

# Povezanost serumskih koncentracija biomarkera moždane ozljede i testosterona u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19

---

**Tokić, Daria**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:226977>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



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

**DARIA TOKIĆ, dr. med.**

**POVEZANOST SERUMSKIH KONCENTRACIJA BIOMARKERA MOŽDANE  
OZLJEDE I TESTOSTERONA U BOLESNIKA S TEŠKIM I KRITIČNIM  
OBLIKOM COVID-19**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2023.**

Ova doktorska disertacija izrađena je na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Split.

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

## **Zahvala**

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Koronavirusna bolest 2019. ....	2
1.1.1. Etiologija.....	2
1.1.2. Prijenos .....	3
1.1.3. Epidemiologija.....	3
1.1.4. Patogeneza .....	4
1.1.5. Klinička slika .....	7
1.1.6. Dijagnostika .....	9
1.1.7. Komplikacije.....	10
1.1.8. Liječenje.....	12
1.2. Biomarkeri moždane ozljede .....	16
1.2.1. Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein.....	17
1.2.2. Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1 .....	19
1.3. Testosteron.....	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	22
3. MATERIJALI I METODE .....	24
3.1. Dizajn.....	25
3.2. Ispitanici .....	25
3.3. Postupci .....	26
3.4. Statistički postupci.....	26
4. REZULTATI.....	27
4.1. Osnovne antropometrijske i kliničke karakteristike ispitanika.....	28
4.2. Razine GFAP i UCH-L1 tijekom boravka u JIL-u.....	29
4.3. Razine GFAP i UCH-L1 u bolesnika sa i bez razvijenih neuroloških manifestacija ....	32
4.4. Usporedba koncentracija biomarkera moždane ozljede i testosterona .....	34
4.5. Usporedba biomarkera moždane ozljede i testosterona između preminulih i preživjelih bolesnika.....	36
4.6. Korelacija serumskih razina biomarkera i visoko-osjetljivog troponina.....	38
5. RASPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČCI.....	47
7. LITERATURA.....	49
8. SAŽETAK.....	60
9. SUMMARY .....	63
10. ŽIVOTOPIS .....	66

## POPIS OZNAKA I KRATICA

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

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

**MERS** Bliskoistočni respiratorni sindrom (engl. *Middle East Respiratory Syndrome*)

**ACE2** Angiotenzin konvertirajući enzim tip 2 (engl. *Angiotensin-converting enzyme 2*)

**NF- $\kappa$ B** Nuklearni faktor kapa B, transkripcijski faktor (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

**TNF- $\alpha$**  Čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *Tumor necrosis factor-alpha*)

**ARDS** Akutni respiratorni distres sindrom (engl. *Acute respiratory distress syndrome*)

**JIL** Jedinica intenzivnog liječenja

**PCR** Lančana reakcija polimerizacije (engl. *Polymerase chain reaction*)

**GDF-15** Faktor diferencijacije rasta hormona 15 (engl. *Growth/Differentiation factor 15*)

**TGF $\beta$**  Transformacijski faktor rasta beta (engl. *Transforming growth factor beta*)

**PTSP** Posttraumatski stresni poremećaj

**RSV** Respiratorni sincicijski virus (engl. *Respiratory syncytial virus*)

**HFNC** Nosna kanila visokog protoka (engl. *high flow nasal canula*)

**NIV** Neinvazivna ventilacija (engl. *non-invasive ventilation*)

**NIPPV** Neinvazivna ventilacija s pozitivnim tlakom (engl. *noninvasive positive-pressure ventilation*)

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

**BiPAP** Dvofazni pozitivni tlak (engl. *Biphasic Positive Airway Pressure*)

**IPAP** Pozitivni inspiratorni tlak (engl. *Inspiratory Positive Airway Pressure*)

**EPAP** Pozitivni ekspiratorni tlak (engl. *Expiratory Positive Airway Pressure*)

**PEEP** Pozitivni tlak na kraju ekspiriraja (engl. *Positive end-expiratory pressure*)

**FDA** Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Drug Administration*)

**GFAP** Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein (engl. *Glial Fibrillary acidic protein*)

**UCH-L1** Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza (engl. *Ubiquitin C-terminal hydrolase L1*)

**GCS** Glasgow koma skala (engl. *glasgow coma scale*)

**NIHSS** Ljestvica moždanog udara Nacionalnog instituta za zdravlje (engl. *National Institute of Health Stroke Scale*)

**CMIA** Kemiluminiscentna imunokemijska metoda (engl. *Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay*)

**ICDSC** Bodovna ljestvica za procjenu delirija (engl. *Intensive Care Delirium Screening Checklist*)

**HHA** Hipotalamičko-hipofizno-adrenalna osovina

**GnRH** Gonadotropin-oslobađajući hormon

**TMPRSS2** Enzim transmembranske proteaze serin 2 (engl. *Transmembrane protease serine 2 enzyme*)

**BMI** Indeks tjelesne mase (engl. *Body mass index*)

## **1. UVOD**



## 1.1. Koronavirusna bolest 2019.

Pojavivši se u Wuhanu u Kini krajem 2019.godine, koronavirusna bolest 2019. (COVID-19), tada još nepoznata zarazna bolest u kratko vrijeme ujedinila je cijelu svjetsku znanstvenu zajednicu u potrazi za rješenjem. Zbog katastrofalnih posljedica i ekstremno brzog širenja bolesti, već u ožujku sljedeće godine Svjetska zdravstvena organizacija proglašava globalnu pandemiju, s čime ova bolest postaje najveći javnozdravstveni svjetski problem od pandemije gripe 1918. godine (1).

### 1.1.1. Etiologija

Coronavirus je pozitivni, jednolančani RNK virus iz obitelji *Coronaviridae*. Sam naziv duguje svom izgledu poput krune, vidljivu elektronskim mikroskopom (lat. *coronam* – kruna). Podobitelj kojoj pripada je *Orthocoronavirinae* a se ista dijeli u četiri roda: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Deltacoronavirus, Gammacoronavirus. Iako su domaćini različiti, ovi virusi često prelaze s vrste na vrstu te uzrokuju različite bolesti. Kod ljudi je do sada izolirano i dokazano sedam virusa iz ove mnogobrojne obitelji. Do posljednje globalne pandemije, daleko najpoznatiji predstavnici bili su SARS-CoV i MERS (2).

SARS-CoV-2, uzročnik COVID-19, novi je član roda Betacoronavirus. Iako samo podrijetlo virusa još uvijek nije razjašnjeno, jedna od teorija koja se trenutno zastupa je da se radi o prijenosu sa životinje (3, 4). Kao svi virusi, jedna od glavnih odlika SARS-CoV-2 je njegova sklonost mutacijama. Također, za vrijeme pandemije istaknulo se pet varijanti virusa sa značajnom infektivnošću i smrtnošću:

- Alpha: potvrđena u Ujedinjenom Kraljevstvu krajem 2020. godine nakon sekvencioniranja genoma uzoraka bolesnika pozitivnih na SARS-CoV-2 (5),
- Beta: potvrđena u Južnoj Africi u listopadu 2020., te se definira kao drugi val COVID-19 infekcije (6),
- Gamma: identificirana u Brazilu u prosincu 2020. godine, sa prvim zabilježenim slučajevima u SAD-u u siječnju 2021. godine (7),
- Delta: iako prvi put zabilježena u Indiji krajem 2020. godine, ova varijanta virusa je uzrokovala veliku stopu smrtnosti u Indiji u travnju 2021. godine. U SAD-u su prvi slučajevi identificirani u ožujku 2021. godine. Posebnost Delta varijante je njeno brzo globalno širenje čime je izazvala velik interes i zabrinutost Svjetske zdravstvene organizacije (8),

- Omicron: prvi put identificirana u Južnoj Africi u studenom 2021. godine, Omicron varijanta izazvala je poseban interes zbog svoje sklonosti mutacijama. Dokazano je preko 30 mutacija na proteinima virusa te infektivnost skoro tri puta veća od Delta varijante (9-11).

### **1.1.2. Prijenos**

Primarni način prijenosa virusa je kapljičnim putem (kihanje, kašljanje, govor) bliskim kontaktom sa zaraženim osobama (12). Ono što je izrazito bitno je da osobe koje prenose virus ne moraju imati simptome; one mogu biti asimptomatske ili presimptomatske. Istraživanja su pokazala kako virus može preživjeti i na površinama, kao što su na primjer plastika ili nehrđajući čelik, čak i do 72 sata (13). Različite studije pokazale su povezanost prijenosa virusa fekooralnim putem, ali i vertikalnim prijenosom s majke na dijete (14, 15). Iako su oba ova prijenosa moguća, u oba slučaja se radi o zanemarivom postotku.

Vremenski period inkubacije za COVID-19 je u rasponu od dva do četrnaest dana. Mnogi bolesnici su asimptomatski prijenosnici, zbog čega je sve do nedavno bila nužna izolacija svih kontakata zaraženih bolesnika (16).

### **1.1.3. Epidemiologija**

COVID-19 pojavila se u prosincu 2019. godine u gradu Wuhan u Kini. U vrlo kratkom vremenskom razdoblju dolazi do globalnog širenja virusa te Svjetska zdravstvena organizacija već u ožujku sljedeće godine proglašava globalnu pandemiju (17). Prema trenutnim podacima, ukupno je zabilježeno skoro sedam milijuna smrtnih slučajeva, što je, za usporedbu, gotovo dvostruko više od broja stanovnika Republike Hrvatske.

Iako je bolest dokazana u svim dobnim skupinama, kao posebno ugrožene skupine koje razvijaju teže posljedice bolesti pokazali su se bolesnici stariji od 60 godina te bolesnici s različitim komorbiditetima (kardiovaskularne bolesti, dijabetes, debljina, onkološki bolesnici, kronične plućne bolesti, pušači). Stokes i suradnici su pokazali kako navedeni bolesnici čak šest puta češće zahtjevaju bolničku skrb (18). Također, studije su pokazale kako su muškarci podložniji razvijanju težih oblika bolesti te da je smrtnost kod muškaraca veća u odnosu na žene (19).

#### 1.1.4. Patogeneza

Radi se o jednolančanom RNK virusu sa pozitivnom uzvojnicom. Sami virus se sastoji se od nekoliko proteina od kojih je za samu infekciju najvažniji protein S. Radi se o šiljastom proteinu (S kao *spike*, engl. *šiljak*) koji je odgovoran za vezanje na stanicu domaćina, točnije za receptor enzima koji konvertira angiotenzin tipa 2 (engl. *Angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) te putem njega ulazi u stanice domaćina (20). Prije vezanja na receptor, dolazi do cijepanja samog S proteina na dvije podjedinice (S1 i S2) (21). S1 omogućava virusu vezivanje na ACE2 receptor, dok S2 dovodi do prodora samog virusa unutar stanice domaćina (22, 23). Prilikom ulaska u stanicu, uz pomoć niza proteina dolazi do stvaranja autofagolizosoma koji prenose virusni materijal unutar stanice, potom do raspadanja samog autofagolizosoma, oslobađanja virusa te započinjanja proces replikacije. Nakon repliciranja virusa unutar stanice, isti se putem egzocitoze otpušta u organizam, te dolazi do daljnjeg širenja virusa (24). Osim samog izlaska iz stanice, SARS-CoV-2 izaziva i apoptozu stanica (25).

Iako je primarno mjesto ulaska virusa tkivo epitel respiracijskog sustava (točnije pneumociti tipa 2), sami ACE2 receptor se nalazi u brojnim drugim organima (srcu, mozgu, bubrezima, testisima, posteljici, krvnim žilama i crijevima) (26-29). Samim time, SARS-CoV-2 ulazi u sve gore navedene organe i organske sustave, što za posljedicu ima diseminaciju virusa i sistemsku infekciju.

Virus dovodi do apoptoze stanica, što uzrokuje kaskadni imunološki odgovor organizma. Pri samom ulasku SARS-CoV-2 u stanicu dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B, koji pokreće proizvodnju i lučenje brojnih faktora, kao što su TNF- $\alpha$ , interleukini 1 $\beta$ , 6 i 8, te time dolazi do pokretanja imunološkog odgovora (30, 31). Sami imunološki odgovor nije jedina specifičnost COVID-19. Naime, aktivacija imunološkog sustava je nužan odgovor organizma na vanjski podražaj, međutim, S1 protein je povezan sa povećanim lučenjem upalnih faktora i njihovim daljnjim pretjeranim odgovorom, što dovodi do razvoja citokinske oluje, ozljede stanice i narušavanja njenog integriteta (32, 33). Samim time, dolazi do pretjeranog izlučivanja upalnih faktora u cirkulaciju i posljedično u ostale organske sustave, što dovodi do sistemskog upalnog odgovora. Osim navedenih faktora upale, u plazmi bolesnika s COVID-19 zabilježen je porast i drugih citokina, kao što su interleukin 4, 10 i 18 (34, 35).

Gledajući isključivo plućno tkivo, nekoliko je mehanizama zbog kojih dolazi do ozljede. Na staničnoj razini dolazi po pretjeranog upalnog odgovora i lučenja proupalnih citokina. Iako pneumociti tip II čine svega 5% u ukupnom postotku epitelnih stanica alveola, zbog svog

fosfolipidnog omotača sudjeluju u proizvodnji prekursora za plućni surfaktant i matičnih stanica koje su prekursori pneumocita tip I (36). Pneumociti tip I su ključni za izmjenu plinova u plućnome tkivu (37). Zbog vezanja SARS-CoV-2 virusa na ACE2 receptor koji se dominantno nalazi na pneumocitima tipa II, dolazi do ozljede ovih stanica, te posljedično smanjene proizvodnje surfaktanta i pneumocita tipa I, s čime dolazi do povećanja površinske napetosti ali i do poremećaja u izmjeni plinova (38, 39).

Nadalje, za daljnje razumijevanje ozljede pluća potrebno je naglasiti važnost ozljede drugog ključnog sustava. Zbog toga što se ACE2 receptori nalaze i na stanicama krvnih žila, ove strukture prijeko potrebne za funkcioniranje cijelog organizma, tako i pluća, oštećuju se čime dolazi do pojave drugih komplikacija u respiracijskom sustavu. Naime, zdravi vaskularni endotel sadrži prirodne pro i antikoagulacijske faktore, čija svojstva održavaju kako integritet same krvne žile, tako i normalnu cirkulaciju u organizmu. Prodorom virusa u endotel vaskularnih struktura, dolazi do lučenja proupalnih citokina, oksidativnog stresa i narušavanja balansa između pro i antikoagulacijskih faktora, što za posljedicu ima ozljedu krvne žile, sklonost zgrušavanju te hipoperfuziju okolnog tkiva (40-42). U samom plućnom tkivu zbog navedenih ozljeda vaskularnih struktura, osim same hipoperfuzije, dolazi i do embolijskih incidenata, edema tkiva te u konačnici do konsolidacije plućnog tkiva, zbog kojeg dolazi do poremećaja odnosa ventilacije i perfuzije, povećanja mrtvog prostora i hipoksije (43).

Zbog prisutnosti ACE2 receptora u drugim organima u tijelu, COVID-19 nije isključivo respiratorna bolest. S obzirom da se u bubrezima ACE2 receptori nalaze u kanalnom sustavu, studije su pokazale da se SARS-CoV-2 može izravno vezati za ove strukture ključne za funkcionalnost bubrežnog sustava. Virus potom dovodi do oštećenja kanalića, propadanja njihovih stanica te glomerulopatije, a u nekim slučajevima i do akutnog bubrežnog zatajenja, koje je uglavnom povezano sa multiorganskim zatajenjem (44, 45).

Kod kardiovaskularnog sustava oštećenje se događa na nekoliko razina. Do oštećenja vaskularnih struktura dolazi izravno zbog vezanja virusa na stanice endotela i njihovog uništenja, te zbog citokinske oluje uzrokovane pretjeranim upalnim odgovorom. Što se tiče samog miokarda, nekoliko studija je opisalo mogućnost oštećenja miokarda izravno infekcijom, što dovodi do miokarditisa (46). Druga teorija je razvijanje akutnog koronarnog sindroma, zbog zahvaćenih krvnih žila i njihove tromboze, također uzrokovane gore opisanim mehanizmom. Nadalje, bitno je napomenuti kako zbog poremećaja bubrežnog sustava dolazi do elektrolitskog disbalansa (prvenstveno kalija) koji može biti okidač za aritmije (47-49).

