktivacije kalpaina uslijed smanjenog utoka kalcija u citoplazmu hepatocita (309). Također, Schwartz i suradnici opisali su povezanost primjene glukokortikoida na smanjenu aktivnost kalpaina 1 i 2 objašnjavajući to pozitivnim učinkom glukokortikoida na kalpastatin koji je odgovoran za održavanje kalpaina u neaktivnom obliku (310). Slične zaključke o inhibitornom učinku kortikosteroida na aktivnost kalpaina zaključili su i drugi istraživači, ispitujući njihov učinak na animalnim modelima (311, 312). O učinku kortikosteroida na koncentracije IL-33 mogu se

6. RASPRAVA

naći radovi s oprečnim rezultatima, što se mora tumačiti i u kontekstu samog istraživanja, kao i bolesti te ispitanika koji su uključeni u istraživanje. Tako su Jafarzadeh i suradnici zaključili da primjena metilprednizolona nije utjecala na vrijednosti IL-33 u cerebrospinalnom likvoru bolesnika oboljelih od multiple skleroze za kojega su pretpostavili da je uključen u njenu patogenezu, dok su Milanović i suradnici utvrdili statistički značajno smanjenje serumske koncentracije IL-33 kod djece s alergijskom astmom nakon provedenog liječenja kortikosteroidima (313, 314). Dong i suradnici također su opisali da primjena kortikosteroida dovodi do sniženja serumskih koncentracija IL-33 (315).

Naši su rezultati u pogledu povezanosti kortikosteroida i vrijednosti ispitivanih parametara oprečni. Na razini svih ispitanika primjena deksametazona bila je povezana s nižim vrijednostima aktivnosti kalpaina 1 i koncentracijama IL-33, dok je primjena metilprednizolona bila povezana s njihovim višim vrijednostima. Ovo djelomično možemo tumačiti i činjenicom da je deksametazon uglavnom primjenjivan u blažim kliničkim oblicima, dok se kod kritično oboljelih bolesnika češće primjenjivao metilprednizolon, a teže oboljeli imali su i više vrijednosti ispitivanih parametara. Ove poveznice nismo našli kada smo ispitivali povezanosti unutar ispitivane i kontrole skupine, ali se i u jednoj i u drugoj skupini našla niska negativna korelacija između primjene remdesivira, bilo samog, bilo kao dodatka kortikosteroidu s ispitivanim parametrima, odnosno ispitanici koji su dobivali remdesivir imali su niže vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Martonik i suradnici u svom su istraživanju iz 2023. godine opisali učinak antiviralne terapije remdesivirom na sniženje vrijednosti proinflamatornih citokina u serumu oboljelih od COVID-a (316).

Iako je hemoperfuzija citokina predstavljena kao moguća spasonosna metoda ekstrakorporalnog liječenja citokinske oluje kod kritično oboljelih od COVID-a (317), prikazani su rezultati oprečni – dio istraživača navodi pozitivne učinke na ove bolesnike, dok dio istraživača opisuje da primjena hemoperfuzije nije imala nikakvog učinka na konačne ishode oboljelih od COVID-a (318 – 321). Naši rezultati ukazuju na pozitivnu korelaciju, iako nisku, između postupka hemoperfuzije citokina i vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33. Ovo se može tumačiti činjenicom, kao i za primjenu metilprednizolona da je ovo postupak koji je rađen samo kod najteže oboljelih kod kojih smo našli najviše vrijednosti ovih parametara, a kako se radi o postupku koji je proveden kod samo 6 ispitanika, dobivene rezultate treba tumačiti s oprezom. Usporedbom mehanički ventiliranih ispitanika

6. RASPRAVA

kojima je rađena hemoperfuzija citokina (6 ispitanika) i onih kojima nije rađena hemoperfuzija citokina (18 ispitanika), nije nađena statistički značajna razlika u vrijednostima ni aktivnosti kalpaina 1 ni koncentracije IL-33. U tom pogledu ispitivali smo i vrijednosti drugih markera akutnog upalnog odgovora – interleukina 6, C-reaktivnog proteina i feritina te ni tu nismo dobili statistički značajne razlike, iako su vrijednosti interleukina 6 bile niže kod skupine ispitanika kojima je rađena hemoperfuzija citokina. Postupak hemoperfuzije citokina rađen je uz adsorbirajuću membranu za koju se zna da ima sposobnost vezanja interleukina 6, a što su opisali i drugi istraživači (322). Učinak konvekcije tijekom postupka na navedene parametre, osim na interleukin 6, zanemariv je zbog veličina ostalih molekula.

Ako promatramo primjenu lijekova i postupak hemoperfuzije citokina na vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u cjelini, njihov je utjecaj zanemariv i podudara se s vrijednostima povezanim s težinom bolesti: metilprednizolon i hemoperfuzija citokina koji su pozitivno korelirali s vrijednostima navedenih parametara primjenjivani su kod ispitanika s težim oblikom COVID-19 bolesti, a kod kojih smo i nalazili povišene vrijednosti ispitivanih parametara.

6.10. Povezanost aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s ishodom bolesti COVID-19

Naposljetku smo ispitili i povezanost vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s konačnim ishodom: smrt ili preživljenje. Na razini svih ispitanika, ispitanici koji su umrli, imali su više vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 što je opet, povezano s težim oblicima COVID-19 bolesti. Kako bismo potvrdili ovaj zaključak, ponovili smo ispitivanje povezanosti samo unutar ispitivane skupine, odnosno ispitanika koji su imali ARDS jer su svi iz kontrolne imali blaži oblik bolesti i svi su preživjeli, čime smo dobili jednaku statističku značajnu povezanost između povišenih vrijednosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 sa smrtnim ishodom.

6.11. Ograničenja i znanstveni doprinos istraživanja

Iako je broj ispitanika uključenih u ovo istraživanje utvrđen po statističkim načelima referirajući se na ranija, slična istraživanja, on predstavlja jedan od limitirajućih čimbenika ovog istraživanja. Ispitivanje povezanosti navedenih parametara s pojavnosti ARDS-a na

6. RASPRAVA

većem broju ispitanika u budućim istraživanjima pridonijet će utvrđivanju naših zaključaka dobivenih temeljem ovog istraživanja. Također, određivanje aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u uzorku bronhoalveolarnog lavata i usporedba s njihovim vrijednostima u serumu može pridonijeti boljem utvrđivanju njihove povezanosti s akutnom plućnom patologijom. Jedno od glavnih znanstvenih doprinosa ovog istraživanja jest činjenica da smo u dobrom dijelu potvrdili rezultate ispitivanja uloge ovih parametara na animalnim modelima akutne plućne patologije, osobito u vidu uloge IL-33 na bolesnicima oboljelim od pneumonije i ARDS-a. U našem istraživanju prvi smo opisali međusobnu povezanost ovih dvaju čimbenika u uzorcima seruma bolesnika, a na koju ukazuju pregledni članci i nekolicina istraživanja na animalnim modelima, što daje poticaj za daljnje ispitivanje međusobne povezanosti i utjecaja kalpaina 1 na aktivaciju IL-33. U kliničkom pogledu, doprinos ovog istraživanja ogleda u stavljanju naglaska na kalpain 1 i IL-33 kao pretkazatelja razvoja i težine ARDS-a, kao i o njihovim ulogama kao potencijalnim terapijskim ciljevima. Budući da smo naše rezultate temeljili na oboljelima od COVID-a i ARDS-u virusne etiologije, buduća istraživanja ovih parametara na drugim etiološkim entitetima ARDS-a također bi utvrdila njihovu poziciju u pogledu nastanka i razvoja akutne plućne patologije, osobito ARDS-a.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenog istraživanja o povezanosti serumske aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 s razvojem ARDS-a kod bolesnikâ s COVID-19 pneumonijom možemo iznijeti sljedeće zaključke:

- Serumske vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 kod ispitanika oboljelih od pneumonije uzrokovane SARS-CoV-2, a koji su razvili ARDS međusobno su bile povezane, odnosno kako je rasla aktivnost kalpaina 1, rasla je i koncentracija IL-33;
- Serumske vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 kod ispitanika oboljelih od pneumonije uzrokovane SARS-CoV-2, a koji su razvili ARDS bile značajno više u odnosu na ispitanike koji nisu razvili ARDS;
- Serumske vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 na razini svih ispitanika bile su nisko do visoko pozitivno povezane s vrijednostima markera akutnog upalnog odgovora (C-reaktivni protein, feritin, fibrinogen, interleukin 6);
- Serumske vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 bile su više kod ispitanika koji su mehanički ventilirani u odnosu na ostale ispitanike te su pozitivno korelirale s frakcijom inspiriranog kisika (FiO_2), vršnim inspiratornim tlakom (PIP) i "driving pressure" (ΔP);
- Serumske vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 nisu se značajno razlikovale u ovisnosti o duljini trajanja bolesti, prisutnosti komorbiditeta, radiološkom nalazu COVID-19 pneumonije načinu liječenja, ali jesu u ovisnosti na težinu i konačni ishod bolesti.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja. Glavni cilj provedenog istraživanja bio je ispitati odnos serumskih vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 kod bolesnikâ s COVID-19 pneumonijom koji su razvili ARDS te ih usporediti s vrijednostima bolesnika s COVID-19 pneumonijom koji nisu razvili ARDS, markerima akutnog upalnog odgovora te primjenom oksigenoterapije i mehaničke ventilacije.

