

POVEZANOST SERUMSKIH VRIJEDNOSTI GALEKTINA-9 I PENTRAKSINA 3, GENSKOG ACE I/D POLIMORFIZMA I OPSEGA PLUĆNIH PROMJENA TE NJIHOV UTJECAJ NA KLINIČKI ISHOD U BOLESNIKA S KORONAVIRUSNOM BOLESTI 2019 (COVID-19)

Krivdić Dupan, Zdravka

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:152:795484>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Zdravka Krivdić Dupan

POVEZANOST SERUMSKIH VRIJEDNOSTI GALEKTINA-9 I PENTRAKSINA 3,
GENSKOG ACE I/D POLIMORFIZMA I OPSEGA PLUĆNIH PROMJENA TE NJIHOV
UTJECAJ NA KLINIČKI ISHOD U BOLESNIKA S KORONAVIRUSNOM BOLESTI
2019 (COVID-19)

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Zdravka Krivdić Dupan

POVEZANOST SERUMSKIH VRIJEDNOSTI GALEKTINA-9 I PENTRAKSINA 3,
GENSKOG *ACE I/D* POLIMORFIZMA I OPSEGA PLUĆNIH PROMJENA TE NJIHOV
UTJECAJ NA KLINIČKI ISHOD U BOLESNIKA S KORONAVIRUSNOM BOLESTI
2019 (COVID-19)

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Vlatka Periša, dr. med.

Komentorica rada: doc. dr. sc. Mirjana Suver Stević

Rad ima 98 listova.

PREDGOVOR RADU

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Vlatki Periši i komentorici doc. dr. sc. Mirjani Suver Stević na velikoj pomoći, poticanju pri provođenju istraživanja i izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem i svim drugima koji su pridonijeli provedbi ovoga istraživanja: dr. sc. Silvi Guljaš, dr. sc. Damiru Mihiću, dr. sc. Domagoju Loinjaku, prof. dr. sc. Ljiljani Trtica Majnarić i dr. sc. Marinu Selešu.

Posebno hvala Nenadu i Martini na bezuvjetnoj pomoći.

Najviše zahvaljujem svojoj obitelji, suprugu Denisu te kćeri Gali i sinu Marku na nesebičnoj ljubavi i velikom razumijevanju u svakom trenutku.

Hvala teti Ani što je uvijek tu.

Ovaj rad posvećujem Ljubici Krivdić i svojim roditeljima, Dubravki i Edi Krivdiću.

Ovo istraživanje financirano je sredstvima Institucijskih znanstveno-istraživačkih projekata Medicinskog fakulteta Osijek IP15 MEFOS-2024 pod nazivom „Prognostički čimbenici i radiografska kvantifikacija plućnih promjena kod koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19)“ (voditeljica projekta doc. dr. sc. Vlatka Periša) i IP2 MEFOS-2021 pod nazivom „Smanjena psihološka otpornost na stres (resilience) i kronične bolesti starenja“ (voditeljica projekta prof. dr. sc. Ljiljana Trtica Majnarić).

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA	III
POPIS TABLICA.....	VI
POPIS SLIKA.....	VII
1. UVOD.....	1
1.1. Virus SARS-CoV-2	1
1.2. Klinička obilježja, dijagnostika i težina bolesti COVID-19.....	3
1.3. Patofiziologija bolesti COVID-19	8
1.3.1. ACE I/D polimorfizam	8
1.3.2. ACE2 receptori i renin-angiotenzin-aldosteronski sustav	9
1.3.3. Imunološki odgovor na virus SARS-CoV-2	11
1.3.4. Abnormalnosti plućnog parenhima povezane s virusom SARS-CoV-2.....	13
1.4. Radiološka obilježja plućnih promjena u COVID-19 bolesnika.....	14
1.4.1. Sumacijska radiografska snimka pluća	14
1.4.2. Kompjutorizirana tomografija pluća.....	17
1.4.3. Radiološka kvantifikacija plućnih promjena.....	20
1.5. Uloga pentraksina 3 i galektina-9 u bolesti COVID-19.....	21
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
4. ISPITANICI I METODE	26
4.1. Etička načela	26
4.2. Ustroj istraživanja	26
4.3. Ispitanici	26
4.4. Metode	27
4.5. Kvantifikacija analize radiografskih snimaka pluća	30
4.6. Statistička analiza.....	32
5. REZULTATI	34
5.1. Obilježja bolesnika	34
5.2. Povezanost težine bolesti s obilježjima bolesnika.....	35
5.3. Kvantifikacija plućnih infiltrata korištenjem MBrixia bodovne ljestvice	36
5.4. Serumske vrijednosti PTX3 i Gal-9	39
5.5. Povezanost rezultata na MBrixia bodovnoj ljestvici i serumskih vrijednosti PTX3 i Gal-9	41

5.6. Analiza polimorfizma I/D u genu za ACE i njegova povezanost s težinom.....	43
kliničke slike, serumskim vrijednostima PTX3, Gal-9 i s ishodom bolesti.....	43
5.7. Analiza predviđanja težine kliničke slike i ishoda liječenja.....	45
5.8. Analiza predviđanja težine plućnih infiltrata.....	50
6. RASPRAVA	53
6.1. Povezanost težine bolesti s obilježjima bolesnika.....	53
6.2. Kvantifikacija plućnih infiltrata putem MBrixia bodovne ljestvice	57
6.3. Serumске vrijednosti PTX3 i Gal-9	58
6.4. Povezanost rezultata na MBrixia bodovnoj ljestvici i serumskih vrijednosti PTX3 i Gal-9	61
6.5. Analiza varijante gena I/D polimorfizma u genu za ACE i njihova povezanost s težinom kliničke slike, serumskim vrijednostima PTX3 i Gal-9 te s ishodom.....	62
6.6. Analiza predikcije težine kliničke slike i ishoda	64
7. ZAKLJUČAK.....	68
8. SAŽETAK	69
9. SUMMARY.....	71
10. LITERATURA	73
11. ŽIVOTOPIS.....	90

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACE	angiotenzin-konvertirajući enzim
ACE1	angiotenzin-konvertirajući enzim 1
ACE2	angiotenzin-konvertirajući enzim 2
ACEI	inhibitor angiotenzin-konvertirajućeg enzima
ACR	engl. <i>American College of Radiology</i>
AGT	angiotenzinogen
ALI	engl. <i>Acute lung injury</i>
AN-I	angiotenzin I
AN-II	angiotenzin II
ANCA	engl. <i>Antineutrophilic cytoplasmic antibody</i>
ANG	angiotenzin
Ang (1-7)	angiotenzin (1-7)
Ang (1-9)	angiotenzin (1-9)
ANOVA	test jednosmjerne analize varijanci (engl. <i>One way analysis of variance</i>)
ARB	blokator angiotenzinskih receptora
ARDS	akutni respiratorni distres sindrom (engl. <i>Acute respiratory distress syndrome</i>)
ASER	engl. <i>American Society of Emergency Radiology</i>
AT1	alveolarne stanice tipa I
AT2	alveolarne stanice tipa II
AT1R	engl. <i>Angiotensin II type 1 receptor</i>
AT2R	engl. <i>Angiotensin II type 2 receptor</i>
AUC	engl. <i>Area under the curve</i>
BIS	bolnički informacijski sustav
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>Body mass index</i>)
COVID-19	koronavirusna bolest 2019
CO-RADS	engl. <i>COVID-19 reporting and data system</i>
CRP	C-reaktivni protein
CT	kompjutorizirana tomografija
CT-SS	(engl. <i>Computed tomography severity score</i>)
DAD	difuzno alveolarno oštećenje (engl. <i>Diffuse alveolar damage</i>)
DAMP	engl. <i>Damage-associated molecular patterns</i>

DENV	engl. <i>Dengue virus</i>
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ECM	izvanstanični matriks (engl. <i>Extracellular matrix</i>)
ELISA	enzimska imunoanaliza (engl. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Gal-9	galektin-9
GGO	engl. <i>Ground glass opacities</i>
HCoV	humani koronavirus (engl. <i>Human coronavirus</i>)
HCoV-229E	humani koronavirus 229E (engl. <i>Human coronavirus 229E</i>)
HCoV-OC43	humani koronavirus OC43 (engl. <i>Human coronavirus OC43</i>)
HBV	virus hepatitisa B
HCV	virus hepatitisa C
HIV	virus humane imunodeficijencije
HSV	virus herpes simplex
IL	interleukin
IL-1R	receptor za interleukin 1
IPF	idiopatska plućna fibroza (engl. <i>Idiopathic pulmonary fibrosis</i>)
IQR	interkvartilni raspon
JIL	jedinica intenzivnog liječenja
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
MasR	receptor MAS
MERS-CoV	bliskoistočni respiratorni sindrom koronavirus (engl. <i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>)
NO	dušikov oksid (engl. <i>Nitric oxide</i>)
PAMP	engl. <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PRR	engl. <i>Pattern recognition receptors</i>
PTE	pluća tromboembolija
PTX3	pentraksin 3
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav
RALE	engl. <i>Radiographic assessment of lung edema</i>
RBD	receptor-vezujuća domena (engl. <i>Receptor-binding domain</i>)
RBI	infiltracija desnog bronha (engl. <i>Right bronchial infiltration</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>Ribonucleic acid</i>)
ROC	engl. <i>Receiver operating characteristic</i>
RTG	rendgensko snimanje

RT-PCR	reverzno prepisivanje lančanom reakcijom polimeraze (engl. <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SARS	teški akutni respiratorni sindrom (engl. <i>Severe acute respiratory syndrome</i>)
SARS-CoV	teški akutni respiratorni sindrom koronavirus (engl. <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>)
SARS-CoV-2	teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (engl. <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
STR	engl. <i>Society of Thoracic Radiology</i>
SZO	Svjetska znanstvena organizacija
TLR	<i>Toll-like</i> receptori (engl. <i>Toll-like receptors</i>)
TMPRSS2	transmembranska serinska proteaza tipa 2 (engl. <i>Transmembrane serine protease 2</i>)
TNF- α	tumorski faktor nekroze alfa (engl. <i>Tumor necrosis factor α</i>)
xMAP	engl. <i>Multi-analyte profiling</i>

POPIS TABLICA

Tablica 1.1. Klinički oblici bolesti COVID-19 prema težini kliničke slike.....	7
Tablica 5.1. Raspodjela bolesnika prema demografskim i kliničkim obilježjima.....	34
Tablica 5.2. Raspodjela bolesnika prema obliku bolesti i obilježjima.....	35
Tablica 5.3. Vrijednosti zbroja na MBrixia bodovnoj ljestvici lijevog i desnog plućnog krila u ukupnom uzorku bolesnika.....	36
Tablica 5.4. Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u odnosu na oblik bolesti.....	37
Tablica 5.5.A Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u odnosu na lokalizaciju prema težini kliničke slike.....	37
Tablica 5.5.B Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u odnosu na lokalizaciju prema težini kliničke slike.....	38
Tablica 5.6. Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u odnosu na ishod liječenja.....	38
Tablica 5.7. Raspodjela i učestalost genotipova I/D polimorfizma u genu za ACE u tri podskupine prema obliku bolesti.....	43
Tablica 5.8. Omjer izgleda za razvoj teškog oblika bolesti COVID-19 s obzirom na ACE I/D polimorfizam.....	43
Tablica 5.9. Omjer izgleda za smrtni ishod bolesti COVID-19 s obzirom na ACE I/D polimorfizam.....	45
Tablica 5.10. Predviđanje vjerojatnosti teškog/kritičkog oblika bolesti (bivarijatna i multivarijatna logistička regresija).....	46
Tablica 5.11. Predviđanje vjerojatnosti nastanka negativnog ishoda liječenja (bivarijatna i multivarijatna logistička regresija).....	47
Tablica 5.12. Vrijednosti ROC krivulje promatranih varijabla s obzirom na težu kliničku sliku (srednje teški i teški oblik bolesti).....	48
Tablica 5.13. Vrijednosti ROC krivulje promatranih varijabla s obzirom na ishod liječenja.....	49
Tablica 5.14. Vrijednosti ROC krivulje za PTX3 i dob u predviđanju težine plućnih infiltrata.....	51
Tablica 5.15. Predviđanje vjerojatnosti nastanka teških plućnih infiltrata.....	52

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Sumacijska snimka pluća (AP projekcija) u bolesnika s COVID-19 pneumonijom.	4
Slika 1.2. Snimka CT-a pluća bolesnika s COVID-19 pneumonijom.....	5
Slika 1.3. Sumacijska snimka pluća u AP projekciji (ležeći položaj bolesnika) pokazuje obostrano difuzno smanjenu prozračnost plućnog parenhima sa slikom konfluirajućih zasjenjenja, koja odgovaraju slici ARDS-a.	6
Slika 1.4. Sumacijska snimka pluća u PA projekciji pokazuje nježne infiltrate plućnog parenhima u perifernoj zoni plućnih režnjeva uzorka mliječnog stakla i nježnih retikulacija, tipično za COVID-19 radiološku sliku.....	16
Slika 1.5. Sumacijska snimka pluća u AP projekciji pokazuje infiltrate plućnog parenhima uzorka mliječnog stakla i područja konsolidacija multilobarne distribucije tipično za COVID-19 radiološku sliku pneumonije kod bolesnika na mehaničkoj ventilaciji.....	17
Slika 1.6. Snimka CT-a pluća bolesnika s COVID-19 pneumonijom zahvaćenih subpleuralnih područja, unutar GGO uzorka prisutna su interlobularna i intralobularna zadebljanja uzorka „ludog popločavanja“ (engl. <i>Crazy paving</i>).....	19
Slika 1.7. CT angiografija plućnih arterija kod bolesnika pozitivnog na SARS-CoV-2 pokazuje defekt kontrastnog stupca lumena obje glave plućne arterije te njihovih ogranaka u sklopu plućne tromboembolije.....	19
Slika 4.1. Utvrđivanje I/D polimorfizma u genu za ACE1 na uređaju LightCycler 480 II.	28
Slika 4.2. Analiza serumske razine galektina-9 i pentraksina 3 na uređaju Luminex 200.	29
Slika 4.3. Prijenosni radiografski uređaj GE Optima XR240amx.	30
Slika 4.4. Shematski prikaz kvantifikacije sustavom MBrixia bodovne ljestvice s 12 pojedinačnih zona, od kojih šest u svakom plućnom krilu na sumacijskoj snimci pluća.	31
Slika 4.5. Prikaz kvantifikacije sustavom MBrixia bodovne ljestvice s 12 pojedinačnih zona, od kojih 6 u svakom plućnom krilu na učinjenim sumacijskim snimkama pluća kod dvaju bolesnika s COVID-19 plućnim promjenama.....	32
Slika 5.1. Koncentracije pentraksina 3 s obzirom na težinu kliničke slike COVID-19	39
Slika 5.2. Koncentracije galektina-9 s obzirom na težinu kliničke slike COVID-19	40
Slika 5.3. Koncentracije pentraksina 3 s obzirom na ishod bolesti COVID-19	40
Slika 5.4. Koncentracije galektina-9 s obzirom na ishod bolesti COVID-19.....	41
Slika 5.5. Povezanost rezultata na MBrixia bodovnoj ljestvici i pentraksina 3 (a), dobi bolesnika i pentraksina 3 (b), rezultata na MBrixia bodovnoj ljestvici i galektina-9 (c) te dobi bolesnika i galektina-9 (d).....	42

Slika 5.6. Koncentracije pentraksina 3 s obzirom na <i>ACE I/D</i> polimorfizam.....	44
Slika 5.7. Koncentracije galektina-9 s obzirom na <i>ACE I/D</i> polimorfizam	44
Slika 5.8. Dob ispitanika, pentraksin 3 i galektin-9 kao dijagnostički pokazatelji nastanka srednje teškog i teškog oblika bolesti (ROC analiza)	48
Slika 5.9. Dob ispitanika, pentraksin 3 i galektin-9 kao dijagnostički pokazatelji smrtnog ishoda (ROC analiza)	49
Slika 5.10. Pentraksin 3 i dob kao pokazatelji smrtnog ishoda (ROC analiza).....	50

1. UVOD

1.1. Virus SARS-CoV-2

Naziv koronavirus dolazi od latinske riječi *corona*, što znači „kruna“ ili „aureola“. Naziv se odnosi na karakterističan izgled virusnih čestica gledanih elektronskim mikroskopom, koji imaju obod koji podsjeća na krunu (1). Koronavirusi predstavljaju skupinu RNA (engl. *Ribonucleic acid*) virusa s najvećim genomom među svim drugim RNA virusima (27 – 37 kb) (2).

Povijest koronavirusa može se pratiti od 1931. godine i otkrića prvog koronavirusa (ptičji infektivni bronhitis virus). Nakon tridesetogodišnjeg razdoblja, tijekom 1966. i 1967. godine, otkriveni su sojevi HCoV-229E i HCoV-OC43, prvi humani koronavirusi (3).

Prva epidemija koronavirusom koja se povezuje s težim oboljenjem započela je u studenome 2002. godine u Foshanu (Kina) kao teški akutni respiratorni sindrom (SARS, engl. *Severe acute respiratory syndrome*) ili SARS-CoV (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus*), koji se 2003. godine pretvorio u globalnu infekciju uzrokujući stopu smrtnosti od 9,6 % (4, 5). Nakon punog desetljeća, 2012. godine pojavljuje se još jedan koronavirus HCoV (engl. *Human coronavirus*), a s obzirom na to da je izvor pandemije bio na Bliskom istoku, s epicentrom u gradu Jeddah u Saudijskoj Arabiji, nazvan je Srednjoistočnim respiratornim sindromom ili MERS-CoV (engl. *Middle East respiratory syndrome*) i imao je globalnu stopu smrtnosti od 34,3 % (6,7).

Koronavirusna bolest 2019 (COVID-19) javlja se prvi put krajem prosinca 2019. godine u kineskom gradu Wuhanu. Kao uzročnik visoko zarazne pneumonije identificiran je do tada nepoznati virus za koji je kasnije utvrđeno da pripada porodici *Coronaviridae* zbog čega je dobio naziv SARS-CoV-2 (8). Zbog vrlo brzog širenja virusa na globalnoj razini Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) proglasila je 11. ožujka 2020. godine postojeću epidemiju pandemijom (9). Prvo oboljenje od COVID-19 u Hrvatskoj potvrđeno je krajem veljače 2020. godine. Prema podacima SZO-a do sredine svibnja 2024. godine u svijetu je zabilježeno 775 522 404 slučaja oboljelih od COVID-19, od čega je u Hrvatskoj bilo 1 317 083 slučajeva. Smrtni ishod u svijetu zabilježen je u 7 049 617 slučajeva (10).

Podrijetlo virusa SARS-CoV-2 najčešće se povezuje sa šišmišima zbog vrlo visoke homologije genoma virusa izoliranih iz šišmiša i humanog virusa SARS-CoV-2, a koja iznosi 96,2 %. Velika genomski sličnost nađena je i s virusima izoliranim iz ljuskavaca (pangolima, 91,02 %), što ih također stavlja u skupinu potencijalnih prirodnih rezervoara SARS-CoV-2 (11, 12).

Smatra se da su prvi bolesnici inficirani konzumiranjem zaraženih životinja (13). Budući da

se bolest brzo širila i da je došlo do pojave respiratornog oboljenja kod osoba koje nisu imale izravni kontakt sa zaraženim životinjama te da su virusi uglavnom izolirani iz epitelnih stanica dišnih puteva, pretpostavljalo se da je glavni put prijenosa virusa između ljudi kapljični putem prilikom govora, kihanja ili kašljanja (14).

SARS-CoV-2 pozitivan je pleomorfní jednolančani RNA virus s veličinom genoma 29 891 kb smještenim u kružnu proteinsku ovojnícu koja sadržava šiljaste nastavke površinskih glikoproteina. Vanjska površina SARS-CoV-2 sastoji se od četiriju strukturnih proteina. Jedan od njih je glikoprotein S koji iz unutrašnjosti virusa izlazi na površinu i podsjeća na šiljak (engl. *Spike*). Građen je od receptor-vezujuće domene (engl. *Receptor binding domain – RBD*), najvarijabilnije strukture koja ima ključnu ulogu u vezanju virusa na receptore stanica dišnog sustava, točnije receptore za angiotenzin-konvertirajući enzim – ACE2 receptore (engl. *Angiotensin-converting enzyme 2*). Uz protein S postoje još tri strukturna proteina: membranski protein ili protein M (engl. *Membrane*), protein ovojnice ili protein E (engl. *Envelope protein*) i nukleokapsidni protein ili protein N (engl. *Nucleocapsid protein*). Proteini M, S i E čine ovojnícu virusne čestice, dok protein N nalazimo unutar virusne čestice koji na sebe veže RNA molekulu (15).

Za virulentnost virusa SARS-CoV-2 zaslužna je njegova sposobnost ulaska u stanice koja je posredovana proteinom S na virusnoj čestici i ACE2 receptorom domaćina (16). Protein S sastoji se od dviju podjedinica: podjedinica S1 omogućava vezanje virusne čestice za ACE2 receptor, a podjedinica S2 omogućava fuziju membrana virusne čestice i stanice domaćina (17). Vezanje proteina S na ACE2 receptor posreduje RBD podjedinice S1. Da bi došlo do fuzije membrane virusne čestice i membrane stanice domaćina koju posreduje podjedinica S2 proteina S, mora doći do cijepanja tih dviju podjedinica, a to omogućava transmembranska serinska proteaza tipa 2 (engl. *Transmembrane serine protease 2 – TMPRSS2*) te membranska proteaza furin koje su izražene na površini stanice domaćina. Fuzijom membrane virusne čestice i membrane stanice domaćina dolazi do oslobađanja virusne RNA u citoplazmu stanice te procesa transkripcije i translacije, nastanka strukturnih i nestrukturnih proteina potrebnih za replikaciju virusne RNA i u konačnici stvaranja novih virusnih čestica. Novonastale se virusne čestice izbacuju iz stanice procesom egzocitoze, a one potom mogu inficirati druge okolne stanice. Ako na površini stanice nema potrebnih proteaza, virus se u stanicu internalizira zajedno s ACE2 receptorom procesom endocitoze i formiranjem endosoma. Aktivacija proteina S događa se endosomalno djelovanjem proteaze katepsina koja posreduje cijepanje podjedinice S1 i S2 te već opisano oslobađanje virusne RNA u citoplazmu stanice (18). Epitelne stanice dišnog sustava imaju najveću ekspresiju ACE2 receptora, a kako je glavni put prijenosa bolesti

kapljični, sluznica dišnog sustava predstavlja ulazna vrata za virus u organizam. Najveću ekspresiju ACE2 receptora nalazimo na epitelnim stanicama nosne sluznice i na bronhalnim epitelnim stanicama, dok se u alveolama ACE2 receptor nalazi na alveolarnim stanicama tipa II (19).

1.2. Klinička obilježja, dijagnostika i težina bolesti COVID-19

COVID-19 bolest je koja se razvija nakon zaraze virusom SARS-CoV-2 (20). Razdoblje od zaraze virusom do pojave prvih simptoma bolesti jest od dva do četrnaest dana, a većina bolesnika razvije simptome unutar 11 dana (21). Prema istraživačkim podacima procijenjeno je da od 17,9 do 33,3 % zaraženih bolesnika ostaje asimptomatskima i ne razvija nikakve kliničke simptome, ali predstavljaju opasnost od širenja zaraze (22). Bolest COVID-19 najčešće se javlja kao obična prehlada koja samo kod određenog broja bolesnika napreduje prema težim oblicima bolesti (23). Najozbiljnije manifestacije zahvaćenosti dišnog sustava uključuju razvoj pneumonije, difuznog alveolarnog oštećenja (engl. *Diffuse alveolar damage* – DAD), akutnog respiratornog distres sindroma (engl. *Acute respiratory distress syndrome* – ARDS) te višeorganskog zahvaćanja. Pneumonija se u većini slučajeva razvija između 5. i 10. dana bolesti. U pojedinim je slučajevima bolest naglo uznapredovala te je bolesnicima bila potrebna potpora mehaničke ventilacije unutar nekoliko dana od početka bolesti (24).

Brzo širenje pandemije COVID-19 zahtijevalo je brzo otkrivanje i identifikaciju virusa te oboljele od istoga. Zlatni standard za dijagnostiku COVID-19 jest molekularna metoda reverzne transkripcije lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-time reverse transcription polymerase chain reaction* – RT-PCR) iz obriska nazofarinksa ili sputuma. Zbog svoje osjetljivosti to je metoda izbora za otkrivanje virusa jer je u odnosu na antigenske testove njome moguće otkriti infekciju u ranoj fazi bolesti kada je broj virusnih čestica vrlo malen (25).

Sumacijska radiografska snimka pluća, odnosno sumacijska snimka torakalnih organa, slikovna je pretraga prve dijagnostičke crte. Iako je manje osjetljiva od kompjutorizirane tomografije (CT), njezina je velika prednost da se za otkrivanje plućnih promjena kod bolesnika sa sumnjom ili potvrđenom bolesti COVID-19 može napraviti po potrebi uz krevet bolesnika (engl. *Bedside*) (26, 27). Sumacijska radiografska snimka pluća uključuje posteroanteriornu (PA) i postraničnu (lateralnu) projekciju bolesnika u stojećem položaju. Izvođenje sumacijske radiografske snimke pluća u ležećem položaju bolesnika, odnosno u anteroposteriornoj (AP) projekciji pomoću prijenosnog sustava kod bolesnika u Jedinicama intenzivnog liječenja (JIL), pomaže u smanjenju širenja infekcije jer se sustav lako čisti i može se smjestiti u objekte

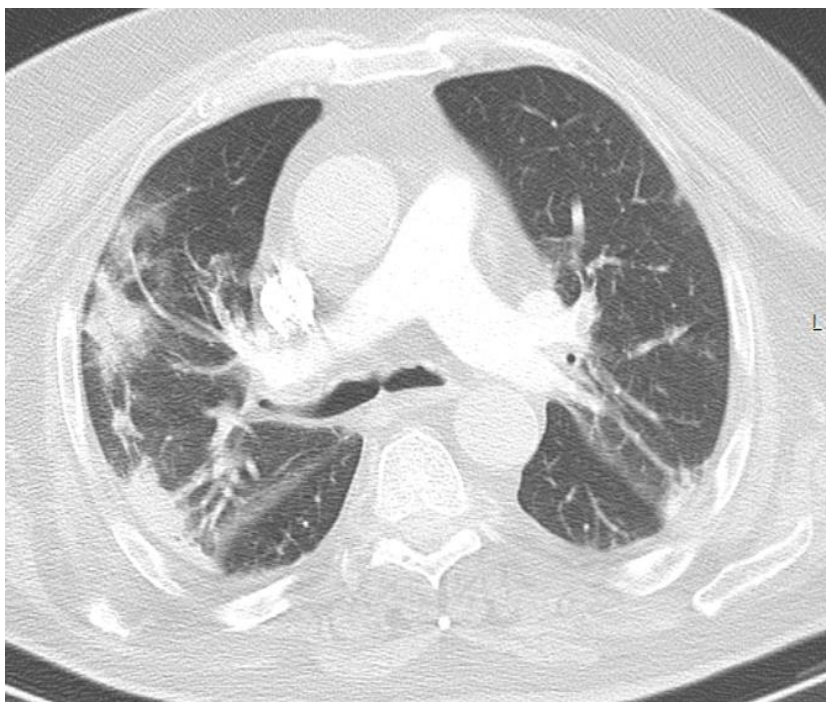
namijenjene za bolesnike zaražene SARS-CoV-2. Navedeno ograničava potrebu za kretanjem potencijalno zaraženih bolesnika unutar bolnice i smanjuje upotrebu osobne zaštitne opreme, a ujedno je i jedina metoda koja se može izvesti kod kritičnih bolesnika u JIL-u uz krevet, a radi praćenja tijeka bolesti. Ujedno, primjenjuje se za otkrivanje mogućih komplikacija poput pneumotoraksa i pneumomedijastinuma (28). Kod većine bolesnika pneumonija je radiološki verificirana kao bilateralna predominantno smještena u lateralnim dijelovima plućnih režnjeva (Slika 1.1.) (29).



Slika 1.1. Sumacijska snimka pluća (AP projekcija) u bolesnika s COVID-19 pneumonijom (izvor slike: arhiva Kliničkog bolničkog centra Osijek; izradila autorica)

CT je pouzdanija radiološka metoda u postavljanju dijagnoze COVID-19 pneumonije u odnosu na standardne radiografske snimke pluća, ali je manje dostupna u svakodnevnoj praksi, osobito u ranim pandemijskim uvjetima (30, 31). Osjetljivost standardnih radiografskih snimaka pluća niža je od osjetljivosti CT-a (69 % naprema 97 – 98 %), no u nekim je publikacijama čak i jednaka (32, 28). Glavno CT obilježje COVID-19 pneumonije uzorak je mliječnog stakla (engl. *Ground glass opacities* – GGO) koji je tipično subpleuralne, odnosno periferne lokalizacije i multilobarna zahvaćenost plućnog parenhima (Slika 1.2.). Uz područja GGO-a mogu se naći i zone fokalnih konsolidacija, a ako se zadebljanja interlobularnih i intralobularnih septi superponiraju na GGO uzorak, dobivamo sliku uzorka ludog popločenja (engl. *Crazy paving pattern*). Nekoliko dana nakon nastupa bolesti može se naći tzv. obrnuti „halo“ znak (engl.

Reverse halo sign), koji karakterizira područje konsolidacije okruženo GGO zonom. Kako infekcija traje, mijenjaju se CT obilježja COVID-19 pneumonije. Kod bolesnika s povoljnim ishodom te se promjene povlače, dok se kod onih s lošijim tijekom bolesti razvijaju retikulacije te rijetko i podloga za fibrozu pluća. Brojna izvješća ističu tromboembolijske komplikacije, poput plućne tromboembolije (PTE). Slikovne pretrage, kao što je CT, igraju ključnu ulogu u dijagnostici plućne tromboembolije kod bolesnika s bolesti COVID-19 (33).



Slika 1.2. Snimka CT-a pluća bolesnika s COVID-19 pneumonijom
(izvor slike: arhiva Kliničkog bolničkog centra Osijek; izradila autorica)

ARDS predstavlja najteži oblik zahvaćenosti dišnog sustava SARS-CoV-2, a karakterizira ga novonastala teška respiratorna insuficijencija, plućni edem koji se na sumacijskoj radiografskoj snimci pluća manifestira kao difuzni alveolarni infiltrati, a konačni rezultat jest teško oštećenje plućnog parenhima i teško narušena izmjena plinova kisika i ugljičnog dioksida (hipoksemija, hiperkapnija) (Slika 1.3.) (27).



Slika 1.3. Sumacijska snimka pluća u AP projekciji (ležeći položaj bolesnika) pokazuje obostrano difuzno smanjenu prozračnost plućnog parenhima sa slikom konfluirajućih zasjenjenja koja odgovaraju slici ARDS-a
(izvor slike: arhiva Kliničkog bolničkog centra Osijek; izradila autorica)

Kako je već navedeno, SARS-CoV-2 predominantno zahvaća dišni sustav, a mogu biti pogođeni i drugi organi i organski sustavi, bilo izolirano ili najčešće zajedno sa zahvaćenošću dišnog sustava. Najčešće ekstrapulmonalne manifestacije COVID-19 jesu gastrointestinalne i hepatobilijarne, hematološke, kardijalne, renalne te neurološke (34, 35).