Patogeneza oštećenja neurološkog sustava SARS-CoV-2 infekcijom može se objasniti dvojakim učinkom virusa na sam sustav. Naime, potrebno je razlikovati dvije bitne značajke samog virusa: neurotropnost i neuroinvazivnost (50). Neurotropnost virusa se može objasniti s pronalaskom samog virusa u olfaktornom živcu (51). Studije koje su analizirale tkiva dobivena *post mortem*, dokazale su pojavu virusa na olfaktornoj sluznici, samom olfaktornom živcu, ali i u dubokim moždanim strukturama kao što su produžena moždina i ganglion trigeminalnog živca (52). Ovi pronalasci govore u prilog tome da sam virus može uzrokovati neurološke manifestacije sa svojim direktnim prodorom u središnji živčani sustav. Druga bitna značajka je neuroinvazivnost (53). Ozljeda vaskularnih struktura SARS-CoV-2 ima posljedice u čitavom organizmu, a iznimka nije ni središnji živčani sustav. Naime, invazijom vaskularnih struktura u području mozga, dolazi do narušavanja krvno-moždane barijere i samim time, omogućen je prodir ne samo virusu u duboke moždane strukture, već i migrirajućim leukocitima i brojim drugim upalnim stanicama i faktorima koji za posljedicu imaju daljnje oštećenje moždanih struktura, uzrokujući brojne neurološke manifestacije i komplikacije (54-56). Studije su pokazale kako vezanje virusa na ACE2 receptor koji se nalazi na krvnoj žili dovodi do povećanja intraluminalnog tlaka koji uzrokuje rupturu krvne žile i moždano krvarenje (57). Nadalje, SARS-CoV-2 uzrokuje niz koagulacijskih poremećaja, te su moguća dva zapravo suprotna događaja; zbog trombocitopenije dolazi do pojave krvarenja intracerebralno, a zbog hiperkoagulacije do pojave tromboze u krvnim žilama te posljedično ishemijskih incidenata (58, 59).

S obzirom na visoku pojavnost ACE2 receptora na epitelu gastrointestinalnog sustava, ovaj organski sustav je također značajno pogođen SARS-CoV-2 infekcijom. Lamers i suradnici su na *in vitro* modelima istraživali prijenos virusa te pokazali kako se infekcija prenosi brzo sa stanice na stanicu, što za posljedicu ima stimulaciju gena za proizvodnju citokina i interferona (60). Ova studija je u skladu s ostalim istraživanjima koje su pokazale kako zaražene stanice gastroenterološkog sustava podliježu ne samo promjenama u smislu izlučivanja upalnih faktora, već i strukturalnim izmjenama (61). Naime, mikroskopski preparati biopsiranih stanica bolesnika s COVID-19 pokazali su blagu dilataciju u području kripte stanica debelog crijeva, te zvjezdoliki prikaz epitelnih stanica s gomilanjem jezgri, dok su stanice uzete iz područja dvanaesnika pokazale očuvanu arhitekturu ali sa mjestimičnim mrljastim krvarenjima (61, 62). Međutim, iako su promjene opisane i dokazane u stanicama gastroenterološkog sustava, pretpostavlja se kako je simptomatologija povezana s infekcijom SARS-CoV-2 prvenstveno sekundarna pojava zbog pojave upalnih citokina, ozljeda malih vaskularnih struktura i

hiperkoagulabilnosti (63). Naime, zbog tromboze malih krvnih žila dolazi do ishemijskih promjena u crijevima i ozljede epitelnih stanica (64). U gušterači, posebice u bolesnika s dijabetesom, zbog ekspresije ACE2 receptora u  $\beta$  stanicama, SARS-CoV-2 može dovesti do apoptoze ovih stanica te posljedično upale i pogoršanja inzulinske rezistencije (65).

### 1.1.5. Klinička slika

Iako je primarno mjesto ulaska virusa respiracijski sustav, samim time je očekivano kako će se kliničke manifestacije prvenstveno prezentirati s respiracijskim simptomima. Međutim, za bolje razumijevanje problematike, bolesnike je moguće podijeliti u nekoliko skupina s obzirom na razvijenost kliničke slike:

- Asimptomatska: bolesnici bez kliničkih manifestacija,
- Blaga: simptomi se mogu podijeliti u tipične (povišena temperatura, suhi kašalj, grlobolja, kihanje, glavobolja, anosmija, bol u mišićima) i atipične (mučnina, povraćanje, proljev, bol u abdomenu),
- Umjerena: bolesnici se prezentiraju s pneumonijom, povišenom temperaturom i suhim kašljem, te se simptomi mogu potvrditi radiološkom dijagnostikom, međutim zasićenost krvi kisikom ne pada ispod 94% na sobnom zraku,
- Teška: bolesnici se prezentiraju s dispnejom (frekvencija disanja je preko 30 respiracija u minuti), hipoksijom, proljevom, povraćanjem i mučninom, zasićenost krvi kisikom je ispod 94%,
- Kritična: tahidispneja, bol u prsištu, progresivno pogoršanje općeg stanja sa razvijanjem komplikacija kao što su aritmije i ozljede miokarda, respiracijski urušaj s razvojem akutnog respiracijskog sindroma i zatajenja, akutno zatajenje bubrega, rabdomioliza, encefalopatija, septički šok te u konačnici multiorgansko zatajenje (66).

Osim učestalih simptoma infektivne bolesti, kao što su grlobolja, povišena temperatura, mijalgija, umor i slično, jedan simptom se prometnuo kao gotovo patognomoničan za COVID-19. Anosmija (gubitak osjeta njuha) ili smanjena osjetljivost na mirise pokazala se kao prvi, a ponekad i jedini simptom COVID-19 (67). Iako se radi o prolaznom gubitku njuha, u nekim slučajevima anosmija perzistira kroz nekoliko tjedana, pa čak i mjeseci (68). Brojne studije iz 2020. godine pokazale su učestalost ovog simptoma, posebice na području Europe, Bliskog Istoka i Sjeverne Amerike (69, 70). Meta-analiza van Barthelda i suradnika iz 2020. godine koja je uključila 104 studije sa ukupno 38 198 bolesnika pokazala je kako je ukupna

prevalencija anosmije čak 43%. Nadalje, u istraživanje je bilo uključeno utjecaj dobi, spola i rase. Pokazali su da postoji razlika između bijelaca i azijata, gdje se pretpostavlja kako zbog varijacije i polimorfizma gena za ACE2 receptor, populacije kod kojih je izražen veći afinitet ACE2 receptora za vezanje virusa češće razvijaju anosmiju, što su u ovom slučaju bijelci kod kojih je prevalencija anosmije tri puta veća (71). Međutim, iako sve varijante virusa koriste isti receptor za vezanje na stanicu domaćina, pokazalo se kako ipak postoje razlike u učestalosti pojave anosmije u različitim vremenskim razdobljima. Naime, najveća prevalencija anosmije bilježila se u razdoblju od ožujka 2020. pa sve do srpnja 2021. godine (72). To vremensko razdoblje odgovara drugom valu pandemije, kada su dominantne varijante bile Alpha i Delta. S obzirom na učestalu pojavnost anosmije, taj simptom je postao gotovo krucijalan za distinkciju i izolaciju rizičnih širitelja bolesti s gotovo nikakvom simptomatologijom. Također, studije su pokazale kako su varijante virusa s mutacijom D614G imale najveću prevalenciju anosmije (73). Međutim, iako je i Omikron varijanta također imala ovu mutaciju, zanimljivo je kako je u razdoblju kada je Omikron bio dominantan, anosmija postala gotovo rijedak simptom. Jedno od objašnjenja koje se trenutno nudi je da Omikron ima nižu stopu vezanja na epitel olfaktornog sustava, čime zapravo ne dolazi do dovoljno jake upalne reakcije epitela i oštećenja stanica koje bi za posljedicu imalo pojavu anosmije (72).

Osim anosmije, neke od najčešćih kliničkih manifestacija COVID-19 su povišena temperatura, kašalj, zaduha, proljev, glavobolja i mijalgija (18, 74). Od neuroloških manifestacija osim glavobolje i već spomenute anosmije, zabilježeni su i poremećaji svijesti, encefalopatija, epileptični i neepileptični napadi, koma, vaskularni incidenti kao što su ishemije i krvarenja, te razne polineuropatije perifernih živaca, među njima najčešće Guillain-Barre sindrom (75-78).

S obzirom na pojavnost samog virusa u različitim organskim sustavima, klinička slika može varirati. Ono što je bitno istaknuti kao najtežu kliničku sliku COVID-19 je akutni respiratorni distress sindrom (ARDS) (79). ARDS se razvija kao posljedica obostrane upale pluća, višestrukog oštećenja i edema plućnog parenhima zbog infiltracije istog upalnim stanicama i proteinima upale. Prezantira se kao teška hipoksemija, sa omjerom parcijalnog tlaka kisika u arterijskog krvi naspram frakcije udahnutog kisika (P/F omjer) <300, tahipneja s frekvencijom disanja >30, te zasićenost krvi kisikom <92%. Tzotzos i suradnici su pokazali kako među hospitaliziranim bolesnicima s COVID-19 trećina (33%) razvije ARDS, četvrtina (26%) zahtjeva liječenje u JIL-u, 16% završi na mehaničkoj ventilaciji a 16% ima smrtni ishod. Od bolesnika u JIL-u, čak 75% razvije ARDS (80).

### 1.1.6. Dijagnostika

U punom jeku pandemije, svaka se respiratorna infekcija smatrala COVID-19 dok se ne bi dokazalo suprotno. Ponekad je na osnovu kliničke prezentacije bilo moguće zaključiti da se radi o bolesti, posebice za vrijeme dominantnih varijanti sa simptomima kao što je anosmija. Međutim, za pravu potvrdu bolesti potrebno je imati pozitivan PCR test. Polimerazna lančana reakcija (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) je visoko osjetljiva, visoko specifična metoda kojom se male količine DNK mogu umnožiti u veliki broj istih kopija. S obzirom na relativno jednostavnu upotrebu, ova metoda postala je zlatni standard dijagnostike SARS-CoV-2 infekcije (81). Način na koji se dobiva uzorak DNK je nazofaringealni ili orofaringealni bris. Ono što je nedostatak ove dijagnostičke metode je skup uređaj za očitavanje, nužnost educiranog osoblja za obavljanje i tumačenje pretrage te je sami postupak uzimanja brisa podložan ljudskoj pogrešci. Također, sami proces obrade traje od četiri do osam sati te se pokazalo kako je visok postotak lažno negativnih rezultata, te je isti, u korelaciji s kliničkom slikom, ponekad potrebno ponavljati. Dva serološka testa koja se koriste za detekciju virusa su brzi antigenski test te test na protutijela. Antigenski test je relativno jeftin, jednostavan za rukovanje te u svega 15 minuta pokaže rezultate na maloj pločici sa jednostavnim indikatorom koji promjeni boju. Njegov nedostatak je također ljudski faktor, gdje, ako bolesnik sam radi taj isti test kod kuće, moguće je manipulirati sa samom tehnikom uzimanja brisa (82). Test na protutijela mjeri razine IgG i IgM protutijela u serumu iz uzoraka krvi, te se na taj način može diferencirati radi li se o akutnoj infekciji ili pak preboljenoj bolesti (83).

Osim dijagnostičkih metoda koje detektiraju pojavnost virusa u organizmu, bitno je naglasiti radiološke metode koje u korelaciji s kliničkom slikom, mogu govoriti u prilog bolesti. Brojne studije govore u prilog tome kako slikovne dijagnostike, kao što su RTG i CT prsišta, mogu diferencirati COVID-19 od nekih drugih oblika pneumonije, posebice RTG, zbog ekonomičnosti, široke dostupnosti i sve više mobilnih uređaja koji na jednostavan način mogu doći u bolesničku sobu. Naime, ono što se primjetilo je kako kod infekcije SARS-CoV-2, odnosno razvijene COVID-19 pneumonije, dolazi do konsolidacije plućnog parenhima koje se na slikovnim metodama prezentira sa slikom „mliječnog stakla“ (84, 85).

Kroz cijelu pandemiju tražilo se neko laboratorijsko rješenje koje bi govorilo u prilog prognostičkim ishodima COVID-19. Standardne laboratorijske pretrage, kao što su C-reaktivni protein, laktat dehidrogenaza, koagulacijski parametri ali i stanice kao što su trombociti,



leukociti i limfociti, iako ne određuju klinički smjer bolesti, jasno govore o trenutnom stanju bolesnika i kakav je odgovor na terapiju. Osim standardnih pretraga, nekoliko se biomarkera istraživalo s ciljem pronalaska prognostičkog markera COVID-19. Jedan od istraživanih je i katestatin, svestrani pleomorfni peptid s brojnim imunomodulatornim svojstvima (86). Također, brojne studije su pokazale kako je GDF-15, član superobitelji TGF- $\beta$ , snažan prediktor negativnog ishoda bolesnika s COVID-19, gdje se događa značajan porast ovog biomarkera u serumu bolesnika kao odgovor na ozljedu tkiva (87). Nadalje, neki vitamini su se također istraživali u COVID-19, u nadi kako će se naći korelacija ili s prognozom ishoda, ili kao eventualna terapija. Među njima je na veliko istraživani vitamin D, gdje su brojne studije pokazale kako bolesnici s COVID-19 imaju nedostatak vitamina D, ali i njegovu potencijalnu zaštitnu ulogu od teških i kritičnih oblika COVID-19 (88).

### **1.1.7. Komplikacije**

Osim izrazito visoke stope smrtnosti, ono što je bitno naglasiti za ovu infektološku bolest su njene brojne komplikacije, koje ostavljaju dugoročne posljedice na svakodnevni život i zdravlje bolesnika. Iako je sami patofiziološki mehanizam dugoročnih posljedica za sada nepoznat, trenutna teorija objašnjava te posljedice kao rezultat ozljede tkiva uzrokovane samim virusom, ali i upalnim odgovorom organizma na virus (89). Nacionalni Institut za Zdravlje i Izvršnost Skrbi Ujedinjenog Kraljevstva utvrdilo je smjernice koje definiraju sljedeće: akutni COVID-19, koji obuhvaća simptome COVID-19 do četiri tjedna, zatim produljeni simptomatski COVID-19, koji obuhvaća simptome od četiri do dvanaest tjedana, te post-COVID-19 sindrom, koji obuhvaća simptome koji se razvijaju tijekom ili nakon akutne faze bolesti, traju duže od dvanaest tjedana, te se ne mogu objasniti niti potvrditi niti jednom drugom dijagnozom (90).

S obzirom da se radi o dominantno plućnoj bolesti, dugoročne posljedice koje se najčešće očekuju su vezane za ovaj organski sustav. Neke od njih su zaduha, fibroza, ovisnost o kisiku (bilo o oksigenatoru ili o respiratoru) te promjene u funkcionalnosti plućnog tkiva koje se prezentiraju izmjenjenim vrijednostima spirometrije i drugih funkcionalnih plućnih testova. Neke studije su pokazale kako zaduha može perzistirati dva mjeseca nakon preboljene bolesti kod do čak 50% bolesnika (91-93).

Kardiovaskularne komplikacije se također javljaju relativno često, posebice u bolesnika koji su zbog oblika bolesti zahtjevali bolničko liječenje. Prema studiji Carfi i suradnika, čak 21% bolesnika se žalilo na bol u prsištu 60 dana nakon otpusta iz bolnice (91). Također,

zabilježena je pojava tahikardija, miokarditisa te strukturalnih promjena koje je moguće utvrditi EKG-om i ultrazvukom srca, kao što je hipertrofija srčanog mišića (94). Nadalje, značajne komplikacije su i posljedica hiperkoagulabilnog stanja (koje se javlja zbog disfunkcije malih krvnih žila ali i zbog upalnih citokina) koje se prezentiraju kao razne arterijske i venske tromboze, vaskulitisi i vaskulopatije (95-97).