Ustroj istraživanja. Istraživanje je postavljeno kao istraživanje parova (engl. *case-control study*).

Ispitanici i metode. U istraživanje je uključeno 80 ispitanika s potvrđenom COVID-19 pneumonijom, a koji su podijeljeni u dvije skupine: ispitivana skupina – ispitanici koji su razvili ARDS (40 ispitanika) i kontrolna skupina – ispitanici koji nisu razvili ARDS (40 ispitanika). Metodologija istraživanja uključivala je prikupljanje kliničkih podataka i parametara o ispitanicima, uzorkovanja krvi te laboratorijskih analiza. Aktivnost kalpaina 1 određena je fluorimetrijskom metodom, dok je koncentracija određena IL-33 ELISA metodom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), pri čemu su korišteni komercijalno dostupni kitovi.

Rezultati. Serumske vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 kod ispitanika oboljelih od COVID-19 pneumonije, a koji su razvili ARDS (ispitivana skupina) međusobno su bile povezane, odnosno kako je rasla aktivnost kalpaina 1, rasla je i koncentracija IL-33 te su one bile značajno više, nego kod ispitanika koji nisu razvili ARDS (kontrolna skupina). Također, serumske vrijednosti aktivnosti kalpaina 1 i koncentracije IL-33 pozitivno su korelirale s markerima akutnog upalnog odgovora te primjenom mehaničke ventilacije.

Zaključak. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da aktivnost kalpaina 1 i koncentracije IL-33 u serumu ima značaj u nastanku i razvoju ARDS-a kod bolesnikâ s COVID-19 pneumonijom.

Ključne riječi: ARDS, COVID-19, interleukin 33, kalpain 1, SARS-CoV-2 virus.

9. SUMMARY

Objectives. The main aim of the research was to examine the relationship between the serum values of calpain 1 activity and the IL-33 concentration in patients with COVID-19 pneumonia who developed ARDS, and to compare them with the values of patients with COVID-19 pneumonia who did not develop ARDS, the markers of acute inflammatory response and the usage of oxygenotherapy or mechanical ventilation.

Study design. The research is structured as a case-control study.

Participants and methods. The study included 80 adult subjects with confirmed COVID-19 pneumonia, and who were divided into two groups: the examined group - subjects who developed ARDS (40 subjects) and the control group - subjects who did not develop ARDS (40 subjects). The methodology included collecting clinical data and parameters about the subjects, blood sampling and laboratory analyses. The activity of calpain 1 was determined by the fluorimetric method, while the IL-33 concentration was determined by the ELISA method (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), using commercially available kits.

Results. The serum values of calpain 1 activity and IL-33 concentration in subjects with COVID-19 pneumonia who developed ARDS (examined group) were interconnected, i.e. as the calpain 1 activity increased, so did the IL-33 concentration, and they were significantly higher than in subjects who did not develop ARDS (the control group). Also, the serum values of calpain 1 activity and IL-33 concentration positively correlated with the markers of acute inflammatory response and the use of mechanical ventilation.

Conclusion. Based on the obtained results, it can be concluded that the calpain 1 activity and the concentration of IL-33 in the serum have significance in the occurrence and the development of ARDS in patients with COVID-19 pneumonia.

Key words: ARDS, COVID-19, interleukin 33, calpain 1, SARS-CoV-2 virus.

10. LITERATURA

10. LITERATURA

1. Grasselli G, Calfee CS, Camporota L, Poole D, Amato MBP, Antonelli M, i sur. ESICM guidelines on acute respiratory distress syndrome: definition, phenotyping and respiratory support strategies. *Intensive Care Med.* 2023;49(7):727-759.
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967;2(7511):319-23.
3. Hendrickson KW, Peltan ID, Brown SM. The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome Before and After Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Clin.* 2021;37(4):703-716.
4. Hsieh YH, Chang HT, Wang PH, Chang MY, Hsu HS. Mortality in patients with COVID-19 versus non-COVID-19- related acute respiratory distress syndrome: A single center retrospective observational cohort study. *PLoS One.* 2023;18(6):e0286564.
5. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med.* 2019;40(1):31-39.
6. Reilly JP, Christie JD, Meyer NJ. Fifty years of research in ARDS. Genomic contributions and opportunities. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196:1113–1121.
7. Gao L, Barnes KC. Recent advances in genetic predisposition to clinical acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;296(5):L713-25.
8. Odeyemi Y, Moraes AGD, Gajic O. What factors predispose patients to acute respiratory distress syndrome? *Evidence-Based Practice of Critical Care.* 2020;103–108.
9. Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:1250–1257.
10. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, i sur. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):18.
11. Vassiliou AG, Kotanidou A, Dimopoulou I, Orfanos SE. Endothelial Damage in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8793.
12. Mokrá D. Acute lung injury - from pathophysiology to treatment. *Physiol Res.* 2020;69(Suppl 3):S353-S366.
13. Juss JK, House D, Amour A, Begg M, Herre J, Storisteanu DM, i sur. Acute Respiratory Distress Syndrome Neutrophils Have a Distinct Phenotype and Are Resistant to Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194(8):961-973..
14. Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(12):1294-309.

10. LITERATURA

15. Sanches Santos Rizzo Zuttion M, Moore SKL, Chen P, Beppu AK, Hook JL. New Insights into the Alveolar Epithelium as a Driver of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Biomolecules*. 2022;12(9):1273.
16. Caudron M, Holt T, Cuvelier G, Dmytrowich J, Hansen G. Pulmonary Thromboses in Pediatric Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respir Care*. 2019;64(2):209-216.
17. Lupu L, Palmer A, Huber-Lang M. Inflammation, Thrombosis, and Destruction: The Three-Headed Cerberus of Trauma and SARS-CoV-2-Induced ARDS. *Front Immunol*. 2020;11:584514.
18. Bastarache JA. The complex role of fibrin in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296(3):L275-6.
19. Juibari AD, Rezadoost MH, Soleimani M. The key role of Calpain in COVID-19 as a therapeutic strategy. *Inflammopharmacology*. 2022;30(5):1479-1491.
20. Ono Y, Saido TC, Sorimachi H. Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15:854–76.
21. Vanderklish PW, Bahr BA. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol*. 2000;81(5):323-39.
22. Liu Y, Liu B, Zhang GQ, Zou JF, Zou ML, Cheng ZS. Calpain inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via switching the development of epithelial-mesenchymal transition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018;391(7):695-704
23. Fahy RJ, Lichtenberger F, McKeegan CB, Nuovo GJ, Marsh CB, Wewers MD. The acute respiratory distress syndrome: a role for transforming growth factor-beta 1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(4):499-503
24. Ware LB. Autopsy in ARDS: insights into natural history. *Lancet Respir Med*. 2013;1(5):352-4.
25. Ichikado K, Muranaka H, Gushima Y, Kotani T, Nader HM, Fujimoto K, i sur. Fibroproliferative changes on high-resolution CT in the acute respiratory distress syndrome predict mortality and ventilator dependency: a prospective observational cohort study. *BMJ Open*. 2012;2(2):e000545.
26. Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, i sur. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(5):1783-8.
27. Michalski JE, Kurche JS, Schwartz DA. From ARDS to pulmonary fibrosis: the next phase of the COVID-19 pandemic? *Transl Res*. 2022;241:13-24

10. LITERATURA

28. Burnham EL, Janssen WJ, Riches DW, Moss M, Downey GP. The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. *Eur Respir J*. 2014;43(1):276-85.
29. Sturgill JL, Mayer KP, Kalema AG, Dave K, Mora S, Kalantar A, et al. Post-intensive care syndrome and pulmonary fibrosis in patients surviving ARDS-pneumonia of COVID-19 and non-COVID-19 etiologies. *Sci Rep*. 2023;13(1):6554.
30. Marshall R, Bellingan G, Laurent G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane. *Thorax*. 1998;53(10):815-7.
31. Huppert LA, Matthay MA. Alveolar Fluid Clearance in Pathologically Relevant Conditions: In Vitro and In Vivo Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front Immunol*. 2017;8:371.
32. Verkman AS, Matthay MA, Song Y. Aquaporin water channels and lung physiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(5):L867-79.
33. Mutlu GM, Sznajder JI. Mechanisms of pulmonary edema clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(5):L685-95.
34. Scott BNV, Kubes P. Death to the neutrophil! A resolution for acute respiratory distress syndrome? *Eur Respir J*. 2018;52(2):1801274.
35. Herold S, Mayer K, Lohmeyer J. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Front Immunol*. 2011;2:65.
36. Olajuyin AM, Zhang X, Ji HL. Alveolar type 2 progenitor cells for lung injury repair. *Cell Death Discov*. 2019;5:63.
37. Sinha P, Calfee CS. Phenotypes in acute respiratory distress syndrome: moving towards precision medicine. *Curr Opin Crit Care*. 2019;25(1):12-20.
38. Shaver CM, Bastarache JA. Clinical and biological heterogeneity in acute respiratory distress syndrome: direct versus indirect lung injury. *Clin Chest Med* 2014;35(04):639–653
39. Calfee CS, Delucchi K, Parsons PE, Thompson BT, Ware LB, Matthay MA. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2014;2(08):611–620
40. Delucchi K, Famous KR, Ware LB, Parsons PE, Thompson BT, Calfee CS. Stability of ARDS subphenotypes over time in two randomised controlled trials. *Thorax* 2018;73(05): 439–445.