Nacionalni institut za zdravlje (engl. *The National Institutes of Health* – NIH) klasificira bolest COVID-19 u pet kategorija, a istu klasifikaciju usvojilo je i Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske u dokumentu „Smjernice za liječenje oboljelih od koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19)“. Prema toj kategorizaciji težine bolesti COVID-19 razlikujemo sljedeće kategorije: asimptomatska infekcija, blagi oblik, srednje teški oblik, teški oblik i kritični oblik bolesti (Tablica 1.1.) (36).

Tablica 1.1. Klinički oblici bolesti COVID-19 prema težini kliničke slike

Klinički oblik	Klinička obilježja
Asimptomatska infekcija	Bolesnici s pozitivnim molekularnim testom na SARS-CoV-2, ali bez bilo kakvih simptoma i znakova koji se mogu povezati s bolesti COVID-19.
Blagi oblik bolesti	Bolesnici koji imaju klasične simptome bolesti COVID-19 kao što su vrućica, kašalj, grlobolja, malaksalost, glavobolja, mialgije, mučnina, povraćanje, poremećaj osjeta okusa i mirisa, ali bez dispneje ili radiološki potvrđene pneumonije.
Srednje teški oblik bolesti	Bolesnici koji imaju kliničke simptome ili radiološki dokaz zahvaćenosti donjeg dijela dišnog sustava (pneumonija), a koji imaju $SpO_2 \geq 93\%$ na sobnom zraku.
Teški oblik bolesti	Bolesnici koji imaju $SpO_2 < 93\%$ na sobnom zraku ili omjer $PaO_2/FiO_2 < 300^{**}$ uz pridruženu tahipneju (respiratorna frekvencija > 30 /minuti) ili radiološki potvrđenu pneumoniju koja zahvaća $> 50\%$ površine pluća.
Kritični oblik bolesti	Bolesnici koji imaju akutno respiratorno zatajenje (akutni respiratorni distress sindrom), sepsu i septički šok i/ili višeorgansko zatajenje.

*periferna saturacija krvi kisikom

**omjer parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi i frakcije udahnutog kisika

Nekoliko je rizičnih čimbenika koji se povezuju s razvojem teških oblika bolesti COVID-19. Oni uključuju životnu dob iznad 60 godina, pridružene kronične komorbiditete (kardiovaskularna bolest, arterijska hipertenzija, šećerna bolest, kronična plućna bolest, kronična bolest bubrega, kronične bolesti jetre, maligne bolesti), adipozitet, stanje prirođene ili stečene imunodeficijencije te trudnoća (37). Između navedenih komorbiditeta i rizičnih čimbenika za razvoj teškog i kritičnog oblika bolesti COVID-19 najčešće se ističu pretilost, arterijska hipertenzija i šećerna bolest (38). Također, veći rizik od razvoja težih oblika bolesti imaju muškarci u odnosu na žene (39). Smrtnost od bolesti COVID-19 ovisi o više čimbenika. Uznapredovala životna dob, kronični komorbiditeti te težina i razvoj komplikacija povećavaju rizik od smrtnosti od COVID-19 bolesti (40).

1.3. Patofiziologija bolesti COVID-19

Infekcija virusom SARS-CoV-2 nastaje ulaskom virusne čestice u stanice domaćina, pri čemu se u prvom redu misli na epitelne stanice gornjeg dijela dišnog sustava gdje je najveći izražaj ACE2 receptora, ključnog elementa za proces ulaska virusa u stanicu. Ulazak virusa u stanice pokreće imunološki odgovor kojemu je cilj neutralizirati virus i infekciju staviti pod kontrolu. Danas se smatra da patofiziologija teških oblika bolesti COVID-19 ne proizlazi samo iz izravnog, citopatskog učinka virusa, nego i iz disregulacije imunološkog odgovora domaćina s posljedičnim hiperinflamatornim stanjem (35).

1.3.1. ACE I/D polimorfizam

Insercijsko/delecijski (I/D) polimorfizam za angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE) odnosi se na varijaciju u genetskom kodu *ACE* gena, koja može utjecati na aktivnost ACE enzima u tijelu. Postoje dvije varijante tog polimorfizma: insercijska (I) i delecijska (D). Osobe s različitim varijantama *ACE* I/D polimorfizma mogu imati različite razine ACE aktivnosti (41).

Što se tiče mehanizma ulaska COVID-19 u stanice domaćina, čini se da polimorfizmi *ACE1* gena mogu utjecati na težinu bolesti. Angiotenzin-konvertirajući enzimi (ACE1/ACE2) jesu proteini renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS) koji imaju važnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka i ravnoteže tekućih elektrolita. Već je rečeno da SARS-CoV-2 ulazi u ljudske stanice vezanjem proteina virusnog šiljka na ACE2 receptor na površini stanice (42). ACE2 eksprimira se u različitim ljudskim organima i tkivima te je homolog ACE1. ACE1 ima različite biološke aktivnosti i može se suprotstaviti negativnoj ulozi RAAS-a u mnogim bolestima (43, 44). S druge strane, ACE2 djeluje kao čimbenik vazodilatacije i modulira učinke ACE1. Ta dva enzima imaju suprotne učinke, stoga ravnoteža ACE1/ACE2 igra važnu ulogu u težini bolesti, a isto je ranije dokazano za koronarnu bolest (45). Gen koji kodira ACE1 sadrži 26 egzona i nalazi se na kromosomu 17q23.3, a poznat je i kao DCP, ACE1, DCP1, CD143 (OMIM broj 106180). On kodira ključni enzim u pretvorbi angiotenzina I (AN-I) u angiotenzin II (AN-II) (46). Polimorfizam I/D u *ACE* genu povezan je s Alu ponavljanjem od 287 bp u intronu 16 i na temelju njega moguća su tri genotipa: heterozigotni I/D te homozigotni I/I i D/D (47). Pokazalo se da polimorfizam *ACE1* I/D značajno doprinosi razini ACE proteina u plazmi, a genotip D/D povezan je s najvišom razinom ACE proteina u tkivu i plazmi (48). U razvoju teškog i kritičnog oblika bolesti COVID-19 različiti čimbenici rizika, kao što su starost, muški spol, te komorbiditeti poput šećerne bolesti, arterijske hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti, pretilosti, kroničnih plućnih bolesti, imunodeficijencije i karcinoma imaju utjecaja na razvoj teškog oblika bolesti (42). Zanimljivo je da su mnogi od tih komorbiditeta usko povezani s polimorfizmima

ACE I/D i s obzirom na ulogu tih polimorfizama u ravnoteži *ACE/ACE2*, to može biti genetski čimbenik rizika za tešku infekciju COVID-19 (49).

1.3.2. ACE2 receptori i renin-angiotenzin-aldosteronski sustav

ACE2 receptor je na staničnoj površini koji predstavlja funkcionalni receptor koji se koristi kao ulazna točka za virus SARS-CoV-2, odnosno ima ključnu ulogu u patogenezi bolesti COVID-19 jer osigurava ulazak virusa u ljudske stanice, posebno stanice dišnog sustava (50). Protein S virusnog šiljka SARS-CoV-2 veže se za ACE2 kao stanični receptor na sličan način kao SARS-CoV, pri čemu je bitno naglasiti da je virus SARS-CoV-2 patogeniji zbog svojeg 10 do 20 puta povećanog afiniteta vezanja na ACE2 receptor (51). Takav način vezanja dovodi do ulaska virusa u stanicu domaćina zajedno s početnim djelovanjem proteina S proteazom TMPRSS2 stanice domaćina. Prema dosadašnjim istraživanjima očito je da se ulazak virusa SARS-CoV-2 u stanice i patološki učinci uglavnom događaju u stanicama gornjeg dišnog sustava, poglavito u stanicama alveolarnog epitela tipa II gdje je uočena izraženija genska ekspresija ACE2 i TMPRSS2 (52).

ACE2 je homolog ACE-a i igra ključnu ulogu u RAAS sustavu, uključujući regulaciju krvnog tlaka i homeostazu elektrolita. ACE2 djeluje kao protuteža ACE-u konvertirajući angiotenzin II (AN-II) u manje aktivne oblike, što rezultira proširenjem krvnih žila i smanjenjem krvnog tlaka.

Angiotenzinogen (ANG), koji proizvodi jetra, cijepa se reninom, što rezultira stvaranjem AN-I. Posljedično, ACE je jedan od enzima koji katalizira pretvorbu AN-I u AN-II (53). AN-II kao glavna aktivna sastavnica RAAS-a ostvaruje svoje učinke uglavnom preko receptora angiotenzina II tipa 1 (AT1R). Glavni učinci AN-II uključuju vazokonstrikciju, bubrežnu resorpciju natrija i izlučivanje kalija, sintezu aldosterona, povišenje krvnog tlaka i indukciju upalnih i profibrotičkih puteva (54). ACE2 cijepa AN-I u angiotenzin (1-7) (Ang(1-7)) koji potiče vazodilatacijske, protuupalne i antifibrotičke učinke vezanjem na MAS receptor (MasR) (55, 56). Učinci aktivacije RAAS-a ovise o ravnoteži *ACE/ACE2* u tkivu, koja određuje dostupnost različitih peptida angiotenzina, a time i ravnotežu između proupalnih i profibrotičkih te protuupalnih i antifibrotičkih puteva (50). Osim svojih funkcija u RAAS-u, ACE2 upravlja metabolizmom bradikinina u plućima inaktivacijom des-Arg9 bradikinina, čime inhibira učinke poput vazodilatacije i povećanja vaskularne propusnosti (57).

ACE2 visoko je izražen na epitelnim stanicama plućnih alveola i epitelnim stanicama tankog crijeva, što je u skladu s potencijalnim putevima virusnog prijenosa SARS-CoV-2 jer su respiratorni i gastrointestinalni sustav prva crta kontakta s vanjskim okruženjem. Dodatno,

ACE2 bio je prisutan na vaskularnim endotelnim stanicama i glatkim mišićnim stanicama u svim proučavanim organima. Također je prisutan i u bazalnom epidermalnom sloju kože te u oralnoj i nazalnoj sluznici. ACE2 široko je izražen u ljudskim tkivima, kako u glavnim ciljnim organima SARS-CoV-2 tako i u organima koji igraju naizgled manje važnu ili čak nepoznatu ulogu u patofiziologiji bolesti COVID-19 (50). Veza između SARS-CoV-2 infekcije, ACE2 receptora i RAAS-a jest složena. Zaključno, infekcija virusom SARS-CoV-2 može rezultirati smanjenjem izražavanja ACE2 receptora što može dovesti do disfunkcije RAAS-a i neželjenih učinaka, kao što su upalni procesi i povećana permeabilnost krvnih žila (58).

RAAS je hormonski sustav koji igra ključnu ulogu u regulaciji arterijskog tlaka, ravnoteže tekućine i elektrolita te sustavnog vaskularnog otpora, a sastoji se od angiotenzinogena (AGT), renina, ACE-a, ANG i dvaju receptora za angiotenzin (AT1R i AT2R) te drugih sastavnica, od kojih se najznačajnijima čine ACE2, angiotenzin 1-9 (Ang (1-9)) i Ang (1-7) (59). Enzim renin koji djeluje kao enzimski katalizator u pretvorbi AGT-a u AN-I sintetizira i oslobađa jukstaglomerularne stanice aferentnih bubrežnih arteriola kao odgovor na nizak arterijski tlak i nizak cirkulirajući natrijev klorid. Renin enzimatski pretvara AGT stvoren u jetri u AN-I koji nije biološki aktivan te se pod utjecajem ACE-a, proizvedenog u endotelu pluća, cijepa u biološki aktivnu molekulu AN-II. Nakon toga, AN-II povezuje se sa svojim receptorom AT1R potičući kaskadu fizioloških odgovora koji obuhvaćaju vazokonstrikciju, protrombotičke učinke te zadržavanje vode i natrija. Zajedno, ti orkestrirani procesi pridonose regulaciji optimalnog krvnog tlaka i dinamike cirkulacije, osobito u slučajevima hipovolemije (60).

Interakcije između AN-II i AT1R-a stimuliraju vazokonstrikciju, aktivaciju simpatičkog živčanog sustava i stimulaciju otpuštanja aldosterona iz kore nadbubrežne žlijezde, zadržavanje natrija te podizanje arterijskog tlaka (61). Jedna od najznačajnijih posljedica aktivacije AT1R-a, posebice na kardiovaskularni sustav, jest proizvodnja i otpuštanje reaktivnih kisikovih spojeva te su učinci viška AN-II i pojačane aktivacije AT1R-a povezani s upalom, fibrozom i endotelnom disfunkcijom (62). Daljnjom pretvorbom AN-II, pod utjecajem ACE2, stvara se Ang (1-7). Taj peptid djeluje na MasR i pokazuje niz korisnih učinaka, uključujući antifibrotičke, antiproliferativne, protuupalne, vazodilatacijske, diuretičke i bradikinin-NO (dušikov oksid) učinke.

Zaključno, Ang (1-7) vezanjem na MasR ostvaruje vazodilatacijske i ostale učinke suprotne učincima AN-II/AT1R. Pretpostavlja se da odsutnost ACE2 može rezultirati povišenim krvnim tlakom i ubrzati progresiju srčane disfunkcije (63). Smanjena regulacija ACE2 remeti pretvorbu AN-I u Ang (1-9) i AN-II u Ang (1-7), što dovodi do unutarstanične akumulacije AN-II. Dodatni fiziološki učinak AN-II uključuje stimulaciju aldosteron sintaze. Aldosteron potiče

povećanje volumena plazme i minutnog volumena srca povećavajući resorpciju natrija u bubrežnom sustavu (64).

SARS-CoV-2 može poremetiti ravnotežu između ACE/ACE2 i AN-II/Ang (1-7), potencijalno utječući na krvni tlak i pridonoseći nastanku arterijske hipertenzije. U kontekstu infekcije virusom SARS-CoV-2 primijećeno je značajno smanjenje ekspresije ACE2, što je rezultiralo pojačanom aktivnošću AN-II (65). Ta povećana aktivnost AN-II uključena je u oštećenje krvnih žila i parenhimskih organa. ACE2 pokazuje različite stupnjeve ekspresije u gotovo svim ljudskim organima. Smanjena regulacija ACE2 koči konverziju AN-I u Ang (1-9) i AN-II u Ang (1-7) (65). Preko svoje interakcije s ACE2 virus SARS-CoV-2 povezan je s raznim kardiovaskularnim komplikacijama, uključujući disfunkciju miokarda, endotelnu disfunkciju, mikrovaskularnu disfunkciju, nestabilnost arterijskog plaka i infarkt miokarda (66). Zaključno, ACE2 ključna je sastavnica RAAS-a, kritičnog regulatora arterijskog krvnog tlaka (67).

1.3.3. Imunološki odgovor na virus SARS-CoV-2

Za razvoj težih kliničkih oblika bolesti COVID-19 smatra se zaslužnom disregulacija imunološkog sustava u odgovoru na prisutnost virusa SARS-CoV-2, a ne samo citopatski učinak virusa (68). Hiperinflamatorni odgovor označava prekomjerni imunološki odgovor koji se očituje pojačanom proizvodnjom i otpuštanjem proupalnih citokina, što se u kliničkoj praksi naziva citokinskom olujom (engl. *Cytokine storm*). COVID-19 može izazvati citokinsku oluju koja pridonosi razvoju ARDS-a i višeorganskog zatajenja uzrokovanog virusom SARS-CoV-2 (69). Hiperinflamatorni sindrom nastaje kao posljedica disregulacije stanica urođenog imunološkog odgovora domaćina u prisustvu virusa SARS-CoV-2 (70). Ta teorija temelji se na piroptози, programiranoj staničnoj smrti zaraženih stanica koja se aktivira tijekom replikacije virusne RNA. Tijekom piroptoze oslobađaju se molekule koje mogu djelovati kao stimulatori stanica urođene imunosti (71).

Raspalom zaraženih stanica oslobađaju se dijelovi virusne RNA koji djeluju kao molekularni obrasci povezani s patogenom, odnosno PAMP molekule (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*), poput virusnih uljeza. Zatim se oslobađaju dijelovi koji su povezani sa sastavnicama stanice domaćina koji se oslobađaju tijekom oštećenja ili stanične smrti, a djeluju kao molekularni obrasci povezani s oštećenjem, odnosno DAMP molekule (engl. *Damage-associated molecular patterns*), ali i drugi virusni proteini koje prepoznaju receptori za prepoznavanje uzorka ili PRR (engl. *Pattern recognition receptors*) receptori okolnih stanica (72). Kako je PRR široka skupina receptora, koja ima ključnu ulogu u pravilnoj funkciji urođenog imunološkog sustava, različiti radovi upućuju na različite vrste PRR

receptora koji se aktiviraju u prisutnosti virusne RNA virusa SARS-CoV-2 u citoplazmi domaćina, a najizgledniji su TLR receptori (engl. *Toll-like receptors*), koji putem IL-1R signalnog puta potiču transkripciju i stvaranje proupalnih citokina, kao što su IL-6, IL-8, IL-10 i TNF- α , INF- γ , MCP, MIP i drugi. Oni dovode do kemotaksije makrofaga i drugih efektorskih stanica urođene imunosti, kao i limfocita T, koji dalje pojačavaju imunološki odgovor, dovode do lokalnog oštećenja stanica i tkiva te dodatno proizvode citokine, čime dolazi do pojačanja imunološkog odgovora. Stvoreni citokini ulaze i u cirkulaciju te mogu uzrokovati poremećaje i na udaljenim tkivima i organima, čime se i tumači nastanak višeorganskog zatajenja kod kritičnih COVID-19 bolesnika (73).

Disregulacija urođene imunosti u nastanku hiperinflamacije očituje se i kroz disregulaciju plućnih makrofaga. Kod bolesnika s teškim oblikom bolesti COVID-19 zabilježena je značajno veća genska ekspresija proupalnih citokina i kemokina u plućnim makrofazima dobivenih iz uzoraka bronhoalveolarnog lavata u odnosu na plućne makrofage dobivene iz uzoraka bronhoalveolarnih lavata zdravih dobrovoljaca. Kod tih bolesnika u bronhoalveolarnim lavatima posljedično se nalaze povišene razine IL-1 β , IL-6, TNF- α te različitih kemokina (CXCL9, CXCL10 i CXCL11) koji djeluju kao moćni regruteri monocita iz periferne krvi u plućni parenhim (74).

U razvoju bolesti COVID-19 smatra se da virus najprije zahvaća organe čije stanice ekspimiraju ACE2 receptor, kao što su pluća, krvne žile, srce, jetra i bubrezi. Nastala oštećenja navedenih organa nastaju uslijed opisane aktivacije imunološkog sustava, a jačina oštećenja ovisi o više čimbenika (75). Opisano hiperinflamatorno stanje, odnosno citokinska oluja, smatra se jednim od glavnih čimbenika u razvoju najtežih oblika bolesti COVID-19, kao što je ARDS i s njim povezano višeorgansko zatajenje. Višeorganskom zatajenju pridonosi aktivacija endotelnih stanica posredovana TNF- α i IL-1 β što dovodi do pojačane ekspresije selektina P, fibrinogena i von Willebrandova čimbenika, kao i pojačanog otpuštanja tkivnog čimbenika, čime se aktivira koagulacijska kaskada i stvaranje ugrušaka, osobito na razini mikrocirkulacije, a u skladu s tim i razvoj diseminirane intravaskularne koagulopatije te mikrotromboze pluća, mozga i bubrega, što su česti nalazi obduciranih COVID-19 bolesnika (76).

1.3.4. Abnormalnosti plućnog parenhima povezane s virusom SARS-CoV-2

Kao što je već poznato ACE2 receptori izraženi su u cijelom tijelu, ali njihova ekspresija visoko je zastupljena u endotelu plućnih krvnih žila i na površini epitelih stanica dišnog sustava. Kao rezultat toga, stanice koje su prve u kontaktu s virusom SARS-CoV-2 nakon udisanja one su koje se nalaze u nazofarinksu, odnosno stanicama gornjih dišnih puteva (77). Kada imunitet domaćina ne uspije zaustaviti infekciju SARS-CoV-2, ona se širi na dijelove donjeg respiratornog trakta, bilo aspiracijom virusnih čestica iz nazofarinksa i orofarinksa ili postupnim napredovanjem kroz traheobronhalno stablo (78). Po dolasku u alveole virus SARS-CoV-2 utječe na AT2 zadužene i za proizvodnju plućnog surfaktanta i regeneraciju AT1 koje čine većinu alveolarnog epitela (79).

Nakon infekcije stanice domaćina u početku pokušavaju kontrolirati širenje virusa putem urođenog imuniteta. Kako je ranije opisano, proteini za prepoznavanje citoplazmatskih uzoraka uočavaju RNA fragmente virusa SARS-CoV-2 što dovodi do poticanja otpuštanja interferona, proupalnih citokina i regrutiranja leukocita te dodatnog oslobađanja citokina, što se događa kada se kao odgovor na ozljedu oslobađaju molekularni uzorci povezani s oštećenjem u stanicama domaćina (80). Ako je urođeni imunološki odgovor neučinkovit, infekcija će se širiti povećavajući rizik od teškog oblika bolesti COVID-19. Ozljeda ili smrt alveolarnih stanica uzrokuje prekid alveolarnog epitela izazivajući neravnotežu između aktivacije koagulacije i fibrinolize (81). Bogati fibrinom alveolarni eksudati stvaraju hijalinske membrane koje sprječavaju daljnje nakupljanje tekućine u ozlijeđenim alveolama, ali također ometaju alveolarno-kapilarni prijenos kisika (82). Difuzno oštećenje alveola praćeno je aktivacijom endotela malih krvnih žila i sekundarnom ozljedom na hipoksiju, citokinima, kemokinima, molekularnim obrascima povezanim s oštećenjem i izravnom infekcijom virusa. Difuzni endotelitis s infiltratima upalnih stanica može inducirati apoptozu endotelih stanica, piroptozu i mikrocirkulacijsku disfunkciju pridonoseći nastanku ARDS-a i također potičući višeorgansko zatajenje, kako je već prije opisano (83).

ARDS može nastati iz raznih heterogenih stanja u kojima se patofiziološki putevi spajaju na jednu anatomsku strukturu, odnosno vrlo bitnu alveolarno-kapilarnu barijeru, uzrokujući DAD (84). Istovremeno se aktivira vanjski i unutarnji koagulacijski put što dodatno održava koagulaciju i podržava činjenicu da je opseg mikrotromboze daleko veći u bolesnika s ARDS-om, a trombotske promjene nisu ograničena samo na mikrocirkulaciju nego je i incidencija plućne tromboembolije velikih krvnih žila veća u bolesnika s ARDS-om kod SARS-CoV-2, nego u bolesnika s ARDS-om koji je sekundaran u odnosu na druge virusne i nevirusne

etiologije (85). Ostali plućni vaskularni poremećaji uočeni na obdukcijama bolesnika uključuju tešku ozljedu endotela pluća i prisutnost proširenih, odnosno datiranih kapilara (86).

Fibroza je rezultat različitih mehanizama koji surađuju u poticanju taloženja fibrina. Oštećene alveole oslobađaju različite markere u krvi i u alveolarnom odjeljku, a oštećenje vaskularnog endotela dovodi do povećanja mikrovaskularne propusnosti i alveolarnog edema. U nekih bolesnika značajno postojano nakupljanje makrofaga, fibrocita, fibroblasta i miofibroblasta u alveolarnom odjeljku dovodi do prekomjernog taloženja sastavnica izvanstaničnog matriksa, uključujući fibronektin i kolagen tipa I i III, među ostalim proteinima. Neravnoteža između profibrotičkih i antifibrotičkih medijatora odredit će taj fibroproliferativni odgovor. Vjeruje se da je patofiziološki proces fibroze plućnog parenhima poput abnormalnog stanja zacjeljivanja rane. Prekomjerna proliferacija fibroblasta i nakupljanje proteina izvanstaničnog matriksa (engl. *Extracellular matrix* – ECM), kao što je kolagen, postali su središte novijih istraživanja plućne fibroze (87). Zanimljivo je da su cirkulirajući fibroblasti u pozitivnoj korelaciji sa stupnjem fibroze što ukazuje na to da se bolesnici s idiopatskom plućnom fibrozom (engl. *Idiopathic pulmonary fibrosis* – IPF) mogu suočiti s povećanim rizikom od nepovoljne prognoze COVID-19 (88).

1.4. Radiološka obilježja plućnih promjena u COVID-19 bolesnika

1.4.1. Sumacijska radiografska snimka pluća

Brojne radiološke profesionalne organizacije i društva, uključujući *American College of Radiology* (ACR), *Society of Thoracic Radiology* (STR) i *American Society of Emergency Radiology* (ASER), trenutno ne preporučuju izvođenje CT-a za dijagnozu bolesti COVID-19 (89). Iako je CT pluća osjetljiviji od radiografske snimke pluća za otkrivanje parenhimskih abnormalnosti, radiografija je još uvijek koristan alat u identificiranju COVID-19 pneumonije kod bolesnika za koje se sumnja da su zaraženi virusom SARS-CoV-2, posebno imajući u vidu da bi izvođenje CT-a pluća kao slikovnog testa prve crte bilo vrlo izazovno s obzirom na veliki broj bolesnika i dugo vrijeme čišćenja opreme, zajedno s mogućnošću povećane izloženosti osoblja i prijenosa u usporedbi s radiografijom. Unatoč tome, u postavkama hitne i kritične skrbi i dalje se izvodi pogotovo prijenosna radiografija kako bi se pomoglo u individualnom liječenju bolesnika, identificirale komplikacije pneumonije i procijenile alternativne dijagnoze. U fazi pandemije COVID-19 radiografija, a posebno digitalni prijenosni rendgenski uređaji, koristili su se u više zemalja kao trijažni alat prve crte ne samo za dijagnozu već i za procjenu

ozbiljnosti infekcije COVID-19. Nadalje, kako se prevalencija COVID-19 globalno povećavala, bitno je za specijaliste radiologije i kliničare da prepoznaju značajke COVID-19 zato što se radiografija pluća često izvodi u i druge svrhe, odnosno druge indikacije. S obzirom na to i prema preporuci ACR-a, prijenosnu radiografiju treba koristiti u početku, kada je to medicinski potrebno, jer se površine tih uređaja mogu lako očistiti i ti se uređaji mogu postaviti u određenim ustanovama za bolesnike s COVID-19 i u odjelima hitne pomoći (90). Zbog problema s kontrolom infekcije povezane s prijevozom bolesnika do CT uređaja i nedostatka dostupnosti CT-a u dijelovima svijeta, prijenosna radiografija pluća vjerojatno će biti najčešće korišteni modalitet za identifikaciju i praćenje abnormalnosti pluća. Nadalje, u slučajevima kliničke sumnje na pozitivan nalaz na COVID-19 na radiografskoj snimci pluća može se izbjeći potreba za CT-om. Osim toga, korištenje radiografije za rano otkrivanje bolesti također može igrati važnu ulogu u područjima s ograničenim pristupom pouzdanom testiranju na COVID-19 RT-PCR testom (91).

Sumacijska radiografska snimka pluća može biti uredna u blagim slučajevima ili u ranom stadiju bolesti, dok bolesnici s umjerenim do teškim simptomima neće inicijalno imati uredan nalaz. Većina je nalaza patološka u bolesnika kod kojih je potrebna hospitalizacija (69 % pri prijemu, a 80 % u nekom trenutku nakon prijema). Radiološki nalazi najizraženiji su od 10. do 12. dana nakon pojave simptoma. Najčešći su nalazi smanjena prozračnost parenhima pluća, koja mogu biti zasjenjenja slikom GGO uzorka, retikulacije ili konsolidacije plućnog parenhima predominantno smještene u perifernim dijelovima plućnih režnjeva (Slika 1.4.) (92, 28).

Analize promjena na radiografskim sumacijskim snimkama pluća prema nomenklaturi Fleischnerova društva, dostupnoj u *Glossary of Terms for Thoracic Imaging* (93), definiraju retikularan crtež kao nepravilna, prugasta, linearna zasjenjenja plućnoga parenhima koja ostavljaju dojam mreže, pa se još naziva i mrežolikim crtežom. Konsolidacija označava homogeno povećanje atenuacije plućnog parenhima, poput zasjenjenja jasnih rubova koje zahvaćaju određeni plućni režanj. Unutar konsolidacije mogu se naći veći bronhi koji sadrže zrak i to nazivamo zračnim bronhogramom (engl. *Air trapping*). Konsolidacija prekriva krvne žile, za razliku od uzorka mliječnog stakla, stoga one nisu vidljive unutar zasjenjenja (94).

COVID-19 pneumonija ubraja se u intersticijske pneumonije i radiološki je karakterizirana obostranim infiltratima najčešće uzorka GGO. GGO je definiran kao „maglovito“ povećanje atenuacije plućnog parenhima koje ne prekriva krvne žile kao konsolidacijska područja, smješteno u perifernim dijelovima plućnog parenhima uz mnogobrojne konsolidacije u kasnijim stadijima (Slika 1. 5.) (95).

Kod opisa radiografskih nalaza bolesnika s COVID-19 koriste se termini kao što su „konsolidacija“, „opacitet“, „zasjenjenja“ i „promjene“, a normalni nalazi RTG-a pluća nisu neuobičajeni za simptomatske bolesnike s blagim oblikom bolesti koji se javljaju u ranoj fazi bolesti (90).



Slika 1.4. Sumacijska snimka pluća u PA projekciji pokazuje nježne infiltrate plućnog parenhima u perifernoj zoni plućnih režnjeva uzorka mliječnog stakla i nježnih retikulacija, tipično za COVID-19 radiološku sliku
(izvor slike: arhiva Kliničkog bolničkog centra Osijek; izradila autorica)



Slika 1.5. Sumacijska snimka pluća u AP projekciji pokazuje infiltrate plućnog parenhima uzorka mliječnog stakla i područja konsolidacija multilobarne distribucije tipično za COVID-19 radiološku sliku pneumonije kod bolesnika na mehaničkoj ventilaciji (izvor slike: arhiva Kliničkog bolničkog centra Osijek; izradila autorica)

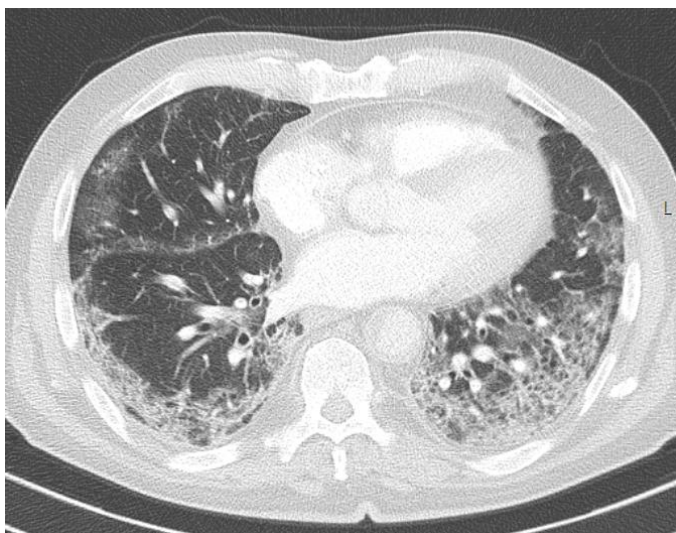
1.4.2. Kompjutorizirana tomografija pluća

Osjetljivost CT-a u dijagnostici COVID-19 pneumonije (upale pluća) jest od 85 do 98 % (96, 97). CT manifestacija te virusne upale pluća ima karakteristične značajke na temelju kojih iskusni specijalisti radiologije mogu dijagnosticirati bolest. Najčešći je i najraniji nalaz uzorak GGO-a koji u samom početku može biti unifokalan, ali obično je multifokalan, bilateralan i periferne distribucije, dominantno u stražnjim dijelovima plućnog parenhima te u donjim režnjevima. U području GGO-a uobičajeno se nalaze proširene krvne žile, a kasnije se mogu naći i trakcijske bronhiektazije ako nalaz napreduje prema fibrozirajućim promjenama (98). CT-om se mogu otkriti promjene već u ranoj fazi bolesti, uključujući nekoliko dana od početka prvog simptoma (0. – 4. dana). S vremenom se radiološka slika distribucije i uzorka mijenja, pa se u progresivnoj fazi bolesti (5. – 8. dana), osim širenja zahvaćenih područja, unutar GGO-a pojavljuju interlobularna i intralobularna zadebljanja. Taj kombinirani uzorak, kako je ranije rečeno, naziva se „ludo popločavanje“, što nije karakteristično za ostale virusne pneumonije, stoga može pomoći u diferencijalnoj dijagnozi (Slika 1.6.). Vrhunac bolesti (9. – 13. dan) jest otprilike deseti dan s konsolidacijama koje se često pojavljuju pomiješane s GGO-om ili nakon GGO-a. Završna faza bolesti, odnosno teški i kritični oblik bolesti, može se prikazati karakterističnom slikom ARDS-a, s radiološkim nalazima koji se preklapaju s organizirajućom pneumonijom (OP). Nakon toga, u fazi povlačenja (> 14 dana) resorpcija konsolidacija ponovno se očituje kao zamućenja u obliku GGO-a koja mogu biti povezana s bronhalnim

dilatacijama i subpleuralnim distorzijama. Mogu se pojaviti i subpleuralne parenhimske trake i subpleuralne retikulacije. Evolucija lezija često je asinkrona, s nekim područjima koja pokazuju resorpciju, a druga progresiju. Uzorak organizirajuće pneumonije polako regredira tijekom narednih mjesec dana uz često zaostale fibrozne trake (99). Kod bolesnika s povoljnim ishodom te se promjene povlače, dok se kod onih s lošijim tijekom bolesti razvijaju retikulacije te rijetko i podloga za fibrozu pluća. Brojna izvješća ističu tromboembolijske komplikacije, poput PTE (Slika 1.7.). Slikovne pretrage, kao što je CT, igraju ključnu ulogu u dijagnostici PTE kod bolesnika s COVID-19 (33).