Kao jedan od glavnih fokusa ovog rada, neizostavno je osvrnuti se detaljnije na neurološke posljedice COVID-19. Dvojak učinak virusa (neurotropnost i neuroinvazivnost) uzrokuje brojne neurološke manifestacije u akutnoj bolesti, ali također, može uzrokovati brojne kratkoročne i dugoročne posljedice. Same neurološke manifestacije se mogu podijeliti u dvije kategorije; psihijatrijske - nesanica, zbunjenost, anksioznost, PTSP, depresija, zlouporaba narkotika, neuroza, psihoza; i neurološke - ishemijski moždani udar, intrakranijalna krvarenja, epileptični i neepileptični napadi, encefalopatija, encefalitis, periferne manifestacije kao što je Guillain-Barre sindrom i mijalgija (98-100). Ono što je također bitno spomenuti moguću povezanost COVID-19 i demencije, odnosno parkinsonisma. Iako još nema utvrđene veze između ova dva entiteta, moguće je za pretpostaviti kako bi u bolesnika koji su imali zabilježene neurološke manifestacije, posebice encefalopatiju, dugoročno moglo doći do razvoja demencije i sličnih stanja (101). Međutim, u ovom trenutku se još radi o spekulacijama, s obzirom na dugoročnost i sporo razvijanje ovakvih stanja. Pojava Guillain-Barre sindroma je neurološka komplikacija istraživana u bolestima uzrokovanih različitim patogenima, a COVID-19 nije iznimka. U dostupnoj literaturi, radi se uglavnom o prikazima slučaja bolesnika i preglednim člancima (78, 102). Iako sami mehanizam nastanka nije u potpunosti razjašnjen, nekoliko je teorija koje objašnjavaju pojavu ovog fenomena. Jedna od njih je neodgovarajući imunomodulatorni odgovor organizma na virus. Ova teorija se objašnjava pojavom različitih antitijela u serumu bolesnika ali i činjenicom kako, prema nekim studijama, čak 77,66% bolesnika uspješno reagira na terapiju imunoglobulinima i plazmaferezom (78).

Iako se ne radi o direktnoj komplikaciji, pojava sekundarnih infekcija u bolesnika s COVID-19 je ozbiljan problem, posebice u bolesnika hospitaliziranih u jedinicama intenzivnog liječenja (103). U skupinu sekundarnih infekcija spadaju i ko-infekcije (u trenutku aktivne COVID-19 bolesti) ali i superinfekcije (nakon same aktivne bolesti). Musuuza i suradnici su u meta-analizi u kojoj su obrađivani članci objavljeni od početka pandemije do 2021. godine kako je 19% bolesnika imalo ko-infekciju a 24% superinfekciju. Nadalje, u bolesnika liječenih u jedinicama intenzivnog liječenja, ova meta-analiza je pokazala kako je ko-infekcija dokazana u 16% bolesnika, a superinfekcija u čak 41% bolesnika. Najčešći uzročnici ko-infekcija su bili

virusi, a superinfekcija bakterije. Kod ko-infekcija najčešće prijavljeni virusi su bili Influenza tip A, tip B i RSV, najčešći bakterijski uzročnici bili su *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus* a od gljivičnih uzročnika se radilo o *Aspergillusu*. Što se tiče superinfekcija, od virusa je to bio Rhinovirus, od bakterija *Acinetobacter spp*, *Pseudomonas* i *E. coli* dok od gljivica se radilo o *Candida sp*. Ono što se može zaključiti je da su bolesnici u jedinicama intenzivnog liječenja podložniji sekundarnim infekcijama, što se može objasniti s mehaničkom ventilacijom ali i rezidentnim uzročnicima koji se često nalaze u jedinicama intenzivnog liječenja, te su takvim infekcijama posebno podložni dugoležeći imunokompromitirani bolesnici. Ono što je također ova meta-analiza pokazala je da su sekundarne infekcije povezane s lošijim ishodom, prvenstveno s višom stopom mortaliteta (104).

### 1.1.8. Liječenje

Na samom početku pandemije zbog nepoznanice o kakvom se virusu uopće radi, liječenje je bilo limitirano te uglavnom simptomatsko i eksperimentalno. Zbog potrebe za brzom prilagodbom i pronalaskom konkretnog lijeka ali i načina suzbijanja širenja virusa, veliki broj farmaceutskih tvrtki se fokusirao na ovaj problem. Do proizvodnje cjepiva, sprječavanje širenja virusa je bilo ograničeno na isključivo higijensko-epidemiološke mjere. Liječenje je uglavnom bilo usmjereno na borbu sa simptomima i komplikacijama.

S obzirom na uglavnom respiratornu simptomatologiju gdje su zaduha i hipoksija jedni od glavnih, oksigenoterapija je bila vodeći način borbe protiv COVID-19. Ovisno o kliničkoj slici, korišteni su različiti modaliteti oksigenoterapije, a neka osnovna podjela je na neinvazivnu i invazivnu terapiju. Kod nekih jednostavnijih oblika bolesti, gdje zasićenost krvi kisikom ne pada ispod 92% (osim bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti, kada se tolerira do 88%), najčešće se radilo o masci sa spremnikom, nosnim vilama ili Venturijevoj masci. Ukoliko bi došlo do progresije simptoma ili ne bi bilo odgovarajućeg odgovora na terapiju, primjenjivali bi se drugi modaliteti neinvazivne ventilacije kao što su nosne kanile visokog protoka (engl. *high flow nasal cannula*, HFNC), neinvazivna ventilacija (engl. *noninvasive ventilation*, NIV) te neinvazivna ventilacija s pozitivnim tlakom (engl. *noninvasive positive-pressure ventilation*, NIPPV) (105, 106). Najčešće korišteni modaliteti neinvazivne ventilacije s pozitivnim tlakom su modalitet s kontinuiranim pozitivnim tlakom (engl. *continuous positive airway pressure*, CPAP) i modalitet s dvofaznim pozitivnim tlakom (engl. *bilevel positive airway pressure*, BiPAP). Ono što je bitno za ove modalitete ventilacije je da pružaju potporu disanju bolesnika, gdje se omjer kisika u smjesi sa zrakom zadaje postavkama te se stvara

zatvorena petlja. CPAP se koristi u bolesnika koji dišu spontano ali nedostatno, s nekim zadanim tlakom (najčešće od 3 do 20 cmH<sub>2</sub>O) kroz cijeli respiracijski ciklus (udah i izdah). CPAP utječe na smanjenje hipoksije kroz alveolarni rekrutment, popravljajući ventilacijsko-perfuzijski odnos i komplijancu pluća. Za razliku od CPAP-a, BiPAP koristi dva različita tlaka; inspiratorni (IPAP), koji se isporučuje putem respiratora za vrijeme udaha, te ekspiratorni (EPAP), koji se isporučuje za vrijeme izdaha. EPAP je zapravo ekvivalentan pozitivnom tlaku na kraju izdaha (PEEP) koji se svakodnevno koristi u anesteziji. BiPAP je mod ventilacije koji se često koristi u kroničnim opstruktivnim plućnim bolestima, te se pokazalo kako u COVID-19 bolesnika s plućnim komorbiditetima može značajno utjecati na poboljšanje disanja. Također, BiPAP se kod COVID-19 pokazao kao bolji izbor kod respiracijske acidoze, pretilosti i zamora dišne muskulature (107).

U bolesnika kod kojih nije bilo uspješnog odgovora na neinvazivne metode dišne potpore, posebice kod teških i kritičnih bolesnika s razvijenim zatajenjem pluća, mehanička ventilacija je jedini izbor. Mehanička ventilacija je zlatni standard u jedinicama intenzivnog liječenja, posebno kod teških i životno ugroženih bolesnika, zatim poslijeoperacijski gdje je preporuka produžena sedacija, te nakon kardiopulmonalnih reanimacija (108). Brojne su studije istraživale mehaničku ventilaciju u COVID-19, kako utječe na samu dinamiku bolesti, vrijeme kada bolesnika priključiti na respirator, ali i o samim postavkama ventilacije koje će osigurati najoptimalnije rezultate za bolesnika (109). Na samom početku pandemije, s obzirom na nepoznatu patofiziologiju bolesti i mehanizme nastanka plućne ozljede, bolesnici s COVID-19 su se gledali kroz prizmu klasičnog ARDS-a, te se liječenje baziralo na liječenju prema smjernicama za ARDS. Međutim, kako je pandemija napredovala, sve je više bolesnika zahtjevalo mehaničku potporu disanju, samim time se nametnila i potreba za daljnim istraživanjem i pronalaskom adekvatnog mehanizma liječenja. Kod ARDS-a uzrokovanog drugom etiologijom, ozljeda pluća (koje se procjenjuje po Berlinskoj definiciji) je proporcionalna težini bolesti, odnosno razini plućnog edema i ukupno manjem plućnom volumenu koji sudjeluje u izmjeni plinova (110). U COVID-19 ozljeda pluća je zbroj raznih kompleksnih patofizioloških mehanizama o kojima je već bilo govora. Pretjerani upalni odgovor, ozljeda vaskularnih struktura, promjene na staničnoj osnovi zbog disregulacije ACE2, samo su neki od faktora koji sudjeluju u plućnoj ozljedi, te sama procjena razine iste nije istovjetna procjeni kod ARDS-a druge etiologije. Samim time, neke promjene u ventilaciji tih bolesnika su bile nužne za uspješan terapijski odgovor (111).

Kada je riječ o teškim oblicima COVID-19, neizostavno je spomenuti pronacijski položaj. Položaj na prsima se pokazao kao dobar pokušaj za smanjenje hipoksemije ne samo u bolesnika na mehaničkoj ventilaciji, već i u budnih bolesnika sa održanim spontanom disanjem. Patofiziološka osnova kojom se objašnjava uspješnost ovog položaja je rektrutment plućnog tkiva, povećanje nezavisne plućne mase (u supinacijskom položaju čak je 60% tkiva ovisno o položaju, dok je u pronacijskom 40%, što znači da je više plućne mase dostupno za izmjenu plinova), smanjenje rigiditeta prsnog koša zbog čega dolazi do smanjenja mrtvog prostora, čime je veća površina plućnog tkiva dostupna za izmjenu plinova. Svi ovi mehanizmi zapravo govore u prilog tome da se pronacijskim položajem ukupno povećava plućno tkivo dostupno za izmjenu plinova, što je od krucijalne važnosti kod plućnog tkiva sa razvijenom COVID-19 pneumonijom (112, 113).

Na samom početku pandemije, izbor medikamentozne terapije je bio ograničen uglavnom na simptomatsko liječenje COVID-19. S obzirom na infektološko podrijetlo bolesti, istraživanja su bila usmjerena na pronalazak antiviralnih lijekova i cjepiva, dok se istovremeno ispitalo uspješnost liječenja poznatim i dostupnim lijekovima. Također, radi se o bolesti s jakim upalnim imunološkim odgovorom, te se korištenjem raznih kombinacija protuupalnih i imunomodulatornih lijekova pokušalo postići terapijski odgovor. Od imunomodulatornih lijekova na prvom mjestu su kortikosteroidi (114). Velika randomizirana studija pokazala je kako je upotreba Dexametasona rezultirala smanjenjem smrtnosti u razdoblju od 28 dana u bolesnika na mehaničkoj ventilaciji, čime je ovaj lijek postao standard za liječenje COVID-19 (115). Od ostalih imunomodulatornih lijekova koji se koriste u imunološkim bolestima pokušao se postići valjani terapijski odgovor. Međutim, neki od njih su kroz pandemiju pokazali kako nemaju značajniji utjecaj na ishod liječenja, kao što su Interferon- $\beta$ -1a, Anakinra (antagonist Interleukina 1), Tocilizumab, Sarilumab, Baricitinib, Ruxolitinib i Tofacitinib (116, 117). Nekoliko randomiziranih kontroliranih studija je rađeno u nadi kako će neki od navedenih lijekova biti ključan za imunomodulatorni odgovor kod COVID-19, međutim (iako su neke studije još u tijeku) dosada nisu zapaženi značajniji rezultati.

Od antiviralnih lijekova nekoliko se prometnulo u obećavajuće agente za prevenciju ili liječenje COVID-19; Remdesivir, antivirotik širokog spektra odobren je od strane FDA za kliničku upotrebu kod djece i odraslih za liječenje bolničkih blagih i umjerenih COVID-19 bolesnika (118). Međutim, studije su pokazale kako Remdesivir nema značajan utjecaj na smanjenje smrtnosti, potrebu za mehaničkom ventilacijom ili dužinu boravka u bolnici, posljednji među njima Cochraneov sustavni pregledni članak (119). Iako, Gottlieb i suradnici

su u randomiziranoj studiji rađenoj na 562 bolesnika pokazali kako trodnevna upotreba Remdesivira može smanjiti potrebu za hospitalizacijom za čak 87% u odnosu na placebo (120). Ono što je također bitno napomenuti je da postoje lijekovi za koje ne postoje nikakve kliničke indikacije za upotrebu protiv COVID-19, ali zbog snažnog javnog odgovora i, recipročno protivljenja struke, u nekim trenucima prometnuli su se kao čudotvorni lijek protiv COVID-19. Jedan od takvih lijekova je i Ivermektin, antiparazitni lijek za kojeg je jedna *in vitro* studija pokazala da sprječava replikaciju SARS-CoV-2 u organizmu. Međutim, Cochraneov sustav pregledni članak koji uključuje 14 studija s ukupno 1678 bolesnika pokazao je kako nijedna studija nije dokazala učinkovitost Ivermektina u liječenju COVID-19 (121).

U virusnim bolestima koje izazivaju imunosni odgovor organizma liječenje se usmjerilo na specifična protutijela kako bi se neutralizirali antigeni samog virusa. S obzirom da SARS-CoV-2 izaziva snažan imunosni odgovor, specifična protutijela su se također nametnula kao predmet istraživanja. Jedan od pristupa liječenju je terapija plazmom bolesnika koji su se oporavili od COVID-19, gdje su studije procijenile kako je potrebno uzeti plazmu od tri bolesnika koji su se oporavili, kako bi količina protutijela za liječenje akutnih bolesnika bila dovoljna. Ova istraživanja su uglavnom provedena na manjim skupinama bolesnika ali su sve pokazale uspješne rezultate u terapiji plazmom u kombinaciji s imunoglobulinima. Meta-analiza objavljena u ožujku ove godine uključila je ukupno 13 studija, od kojih je samo jedna bila randomizirano kontrolirano istraživanje, pokazala je kako liječenje plazmom bilo povezano s ukupnim smanjenjem mortaliteta, međutim, i dalje se radi o prilično limitiranim podacima (122).

Prijelomni trenutak u pandemiji se može smatrati pojava prvog cjepiva. Od tada je postalo moguće ne samo zaštititi populaciju standardnim higijensko-epidemiološkim mjerama, već sustavnim procjepljivanjem dovesti do kraja pandemije. Prema dostupnim podacima, do 2022. godine za istraživanje je odobreno 334, a u kliničkoj fazi ispitivanja je bilo 140 cjepiva (123). Od odobrenih cjepiva dostupnih za prodaju neki od njih su dobro poznati, kao što su vektorska cjepiva i inaktivna komponenta virusa. Međutim, ono što je izazvalo najveću pozornost ne samo znanstvene zajednice već i javnosti općenito su RNA cjepiva. Virusni vektori su se uglavnom koristili u genskoj terapiji, ali posljednjih 25 godina se koriste u razvoju cjepiva. Dosada su to uglavnom bila cjepiva za adenoviruse, herpes viruse, alfaviruse, ali i za ospice i variolu. Prednosti ovakvih cjepiva su dugotrajna imunost, međutim kod virusa koji imaju veliku sklonost mutacijama, može doći do mutacija kod same proizvodnje cjepiva. Za

COVID-19 najpoznatija vektorska cjepiva su Sputnik V i Janssen, posebno zbog toga što se primjenjuje samo jedna doza, te Oxford AstraZeneca, gdje se primjenjuju dvije doze (123-127).