10. LITERATURA

41. Famous KR, Delucchi K, Ware LB, Kangelaris KN, Liu KD, Thompson BT, i sur. Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(3):331-338.
42. Dereli N, Babayigit M, Koç F, Menteş O, Yildiz G, Kiliçarslan A, i sur. Type-H, and Type-L COVID-19: are they different subtypes or the same? *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2022;26(9):3367-3373.
43. Habashi NM, Camporota L, Gatto LA, Nieman G. Functional pathophysiology of SARS-CoV-2-induced acute lung injury and clinical implications. *J Appl Physiol.* 2021;130(3):877-891.
44. Chiumello D, Brochard L, Marini JJ, Slutsky AS, Mancebo J, Ranieri VM, i sur. Respiratory support in patients with acute respiratory distress syndrome: an expert opinion. *Crit Care.* 2017;21(1):240.
45. Fan E, Del Sorbo L, Goligher EC, Hodgson CL, Munshi L, Walkey AJ, i sur. An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(9):1253-1263.
46. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1301-8.
47. Xi XM, Jiang L, Zhu B; RM group. Clinical efficacy and safety of recruitment maneuver in patients with acute respiratory distress syndrome using low tidal volume ventilation: a multicenter randomized controlled clinical trial. *Chin Med J (Engl).* 2010;123(21):3100-5.
48. Pintado MC, de Pablo R, Trascasa M, Milicua JM, Rogero S, Daguerre M, i sur. Individualized PEEP setting in subjects with ARDS: a randomized controlled pilot study. *Respir Care.* 2013 Sep;58(9):1416-23.
49. Poole D, Pisa A, Fumagalli R. Prone position for acute respiratory distress syndrome and the hazards of meta-analysis. *Pulmonology.* 2023;S2531-0437(23)00009-0.
50. Schmidt M, Franchineau G, Combes A. Recent advances in venovenous extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care.* 2019;25(1):71-76.
51. Barbaro RP, Odetola FO, Kidwell KM, Paden ML, Bartlett RH, Davis MM, i sur. Association of hospital-level volume of extracorporeal membrane oxygenation cases and

10. LITERATURA

- mortality. Analysis of the extracorporeal life support organization registry. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(8):894-901..
52. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, i sur. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA.* 2016;315(8):788-800.
53. Luyt CÉ, Combes A, Trouillet JL, Nieszkowska A, Chastre J. Virus-induced acute respiratory distress syndrome: epidemiology, management and outcome. *Presse Med.* 2011;40(12):e561-8.
54. Shrestha SS, Swerdlow DL, Borse RH, Prabhu VS, Finelli L, Atkins CY, i sur. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009-April 2010). *Clin Infect Dis.* 2011;52 Suppl 1:S75-82.
55. Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, i sur. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med.* 2005;353(13):1374-85.
56. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015;1282:1-23.
57. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(8):523-34.
58. Zhong NS, Wong GW. Epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS): adults and children. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5(4):270-4.
59. Zhang AR, Shi WQ, Liu K, Li XL, Liu MJ, Zhang WH, i sur. Epidemiology and evolution of Middle East respiratory syndrome coronavirus, 2012-2020. *Infect Dis Poverty.* 2021;10(1):66.
60. Krynytska I, Marushchak M, Birchenko I, Dovgalyuk A, Tokarskyy O. COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome versus classical acute respiratory distress syndrome (a narrative review). *Iran J Microbiol.* 2021;13(6):737-747.
61. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses.* 2021;13(2):202.
62. Pirc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol.* 2007;81(7):3051-7.
63. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmailzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med.* 2021;23(2):e3303.

10. LITERATURA

64. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, i sur. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm Sin B*. 2020;10(7):1228-1238.
65. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, i sur. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807):215-220.
66. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):562-569.
67. Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, i sur. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol*. 2022;12:809244.
68. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):141-154.
69. Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(5):905-919.
70. Lee B, Ashcroft T, Agyei-Manu E, Farfan de los Godos E, Leow A, Krishan P, i sur. Clinical features of COVID-19 for integration of COVID-19 into influenza surveillance: A systematic review. *J Glob Health*. 2022;12:05012.
71. Xu W, Sun NN, Gao HN, Chen ZY, Yang Y, Ju B, i sur. Risk factors analysis of COVID-19 patients with ARDS and prediction based on machine learning. *Sci Rep*. 2021;11(1):2933.
72. Zheng Z, Peng F, Xu B, Zhao J, Liu H, Peng J, i sur. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: a systematic literature review and meta-analysis. *J. Infect*. 2020;81:e16–e25.
73. Liang W, Liang H, Ou L, Chen B, Chen A, Li C, i sur. Development and validation of a clinical risk score to predict the occurrence of critical illness in hospitalized patients with COVID-19. *JAMA Intern. Med*. 2020;180(8):1081–1089.
74. Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, i sur. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(1):110-118.
75. Čivljak R, Perić Lj, Trošelj-Vukić B, Ledina D, Puljiz I, Lukas D, i sur. Smjernice za liječenje oboljelih od koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19) - verzija 8 od 17. listopada 2022. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr/koronavirus-i-mjere-prevencije/4952>.
76. Velavan TP, Pallerla SR, Rüter J, Augustin Y, Kremsner PG, Krishna S, i sur. Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. *EBioMedicine*. 2021;72:103629.

10. LITERATURA

77. Ellinghaus D. Genomewide association study of severe COVID-19 with respiratory failure. *N Engl J Med.* 2020;383(16):1522–1534.
78. Shelton JF, Shastri AJ, Ye C, Weldon CH, Filshtein-Sonmez T, Coker D, i sur. Trans-ancestry analysis reveals genetic and nongenetic associations with COVID-19 susceptibility and severity. *Nat Genet.* 2021;53(6):801-808.
79. Andolfo I, Russo R, Lasorsa VA, Cantalupo S, Rosato BE, Bonfiglio F, i sur. Common variants at 21q22.3 locus influence MX1 and TMPRSS2 gene expression and susceptibility to severe COVID-19. *iScience.* 2021;24(4):102322.
80. Ulhaq ZS, Soraya GV. Anti-IL-6 receptor antibody treatment for severe COVID-19 and the potential implication of IL-6 gene polymorphisms in novel coronavirus pneumonia. *Med Clin (Engl Ed).* 2020;155(12):548-556.
81. Hasan SS, Capstick T, Ahmed R, Kow CS, Mazhar F, Merchant HA, i sur. Mortality in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome and corticosteroids use: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Respir Med.* 2020;14(11):1149-1163.
82. Zhou Q, Gao Y, Wang X, Liu R, Du P, Wang X, i sur. Nosocomial infections among patients with COVID-19, SARS and MERS: a rapid review and meta-analysis. *Ann Transl Med.* 2020;8(10):629.
83. Gujski M, Jankowski M, Rabczenko D, Goryński P, Juszczuk G. The Prevalence of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and Outcomes in Hospitalized Patients with COVID-19-A Study Based on Data from the Polish National Hospital Register. *Viruses.* 2022;14(1):76.
84. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, i sur. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* 2020;8(5):475-481.
85. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, i sur. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA.* 2020;323(16):1574-1581.
86. Bhatraju PK, Ghassemieh BJ, Nichols M, Kim R, Jerome KR, Nalla AK, i sur. Covid-19 in Critically Ill Patients in the Seattle Region - Case Series. *N Engl J Med.* 2020;382(21):2012-2022.
87. Tzotzos SJ, Fischer B, Fischer H, Zeitlinger M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. *Crit Care.* 2020;24(1):516.

10. LITERATURA

88. Gibson PG, Qin L, Puah SH. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. *Med J Aust.* 2020;213(2):54-56.e1.
89. Riviello ED, Kiviri W, Twagirumugabe T, Mueller A, Banner-Goodspeed VM, Officer L, i sur. Hospital Incidence and Outcomes of the Acute Respiratory Distress Syndrome Using the Kigali Modification of the Berlin Definition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(1):52-9.
90. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, i sur. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med.* 2012;38(10):1573-82.
91. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, i sur. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 2012;307(23):2526-33.
92. Matthay MA, Thompson BT, Ware LB. The Berlin definition of acute respiratory distress syndrome: should patients receiving high-flow nasal oxygen be included? *Lancet Respir Med.* 2021;9(8):933-936.
93. Ranieri VM, Tonetti T, Navalesi P, Nava S, Antonelli M, Pesenti A, i sur. High-Flow Nasal Oxygen for Severe Hypoxemia: Oxygenation Response and Outcome in Patients with COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med.* 2022;205(4):431-439..
94. Chavda VP, Kapadia C, Soni S, Prajapati R, Chauhan SC, Yallapu MM, i sur. A global picture: therapeutic perspectives for COVID-19. *Immunotherapy.* 2022;14(5):351-371.
95. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, i su. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395: 497–506
96. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, i sur. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323:1061–1069.
97. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, i sur. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395:1054–1062
98. Pan C, Liu L, Xie J, Qiu H, Yang Y. It is time to update the ARDS definition: It starts with COVID-19-induced respiratory failure. *J Intensive Med.* 2021;2(1):29-31.
99. Lu S, Huang X, Liu R, Lan Y, Lei Y, Zeng F, i sur. Comparison of COVID-19 Induced Respiratory Failure and Typical ARDS: Similarities and Differences. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:829771.