Plućna fibroza može biti uzrokovana ARDS-om ili pneumonijom uzrokovanom bolesti COVID-19. Treba uzeti u obzir čimbenike rizika, kao što su starija dob, kronični komorbiditeti, potreba za mehaničkom ventilacijom tijekom akutne faze i ženski spol. Pojedinci sa simptomima COVID-19 pneumonije koji su trajali najmanje 12 tjedana nakon dijagnoze, uključujući kašalj, dispneju, dispneju pri naporu i hipoksemiju, odgovorni su za pojavnost te komplikacije. Najčešći nalazi na CT-u pluća bile su plućne intersticijske promjene, kao uzorak mliječnog stakla i nepravilne retikulacije, pleuroparenhimske trake, distrozija bronha i redukcija volumena plućnog parenhima (100).

S obzirom na to da CT nije lako dostupna pretraga u uvjetima pandemije, a postoji potreba za usporedivom metodom snimanja i snimanja bolesnika u bolesničkom krevetu, radiografska snimka pluća izabrana je kao dijagnostička metoda izbora prema smjernicama ACR-a (90).



Slika 1.6. Snimka CT-a pluća bolesnika s COVID-19 pneumonijom zahvaćenih subpleuralnih područja, unutar GGO uzorka prisutna su interlobularna i intralobularna zadebljanja uzorka „ludog popločavanja“ (engl. *Crazy paving*)
(izvor slike: arhiva Kliničkog bolničkog centra Osijek; izradila autorica)



Slika 1.7. CT angiografija plućnih arterija kod bolesnika pozitivnog na SARS-CoV-2 pokazuje defekt kontrastnog stupca lumena obje glave plućne arterije te njihovih ogranaka u sklopu plućne tromboembolije
(izvor slike: arhiva Kliničkog bolničkog centra Osijek; izradila autorica)

1.4.3. Radiološka kvantifikacija plućnih promjena

Radi standardizacije i bolje usporedbe nalaza, odnosno procjene težine bolesti i praćenja u bolesnika oboljelih od bolesti COVID-19 mogu se koristiti bodovne ljestvice (101, 90). Jedan od njih je Brixia bodovni sustav koji određuje kvantifikaciju radiološki verificiranih infiltrata plućnog parenhima putem sustava bodovanja šest polja na standardnim sumacijskim radiografskim snimkama pluća (lijeva i desna gornja, srednja i donja zona pluća), od koji se svako polje boduje ovisno o zasjenjenju s bodovima od 0 do 3, pri čemu 0 označava uredan nalaz, 1 označava intersticijske infiltrate poput retikulacija, 2 označava intersticijske i alveolarne infiltrate s predominacijom intersticijskih promjena, a 3 označava konsolidirajuće alveolarne infiltrate plućnog parenhima. Prema tome, najveća vrijednost na Brixia bodovnoj ljestvici (tzv. Brixia skor) iznosi 18 (102, 103).

Kako je Brixia sustav zahtijevao preinaku radi još bolje prostorne razlučivosti te boljeg prikaza anatomije i opsega zahvaćenosti plućnog parenhima, proširen je sustav bodovanja na MBrixia bodovnu ljestvicu. Na standardnim sumacijskim radiografskim snimkama, pluća su podijeljena u tri zone dvjema vodoravnim linijama koje sežu jedna ispod luka aorte i jedna ispod hilarnih struktura. Svaka zona zatim je dalje podijeljena u dodatne medijalne i lateralne podzone. Ukupno 12 pojedinačnih zona, po 6 u svakom plućnom krilu, ocijenjeno je prema težini plućnih lezija bodovima od 0 do 3 po zoni. Broj 0 označava uredan nalaz, 1 označava intersticijske infiltrate, 2 označava kombinaciju intersticijskih i alveolarnih infiltrata, a 3 označava konsolidirajuće alveolarne infiltrate. Ukupan broj bodova može iznositi najviše 36 (104).

Kod bodovnog sustava RALE (engl. *Radiographic assessment of lung edema*) koji je izrazito koristan kod bolesnika u JIL-u na mehaničkoj ventilaciji za dijagnozu i prognozu ARDS-a, pluća su podijeljena na kvadrante s obzirom na ocjenu zahvaćenosti pluća i gustoće infiltrata. Rezultati kvadranta množe se, a zatim zbrajaju i rezultiraju konačnim zbrojem u rasponu od 0 do 48. Dostupna je i pojednostavljena verzija RALE zbroja gdje je svakom plućnom krilu dana ocjena od 0 do 4 proporcionalna količini zahvaćenog plućnog parenhima (105, 106).

Yang i suradnici u ožujku 2020. predložili su procjenu težine zahvaćenosti plućnih promjena CT-om pod nazivom CT-SS (engl. *Computed tomography severity score – CT-SS*) (107). Napravljen je kako bi pomogao u procjeni opterećenja COVID-19 na inicijalnoj snimci dobivenoj pri prijemu i pružio bi objektivan pristup identificiranju bolesnika kojima je potreban hitan prijem u bolnicu. Spomenuta bodovna ljestvica koristi opacifikacije plućnog parenhima kao ekvivalent za proširenje bolesti u plućima. Osamnaest segmenata obaju plućnih krila

podijeljeno je u 20 regija, u kojima je apikoposteriorni segment lijevog gornjeg plućnog režnja podijeljen na apikalnu i posteriornu segmentnu regiju, dok je anteromedijalni bazalni segment lijevog donjeg plućnog režnja bio dodatno podijeljen u prednje i bazalne segmentne regije. Zatim su opacifikacije plućnog parenhima u svih 20 regija pluća subjektivno procijenjene na CT-u pluća. Svako područje ocijenjeno je s 0, 1 ili 2 boda, ovisno o uključenim opacifikacijama plućnog parenhima: 0 %, 1 – 50 %, odnosno 51 – 100 % zahvaćenosti. Ukupni CT rezultat težine definiran je kao zbroj bodova postignutih u svakoj od 20 regija segmenta pluća, koji se kreće od 0 do 40 bodova (101, 108).

COVID-19 CO-RADS (engl. *Reporting and data system – CO-RADS*) uspostavilo je Nizozemsko radiološko društvo kako bi se standardizirala shema procjene i pojednostavilo izvješćivanje korištenjem bodovne ljestvice od 5 stupnjeva s oznakama od 1 (vrlo niska) do 5 (vrlo visoka) sumnja za COVID-19 pneumoniju na CT slikama pluća (109). CO-RADS ima izvrsnu dijagnostičku izvedbu za COVID-19 kroz interpretaciju CT slika pluća (110).

1.5. Uloga pentraksina 3 i galektina-9 u bolesti COVID-19

Pentraksin 3 (PTX3) je protein koji je dio imunološkog sustava i ima važnu ulogu u regulaciji upale i imunološkog odgovora na infekcije (111). PTX3 pripada superobitelji pentraksina, a sličnost s C-reaktivnim proteinom (CRP) potaknula je istraživanja korisnosti PTX3 kao biomarkera u različitim ljudskim stanjima infektivnog ili upalnog podrijetla. PTX3 bitna je sastavnica humoralne urođene imunosti te je prepoznat u otpornosti na odabrane patogene i regulaciji upale. Za razliku od CRP-a koji uglavnom proizvodi jetra kao odgovor na IL-6 tijekom odgovora akutne faze, PTX3 eksprimiraju mijeloične i stromalne stanice, posebice endotelne i respiratorne epitelne stanice, kao odgovor na primarne proupalne signale, prepoznavanje mikroba i oštećenje tkiva (112, 113). Glavna obilježja PTX3 lokalna su proizvodnja na mjestu infekcije ili oštećenja tkiva od strane više vrsta stanica i otpuštanje prethodno formiranog proteina od strane neutrofila te posljedično brzo povećanje njegovih cirkulirajućih razina u upalnim ili infektivnim stanjima. Navedeno objašnjava brzinu porasta PTX3 u ovim stanjima, što ga čini kandidatom za prognostički biomarker. U različitim patološkim stanjima, u rasponu od kardiovaskularnih bolesti do infekcija i sepse, razine PTX3 u plazmi povećane su i općenito u korelaciji s težinom bolesti (114, 115, 116). Pojačana ekspresija PTX3 i korelacija s aktivnošću bolesti uočeni su u stanjima različitih vaskulitisa, uključujući arteritis divovskih stanica, Takayasuov arteritis i vaskulitis malih krvnih žila povezan s ANCA-om (engl. *Antineutrophilic cytoplasmic antibody*) (117). Osim toga, zabilježeno je da razine

PTX3 u plazmi predviđaju smrtnost u nekoliko sustavnih upalnih stanja, uključujući akutni infarkt miokarda (118) i sepsu (119). Ranije studije pokazale su da su povišene serumske vrijednosti PTX3 povezane s težim oblicima upale i oštećenjem plućnog parenhima, a povećana ekspresija PTX3 može doprinijeti patogenezi akutne ozljede pluća (engl. *Acute lung injury* – ALI), odnosno ARDS-a (120, 121).

Povišene razine PTX3 povezane su s težim oblicima COVID-19 i lošijim ishodom u bolesnika s koronavirusnom bolesti. Određen broj studija predlažu PTX3 kao mogući prediktor kliničkog tijeka kod bolesnika nakon infekcije virusom SARS-CoV-2 (122). Druge studije predlažu PTX3 kao čimbenik bolničke stratifikacije ukazujući na to kako su njegove visoke vrijednosti povezane s vjerojatnijim prijemom u JIL nego na druge odjele (123).

PTX3 je također uključen u endotelnu disfunkciju kroz različite mehanizme i korelira sa smrtnim slučajevima povezanim s akutnom plućnom embolijom (124, 125). Nadalje, PTX3 se istražuje zbog svog potencijalnog utjecaja na plućne promjene u bolesti COVID-19. Plućne promjene kod COVID-19, kako je već rečeno, mogu uključivati različite patološke procese, od pneumonije, mikrotrombotskih promjena, edema pluća, ARDS-a te u konačnici do fibroze pluća. Ta zapažanja dovela su do zaključka kako PTX3 može biti koristan prognostički biomarker kod bolesnika s COVID-19 (126). Također, PTX3 može biti uključen u procese koji su važni za oporavak pluća nakon ozljeda, uključujući regulaciju stvaranja novih krvnih žila i staničnu reparaciju (127). Razumijevanje uloge PTX3 u plućnim promjenama kod bolesti COVID-19 može pomoći u razvoju novih terapijskih strategija i identificiranju biomarkera za praćenje napretka bolesti i odgovora na terapiju (128, 129).

Unatoč preliminarnim nalazima potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjela uloga PTX3 u patogenezi plućnih promjena kod COVID-19 i kako bi se procijenila njegova potencijalna primjena kao biomarkera u dijagnostici ili njegovog terapijskog učinka (130).

Galektin-9 (Gal-9) jest lektin koji veže β -galaktozid poznat po svojoj imunomodulatornoj ulozi kod raznih mikrobnih infekcija. Gal-9 ekspirira se u svim organskim sustavima i lokaliziran je u jezgri, na površini stanice, u citoplazmi i u izvanstaničnom matriksu. Posreduje u interakcijama domaćina i patogena te regulira staničnu signalizaciju putem vezanja na svoje receptore. Zbog svojih obilježja uključen je u mnoge fiziološke funkcije, kao što su rast stanica, diferencijacija, adhezija, komunikacija i programirana stanična smrt (131). Nedavno je potencijalna uloga galektina, kao ranije opisanih PRR-ova, postala područje intenzivnih istraživanja (132). Također, galektini se smatraju DAMP-ovima koji uz molekularne obrasce povezane s patogenom (PAMP) orkestriraju urođeni imunološki odgovor (133). Na primjer, Gal-9 navodi se kao signal opasnosti kod infekcije virusom DENV-a (engl. *Dengue virus*)

(134). Slična tome je i uloga Gal-3 u indukciji citokinske oluje, što ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu inhibitora kao terapijskog pristupa za ublažavanje hiperinflamacije kod infekcije COVID-19 (135). Povišenje serumskih vrijednosti Gal-9 u plazmi bolesnika s virusnim infekcijama kao što su HIV infekcija; karcinomi povezani s virusnima, kao što su hepatitis B (HBV) i hepatitis C (HCV) te virus herpes simplex (HSV) dokumentirane su u prijašnjim radovima. Također, novije studije ukazuju na povišene razine Gal-9 kod autoimunih poremećaja, akutnog zatajenja jetre, atopijskog dermatitisa, kronične bolesti bubrega, dijabetesa tipa 2, bolesti koronarnih arterija, ateroskleroze i neplodnosti, odnosno ukazuju na potencijal Gal-9 kao pouzdanog, osjetljivog i neinvazivnog biomarkera težine bolesti (131).

U infekciji SARS-CoV-2 povišene su serumske razine Gal-1, Gal-3 i Gal-9 koje pozitivno koreliraju s markerima upale i ozljede tkiva. Tada galektini mogu biti prediktori ozbiljnosti bolesti i mogu doprinijeti sindromu otpuštanja citokina (136, 137, 138). Receptorska vezna domena SARS-CoV-2 također ima neke sličnosti s galektinima s obzirom na svoju strukturu i kapacitet vezanja ugljikohidrata, što može objasniti teoriju da glikani mogu olakšati ulazak virusa SARS-CoV-2 u stanice (139, 140).

2. HIPOTEZA

ACE I/D polimorfizam i povišena serumska vrijednost *PTX3* i *Gal-9* povezani su s predispozicijom za razvoj teškog oblika bolesti COVID-19 i opsegom plućnih promjena prema MBrixia bodovnoj ljestvici na radiografskoj snimci pluća.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi su istraživanja:

1. Ispitati povezanost *ACE I/D* polimorfizma i vrijednosti MBrixia bodovne ljestvice radiografski verificiranih plućnih infiltrata.
2. Ispitati povezanost serumskih vrijednosti PTX3 i Gal-9 i vrijednosti MBrixia bodovne ljestvice radiografski verificiranih plućnih infiltrata.
3. Kvantificirati plućne infiltrate kod bolesti COVID-19 korištenjem MBrixia bodovne ljestvice.
4. Ispitati povezanost *ACE I/D* polimorfizma i serumskih vrijednosti PTX3 i Gal-9.
5. Ispitati povezanost serumskih vrijednosti PTX3 i Gal-9 s težinom kliničke slike i ishodom oboljelih od bolesti COVID-19.
6. Ispitati povezanost *ACE I/D* polimorfizma s težinom kliničke slike i ishodom oboljelih od bolesti COVID-19.
7. Ispitati povezanost dobi, spola i komorbiditeta s koncentracijom serumskih vrijednosti PTX3, Gal-9 i opsegom plućnih infiltrata oboljelih od bolesti COVID-19, odnosno s težinom kliničke slike i ishodom oboljelih od bolesti COVID-19.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Etička načela

Istraživanje je provedeno u skladu s važećom Helsinškom deklaracijom, Kodeksom medicinske etike i deontologije Hrvatske liječničke komore, Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske te Zakonom o zaštiti prava pacijenta Republike Hrvatske. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Osijek (broj: R1-1510/2023, Osijek 7. veljače 2023.) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku (Klasa: 602-04/23-08/03, URBROJ: 2158-61-46-23-120, Osijek 17. srpnja 2023.). Identitet ispitanika uključenih u istraživanje anoniman je i zaštićen.

4.2. Ustroj istraživanja

Istraživanje je ustrojeno kao presječno istraživanje (engl. *Cross sectional study*).

4.3. Ispitanici

Prema izračunu veličine uzorka u istraživanje je uključeno 80 odraslih ispitanika u dobi između 18. i 83. godine života, poštujući pri tome uključne i isključne kriterije. U istraživanje su uključeni bolesnici koji su liječeni na Klinici za infektologiju, Klinici za unutarnje bolesti te Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje (respiracijski centar) Kliničkog bolničkog centra (KBC) Osijek.

Dva su osnovna ključna kriterija koja su se poštovala pri uključivanju ispitanika u ovo istraživanje:

1. potvrđena dijagnoza COVID-19 bolesti koja se temeljila na pozitivnom molekularnom testu RT-PCR u stvarnom vremenu
2. ispitanici pregledani u ambulanti i liječeni na Klinici za infektologiju, Klinici za unutarnje bolesti ili u Respiracijskom centru KBC-a Osijek tijekom 2020. i 2021. godine kao bolesnici sa simptomatskim oblikom bolesti (blagi, srednje teški, teški ili kritični).

Kako bi u istraživanju imali uključene bolesnike s različitom težinom kliničke slike bolesti COVID-19 te podjednakom raspodjelom, pri uključanju smo se vodili procjenom težine bolesti prema smjernicama Ministarstva zdravstva RH iz 2022. godine.

Isključni kriteriji koji su se poštovali pri uključivanju ispitanika u ovo istraživanje jesu:

1. ispitanici koji su se u fazi aktivnog onkološkog liječenja zarazili SARS-CoV-2 virusom

2. ispitanici cijepljeni sa SARS-CoV-2 cjepivima
3. ispitanici kod kojih je dominirajući nalaz pneumotoraksa i opsežnih pleuralnih izljeva na jedinoj učinjenoj radiografskoj snimci pluća u tijeku bolesti.

Nakon odabira ispitanika za uključivanje u istraživanje, oni su podijeljeni u tri skupine u skladu sa spomenutim smjernicama Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske. U istraživanje su uključeni bolesnici s blagim oblikom (nekomplikirane infekcije dišnog sustava s vrućicom, glavoboljom, hunjavicom, grloboljom i/ili kašljem), srednje teškim (bolesnici s težim simptomima bolesti i/ili pneumonijom, ali bez kriterija za tešku pneumoniju, bez potrebe za nadomjesnom terapijom kisikom), teškim (bolesnici s teškom pneumonijom uz najmanje jedan od znakova: frekvencija disanja > 30 udisaja/min, respiratorna insuficijencija ili potreba za nadomjesnom terapijom kisikom) te kritičnim oblikom bolesti (bolesnici s ARDS-om, odnosno sepsom, septičnim šokom, s/bez akutne disfunkcije drugih organskih sustava). Težina bolesti procijenila se na temelju nalaza infektologa prilikom prvog pregleda bolesnika, a progresija bolesti pratila se iz povijesti bolesti i epikriza iz bolničkog informacijskog sustava (BIS-a) zabilježenih tijekom hospitalizacije. Svim bolesnicima zabilježio se konačni ishod liječenja. Ispitanici/bolesnici podijeljeni su prema težini: 1. bolesnici s blagim oblikom bolesti, 2. bolesnici sa srednje teškim oblikom bolesti te 3. bolesnici s teškim i kritičnim oblikom bolesti.

4.4. Metode

U istraživanju su se koristile sljedeće metode: prikupljanje podataka o ispitaniku i njegovoj bolesti (povijest bolesti), procjena plućnih promjena na učinjenim sumacijskim radiografskim snimkama pluća prema MBrixia bodovnoj ljestvici te laboratorijska ispitivanja.

Podaci o ispitaniku i njegovoj bolesti (povijesti bolesti) dobiveni su iz dostupne medicinske dokumentacije (raniji medicinski nalazi, temperaturne liste, BIS) i razgovora s ispitanikom, ako je to težina njegove bolesti omogućavala. Za potrebe ovog istraživanja prikupljali su se sljedeći podatci:

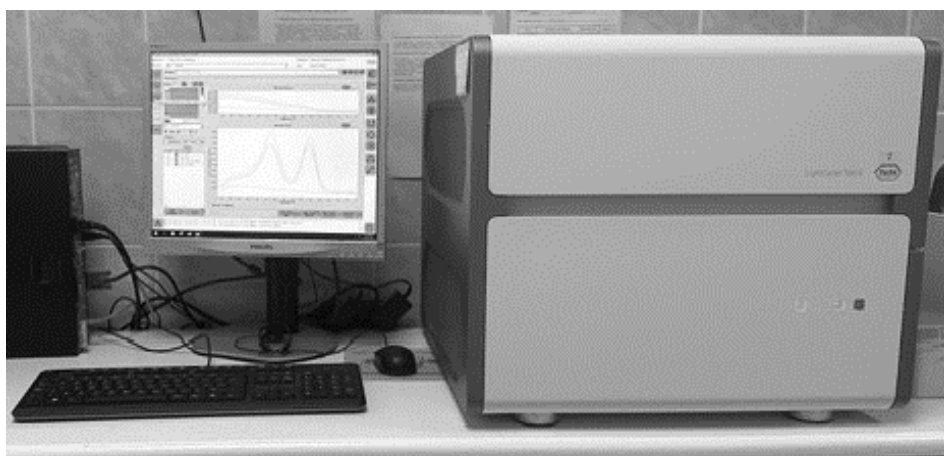
1. demografski podatci (spol i dob ispitanika)
2. prisutnost komorbiditeta, odnosno kroničnih bolesti
3. radiološki nalaz (prisutnost i raspodjela upalnih infiltrata po MBrixia bodovnoj ljestvici)
4. primjena mehaničke ventilacije
5. konačni ishod bolesti (preživjeli/umrli).

Procjena kliničkog statusa i određivanje težine bolesti napravljeni su prikupljanjem podataka o ispitaniku i njegovoj bolesti te koristeći se bodovnim sustavom MBrixia

zahvaćenosti plućnog parenhima na sumacijskim radiografskim snimkama pluća te stadija bolesti prema smjernicama Ministarstva zdravstva RH iz 2022. godine. Kod svakog je ispitanika procijenjena težina bolesti: blagi oblik, srednje teški te teški/kritični oblik bolesti.

Ispitanicima su u trenutku bolesti (od 2. do 7. dana od početka bolesti) izvađeni uzorci periferne venske krvi, a koristili su se u svrhu izolacije seruma i DNA. Za izdvajanje seruma prikupljen je uzorak periferne krvi u epruvetu bez antikoagulansa koji je inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je serum odijeljen centrifugiranjem 10 min na 3000 g. Alikvoti seruma pohranjeni su u zamrzivač na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gdje su čuvai do trenutka analize. Krv prikupljena u svrhu izolacije DNA uzorkovana je u epruvetu s antikoagulansom K_2EDTA , a postupak izolacije uključivao je primjenu komercijalnog seta *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) u skladu s uputama proizvođača. Izolirani uzorci DNA pohranjeni su u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Analiza I/D polimorfizma u genu za *ACE* utvrdila se PCR metodom u stvarnom vremenu. U tu svrhu koristio se komercijalni set specifičnih početnica i hibridizacijskih proba (*LightMix ACE I/D Kit*; Tib MolBiol) u kombinaciji sa setom *LightCycler FastStart DNA Master HybProbe* (Roche). Proces umnažanja specifičnog slijeda DNA i hibridizacije proba izvodio se u PCR uređaju *LightCycler 480 II* (Roche), a rezultati su analizirani u odgovarajućem računalnom programu (*LightCycler 480 II Software*). Utvrđivanje genotipa temeljilo se na analizi krivulje taljenja (T_m) u usporedbi s heterozigotnom (I/D) pozitivnom kontrolom (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Utvrđivanje I/D polimorfizma u genu za *ACE1* na uređaju LightCycler 480 II (izvor slike: izradila autorica)

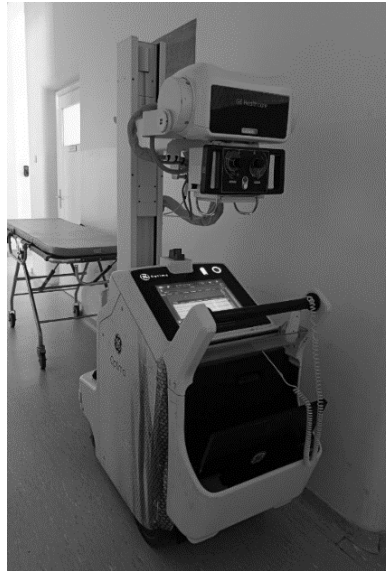
Svim bolesnicima uključenim u istraživanje odredila se serumska vrijednost PTX3 i Gal-9. Analiza serumske razine Gal-9 i PTX3 izvodila se primjenom posebno dizajniranog panela s dva analita ProcartaPlex™ 2 PLEX (human Galectin-9, PTX3) na uređaju Luminex 200 i primjenom tehnologije xMAP (engl. *Multi-analyte profiling*) koja omogućuje istodobno utvrđivanje i kvantifikaciju više analita. Rezultati su obrađeni i analizirani primjenom računalnog programa ProcartaPlex Analysis App (Thermo Fisher Scientific). Navedeni set u svom sastavu imao je standarde na osnovu kojih je generirana standardna krivulja potrebna za određivanje koncentracije promatranih analita u uzorcima. Postupak analize izvodio se na ploči s 96 jažica u koje su se dodale magnetne kuglice, a nakon uklanjanja tekućine u jažice dodan je univerzalni pufer i uzorci/standardi, nakon čega je uslijedila inkubacija. Inkubacija uzoraka odvijala se nekoliko puta i to nakon dodavanja specifičnih protutijela, streptavidina i pufera za očitavanje. Između svakog koraka, a prije dodavanja specifične supstance, kuglice su ispirane dva puta, a očitavanje rezultata izvršilo se u računalnom programu xPonent (Slika 4.2.).



Slika 4.2. Analiza serumske razine Gal-9 i PTX3 na uređaju Luminex 200
(izvor slike: izradila autorica)

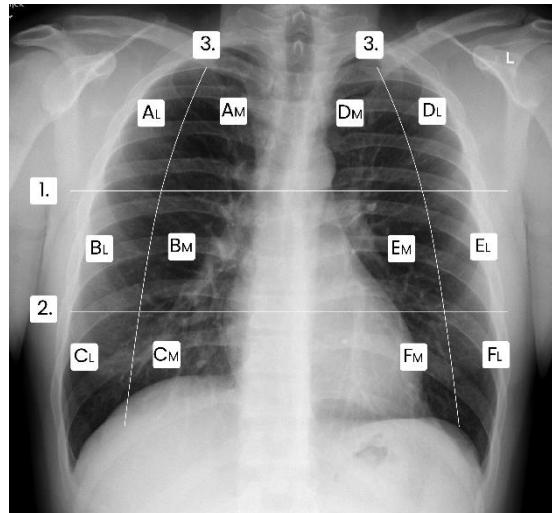
4.5. Kvantifikacija analize radiografskih snimaka pluća

Bolesnicima s inicijalno utvrđenim srednje teškim, teškim i kritičnim oblikom bolesti izvršila se kvantifikacija plućnih promjena na učinjenoj sumacijskoj radiografskoj snimci pluća neposredno prije ili nakon uzorkovanja (isti dan ili do najviše 7 dana) na uređajima GE Optima XR240amx prema MBrixia bodovnoj ljestvici (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Prijenosni radiografski uređaj GE Optima XR240amx
(izvor slike: izradila autorica)

Na sumacijskim radiografskim snimkama pluća učinjenim u posteroanteriornoj ili anteroposteriornoj projekciji, pluća su podijeljena u tri zone dvjema vodoravnim crtama: jedna ispod luka aorte i jedna ispod hilarnih struktura. Svaka zona zatim je dalje podijeljena u dodatne medijalne i lateralne podzone povlačenjem okomitih crta od plućnih vrhova do sredine dijafragme na svakom plućnom krilu. Dobivene su zone medijalna A i lateralna A, medijalna B i lateralna B, medijalna C i lateralna C, medijalna D i lateralna D, medijalna E i lateralna E te medijalna F i lateralna F zona. Svaka okomita crta bila je zakrivljena kako bi odgovarala zakrivljenosti prsnog koša (Slika 4.4.).



Slika 4.4. Shematski prikaz kvantifikacije sustavom MBrixia bodovne ljestvice s 12 pojedinačnih zona, od kojih šest u svakom plućnom krilu na sumacijskoj snimci pluća (izvor slike: izradila autorica)

Rezultirajućih 12 pojedinačnih zona, 6 u svakom plućnom krilu, ocijenjeno je prema težini plućnih lezija koristeći se bodovima od 0 do 3 po zoni. Broj 0 označava uredan nalaz, 1 označava intersticijske infiltrate, 2 označava kombinaciju intersticijskih i alveolarnih infiltrata, a 3 označava alveolarne infiltrate. Ukupan zbroj bodova najviše može iznositi 36. Također su se odvojeno bodovali lateralni i medijalni dijelovi plućnih polja te zbroj bodova za lijevo i zbroj bodova za desno plućno krilo.

Kvantifikacija sustavom MBrixia bodovne ljestvice učinila se na navedenim snimkama koje je specijalist kliničke radiologije pohranio u Sectra PACS sustavu KBC-a Osijek na Kliničkom zavodu za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju.

Kod bolesnika s inicijalno blagim oblikom bolesti koji u trenutku pregleda nisu pokazali simptome bolesti respiratornog sustava, zbog čega im nije učinjena radiografska snimka pluća, smatralo se da imaju zbroj 0 na MBrixia bodovnoj ljestvici (Slika 4.5.).