Cjepiva koja koriste genetski materijal, kao što su RNA i DNA cjepiva, izazivaju poseban interes iz više razloga. RNA molekule su u opticaju kao razvojne i terapijske molekule preko 20 godina. Međutim, korištenje mRNA kao cjepiva dugo nije bilo razmatrano kao opcija zbog preosjetljivosti materijala na razgradnju. Nakon dugogodišnjih ispitivanja, danas je dostupno nekoliko mRNA cjepiva za infektivne uzročnike bolesti, kao što su Zika virus, cytomegalovirus, parainfluenza virus, influenza virus, pa čak i za neke karcinome (128). Prednost ovakvih je cjepiva je jednostavna i brza proizvodnja (129). Temeljni princip mRNA cjepiva je isporuka prijepisa gena koji kodira ciljani antigen. Sinteza RNA može odmah započeti na istoj platformi čim sekvenca koja kodira antigen postane dostupna, a proces se može lako skalirati i bez stanica, zahtijevajući minimalnu promjenu platforme tijekom formulacije i proizvodnje mRNA. Također, mRNA je sigurniji vektor od DNA jer se radi o prijepisu manje sekvence, i ne interferira sa genomom domaćina (130). Nedostatci ovakvog cjepiva su osiguravanje uvjeta za čuvanje i prijenos. Za očuvanje integriteta mRNA cjepiva potrebne su izrazito niske temperature, čime je otežan transport u zemlje u toplijim krajevima i neadekvatnim spremištima (131, 132). Međutim, testiranja su pokazala kako COVID-19 mRNA cjepiva ostaju stabilna do 24 sata na sobnoj temperaturi. Najčešće korištena mRNA cjepiva su proizvodi Pfeizera i Moderne, a oba sadrže sekvencu cijelog proteina S SARS-CoV-2 (133).

## **1.2. Biomarkeri moždane ozljede**

Prema FDA, biomarkeri se definiraju kao „objektivni indikatori normalnih bioloških procesa, patoloških procesa, odgovor na izlaganje raznim intervencijama, uključujući i terapijske“ (134). Mjerenje vrijednosti biomarkera se može izvesti različitim molekularnim, radiološkim i histološkim metodama. Njihova vrijednost može biti indikator različitih događaja i prema tome oni mogu biti dijagnostički, prognostički ili prediktivni čimbenici. Genetski biomarkeri se koriste za procjenu rizika razvijanja određenih nasljednih bolesti (135).

Biomarkeri moždane ozljede su heterogena skupina biomarkera čija se varijabilnost očituje kroz njihovu kliničku implikaciju. Različiti biomarkeri moždane ozljede u kliničkoj praksi služe kao dijagnostički ili prognostički čimbenici različitih stanja koji dovode do moždane ozljede, bili oni traumatski ili netraumatski. Većina ovih biomarkera se uglavnom nalazi i koristi za analizu iz tjelesnih tekućina, kao što su krv, serum, cerebrospinalni likvor, a

u novije vrijeme i iz sline, posebice zbog neinvazivnog načina dobivanja uzorka za analizu. Za ovu disertaciju su ključna dva biomarkera, a to su GFAP i UCH-L1.

### 1.2.1. Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein

Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein (engl. *glial fibrillary acid protein*, GFAP) je intermedijarni filament dug 8-9 nm pronađen gotovo isključivo u zrelih astrocitima središnjeg živčanog sustava (SŽS), nemijeliziranim Schwannovim stanicama, fibroznim tračcima perifernih živaca te u glijalnim stanicama crijevnog živčanog sustava. Astrociti su najbrojnija skupina stanica u moždanom tkivu, gdje je njihova funkcija dvojaka; strukturalna - osiguravajući potporu tkivu, i funkcionalna - reciklirajući neurotransmitere poput glutamata koji je nužan za uredno funkcioniranje neurona (136). Također, ta strukturalna uloga je ključna za održavanje i funkcionalnost krvno-moždane barijere.

Kao glavni protein astrocita, GFAP je ključan za ulogu astrocita. Prvi put ga je izolirao i opisao dr. Eng 1969.g, te je od tada postao predmet brojnih istraživanja (137). Kao i u astrocitima SŽS, GFAP u glijalnim stanicama crijevnog živčanog sustava ima potpurnu ulogu subepitelnim glijalnim stanicama koje su nužne za neuromodulatornu funkciju ovog sustava, kao što su mobilnost crijeva i sekrecija (138). Za GFAP postoji samo jedan gen na 17 kromosomu. Dosada je nađeno ukupno 10 izoformnih varijanti, od kojih je najdominantniji GFAP- $\alpha$  koji se nalazi u mozgu i kralježničnoj moždini dok GFAP- $\beta$  najprisutniji u nemijeliziranim Schwannovim stanicama. Mutacija gena za GFAP uzrokuje autosomno dominantno nasljednu Alexanderovu bolest, karakteriziranu patološkim nakupljanjem proteinskih depozita koji se nazivaju Rosenthalova vlakna (136). Međutim, ono što je specifično je kako se uglavnom u većini slučajeva radi o slučajnim mutacijama gena. Ono što je također zanimljivo je kako se osim mutiranih varijanti GFAP, neke izoformne varijante se nakupljaju u području piramidalnih neurona hipokampusa u bolesnika s Downovim sindromom.

Kod ozljeda moždanog tkiva dolazi do procesa „reaktivne astroglioze“, odnosno stanične hipertrofije i proliferacije (137). Zbog stanične hipertrofije dolazi do povećanja u veličini ali i ekspresiji proteina. S obzirom da je moždana ozljeda kompleksan patofiziološki proces zbog kojeg dolazi do upale i posljedične aktivacije upalnog odgovora, astrociti proliferiraju u oštećeno područje s ciljem održavanja tkivnog integriteta, što za posljedicu ima povišene razine GFAP-a (139). Iako je moždana trauma uglavnom povezana s ozljedom i smrću



neurona, s obzirom na to da glavninu stanica u moždanom tkivu čine upravo astrociti, pretpostavlja se kako su i oni podložni promjenama (kako mehaničkim tako i kemijskim) u sklopu moždane traume te da upravo te promjene za posljedicu imaju niz neurodegenerativnih poremećaja (140). Kod studija provedenih na animalnim modelima je pokazano kako se patološke promjene nakon akutnih neurotrauma u mozgu i kralježničkoj moždini odvijaju upravo u glijalnim stanicama (141). Osim akutnih moždanih trauma, ovakva nakupljanja GFAP-a su zabilježena i kod Parkinsonove bolesti, gdje su posljedice rezultat dugoročnih promjena moždanog tkiva (142).

Kliničke implikacije ovog proteina su brojne. Studije su pokazale kako kod akutnog ishemijskog moždanog udara također dolazi do astroglioze, samim time do porasta koncentracije GFAP-a, a zbog narušavanja krvno-moždane barijere, povišene vrijednosti ovog biomarkera se mogu pratiti u serumu i cerebrospinalnom likvoru (135). Observacijska studija iz 2021. godine pratila je razine GFAP-a u bolesnika s akutnim ishemijskim moždanim udarom. Bolesnici su na osnovu Ljestvica moždanog udara Nacionalnog instituta za zdravlje (engl. *NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale*) ljestvice bili podjeljeni u tri skupine; blagi, umjereni i teški neurološki deficit. Rezultati ove studije su pokazali snažnu pozitivnu korelaciju između razina GFAP-a i razvijenosti neurološkog deficita (143). Ova i slične studije govore u prilog tome kako mjerenje razina GFAP-a može služiti kao dijagnostički ali i prognostički kriterij. Ono što je također zanimljivo je da kod hemoragijskih moždanih udara zbog direktno narušene krvno-moždane barijere razine ovog proteina rastu već unutar 2 do 6 sati od same ozljede, dok kod ishemijskih moždanih udara povišene razine GFAP-a će se zabilježiti nakon 8 sati, sa vrhuncem nakon 48-72 sata (144). To se objašnjava s održanim integritetom krvno-moždane barijere duže kod ishemijskog moždanog udara, gdje nekroza oštećenih moždanih stanica nastupa otprilike 6 do 12 sati od začepjenja krvne žile. Hansen i suradnici su u studiji iz 2019. godine istraživali razine GFAP-a kod 36 neonatusa sa kongenitalnim srčanim greškama koje zahtjevaju kirurško liječenje. Rezultati njihove studije su pokazale kako je GFAP bio povišen u skoro 50% operiranih bolesnika te da je taj rezultat povezan sa moždanom oksigenacijom, odnosno svi bolesnici koji su imali povišeni GFAP imali su nižu moždanu oksigenaciju za vrijeme same operacije (145). Ovakva studija ima veliki budući potencijal u dugoročnom praćenju operiranih bolesnika te eventualnih posljedica u bolesnika s povišenim razinama GFAP-a. Meta-analiza iz 2021. godine promatrala je rezultate studija koje su mjerile razine GFAP-a u bolesnika s multiplom sklerozom. U analizu je bilo uključeno 11 kliničkih studija te ukupno 960 bolesnika, gdje su rezultati pokazali kako ukupno 503 bolesnika s

multiplom sklerozom ima povišene razine GFAP-a u cerebrospinalnom likvoru u odnosu za kontrole. Također, više razine ovog biomarkera su zabilježene u bolesnika s progresivnom bolesti nego u bolesnika s relapsima bolesti, čime se GFAP može biti izrazito koristan kao marker progresije bolesti (146).

### 1.2.2. Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1

Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1 (engl. *ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*, UCH-L1) je jedan od najzastupljenijih proteina u neuronima mozga. Sastoji od svega 223 aminokiseline, a procjenjuje se kako čini 1-5% u ukupnom postotku neuronalnih proteina. Radi se o globularnom proteinu koji sadrži očuvanu katalitičku domenu superobitelji peptidaze C12 s vrlo kratkim N- i C-terminalnim produžecima. 3D struktura UCH-L1 se opisuje kao dva reznja sastavljena od  $\alpha$  uzvojnica koje okružuju hidrofobnu jezgru sastavljenu od  $\beta$  lanca (147). *In vitro* studije su pokazale da uklanjanje svega nekoliko aminokiselina može destabilizirati cijelu strukturu proteina čime dolazi do odmotavanja uzvojnica i izlaganja hidrofobne jezgre. Uklanjanje 11 aminokiselina sa N-produžetka dovodi do gubitka afiniteta za ubikvitin čime dolazi do gubitka formacije samog proteina (148-150). Na staničnoj razini ovaj protein pokazuje jednolično bojanje u citoplazmi u neuronima cijelog mozga (151). Osim u mozgu, UCH-L1 se rijetko nalazi u zdravim tkivima. U malim količinama se ovaj protein nalazi u gonadama te u fibroblastima za vrijeme cjeljenja rane. Ono što je zanimljivo je kako se UCH-L1 može nalaziti u stanicama karcinoma, kao što su karcinom gušterače, karcinom prostate te invazivni karcinom dojke (152-154). Također, prisutan je u velikim senzornim i motoneuronima (155).

Iako točna funkcija UCH-L1 nije u potpunosti poznata, ono što se zna je da nije nužan za razvoj neurona, ali poznato je da je ključan u održavanju aksonalnog integriteta. Također, UCH-L1 sudjeluje u homeostazi te ima proteosomalnu i lizosomalnu funkciju (156, 157). Studija rađena na animalnim modelima pokazalo je kako mutacija gena za UCH-L1 dovodi do degeneracije presinaptičkih krajeva na neuromuskularnoj spojnici, gubitka aksonalnog integriteta i nakupljanja depozita slobodnog ubikvitina i amiloid  $\beta$  proteina (A $\beta$ ) (158). Zbog svoje pojavnosti gotovo isključivo u mozgu, ovaj protein se smatra moždanim biomarkerom te se njegov porast može pratiti kod brojnih neurodegenerativnih bolesti, ali i kod ozljede moždanog tkiva. Kod neurodegenerativnih bolesti, kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, dolazi do oksidativnih promjena strukturalnih proteina mozga, zbog čega dolazi do nakupljanja rezidualnih produkata raspadanja. Iako sami mehanizam još uvijek nije razjašnjen, pretpostavlja se da zbog ozljede neurona dolazi do strukturalne pogreške kod UCH-L1 te

posljedičnog nakupljanja proteina u dopaminskim neuronima u bolesnika s Parkinsonovom bolešću (159).

Iako je UCH-L1 otkriven prije 20ak godina, istraživanja su uglavnom bila usmjerena na njegovu povezanost s neurodegenerativnim bolestima, dok se u traumama mozga počeo istraživati relativno nedavno, čemu u prilog govore studije uglavnom objavljene kroz prošlo desetljeće. Jedna od prvih je studija Mondelle i suradnika koji su pokazali kako razine UCH-L1 direktno koreliraju s moždanom ozljedom i ozbiljnosti iste. Njihova je studija također pokazala kako u prvih 12 sati od moždane ozljede bolesnici sa GCS 3-5 imaju značajno više razine UCH-L1 u odnosu na bolesnike sa GCS 6-8. Također, pokazali su kako su bolesnici sa smrtnim ishodom imali značajno više razine UCH-L1 u odnosu na preživjele (160). Sve ovo govori u prilog tome kako ne samo da je UCH-L1 vrijedan marker moždane ozljede, već ima snažan potencijal kao dijagnostički pokazatelj ozbiljnosti ozljede te u konačnici i prognostički pokazatelj ishoda. Nedavna istraživanja su pokazala kako se UCH-L1 može pronaći i izvan središnjeg živčanog sustava. Radon i suradnici istraživali su pojavu UCH-L1 u bubrežnim stanicama, te pokazali kako se ovaj protein nalazi u parijetalnim i tubularnim stanicama bubrega te njegovu *de novo* ekspresiju u ozljeđenim podocitima. Također, miševi sa deficitom UCH-L1 razvijaju proteinuriju bez značajne morfološke promjene samih glomerula (161). Nadalje, nakupljeni proteini dovode do promjene proteosomalne aktivnosti, daljnje egzacerbacije bolesti, tubulointerstinalnog oštećenja te posljedično zatajenja bubrežne funkcije. Nekoliko je studija također proučavalo pojavnost i utjecaj UCH-L1 u bubrežnom sustavu, što govori u prilog svestranosti ovog biomarkera i njegovog utjecaja na homeostazu ne samo središnjeg živčanog, već i drugih organskih sustava (162-164).

### **1.3. Testosteron**

Testosteron je primarni muški spolni hormon odgovoran za regulaciju diferencijacije spola, plodnost, spermatogenezu i razvijanje muških spolnih obilježja (165). Osim svoje primarne funkcije, testosteron se u istraživanjima pokazao kao vrijedan ne samo kao dijagnostički čimbenik, već i kao potencijalna terapija. Također, Collongues i suradnici su istraživali testosteron kao potencijalnu adjuvantnu terapiju u muških bolesnika s multiplom sklerozom, gdje su pokazali kako, iako je potrebno još istraživanja, ovaj hormon pokazuje značajan terapijski potencijal (166). Sheikh-Ahmad i suradnici su u studiji iz 2022. godine istraživali povezanost testosterona, upale i citokina u muških bolesnika s dijabetesom tip 2 te kontrolne skupine, te su rezultati pokazali kako ukupni testosteron negativno korelira s dijabetesom, markerima upale te citokinima (167). Dodatna analiza je pokazala kako se niže

vrijednosti testosterona mogu predvidjeti na osnovu drugih nezavisnih faktora, kao što su TNF- $\alpha$  i indeks tjelesne mase. Sve navedeno govori u prilog tome kako je testosteron povezan s raznim faktorima upale i citokinima, koji mogu imati potencijalnu ulogu u hipogonadizmu.