10. LITERATURA

100. Li X, Ma X. Acute respiratory failure in COVID-19: is it "typical" ARDS? *Crit Care*. 2020;24(1):198.
101. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, i sur. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-1720.
102. Chung M, Bernheim A, Mei X, Zhang N, Huang M, Zeng X, i sur. CT imaging features of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Radiology*. 2020;295:202–207.
103. Song F, Shi N, Shan F, Zhang Z, Shen J, Lu H, i sur. Emerging 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia. *Radiology*. 2020;295(1):210-217.
104. Cronin JN, Camporota L, Formenti F. Mechanical ventilation in COVID-19: A physiological perspective. *Exp Physiol*. 2022;107(7):683-693.
105. Mittermaier M, Pickerodt P, Kurth F, de Jarcy LB, Uhrig A, Garcia C, i sur. Evaluation of PEEP and prone positioning in early COVID-19 ARDS. *EClinicalMedicine*. 2020;28:100579.
106. Kadkhodai L, Saghaei M, Habibzadeh M, Alikiaii B, Hashemi SJ. Estimating the best fraction of inspired oxygen for calculation of PaO₂/FiO₂ ratio in acute respiratory distress syndrome due to COVID-19 pneumonia. *J Res Med Sci*. 2022;27:38.
107. Gattinoni L, Chiumello D, Caironi P, Busana M, Romitti F, Brazzi L, i sur. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? *Intensive Care Med*. 2020;46(6):1099-1102.
108. Rahmani F, Salmasi S, Rezaeifar P. Prone Position Effects in the Treatment of Covid-19 Patients. *Caspian J Intern Med*. 2020;11(Suppl 1):580-582.
109. Lin WC, Lin SY, Tsai MC, Chung FT, Chang HM. The effect of lung recruitment maneuverer in COVID-19 induced acute respiratory distress syndrome. *Respirol Case Rep*. 2023;11(3):e01107.
110. Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *AAPS J*. 2021;23(1):14.
111. Kolilekas L, Loverdos K, Giannakaki S, Vlassi L, Levounets A, Zervas E, i sur. Can steroids reverse the severe COVID-19 induced "cytokine storm"? *J Med Virol*. 2020;92(11):2866-2869.
112. So C, Ro S, Murakami M, Imai R, Jinta T. High-dose, short-term corticosteroids for ARDS caused by COVID-19: a case series. *Respirol Case Rep*. 2020;8(6):e00596.
113. Noreen S, Maqbool I, Madni A. Dexamethasone: Therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic. *Eur J Pharmacol*. 2021;894:173854.

10. LITERATURA

114. Saeed MAM, Mohamed AH, Owaynat AH. Comparison between methylprednisolone infusion and dexamethasone in COVID-19 ARDS mechanically ventilated patients. *Egypt J Intern Med.* 2022;34(1):19.
115. Rahman MU, Nair SC, Din MU, Dar MR, Masood M, Al Menhali ARS, i sur. Methylprednisolone Treatment Versus Standard Supportive Care for Adult COVID-19 Mechanically Ventilated, Acute Respiratory Distress Syndrome Patients. *SN Compr Clin Med.* 2022;4(1):11.
116. Ngu NH, Chai CS, Chan SK, Kho SS, Yong MC, Tie ST. Methylprednisolone in severe COVID-19 with acute respiratory distress syndrome - less is more? *Med J Malaysia.* 2022;77(6):650-654.
117. Nopp S, Moik F, Jilma B, Pabinger I, Ay C. Risk of venous thromboembolism in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;4(7):1178-1191.
118. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, i sur. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(2):120-128..
119. Guney C, Akar F. Epithelial and Endothelial Expressions of ACE2: SARS-CoV-2 Entry Routes. *J Pharm Pharm Sci.* 2021;24:84-93.
120. Rentsch CT, Beckman JA, Tomlinson L, Gellad WF, Alcorn C, Kidwai-Khan F, i sur. Early initiation of prophylactic anticoagulation for prevention of coronavirus disease 2019 mortality in patients admitted to hospital in the United States: cohort study. *BMJ.* 2021;372:n311.
121. Al-Samkari H, Gupta S, Leaf RK, Wang W, Rosovsky RP, Brenner SK, i sur. Thrombosis, Bleeding, and the Observational Effect of Early Therapeutic Anticoagulation on Survival in Critically Ill Patients With COVID-19. *Ann Intern Med.* 2021;174(5):622-632.
122. Ceccato A, Camprubí-Rimblas M, Campaña-Duel E, Areny-Balagueró A, Morales-Quinteros L, Artigas A. Anticoagulant Treatment in Severe ARDS COVID-19 Patients. *J Clin Med.* 2022;11(10):2695.
123. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, i sur. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):128.

10. LITERATURA

124. Li T, Qiu Z, Zhang L, Han Y, He W, Liu Z, i sur. Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Infect Dis.* 2004;189(4):648-51.
125. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, i sur. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):2000045.
126. Kadkhoda K. COVID-19: an immunopathological view. *mSphere.* 2020;5:e00344–20.
127. Yang J, Petitjean SJL, Koehler M, Zhang Q, Dumitru AC, Chen W, i sur. Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor. *Nat Commun.* 2020;11(1):4541.
128. Dong M, Zhang J, Ma X, Tan J, Chen L, Liu S, i sur. ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110678.
129. 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.
130. Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* 2022;23(2):165-176.
131. Kikkert M. Innate immune evasion by human respiratory RNA viruses. *J Innate Immun.* 2020;12:4–20.
132. Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93:2735-9.
133. Yin X, Riva L, Pu Y, Martin-Sancho L, Kanamune J, Yamamoto Y, i sur. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep.* 2021;34:108628.
134. Dai J, Wang Y, Wang H, Gao Z, Wang Y, Fang M, i sur. Toll-Like Receptor Signaling in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Innate Immune Responses and the Potential Application Value of Toll-Like Receptor Immunomodulators in Patients With Coronavirus Disease 2019. *Front Microbiol.* 2022;13:948770.
135. Aboudounya MM, Heads RJ. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:8874339.
136. Khan S, Shafiei MS, Longoria C, Schoggins JW, Savani RC, Zaki H. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway. *Elife.* 2021;10:e68563.

10. LITERATURA

137. Qian Y, Lei T, Patel PS, Lee CH, Monaghan-Nichols P, Xin HB, i sur. Direct Activation of Endothelial Cells by SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Is Blocked by Simvastatin. *J Virol.* 2021;95(23):e0139621.
138. Jung HE, Lee HK. Current Understanding of the Innate Control of Toll-like Receptors in Response to SARS-CoV-2 Infection. *Viruses.* 2021;13(11):2132.
139. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, i sur. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 2020;181(5):1036-1045.e9.
140. Park A, Iwasaki A. Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe.* 2020;27(6):870-878.
141. Totura AL, Whitmore A, Agnihothram S, Schäfer A, Katze MG, Heise MT, i sur. Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *mBio.* 2015;6(3):e00638-15.
142. Yokota S, Okabayashi T, Fujii N. The battle between virus and host: modulation of Toll-like receptor signaling pathways by virus infection. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:184328.
143. Parthasarathy U, Martinelli R, Vollmann EH, Best K, Therien AG. The impact of DAMP-mediated inflammation in severe COVID-19 and related disorders. *Biochem Pharmacol.* 2022;195:114847.
144. Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, Tarhriz V, Farjami A, Ghasemian Sorbeni F, i sur. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Viol J.* 2022;19(1):92.
145. Hasanvand A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. *Inflammopharmacology.* 2022;30(3):789-798.
146. Theoharides TC, Conti P. COVID-19 and multisystem inflammatory syndrome, or is it mast cell activation syndrome? *J Biol Regul Homeost Agents.* 2020;34:1633–6.
147. Overmyer KA, Shishkova E, Miller IJ, Balnis J, Bernstein MN, Peters-Clarke TM, i sur. Large-scale multi-omic analysis of COVID-19 severity. *Cell Syst.* 2021;12:23–40. e7.
148. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, i sur. Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2020;217:e20200652.
149. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, i sur. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303:1532–1535.

10. LITERATURA

150. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, i sur. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020;5:e138999.
151. Middleton EA, He XY, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, i sur. Neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood*. 2020;136:1169–1179.
152. Bautista-Becerril B, Campi-Caballero R, Sevilla-Fuentes S, Hernández-Regino LM, Hanono A, Flores-Bustamante A, i sur. Immunothrombosis in COVID-19: Implications of Neutrophil Extracellular Traps. *Biomolecules*. 2021;11(5):694.
153. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1131-1134.
154. Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K, i sur. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology*. 2020;160(3):261-268.
155. Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, i sur. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. *Ann Intern Med*. 2020;173:268–77.
156. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, i sur. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26:842–4
157. de Candia P, Prattichizzo F, Garavelli S, Matarese G. T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. *Trends Immunol*. 2021;42(1):18-30.
158. Mansourabadi AH, Aghamajidi A, Dorfaki M, Keshavarz F, Shafeghat Z, Moazzeni A, i sur. B lymphocytes in COVID-19: a tale of harmony and discordance. *Arch Virol*. 2023;168(5):148.
159. Zhang B, Zhou X, Zhu C, Song Y, Feng F, Qiu Y, i sur. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. *Front Mol Biosci*. 2020;7:157.
160. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, i sur. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020;71(16):2027-2034.
161. Yang L, Gou J, Gao J, Huang L, Zhu Z, Ji S, i sur. Immune characteristics of severe and critical COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):179.
162. Fu J, Lin SH, Wang CJ, Li SY, Feng XY, Liu Q, i sur. HMGB1 regulates IL-33 expression in acute respiratory distress syndrome. *Int Immunopharmacol*. 2016;38:267-74.