DESNO PLUĆNO KRILO				LIJEVO PLUĆNO KRILO			
ZONA	BOD	ZONA	BOD	ZONA	BOD	ZONA	BOD
A lat	0	A med	0	D lat	0	D med	0
B lat	1	B med	1	E lat	2	E med	1
C lat	2	C med	2	F lat	2	F med	2
Zbroj	3	Zbroj	3	Zbroj	4	Zbroj	3
UKUPNO 13 / 36							

DESNO PLUĆNO KRILO				LIJEVO PLUĆNO KRILO			
ZONA	BOD	ZONA	BOD	ZONA	BOD	ZONA	BOD
A lat	3	A med	3	D lat	2	D med	2
B lat	3	B med	3	E lat	3	E med	2
C lat	3	C med	3	F lat	3	F med	2
Zbroj	9	Zbroj	9	Zbroj	8	Zbroj	8
UKUPNO 32 / 36							

Slika 4.5. Prikaz kvantifikacije sustavom MBrixia bodovne ljestvice s 12 pojedinačnih zona, od kojih 6 u svakom plućnom krilu na učinjenim sumacijskim snimkama pluća kod dvaju bolesnika s COVID-19 plućnim promjenama (izvor slike: arhiva Kliničkog bolničkog centra Osijek; izradila autorica)

4.6. Statistička analiza

Kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabla testirane su Hi-kvadrat testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele brojčanih varijabla testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Brojčani podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih brojčanih varijabla između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t-testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyjevim U testom (uz iskazanu razliku i 95 % raspon pouzdanosti), a između tri i više skupina analizom varijance (ANOVA) ili Kruskal-Wallisovim testom (post hoc Conover) u ovisnosti o normalnosti raspodjele.

Povezanost normalno raspodijeljenih brojčanih varijabla ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije r , a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). Logističkom regresijom ispitani su nezavisni čimbenici koji

utječu na težinu kliničke slike i ishod oboljelih od COVID-19. ROC analiza (engl. *Receiver operating characteristic*) primijenila se za određivanje optimalne točke razlučivanja (engl. *Cut-off value*), površine ispod ROC krivulje (engl. *Area under the curve* – AUC), specifičnosti, osjetljivosti ispitivanih parametara u slučaju vjerojatnosti zadanih ishoda (lošije kliničke slike i negativnog ishoda). Razina značajnosti postavljena je na Alpha (α) = 0,05. Za statističku analizu koristio se statistički program MedCalc® Statistical Software version 22.006 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija; <https://www.medcalc.org>; 2023) i SPSS ver 23.

5. REZULTATI

5.1. Obilježja bolesnika

Istraživanje je provedeno na 80 bolesnika, od kojih je 38 (47,5 %) muškog, a 42 (52,5 %) ženskog spola. Većina bolesnika (66 %) imala je neki od komorbiditeta, a najučestaliji su bili hipertenzija (63 %) i adipozitet (28 %). Demografska obilježja i raspodjela bolesnika prema komorbiditetima, težini kliničke slike i ishodu bolesti prikazani su u Tablici 5.1.

Tablica 5.1. Raspodjela bolesnika prema demografskim i kliničkim obilježjima

	n (%) ili medijan (IQR)*
Spol	
Muškarci	38 (48)
Žene	42 (52)
Dob (godine)	66 (54 – 74)
Rizični čimbenici	
Hiperlipidemija	19 (24)
Adipozitet	22 (28)
Šećerna bolest	17 (21)
Arterijska hipertenzija	50 (63)
Težina kliničke slike	
Asimptomatski/blagi oblik bolesti	29 (36)
Srednje teški oblik bolesti	22 (28)
Teški/kritični oblik bolesti	29 (36)
Ishod	
Preživjeli	53 (66)
Umrli	27 (34)

*kategorijski podatci prikazani su apsolutnim (N) i relativnim (%) frekvencijama, a brojčani medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR)

5.2. Povezanost težine bolesti s obilježjima bolesnika

Nije bilo značajnih razlika u raspodjeli bolesnika prema spolu i obliku bolesti. Značajno su mlađi bolesnici s blagim oblikom bolesti u odnosu na srednje teški i teški oblik bolesti (Kruskal-Wallisov test, $P < 0,001$). Ispitanici s teškim/kritičnim oblikom bolesti značajno su češće bili adipozni (χ^2 test, $P = 0,01$), imali šećernu bolest (χ^2 test, $P = 0,003$) ili arterijsku hipertenziju (χ^2 test, $P < 0,001$). Povezanost težine bolesti s obilježjima bolesnika i ishodom prikazana je u Tablici 5.2.

Tablica 5.2. Raspodjela bolesnika prema obliku bolesti i obilježjima

	n (%) ispitanika			<i>P</i> *
	Blagi oblik (n = 29)	Srednje teški oblik (n = 22)	Teški/kritični oblik (n = 29)	
Dob (godine)	54 (35 – 64)	69 (63 – 79)	70 (63 – 78)	< 0,001 [†]
Spol				
Muškarci	10 (34)	10 (45)	18 (62)	0,11
Žene	19 (66)	12 (55)	11 (38)	
Rizični čimbenici				
Hiperlipidemija	3 (10)	6 (27)	10 (34)	0,09
Adipozitet	3 (10)	6 (27)	13 (45)	0,01
Šećerna bolest	2 (7)	3 (14)	12 (41)	0,003
Arterijska hipertenzija	8 (28)	15 (68)	27 (93)	< 0,001
Ishod				
Preživjeli	28 (97)	19 (86)	6 (21)	< 0,001
Umrli	1 (3)	3 (14)	23 (79)	

* χ^2 test za kategorijske i Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover) za kontinuirane varijable; [†]na razini $P < 0,05$ značajna je razlika blagi oblik vs. svi ostali oblici

5.3. Kvantifikacija plućnih infiltrata korištenjem MBrixia bodovne ljestvice

Svim bolesnicima kvantificirana je težina plućnih infiltrata na radiografskoj snimci pluća korištenjem MBrixia bodovnog sustava. Asimptomatskim bolesnicima, kao i bolesnicima s blagim oblikom bolesti koji nisu imali indikaciju za radiografsko snimanje, pretpostavljen je MBrixia zbroj 0. Ukupno je analizirano 58 RTG snimaka, a medijan zbroja na MBrixia bodovnoj ljestvici u ispitivanom uzorku bio je 17 (0 – 27). Odvojeno se bodovalo desno i lijevo plućno krilo te lateralni i medijalni dijelovi plućnih polja. Više vrijednosti MBrixia bodovne ljestvice (najviše 36) upućuju na veće promjene plućnih lezija, odnosno težu kliničku sliku. Vrijednosti MBrixia bodovne ljestvice desnog i lijevog plućnog krila te lateralno i medijalno u ukupnom uzorku bolesnika prikazane su u Tablici 5.3.

Tablica 5.3. Vrijednosti zbroja na MBrixia bodovnoj ljestvici lijevog i desnog plućnog krila u ukupnom uzorku bolesnika

	Medijan (IQR)
Ukupno desno plućno krilo	12 (8 – 16)
Lateralno desno	7 (4 – 8)
Medijalno desno	6 (4 – 8)
Ukupno lijevo plućno krilo	11 (6 – 14)
Lateralno lijevo	6 (4 – 7)
Medijalno lijevo	5 (3 – 7)

IQR: interkvartilni raspon

Vrijednost MBrixia zbroja značajno se razlikovala u ispitivanom uzorku s obzirom na težinu bolesti (Kruskal-Wallisov test, $P < 0,001$), kao i s obzirom na preživljenje (Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,001$) (Tablica 5.4., Tablica 5.5.A i B te Tablica 5.6.).

Tablica 5.4. Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u odnosu na oblik bolesti

	Medijan (IQR)			<i>P</i> *
	Blagi oblik (n = 7)	Srednje teški oblik (n = 22)	Teški/kritični oblik (n = 29)	
Ukupno	0 (0 – 1)	17 (15 – 18)	29 (26 – 33)	<0,001 [†]
Ukupno				
desno plućno krilo	2 (4 – 3)	9 (8 – 11)	16 (14 – 16)	<0,001 [†]
Lateralno desno	1 (0,25 – 2)	5 (4 – 6)	8 (8 – 8)	<0,001 [†]
Medijalno desno	1 (0,25 – 1)	4 (3 – 4)	8 (6 – 8)	<0,001 [†]
Ukupno				
lijevo plućno krilo	2 (1,25 – 3)	8 (6 – 9)	14 (12 – 16)	<0,001 [†]
Lateralno lijevo	2 (0 – 3)	5 (3 – 6)	7 (6 – 8)	<0,001 [†]
Medijalno lijevo	1 (0 – 1)	4 (3 – 4)	7 (6 – 8)	<0,001 [†]

IQR: interkvartilni raspon; *Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover); [†]na razini $P < 0,05$ značajno se razlikuju sve skupine međusobno

Tablica 5.5.A Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u odnosu na lokalizaciju prema težini kliničke slike

	Medijan (IQR)		Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	<i>P</i> *
	Desno plućno krilo	Lijevo plućno krilo		
Blagi oblik				
Ukupno	2 (1,4 – 3)	2 (1,25 – 3)	0 (-2 do 2)	> 0,99
Lateralno	1 (0,25 – 2)	2 (0 – 3)	0 (-2 do 2)	0,64
Medijalno	1 (0,25 – 1)	1 (0 – 1)	0 (-1 do 1)	0,62

Tablica 5.5.B Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u odnosu na lokalizaciju prema težini kliničke slike

	Medijan (IQR)		Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	P*
	Desno plućno krilo	Lijevo plućno krilo		
Srednje teški oblik				
Ukupno	9 (8 – 11)	8 (6 – 9)	-1 (-2 do 1)	0,32
Lateralno	5 (4 – 6)	5 (3 – 6)	0 (-1 do 1)	0,75
Medijalno	4 (3 – 4)	4 (3 – 4)	0 (-1 do 0)	0,13
Teški/kritični oblik				
Ukupno	16 (14 – 16)	14 (12 – 16)	-1 (-2 do 0)	0,07
Lateralno	8 (8 – 8)	7 (6 – 8)	-1 (-1 do 0)	0,04
Medijalno	8 (6 – 8)	7 (6 – 8)	0 (-1 do 0)	0,17

IQR: interkvartilni raspon; *Mann-Whitneyjev U test

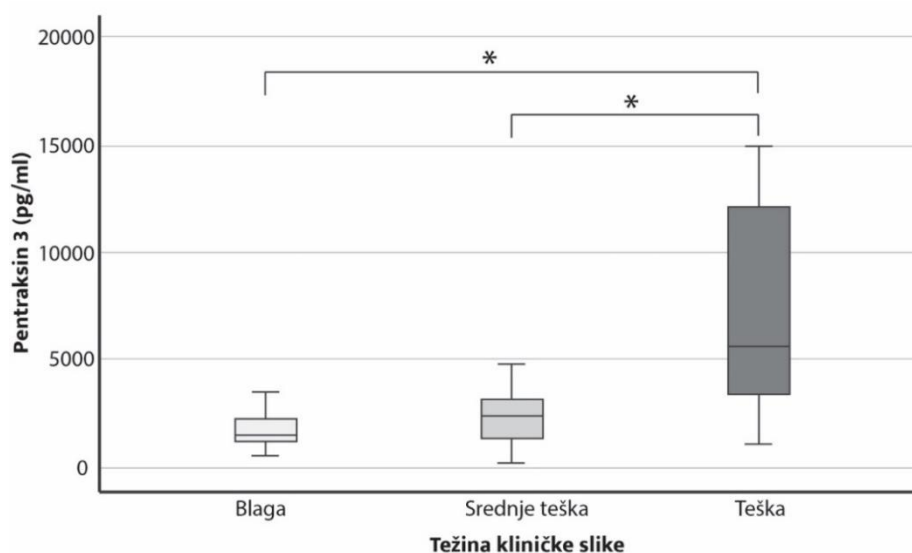
Tablica 5.6. Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u odnosu na ishod liječenja

	Medijan (IQR)		Razlika 95 % raspon pouzdanosti)	P*
	Oporavljeni (n = 31)	Preminuli (n = 27)		
MBrixia ukupno	7 (0 – 17)	28 (24 – 32)	18 (14 do 24)	< 0,001
Ukupno desno plućno krilo				
Lateralno desno	5 (2 – 7)	8 (6 – 8)	2 (1 do 4)	<0,001
Medijalno desno	4 (3 – 6)	8 (6 – 8)	3 (2 do 4)	<0,001
Ukupno lijevo plućno krilo				
Lateralno lijevo	4 (3 – 6)	7 (5 – 8)	3 (1 do 4)	<0,001
Medijalno lijevo	3 (2 – 5)	7 (5 – 8)	3 (2 do 4)	<0,001

IQR: interkvartilni raspon; *Mann-Whitneyjev U test

5.4. Serumske vrijednosti PTX3 i Gal-9

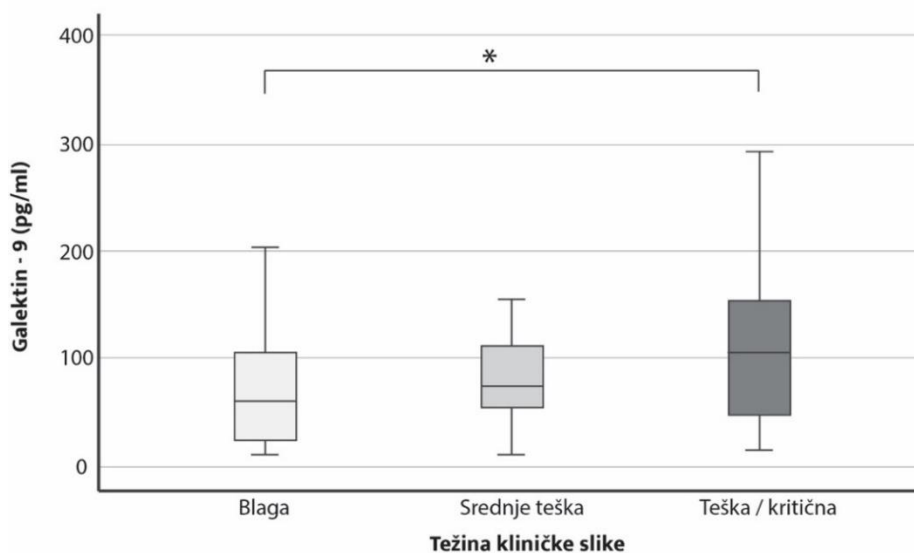
Svim bolesnicima uključenim u istraživanje određena je serumska vrijednost PTX3 i Gal-9. Medijan serumske vrijednosti PTX3 u ukupno ispitivanom uzorku bio je 2560,82 (1380,82 – 5111,18) pg/mL, a Gal-9 73,52 (42,32 – 145,34) pg/mL. S obzirom na težinu kliničke slike kod bolesnika s teškim/kritičnim oblikom bolesti izmjerene su značajno više razine PTX3 (Kruskal-Wallisov test, $P < 0,001$), medijan 5632,97 (3314,14 – 12463,43) pg/mL. Također, u istoj skupini bolesnika mjerene su i značajno više razine Gal-9 (Kruskal-Wallisov test, $P < 0,001$), medijan 105,10 (57,16 – 149,45) pg/mL. Serumske razine PTX3 i Gal-9 prikazane su na slikama (Slika 5.1. i Slika 5.2.).



Slika 5.1. Koncentracije pentraksina 3 s obzirom na težinu kliničke slike COVID-19

Legenda: *Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover), $P < 0,05$

(izvor slike: izradila autorica)

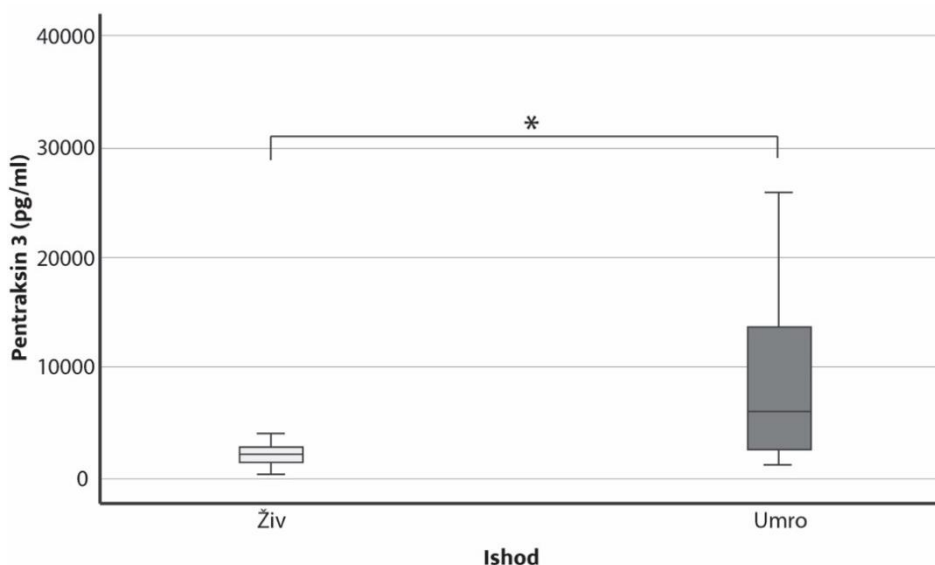


Slika 5.2. Koncentracije galektina-9 s obzirom na težinu kliničke slike COVID-19

Legenda: *Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover), $P < 0,05$

(izvor slike: izradila autorica)

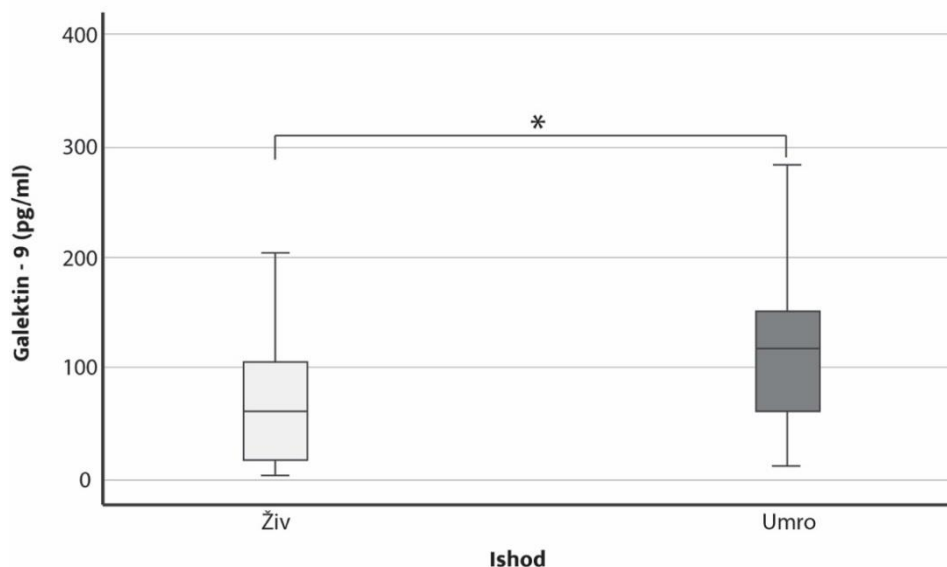
Kod bolesnika sa smrtnim ishodom značajno su više vrijednosti na MBrixia bodovnoj ljestvici (Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,001$) te serumskih vrijednosti PTX3 (Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,001$) i Gal-9 (Mann-Whitneyjev U test, $P = 0,02$) (Slika 5.3. i 5.4.).



Slika 5.3. Koncentracije pentraksina 3 s obzirom na ishod bolesti COVID-19

Legenda: *Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,05$

(izvor slike: izradila autorica)



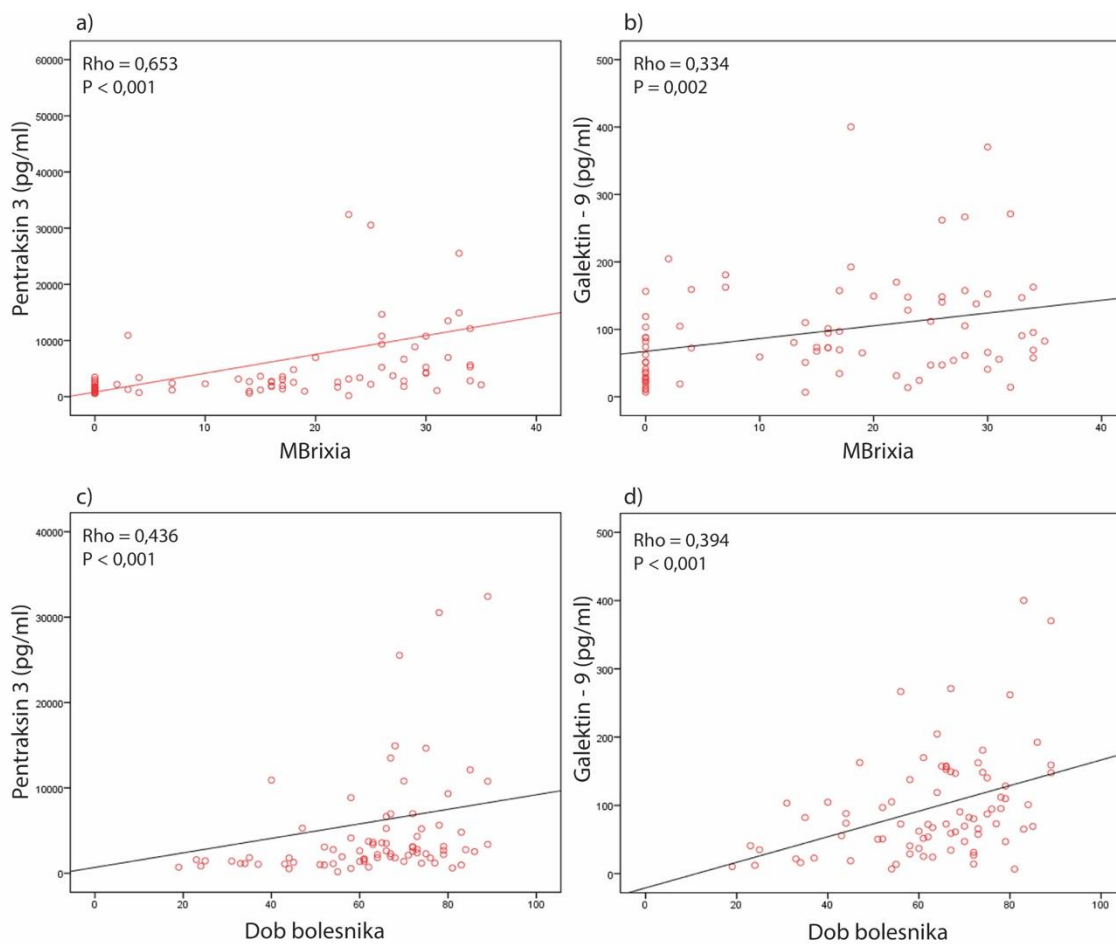
Slika 5.4. Koncentracije galektina-9 s obzirom na ishod bolesti COVID-19

Legenda: *Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,05$

(izvor slike: izradila autorica)

5.5. Povezanost rezultata na MBrixia bodovnoj ljestvici i serumskih vrijednosti PTX3 i Gal-9

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenila se povezanost serumskih vrijednosti PTX3 i Gal-9 s vrijednostima zbroja na MBrixia bodovnoj ljestvici i s dobi bolesnika. Uočava se da bolesnici s višim rezultatom na MBrixia ljestvici i stariji bolesnici imaju više vrijednosti PTX3 (Slika 5.5.a i 5.5.b). Također, i u slučaju vrijednosti Gal-9, uz viši zbroj na MBrixia ljestvici i veću dob, više su i vrijednosti Gal-9 (Slika 5.5.c i 5.5.d).



Slika 5.5. Povezanost rezultata na MBrixia bodovnoj ljestvici i pentraksina 3 (a), dobi bolesnika i pentraksina 3 (b), rezultata na MBrixia bodovnoj ljestvici i galektina-9 (c) te dobi bolesnika i galektina-9 (d). Legenda: Rho = Spearmanov koeficijent korelacije (izvor slike: izradila autorica)

Kako je dob značajno povezana s vrijednostima PTX3 i Gal-9, izračunala se i povezanost s MBrixia bodovnom ljestvicom uz korekciju za dob. Ako se ukloni utjecaj dobi, uočava se da je zbroj na MBrixia ljestvici u značajnoj i pozitivnoj vezi s PTX3 ($Rho = 0,274$, $P = 0,02$), no ne i s Gal-9 ($Rho = 0,137$, $P = 0,23$).

5.6. Analiza polimorfizma I/D u genu za ACE i njegova povezanost s težinom kliničke slike, serumskim vrijednostima PTX3, Gal-9 i s ishodom bolesti

Značajna je razlika u raspodjeli bolesnika prema učestalosti genotipa ACE I/D polimorfizma u odnosu na oblik bolesti (χ^2 test, $P = 0,03$) (Tablica 5.7.).

Tablica 5.7. Raspodjela i učestalost genotipova I/D polimorfizma u genu za ACE u tri podskupine prema obliku bolesti

	Genotip [n (%)] prema težini kliničke slike			<i>P</i> *
	Blagi oblik (n = 29)	Srednje teški oblik (n = 22)	Teški/kritični oblik (n = 29)	
D/D	3 (10)	6 (27)	12 (41)	0,03
I/D	11 (38)	9 (41)	12 (41)	
I/I	15 (52)	7 (32)	5 (18)	

* χ^2 test

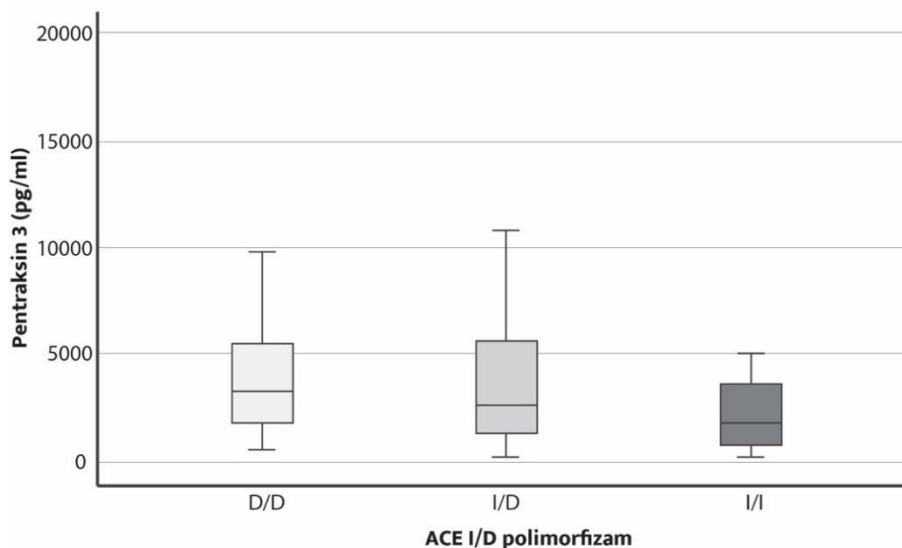
Uzimajući u obzir značajne razlike u distribuciji ACE I/D polimorfizma s obzirom na težinu COVID-19, omjer izgleda za razvoj teškog oblika bolesti COVID-19 veći je za 2,4 puta kod I/D genotipa, a 7,5 puta kod D/D genotipa (Tablica 5.8.)

Tablica 5.8. Omjer izgleda za razvoj teškog oblika bolesti COVID-19 s obzirom na ACE I/D polimorfizam

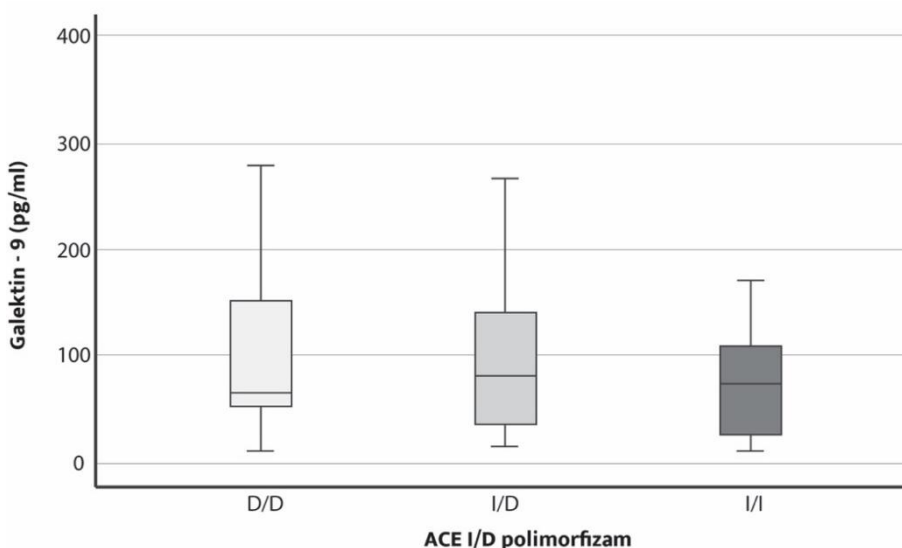
	Genotip [n (%)] prema težini kliničke slike			Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	<i>P</i> *
	Blagi oblik (n = 29)	Srednje teški/teški oblik (n = 51)			
ACE I/D polimorfizam	I/I	15 (52)	12 (24)	1,0	0,009
	I/D	11 (38)	21 (41)	2,4 (0,8 – 6,8)	
	D/D	3 (10)	18 (35)	7,5 (1,8 – 31,6)	

* χ^2 test; ACE: gen za angiotenzin-konvertirajući enzim

Nema značajnih razlika u serumskim koncentracijama PTX3 i Gal-9 ovisno o genotipu *ACE* I/D u ukupnom uzorku bolesnika (Slika 5.6. i Slika 5.7.). Također, nije bilo razlike u serumskim koncentracijama PTX3 i Gal-9 s obzirom na *ACE* I/D polimorfizam unutar pojedinih skupina prema težini kliničke slike.



Slika 5.6. Koncentracije pentraksina 3 s obzirom na *ACE* I/D polimorfizam
Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover)
(izvor slike: izradila autorica)



Slika 5.7. Koncentracije galektina-9 s obzirom na *ACE* I/D polimorfizam
Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover)
(izvor slike: izradila autorica)

S obzirom na *ACE* I/D polimorfizam omjer izgleda za razvoj smrtnog ishoda veći je za 3,5 puta kod I/D genotipa, a za 6,5 puta kod D/D genotipa (Tablica 5.9.).

Tablica 5.9. Omjer izgleda za smrtni ishod bolesti COVID-19 s obzirom na *ACE* I/D polimorfizam

		Genotip [n (%)] prema ishodu		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P*
		Oporavljeni	Preminuli		
<i>ACE</i> I/D polimorfizam	I/I	23 (43)	4 (15)	1,0	
	I/D	20 (38)	12 (44)	3,5 (0,9 – 12,4)	0,02
	D/D	10 (19)	11 (41)	6,3 (1,6 – 24,8)	

* χ^2 test; *ACE*: gen za angiotenzin-konvertirajući enzim

5.7. Analiza predviđanja težine kliničke slike i ishoda liječenja

Bivarijatnom logističkom regresijom ispitani su značajni prediktori u predviđanju teškog/kritičnog oblika bolesti. U bivarijatnoj logističkoj regresiji uočava se da bolesnici s hipertenzijom imaju 16,4 puta veću vjerojatnost za razvoj teškog/kritičnog oblika bolesti. S obzirom na genotip, bolesnici s D/D genotipom imaju 3,9 puta veću vjerojatnost za teži oblik bolesti, dok I/I genotip štiti od razvoja teškog/kritičnog oblika bolesti. Ostali značajni prediktori prikazani su u Tablici 5.10.