Za vrijeme COVID-19 pandemije istraživani su brojni upalni faktori i dostupni biomarkeri u svrhu pronalaska prognostičkog ili terapijskog čimbenika, a među njima i hormoni. Testosteron je također istraživan, s ciljem pronalaska poveznice između bolesti i ovog hormona, posebno zbog dosadašnjih istraživanja koja su pokazala kako je u muškaraca povećan rizik za razvijanje teških oblika COVID-19. Međutim, rezultati studija su oprečni. Samuel i suradnici su istraživali dosad poznate lijekove kako bi detektirali lijek koji reducira ekspresiju ACE2 receptora. Ono što su pronašli je kako su androgeni ključni modulatori razina ACE2 receptora, odnosno, antiandrogeni lijekovi smanjuju ekspresiju ACE2 receptora i imaju svojevrsnu protektivnu ulogu (168). Ova teorija je potkrijepljena drugom velikom studijom u koju je bilo uključeno 4532 bolesnika s karcinomom prostate liječeni supresivnom hormonskom terapijom. Rezultati ove studije su pokazali kako ovi bolesnici imaju niži rizik od SARS-CoV-2 infekcije (169). Međutim, oprečne rezultate je pokazala velika epidemiološka studija rađena na 7894 bolesnika koja su također bolovali od karcinoma prostate, također liječeni hormonskom supresivnom terapijom, gdje su pokazali kako ne postoje benefiti ove terapije ni na postotak infekcije virusom, niti na težinu bolesti (170). Nadalje, brojne studije, uključujući meta-analizu 11 studija, pokazale su kako su razine ukupnog testosterona niže u muških bolesnika s COVID-19, posebno u bolesnika s teškim oblikom COVID-19 (171). U usporedbi s drugim stanjima, značajnu ulogu u sniženim razinama testosterona imaju upalni parametri, te općenito teška akutna bolest koja suprimira hormonalnu osovinu u organizmu, što je slučaj i kod COVID-19 (172). Ono što je i dalje predmet velikog interesa jest jesu li niže razine testosterona pokazatelj lošijeg ishoda bolesti, perspektivna terapijska metoda i ima li testosteron protektivnu ulogu od teških oblika COVID-19.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

**Glavni cilj istraživanja:**

1. Istražiti dinamiku GFAP-a i UCH-L1 tijekom boravka bolesnika s teškom i kritičnom COVID-19 u Jedinici intenzivnog liječenja.

**Sporedni ciljevi istraživanja su:**

1. Istražiti jesu li razine GFAP i UCH-L1 više u bolesnika koji su razvili neurološke manifestacije tijekom boravka u bolnici.

2. Istražiti jesu li razine testosterona povezane s GFAP-om i UCH-L1.

**Hipoteze istraživanja:**

1. Razine GFAP će biti više u bolesnika s razvijenim neurološkim manifestacijama nakon liječenja u JIL-u u odnosu na bolesnike bez neuroloških manifestacija.

2. Razine UCH-L1 će biti više u bolesnika s razvijenim neurološkim manifestacijama nakon liječenja u JIL-u u odnosu na bolesnike bez neuroloških manifestacija.

3. Razine testosterona će biti više u bolesnika s lošijim ishodom u odnosu na bolesnike s boljim ishodom.

4. Razine GFAP će pozitivno korelirati s razinama testosterona u ispitivanoj populaciji.

5. Razine UCH-L1 će pozitivno korelirati s razinama testosterona u ispitivanoj populaciji.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Dizajn

Ova jednocentrična, retrospektivna studija provedena je u Jedinici intenzivnog liječenja Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Split u razdoblju od siječnja do svibnja 2022. godine, u kojoj su u tom razdoblju liječeni isključivo bolesnici s COVID-19. Studija je odobrena od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Split te je napravljena u skladu s etičkim načelima Helsinške deklaracije iz 2013. godine (Klasa 500-03/21-01/185, Urbroj: 2181-147/01/06-M. S. 21-02, Split, Hrvatska, 22. prosinac 2021). Svi bolesnici su dali svoj pisani pristanak za sudjelovanje u provedenom istraživanju.

### 3.2. Ispitanici

U studiju je bilo uključeno 65 muških bolesnika u dobi od 18 do 65 godina koji su liječeni u JIL-u zbog teške i kritične COVID-19 bolesti. Svi uključeni bolesnici bili su intubirani i mehanički ventilirani pri prijemu u JIL. Smjernice za endotrahealnu intubaciju sastojale su se od: zaštite dišnog puta, teške dekompenzirane respiratorne acidoze ( $\text{pH} < 7,2$ ) i kritične hipoksemije ( $\text{PaO}_2 < 50 \text{ mmHg}$  ili  $\text{SpO}_2 < 90\%$ ), bez obzira na maksimalne neinvazivne respiratorne metode. Isključni kriteriji su bili: ženski spol, aktivna maligna bolest u protekloj godini, prisutnost autoimunih bolesti, neuromuskularne bolesti, prethodni cerebrovaskularni incidenti, prethodno dijagnosticirani hipogonadizam, zatajenje srca, zatajenje jetre i zatajenje bubrega.

Sociodemografske značajke i podaci relevantni za studiju (povijest bolesti uključujući trenutnu i kroničnu terapiju, komorbiditete, vremensko razdoblje od pojave prvih simptoma bolesti do prijema u bolnicu zatim vremensko razdoblje od prijema u bolnicu do prijema u JIL) prikupljeni su iz bolničke dokumentacije za svakog uključenog bolesnika. Od prijema u JIL, stalno su praćeni vitalni znakovi (arterijski tlak mjereno invazivno, puls i zasićenost krvi kisikom). Izračunat je BMI formulom (tjelesna težina (kg) podijeljena s kvadratom visine ( $\text{m}^2$ )) prema podacima dostupnima iz najnovije medicinske dokumentacije. Dijagnoza COVID-19 temeljila se na kliničkoj prezentaciji, pozitivnom PCR testu na SARS-CoV-2 dobivenim iz brisa nazofarinksa te radiološkom dokazu upale pluća, najčešće RTG snimci. U vrijeme provođenja istraživanja, u Hrvatskoj je bila dominantna varijanta SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) (173). Razvijene neurološke manifestacije su prijavili sami bolesnici ili ih je prepoznao ordinirajući liječnik nakon ekstubacije bolesnika, te su potom bolesnici pregledani od strane nadležnog neurologa.



### 3.3. Postupci

Po prijemu u JIL bolesnicima je uzet uzorak venske krvi za standardne pretrage (crvena i diferencijalna krvna slika, CRP, urea, kreatinin, jetreni enzimi, glukoza, troponin, D-dimeri, elektroliti, prokalcitonin, koagulogram) i arterijska krv za plinske analize krvi. Nadalje, isti uzorci su vađeni svakodnevno. Svi uzorci su obrađeni po standardnim laboratorijskim protokolima, pod nadzorom iskusnog magistra biokemije.

Uzorci periferne venske krvi korišteni za mjerenje razina GFAP-a, UCH-L1 i testosterona vađeni su prvi, sedmi i četrnaesti dan od prijema u JIL, osim u slučaju premještaja iz JIL-a (otпуст ili premještaj na drugi bolnički odjel) ili smrtnog ishoda bolesnika. Uzorci krvi su centrifugirani na 3000 okretaja/minuti kroz 10 minuta te potom skladišteni na  $-80^{\circ}\text{C}$  do trenutka korištenja. Koncentracije GFAP (Reagent Kit: 04W17; Abbot, Chicago, IL, SAD) i UCH-L1 (Reagent Kit 04W19; Abbot, Chicago, IL, SAD) su određivane iz seruma koristeći kemiluminiscentnu imunokemijsku metodu (CMIA). Minimalna razina za detekciju GFAP je bila 2,2 ng/L te 16,1 ng/L za UCH-L1. Razine ukupnog testosterona su određivane pomoću imunokemijske metode (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka). Sve pretrage su napravljene po uputama proizvođača.

### 3.4. Statistički postupci

Sve analize podataka provedene su pomoću statističkog softvera MedCalc (verzija 20.110, MedCalc Software, Ostend, Belgija). Svi grafovi su napravljeni koristeći SigmaPlot (verzija 14.0, Systat Software Inc, San Jose, SAD). Normalnost distribucije podataka procijenjena je Kolmogorov–Smirnovljevim testom. Kvalitativne varijable prikazane su kao cijeli brojevi i postoci. Ovisno o normalnosti distribucije, kvantitativni podaci prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ili medijan i interkvartilni raspon. Za usporedbu kategorijskih varijabli korišten je hi-kvadrat test. Za usporedbu između dvije grupe parametrijskih varijabli korišten je Student t-test, dok je za usporedbu između dvije grupe neparametrijskih varijabli korišten Mann-Whitney U test. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) s *post hoc* Tukeyjevim testom korištena je za usporedbu parametrijskih varijabli između tri skupine, dok je Kruskal–Wallisov test s *post hoc* Dunnovim testom korišten za usporedbu neparametrijskih varijabli između tri skupine. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

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

U studiju je uključeno ukupno 65 muških bolesnika, čija je prosječna dob  $54,1 \pm 7,6$  godina. Bolesnici koji su razvili neurološke manifestacije tijekom bolničkog liječenja nakon teškog i kritičnog oblika COVID-19 imali su značajnije duže vrijeme boravka u JIL-u te su bili duže mehanički ventilirani u usporedbi s bolesnicima koji nisu razvili neurološke manifestacije ( $p = 0,014$  and  $p = 0,010$ ). Također, bolesnici sa razvijenim neurološkim manifestacijama imali su značajno više razine visoko osjetljivog troponina ( $p = 0,021$ ) i testosterona četrnaesti dan nakon prijema u JIL. ( $p = 0,046$ ). Ostale karakteristike prikazane su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Antropometrijske i kliničke karakteristike ispitivanog uzorka.

Parametri	Ukupno (n = 65)	Intrahospitalno razvijene neurološke manifestacije		p
		Ne (n = 45)	Da (n = 20)	
Dob (godine)	54,1 ± 7,6	53,4 ± 8,3	55,0 ± 7,8	0,477*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,7 ± 3,3	28,8 ± 4,5	28,6 ± 3,3	0,851*
Trajanje bolesti u trenutku prijema u JIL (dani)	9,2 ± 2,2	8,5 ± 3,1	9,3 ± 2,2	0,293*
Trajanje hospitalizacije (dani)	16 (14 – 23)	16 (14 – 20)	20,5 (14 – 32)	0,199†
Trajanje boravka u JIL-u (dani)	13,2 ± 7,9	9,4 ± 2,9	14,3 ± 6,2	0,010*
Trajanje mehaničke ventilacije (dani)	9,3 ± 7,6	7,1 ± 4,5	12,4 ± 6,6	0,014*
Potpuno cijepljeni (n, %)	33 (50,8%)	22 (48,9%)	11 (55,0%)	0,825
Preminuli tijekom boravka u JIL-u (n, %)	12 (18,5%)	12 (100%)	0 (0%)	<0,001‡
Neurološke manifestacije razvijene u bolnici (n, %)	20 (30,8%)	N/A	20 (100%)	N/A
Paraestezija	5 (7,7%)	N/A	5 (25%)	N/A
Pareza	8 (12,3%)	N/A	8 (40%)	N/A
Inkontinencija	3 (4,6%)	N/A	3 (15%)	N/A
Anosmija i/ili ageusia	4 (6,2%)	N/A	4 (20%)	N/A
<b>Komorbiditeti</b>				
Pušenje (n, %)	4 (6,2%)	3 (6,7%)	1 (5%)	1,000§
Arterijska hipertenzija (n, %)	18 (27,7%)	14 (31,1%)	4 (20%)	0,549§
Diabetes mellitus (n, %)	4 (6,2%)	2 (4,4%)	2 (10%)	0,581§
Dislipidemija (n, %)	42 (64,6%)	27 (60%)	15 (75%)	0,243‡
<b>Laboratorijski parametri</b>				
Hemoglobin (g/L)	133,4 ± 11,7	134,8 ± 12,1	132,8 ± 12,3	0,645*
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	243,7 ± 85,6	263,2 ± 82,6	221,3 ± 89,1	0,123*
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	9,7 ± 3,5	10,1 ± 3,3	8,8 ± 4,4	0,222*
SaO <sub>2</sub> (%)	92,9 (91,3 – 96,0)	90,9 (90,3 – 96,0)	94,0 (87,6 – 95,5)	0,501†
pH	7,36 ± 0,07	7,36 ± 0,08	7,34 ± 0,06	0,734*
pO <sub>2</sub> (kPa)	5,8 ± 1,0	5,7 ± 1,0	5,9 ± 0,7	0,508*
pCO <sub>2</sub> (kPa)	9,9 ± 2,1	10,0 ± 3,3	9,8 ± 2,0	0,858*

HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	25,7 ± 2,2	26,0 ± 2,5	25,4 ± 2,0	0,652*
CRP (mmol/L)	97,5 ± 62,8	97,1 ± 65,6	94,9 ± 39,2	0,459*
D-dimeri (mg/L)	2,5 (1,6 – 4,2)	2,3 (1,3 – 4,2)	3,1 (1,9 – 6,7)	0,422†
hs-TnI (ng/L)	12,9 (6,4 – 28,3)	9,8 (4,8 – 14,7)	21,2 (12,8 – 31,7)	0,021†
Glukoza (mmol/L)	9,7 ± 3,2	9,5 ± 2,4	10,6 ± 5,1	0,324*
Ureja (mmol/L)	8,2 ± 2,6	7,8 ± 2,2	8,9 ± 4,5	0,255*
Kreatinin (mmol/L)	80,3 ± 17,6	76,5 ± 14,4	83,2 ± 27,4	0,111*
<b>Testosteron (nmol/L)</b>				
<b>Pri prijemu</b>	0,81 (0,43 – 1,55)	1,24 (0,50 – 1,49)	0,55 (0,43 – 1,57)	0,254†
<b>Nakon 7 dana</b>	2,70 (1,22 – 4,65)	3,35 (2,50 – 7,20)	2,80 (1,66 – 4,50)	0,146†
<b>Nakon 14 dana</b>	3,34 (1,52 – 8,70)	10,70 (3,28 – 12,03)	4,52 (2,15 – 6,90)	0,046†

Rezultati su prikazani kao medijan ± SD, brojevi (%) ili medijan (interkvartilni raspon).

\* Student t-test

† Mann-Whitney U test

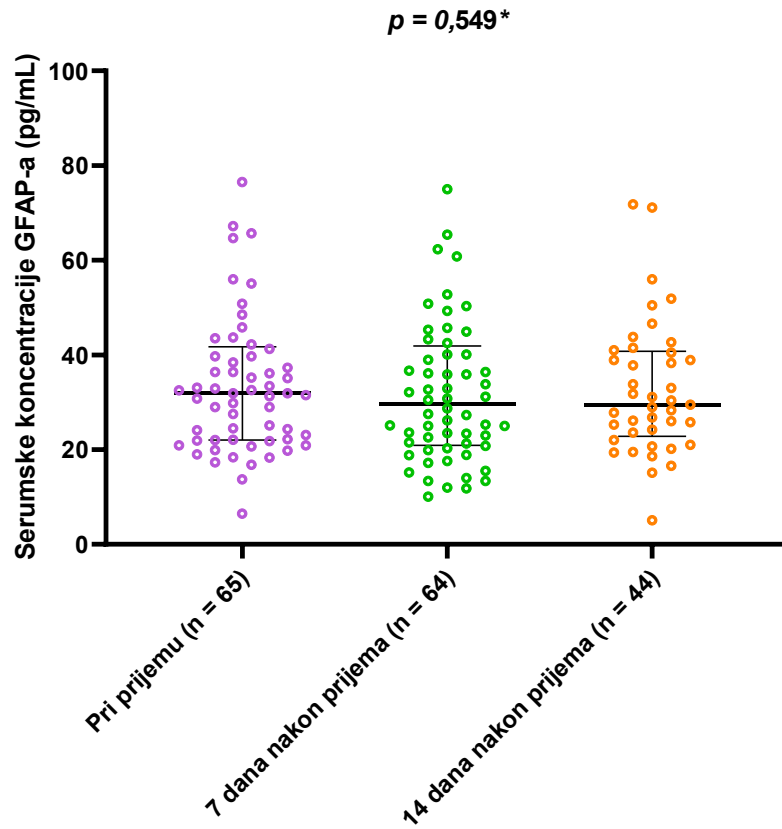
‡ hi-kvadrat test

§ Fisherov egzaktni test.

Kratice: CRP: C-reaktivni protein; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: bikarbonati; pO<sub>2</sub>: parcijalni tlak kisika; pCO<sub>2</sub>: parcijalni tlak ugljikovog dioksida; SaO<sub>2</sub>: zasićenost kisika u arterijskoj krvi; hs-TnI: visoko-osjetljivi troponin I.