10. LITERATURA

163. Lei M, Wang CJ, Yu F, Xie K, Lin SH, Xu F. Different intensity of autophagy regulate interleukin-33 to control the uncontrolled inflammation of acute lung injury. *Inflamm Res.* 2019;68(8):665-675.
164. Lin SH, Fu J, Wang CJ, Gao F, Feng XY, Liu Q, i sur. Inflammation elevated IL-33 originating from the lung mediates inflammation in acute lung injury. *Clin Immunol.* 2016;S1521-6616(16)30535-6.
165. Hayakawa M, Hayakawa H, Matsuyama Y, Tamemoto H, Okazaki H, Tominaga S. Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;387(1):218-22.
166. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, i sur. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 2003;163(1):69-79.
167. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39(6):1003-18.
168. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(11):676-689.
169. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol.* 2016;17(2):122-31.
170. Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev.* 2017;278(1):173-184.
171. Scott IC, Majithiya JB, Sanden C, Thornton P, Sanders PN, Moore T, i sur. Interleukin-33 is activated by allergen- and necrosis-associated proteolytic activities to regulate its alarmin activity during epithelial damage. *Sci Rep.* 2018;8(1):3363.
172. Trajkovic V, Sweet MJ, Xu D. T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(2-3):87-95.
173. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, i sur. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23(5):479-90.
174. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, i sur. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci.* 2011;26(9):1132-9.
175. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm (Lond).* 2011;8(1):22.

10. LITERATURA

176. Bost KL, Holton RH, Cain TK, Clements JD. In vivo treatment with anti-interleukin-13 antibodies significantly reduces the humoral immune response against an oral immunogen in mice. *Immunology*. 1996;87(4):633-41.
177. Alves-Filho JC, Sonogo F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, i sur. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010;16:708–712.
178. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, i sur. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 2009;183:6469–6477.
179. Zhiguang X, Wei C, Steven R, Wei D, Wei Z, Rong M, i sur. Over-expression of IL-33 leads to spontaneous pulmonary inflammation in mIL-33 transgenic mice. *Immunol Lett*. 2010;131(2):159-65.
180. Yin H, Li X, Yuan B, Zhang B, Hu S, Gu H, Jin X, Zhu J. Heme oxygenase-1 ameliorates LPS-induced acute lung injury correlated with downregulation of interleukin-33. *Int Immunopharmacol*. 2011 Dec;11(12):2112-7.
181. Mato N, Bando M, Kusano A, Hirano T, Nakayama M, Uto T, i sur. Clinical significance of interleukin 33 (IL-33) in patients with eosinophilic pneumonia. *Allergol Int*. 2013;62(1):45-52.
182. Cheng L, Jiao Y, Jiang W, Zhang X, Zhang L, Jia G. IL-33 Deficiency Attenuates Lung Inflammation by Inducing Th17 Response and Impacting the Th17/Treg Balance in LPS-Induced ARDS Mice via Dendritic Cells. *J Immunol Res*. 2022;2022:9543083.
183. Tan W, Zhang B, Liu X, Zhang C, Liu J, Miao Q. Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells Mediates Pulmonary Epithelial Regeneration During Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front Immunol*. 2021;12:653803.
184. Martínez-González I, Roca O, Masclans JR, Moreno R, Salcedo MT, Baekelandt V, i sur. Human mesenchymal stem cells overexpressing the IL-33 antagonist soluble IL-1 receptor-like-1 attenuate endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(4):552-62.
185. Liu Q, Dwyer GK, Zhao Y, Li H, Mathews LR, Chakka AB, i sur. IL-33-mediated IL-13 secretion by ST2+ Tregs controls inflammation after lung injury. *JCI Insight*. 2019;4(6):e123919.
186. Halát G, Haider T, Dedeyan M, Heinz T, Hajdu S, Negrin LL. IL-33 and its increased serum levels as an alarmin for imminent pulmonary complications in polytraumatized patients. *World J Emerg Surg*. 2019;14:36.

10. LITERATURA

187. Zhao J, Zhao Y. Interleukin-33 and its Receptor in Pulmonary Inflammatory Diseases. *Crit Rev Immunol*. 2015;35(6):451-61.
188. Lee JU, Chang HS, Lee HJ, Jung CA, Bae DJ, Song HJ, i sur. Upregulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin levels in the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2017;17:39.
189. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev*. 2003;83(3):731-801.
190. Spinozzi S, Albini S, Best H, Richard I. Calpains for dummies: What you need to know about the calpain family. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2021;1869(5):140616.
191. Deng H, Tian X, Sun H, Liu H, Lu M, Wang H. Calpain-1 mediates vascular remodelling and fibrosis via HIF-1 α in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Cell Mol Med*. 2022;26(10):2819-2830.
192. Tan WJ, Tan QY, Wang T, Lian M, Zhang L, Cheng ZS. Calpain 1 regulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells via PI3K/Akt signaling pathway. *Am J Transl Res*. 2017;9(3):1402-1409.
193. Hu H, Li X, Li Y, Wang L, Mehta S, Feng Q, i sur. Calpain-1 induces apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells under septic conditions. *Microvasc Res*. 2009;78(1):33-9.
194. Pal GP, De Veyra T, Elce JS, Jia Z. Crystal structure of a micro-like calpain reveals a partially activated conformation with low Ca²⁺ requirement. *Structure*. 2003;11(12):1521-6.
195. Bertipaglia I, Carafoli E. Calpains and human disease. *Subcell Biochem*. 2007;45:29-53..
196. Inazawa J, Nakagawa H, Misawa S, Abe T, Minoshima S, Fukuyama R, i sur. Assignment of the human calpastatin gene (CAST) to chromosome 5 at region q14-q22. *Cytogenet Cell Genet*. 1990;54(3-4):156-8.
197. Hanna RA, Campbell RL, Davies PL. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*. 2008;456(7220):409-12.
198. Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL. A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell*. 2002;108(5):649-60.
199. Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J*. 1999;18(24):6880-9.

10. LITERATURA

200. Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, i sur. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):588-92.
201. Khorchid A, Ikura M. How calpain is activated by calcium. *Nat Struct Biol*. 2002;9(4):239-41.
202. Velez G, Sun YJ, Khan S, Yang J, Herrmann J, Chemudupati T, i sur. Structural Insights into the Unique Activation Mechanisms of a Non-classical Calpain and Its Disease-Causing Variants. *Cell Rep*. 2020;30(3):881-892.e5.
203. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047–1058.
204. Breitwieser GE. Extracellular calcium as an integrator of tissue function. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(8).
205. Du M, Li X, Li Z, Shen Q, Wang Y, Li G, i sur. Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in μ -calpain activity. *Food Chem*. 2018;252:33-39.
206. Michetti M, Salamino F, Melloni E, Pontremoli S. Reversible inactivation of calpain isoforms by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;207(3):1009-14.
207. Bassett EA, Palanichamy K, Pearson M, McElroy JP, Haque SJ, Bell EH, i sur. Calpastatin phosphorylation regulates radiation-induced calpain activity in glioblastoma. *Oncotarget*. 2018 Feb;9(18):14597-14607.
208. Shapovalov I, Harper D, Greer PA. Calpain as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2022;26(3):217-231.
209. Ji J, Su L, Liu Z. Critical role of calpain in inflammation. *Biomed Rep*. 2016;5(6):647-652.
210. Virlos I, Mazzon E, Serraino I, Genovese T, Di Paola R, Thiemerman C, i sur. Calpain I inhibitor ameliorates the indices of disease severity in a murine model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Intensive Care Med*. 2004;30(8):1645-51.
211. Choi YS, Park JA, Kim J, Rho SS, Park H, Kim YM, i sur. Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF- κ B p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;421(2):305-11.
212. Ono Y, Sorimachi H. Calpains — an elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1824(1):224–236.
213. Leloup L, Wells A. Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(3):309-23.

10. LITERATURA

214. Zhang P, Liu J, Zong R. Triptolide protects against TGF- β 1-induced pulmonary fibrosis by regulating FAK/calpain signaling. *Exp Ther Med*. 2019;18(6):4781-4789.
215. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Siriwardena D, Serraino I, Dugo L, i sur. Calpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation. *Am J Pathol*. 2000;157:2065–2079.
216. Potz BA, Abid MR, Sellke FW. Role of Calpain in Pathogenesis of Human Disease Processes. *J Nat Sci*. 2016;2(9):e218.
217. Seeley EJ, Rosenberg P, Matthay MA. Calcium flux and endothelial dysfunction during acute lung injury: a STIMulating target for therapy. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1015-8.
218. Gandhirajan RK, Meng S, Chandramoorthy HC, Mallilankaraman K, Mancarella S, Gao H, i sur. Blockade of NOX2 and STIM1 signaling limits lipopolysaccharide-induced vascular inflammation. *J Clin Invest*. 2013;123(2):887-902.
219. Madesh M, Hawkins BJ, Milovanova T, Bhanumathy CD, Joseph SK, Ramachandrarao SP, i sur. Selective role for superoxide in InsP3 receptor-mediated mitochondrial dysfunction and endothelial apoptosis. *J Cell Biol*. 2005;170(7):1079-90.
220. Cannavò L, Perrone S, Viola V, Marseglia L, Di Rosa G, Gitto E. Oxidative Stress and Respiratory Diseases in Preterm Newborns. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12504.
221. Du PR, Lu HT, Lin XX, Wang LF, Wang YX, Gu XM, i sur. Calpain inhibition ameliorates scald burn-induced acute lung injury in rats. *Burns Trauma*. 2018;6:28.
222. Yi C, Chen F, Ma R, Fu Z, Song M, Zhang Z, i sur. Serum level of calpains product as a novel biomarker of acute lung injury following cardiopulmonary bypass. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:1000761.
223. Momeni HR. Role of calpain in apoptosis. *Cell J*. 2011;13(2):65-72.
224. Makaremi S, Asgarzadeh A, Kianfar H, Mohammadnia A, Asghariazar V, Safarzadeh E. The role of IL-1 family of cytokines and receptors in pathogenesis of COVID-19. *Inflamm Res*. 2022;71(7-8):923-947.
225. Gao Y, Cai L, Li L, Zhang Y, Li J, Luo C, i sur. Emerging Effects of IL-33 on COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13656.
226. Furci F, Murdaca G, Allegra A, Gammeri L, Senna G, Gangemi S. IL-33 and the Cytokine Storm in COVID-19: From a Potential Immunological Relationship towards Precision Medicine. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):14532.
227. Zizzo G, Cohen PL. Imperfect storm: is interleukin-33 the Achilles heel of COVID-19? *Lancet Rheumatol*. 2020;2(12):e779-e790.