Multivarijatnom logističkom regresijom (*stepwise*) uočava se da postoji značajan model u predikciji težeg oblika bolesti, a to su adipozitet (OR = 6,6), koncentracija PTX3 (OR = 1,7) i *ACE* D/D genotip (OR = 9,58). Model je u cijelosti značajan (χ^2 test = 59,736 df=5, P < 0,001) i objašnjava od 52,6 % (po Cox&Snell) do 72,1 % (po Negelkerke) nastanak težeg oblika bolesti te točno klasificira 87,5 % slučajeva (Tablica 5.10.).

Tablica 5.10. Predviđanje vjerojatnosti teškog/kritičkog oblika bolesti (bivarijatna i multivarijatna logistička regresija)

	β	Wald	P	Omjer izgleda (OR)	95 % raspon pouzdanosti
Bivarijatna regresija					
Spol (Ž)	-0,93	3,78	0,05	0,39	0,15 do 1,01
Dob	0,05	6,43	0,01	1,05	1,01 do 1,1
Hiperlipidemija	0,89	2,88	0,09	2,45	0,86 do 7,03
Adipozitet	1,33	6,47	0,01	3,79	1,36 do 10,58
Šećerna bolest	1,87	9,62	0,002	6,49	1,99 do 21,18
Arterijska hipertenzija	2,79	12,71	< 0,001	16,4	3,53 do 76,55
Pentraksin 3 (ng)	0,57	12,93	< 0,001	1,77	1,29 do 2,42
Galektin-9 (pg)	0,007	4,01	0,04	1,01	1,00 do 1,01
ACE I/I	-1,29	5,19	0,02	0,27	0,09 do 0,83
ACE D/D	1,19	5,12	0,02	3,29	1,17 do 9,24
ACE I/D	0,09	0,04	0,84	1,09	0,43 do 2,76
Multivarijatna regresija					
Adipozitet	1,89	4,66	0,03	6,6	1,19 do 37,01
Šećerna bolest	1,59	2,97	0,08	4,93	0,80 do 30,28
Arterijska hipertenzija	1,88	3,54	0,06	6,57	0,92 do 46,72
Pentraksin 3 (ng)	0,53	12,04	< 0,001	1,7	1,26 do 2,30
ACE D/D	2,26	5,72	0,02	9,58	1,51 do 61,00
Konstanta	-6,04	15,11	< 0,001		

β – koeficijent regresije; ACE: gen za angiotenzin-konvertirajući enzim

Bivarijatnom logističkom regresijom ispitani su značajni prediktori u predviđanju smrtnog ishoda. Najznačajniji klinički prediktor smrtnog ishoda bila je arterijska hipertenzija (OR = 14,0), šećerna bolest (OR = 3,87) i ACE D/D polimorfizam (OR = 2,95). Ostali prediktori prikazani su u Tablici 5.11.

Multivarijatnom logističkom regresijom (*stepwise*) uočava se da postoji značajan model u predikciji smrtnog ishoda, a to su arterijska hipertenzija (OR = 5,85) te više vrijednosti PTX3 (OR = 1,46). Model je u cijelosti značajan (χ^2 test = 42,74, df = 3, P < 0,001) i objašnjava od 41,4 % (po Cox&Snell) do 57,4 % (po Nagelkerke) nastanak smrtnog ishoda te točno klasificira 85 % slučajeva (Tablica 5.11.).

Tablica 5.11. Predviđanje vjerojatnosti nastanka negativnog ishoda liječenja (bivarijatna i multivarijatna logistička regresija)

	β	Wald	P	Omjer izgleda (OR)	95 % raspon pouzdanosti
Bivarijatna regresija					
Spol (Ž)	-1,19	5,77	0,02	0,30	0,11 do 0,80
Dob	0,06	8,48	0,004	1,06	1,02 do 1,10
Hiperlipidemija	0,18	0,11	0,74	1,20	0,41 do 3,50
Adipozitet	0,70	1,83	0,18	2,01	0,73 do 5,53
Šećerna bolest	1,35	5,65	0,02	3,87	1,27 do 11,78
Arterijska hipertenzija	2,64	11,3	0,001	14,0	3,01 do 65,2
Pentraksin 3 (ng)	0,45	12,9	<0,001	1,57	1,22 do 2,01
Galektin-9 (pg)	0,009	6,63	0,01	1,01	1,002 do 1,02
ACE II	-1,48	5,94	0,01	0,23	0,07 do 0,75
ACE D/D	1,08	4,24	0,04	2,95	1,05 do 8,29
ACE I/D	0,28	0,33	0,56	1,32	0,51 do 3,38
Multivarijatna regresija					
Hipertenzija	1,76	4,12	0,04	5,85	1,06 do 32,22
Pentraksin 3 (ng)	0,37	10,54	0,001	1,46	1,16 do 1,82
ACE D/D	1,18	3,05	0,08	3,27	0,86 do 12,34
Konstanta	-3,96	18,40	<0,001		

β – koeficijent regresije; ACE: gen za angiotenzin-konvertirajući enzim

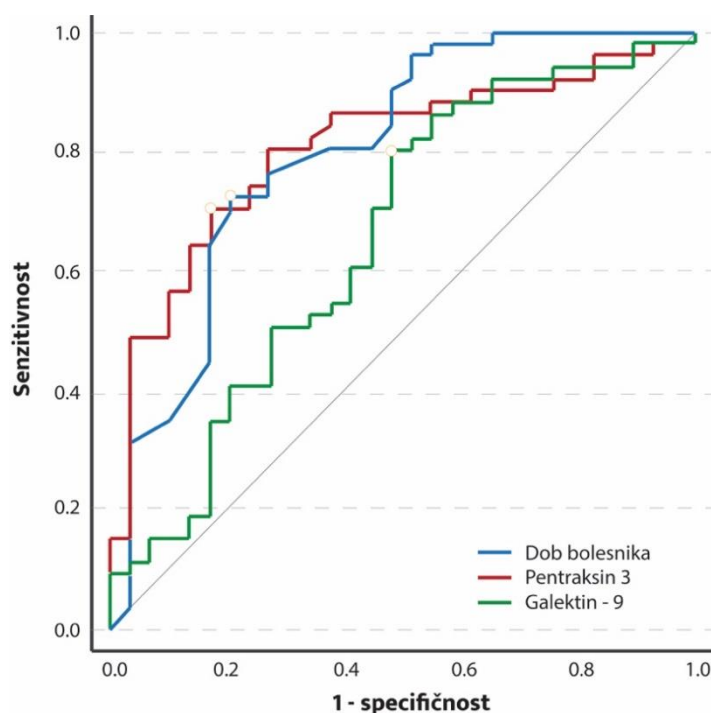
Da bi se procijenila dijagnostička vrijednost pojedinih varijabla koje su logističkom regresijom dobivene da značajno doprinose predviđanju srednje teškog i teškog oblika bolesti ili negativnog ishoda liječenja (smrti), koristila se metoda izračuna ROC krivulje kojom se stupnjevito mijenjaju vrijednosti koje razlučuju bolesnika s težim oblikom bolesti (u toj su skupini bolesnici sa srednje teškim i teškim oblikom bolesti) i s blagim oblikom bolesti. Mijenjana je točka razlučivanja za pojedinu skupinu ispitanika (engl. *Cut-off point*) kako bi se stvaranjem ROC krivulje moglo objektivno zaključiti koja vrijednost najbolje razlučuje uspoređene skupine.

S obzirom na teži oblik bolesti, u ovom uzorku ispitanika PTX3 nešto je bolji (AUC = 0,804, Youden index = 0,534) dijagnostički pokazatelj srednje teškog i teškog oblika bolesti (senzitivnost = 71 %, specifičnost = 83 %, $P < 0,001$), s *cut-off* vrijednostima višim od 2394,4 (Tablica 5.12. i Slika 5.8.).

Tablica 5.12. Vrijednosti ROC krivulje promatranih varijabla s obzirom na težu kliničku sliku (srednje teški i teški oblik bolesti)

	AUC	95 % CI	Senzitivnost	Specifičnost	Točka razlučivanja	Youden index	<i>P</i>
Dob	0,801	0,696 0,882	73	79	> 64	0,519	<0,001
Pentraksin 3 (PTX3)	0,804	0,700 0,885	71	83	> 2394,4	0,534	<0,001
Galektin-9	0,657	0,542 0,759	80	52	> 51,7	0,321	0,02

AUC – površina ispod krivulje; CI – raspon pouzdanosti



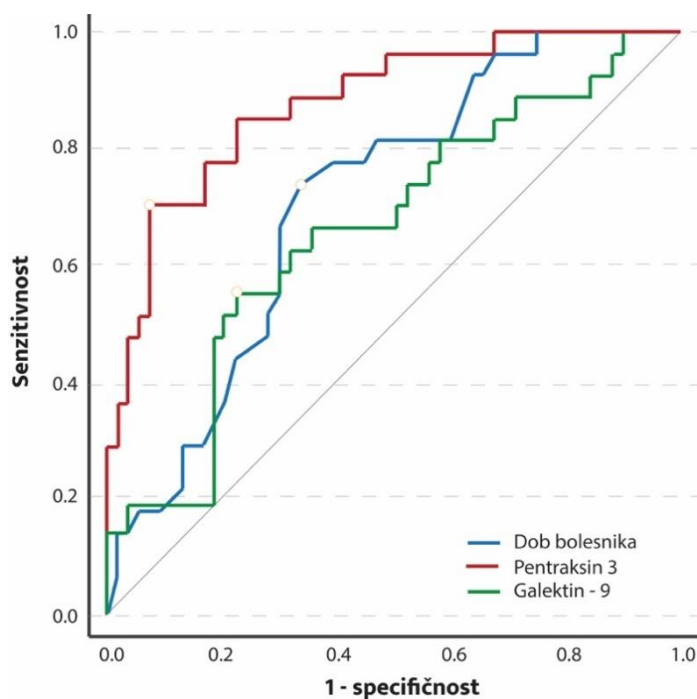
Slika 5.8. Dob ispitanika, pentraksin 3 i galektin-9 kao dijagnostički pokazatelji nastanka srednje teškog i teškog oblika bolesti (ROC analiza)

(izvor slike: izradila autorica)

Na ovom uzorku ispitanika sve tri varijable značajni su prediktori smrtnog ishoda, no najbolji je prediktor serumska razina PTX3 (AUC = 0,878, Youden index = 0,628) (senzitivnost = 70 %, specifičnost = 92 %, $P < 0,001$) s *cut-off* vrijednostima višim od 3730,4 (Tablica 5.13. i Slika 5.9.).

Tablica 5.13. Vrijednosti ROC krivulje promatranih varijabla s obzirom na ishod liječenja

	AUC	95 % CI	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Točka razlučivanja	Youden index	<i>P</i>
Dob	0,712	0,600 – 0,8098	74	66	> 66	0,401	< 0,001
Pentraksin 3 (PTX3)	0,878	0,786 – 0,941	70	92	> 3730,4	0,628	< 0,001
Galektin-9	0,660	0,545 – 0,762	56	77	> 104,7	0,329	0,01



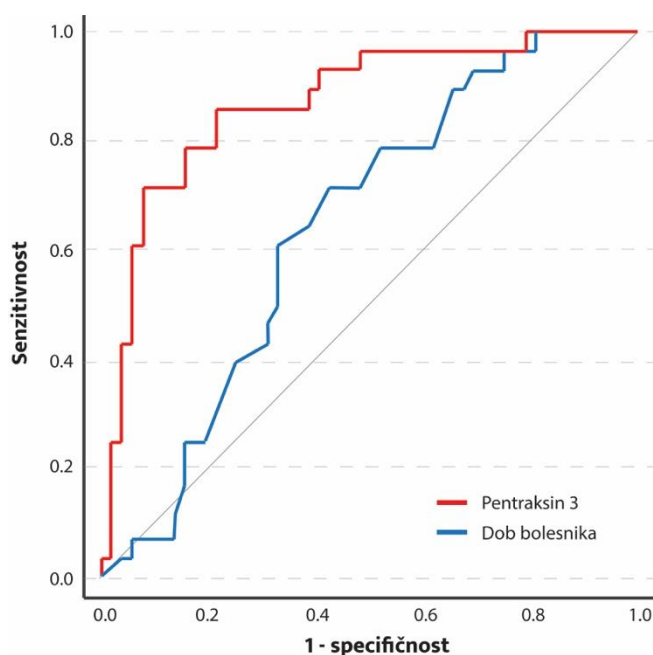
Slika 5.9. Dob ispitanika, pentraksin 3 i galektin-9 kao dijagnostički pokazatelji smrtnog ishoda (ROC analiza)
(izvor slike: izradila autorica)

5.8. Analiza predviđanja težine plućnih infiltrata

Zbroj na MBrixia bodovnoj ljestvici (AUC = 0,998 (0,994 – 1,000)) značajan je dijagnostički pokazatelj u dijagnosticiranju teškog oblika COVID-19 bolesti (senzitivnost = 100 %, specifičnost = 96,6 %, $P < 0,001$) s *cut-off* vrijednostima ukupnog zbroja $\geq 23,5$.

Serumske vrijednosti PTX3 bile su značajno više u skupini bolesnika s MBrixia zbrojem višim od 23,5 u usporedbi s onima nižeg MBrixia zbroja 5456,2 (3193,6 – 11789) pg/mL prema 1796,2 (1144,8 – 2665,2) pg/mL, $P < 0,001$.

U ovom uzorku bolesnika, s obzirom na težinu plućnih infiltrata prema MBrixia bodovnoj ljestvici, PTX3 bolji je dijagnostički pokazatelj (AUC = 0,871 (0,787 – 0,954)), točniji je od dobi u predviđanju težine plućnih infiltrata (senzitivnost = 85,7 %, specifičnost = 78,8 %, $P < 0,001$), s *cut-off* vrijednostima ≥ 2765 pg/mL u predviđanju visokog MBrixia zbroja (Slika 5.10. i Tablica 5.14.).



Slika 5.10. Pentraksin 3 i dob kao pokazatelji smrtnog ishoda (ROC analiza)
(izvor slike: izradila autorica)

Tablica 5.14. Vrijednosti ROC krivulje za PTX3 i dob u predviđanju težine plućnih infiltrata

	AUC (95 % CI)	Senzitivnost	Specifičnost	Točka razlučivanja	Youden	P
Dob	0,647 (0,526 – 0,767)	71,4 %	57,7 %	≥ 65,5	0,291	0,02
PTX3	0,871 (0,787 – 0,954)	85,7 %	78,8 %	≥ 2765 pg/mL	0,645	<0,001

AUC – površina ispod krivulje; CI – raspon pouzdanosti; PTX3: pentraksin 3

Univarijatnom regresijskom analizom arterijska hipertenzija (OR = 15,2), šećerna bolest (OR = 7,05) i adipozitet (OR = 4,14) najznačajniji su prediktori težine plućnih infiltrata, zajedno s D/D genotipom *ACE* I/D polimorfizma (OR = 3,58) i serumskim vrijednostima PTX3 (OR 1,26). Multivarijatnom regresijskom analizom samo arterijska hipertenzija (OR = 7,71) i PTX3 (OR = 1,19) ostaju najznačajniji prediktori težine plućnih infiltrata. Model je u cijelosti značajan (χ^2 test = 46,707 df = 6, P < 0,001) i objašnjava od 44,2 % (po Cox&Snell) do 60,9 % (po Nagelkerke) nastanak težeg oblika bolesti te točno klasificira 85 % slučajeva (Tablica 5.15.).

Tablica 5.15. Predviđanje vjerojatnosti nastanka teških plućnih infiltrata

	β	Wald	P	OR	95 % CI
Univarijatna regresija					
Spol (Ž)	-0,83	2,96	0,08	0,44	0,17 – 1,12
Dob	0,04	4,97	0,03	1,04	1,00 – 1,08
Dislipidemija	0,97	3,29	0,07	2,65	0,92 – 7,62
Adipozitet	1,42	7,26	0,007	4,14	1,47 – 11,63
Šećerna bolest	1,95	10,39	0,001	7,05	2,15 – 23,12
Arterijska hipertenzija	2,72	12,01	<0,001	15,2	3,26 – 70,62
PTX3 (ng)	0,228	8,61	0,003	1,26	1,08 – 1,46
Gal-9 (pg)	0,006	3,63	0,06	1,01	1,00 – 1,01
ACE D/D	1,28	5,81	0,02	3,58	1,27 – 10,11
ACE I/D	0,18	0,15	0,70	1,20	0,47 – 3,05
ACE I/I	-1,56	6,58	0,01	0,21	0,06 – 0,69
Multivarijatna regresija					
Adipozitet	1,31	2,99	0,08	3,69	0,84 – 16,21
Šećerna bolest	1,51	3,20	0,07	4,52	0,86 – 23,64
Arterijska hipertenzija	2,01	4,62	0,03	7,71	1,20 – 50,16
PTX3 (ng)	0,18	6,19	0,01	1,19	1,04 – 1,38
ACE D/D	1,28	2,55	0,11	3,61	0,75 – 17,41
ACE I/I	-1,65	2,61	0,11	0,19	0,02 – 1,42
Konstanta	-3,91	11,57	<0,001		

β – koeficijent regresije; PTX3: pentraksin 3; ACE: gen za angiotenzin-konvertirajući enzim

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju proučavana je povezanost vrijednosti MBrixia bodovne ljestvice plućnih infiltrata na radiografskim snimkama, genskog polimorfizma *ACE I/D* i serumske vrijednosti PTX3 i Gal-9 u procjeni težine i ishoda bolesti kod bolesnika oboljelih od COVID-19 bolesti.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su bolesnici sa srednje teškim i teškim/kritičnim oblikom bolesti bili prosječno starije životne dobi te da su imali različite komorbiditete, kao što su adipoznost, šećerna bolest i/ili arterijska hipertenzija. Zahvaćenost plućnog parenhima izražena MBrixia bodovnom ljestvicom značajno se razlikovala u ispitivanom uzorku te pozitivno korelira s težinom bolesti i negativnim ishodom liječenja.

Kod bolesnika s teškim/kritičnim oblikom bolesti izmjerene su značajno više serumske vrijednosti PTX3 u odnosu na ispitanike sa srednje teškim i blagim oblikom bolesti, dok su serumske vrijednosti Gal-9 bile značajno više samo u odnosu na blagi oblik bolesti. Osim navedenog, oba parametra pokazala su pozitivnu korelaciju s dobi bolesnika. Nakon dodatnih analiza, koje su uključivale korekciju za dob, zadržane su samo značajne razlike za PTX3, što ukazuje na povezanost serumskih vrijednosti PTX3 s težinom kliničke slike. Također, ustanovljena je značajna povezanost PTX3 i objektivnog pokazatelja težine zahvaćenosti plućnog parenhima prema MBrixia bodovnoj ljestvici.

Od svih analiziranih parametara, dob i arterijska hipertenzija pokazali su se kao najbolji pokazatelji vjerojatnosti težeg oblika bolesti, dok su se ARDS i PTX3 pokazali značajni u predviđanju smrtnog ishoda.

6.1. Povezanost težine bolesti s obilježjima bolesnika

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su bolesnici sa srednje teškim i teškim/kritičnim oblikom bolesti bili prosječno starije životne dobi u odnosu na bolesnike koji su imali blagi oblik bolesti. Osim toga, većina bolesnika uključenih u istraživanje imala je komorbiditete. Bolesnici s teškim/kritičnim oblikom bolesti češće su bili adipozni, imali šećernu bolest i/ili arterijsku hipertenziju.

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima ostalih studija koje pokazuju da starije osobe i muški spol imaju veći rizik za lošiji ishod bolesti. Neke studije ukazuju na to da se ekspresija ACE2 receptora smanjuje sa starenjem, dok druge studije pokazuju različite rezultate ovisno o tkivu i organu koji se ispituje. Xudong i skupina autora 2006. godine objavili su rezultate istraživanja u kojima podupiru teoriju da ekspresija ACE2 receptora u plućima štakora opada s

godinama te da je izraženija kod muškog spola (141). Smanjenje ekspresije ACE2 sa starenjem ima značajan utjecaj na zdravlje pluća povećavajući rizik osjetljivosti na respiratorne infekcije, kronične plućne bolesti i fibrozu. Starenje je istaknuti čimbenik rizika za razvoj teškog oblika bolesti i lošeg ishoda COVID-19. Pretpostavljamo da je starenje povezano s opadanjem i deregulacijom imunološke funkcije, što u kombinaciji s upalnim odgovorom doprinosi povećanoj ranjivosti i lošijem ishodu COVID-19 kod starijih osoba, što je u skladu s rezultatima ove studije (142). Nadalje, podmakla dob (od oko 60 godina nadalje), čak i kod starijih osoba bez komorbiditeta, jak je i neovisan čimbenik rizika za izraženije plućne manifestacije, potrebu za mehaničkom ventilacijom i smrtni ishod nakon infekcije SARS-CoV-2. Suprotno istraživanju koje su proveli Xudong i skupina autora, Clarfield i suradnici utvrdili su kako su kod starije populacije, uz povećani rizik od obolijevanja od COVID-19, češći atipični i teški oblici te lošiji ishod bolesti, što su pokazali i rezultati ovog istraživanja. Prema njihovom istraživanju pretpostavlja se da je starenje povezano s porastom ekspresije ACE2 receptora na koji se veže šiljasti protein SARS-CoV-2, što omogućuje ulazak virusa u stanicu domaćina i doprinosi težim oblicima bolesti (143).

Razlika u težini bolesti COVID-19 između muških i ženskih bolesnika može se pripisati razlikama u spolnim hormonima koji sudjeluju u upalnim procesima, razinama ekspresije ACE2 i TMPRSS2 te načinu života (38).

Komorbiditeti povezani sa starenjem, osobito kardiovaskularne bolesti, arterijska hipertenzija i šećerna bolest, također izlažu starije osobe povećanom riziku od komplikacija i lošeg ishoda bolesti, što je pokazalo i ovo istraživanje (144).

Osobe mlađe životne dobi zaražene SARS-CoV-2 imaju blaži oblik bolesti zbog moguće aktivacije učinkovitog adaptivnog imunološkog odgovora. Cunha i suradnici smatraju da se stanice koje izlučuju antitijela i folikularne pomoćne T-stanice učinkovito aktiviraju kod mladih bolesnika zbog čega imaju povoljniju prognozu. Nasuprot tome, starije osobe sklonije su nekontroliranoj aktivaciji urođenog imunološkog odgovora koji dovodi do sindroma otpuštanja citokina i oštećenja tkiva, što može objasniti zašto starije osobe ne kontroliraju replikaciju virusa i potencijalne posljedice izazvane citokinskom olujom, ozljedom endotela krvnih žila i višeorganskim zahvaćanjem (145). Hiperinflamatorni odgovor uobičajena je značajka najtežih slučajeva COVID-19 zbog čega se dovodi u vezu s imunološkim starenjem kod starijih osoba (engl. *Immunosenescence*) i osoba s različitim komorbiditetima (146).

Istraživanje Gebharda i skupine autora pokazalo je kako je u Kini COVID-19 smrtonosnija bolest za zaražene muškarce nego za žene, sa stopom smrtnosti od 2,8 % kod kineskih muškaraca naprema 1,7 % kod žena. Nadalje, podatci o COVID-19 raščlanjeni prema spolu u

nekoliko europskih zemalja pokazuju sličan broj slučajeva između spolova, ali teže ishode kod starijih muškaraca. Smrtnost je najveća kod muškaraca s već postojećim kardiovaskularnim bolestima. Mehanizmi koji objašnjavaju smanjenu stopu smrtnosti kod žena trenutno su nejasni, ali mogu ponuditi potencijal za razvoj novih alata za stratifikaciju rizika i terapijskih opcija za žene i muškarce. Ovo zapažanje dodatno podupire ideju kako dob i ranjivost specifična za spol i/ili biološke varijable međusobno djeluju na težinu i ishod bolesti COVID-19, što je pokazalo i ovo istraživanje (39).

Većina objavljenih studija pokazuju kako je oko 70 % bolesnika primljenih u JIL imalo različite komorbiditete (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, adipoznost i druge kronične bolesti), što ukazuje na njihov veliki utjecaj na prognozu i lošiji ishod, kako je pokazalo i ovo istraživanje (147).

Bolesnici s teškim/kritičnim oblikom bolesti u ovom istraživanju značajno su češće bili adipozni, imali šećernu bolest ili arterijsku hipertenziju. Također je utvrđeno da je prisutnost komorbiditeta, kao što je arterijska hipertenzija i/ili šećerna bolest i/ili pretilost, značajno povećala rizik za nastanak težeg oblika bolesti.

Od početka pandemije COVID-19 vodi se velika rasprava o tome utječe li hipertenzija, kao već postojeća bolest, na klinički tijek infekcije virusom SARS-CoV-2. Rane studije pokazale su da se arterijska hipertenzija često opažala kod bolesnika hospitaliziranih s COVID-19. Osim toga, drugi čimbenici rizika za teški oblik bolesti COVID-19, kao što su pretilost, kronična bolest bubrega i kardiovaskularne bolesti, često se uočavaju u bolesnika s hipertenzijom, što dodatno utječe na loš ishod (148). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima ostalih istraživanja koja pokazuju da je arterijska hipertenzija najučestaliji komorbiditet u bolesnika oboljelih od COVID-19 (149, 150).

U liječenju bolesnika s arterijskom hipertenzijom jedna od vrsta antihipertenzivnih lijekova su i modulatori RAAS-a, poput inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACEI) i blokatora angiotenzinskih receptora (ARB). Na početku pandemije COVID-19 postojala je zabrinutost da bi ti lijekovi mogli povećati ekspresiju ACE2 receptora, odnosno infektivnosti među bolesnicima liječenim RAAS modulatorima. Razmotrene su različite kliničke studije provedene korištenjem RAAS modulatora kod bolesnika s COVID-19. Prema učinjenim studijama trenutačni dokazi nisu pokazali povećani rizik od infekcije COVID-19 među hipertenzivnim bolesnicima koji uzimaju ACEI/ARB u usporedbi s drugim antihipertenzivnim lijekovima. Nekoliko studija pokazalo je da nema štetnih učinaka RAAS modulatora na kliničku sliku, boravak u bolnici ili u JIL-u, mehaničku ventilaciju i smrtnost (151).

Prevalencija šećerne bolesti kod bolesnika s COVID-19 varirala je među oboljelima diljem svijeta. Većina dostupnih dokaza ukazuje na značajno povećanje ozbiljnosti i smrtnosti od COVID-19 kod bolesnika sa šećernom bolesti, posebno u kombinaciji s lošom kontrolom glikemije. Novonastala hiperglikemija i novonastala šećerna bolest sve više se prepoznaju u kontekstu COVID-19 i povezuju s lošijim ishodom bolesti (152, 153). Kao objašnjenje, smatra se da SARS-CoV-2 inficira gušteraču preko receptora ACE2 koji je u usporedbi s drugim organima u gušterači značajno izražen. Zbog toga može doći do oštećenja gušterače i kao posljedica toga do poremećaja u lučenju inzulina i razvoja hiperglikemije kod osoba koje nemaju šećernu bolest (154, 155). Šećerna bolest pokazala se kao čimbenik rizika za razvoj teških i kritičnih oblika COVID-19, koji zahtijevaju prijem u JIL i/ili primjenu invazivne mehaničke ventilacije, s visokim stopama smrtnosti (156, 157).

Masno tkivo predstavlja izvor citokina, koji pospješuju razvoj težih oblika bolesti, što dodatno otežava njegu adipoznih bolesnika koja je otežana zbog prekomjerne težine i poteškoća s mehaničkom ventilacijom (158). Nadalje, adipozitet, šećerna bolest i COVID-19 pokazuju međusobnu interakciju. Njihovom interakcijom nastale metaboličke promjene mogu dovesti do dugotrajnih učinaka i komplikacija u liječenju, kao i do pogoršanja težine bolesti. Višak slobodnih masnih kiselina izaziva lipotoksičnost, uzrokujući oštećenje organa kao što su jetra i gušterača. To dovodi do oštećenja inzulinskih receptora pridonoseći inzulinskoj rezistenciji, hipertrigliceridemiji i progresiji u metabolički sindrom. Nadalje, adipoznost stvara proinflamatorno stanje s povećanom ekspresijom citokina, kao što su tumorski faktor nekroze alfa (TNF- α) i interleukin-6 (IL-6), kao i faktora akutne faze, poput CRP-a i amiloidnog antigena (159). Ti citokini uzrokuju oštećenje vaskularnog endotela, ubrzavaju razvoj ili pogoršavaju arterijsku hipertenziju preko aktivacije RAAS sustava, uzrokuju aterosklerozu, pa čak i trombozu (160).

Nakeshbandi i skupina autora u svojem istraživanju opisali su povezanost između adipoznosti i invazivne mehaničke ventilacije. Prema njihovom istraživanju višak masnog tkiva u gornjim dišnim putevima dovodi do opstrukcije dišnih puteva i bržeg napredovanja respiratorne insuficijencije do hipoksije. Adipozni bolesnici također imaju povećan intraabdominalni tlak i restriktivnu stijenknu prsnog koša, što rezultira smanjenim forsiranim ekspiracijskim volumenom i forsiranim vitalnim kapacitetom, kao i smanjenom kontraktilnošću dijafragme. Navedeno pridonosi disfunkciji pluća i posljedičnoj desaturaciji koja dovodi do potrebe za mehaničkom ventilacijom. To je u skladu i s rezultatima ovog istraživanja koje je pokazalo da su bolesnici s teškim/kritičnim oblikom bolesti češće bili adipozni, imali šećernu i/ili arterijsku hipertenziju (161, 162).

6.2. Kvantifikacija plućnih infiltrata putem MBrixia bodovne ljestvice

U inicijalnoj dijagnostici bolesnika oboljelih od COVID-19, uz RT-PCR test, primarno se odrađivala sumacijska radiografska snimka pluća koja je bila ključni alat u procjeni težine COVID-19 koja se zbog svoje dostupnosti, brze izvedivosti, posebno u hitnim jedinicama, mogla izvršiti uz krevet bolesnika. Osnovna obilježja COVID-19 na učinjenim radiografskim snimkama pluća uključuju unilateralne ili bilateralne konsolidacije i/ili naglašen intersticijski uzorak. U skladu s tim, bitnu ulogu u postavljanju radiološke dijagnoze imaju sustavi bodovanja uočenih plućnih promjena. Brixia rezultat pokazao se kao koristan, jasan i jednostavan alat za plućne promjene kod COVID-19, što pomaže kliničarima da dobiju relevantne podatke iz radiografskih snimki pluća. Utvrđeno je da su više vrijednosti Brixia bodovnog sustava povezane s potrebama za mehaničkom ventilacijom i smrtnim ishodom (163).

Ovim istraživanjem ispitalo se može li modificirani MBrixia sustav bodovanja plućnih promjena pomoći u određivanju stadija bolesti, odnosno određivanju ozbiljnosti napredovanja bolesti kod bolesnika s COVID-19. Prema MBrixia bodovnoj ljestvici utvrdilo se da je u srednje teškom obliku bolesti nađena značajno veća razina zahvaćenosti svih dijelova pluća u odnosu na blagi oblik bolesti, a u skladu s tim infiltrati su češće bili u lateralnim dijelovima plućnih režnjeva. Kako je bilo i za očekivati, učestalost i težina zahvaćenosti svih dijelova plućnih režnjeva u kritičnoj bolesti bila je značajno viša u usporedbi sa srednje teškim oblikom bolesti.