#### 4.2. Razine GFAP i UCH-L1 tijekom boravka u JIL-u

U ovoj studiji, nije pronađena dinamika serumskih koncentracija GFAP i UCH-L1 za vrijeme liječenja bolesnika u JIL-u od teškog i kritičnog oblika COVID-19 ( $p = 0,549$ ,  $p = 0,425$ ), (Slika 1. i 2.). Međutim, razine testosterona su pokazale progresivni porast za vrijeme boravka u JIL-u ( $p < 0,001$ ) (Slika 3).

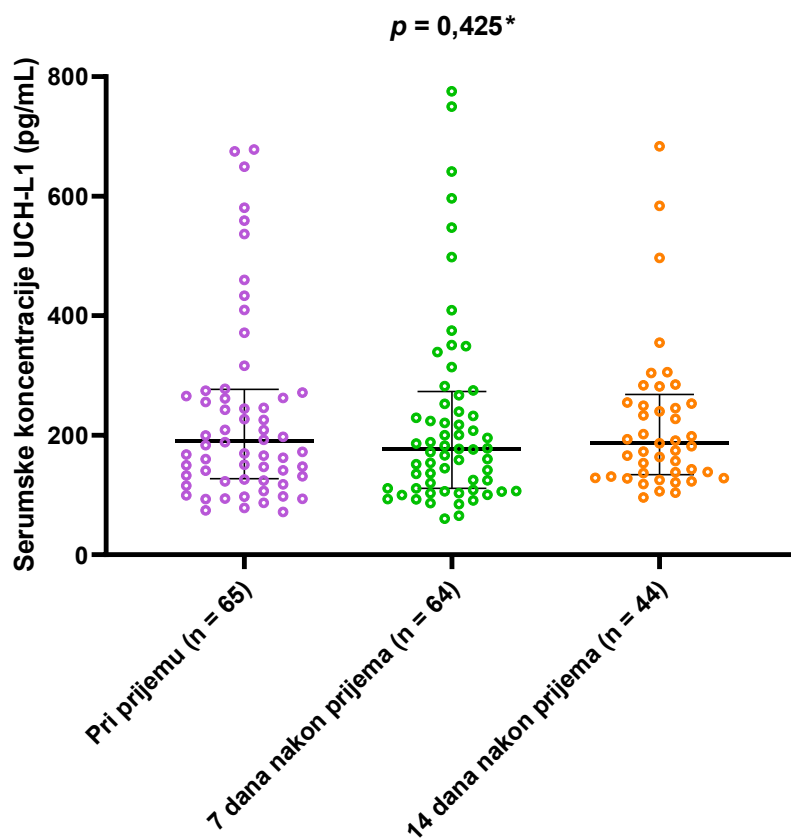


**Slika 1.** Dinamika biomarkera moždane ozljede GFAP u bolesnika u JIL-u zbog teškog i kritičnog oblika COVID-19 u tri točke mjerenja; pri prijemu, sedam dana i 14 dana nakon prijema.

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

\*Friedmanov test.

Kratice: GFAP (Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein).

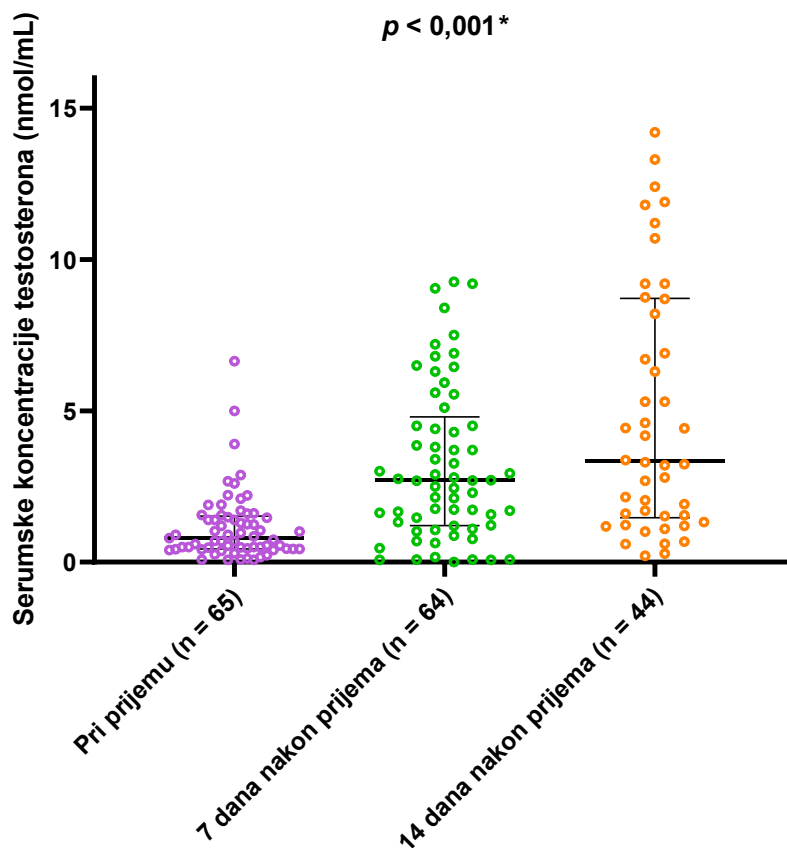


**Slika 2.** Dinamika biomarkera moždane ozljede UCH-L1 u bolesnika u JIL-u zbog teškog i kritičnog oblika COVID-19 u tri točke mjerenja; pri prijemu, sedam dana i 14 dana nakon prijema.

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

\*Friedmanov test.

Kratice: UCH-L1 (Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1).

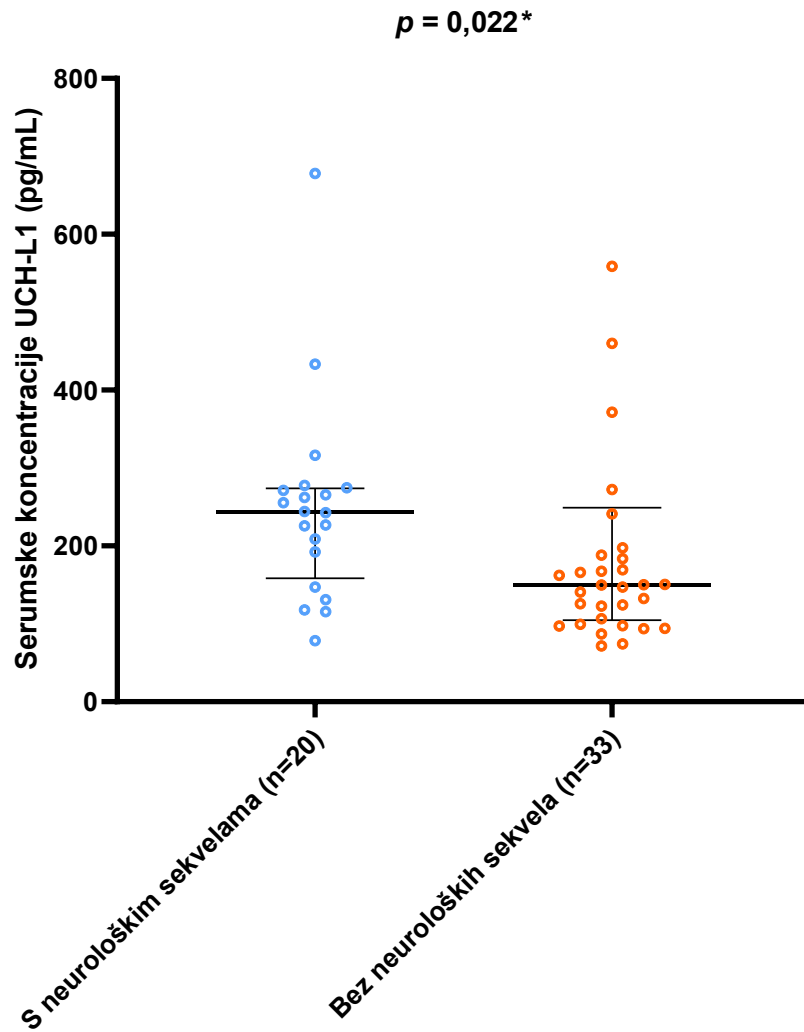


**Slika 3.** Dinamika serumskih koncentracija testosterona u bolesnika liječenih u JIL-u zbog teškog i kritičnog oblika COVID-19 u tri točke mjerenja; pri prijemu, sedam dana i 14 dana nakon prijema.

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.  
\*Friedmanov test.

#### 4.3. Razine GFAP i UCH-L1 u bolesnika sa i bez razvijenih neuroloških manifestacija

U bolesnika sa razvijenim neurološkim manifestacijama ( $n = 20$ ) serumske koncentracije UCH-L1 bile su više pri prijemu nego u bolesnika bez neuroloških manifestacija (240,0 (155,4-366,4) pg/mL vs 146,4 (92,5-243,9) pg/mL,  $p = 0,022$ ) (Slika 4). S druge strane, serumske koncentracije GFAP pri prijemu nisu se razlikovale između dvije ispitivane skupine (32,2 (24,2-40,1) pg/mL vs. 29,8 (21,8-39,4) pg/mL,  $p = 0,372$ ) (Slika 5).



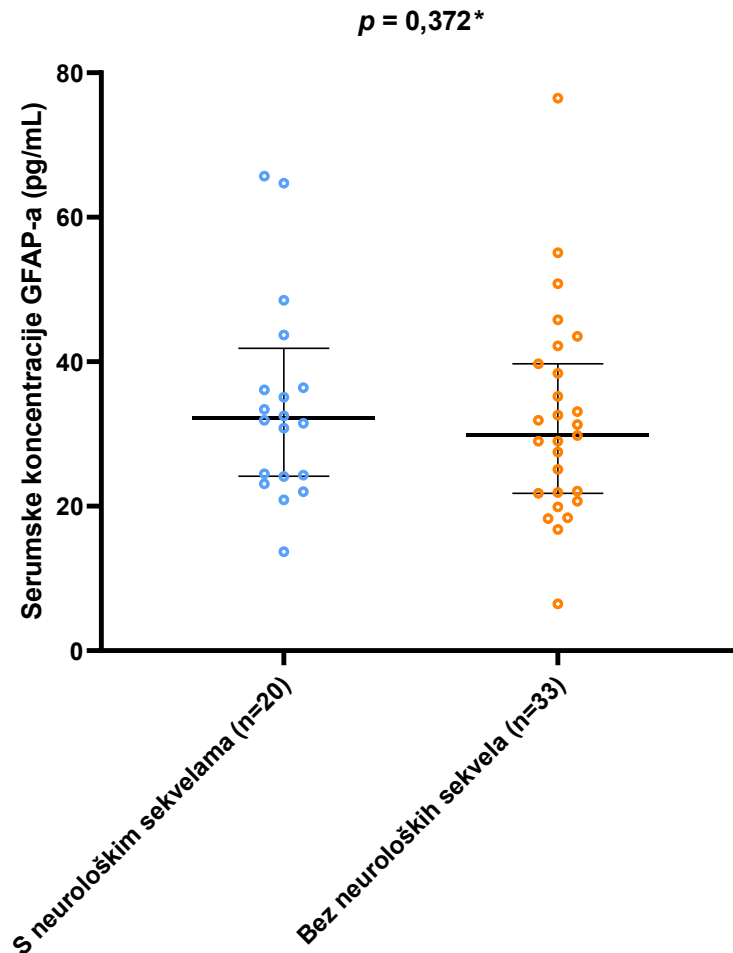
**Slika 4:** Usporedba serumskih razina UCH-L1 pri prijemu između bolesnika sa i bez razvijenih neuroloških manifestacija.

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

\*Mann-Whitney U test.

Kratice: UCH-L1 (Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1).





**Slika 5.** Usporedba serumskih razina GFAP pri prijemu između bolesnika sa i bez razvijenih neuroloških manifestacija.

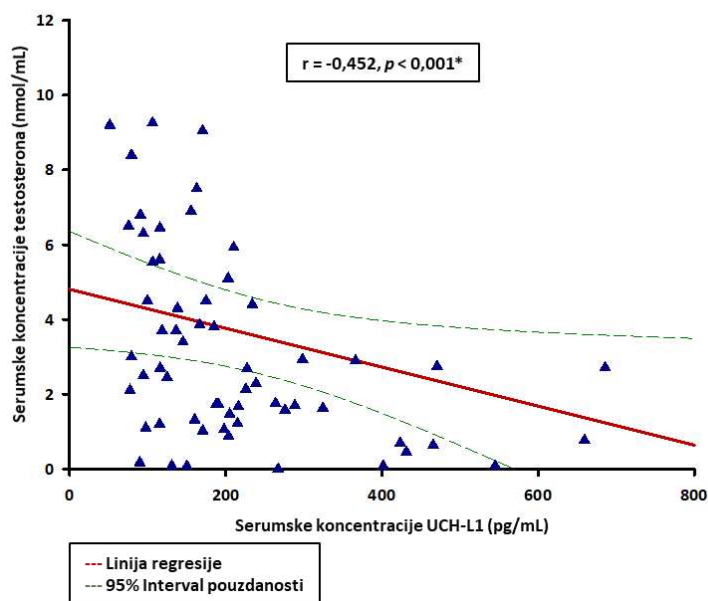
Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

\*Mann-Whitney U test.

Kratice: GFAP (Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein).

#### 4.4. Usporedba koncentracija biomarkera moždane ozljede i testosterona

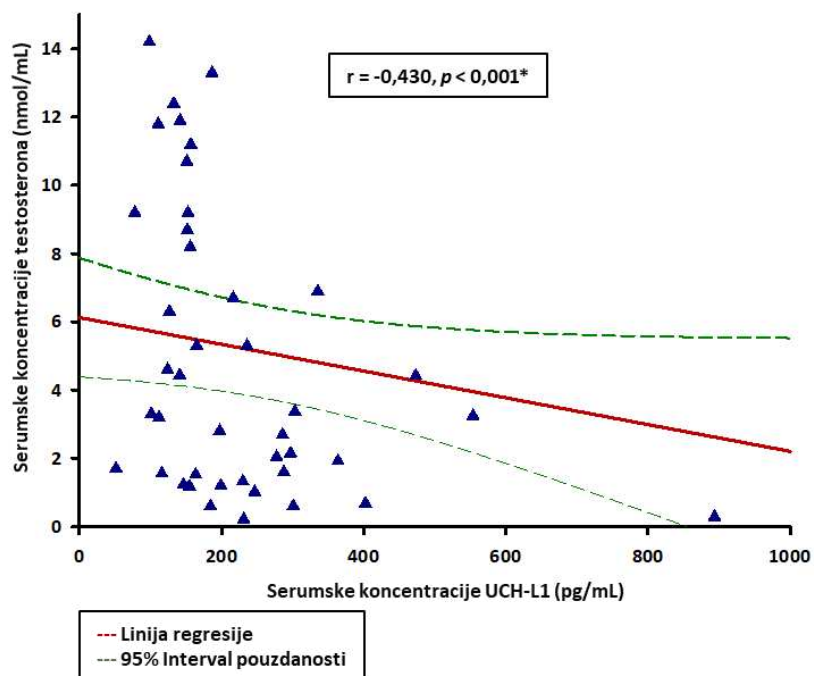
Serumske koncentracije UCH-L1 pokazale su negativnu korelaciju s testosteronom u sve tri točke mjerenja ( $r = -0,452, p < 0,001$ ;  $r = -0,430, p < 0,001$ ;  $r = -0,476, p = 0,001$ ) (Slike 6-8). Naprotiv, serumske koncentracije GFAP nisu pokazale korelaciju s testosteronom u nijednoj točki mjerenja ( $r = 0,091, p = 0,486$ ;  $r = 0,111, p = 0,399$ ;  $r = -0,190, p = 0,229$ ). Međutim, za razliku od UCH-L1, serumske razine GFAP pokazale su pozitivnu korelaciju s godinama ( $r = 0,397, p = 0,002$ ).



**Slika 6:** Usporedba serumskih koncentracija UCH-L1 i testosterona pri prijemu bolesnika u JIL.

\*Spearmanov korelacijski koeficijent.