10. LITERATURA

228. Liang Y, Ge Y, Sun J. IL-33 in COVID-19: friend or foe? *Cell Mol Immunol*. 2021;18(6):1602-1604.
229. Markovic SS, Jovanovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Arsenijevic N, Jovanovic M, i sur. IL 33 Correlates With COVID-19 Severity, Radiographic and Clinical Finding. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:749569.
230. Moustafa N, Mohamed R, Elsaid R, Mahmoud F. Diagnostic Value of Serum Level of Interleukin 33 (IL-33), C-C Motif Chemokine Ligand 17 (CCL17) and Interferon Gamma Inducible Protein-10 (IP-10) in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients. *EJMM*. 2022;31(1):23-30.
231. Majeed AY, Zulkafli NES, Ad'hiah AH. Interleukin-22 and interleukin-33 show up-regulated levels in the serum of patients with mild/moderate Coronavirus disease 2019. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*. 2023;12(1):24.
232. Stanczak MA, Sanin DE, Apostolova P, Nerz G, Lampaki D, Hofmann M, i sur. IL-33 expression in response to SARS-CoV-2 correlates with seropositivity in COVID-19 convalescent individuals. *Nat Commun*. 2021;12(1):2133.
233. Wilkinson T, De Soyza A, Carroll M, Chalmers JD, Crooks MG, Griffiths G, i sur. A randomised phase 2a study to investigate the effects of blocking IL-33 with tozorakimab in patients hospitalised with COVID-19: ACCORD-2. *ERJ Open Research*. 2023;00249-2023.
234. Inal J, Paizuldaeva A, Terziu E. Therapeutic use of calpeptin in COVID-19 infection. *Clin Sci (Lond)*. 2022;136(20):1439-1447.
235. Hu Y, Ma C, Szeto T, Hurst B, Tarbet B, Wang J. Boceprevir, Calpain Inhibitors II and XII, and GC-376 Have Broad-Spectrum Antiviral Activity against Coronaviruses. *ACS Infect Dis*. 2021;7(3):586-597.
236. Ma C, Sacco MD, Hurst B, Townsend JA, Hu Y, Szeto T, i sur. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *bioRxiv* . 2020;2020.04.20.051581.
237. Barnett WR, Radhakrishnan M, Macko J, Hinch BT, Altorok N, Assaly R. Initial MEWS score to predict ICU admission or transfer of hospitalized patients with COVID-19: A retrospective study. *J Infect*. 2021;82(2):282-327.
238. Vandenbrande J, Verbrugge L, Bruckers L, Geebelen L, Geerts E, Callebaut I, i sur. Validation of the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II and IV Score in COVID-19 Patients. *Crit Care Res Pract*. 2021;2021:5443083.

10. LITERATURA

239. Zimmerman JE, Kramer AA, McNair DS, Malila FM. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) IV: hospital mortality assessment for today's critically ill patients. *Crit Care Med.* 2006;34(5):1297-310.
240. Shaver CM. Targeting Protease Activity to Interrupt Acute Respiratory Distress Syndrome Pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2022;205(7):739-740.
241. Liu D, Yan Z, Minshall RD, Schwartz DE, Chen Y, Hu G. Activation of calpains mediates early lung neutrophilic inflammation in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(4):L370-9.
242. McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, Cuzzocrea S, Abdelrahman M, Harwood S, i sur. Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEB J.* 2001;15(1):171-186.
243. Ren R, Xu Z, Wang X, Jiang W, Yu P. Verdiperstat attenuates acute lung injury by modulating MPO/ μ -calpain/ β -catenin signaling. *Eur J Pharmacol.* 2022;924:174940.
244. Zheng JN, Li Y, Yan YM, Yu Y, Shao WQ, Wang Q. Increased serum calpain activity is associated with HMGB1 levels in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2020;22(1):110.
245. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(1):43-64.
246. Lefrançois E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard J-P i sur. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:1673–1678.
247. Manson JJ, Crooks C, Naja M, Ledlie A, Goulden B, Liddle T, i sur. COVID-19-associated hyperinflammation and escalation of patient care: a retrospective longitudinal cohort study. *Lancet Rheumatol.* 2020;2(10):e594–e602.
248. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med.* 2020;383(23):2255–2273.
249. Zheng J, Miao J, Guo R, Guo J, Fan Z, Kong X, i sur. Mechanism of COVID-19 Causing ARDS: Exploring the Possibility of Preventing and Treating SARS-CoV-2. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:931061.
250. Paranga TG, Pavel-Tanasa M, Constantinescu D, Plesca CE, Petrovici C, Miftode IL, i sur. Comparison of C-reactive protein with distinct hyperinflammatory biomarkers in association with COVID-19 severity, mortality and SARS-CoV-2 variants. *Front Immunol.* 2023;14:1213246.
251. Lin Z, Long F, Yang Y, Chen X, Xu L, Yang M. Serum ferritin as an independent risk factor for severity in COVID-19 patients. *J Infect.* 2020;81(4):647-679.

10. LITERATURA

252. Di Micco P, Russo V, Carannante N, Imperato M, Cardillo G, Lodigiani C. Prognostic Value of Fibrinogen among COVID-19 Patients Admitted to an Emergency Department: An Italian Cohort Study. *J Clin Med*. 2020;9(12):4134.
253. Han H, Ma Q, Li C, Liu R, Zhao L, Wang W, i sur. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):1123-1130.
254. Connelly KG, Moss M, Parsons PE, Moore EE, Moore FA, Giclas PC, i sur. Serum ferritin as a predictor of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(1):21-5.
255. Sharkey RA, Donnelly SC, Connelly KG, Robertson CE, Haslett C, Repine JE. Initial serum ferritin levels in patients with multiple trauma and the subsequent development of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(5 Pt 1):1506-9.
256. Mehta P, Samanta R, Wick K, Coll R, Mcleavey P, Boyle A, i sur. Elevated ferritin is associated with systemic inflammation, inflammasome activation and mortality in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *ERJ Open Research*. 2022;8:118.
257. Shakaroun DA, Lazar MH, Horowitz JC, Jennings JH. Serum Ferritin as a Predictor of Outcomes in Hospitalized Patients with Covid-19 Pneumonia. *J Intensive Care Med*. 2023;38(1):21-26.
258. Galván-Román JM, Rodríguez-García SC, Roy-Vallejo E, Marcos-Jiménez A, Sánchez-Alonso S, Fernández-Díaz C, i sur. IL-6 serum levels predict severity and response to tocilizumab in COVID-19: An observational study. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(1):72-80.e8.
259. Avila-Nava A, Cortes-Telles A, Torres-Erazo D, López-Romero S, Chim Aké R, Gutiérrez Solis AL. Serum IL-6: A potential biomarker of mortality among SARS-CoV-2 infected patients in Mexico. *Cytokine*. 2021;143:155543.
260. Murdaca G, Paladin F, Tonacci A, Borro M, Greco M, Gerosa A, i sur. Involvement of IL-33 in the Pathogenesis and Prognosis of Major Respiratory Viral Infections: Future Perspectives for Personalized Therapy. *Biomedicines*. 2022;10(3):715.
261. Skevaki C, Fragkou PC, Cheng C, Xie M, Renz H. Laboratory characteristics of patients infected with the novel SARS-CoV-2 virus. *J Infect*. 2020;81(2):205-212.
262. Melo AKG, Milby KM, Caparroz ALMA, Pinto ACPN, Santos RRP, Rocha AP, i sur. Biomarkers of cytokine storm as red flags for severe and fatal COVID-19 cases: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021;16(6):e0253894.