Prema raspodjeli plućnih infiltrata, utvrdilo se da je desno plućno krilo bilo češće zahvaćeno izraženijim promjenama nego lijevo, što je u skladu sa studijom Wasima i skupine autora koji sugeriraju anatomiju kao podlogu navedenih promjena. Fiziološka anatomija desnog primarnog bronha razlikuje se od lijevog, stoga sve što se aspirira ima vrlo veliku vjerojatnost da će ući u desni primarni bronh. Desni primarni bronh većeg je promjera, dakle olakšava ulazak bilo koje fizičke tvari veće veličine ili veće količine u usporedbi s lijevim primarnim bronhom. Također, desni primarni bronh relativno je okomitiji od regije karine traheje. Krećući se naprijed, desni primarni bronh dijeli se na tri lobarna bronha, koji se usmjeravaju prema gornjem, srednjem i donjem režnju, a donji lobarni bronh opet je okomitiji, strmiji i usmjeren ravno prema dolje u najniži režanj pluća. U navedenoj studiji utvrđeno je da je većina bolesnika koji su došli u bolnicu unutar nekoliko dana od infekcije, pokazivala infiltrate u desnoj perihilarnoj regiji te su navedene promjene nazvali infiltracija desnog bronha (engl. *Right bronchial infiltration* – RBI), a kako je bolest napredovala, infiltrati vidljivi na radiografskim snimkama pluća pokazali su progresiju slike u obliku masivnih infiltrata koji su uzrokovali konsolidirajuću pneumoniju (164).

Istraživanje je pokazalo da su češće bili zahvaćeni lateralni dijelovi plućnog parenhima, što je u skladu s istraživanjima drugih skupina autora (165).

Viši rezultati radiografskih snimaka pluća prema MBrixia bodovnoj ljestvici povezani su s potrebom za mehaničkom ventilacijom i nepovoljnim ishodom, odnosno smrću. U skladu s tim, ovaj alat mogao bi biti vrijedan u predviđanju potrebe za mehaničkom ventilacijom (104). Modificirani sustav bodovanja može pomoći u određivanju ozbiljnosti napredovanja bolesti kod bolesnika s COVID-19, posebno u područjima s nedostatkom ustanova i stručnjaka (166).

Modificirana definicija anatomije i patologije MBrixia rezultata i njegov širi raspon bodovanja u usporedbi s Brixia rezultatom (0 – 36 bodova u odnosu na 0 – 18 bodova), omogućili su detaljniju prostornu kvantifikaciju pneumonije uzrokovane COVID-19. To je bitno jer se pneumonija uzrokovana COVID-19 može manifestirati s nekoliko radioloških nalaza različitog stupnja, a svi su u korelaciji s kliničkim ishodom (167).

Rezultati ovog istraživanja pružaju bitne informacije o čimbenicima koji utječu na MBrixia rezultat i njegovu korisnost u predviđanju najnepovoljnijeg ishoda, odnosno smrti. Ti nalazi imaju kliničku važnost, posebno u okolnostima epidemije. Nadalje, radiografsko oslikavanje široko je dostupno, brzo i jeftino što omogućava brzu dijagnostiku kod bolesnika s teškom kliničkom slikom, posebice kod bolesnika koji su hospitalizirani u JIL-u. Osim toga, primjena MBrixia bodovnog sustava jasna je i jednostavna te koristi kliničarima u svakodnevnoj praksi (163).

6.3. Serumske vrijednosti PTX3 i Gal-9

Vrijednosti PTX3 značajno su rasle s težinom bolesti, a pri tome su u srednje teškom obliku u prosjeku bile 1,7 puta veće u odnosu na blagi oblik bolesti. Kod kritičnog oblika bolesti zapaža se daljnji porast PTX3 te su njegove vrijednosti u prosjeku bile 3,9 puta više nego kod blagog oblika bolesti te 2,3 puta više u odnosu na srednje teški oblik bolesti. Nadalje, u ovom uzorku ispitanika analizom ROC krivulje pokazalo se da je najznačajniji prediktor smrtnog ishoda vrijednosti PTX3 preko 3730 pg/ml, što upućuje na to da vrijednosti, odnosno serumske koncentracije PTX3 mogu poslužiti kao prediktor ishoda bolesti.

S tim u vezi, prethodna su istraživanja pokazala da su razine PTX3 pouzdan pokazatelj smrti kod bolesnika koji boluju od bolesti COVID-19, a Brunetta i suradnici primijetili su da preminuli bolesnici imaju znatno više razine PTX3 u odnosu na bolesnike koji su se oporavili i koji nisu bili hospitalizirani u JIL-u (168, 123).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako su dob, PTX3 i Gal-9 značajni prediktori teškog oblika bolesti, od čega su vrijednosti PTX3 preko 2394 pg/mL imale najveću specifičnost i senzitivnost.

Ovi rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja koje su proveli Capra i suradnici govoreći kako je PTX3 visoko očuvani protein urođene imunosti povezan s lošijim ishodom bolesti. Na temelju gore navedenog, ovaj sustavni pregled i metaanaliza procijenili su prognostički potencijal PTX3 kod bolesti COVID-19 (123).

Osim toga, rezultati ovog istraživanja podupiru dostupne objavljene studije koje ukazuju na prognostičku vrijednost određivanja PTX3 u plazmi kao prediktora bolničke smrtnosti u bolesnika sa septičkim šokom (169). Također, utvrđene su značajno povišene vrijednosti PTX3 kod bolesnika koji su razvili ARDS u odnosu na bolesnike koji ga nisu razvili. Povišene serumske vrijednosti PTX3 ističu se kao bitan prediktor razvoja ARDS-a (121).

S obzirom na to, PTX3 je predložen kao obećavajući biomarker kod bolesnika sa sepsom zato što je porast koncentracije PTX3 u plazmi pozitivno povezan s težinom i smrtnošću (170). Nadalje, prema istraživanju koje su proveli Brunetta i suradnici, PTX3 se pokazao kao snažan prediktor kratkoročne smrtnosti. U svojem istraživanju izvijestili su da je PTX3 bolji prognostički marker u usporedbi s CRP-om, IL-6, feritinom i D-dimerom (168). U drugoj studiji, koju su proveli Krishnamachary i skupina autora, otkriveno je da su više vrijednosti PTX3 bile kod bolesnika s teškim oblikom COVID-19 u odnosu na asimptomatske bolesnike te da je PTX3 u pozitivnoj korelaciji s D-dimerom i indeksom tjelesne mase (engl. *Body mass indeks* – BMI) (171).

U svojoj studiji Zahra i suradnici pokazali su da su bolesnici koji nisu bili hospitalizirani u JIL-u, kao i bolesnici hospitalizirani u JIL-u, imali povišeniju vrijednost PTX3 u odnosu na zdrave kontrole. Iako razlika nije bila značajna između bolesnika na intenzivnoj njezi i onih koji nisu zahtijevali intenzivnu njegu, bolesnici na intenzivnoj njezi pokazali su više razine PTX3 (129).

Prema istraživanju, koje su Tatli i suradnici proveli na ispitanicima s kontuzijskim ozljedama pluća, zaključeno je kako je razina PTX3 značajno povišena zbog čega se pokazalo da ima važnu ulogu u patofiziologiji plućne kontuzije te akutnog upalnog posttraumatskog odgovora, koji igra značajnu ulogu u patofiziologiji plućne kontuzije. Stoga se može očekivati da će razine PTX3 porasti kao upalni marker u sklopu oštećenja mikrocirkulacije i akutnog upalnog odgovora (172).

PTX3 se pokazao kao važan i specifičan biomarker rane infekcije u novorođenčadi. Također se pokazalo da je povišen već i u pupkovini, stoga bi mjerenje serumskog PTX3 moglo biti korisno u predviđanju infekcije u novorođenčadi (173).

PTX3 je također uključen u endotelnu disfunkciju kroz različite mehanizme i korelira sa smrtnim slučajevima povezanim s akutnom plućnom embolijom, dok je endotelna disfunkcija prijavljena u teškim slučajevima bolesti COVID-19 i igra vitalnu ulogu u koagulopatiji (125). U skladu s tim, cirkulirajući PTX3 može biti dobar biomarker za praćenje prognoze COVID-19, što može dati nove ideje i smjernice za klinička i znanstvena istraživanja (130).

Gal-9 jest lektin koji veže β -galaktozid, a poznat je po svojoj imunomodulatornoj ulozi kod raznih mikrobnih infekcija. Ekspimiran je u svim organskim sustavima, a lokaliziran je u jezgri, na površini stanice, u citoplazmi i izvanstaničnom matriksu. Posreduje u interakcijama domaćin – patogen i regulira staničnu signalizaciju putem vezanja na svoje receptore. Gal-9 uključen je u mnoge fiziološke funkcije, kao što su rast stanica, diferencijacija, adhezija, komunikacija i smrt. U novijim studijama prikazani su podatci s utvrđenim povišenim razinama Gal-9 kod autoimunih poremećaja, virusnih infekcija, invazije parazita, karcinoma, akutnog zatajenja jetre, atopijskog dermatitisa, kronične bolesti bubrega, dijabetesa tipa 2, bolesti koronarnih arterija, ateroskleroze i neplodnosti. Moar i autori predlažu potencijal Gal-9 kao pouzdanog, osjetljivog i neinvazivnog biomarkera težine različitih bolesti (131).

Ekspresija Gal-9 često je promijenjena u tkivima malignih bolesti u usporedbi s normalnim tkivima. S obzirom na sve veći broj dokaza o uključenosti Gal-9 u progresiju tumora i angiogenezu, Gal-9 predstavlja potencijal kao prognostički marker, a sve se više raspravlja o njegovoj potencijalnoj primjeni u onkološkoj terapiji (174). Ekspresija galektina povezana je s tumorogenezom, progresijom bolesti i pojavnosti metastaza, čineći nekoliko članova obitelji galektina potencijalnim prognostičkim markerima za različite vrste karcinoma (175).

Pokazalo se da je ekspresija Gal-9 povećana u raznim ciljnim stanicama mnogih različitih virusa, kao što su HCV, HBV, HSV, DENV i HIV. Pojačana ekspresija Gal-9 nakon virusne infekcije potiče značajne promjene u ponašanju stanica zaraženih virusom, a rezultirajući događaji usko su povezani s imunopatogenezom virusne bolesti. Budući da ljudski imunološki odgovor na različite virusne infekcije može varirati, a nedostatak odgovarajućeg liječenja može imati potencijalno kobne posljedice, razumijevanje implikacija Gal-9 ključno je za razvoj boljih metoda za praćenje i liječenje virusnih infekcija (176).

U skladu s provedenim istraživanjima Du i suradnika, Gal-9 promiče vezanje SARS-CoV-2 i ulazak virusa u stanicu jer povećava afinitet vezanja proteina virusnog šiljka na ACE2 receptor (177).

Bozorgmehr i suradnici pokazali su pozitivnu korelacije razina Gal-9 u plazmi sa širokim rasponom proupalnih biomarkera u bolesnika s COVID-19. U skladu s tim istraživanjem, Gal-9 može se koristiti kao dijagnostički test jer može razlikovati osobe zaražene virusom SARS-CoV-2 od nezaraženih uz specifičnost/osjetljivost od 95 %. S obzirom na to da je Gal-9 važan čimbenik koji pridonosi sindromu otpuštanja citokina, odnosno u nastanku citokinske oluje, inhibicija Gal-9 mogla bi poslužiti kao terapijski pristup supresije hiperinflamatornog odgovora kod bolesnika s COVID-19 (138). Također, prema njihovom istraživanju dijagnostička snaga određivanja serumskih vrijednosti Gal-9 nije bila dovoljna za razlikovanje blage/umjerene od teške infekcije COVID-19, što je suprotno našem istraživanju prema kojem je utvrđena značajna razlika između blagog oblika i teškog, tj. kritičnog oblika.

Nedavna istraživanja otkrivaju da je cirkulirajući Gal-9 povišen kod osoba zaraženih SARS-CoV-2 s umjerenom do teškom bolešću, kako je dokazalo i ovo istraživanje (178). U prilog tome, Oatis i skupina autora utvrdili su da početna vrijednost od 2,042 pg/mL Gal-9 u plazmi može razlikovati SARS-CoV-2 inficirane bolesnike od neinficiranih s 95 % specifičnosti, dok je primijećena jaka korelacija s proupalnim medijatorima. Osim toga, prikazana je uloga Gal-9 u vezivanju virusa i njegovog ulaska u alveolarne epitelne stanice povećanjem afiniteta vezanja proteina virusnog šiljka na alveolarne stanice tipa 2. Navedena studija ukazuje na to da bi visoke razine plazmatskog Gal-9 mogle biti povezane s upalnim markerima koji odražavaju težinu COVID-19 pneumonije (179, 180).

6.4. Povezanost rezultata na MBrixia bodovnoj ljestvici i serumskih vrijednosti PTX3 i Gal-9

Hanley i suradnici izvijestili su da su više vrijednosti na Brixia bodovnoj ljestvici povezane s intubacijom, zahtjevom za neinvazivnom mehaničkom ventilacijom i smrtnim ishodom, postavljajući prediktor intubacije s graničnim rezultatom 6 od ukupno 18 (104). Nadalje, navedeno je da postoji značajna povezanost između početnog Brixia rezultata učinjenog na radiografskim snimkama pluća i njegovih viših vrijednosti s višim razinama CRP-a (163).

Razine CRP-a u korelaciji su s plućnim infiltratima opaženim na CT-u pluća kod bolesti COVID-19, što je u korelaciji i s opsegom plućnih promjena na radiografskim snimkama pluća (181, 182).

U ovom istraživanju MBrixia rezultat granične vrijednosti veće ili jednake 23,5 ima specifičnost od 96,6 % i senzitivnost od 100 % u dijagnostici teškog oblika bolesti COVID-19. Razine PTX3 u serumu značajno su više u skupini bolesnika s MBrixia rezultatom većim ili

jednakim 23,5 u usporedbi s onima nižeg MBrixia rezultata, 1796 pg/mL naprema 5456,2 pg/mL. U ovom je uzorku bolesnika PTX3 imao bolju točnost od dobi u predviđanju težine plućnih infiltrata pokazujući senzitivnost od 85,7 % i specifičnost od 78,8 %, granične vrijednosti ≥ 2765 pg/mL u predviđanju visokog MBrixia rezultata. Također je uočeno da bolesnici starije životne dobi i višeg MBrixia rezultata imaju veće vrijednosti PTX3. Uz višu dob i veći MBrixia rezultat, više su i vrijednosti biomarkera Gal-9. Kako je dob značajno povezana s vrijednostima PTX3 i Gal-9 biomarkera, izračunata je njihova povezanost s MBrixia bodovnom ljestvicom uz korekciju za dob. Ako se ukloni utjecaj dobi, uočava se da je MBrixia rezultat u značajnoj i pozitivnoj vezi s PTX3, no ne i s Gal-9, što se objašnjava istraživanjem koje su proveli Capra i suradnici govoreći kako je PTX3 visoko očuvani protein urođene imunosti povezan s lošijim ishodom bolesti, a samo starenje istaknuti je čimbenik rizika za razvoj teškog oblika bolesti i lošeg ishoda COVID-19. Pretpostavlja se da je starenje povezano s opadanjem i deregulacijom imunološke funkcije, što u kombinaciji s upalnim odgovorom igra glavnu ulogu u povećanoj ranjivosti i lošijem ishodu bolesti COVID-19 kod starijih osoba, a što je u skladu i s rezultatima ovog istraživanja (123, 142).

6.5. Analiza varijante gena I/D polimorfizma u genu za ACE i njihova povezanost s težinom kliničke slike, serumskim vrijednostima PTX3 i Gal-9 te s ishodom

ACE I/D polimorfizam odnosi se na varijaciju u nukleotidnom slijedu ACE gena, koja može utjecati na aktivnost ACE enzima u tijelu. Postoje dvije glavne varijante tog polimorfizma: insercijska i delecijaska, koje uključuju varijaciju od 287 parova baza u intronu 16 ACE gena. Osobe s različitim varijantama ACE I/D polimorfizma mogu imati različite razine ACE aktivnosti. Nekoliko studija obuhvaćalo je istraživanje moguće povezanosti ACE I/D polimorfizma i težine kliničke slike kod bolesti COVID-19, odnosno osjetljivosti bolesnika na infekciju SARS-CoV-2, a njihovi su rezultati različiti. Neki radovi upućuju na to da određene varijante ACE I/D polimorfizma mogu biti povezane s povećanim rizikom od težih oblika COVID-19 ili većom osjetljivošću na infekciju, dok drugi radovi upućuju na suprotne ili neutralne učinke. Međutim, važno je napomenuti da ACE I/D polimorfizam nije jedini čimbenik koji utječe na razvoj COVID-19. Mnogi drugi čimbenici, uključujući dob, spol, prisutnost komorbiditeta također igraju važnu ulogu. U ovom istraživanju D/D i I/D genotip značajno su češće zastupljeni kod bolesnika sa srednje teškim i kritičnim oblikom bolesti, dok kod blagog oblika bolesti prevladava I/I genotip.

Marshall i skupina autora u svojoj studiji provedenoj prije pandemije SARS-CoV-2 pokazali su povezanost između genotipa D/D i incidencije, morbiditeta i rizika od smrtnosti kod bolesnika s ARDS-om, na što ukazuje i ovo istraživanje (183).

Nadalje, u drugom istraživanju pokazano je da učestalost alela D značajno veća u skupini bolesnika s hipoksemijom nego u skupini bez hipoksemije, što ukazuje da bi *ACE* gen mogao biti jedan od kandidata koji utječu na napredovanje SARS-a (184).

Prema istraživanju Patija i suradnika provedenoj na populaciji azijskih zemalja genotip *ACE* I/I u populaciji bio je u značajnije negativnoj korelaciji s brojem smrtnih slučajeva uzrokovanih infekcijom SARS-CoV-2, što ukazuje na to da genotip I/I može povoljno utjecati na prevalenciju i klinički ishod COVID-19. Osim toga, navedena studija pokazuje da genotip D/D može biti važan prognostički marker za smrtnost u bolesnika iz azijskih zemalja s COVID-19 akutnom ozljedom pluća, odnosno ARDS-om, te da je alel D povezan s osjetljivošću na infekciju SARS-CoV-2 i sa stopom smrtnosti (185). Spomenuti autori pronašli su značajnu pozitivnu korelaciju alela D s infekcijom SARS-CoV-2 i zaključili kako je povezan sa stopom infekcije i smrtnosti. Dvije druge skupine također su pokazale da je genotip I/I povezan sa značajno manjom stopom smrtnosti od bolesti COVID-19 (186, 187).

Moguću povezanost između *ACE* polimorfizma i bolesti COVID-19 već su istraživali Delanghe i autori koji su usporedili učestalost alela D sa smrtnošću od bolesti COVID-19 u 25 različitih europskih zemalja. Pronašli su značajnu korelaciju između smrti povezanih s COVID-19 i prevalencije *ACE* alela D (188).

Provedene studije upućuju na to da su heterozigotni i homozigotni genotipovi *ACE* D/D i I/D čimbenici rizika za pogoršanje bolesti, što pokazuje i ovo istraživanje (189).

Uspoređujući ispitanike s obzirom na ishod liječenja, u ovom istraživanju utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli i učestalosti D/D genotipa kod bolesnika s negativnim ishodom u odnosu na preživjele, doprinoseći 6,3 puta većem izgledu za smrtni ishod, dok je isti kod I/D genotipa bio veći za 3,5 puta. U skladu s navedenim, I/I genotip ima zaštitni učinak.

Nema značajnih razlika u serumskim koncentracijama PTX3 i Gal-9 ovisno o genotipu *ACE* I/D u ukupnom uzorku bolesnika. Također, nije bilo razlike u serumskim koncentracijama PTX3 i Gal-9 s obzirom na *ACE* I/D unutar pojedinih skupina prema težini kliničke slike.

Kako je u brojnim istraživanjima potvrđena činjenica da na razvoj teškog i kritičnog oblika bolesti COVID-19 imaju utjecaj različiti čimbenici rizika (starost, muški spol, šećerna bolest, arterijska hipertenzija i druge), zanimljivo je da su mnogi od tih komorbiditeta usko povezani s polimorfizmom *ACE* I/D. S obzirom na ulogu tih polimorfizama u ravnoteži ACE/ACE2, to može biti genetski čimbenik rizika za tešku infekciju (42).

Prema istraživanju Gomeza i suradnika nepovoljan ishod bolesti COVID-19 bio je povezan s muškim spolom, hipertenzijom, hiperkolesterolemijom i genotipom *ACE*. Njihov rad upućuje na to da bi I/D polimorfizam mogao utjecati na težinu bolesti COVID-19, ali je učinak ovisio o statusu arterijske hipertenzije. Učestalosti muškog spola, arterijske hipertenzije, hiperkolesterolemije i genotipa D/D bile su značajno veće u skupini s teškim oblikom bolesti. Pojedinci s D/D genotipom pokazali su najviše razine ACE-a u krvi što bi moglo objasniti povećani rizik za kardiovaskularne i respiratorne bolesti. Neki autori povezuju taj polimorfizam s ishodom ARDS-a, kao i s progresijom upale pluća kod SARS-a, što je već ranije i opisano. U navedenom istraživanju zaključeno je da je učinak polimorfizma za *ACE* gen na ishod bolesti COVID-19 vjerojatno posljedica njegove povezanosti s hipertenzijom (190, 191).

6.6. Analiza predikcije težine kliničke slike i ishoda

Analiza predikcije kliničke slike i ishoda kod bolesti COVID-19 zahtijeva multidisciplinarni pristup. Predikcija težine kliničke slike uključuje procjenu čimbenika rizika kod pojedinca, kao što su starost i komorbiditeti, imunološki status te procjenu čimbenika rizika u populaciji, od stope širenja virusa i dostupnosti medicinskih resursa do učinkovitosti preventivnih mjera.

Ovim istraživanjem zaključeno je da su značajni prediktori starija dob, koja je u ovom uzorku ispitanika iznosila preko 65 godina, te PTX3 s vrijednostima preko 2394 pg/mL, kao najbolji prediktor za teški oblik bolesti. Kako je i očekivano, bolesnici s teškim oblikom bolesti imali su najveći rizik za razvoj ARDS-a. Pri tome je D/D genotip *ACE* I/D polimorfizma najčešće uočen kod bolesnika s kritičnim oblikom bolesti COVID-19. U skladu s navedenim povezan je i stupanj zahvaćenosti plućnog parenhima prema MBrixia bodovnoj ljestvici.

Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici značajno se razlikovao među različitim stupnjevima težine bolesti COVID-19. Provedenom ROC analizom dobila se granična vrijednost $\geq 23,5$ koja ima specifičnost od 96,6 % i senzitivnost od 100 % u dijagnosticiranju teškog/kritičnog oblika bolesti COVID-19. Može se zaključiti kako je rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici značajan prognostički alat za identifikaciju bolesnika kod kojih postoji veći rizik od komplikacija i smrtnog ishoda.

Ishod bolesti COVID-19 može varirati od blagih simptoma do teških komplikacija, uključujući respiratorno i višeorgansko zatajenje te smrt. Predviđanje ishoda može uključivati procjenu čimbenika koji utječu na progresiju bolesti, kao što su klinička obilježja bolesnika, laboratorijski nalazi, radiološki nalazi i druge dijagnostičke metode.

Provedena je ROC analiza kako bi se utvrdilo ima li vrijednost PTX3 značajnu graničnu vrijednost u predviđanju smrtnosti kod bolesnika oboljelih od COVID-19 (128). U ovom uzorku ispitanika analiza ROC krivulje pokazala je da je najznačajniji prediktor smrtnog ishoda PTX3 s vrijednostima ≥ 3730 pg/mL. Glavne su značajke PTX3 lokalna proizvodnja na mjestu infekcije ili oštećenja tkiva od strane više vrsta stanica i otpuštanje prethodno formiranog proteina od strane neutrofila te kao posljedica toga brzo povećanje njegovih cirkulirajućih razina u upalnim ili infektivnim stanjima. Time bi se mogla objasniti brzina porasta PTX3 u tim stanjima, što ga čini dobrim kandidatom za prognostički biomarker. U različitim patološkim stanjima, u rasponu od kardiovaskularnih bolesti do infekcija i sepse, razine PTX3 u plazmi povećane su, općenito su u korelaciji s težinom bolesti i s ARDS-om, što objašnjava navedeni fenomen (116).

Bivarijatnom logističkom regresijom ispitani su značajni prediktori u predviđanju težeg oblika bolesti. Uočava se da bolesnici s hipertenzijom imaju značajnu vjerojatnost za nastanak težeg oblika bolesti. S obzirom na genotip, bolesnici s D/D genotipom imaju značajno veću vjerojatnost za razvoj težeg oblika bolesti.

Multivarijatnom logističkom regresijom uočava se da postoji značajan model u predikciji težeg oblika bolesti, a to su dob bolesnika i prisutna hipertenzija.

Bivarijatnom logističkom regresijom ispitani su značajni prediktori u predviđanju smrtnog ishoda. Najznačajniji klinički prediktor smrtnog ishoda bio je ARDS i prisutnost komorbiditeta. Također, kod bolesnika s D/D genotipom rizik za nastanak smrtnog ishoda bio je veći za 6,5 puta, što je pokazala i studija Gomeza i autora (190).

Osim toga, multivarijatnom logističkom regresijom uočava se da postoji značajan model u predikciji smrtnog ishoda, a to su ARDS te više vrijednosti PTX3.

ACE I/D povezan je s promjenama u serumskim razinama ACE jer genotipska razlika dovodi do razlika u aktivnosti enzima. U studijama je uočeno kako su koncentracije ACE u serumu značajno više u ispitanika s D/D genotipom u usporedbi s genotipovima I/D i I/I. Uzimajući u obzir suprotan učinak između ACE i ACE2, smanjena ekspresija gena ACE2 receptora snažno je povezana s povećanjem u ACE izrazu. Stoga se može pretpostaviti da prisutnost alela D utječe na klinički tijek bolesti COVID-19 smanjenjem razine ACE2 receptora. Osim toga, pokazalo se da bolesnici s kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću (KOPB) imaju povećanu ekspresiju gena ACE2 receptora u epitelnim stanicama bronha u donjem respiratornom traktu te da pušenje povećava i ekspresiju i aktivnost ACE2 u dišnim putevima. Iako je pojačana regulacija ACE2 korisna u zaštiti domaćina od akutne ozljede pluća, to čini pojedince osjetljivijima na infekciju SARS-CoV-2 koji koristi taj receptor za ulazak u

epitelne stanice (191).

Thakur i skupina autora u svojoj studiji zaključili su da je *ACE I/D* polimorfizam zajednički regulator koagulacije, fibrinolitičkog i RAAS puta kod neplodnosti i povezanih komplikacija u trudnoći. Prema njihovom istraživanju polimorfizam *ACE I/D* značajan je polimorfizam koji utječe na razine ACE-a u plazmi. Pojedinci koji su homozigoti za alel D imaju najviše razine enzima, homozigoti za alel I imaju najniže, a heterozigoti imaju srednju razinu. Alel D povezan je s povišenim razinama ACE-a što dovodi do višeg krvnog tlaka i smanjena fibrinolize tijekom trudnoće, izlažući zdravlje uteroplacente riziku. Također je zaključeno da su visoke razine fibrinogena povezane s povećanim rizikom od tromboembolijskih bolesti, uključujući povećani rizik od tromboze u krvnim žilama posteljice, što ubrzava gubitak trudnoće (192).

Međutim, nekoliko drugih istraživanja izvijestilo je o pozitivnoj povezanosti između alela D i visokog krvnog tlaka (41). Arterijska hipertenzija povezana je s većim rizikom od ozbiljnosti i smrtnosti od bolesti COVID-19. Pretpostavlja se da su starija dob, više komorbiditeta i komplikacija, nekontrolirana arterijska hipertenzija i neravnoteža između dva glavna RAAS-a, to jest sniženog ACE2/Ang (1-7) i najviše reguliranog ACE/AN-II, pridonijeli povećanoj ozbiljnosti i smrtnosti kod bolesnika s hipertenzijom i bolesti COVID-19, na što ukazuju i rezultati ovog istraživanja (38).

U ovom uzorku univarijatna regresijska analiza pokazala je da su arterijska hipertenzija, šećerna bolest i pretilost najznačajniji prediktori težine plućnih infiltrata zajedno s *ACE D/D* polimorfizmom i serumskom razinom PTX3. Multivarijatnom regresijskom analizom samo su hipertenzija, genotip *D/D ACE I/D* polimorfizma i PTX3 ostali važni prediktori težine plućnih infiltrata.

Zaključno, dobiveni rezultati dio su istraživanja koje je provedeno na populaciji bolesnika oboljelih od COVID-19 hospitaliziranih u jednom centru zbog čega ima svoja ograničenja. Ograničenje ovog istraživanja jest veličina uzorka zbog čega bi za veću pouzdanost i eventualnu dijagnostičku snagu bilo dobro nastaviti istraživanje na većem broju sudionika. Time bi se dobili dosljedni zaključci primjenjivi na širu populaciju.

Također, snimke pluća pacijenta u JIL-u učinjene su u ležećem položaju bolesnika zbog čega imaju ograničenja u interpretaciji nalaza. MBrixia sustav bodovanja pokazao se kao dobar sustav za procjenu oštećenja pluća, ali zbog činjenice da je temeljen na subjektivnoj procjeni oštećenja od strane kliničara nije u potpunosti pouzdana metoda. Kako je ranije rečeno, CT pluća superiorniji je kao dijagnostička metoda, ali nije primjenjiv i dostupan u pandemijskom razdoblju u usporedbi s radiografskim snimkama pluća.

Unatoč tome, rezultati ovog istraživanja nagovještavaju primjenu sustava kvantifikacije

plućnih promjena, koja bi pomogla kliničarima u stratifikaciji i trijaži bolesnika, kao i uvođenje novih biomarkera kao dijagnostičke i prediktivne smjernice za oboljele.

Podatci dobiveni ovim istraživanjem iznimno su vrijedni jer su pokazali kako je rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici i serumske vrijednosti PTX3 te *ACE* D/D genotipa značajan prognostički alat za identifikaciju bolesnika kod kojih postoji veći rizik od težih oblika bolesti te smrtnog ishoda.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Korelacija (povezanost) serumskih koncentracija PTX3 i Gal-9 u COVID-19 bolesnika statistički je značajna.
- Serumske koncentracije PTX3 značajno su povezane s težinom kliničke slike, s lošijim kliničkim ishodima, odnosno s povećanom učestalosti razvoja komplikacija, povećanom smrtnosti i ARDS-om.
- Serumske koncentracije Gal-9 nisu značajno povezane s ARDS-om.
- Opseg plućnih promjena povezan je s kliničkom slikom.
- Rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici u značajnoj je i pozitivnoj vezi sa serumskim vrijednostima PTX3 i lošim ishodom bolesti.
- Od komorbiditeta, arterijska hipertenzija pokazuje se statistički najznačajnijim komorbiditetom.
- Demografske varijable (spol i dob) povezane su s težim oblikom bolesti i lošijim ishodom.
- *ACE D/D* genotip najčešće je zastupljen u bolesnika s kritičnim oblikom COVID-19.

S obzirom na navedene zaključke može se reći da serumske koncentracije PTX3 i Gal-9 pokazuju statistički značajnu povezanost i s težinom kliničke slike i s kliničkim ishodima, što im daje značaj kao patofiziološkom i prognostičkom čimbeniku kod bolesnika oboljelih od bolesti COVID-19. Također, može se zaključiti kako je rezultat na MBrixia bodovnoj ljestvici značajan prognostički alat za identifikaciju bolesnika koji imaju veći rizik od komplikacija i smrtnog ishoda.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati odnose serumskih koncentracija pentraksina 3 (PTX3), galektina-9 (Gal-9), genskog *ACE I/D* polimorfizma i opsega plućnih promjena na radiografskim snimkama pluća kod COVID-19 bolesnika, usporediti ih s težinom kliničke slike, biljezima hiperinflamatornog odgovora te kliničkim ishodom. Također, ispitan je utjecaj dobi i komorbiditeta na njihovu serumsku koncentraciju i opseg plućnih promjena.