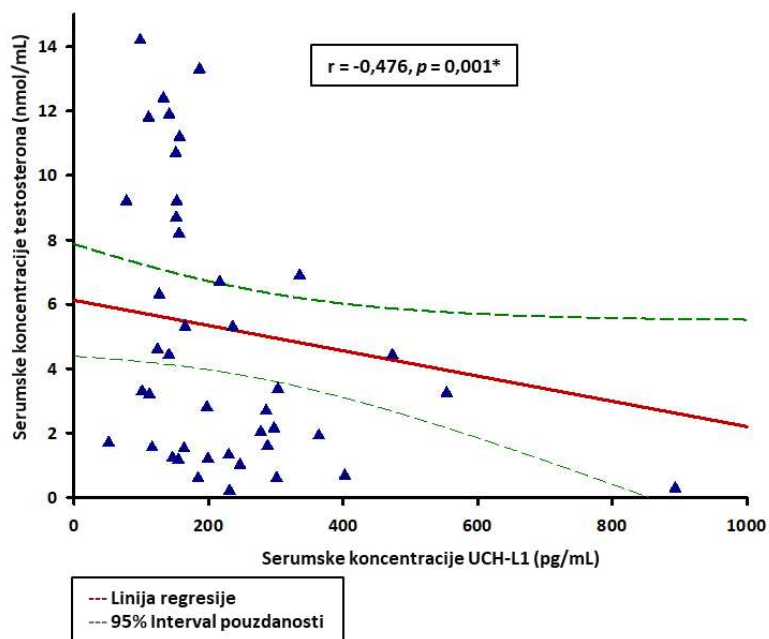
Kratice: UCH-L1 (Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1).



**Slika 7:** Usporedba serumskih koncentracija UCH-L1 i testosterona sedmi dan od prijema bolesnika u JIL.

\*Spearmanov korelacijski koeficijent.

Kratice: UCH-L1 (Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1).

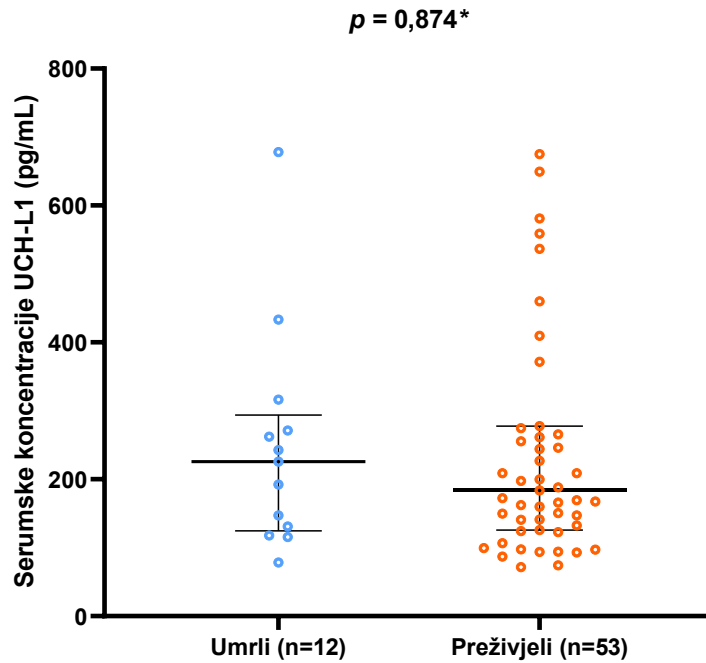


**Slika 8:** Usporedba serumskih koncentracija UCH-L1 i testosterona četrnaesti dan od prijema bolesnika u JIL.

\*Spearmanov korelacijski koeficijent.  
Kratice: UCH-L1 (Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1).

#### 4.5. Usporedba biomarkera moždane ozljede i testosterona između preminulih i preživjelih bolesnika

Usporedba izmjerenih serumskih koncentracija UCH-L1, GFAP i testosterona nije pokazala razliku koncentracija ispitivanih biomarkera između preminulih i preživjelih bolesnika od teškog i kritičnog oblika COVID-19 (UCH-L1 225,8 (127,8-282,5) pg/mL vs. 183,5 (127,6-276,8) pg/mL,  $p = 0,874$ ; GFAP (37,3 (20,6-58,8) pg/mL vs. 31,7 (22,6-39,1) pg/mL,  $p = 0,403$ ; testosteron 0,85 (0,38-1,21) nmol/mL vs. 0,77 (0,45-1,53) nmol/mL,  $p = 0,699$ ) (Slike 9-11).

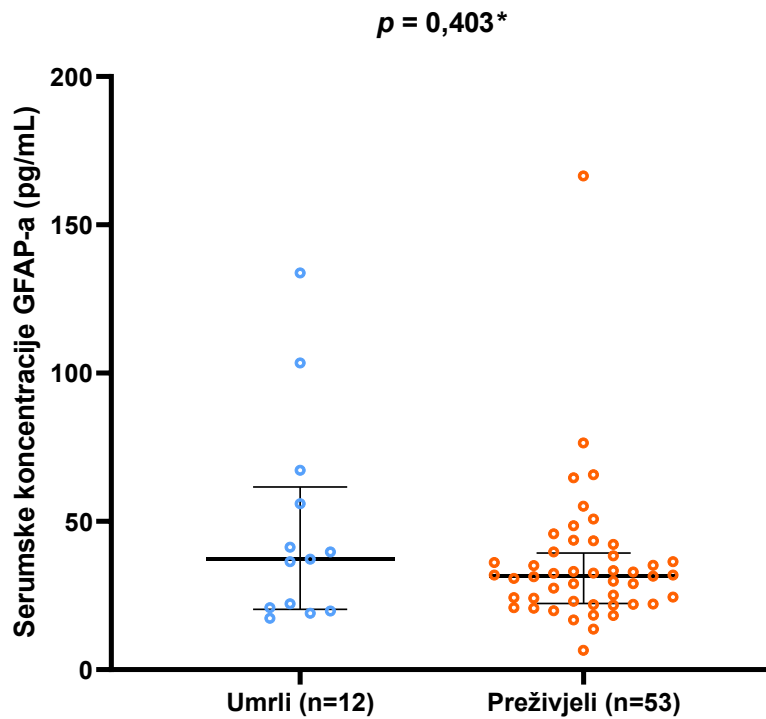


**Slika 9.** Usporedba početnih serumskih koncentracija UCH-L1 između preživjelih bolesnika i bolesnika koji nisu preživjeli do otpusta iz bolnice.

Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

\* Mann-Whitneyev U test.

Kratice: UCH-L1 (Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1).

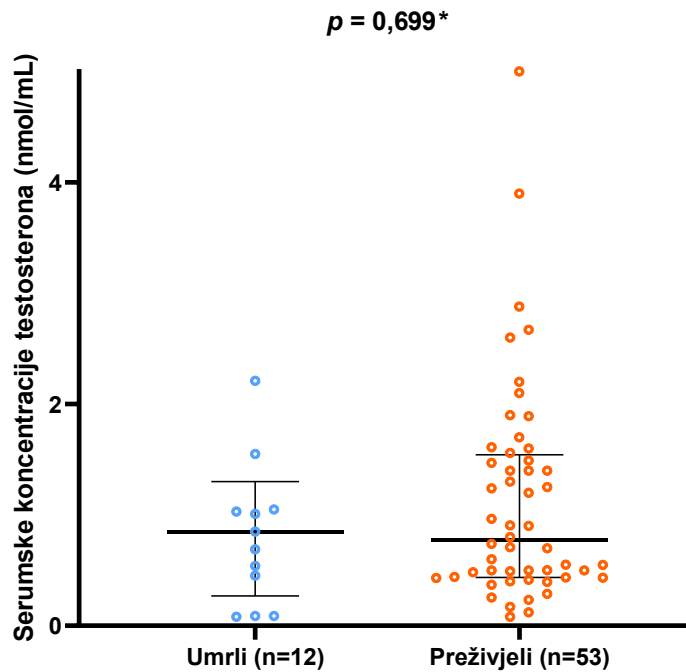


**Slika 10.** Usporedba početnih serumskih koncentracija GFAP između preživjelih bolesnika i bolesnika koji nisu preživjeli do otpusta iz bolnice.

Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

\* Mann-Whitneyev U test.

Kratice: GFAP (Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein).



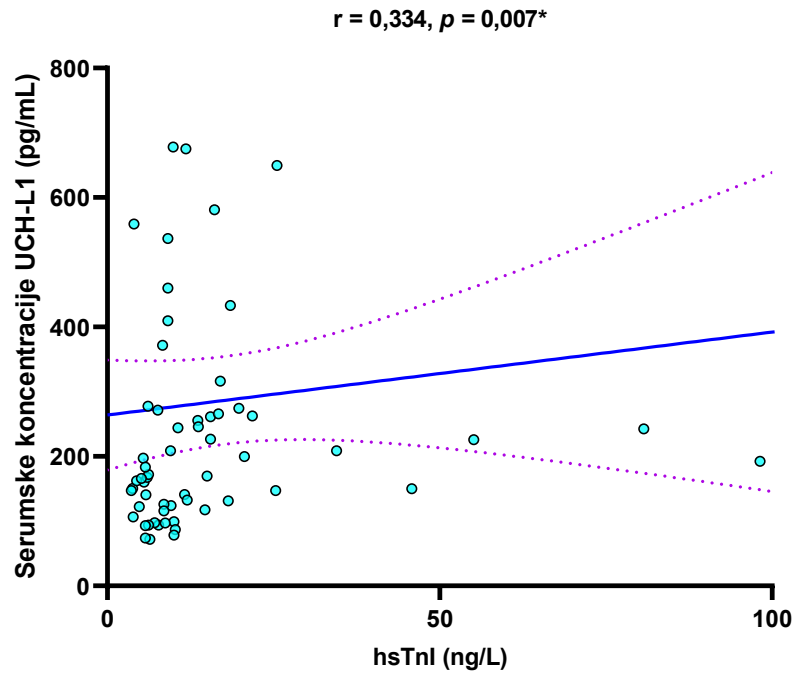
**Slika 11.** Usporedba početnih serumskih koncentracija testosterona između preživjelih bolesnika i bolesnika koji nisu preživjeli do otpusta iz bolnice.

Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

\* Mann-Whitneyev U test.

#### 4.6. Korelacija serumskih razina biomarkera i visoko-osjetljivog troponina

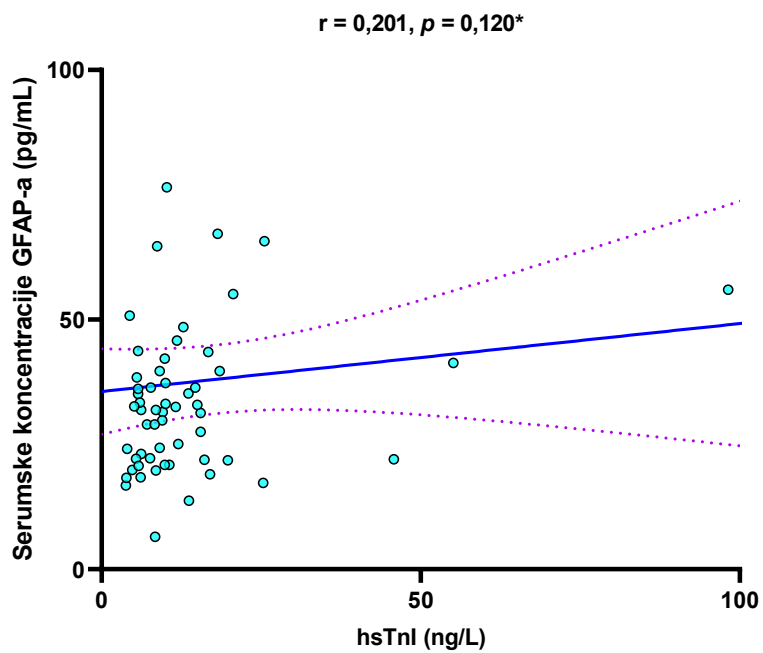
Usporedbom serumskih koncentracija biomarkera moždane ozljede i visoko-osjetljivog troponina pronađena je statistički značajna pozitivna korelacija između razina UCH-L1 i visoko-osjetljivog troponina, dok između GFAP i visoko-osjetljivog troponina nije pronađena statistički značajna korelacija. (Slike 12 i 13).



**Slika 12.** Korelacija serumskih koncentracija UCH-L1 i visoko-osjetljivog troponina u bolesnika s teškim oblikom COVID-19.

\* Spearmanov korelacijski koeficijent.

Kratice: UCH-L1 (Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1); hsTnI (visoko-osjetljiv troponin I).



**Slika 13.** Korelacija serumskih koncentracija GFAP-a i visoko-osjetljivog troponina u bolesnika s teškim oblikom COVID-19.

\* Spearmanov korelacijski koeficijent.

Kratice: GFAP (Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein); hsTnI (visoko-osjetljiv troponin I).

## **5. RASPRAVA**



Rezultati ove studije pokazuju kako nema značajne dinamike u serumskim koncentracijama biomarkera moždane ozljede UCH-L1 i GFAP u razdoblju od dva tjedna boravka u JIL-u u muških bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19. Nadalje, prvi put je pokazana negativna korelacija između UCH-L1 i serumskih razina testosterona u gore navedenoj skupini. Međutim, korelacija između GFAP i testosterona nije utvrđena. Također, ovo istraživanje pokazalo je kako među bolesnicima koji su preživjeli teški ili kritični oblik COVID-19, bolesnici s razvijenim neurološkim manifestacijama imaju značajno više razine UCH-L1 u serumu. Ovi rezultati mogu se objasniti i usporediti s dosad provedenim sličnim studijama.

Cooper i suradnici istraživali su razliku između serumskih koncentracija UCH-L1 i GFAP između 27 bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 te 19 kontrola liječenih u JIL-u. Autori su pokazali kako su povišene razine GFAP ali ne i UCH-L1 u istraživanoj skupini, čak niti nakon prilagodbe rezultata u odnosu na dob i spol (174). Nadalje, u skladu s rezultatima ove studije, pokazali su kako postoji pozitivna korelacija između serumskih razina GFAP i dobi bolesnika, te da nema značajne dinamike mjerenih biomarkera moždane ozljede kroz dvotjedno razdoblje liječenja u JIL-u. Najvažniji rezultat koji su prikazali Cooper i suradnici je pozitivna korelacija između razina GFAP i UCH-L1 s Bodovnom ljestvicom za procjenu delirija (*engl Intensive Care Delirium Screening Checklist (ICDSC)*), validiranim upitnikom koji služi za procjenu pojavnosti delirija u bolesnika u JIL-u. Iako, potrebno je naglasiti kako se pozitivna korelacija pronašla i kod kontrolne skupine. Međutim, drugo istraživanje je pokazalo povišene serumske vrijednosti GFAP u odnosu na kontrole, ali snižene nakon razdoblja od 11.4 dana. Također, ista studija pokazala je kako su vrijednosti GFAP bile više kod teških i kritičnih oblika COVID-19 u usporedbi s umjerenim oblikom te pozitivnu korelaciju s dobi bolesnika (175). U ovoj studiji nesrazmjer u rezultatima može se objasniti razlikama u istraživanim skupinama te različitim vremenskim točkama mjerenja serumskih koncentracija biomarkera. Konačno, Kanberg i suradnici istraživali su serumske razine GFAP tijekom dugoročnog praćenja (medijan od 225 dana). Pokazali su kako nakon početnih povišenih razina, razine GFAP imaju tendenciju povratka na normalne razine. Dodatno, autori su pokazali kako nema povezanosti između povišenih koncentracija tijekom akutne faze bolesti i postinfektivnih neuroloških simptoma na kontrolnom pregledu (175).