10. LITERATURA

263. Shekhawat J, Gauba K, Gupta S, Purohit P, Mitra P, Garg M, i sur. Interleukin-6 Perpetrator of the COVID-19 Cytokine Storm. *Indian J Clin Biochem.* 2021;36(4):440-450.
264. Shieh JM, Tseng HY, Jung F, Yang SH, Lin JC. Elevation of IL-6 and IL-33 Levels in Serum Associated with Lung Fibrosis and Skeletal Muscle Wasting in a Bleomycin-Induced Lung Injury Mouse Model. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:7947596.
265. Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kobayashi S, Ito Y, i sur. Overexpression of a minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF- κ B and increased STAT5 signals. *PLoS One.* 2011;6(10):e27020.
266. Taj S, Kashif A, Arzinda Fatima S, Imran S, Lone A, Ahmed Q. Role of hematological parameters in the stratification of COVID-19 disease severity. *Ann Med Surg (Lond).* 2021;62:68-72.
267. Huang G, Kovalic AJ, Graber CJ. Prognostic Value of Leukocytosis and Lymphopenia for Coronavirus Disease Severity. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(8):1839-1841.
268. Asrie F, Tekle E, Gelaw Y, Dagnew M, Gelaw A, Negash M, i sur. Baseline Thrombocytopenia and Disease Severity Among COVID-19 Patients, Tibebe Ghion Specialized Hospital COVID-19 Treatment Center, Northwest Ethiopia. *J Blood Med.* 2022;13:315-325.
269. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: a meta-analysis. *Clinica chimica acta.* 2020;506:145–148.
270. Appelman B, Michels EHA, de Brabander J, Peters-Sengers H, van Amstel RBE, Noordzij SM, i sur. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in severe COVID-19. *Thromb Res.* 2023;229:187-197.
271. Tyagi T, Ahmad S, Gupta N, Sahu A, Ahmad Y, Nair V, i sur. Altered expression of platelet proteins and calpain activity mediate hypoxia-induced prothrombotic phenotype. *Blood.* 2014;123(8):1250-60.
272. Poor HD. Pulmonary Thrombosis and Thromboembolism in COVID-19. *Chest.* 2021;160(4):1471-1480.
273. Nemeč HM, Ferenczy A, Christie BD, Ashley DW, Montgomery A. Correlation of D-dimer and Outcomes in COVID-19 Patients. *Am Surg.* 2022;88(9):2115-2118.

10. LITERATURA

274. Baroiu L, Lese AC, Stefanopol IA, Iancu A, Dumitru C, Ciubara AB, i sur. The Role of D-Dimers in the Initial Evaluation of COVID-19. *Ther Clin Risk Manag.* 2022;18:323-335.
275. Yao Y, Cao J, Wang Q, Shi Q, Liu K, Luo Z, i sur. D-dimer as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients: a case control study. *J Intensive Care.* 2020;8:49.
276. Stojkovic S, Thulin Å, Hell L, Thaler B, Rauscher S, Baumgartner J, i sur. IL-33 stimulates the release of procoagulant microvesicles from human monocytes and differentially increases tissue factor in human monocyte subsets. *Thromb Haemost.* 2017;117(7):1379-1390.
277. Stojkovic S, Kaun C, Basilio J, Rauscher S, Hell L, Krychtiuk KA, i sur. Tissue factor is induced by interleukin-33 in human endothelial cells: a new link between coagulation and inflammation. *Sci Rep.* 2016;6:25171.
278. Kuchay SM, Chishti AH. Calpain-mediated regulation of platelet signaling pathways. *Curr Opin Hematol.* 2007;14(3):249-54.
279. Pasquet JM, Toti F, Nurden AT, Dachary-Prigent J. Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles. *Thromb Res.* 1996;82(6):509-22.
280. Keller K, Sagoschen I, Konstantinides S, Gori T, Münzel T, Hobohm L. Incidence and risk factors of myocarditis in hospitalized patients with COVID-19. *J Med Virol.* 2023;95(3):e28646.
281. García de Guadiana-Romualdo L, Morell-García D, Rodríguez-Fraga O, Morales-Indiano C, Lourdes Padilla Jiménez A, Gutiérrez Revilla JI, i sur. Cardiac troponin and COVID-19 severity: Results from BIOCOVID study. *Eur J Clin Invest.* 2021;51(6):e13532.
282. Bloom PP, Meyerowitz EA, Reinus Z, Daidone M, Gustafson J, Kim AY, i sur. Liver biochemistries in hospitalized patients with COVID-19. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2020;73:890–900.
283. Yu D, Du Q, Yan S, Guo XG, He Y, Zhu G, i sur. Liver injury in COVID-19: clinical features and treatment management. *Virol J.* 2021;18(1):121.
284. McNicholas BA, Rezoagli E, Simpkin AJ, Khanna S, Suen JY, Yeung P, i sur. Epidemiology and outcomes of early-onset AKI in COVID-19-related ARDS in comparison with non-COVID-19-related ARDS: insights from two prospective global cohort studies. *Crit Care.* 2023;27(1):3.

10. LITERATURA

285. Akcay A, Nguyen Q, He Z, Turkmen K, Won Lee D, Hernando AA, i sur. IL-33 exacerbates acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(11):2057-67.
286. Yang F, Zhu P, Duan L, Yang L, Wang J. IL 33 and kidney disease (Review). *Mol Med Rep.* 2016;13(1):3-8.
287. Wei X, Zeng W, Su J, Wan H, Yu X, Cao X, i sur. Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19. *J Clin Lipidol.* 2020;14(3):297-304.
288. Hu X, Chen D, Wu L, He G, Ye W. Low serum cholesterol level among patients with COVID-19 infection in Wenzhou, China. *Clin Chim Acta.* 2020;10:105–110.
289. Klein SJ, Mayerhöfer T, Fries D, Preuß Hernández C, Joannidis M. Elevated HbA1c remains a predominant finding in severe COVID-19 and may be associated with increased mortality in patients requiring mechanical ventilation. *Crit Care.* 2021;25(1):300.
290. Pereira MJ, Azim A, Hetty S, Nandi Jui B, Kullberg J, Lundqvist MH, i sur. Interleukin-33 inhibits glucose uptake in human adipocytes and its expression in adipose tissue is elevated in insulin resistance and type 2 diabetes. *Cytokine.* 2023;161:156080.
291. Liu S, Deng M, Pan P, Turnquist HR, Pitt BR, Billiar TR, i sur. Mechanical Ventilation with Moderate Tidal Volume Exacerbates Extrapulmonary Sepsis-Induced Lung Injury via IL33-WISP1 Signaling Pathway. *Shock.* 2021;56(3):461-472.
292. Ding X, Jin S, Shao Z, Xu L, Yu Z, Tong Y, i sur. The IL-33-ST2 Pathway Contributes to Ventilator-Induced Lung Injury in Septic Mice in a Tidal Volume-Dependent Manner. *Shock.* 2019;52(3):e1-e11.
293. Chang J, Xia Y, Wasserloos K, Deng M, Blose KJ, Vorp DA, i sur. Cyclic stretch induced IL-33 production through HMGB1/TLR-4 signaling pathway in murine respiratory epithelial cells. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184770.
294. Yang SH, Lin JC, Wu SY, Huang KL, Jung F, Ma MC, i sur. Membrane translocation of IL-33 receptor in ventilator induced lung injury. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121391.
295. Kolobow T, Moretti MP, Fumagalli R, Mascheroni D, Prato P, Chen V, i sur. Severe impairment in lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. An experimental study. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135(2):312-5.
296. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(1):294-323.
297. Meier A, Sell RE, Malhotra A. Driving Pressure for Ventilation of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Anesthesiology.* 2020;132(6):1569-1576.

10. LITERATURA

298. Dursun A, Okumuş N, Erol S, Bayrak T, Zenciroğlu A. Effect of Ventilation Support on Oxidative Stress and Ischemia-Modified Albumin in Neonates. *Am J Perinatol*. 2016;33(2):136-42.
299. Ray SK, Fidan M, Nowak MW, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Oxidative stress and Ca²⁺ influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells. *Brain Res*. 2000;852(2):326-34.
300. Yokoyama Y, Maruyama K, Yamamoto K, Omodaka K, Yasuda M, Himori N, i sur. The role of calpain in an in vivo model of oxidative stress-induced retinal ganglion cell damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(4):510-5.
301. Uchida M, Anderson EL, Squillace DL, Patil N, Maniak PJ, Iijima K, i sur. Oxidative stress serves as a key checkpoint for IL-33 release by airway epithelium. *Allergy*. 2017;72(10):1521-1531
302. Bajgain KT, Badal S, Bajgain BB, Santana MJ. Prevalence of comorbidities among individuals with COVID-19: A rapid review of current literature. *Am J Infect Control*. 2021;49(2):238-246.
303. Justino DCP, Silva DFO, Costa KTDS, de Moraes TNB, de Andrade FB. Prevalence of comorbidities in deceased patients with COVID-19: A systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(38):e30246.
304. Wan TT, Li XF, Sun YM, Li YB, Su Y. Role of the calpain on the development of diabetes mellitus and its chronic complications. *Biomed Pharmacother*. 2015;74:187-90.
305. Pánico P, Salazar AM, Burns AL, Ostrosky-Wegman P. Role of calpain-10 in the development of diabetes mellitus and its complications. *Arch Med Res*. 2014;45(2):103-15.
306. Pavlovic S, Petrovic I, Jovicic N, Ljubic B, Miletic Kovacevic M, Arsenijevic N, i sur. IL-33 Prevents MLD-STZ Induction of Diabetes and Attenuate Insulinitis in Prediabetic NOD Mice. *Front Immunol*. 2018;9:2646.
307. Bitker L, Talmor D, Richard JC. Imaging the acute respiratory distress syndrome: past, present and future. *Intensive Care Med*. 2022;48(8):995-1008.
308. Romano GM, Cafiero T, Frangiosa A, Robertis E. Corticosteroids in patients with COVID-19: use and misuse. *Minerva Anestesiol*. 2021;87(9):1042-1048.
309. Wang M, Sakon M, Umeshita K, Okuyama M, Shiozaki K, Nagano H, i sur. Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain mu activation. *J Hepatol* 2001;34:278–283.