Nacrt istraživanja: Presječno istraživanje.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 80 odraslih ispitanika/bolesnika kojima je postavljena dijagnoza COVID-19 bolesti na temelju PCR testa. Ispitanici su bili podijeljeni u tri skupine prema smjernicama Ministarstva zdravstva RH iz 2022. godine: ispitanici s blagim, ispitanici sa srednje teškim te ispitanici s teški i kritičnim oblikom bolesti. Za potrebe ovog istraživanja prikupljeni su podatci o bolesniku i njegovoj bolesti (anamneza, povijest bolesti), procijenjen je klinički status i na osnovi njega procijenjena je težina bolesti te su provedena laboratorijska ispitivanja. Za potrebe laboratorijskih ispitivanja uzorkovana je venska i arterijska krv iz kojih su određivani ispitivani parametri. Vrijednosti serumskih koncentracija PTX3 i Gal-9 određivane su primjenom tehnologije xMAP (engl. *Multi-analyte profiling*), a polimorfizam *I/D* u genu za *ACE* PCR metodom u stvarnom vremenu. Promjene plućnog parenhima kvantificirane su MBrixia bodovnim sustavom na učinjenim sumacijskim radiografskim snimkama pluća.

Rezultati: Korelacija serumskih koncentracija PTX3 i Gal-9 kod ovih ispitanika bila je statistički značajna. Serumske koncentracije PTX3 i Gal-9 pozitivno su korelirale s težinom kliničke slike te s lošijim kliničkim ishodima, odnosno ispitanici s višim vrijednostima imali su teže kliničke oblike COVID-19 bolesti, viši zbroj na MBrixia bodovnoj ljestvici, najčešću učestalost *ACE D/D* genotipa i veću smrtnost. Ispitanici s većim koncentracijama PTX3 pozitivno su korelirali s razvojem akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS), dok se ta povezanost nije našla za Gal-9. Najčešći komorbiditeti među ispitanicima bili su arterijska hipertenzija, šećerna bolest i pretilost, od kojih je arterijska hipertenzija bila najučestalija. Demografska varijabla koja se odnosila na dob i spol pozitivno je korelirala s težinom kliničke slike.

Zaključak: Serumske koncentracije PTX3 i Gal-9 pokazuju statistički značajnu povezanost i s težinom kliničke slike i s kliničkim ishodima što im daje značaj kao patofiziološkom i prognostičkom čimbeniku kod bolesnika oboljelih od bolesti COVID-19, a dodatno je PTX3 pokazatelj razvoja ARDS-a. Također, može se zaključiti kako rezultat na MBrixia bodovnoj

ljestvici značajan prognostički alat za identifikaciju bolesnika koji imaju veći rizik od komplikacija i smrtnog ishoda.

Ključne riječi: ACE; COVID-19; galektini; polimorfizam; PTX3; radiografska snimka pluća; SARS-CoV-2

9. SUMMARY

Title: “Correlation between Serum Values of Galectin-9, Pentraxin 3, *ACE* I/D Polymorphism and the Extent of Pulmonary Changes and Their Impact on Clinical Outcomes in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)”

Objectives: The aim of this study was to examine the correlations of serum concentrations of PTX3, Gal-9, *ACE* I/D polymorphism and the extent of pulmonary changes on chest X-ray (CXR) in patients with COVID-19, and to compare them with the severity of the clinical picture, signs of hyperinflammatory response, and the clinical outcome. Furthermore, we also examined the effects of age and comorbidities on their concentration and the extent of pulmonary changes.

Study design: Cross-sectional study.

Participants and methods: The study included 80 adult subjects – patients diagnosed with COVID-19 disease using the PCR test, who were divided into three groups based on the guidelines of the Ministry of Health of the Republic of Croatia from 2022: subjects with a mild, a moderately severe, and a severe and critical form of the disease. For the purposes of this research, we collected data about patients and their disease (anamnesis, medical history), assessed the clinical status to determine the severity of the disease, and conducted laboratory tests. For laboratory tests, we sampled venous and arterial blood to analyse the tested parameters. The values of the PTX3 and Gal-9 serum concentrations were determined using the xMAP (multi-analyte profiling) technology, and the polymorphism in the *ACE* gene was determined using the real-time PCR method. Changes in the lung parenchyma were quantified using the MBrixia scoring system on CXR.

Results: The correlation of serum concentrations in our subjects was statistically significant. Serum concentrations of PTX3 and Gal-9 positively correlated with the severity of the clinical picture and with worse clinical outcomes, that is, subjects with higher values had more severe clinical forms of the COVID-19 disease, a higher MBrixia score, higher frequency of *ACE* D/D genotype and higher mortality. Subjects with higher concentrations of PTX3 showed positive correlations with the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS), while this link was not found for Gal-9. The most common comorbidities among the subjects were arterial hypertension, diabetes, and obesity, of which arterial hypertension was the most common. The demographic variable related to age and gender positively correlated with the severity of the clinical picture.

Conclusion: Serum concentrations of PTX3 and Gal-9 show a statistically significant correlation with both the severity of the clinical picture and clinical outcomes, which makes it an important pathophysiological and prognostic factor in patients with COVID-19 disease. Additionally, the PTX3 indicates the development of ARDS. We can also conclude that the MBrixia score is a significant prognostic tool for identifying patients at a higher risk of complications and death.

Keywords: ACE; COVID-19; Galectins; Polymorphism; PTX3; Radiography; SARS-CoV-2

10. LITERATURA

1. Coronavirus. Dostupno na adresi:
<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Coronavirus&oldid=1219051526>
2. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(5):760–73.
3. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155–70.
4. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348(20):1953–66.
5. Zhu Z, Lian X, Su X, Wu W, Marraro GA, Zeng Y. From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. *Respir Res.* 2020;27;21(1):224.
6. Memish ZA, Perlman S, Van Kerkhove MD, Zumla A. Middle East respiratory syndrome. *Lancet.* 2020;28;395(10229):1063–77.
7. Yamazaki O, Shibata S. Severe COVID-19 and preexisting hypertension: a matter of age? *Hypertens Res.* 2022;45(9):1523–5.
8. Xie M, Chen Q. Insight into 2019 novel coronavirus — An updated interim review and lessons from SARS-CoV and MERS-CoV. *Int J Infect Dis.* 2020;94:119–24.
9. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed.* 2020;91(1):157–60.
10. COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard. Dostupno na adresi:
<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
11. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–3.
12. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Curr Biol.* 2020;30(7):1346–51.
13. Qun L, Xuhua G, Peng W, Xiaoye W, Lei Z, Yeqing T, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1199–207.

14. Ralph R, Lew J, Zeng T, Francis M, Xue B, Roux M, et al. 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. *J Infect Dev Ctries*. 2020;14(1):3–17.
15. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565–74.
16. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450–4.
17. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;11(1):1620.
18. 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.
19. Lee IT, Nakayama T, Wu CT, Goltsev Y, Jiang S, Gall PA, et al. ACE2 localizes to the respiratory cilia and is not increased by ACE inhibitors or ARBs. *Nat Commun*. 2020;11(1):5453.
20. COVID-19. Dostupno na adresi: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=COVID-19&oldid=1219656498>
21. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann Intern Med*. 2020;M20-0504.
22. Nishiura H, Kobayashi T, Miyama T, Suzuki A, Jung SM, Hayashi K, et al. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *Int J Infect Dis*. 2020;94:154–5.
23. Fu L, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2020;80(6):656–65.
24. Goyal D, Inada-Kim M, Mansab F, Iqbal A, McKinstry B, Naasan AP, et al. Improving the early identification of COVID-19 pneumonia: a narrative review. *BMJ Open Respiratory Research*. 2021;8(1):e000911
25. Agard A, Elsheikh O, Bell D, Relich RF, Schmitt BH, Sadowski J, et al. Clinical

- comparison and agreement of PCR, antigen, and viral culture for the diagnosis of COVID-19. *J Clin Virol Plus*. 2022;2(3):100099.
26. Ippolito D, Pecorelli A, Maino C, Capodaglio C, Mariani I, Giandola T, et al. Diagnostic impact of bedside chest X-ray features of 2019 novel coronavirus in the routine admission at the emergency department: case series from Lombardy region. *Eur J Radiol*. 2020;129:109092.
27. Aslan A, Aslan C, Zolbanin NM, Jafari R. Acute respiratory distress syndrome in COVID-19: possible mechanisms and therapeutic management. *Pneumonia*. 2021;13(1):14.
28. Martínez Chamorro E, Díez Tascón A, Ibáñez Sanz L, Ossaba Vélez S, Borrue Nacenta S. Radiologic diagnosis of patients with COVID-19. *Radiologia*. 2021;63(1):56–73.
29. Churruca M, Martínez-Besteiro E, Couñago F, Landete P. COVID-19 pneumonia: A review of typical radiological characteristics. *World J Radiol*. 2021;13(10):327–43.
30. Cao Y, Liu X, Xiong L, Cai K. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2020;92(9):1449–59.
31. Saez de Gordo E, Portella A, Escudero-Fernández JM, Andreu Soriano J. Usefulness of chest X-rays for detecting COVID 19 pneumonia during the SARS-CoV-2 pandemic. *Radiologia (Engl Ed)*. 2022;64(4):310–6.
32. Schiaffino S, Tritella S, Cozzi A, Carriero S, Blandi L, Ferraris L, et al. Diagnostic performance of chest X-ray for COVID-19 pneumonia during the SARS-CoV-2 pandemic in Lombardy, Italy. *J Thorac Imaging*. 2020;35(4):W105–6.
33. Trunz LM, Lee P, Lange SM, Pomeranz CL, Needleman L, Ford RW, et al. Imaging approach to COVID-19 associated pulmonary embolism. *Int J Clin Pract*. 2021;75(10):e14340.
34. Kopańska M, Barnaś E, Błajda J, Kuduk B, Łagowska A, Banaś-Ząbczyk A. Effects of SARS-CoV-2 inflammation on selected organ systems of the human body. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8):4178.
35. Bohn MK, Hall A, Sepiashvili L, Jung B, Steele S, Adeli K. Pathophysiology of COVID-19: mechanisms underlying disease severity and progression. *Physiology (Bethesda)*. 2020;35(5):288–301.

36. Koronavirus - smjernice, preporuke, obrasci Klinika za infektivne bolesti. 2020. Dostupno na adresi: <https://bfm.hr/koronavirus-aktualno/>
37. Gandhi RT, Lynch JB, Del Rio C. Mild or moderate COVID-19. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1757–66.
38. Gao YD, Ding M, Dong X, Zhang JJ, Kursat Azkur A, Azkur D, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy*. 2021;76(2):428–55.
39. Gebhard C, Regitz-Zagrosek V, Neuhauser HK, Morgan R, Klein SL. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol Sex Differ*. 2020;11(1):29.
40. COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med*. 2021;47(1):60–73.
41. Sayed-Tabatabaei F a., Oostra B a., Isaacs A, van Duijn C m., Witteman J c. m. ACE Polymorphisms. *Circ Res*. 2006;98(9):1123–33.
42. Soltani Rezaiezhadeh J, Lord JS, Yekaninejad MS, Izadi P. The association of ACE I/D polymorphism with the severity of COVID-19 in Iranian patients: A case-control study. *Hum Gene*. 2022;34:201099.
43. Wyawahare M, Neelamegam R, Vilvanathan S, Soundravally R, Das A, Adithan C. Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and nephropathy in diabetic patients at a tertiary care centre in South India. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2017;10:1179551417726779.
44. Pinheiro DS, Santos RS, Jardim PCBV, Silva EG, Reis AAS, Pedrino GR, et al. The combination of ACE I/D and ACE2 G8790A polymorphisms reveals susceptibility to hypertension: A genetic association study in Brazilian patients. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221248.
45. Gemmati D, Bramanti B, Serino ML, Secchiero P, Zauli G, Tisato V. COVID-19 and individual genetic susceptibility/receptivity: Role of ACE1/ACE2 genes, immunity, inflammation and coagulation. Might the double X-chromosome in females be protective against SARS-CoV-2 compared to the single X-chromosome in males? *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3474.
46. Georgiadis D, Beau F, Czarny B, Cotton J, Yiotakis A, Dive V. Roles of the two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin. *Circ Res*. 2003;93(2):148–54.

47. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990;86(4):1343–6.
48. Dhumad MM, Hamdan FB, Al-Mayah QS. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (I/D) gene polymorphism in Iraqi type 2 diabetic patients: association with the risk of cardiac autonomic neuropathy. *Egypt J Med Hum Genet.* 2020;21(1):20.
49. Möhlendick B, Schönfelder K, Breuckmann K, Elsner C, Babel N, Balfanz P, et al. ACE2 polymorphism and susceptibility for SARS-CoV-2 infection and severity of COVID-19. *Pharmacogenet Genomics.* 2021;31(8):165-71.
50. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004;203(2):631–7.
51. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260–3.
52. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med.* 2020;26(5):681–7.
53. Voors AA, Pinto YM, Buikema H, Urata H, Oosterga M, Rooks G, et al. Dual pathway for angiotensin II formation in human internal mammary arteries. *Br J Pharmacol.* 1998;125(5):1028–32.
54. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(6):H2281-2290.
55. Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2013;169(3):477–92.
56. Sanchis-Gomar F, Lavie CJ, Perez-Quilis C, Henry BM, Lippi G. Angiotensin-converting enzyme 2 and antihypertensives (angiotensin receptor blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors) in coronavirus disease 2019. *Mayo Clin Proc.* 2020;95(6):1222–30.
57. Van De Veerdonk F, Netea MG, Van Deuren M, Van Der Meer JWM, De Mast Q, Bruggemann RJ, et al. Kinins and cytokines in COVID-19: a comprehensive

pathophysiological approach. Preprints 2020; 2020040023. Dostupno na adresi:
<https://doi.org/10.20944/preprints202004.0023.v1>

58. Mehrabadi ME, Hemmati R, Tashakor A, Homaei A, Yousefzadeh M, Hemati K, et al. Induced dysregulation of ACE2 by SARS-CoV-2 plays a key role in COVID-19 severity. *Biomed Pharmacother.* 2021;137:111363.
59. Wu CH, Mohammadmoradi S, Chen JZ, Sawada H, Daugherty A, Lu HS. Renin-angiotensin system and cardiovascular functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(7):e108–16.
60. Alcocer-Díaz-Barreiro L, Cossio-Aranda J, Verdejo-Paris J, Ríos MO de los, Galván-Oseguera H, Álvarez-López H, et al. COVID-19 y el sistema renina, angiotensina, aldosterona. Una relación compleja. *Arch Cardiol Méx.* 2020;90:19–25.
61. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018;98(3):1627–738.
62. Bäumer AT, Wassmann S, Ahlbory K, Strehlow K, Müller C, Sauer H, et al. Reduction of oxidative stress and AT1 receptor expression by the selective oestrogen receptor modulator idoxifene. *Br J Pharmacol.* 2001;134(3):579–84.
63. Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T, Ito N, Ikushima M, Kaibe M, et al. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension.* 2006;47(4):718–26.
64. Freel EM, Connell JMC. Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):1993–2001.
65. Glowacka I, Bertram S, Herzog P, Pfefferle S, Steffen I, Muench MO, et al. Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *J Virol.* 2010;84(2):1198–205.
66. Nappi F, Avtaar Singh SS. Endothelial dysfunction in SARS-CoV-2 infection. *Biomedicines.* 2022;10(3):654.
67. Bielecka E, Sielatycki P, Pietraszko P, Zapora-Kurel A, Zbroch E. Elevated arterial blood pressure as a delayed complication following COVID-19—a narrative review. *Int J Mol Sci.* 2024;25(3):1837.
68. Borczuk AC, Yantiss RK. The pathogenesis of coronavirus-19 disease. *J Biomed Sci.* 2022;29(1):87.

69. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020;8(4):420–2.
70. Gustine JN, Jones D. Immunopathology of hyperinflammation in COVID-19. *Am J Pathol.* 2021;191(1):4–17.
71. Schifanella L, Anderson JL, Galli M, Corbellino M, Lai A, Wieking G, et al. Massive viral replication and cytopathic effects in early COVID-19 pneumonia. *arXiv*; 2020 [Dostupno na adresi: <http://arxiv.org/abs/2005.00004>
72. Kikkert M. Innate immune evasion by human respiratory RNA viruses. *J Innate Immun.* 2020;12(1):4–20.
73. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2620–9.
74. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(6):842–4.
75. Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, Tarhriz V, Farjami A, Ghasemian Sorbeni F, et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virol J.* 2022;19(1):92.
76. Chen W, Pan JY. Anatomical and pathological observation and analysis of SARS and COVID-19: microthrombosis is the main cause of death. *Biol Proced Online.* 2021;23(1):4.
77. Shirbhate E, Pandey J, Patel VK, Kamal M, Jawaid T, Gorain B, et al. Understanding the role of ACE-2 receptor in pathogenesis of COVID-19 disease: a potential approach for therapeutic intervention. *Pharmacol Rep.* 2021;73(6):1539–50.
78. Li Y, Li JZ. SARS-CoV-2 Virology. *Infect Dis Clin North Am.* 2022;36(2):251–65.
79. Calkovska A, Kolomaznik M, Calkovsky V. Alveolar type II cells and pulmonary surfactant in COVID-19 era. *Physiol Res.* 2021;70(Suppl 2):S195–208.
80. Wang Y, Wu M, Li Y, Yuen HH, He ML. The effects of SARS-CoV-2 infection on modulating innate immunity and strategies of combating inflammatory response for COVID-19 therapy. *J Biomed Sci.* 2022;29:27.
81. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(5):270–84.
82. Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost.*

- 2020;18(9):2103–9.
83. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. *N Engl J Med*. 2020;383(2):120–8.
 84. Ball L, Silva PL, Giacobbe DR, Bassetti M, Zubieta-Calleja GR, Rocco PRM, et al. Understanding the pathophysiology of typical acute respiratory distress syndrome and severe COVID-19. *Expert Rev Respir Med*. 16(4):437–46.
 85. Helms J, Tacquard C, Severac F, Leonard-Lorant I, Ohana M, Delabranche X, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med*. 2020;46(6):1089–98.
 86. Villalba JA, Hilburn CF, Garlin MA, Elliott GA, Li Y, Kunitoki K, et al. Vasculopathy and increased vascular congestion in fatal COVID-19 and acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022;206(7):857–73.
 87. Wang K, Wen D, Xu X, Zhao R, Jiang F, Yuan S, et al. Extracellular matrix stiffness—The central cue for skin fibrosis. *Front Mol Biosci*. 2023;10:1132353.
 88. Pannone G, Caponio VCA, De Stefano IS, Ramunno MA, Meccariello M, Agostinone A, et al. Lung histopathological findings in COVID-19 disease – a systematic review. *Infect Agent Cancer*. 2021;16:34.
 89. Simpson S, Kay FU, Abbara S, Bhalla S, Chung JH, Chung M, et al. Radiological society of north america expert consensus document on reporting chest CT findings related to COVID-19: Endorsed by the Society of Thoracic Radiology, the American College of Radiology, and RSNA. *Radiol Cardiothorac Imaging*. 2020;2(2):e200152.
 90. Litmanovich DE, Chung M, Kirkbride RR, Kicska G, Kanne JP. Review of chest radiograph findings of COVID-19 pneumonia and suggested reporting language. *J Thorac Imaging*. 2020;35(6):354.
 91. Jacobi A, Chung M, Bernheim A, Eber C. Portable chest X-ray in coronavirus disease-19 (COVID-19): A pictorial review. *Clin Imaging*. 2020;64:35–42.
 92. Wong HYF, Lam HYS, Fong AHT, Leung ST, Chin TWY, Lo CSY, et al. Frequency and distribution of chest radiographic findings in patients positive for COVID-19. *Radiology*. 2020;296(2):E72–8.
 93. Bankier AA, MacMahon H, Colby T, Gevenois PA, Goo JM, Leung ANC, et al. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology*.

- 2024;310(2):e232558.
94. Vancheri SG, Savietto G, Ballati F, Maggi A, Canino C, Bortolotto C, et al. Radiographic findings in 240 patients with COVID-19 pneumonia: time-dependence after the onset of symptoms. *Eur Radiol.* 2020;30(11):6161–9.
 95. Colman J, Zamfir G, Sheehan F, Berrill M, Saikia S, Saltissi F. Chest radiograph characteristics in COVID-19 infection and their association with survival. *Eur J Radiol Open.* 2021;8:100360.
 96. Benmalek E, Elmhamdi J, Jilbab A. Comparing CT scan and chest X-ray imaging for COVID-19 diagnosis. *Biomed Eng Adv.* 2021;1:100003.
 97. Borakati A, Perera A, Johnson J, Sood T. Diagnostic accuracy of X-ray versus CT in COVID-19: a propensity-matched database study. *BMJ Open.* 2020;10(11):e042946.
 98. Kovács A, Palásti P, Veréb D, Bozsik B, Palkó A, Kincses ZT. The sensitivity and specificity of chest CT in the diagnosis of COVID-19. *Eur Radiol.* 2021;31(5):2819–24.
 99. Pontone G, Scafuri S, Mancini ME, Agalbato C, Guglielmo M, Baggiano A, et al. Role of computed tomography in COVID-19. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2021;15(1):27–36.
 100. Duong-Quy S, Vo-Pham-Minh T, Tran-Xuan Q, Huynh-Anh T, Vo-Van T, Vu-Tran-Thien Q, et al. Post-COVID-19 pulmonary fibrosis: facts—challenges and futures: a narrative review. *Pulm Ther.* 2023;9(3):295–307.
 101. Wasilewski P, Mruk B, Mazur S, Póltorak-Szymczak G, Sklinda K, Walecki J. COVID-19 severity scoring systems in radiological imaging – a review. *Pol J Radiol.* 2020;85(1):361–8.
 102. Borghesi A, Maroldi R. COVID-19 outbreak in Italy: experimental chest X-ray scoring system for quantifying and monitoring disease progression. *Radiol Med.* 2020;125(5):509–13.
 103. Abo-Hedibah SA, Tharwat N, Elmokadem AH. Is chest X-ray severity scoring for COVID-19 pneumonia reliable? *Pol J Radiol.* 2021;86:e432–9.
 104. Hanley M, Brosnan C, O’Neill D, Ni Mhuirheartaigh N, Logan M, Morrin MM, et al. Modified Brixia chest X-ray severity scoring system and correlation with intubation, non-invasive ventilation and death in a hospitalised COVID-19 cohort. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2022;66(6):761–7.
 105. Filippini DFL, Hagens LA, Heijnen NFL, Zimatore C, Atmowihardjo LN, Schnabel

- RM, et al. Prognostic value of the radiographic assessment of lung edema score in mechanically ventilated ICU patients. *J Clin Med*. 2023;12(4):1252.
106. Zimatore C, Pisani L, Lippolis V, Warren MA, Calfee CS, Ware LB, et al. Accuracy of the radiographic assessment of lung edema score for the diagnosis of ARDS. *Front Physiol*. 2021;12:672823.
107. Yang R, Li X, Liu H, Zhen Y, Zhang X, Xiong Q, et al. Chest CT severity score: an imaging tool for assessing severe COVID-19. *Radiol Cardiothorac Imaging*. 2020;2(2):e200047.
108. Inoue A, Takahashi H, Ibe T, Ishii H, Kurata Y, Ishizuka Y, et al. Comparison of semiquantitative chest CT scoring systems to estimate severity in coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia. *Eur Radiol*. 2022;32(5):3513–24.
109. Prokop M, van Everdingen W, van Rees Vellinga T, Quarles van Ufford H, Stöger L, Beenen L, et al. CO-RADS: A categorical CT assessment scheme for patients suspected of having COVID-19-definition and evaluation. *Radiology*. 2020;296(2):E97–104.
110. Liu G, Chen Y, Runa A, Liu J. Diagnostic performance of CO-RADS for COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol*. 2022;32(7):4414–26.
111. Porte R, Davoudian S, Asgari F, Parente R, Mantovani A, Garlanda C, et al. The long pentraxin PTX3 as a humoral innate immunity functional player and biomarker of infections and sepsis. *Front Immunol*. 2019;10:794.
112. Garlanda C, Bottazzi B, Magrini E, Inforzato A, Mantovani A. PTX3, a humoral pattern recognition molecule, in innate immunity, tissue repair, and cancer. *Physiol Rev*. 2018;98(2):623–39.
113. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:157–83.
114. Ristagno G, Fumagalli F, Bottazzi B, Mantovani A, Olivari D, Novelli D, et al. Pentraxin 3 in Cardiovascular Disease. *Front Immunol*. 2019;10. Dostupno na adresi: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.00823/full>
115. Pentraxin-3 in chronic heart failure: the CORONA and GISSI-HF trials - Latini - 2012 - European Journal of Heart Failure - Wiley Online Library. Dostupno na adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1093/eurjhf/hfs092?scrollTo=references>
116. Wang G, Jiang C, Fang J, Li Z, Cai H. Pentraxin-3 as a predictive marker of mortality in sepsis: an updated systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2022;26(1):167.

117. Baldini M, Maugeri N, Ramirez GA, Giacomassi C, Castiglioni A, Prieto-González S, et al. Selective up-regulation of the soluble pattern-recognition receptor pentraxin 3 and of vascular endothelial growth factor in giant cell arteritis: Relevance for recent optic nerve ischemia. *Arthritis Rheum.* 2012;64(3):854–65.
118. Jenny NS, Arnold AM, Kuller LH, Tracy RP, Psaty BM. Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease and all-cause death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):594–9.
119. Caironi P, Masson S, Mauri T, Bottazzi B, Leone R, Magnoli M, et al. Pentraxin 3 in patients with severe sepsis or shock: the ALBIOS trial. *Eur J Clin Invest.* 2017;47(1):73–83.
120. He X, Han B, Bai X, Zhang Y, Cypel M, Mura M, et al. PTX3 as a potential biomarker of acute lung injury: supporting evidence from animal experimentation. *Intensive Care Med.* 2010;36(2):356–64.
121. Mauri T, Coppadoro A, Bellani G, Bombino M, Patroniti N, Peri G, et al. Pentraxin 3 in acute respiratory distress syndrome: An early marker of severity. *Crit Care Med.* 2008;36(8):2302.
122. Feitosa TA, de Souza Sá MV, Pereira VC, de Andrade Cavalcante MK, Pereira VRA, da Costa Armstrong A, et al. Association of polymorphisms in long pentraxin 3 and its plasma levels with COVID-19 severity. *Clin Exp Med.* 2023;23(4):1225–33.
123. Capra AP, Ardizzone A, Pantò G, Paterniti I, Campolo M, Crupi L, et al. The prognostic value of pentraxin-3 in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis of mortality incidence. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):3537.
124. Escher R, Breakey N, Lämmle B. Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation. *Thromb Res.* 2020;190:62.
125. Tong M, Xiong Y, Zhu C, Xu H, Zheng Q, Hu C, et al. Elevated serum pentraxin-3 levels is positively correlated to disease severity and coagulopathy in COVID-19 patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2021;13(1):e2021015.
126. Lapadula G, Leone R, Bernasconi DP, Biondi A, Rossi E, D'Angiò M, et al. Long pentraxin 3 (PTX3) levels predict death, intubation and thrombotic events among hospitalized patients with COVID-19. *Front Immunol.* 2022;13. Dostupno na adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.933960>
127. Doni A, Mantovani A, Bottazzi B, Russo RC. PTX3 regulation of inflammation,

- hemostatic response, tissue repair, and resolution of fibrosis favors a role in limiting idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Immunol.* 2021;12:676702.
128. Genç AB, Yaylaci S, Dheir H, Genç AC, İşsever1 K, Çekiç1 D, et al. The predictive and diagnostic accuracy of long pentraxin-3 in COVID-19 pneumonia. *Turk J Med Sci.* 2021;51(2):448–53.
129. Moulana Z, Bagherzadeh M, Mirzakhani M, Rostami A, Mohammadnia-Afrouzi M, Shahbazi M. Increased levels of serum pentraxin 3 in critical coronavirus disease-2019 patients. *Environ Sci Pollut Res.* 2022;29(57):85569–73.
130. Ke Y, Wu K, Shen C, Zhu Y, Xu C, Li Q, et al. Clinical utility of circulating pentraxin 3 as a prognostic biomarker in coronavirus disease 2019: A Systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Ther.* 2023;12(1):67–80.
131. Moar P, Tandon R. Galectin-9 as a biomarker of disease severity. *Cell Immunol.* 2021;361:104287.
132. Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J Immunol.* 1996;156(4):1572–7.
133. Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunol Rev.* 2009;230(1):172–87.
134. Dapat IC, Pascapurnama DN, Iwasaki H, Labayo HK, Chagan-Yasutan H, Egawa S, et al. Secretion of galectin-9 as a DAMP during Dengue virus infection in THP-1 Cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1644.
135. Caniglia JL, Asuthkar S, Tsung AJ, Guda MR, Velpula KK. Immunopathology of galectin-3: an increasingly promising target in COVID-19. *F1000Res.* 2020;9:1078.
136. Markovic SS, Gajovic N, Jurisevic M, Jovanovic M, Jovicic BP, Arsenijevic N, et al. Galectin-1 as the new player in staging and prognosis of COVID-19. *Sci Rep.* 2022;12:1272.
137. Cervantes-Alvarez E, la Rosa NL de, la Mora MS de, Valdez-Sandoval P, Palacios-Jimenez M, Rodriguez-Alvarez F, et al. Galectin-3 as a potential prognostic biomarker of severe COVID-19 in SARS-CoV-2 infected patients. *Sci Rep.* 2022;12:1856.
138. Bozorgmehr N, Mashhour S, Perez Rosero E, Xu L, Shahbaz S, Sligl W, et al.