10. LITERATURA

310. Schwartz SM, Duffy JY, Pearl J, Goins S, Wagner CJ, Nelson DP. Glucocorticoids preserve calpastatin and troponin I during cardiopulmonary bypass in immature pigs. *Pediatr Res.* 2003;54(1):91-7.
311. Banik NL, Matzelle D, Terry E, Hogan EL. A new mechanism of methylprednisolone and other corticosteroids action demonstrated in vitro: inhibition of a proteinase (calpain) prevents myelin and cytoskeletal protein degradation. *Brain Res.* 1997;748:205–210.
312. Maes K, Agten A, Smuder A, Powers SK, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Corticosteroid effects on ventilator-induced diaphragm dysfunction in anesthetized rats depend on the dose administered. *Respir Res.* 2010;11(1):178.
313. Jafarzadeh A, Mahdavi R, Jamali M, Hajghani H, Nemati M, Ebrahimi HA. Increased Concentrations of Interleukin-33 in the Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Multiple Sclerosis. *Oman Med J.* 2016;31(1):40-5.
314. Milanovic B, Vijatov-Djuric G, Stojcevic Maletic J, Stojanovic V. Comparison between serum levels of interleukin-33 in children with allergic asthma before and after inhalatory corticosteroid treatment. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo.* 2019;126-127.
315. Dong Y, Zhong J, Dong L. IL-33 in Rheumatic Diseases. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:739489.
316. Martonik D, Parfieniuk-Kowerda A, Starosz A, Grubczak K, Moniuszko M, Flisiak R. Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19. *Front Immunol.* 2023;14:1222170.
317. Shadvar K, Tagizadiyeh A, Gamari AA, Soleimanpour H, Mahmoodpour A. Hemoperfusion as a Potential Treatment for Critically Ill COVID-19 Patients with Cytokine Storm. *Blood Purif.* 2021;50(3):405-407.
318. Alavi Darazam I, Kazempour M, Pourhoseingholi MA, Hatami F, Rabiei MM, Javandoust Gharehbagh F, i sur. Efficacy of Hemoperfusion in Severe and Critical Cases of COVID-19. *Blood Purif.* 2023;52(1):8-16.
319. Rampino T, Gregorini M, Perotti L, Ferrari F, Pattonieri EF, Grignano MA, i sur. Hemoperfusion with CytoSorb as Adjuvant Therapy in Critically Ill Patients with SARS-CoV2 Pneumonia. *Blood Purif.* 2021;50(4-5):566-571.
320. Soleimani A, Taba SMM, Hasibi Taheri S, Loghman AH, Shayestehpour M. The effect of hemoperfusion on the outcome, clinical and laboratory findings of patients with severe COVID-19: a retrospective study. *New Microbes New Infect.* 2022;44:100937.

10. LITERATURA

321. Chang K, Li Y, Qin Z, Zhang Z, Wang L, Yang Q, i sur. Effect of extracorporeal hemoadsorption in critically ill patients with COVID-19: A narrative review. *Front Immunol.* 2023;14:1074465.
322. Persic V, Jerman A, Malgaj Vrecko M, Berden J, Gorjup V, Stecher A, i sur. Effect of CytoSorb Coupled with Hemodialysis on Interleukin-6 and Hemodynamic Parameters in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome: A Retrospective Cohort Study. *J Clin Med.* 2022;11(24):7500.

11. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije:	
Ime i prezime:	Domagoj Loinjak
Datum rođenja:	11. listopada 1984.
Državljanstvo:	Hrvatsko
Adresa:	Bizovačka 65, 31 221 Osijek
Telefon:	091 898 2893
E-pošta:	loinjak.domagoj@gmail.com
Trenutno mjesto zaposlenja:	Specijalist interne medicine, uži specijalist intenzivne medicine <i>KBC Osijek</i> <i>Klinika za unutarnje bolesti</i>
Radno iskustvo:	
Od 06/2022.	Subspecijalist intenzivne medicine <i>KBC Osijek, Klinika za unutarnje bolesti</i>
Od 09/2019.	Specijalist opće interne medicine <i>KBC Osijek, Klinika za unutarnje bolesti</i>
Od 06/2019.	Asistent u suradničkom zvanju i suradničkom radnom mjestu <i>Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku</i>
04/2014. – 09/2019.	Specijalizant opće interne medicine <i>KBC Osijek, Klinika za unutarnje bolesti</i>
05/2013. – 03/2014.	Liječnik u timu 1. izvanbolničke hitne medicinske pomoći <i>Zavod za hitnu medicinu Osječko-baranjske županije</i>
11/2012. – 05/2013.	Liječnik obiteljske medicine <i>Dom zdravlja Osječko-baranjske županije</i>
11/2011. – 11/2012.	Liječnik na pripravničkom stažu <i>KBC Osijek</i>
Obrazovanje:	
Od 11/2019.	Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo <i>Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku</i>
2015./2016.	Sveučilišni stručni diplomski studij Opća interna medicina <i>Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku</i>
2005. – 2011.	Preddiplomski i diplomski studij medicine <i>Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku</i>

<i>Znanstvene i stručne publikacije:</i>	
08/2023.	Loinjak D., Mihić D., Maričić L., Kadović M., Sušić L., Tolj I. The clinical and predictive value of C-reactive protein/albumin ratio in critically ill and mechanically ventilated adult patients. <i>Medica Jadertina</i> . 2023;53:89-95.
06/2023.	Loinjak D., Mihić D., Smolić R., Maričić L., Šahinović I., Smolić M. i sur. The Correlation of Serum Calpain 1 Activity and Concentrations of Interleukin 33 in COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. <i>Biomedicines</i> . 2023 Jun 27;11(7):1847.
11/2022.	Mihić D., Loinjak D., Maričić L., Smolić R., Šahinović I., Steiner K. i sur. The Relationship between Nrf2 and HO-1 with the Severity of COVID-19 Disease. <i>Medicina (Kaunas)</i> . 2022;58:1658.
05/2022.	Maričić L., Mihić D., Turk T., Loinjak D., Zubčić V. The Role of Extracorporeal Blood Purification in the Treatment of a Patient with Lemierre's Syndrome. <i>Case Rep Med</i> . 2022;2022:8522398.
01/2022.	Šahinović I., Mandić S., Mihić D., Duvnjak M., Loinjak D., Sabadi D. i sur. Endocannabinoids, Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol, as Prognostic Markers of Sepsis Outcome and Complications. <i>Cannabis Cannabinoid Res</i> . 2022 Jun 1. doi: 10.1089/can.2022.0046.
12/2021.	Mihić D., Maričić L., Tolj I., Loinjak D., Sušić L., Begić I. Prognostic significance inflammatory scoring systems in critically ill patients with COVID 19 infection. <i>Medica Jadertina</i> . 2022;52:5-12.
02/2021.	Maričić L., Mihić D., Sušić L, Loinjak D. COVID 19 cardiac complication myocarditis. <i>The Open COVID-19 Journal</i> . 2021;1:1-5.
10/2020.	Maričić L., Loinjak D., Mihić D. Dissapearing Left Atrial Mass with Complete Embolisation. <i>J Heart</i> . 2020;20:22-25.
02/2020.	Mihić D., Maričić L, Loinjak D. Systemic air embolism during endoscopic retrograde cholangiopancreatography with myocardial and cerebral ischemia. <i>Int J Case Rep Images</i> . 2019;10:101075Z01DM2019.
05/2023	Glucose and sodium levels as disease outcome predictors in critically ill patients. Poster. 25th European Congress of Endocrinology
03/2023	Purifikacija krvi u sepsi - hemoperfuzija citokina. Predavanje. 27. dani internista Slavnonije i Baranje. Osijek

11. ŽIVOTOPIS

10/2022	"Atellica COVID-19 severity" algoritam u ranoj prognozi COVID-19 bolesti. Poster. Biochemia Medica 2022;32:S1-S235.
10/2022	Cirkulirajući kalprotektin kao rani biljeg smrtnog ishoda sepse. Poster. Biochemia Medica 2022;32:S1-S235.
10/2022	Promjene u krivulji disocijacije oksihemoglobina u teškom obliku COVID-19 bolesti. Poster Biochemia medica 2022; 3: S1-S235
05/2022	Plasma concentration of endocannabinoid anandamide as sepsis mortality predictor. Poster 1 st Biomedicine and Health PhD Students Congress with Internationaln Participation.
05/2022	Citratna antikogulacija kod CRRT u JIL-u. Predavanje 7. Osječki nefrološki dani
03/2022	Specifičnosti ARDS-a u bolesnika s COVID-19 pneumonijom. Predavanje. 26. dani internista Slavonije i Baranje
03/2021	Metode kontinuirane hemodijalize u kritično oboljele osobe. Predavanje. 25. dani internista Slavonije i Baranje
05/2019	Nadomjesno liječenje bubrežne funkcije u jedinici intenzivnog liječenja. Predavanje 6. Osječki nefrološki dani
<i>Ostala znanja i vještine</i>	
Jezici	Materinski jezik: hrvatski jezik Strani jezik: engleski jezik, razina B2
Računalne vještine	Osnove rada na računalu te osnovnim informatičkim računalnim programima