- Galectin-9, a player in cytokine release syndrome and a surrogate diagnostic biomarker in SARS-CoV-2 infection. *mBio*. 2021;12(3):10.1128/mbio.00384-21.
139. Nguyen L, McCord KA, Bui DT, Bouwman KM, Kitova EN, Elaish M, et al. Sialic acid-containing glycolipids mediate binding and viral entry of SARS-CoV-2. *Nat Chem Biol*. 2022;18(1):81–90.
140. Nikitopoulou I, Vassiliou AG, Athanasiou N, Jahaj E, Akinosoglou K, Dimopoulou I, et al. Increased levels of galectin-3 in critical COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2023;24(21):15833.
141. Xudong X, Junzhu C, Xingxiang W, Furong Z, Yanrong L. Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung. *Life Sci*. 2006;78(19):2166–71.
142. Chen Y, Klein SL, Garibaldi BT, Li H, Wu C, Osevala NM, et al. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. *Ageing Res Rev*. 2021;65:101205.
143. Clarfield AM, Jotkowitz A. Age, ageing, ageism and ‘age-itation’ in the Age of COVID-19: rights and obligations relating to older persons in Israel as observed through the lens of medical ethics. *Isr J Health Policy Res*. 2020;9(1):64.
144. Farshbafnadi M, Kamali Zonouzi S, Sabahi M, Dolatshahi M, Aarabi MH. Aging & COVID-19 susceptibility, disease severity, and clinical outcomes: The role of entangled risk factors. *Exp Gerontol*. 2021;154:111507.
145. Cunha LL, Perazzio SF, Azzi J, Cravedi P, Riella LV. Remodeling of the immune response with aging: immunosenescence and its potential impact on COVID-19 immune response. *Front Immunol*. 2020;11:1748.
146. Asghari F, Asghary A, Majidi Zolbanin N, Faraji F, Jafari R. Immunosenescence and Inflammaging in COVID-19. *Viral Immunol*. 2023;36(9):579–92.
147. Silaghi-Dumitrescu R, Patrascu I, Lehene M, Bercea I. Comorbidities of COVID-19 Patients. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59(8):1393.
148. Sparks MA, South AM, Badley AD, Baker-Smith CM, Batlle D, Bozkurt B, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, COVID-19, and the renin-angiotensin system: pressing needs and best research practices. *Hypertension*. 2020;76(5):1350–67.
149. Kamyshnyi A, Krynytska I, Matskevych V, Marushchak M, Lushchak O. Arterial hypertension as a risk comorbidity associated with COVID-19 pathology. *Int J Hypertens*. 2020;2020:e8019360.
150. Sisniegues CEL, Espeche WG, Salazar MR. Arterial hypertension and the risk of

- severity and mortality of COVID-19. *Eur Respir J.* 2020;55(6). Dostupno na adresi: <https://erj.ersjournals.com/content/55/6/2001148>
151. Shylesh C M S, V S A, S K K, P UD. Renin-angiotensin system modulators in COVID-19 patients with hypertension: friend or foe? *Clin Exp Hypertens.* 2022;44(1):1–10.
 152. Singh AK, Khunti K. COVID-19 and Diabetes. *Annu Rev Med.* 2022;73:129–47.
 153. Vallianou NG, Evangelopoulos A, Kounatidis D, Stratigou T, Christodoulatos GS, Karampela I, et al. Diabetes mellitus and SARS-CoV-2 infection: pathophysiologic mechanisms and implications in management. *Curr Diabetes Rev.* 2021;17(6):e123120189797.
 154. Faruqi J, Balasubramanyam A. COVID-19 and diabetes mellitus: a review of the incidence, pathophysiology and management of diabetes during the pandemic. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2023;18(2):167–79.
 155. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Alblihed M, Guerreiro SG, Cruz-Martins N, Batiha GES. COVID-19 in relation to hyperglycemia and diabetes mellitus. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:644095.
 156. Pugliese G, Vitale M, Resi V, Orsi E. Is diabetes mellitus a risk factor for COroNaVirus Disease 19 (COVID-19)? *Acta Diabetol.* 2020;57(11):1275–85.
 157. Conte C, Cipponeri E, Roden M. Diabetes mellitus, energy metabolism, and COVID-19. *Endocr Rev.* 2024;45(2):281–308.
 158. Gammone MA, D’Orazio N. COVID-19 and obesity: overlapping of two pandemics. *Obes Facts.* 2021;14(6):579–85.
 159. Redinger RN. The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2007;3(11):856–63.
 160. Sattar N, McInnes IB, McMurray JJV. Obesity is a risk factor for severe COVID-19 infection. *Circulation.* 2020;142(1):4–6.
 161. Nakeshbandi M, Maini R, Daniel P, Rosengarten S, Parmar P, Wilson C, et al. The impact of obesity on COVID-19 complications: a retrospective cohort study. *Int J Obes.* 2020;44(9):1832–7.
 162. Simonnet A, Chetboun M, Poissy J, Raverdy V, Noulette J, Duhamel A, et al. High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. *Obesity.* 2020;28(7):1195–9.

163. Nukovic JA, Opancina V, Zdravkovic N, Prodanovic N, Pejicic A, Opancina M, et al. Brixia chest X-ray Score, laboratory parameters and vaccination status for prediction of mortality in COVID-19 hospitalized patients. *Diagnostics*. 2023;13(12):2122.
164. Wasim AU, Khan R, Khan MS, Mustehsan Z, Khan MW. Diagnostic accuracy of right bronchial infiltration on chest X-rays in diagnosing COVID-19 patients in the early stage of the disease. *Cureus*. 2022;14(3). Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9020274/>
165. Rousan LA, Elobeid E, Karrar M, Khader Y. Chest x-ray findings and temporal lung changes in patients with COVID-19 pneumonia. *BMC Pulm Med*. 2020;20(1):245.
166. Bae S, Kim Y, Hwang S, Kwon KT, Chang HH, Kim SW. New Scoring system for predicting mortality in patients with COVID-19. *Yonsei Med J*. 2021;62(9):806–13.
167. Jensen CM, Costa JC, Nørgaard JC, Zucco AG, Neesgaard B, Niemann CU, et al. Chest x-ray imaging score is associated with severity of COVID-19 pneumonia: the MBrixia score. *Sci Rep*. 2022;12(1):21019.
168. Brunetta E, Folci M, Bottazzi B, De Santis M, Gritti G, Protti A, et al. Macrophage expression and prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in COVID-19. *Nat Immunol*. 2021;22(1):19–24.
169. Perez-San Martin S, Suberviola B, Garcia-Unzueta MT, Lavin BA, Campos S, Santibañez M. Prognostic value of plasma pentraxin 3 levels in patients with septic shock admitted to intensive care. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243849.
170. Bottazzi B, Garlanda C, Teixeira MM. Editorial: The role of pentraxins: from inflammation, tissue repair and immunity to biomarkers. *Front Immunol*. 2019;10:2817.
171. Krishnamachary B, Cook C, Spikes L, Chalise P, Dhillon NK. The potential role of extracellular vesicles in COVID-19 associated endothelial injury and pro-inflammation. *medRxiv*. [Preprint] 2020; 2020.08.27.20182808. Dostupno na adresi: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.27.20182808v1>
172. Tatli O, Kurt NBK, Karaca Y, Sahin A, Aygün A, Sahin E, et al. The diagnostic value of serum pentraxin 3 levels in pulmonary contusion. *Am J Emerg Med*. 2017;35(3):425–8.
173. Baumert M, Surmiak P, Szymkowiak M, Janosz A. The assessment of pentraxin 3: a novel biomarker in early detection of infection in newborns. *Biomed Res Int*. 2021;2021:6638622.
174. Heusschen R, Griffioen AW, Thijssen VL. Galectin-9 in tumor biology: a jack of

- multiple trades. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1836(1):177–85.
175. Kapetanakis NI, Busson P. Galectins as pivotal components in oncogenesis and immune exclusion in human malignancies. *Front Immunol*. 2023;14:1145268.
176. Lai JH, Luo SF, Wang MY, Ho LJ. Translational implication of galectin-9 in the pathogenesis and treatment of viral infection. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2108.
177. Du L, Bouzidi MS, Gala A, Deiter F, Billaud JN, Yeung ST, et al. Human galectin-9 potently enhances SARS-CoV-2 replication and inflammation in airway epithelial cells. *J Mol Cell Biol*. 2023;15(4):mjad030.
178. Yeung ST, Premeaux TA, Du L, Niki T, Pillai SK, Khanna KM, et al. Galectin-9 protects humanized-ACE2 immunocompetent mice from SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol*. 2022;13:1011185.
179. Oatis D, Simon-Repolski E, Balta C, Miħu A, Pieretti G, Alfano R, et al. Cellular and molecular mechanism of pulmonary fibrosis post-COVID-19: focus on galectin-1, -3, -8, -9. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8210.
180. Martín-Quirós A, Maroun-Eid C, Avendaño-Ortiz J, Lozano-Rodríguez R, Valentín Quiroga J, Terrón V, et al. Potential role of the galectin-9/TIM-3 Axis in the disparate progression of SARS-CoV-2 in a married couple: a case report. *Biomed Hub*. 2021;6(1):48–58.
181. Atef M, Eid H, Amin M, Shehata M, Shaarawy A, Nabawy O, et al. Assessment of C-reactive protein levels as an indicator for lung infiltrates in patients with COVID-19 pneumonia. *J Med Life*. 2023;16(7):1028–31.
182. Fachri M, Hatta M, Widowati E, Akaputra R, Dwiyantri R, Syukri A, et al. Correlations between comorbidities, chest x-ray findings, and C-Reactive protein level in patients with COVID-19. *Ann Med Surg*. 2022;77:103553.
183. Marshall RP, Webb S, Bellingan GJ, Montgomery HE, Chaudhari B, McAnulty RJ, et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(5):646–50.
184. Itoyama S, Keicho N, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha LD, et al. ACE1 polymorphism and progression of SARS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323(3):1124–9.
185. Pati A, Mahto H, Padhi S, Panda AK. ACE deletion allele is associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and mortality rate: An epidemiological study in the

- Asian population. *Clin Chim Acta*. 2020;510:455–8.
186. Aung AK, Aitken T, Teh BM, Yu C, Ofori-Asenso R, Chin KL, et al. Angiotensin converting enzyme genotypes and mortality from COVID-19: An ecological study. *J Infect*. 2020;81(6):961–5.
187. Bellone M, Calvisi SL. ACE polymorphisms and COVID-19-related mortality in Europe. *J Mol Med (Berl)*. 2020;98(11):1505–9.
188. Delanghe JR, Speeckaert MM, De Buyzere ML. The host's angiotensin-converting enzyme polymorphism may explain epidemiological findings in COVID-19 infections. *Clin Chim Acta*. 2020;505:192–3.
189. Yamamoto N, Nishida N, Yamamoto R, Gojobori T, Shimotohno K, Mizokami M, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) 1 gene polymorphism and phenotypic expression of COVID-19 symptoms. *Genes*. 2021;12(10):1572.
190. Gómez J, Albaiceta GM, García-Clemente M, López-Larrea C, Amado-Rodríguez L, Lopez-Alonso I, et al. Angiotensin-converting enzymes (*ACE*, *ACE2*) gene variants and COVID-19 outcome. *Gene*. 2020;762:145102.
191. Karakaş Çelik S, Çakmak Genç G, Pişkin N, Açıkgöz B, Altinsoy B, Kurucu İşsiz B, et al. Polymorphisms of ACE (*I/D*) and ACE2 receptor gene (*Rs2106809*, *Rs2285666*) are not related to the clinical course of COVID-19: A case study. *J Med Virol*. 2021;93(10):5947–52.
192. Thakur S, Sharma V, Kaur D, Purkait P. Angiotensin-converting enzyme (*ACE*) insertion/deletion (*I/D*) polymorphism as a conjoint regulator of coagulation, fibrinolytic, and RAAS pathway in infertility and associated pregnancy complications. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2022;2022:1695769.

11. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije	
Ime i prezime:	Zdravka Krivdić Dupan
Datum rođenja:	29. siječnja 1980.
Državljanstvo:	Hrvatsko
Adresa:	Krndije 14, 31 000 Osijek
Telefon:	+385 915142833
E-mail:	zdravka.krivdic@gmail.com
Trenutno mjesto zaposlenja:	specijalist kliničke radiologije, subspecijalist neuroradiologije Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju, Klinički bolnički centar Osijek
Radno iskustvo	
Od listopada 2022.	subspecijalist neuroradiologije Klinički bolnički centar Osijek, Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju
Od studenog 2011.	specijalist radiologije OŽB Našice, Odjel radiologije
Od siječnja 2016.	specijalist radiologije Klinički bolnički centar Osijek, Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju
Od listopada 2020.	asistent u suradničkom zvanju i suradničkom radnom mjestu <i>Medicinski fakultet Osijek</i>
Od studenog 2007. do studenog 2011.	liječnik na specijalizaciji iz radiologije Klinički bolnički centar Osijek, Klinika za unutarnje bolesti
Od srpnja 2007. do listopada 2007.	liječnik u timu 1 izvanbolničke hitne medicinske pomoći Zavod za hitnu medicinu Osječko-baranjske županije

Od svibnja 2005. do svibnja 2006.	liječnik na pripravničkom stažu Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije
Obrazovanje	
Od studenog 2016.	Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo Medicinski fakultet Osijek
Od 2009. do 2010.	Sveučilišni stručni diplomski studij iz radiologije Medicinski fakultet Zagreb
Ostala znanja i vještine	
Jezici	materinski jezik: hrvatski jezik strani jezik: engleski jezik (razina C1)
Komunikacijske vještine	dobre komunikacijske vještine stečene kao višegodišnji predavači asistent pri radu sa studentima
Računalne vještine	osnove rada na računalu te osnovnim informatičkim računalnim programima

Projekti

1. Projekt „Transition“, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku – voditelj EU projekta prof. dr. sc. Ljiljana Majnarić Trtica, dr. med.
2. Institucijski projekt 2024 IP15, institucijski znanstveno-istraživački projekt Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. „Prognostički čimbenici i radiografska kvantifikacija plućnih promjena kod koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19)“, suradnik, voditelj projekta doc. dr. sc. Vlatka Periša
3. Institucijski projekt 2023., institucijski znanstveno-istraživački projekt Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. „Integrirani modeli kroničnih bolesti“, suradnik, voditelj prof. dr. sc. Ljiljana Majnarić
4. Institucijski projekt 2022., institucijski znanstveno-istraživački projekt Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, „Uloga članova obitelji miRNA-200 u cijeljenju kronične rane nakon lokalne primjene plazme obogaćene trombocitima“, suradnik, voditelj doc. dr. sc. Dalibor Divković, dr. med.
5. Institucijski projekt 2021. institucijski znanstveno-istraživački projekt Medicinskog

fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, „Smanjena psihološka otpornost na stres (Resilience) i kronična bolest starenja“, suradnik, voditelj projekta prof. dr. sc. Ljiljana Majnarić Trtica, dr. med.

Objavljeni znanstveni radovi

1. Tomic, Svetlana, Zjalić, Milorad, Popović, Zvonimir, Krivdic Dupan, Zdravka, Heffer, Marija, Mujkic, Darija, Mandic, Dario, Guljaš, Silva, Petrovic, Igor. (2024). Case report: Rapid-onset parkinsonism after a hornet sting. *Frontiers in Neurology*. 15. 1365199. 10.3389/fneur.2024.1365199.
2. Šapina M., Olujic B., Nađ T., et al. Real-time ultrasound-guided segmental bronchoscopic insufflation in a Tay-Sachs patient with atelectasis. *Pediatr Pulmonol*. 2024;1-3. doi:10.1002/ppul.26956
3. Kopačin, Vjekoslav, Zubcic, Vedran, Mumlek, Ivan, Mužević, Dari, Rončević, Alen, Lazar, Ana-Maria, Kvolik Pavić, Ana, Koruga, Anamarija, Krivdic Dupan, Zdravka, Martinović, Ivana, Koruga, Nenad. (2024). Personalized 3D-printed cranial implants for complex cranioplasty using open-source software. *Surgical Neurology International*. 15. 39. 10.25259/SNI_906_2023.
4. Trtica, L. M., Volarić, M., Kurevija, T. *et al.* Psycho-social and health predictors of loneliness in older primary care patients and mediating mechanisms linking comorbidities and loneliness. *BMC Geriatr* 23, 801 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12877-023-04436-6>
5. Guljaš, S.; Dupan Krivdić, Z.; Drežnjak Madunić, M.; Šambić Penc, M.; Pavlović O.; Krajina, V.; Pavoković, D.; Šmit Takač, P.; Štefančić, M.; Salha, T. Dynamic Contrast-Enhanced Study in the mpMRI of the Prostate—Unnecessary or Underutilised? A Narrative Review. *Diagnostics* 2023, 13, 3488. [hps://doi.org/10.3390/diagnostics13223488](https://doi.org/10.3390/diagnostics13223488)
6. Šapina M., Olujic B., Nađ T., et al. Bronchoscopic treatment of pediatric atelectasis: a modified segmental insufflation-surfactant instillation technique. *Pediatr Pulmonol*. 2023;1-7. doi:10.1002/ppul.26792
7. Rončević A., Koruga N., Soldo Koruga A., Debeljak Ž., Rončević R., Turk T., Kretić D., Rotim T., Krivdić Dupan Z., Troha D., Perić M., Šimundić T. MALDI Imaging Mass Spectrometry of High-Grade Gliomas: A Review of Recent Progress and Future Perspective. *Curr Issues Mol Biol*. 18 (2023) 45(2):838-51. doi: 10.3390/cimb45020055. PMID: 36826000; PMCID: PMC9955680.

8. Brlek, P.; Bulic, L.; Glavaš Weinberger, D.; Bošnjak, J.; Pavlović, T.; Tomic, S.; Krivdić Dupan, Z.; Boric, I.; Primorac, D. Successful Treatment of a Rare Cholesterol Homeostasis Disorder Due to CYP27A1 Gene Mutation with Chenodeoxycholic Acid Therapy. *Biomedicines* 2023, 11, 1430. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051430>
9. Kusić L., Mrđenović S., Gilman Kuric T., Zdravka Krivdić Dupan, Svetlana Tomić. Hereditary hemochromatosis and cervical dystonia – beyond the coincidence. *Acta neurologia Neurol Croat.* 68 (2023) 1
10. Špoljarić M., Jurić S., Perković R., Krivdić Dupan Z., Šnajder Mujkić D., Tomić S. A novel mutation in POLG gene in a patient with progressive external ophthalmoplegia with associated parkinsonism. *Neurol Croat* 68 (2023)1.
11. Cvijić, T, Canjko, I, Tomaš, I, Kralik, K, Perić, L, Kotromanović, D, Krivdić Dupan, Zdravka, Peić, A, Mimica, S. (2023). Real-world data on efficacy and safety of pembrolizumab in the first-line treatment of metastatic lung cancer in patients with PD-L1 expression >0% - a single center experience. *European review for medical and pharmacological sciences.* 27. 9213-9225. [10.26355/eurrev_202310_33949](https://doi.org/10.26355/eurrev_202310_33949).
12. Spoljaric, Mario, Krivdić Dupan, Zdravka, Kramaric, Ruzica, Guljaš, Silva, Tomic, Svetlana. (2023). Huntington-like disease caused by a novel RNF216/TRIAD3 pathogenic variant. *Rare.* 1. 100006. [10.1016/j.rare.2023.100006](https://doi.org/10.1016/j.rare.2023.100006).
13. Krivdić Dupan Z., Guljaš S., Periša V., Laslo D., Salha T., Koruga N. Hereditary hemorrhagic telangiectasia with bilateral pulmonary vascular malformations and a cerebral abscess as a complication: A case report. *Journal of Case Reports and Images in Surgery*, 8 (2022), 2: 4-8 [doi:10.5348/100105Z12ZD2022CR](https://doi.org/10.5348/100105Z12ZD2022CR)
14. Guljaš, S., Benšić M., Krivdić Dupan Z., Pavlović O., Krajina V., Pavoković D., Šmit Takač P., Hranić M., Salha T. Dynamic Contrast Enhanced Study in Multiparametric Examination of the Prostate - Can We Make Better Use of It? *Tomography*, 8 (2022) 3; 1509-152 [doi:10.3390/tomography8030124](https://doi.org/10.3390/tomography8030124)
15. Guljaš S., Bosnić Z., Salha T., Berecki M., Krivdić Dupan Z., Rudan S., Majnarić Trtica Lj. Lack of Informations about COVID-19 Vaccine: From Implications to Intervention for Supporting Public Health Communications in COVID-19 Pandemic. *International journal of environmental research and public health*, 18 (2021) 11; 6141, 15 [doi:10.3390/ijerph18116141](https://doi.org/10.3390/ijerph18116141)

Kongresna priopćenja, sažetci i poster

1. Krivdić Dupan Z, Štefančić M, Salha T, Nađ T, Damašek M, Mesić N, Prlić Seršić I,

- Kos M, Guljaš S, Neuroimaging and clinical findings of anti-MOG antibody-positive ADEM in children: a case series and literature review, ECR Beč, Austrija, ožujak 2024., poster presentation, DOI10.26044/ecr2024/C-22651
2. Guljaš S, Salha T, Krivdić Dupan Z, Štefančić M, Salha T, Šmit Takač P, Kaurinović A, The pearls and pitfalls of multiparametric magnetic resonance imaging for bladder carcinoma using VI-RADS categorisation- literature and pictorial review, ECR Beč, Austrija, ožujak 2024., poster presentation
 3. Krivdić Dupan Z, Guljaš S, Salha T, Opačak K, Jovanić T, Mesić N, Šmit Takač P; Pearls and pitfalls of artificial intelligence applications for extremity fracture detection in traumatic urgent care unit – literature and pictorial review, ECR Beč, Austrija, ožujak 2024., poster presentation
 4. Salha T, Guljaš S, Krivdić Dupan Z; Quantitative assessment of visceral and subcutaneous adipose tissue using MRI in correlation with chemerin blood levels- radiologist role in predicting metabolic syndrome, ECR Beč, Austrija, ožujak 2024., poster presentation
 5. Krivdić Dupan Z, Guljaš S, Šambić Penc M, Canjko I, Perić L, Belić D, Spajić S, Šmit Takač P, Salha T, Kovač Pejić AM, Cvijić T, Radiological and clinical findings of immunotherapy complications in patients treated with pemrolizumab in the first-line treatment of metastatic lung cancer in patients with PD-L1 expression > 0 %, HOK 2024., Šibenik, Hrvatska, travanj 2024., poster
 6. Guljaš S, Krivdić Dupan Z, Salha T, Šmit Takač P, Šambić Penc M, Canjko, Spectrum of true and false positive radiological imaging findings in lung screening programe at UHC Osijek, HOK 2024, Šibenik, Hrvatska, travanj 2024., poster
 7. Spajić S, Perić L, Flam J, Tomaš I, Belić D, Canjko I, Šambić Penc M, Kotromanović D, Krivdić Dupan Z, Seletković D, Systemic immune-inflammation index (SII) as a predictive value for complete pathological response after neoadjuvant therapy in breast cancer, HOK 2024., Šibenik, Hrvatska, travanj 2024., poster
 8. Belić D, Flam J, Šambić Penc M, Spajić S, Perić L, Tomaš I, Krivdić Dupan Z, Rončević R, Zagorac I, Vukoja A, Hertl V, Kasabašić M, The reliability of preoperative ultrasound evaluation of axillary lymph nodes in patients with breast cancer, HOK 2024., Šibenik, Hrvatska, travanj 2024., poster
 9. Cvijić T, Canjko I, Tomaš I, Šambić Penc M, Flam J, Perić L, Kotromanović D, Krivdić Dupan Z, Mimica S, Treatment outcomes of ALK positive metastatic non-small cell lung cancer – A small center experience, HOK 2024., Šibenik, Hrvatska, travanj 2024., poster

10. Šambić Penc M, Kovač Barić M, Flam J, Krivdić Dupan Z, Guljaš Z, Perić L, Cvijić T, Belić D, Spajić S, Seletković D, Canjko I – Neoadjuvant and adjuvant treatment of muscle-invasive bladder cancer, HOK 2024., Šibenik, Hrvatska, travanj 2024., predavanje
11. Canjko I, Kovač Barić M, Perić L, Krivdić Dupan Z, Cvijić T, Spajić S, Belić D, Seletković D, Flam J, Šambić Penc M, Integration of SBRT and immunotherapy in the treatment of early stage lung cancer, HOK 2024., Šibenik, Hrvatska, travanj 2024., predavanje
12. Krivdić Dupan Z, Guljaš S, Salha T, Mumlek I, Zubčić V, Štefančić M, Šambić Penc M, Kovačević M, Jurić T. Extracutaneous melanomas – the role of neuroimaging: a case series and literature review, Beč, Austrija, ožujak 2023., poster prezentacija
13. Guljaš S., Salha T., Krivdić Dupan Z., Pavlović O., Krajina V., Pavoković D., Hranić M., Šmit Takač P. Can we make better use of dynamic contrast enhanced (DCE) study in multiparametric examination of the prostate?, ECR 2023., Beč, Austrija, poster prezentacija
14. Canjko I., Kovač Barić M., Šambić Penc M., Perić L., Krivdić Dupan Z., Cvijić T., Flam J., Belić D. Implementation of immunotherapy in patients with contraindications for the same HOK 20. – 23. 4. 2023., Poreč, Hrvatska, predavanje
15. Šambić Penc M., Kovač Barić M., Canjko I., Krivdić Dupan Z., Flam J., Perić L., Cvijić T., Belić D. Advanced urothelial cancer, new treatment options, HOK 20. – 23. 4. 2023., Poreč, Hrvatska, predavanje
16. Perić L., Šambić Penc M., Canjko I., Flam J., Krivdić Dupan Z., Kotromanović D., Cvijić T., Spajić S. Dual immunotherapy for the treatment of metastatic kidney cancer in a patient undergoing hemodialysis HOK 20. – 23. 4. 2023., Poreč, Hrvatska, predavanje
17. Perić L., Rončević R., Krivdić Dupan Z., Čokolić Petrović D., Metikoš J., Koruga N., Rončević A. Case report: Neuroimaging features of idiopathic intracranial hypertension in pediatric patient OSCON 30.3. – 1. 4. 2023. Osijek, Hrvatska, poster
18. Štefančić M., Krivdić Dupan Z., Guljaš S., Kos M., Nađ T., Petrović Čokolić D., Vuksan A. Case report: Neuroimaging importance in the diagnosis of acute disseminated encephalomyelitis, OSCON 30.3. – 1. 4. 2023., Osijek, Hrvatska, poster
19. Metikoš J., Vidović, Krivdić Dupan Z., Biuk D., Barać J. Indirektna traumatska optička neuropatija izazovi u dijagnostici i liječenju, 22. kongres Hrvatskog oftalmološkog i optometrijskog društva 4. – 7. 5. 2023., Dubrovnik, Hrvatska, predavanje
20. Krivdić Dupan Z., Guljaš S., Mumlek I., Zubčić V., Neuroradiološka dijagnostika

- malignog melanoma kroz prikaz slučajeva, 4. znanstveni simpozij multidisciplinarnih timova za melanom, studeni 2023., Rovinj, Hrvatska, predavanje
21. Štefančić M, Krivdić Dupan Z, Pušeljčić I, Katić F, Guljaš S, Štimac D, Imaging i varijabilnost ektranodalnih limfoma regije glave i vrata – serija prikaza, 8. kongres Hrvatskog društva radiologa s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, listopad 2023., poster
 22. Guljaš S., Salha T., Krivdić Dupan Z., Ratković J., Šmit Takač P, The role of multiparametric resonance imaging in the detection of prostate cancer recurrence- pictorial review and review of the literature, 8. kongres Hrvatskog društva radiologa s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, listopad 2023., poster
 23. Guljaš S., Salha T., Krivdić Dupan Z., Ratković J., Šmit Takač P. , Biparametrijski ili multiparametrijski magnet prostate, pitanje je sad?, 8. kongres Hrvatskog društva radiologa s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, listopad 2023., predavanje
 24. Krivdić Dupan Z., Guljaš S., Štefančić M, Salha T., Kardum Ž., Prlić Sršić I. , RA – ILD varijabilnost intersticijskog uzorka na HRCT pluća, 8. kongres Hrvatskog društva radiologa s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, listopad 2023., poster
 25. Krivdić Dupan Z., Guljaš S., Štefančić M., Salha T, Radiološka obrada pacijenta u prijeoperacijskom postupku FESS-a i NESS-a – CT PNŠ, 8. kongres Hrvatskog društva radiologa s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, listopad 2023., predavanje
 26. Krivdić Dupan Z, Guljaš S, Štefančić M, Mumlek I, Zubčić V, CT diagnosis of the oral cavity and oropharynx cancer- the importance of radiological interpretation in treatment planning, 5. hrvatski neuroradiološki sastanak s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, prosinac 2023., predavanje
 27. Štefančić M, Krivdić Dupan Z, Neuroimaging pacijenta s glavoboljom uvjetovanom promjenama intrakranijskog tlaka – IIH vs SIH (prikazi slučajeva) 5. hrvatski neuroradiološki sastanak s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, prosinac 2023., predavanje
 28. Krivdić Dupan Z, Guljaš S, Salha , Damašek M, Kos M, Čokolić D, Franz L; Headache as a warning sign – the role of neuroimaging in pediatric patients with COVID-19 infection: a case series and literature review, Beč, Austrija, ožujak 2022., poster prezentacija
 29. Lazar AM, Zubčić V, Mumlek I, Kvolik Pavić A, Čokolić Petrović D, Kos M, Damašek M, Krivdić Dupan Z. Grisel's syndrome and Covid infection in children: two case reports // 26th EACMFS CONGRESS Madrid, Spain, 2022.

30. Krivdić Dupan Z., Canjko I., Guljaš S., Šarić G., Šambić Penc M., Prlić- Seršić I., Dumančić D. Spectrum of radiological imaging findings of immune-checkpoint blockade for lung cancer at University hospital centre Osijek, HOK travanj 2022., Opatija, Hrvatska, poster
31. Krivdić Dupan, Zdravka; Canjko, Ivana; Guljaš, Silva; Šarić, Gordan; Šambić Penc, Mirela; Rončević, Robert; Perić, Luka, Spectrum of radiological imaging findings of specific target therapy for lung cancer at University hospital center Osijek, HOK travanj 2022., Opatija, Hrvatska, poster
32. Perić L., Šambić Penc M., Canjko I., Flam J., Kovač Barić M. , Krivdić Dupan Z., Pušeljić N., Adjuvant treatment of testicular cancers, HOK travanj 2022., Opatija, Hrvatska, predavanje
33. Rončević R., Krivdić Dupan Z., Canjko I., Once unthinkable, today everyday life OSCON 2022., Osijek, Hrvatska, poster
34. Jurić I., Lucija T., Nika P., Jurić P., Vedrana Pavlović, Krivdić Dupan Z., Erić S., Squamous cell carcinoma of oropharyngeal carcinoma associated with human papillomavirus (HPV (+) OPSCC) – case report , OSCON 2022., Osijek, Hrvatska, poster
35. Štefančić M., Krivdić Dupan Z., Guljaš S., Radiološka obrada pacijenta u prijeoperacijskom postupku FRESSa i NESSa, Kongres mladih radiologa Srbije, studeni 2022., Beograd, Srbija, poster
36. Kos M, Tomac V, Damašek M, Krivdić Dupan Z, Stupin A, Drenjančević I, Pušeljić S, Jukić I. Does Mom cook the best? // 5. hrvatski kongres o hipertenziji s međunarodnim sudjelovanjem online, Zagreb, Hrvatska, 2021.
37. Dupan Krivdić Z, Guljas S, Čokolić Petrović D, Kos M. Type of brain lesions as potential predictor of neurobehavioural impairment in individuals with TSC"; ECR Beč, Austrija, 2021.; poster presentation//DOI10.26044/ecr2021/C-11873

Pozvani predavač na simpoziju/tečaju trajne izobrazbe liječnika

1. Krivdić Dupan Z, Moderne operacijske tehnike u kirurgiji glave i vrata, tema predavanja: CT i MR dijagnostika baze lubanje, Simpozij 17. 3. 2023., Osijek, Hrvatska KBC Osijek
2. Krivdić Dupan Z, CT PNŠ u prijeoperativnom postupku, Minimalno invazivna kirurgija paranazalnih šupljina i baze lubanje u KBC Osijek, 22. – 23. 9. 2021., Osijek, Hrvatska

Knjiga

1. Holik, Dubravka, Majnarić Trtica, Ljiljana; Noviji koncepti u gerijatrijskoj medicini i prevenciji za osobe starije dobi. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo, 2023.

Članstvo u znanstvenim društvima i udrugama

- Hrvatsko radiološko društvo (HDR)
- Hrvatsko neuroradiološko društvo (HDNR)
- Europsko radiološko društvo (ESR)
- Europsko neuroradiološko društvo (ESNR)
- Hrvatsko onkološko društvo (HOD)
- Hrvatsko društvo za bolesti glave i vrata Slavonije i Baranje (HDBGV)
- Hrvatski liječnički zbor (HLZ)
- Hrvatska liječnička komora (HLK)