Iako nijedan od istraživanih biomarkera moždane ozljede nije pokazao dinamiku u dvotjednom razdoblju ispitivanja za vrijeme boravka u JIL-u, UCH-L1 je ipak pokazao porast kod bolesnika s razvijenim neurološkim manifestacijama, dok porast razina GFAP nije

detektirana. Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja za ovakav rezultat. Naime, ova dva biomarkera, iako se oba nalaze primarno u moždanom tkivu, nalaze se u različitim stanicama. Kao što je objašnjeno u uvodnom dijelu, GFAP se nalazi u astrocitima, dok se UCH-L1 nalazi u citoplazmi neurona. Samim time moždane ozljede nastale drugačijim mehanizmom neće jednako utjecati na različite stanice moždanog tkiva. Mondello i suradnici istaživali su pojavnost ova dva biomarkera kod moždane ozljede. U studiju je bio uključen 81 bolesnik te 167 kontrola iz četiri bolnička centra specijalizirana za neurotraumu. Rezultati njihove studije pokazali su povišene razine oba biomarkera u odnosu na kontrole te značajnu korelaciju razina biomarkera s GCS i nalazima slikovne dijagnostike. Nadalje, razine GFAP bile su više kod bolesnika sa žarišnim masivnim lezijama, dok su razine UCH-L1 bile više kod bolesnika s difuznom moždanom ozljedom. Još jedan zanimljiv rezultat ove studije pokazao je kako se UCH-L1 pokazao kao nezavisni prediktor smrtnog ishoda pri otpustu, dok su oba biomarkera pokazala snažnu korelaciju sa smrtnim ishodom šest mjeseci nakon ozljede. (176). Ovakvi rezultati govore u prilog tome kako je različit mehanizam i mjesto moždane ozljede dovodi do različite dinamike u serumskim razinama ova dva biomarkera te se samim time može pretpostaviti kako u nekim slučajevima jedan biomarker može biti superiorniji u odnosu na drugi. U tom svjetlu moguće je objasniti i rezultate naše studije. Međutim, iako je u nekim slučajevima jedan od ova dva biomarkera dominantniji, kombinacija oba biomarkera je poželjna i nužna, kako zbog distinkcije moždane ozljede na staničnoj razini, tako i zbog potencijalne predikcije ozbiljnosti ozljede i smrtnog ishoda.

Brojna dosadašnja istraživanja ustanovila su pojavnost neuroloških simptoma u teškim i kritičnim oblicima COVID-19 (50, 177-179). U velikoj multicentričnoj studiji nazvanoj GCS-Neuro COVID-19 studija, koja je uključivala preko 3500 bolesnika, pokazano je kako je u čak 80% bolesnika prisutna neka neurološka manifestacija, od kojih je na prvom mjestu encefalopatija (180). Patofiziološka pozadina koja objašnjava pojavnost ovih ozljeda nije jasna, no ono što je sigurno je da se radi o višestrukim, možda i nepovezanim scenarijima. SARS-CoV-2 virus ima neurotropni i neuroinvazivni učinak na središnji živčani sustav. Sami ulazak virusa u SŽS odvija se na više razina; trans-sinaptičkim prijenosom, olfaktornim živcem, vaskularnim strukturama te migrirajućim leukocitima preko narušene krvno-moždane barijere. Posljedično, virus vezanjem na ACE2 receptor dovodi do progresije ciklusa širenja virusa te daljnjeg oštećenja neurona čak i bez jasne prisutnosti upale. Osim toga, nakon ulaska u neurone, virus dovodi do poremećaja ravnoteže između ACE2 i ACE1 receptora, rezultirajući pretjeranom vazokonstrikcijom i narušavanjem moždane autoregulacije te dodatnim

cerebrovaskularnim komplikacijama (181). Ono što je važno naglasiti je kako je u nekim slučajevima nemoguće razlikovati pojavnost neuroloških manifestacija od već postojećih neuroloških i psihijatrijskih poremećaja i njihovih potencijalnih egzacerbacija, posebice u starijoj populaciji, čime je istraživanje neuroloških manifestacija u COVID-19 bolesnika ograničeno, ponekad i nemoguće (182). Sve više studija govori u prilog povišenim razinama GFAP i UCH-L1 kao biomarkera ne samo traumatske, već i netraumatske ozljede mozga. To se posebno odnosi na neurodegenerativne bolesti, kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, ali i razne neuropalne bolesti. Kako je do sada utvrđeno, SARS-CoV-2 može uzrokovati promociju proupalnih mikroglijalnih stanica fenotipa M1, te se pretpostavlja kako povišene vrijednosti biomarkera moždane ozljede mogu biti pretkazatelji neurološke upale kod COVID-19 (183, 184).

Značajno je da su u ovoj studiji razine testosterona u serumu bile niže od nižih referentnih granica naše populacije (6,68 nmol/L) u sve tri točke mjerenja. Nekoliko nedavnih studija također je pokazalo da postoji značajno smanjenje testosterona u bolesnika s teškim oblikom COVID-19 (185, 186). Ove niske razine testosterona mogle bi biti posljedica kortizolom inducirane supresije, kroz aktivaciju hipotalamičko-hipofizno-adrenalne (HHA) osovine koja dovodi do povišenih vrijednosti kortizola u bolesnika COVID-19 (187). S druge strane, također je pokazano kako testosteron suprimira produkciju kortizola te kako su niske vrijednosti testosterona posljedica stresom inducirane aktivacije HHA osovine (188). Ono što je bitno naglasiti je kako su niske vrijednosti testosterona moguća posljedica visokih doza steroidnih lijekova kao terapije za COVID-19. Naime, poznato je kako visoke doze steroidnih lijekova dovode do disregulacije gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) (189). Također, prethodne studije su pokazale kako sistemske upale potencijalno mogu dovesti do disregulacije HHA osovine (190). Nadalje, pacijenti s neurološkim posljedicama imali su niži testosteron nakon 2 tjedna boravka u JIL-u, ali ne pri prijemu, niti 7 dana poslije, iako postoji tendencija ka smanjenju vrijednosti promatrajući ukupno razdoblje liječenja. Ono što je dosad pokazano u studijama koje su istraživale testosteron u COVID-19 bolesnika je kako se radi o dvosmjernoj situaciji. Naime, iako bi povećane koncentracije testosterona mogle dovesti do povećanja osjetljivosti na SARS-CoV-2 te predviđaju lošije ishode pojačanom regulacijom ekspresije transmembranske proteaze serin 2 (TMPRSS2), poznato je kako testosteron dovodi do smanjenja oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije, čime se prigušuje aberantni imunološki odgovor koji se razvija u teškim i kritičnim oblicima COVID-19. Dosada, prema pretraživanju literature, nije istraživana povezanost testosterona i biomarkera moždane ozljede.

Ipak, kako dostupni dokazi upućuju na to da početne razine testosterona mogu povećati ulazak virusa dok paradoksalno pruža relativnu zaštitu od hiperreaktivnog imunološkog stanja koje uzrokuje smrtnost, možemo pretpostaviti da su bolesnici s nižim razinama testosterona podložniji ozljedama mozga koje se javljaju kod teškog i kritičnog oblika COVID-19, čemu u prilog govore i rezultati ove studije.

Još jedan zanimljiv rezultat ove studije je kako nije utvrđena razlika serumskih koncentracija biomarkera mjerenih pri prijemu u JIL između preživjelih i preminulih bolesnika. Ono što implicira ovakav rezultat je da, iako su GFAP i UCH-L1 dosada uvelike istraživani kao prediktori ishoda ne samo traumatske moždane ozljede već i ukupnog mortaliteta kod takvih ozljeda, nisu pouzdani prediktori mortaliteta kada se radi o COVID-19 bolesnicima. Jedno od objašnjenja je kako COVID-19 ipak nije prvenstveno neurološka bolest, te da je dinamika ovih markera ipak možda vezana za dominantno neurološka oštećenja. S druge strane, finska multicentrična anesteziološka studija objavljena u travnju ove godine istraživala je prognostičku vrijednost UCH-L1 u bolesnika koji su doživili srčani arrest u izvanbolničkim uvjetima te su bili liječeni u JIL-u (191). Rezultati ove studije su pokazali kako su vrijednosti UCH-L1 bile veće u bolesnika s lošijim ishodom u odnosu na bolesnike s dobrim ishodom. Iako su rezultati suprotni od rezultata ove disertacije, otvara se mogućnost biomarkerima kao što je UCH-L1, kako ipak imaju svoje mjesto u dinamici i prognozi ishoda bolesti koje nisu dominantno vezane za središnji živčani sustav. Naime, još jedan rezultat ove studije govori u prilog tome. Utvrđena je pozitivna korelacija između UCH-L1 i visoko-osjetljivog troponina, ali i značajno povišene vrijednosti troponina u bolesnika s razvijenim neurološkim manifestacijama. Pretražujući literaturu, ova korelacija dosada nije istraživana. S druge strane, troponin, kao strukturalni protein srčanog mišića istraživan je i kao biomarker srčane ozljede u bolesnika s COVID-19 (192). Iako sam UCH-L1 nije pokazao dinamiku u tri točke mjerenja niti se utvrdila razlika u njegovim vrijednostima između preživjelih i preminulih bolesnika, ovakva korelacija ipak govori u prilog tome kako UCH-L1 ima svoju ulogu kao prognostički pokazatelj ne samo moždane ozljede, već i ozljede drugih organskih sustava pogođenih SARS-CoV-2 infekcijom, te povezujući ga s drugim od prije poznatim markerima i prognostičkim pokazateljima, otvara nove mogućnosti ne samo za dinamiku i ishod liječenja, već i potencijalne terapijske metode i postupke.

Ova studija ima nekoliko limitacija. Važno je napomenuti da se radi o istraživanju iz samo jednog kliničkog centra s ograničenim brojem ispitanika. Nadalje, u istraživanje su se uključili samo muški ispitanici te rezultate stoga ne možemo generalizirati na čitavu populaciju.

Razlog tome je istraživanje odnosa između testosterona i neuroloških manifestacija bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19, te stvaranje homogene skupine ispitanika isključivanjem ženskih pacijenata. Isto tako, nismo bili u mogućnosti eliminirati sve zbunjujuće čimbenike koji su mogli utjecati na naše rezultate, dok su smrtni slučajevi nekoliko uključenih pacijenata mogli utjecati na završne ishode studije. U istraživanje nije bila uključena kontrolna skupina bolesnika iz jedinice intenzivnog liječenja koji nisu oboljeli od COVID-19. Na kraju, u istraživanje su bile uključene samo razine ukupnog testosterona, dok se nisu promatrale razine slobodnog testosterona čime bi dobili preciznije informacije o dinamici i ulozi testosterona u navedenoj problematici.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Nije utvrđen porast serumskih razina GFAP i UCH-L1 u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 liječenih u JIL-u.
2. Razine testosterona pokazale su porast u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 liječenih u JIL-u kroz tri točke mjerenja.
3. Razine UCH-L1 bile su više pri prijemu u bolesnika s razvijenim neurološkim posljedicama u odnosu na bolesnike bez razvijenih neuroloških posljedica.
4. Razine GFAP pri prijemu nisu se razlikovale u bolesnika s i bez razvijenih neuroloških posljedica.
5. Razine UCH-L1 negativno su korelirale s razinama testosterona u sve tri točke mjerenja.
6. Razine GFAP nisu pokazale korelaciju s testosteronom u nijednoj točki mjerenja.
7. Razine GFAP pokazale su pozitivnu korelaciju s dobi bolesnika.
8. Razine UCH-L1, GFAP i testosterona nisu se razlikovale u bolesnika koji su preživjeli i bolesnika koji su preminuli od teškog i kritičnog oblika COVID-19.
9. Pronađena je značajna pozitivna korelacija između UCH-L1 i visokoosjetljivog troponina.

## **7. LITERATURA**



1. Bogoch, II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med.* 2020;27(2).
2. Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-36.
3. 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.e2.
4. Oreshkova N, Molenaar RJ, Vreman S, Harders F, Oude Munnink BB, Hakze-van der Honing RW, et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(23).
5. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature.* 2021;593(7858):266-9.
6. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature.* 2021;592(7854):438-43.
7. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DDS, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *medRxiv.* 2021.
8. Shieh-zadegan S, Alaghemand N, Fox M, Venketaraman V. Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19. *Clin Pract.* 2021;11(4):778-84.
9. Vaughan A. Omicron emerges. *New Sci.* 2021;252(3363):7.
10. Callaway E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. *Nature.* 2021;600(7887):21.
11. Chen J, Wang R, Gilby NB, Wei GW. Omicron (B.1.1.529): Infectivity, vaccine breakthrough, and antibody resistance. *ArXiv.* 2021.
12. Mourmouris P, Tzelves L, Roidi C, Fotsali A. COVID-19 transmission: a rapid systematic review of current knowledge. *Osong Public Health Res Perspect.* 2021;12(2):54-63.
13. Guo ZD, Wang ZY, Zhang SF, Li X, Li L, Li C, et al. Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(7):1583-91.
14. Kotlyar AM, Grechukhina O, Chen A, Popkhadze S, Grimshaw A, Tal O, et al. Vertical transmission of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;224(1):35-53.e3.
15. Yeo C, Kaushal S, Yeo D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible? *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(4):335-7.
16. 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;172(9):577-82.
17. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.* 2020;91(1):157-60.
18. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, Marder EP, Raz KM, El Burai Felix S, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance - United States, January 22-May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(24):759-65.
19. 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.
20. Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Krämer-Kühl A, et al. The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J Virol.* 2013;87(10):5502-11.
21. Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin.* 2020;41(9):1141-9.
22. Brielle ES, Schneidman-Duhovny D, Linial M. The SARS-CoV-2 Exerts a Distinctive Strategy for Interacting with the ACE2 Human Receptor. *Viruses.* 2020;12(5).

23. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-80.e8.
24. Alexandre J, Cracowski JL, Richard V, Bouhanick B. Renin-angiotensin-aldosterone system and COVID-19 infection. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2020;81(2-3):63-7.
25. Li X, Zhang Z, Wang Z, Gutiérrez-Castrellón P, Shi H. Cell deaths: Involvement in the pathogenesis and intervention therapy of COVID-19. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):186.
26. Carcaterra M, Caruso C. Alveolar epithelial cell type II as main target of SARS-CoV-2 virus and COVID-19 development via NF-Kb pathway deregulation: A physio-pathological theory. *Med Hypotheses*. 2021;146:110412.
27. Ni W, Yang X, Yang D, Bao J, Li R, Xiao Y, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care*. 2020;24(1):422.
28. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*. 2020;14(2):185-92.
29. Zhang H, Li HB, Lyu JR, Lei XM, Li W, Wu G, et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis*. 2020;96:19-24.
30. Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin Rheumatol*. 2020;39(7):2085-94.
31. Paolini A, Borella R, De Biasi S, Neroni A, Mattioli M, Lo Tartaro D, et al. Cell Death in Coronavirus Infections: Uncovering Its Role during COVID-19. *Cells*. 2021;10(7).
32. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zaldondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell*. 2021;184(1):149-68.e17.
33. 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.
34. Lu L, Zhang H, Dauphars DJ, He YW. A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends Immunol*. 2021;42(1):3-5.
35. Hasanvand A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. *Inflammopharmacology*. 2022;30(3):789-98.
36. Zhao CZ, Fang XC, Wang D, Tang FD, Wang XD. Involvement of type II pneumocytes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2010;104(10):1391-5.
37. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, et al. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(1):120-4.
38. Mason RJ. Thoughts on the alveolar phase of COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020;319(1):L115-120.
39. Calkovska A, Kolomaznik M, Calkovsky V. Alveolar type II cells and pulmonary surfactant in COVID-19 era. *Physiol Res*. 2021;70(S2):S195-s208.
40. Becker RC. COVID-19-associated vasculitis and vasculopathy. *J Thromb Thrombolysis*. 2020;50(3):499-511.
41. Mondal R, Lahiri D, Deb S, Bandyopadhyay D, Shome G, Sarkar S, et al. COVID-19: Are we dealing with a multisystem vasculopathy in disguise of a viral infection? *J Thromb Thrombolysis*. 2020;50(3):567-79.
42. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844-7.
43. Camporota L, Cronin JN, Busana M, Gattinoni L, Formenti F. Pathophysiology of coronavirus-19 disease acute lung injury. *Curr Opin Crit Care*. 2022;28(1):9-16.
44. Zheng KI, Feng G, Liu WY, Targher G, Byrne CD, Zheng MH. Extrapulmonary complications of COVID-19: A multisystem disease? *J Med Virol*. 2021;93(1):323-35.

45. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int.* 2020;98(1):219-27.
46. Madjid M, Safavi-Naeini P, Solomon SD, Vardeny O. Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System: A Review. *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):831-40.
47. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *Jama.* 2020;323(11):1061-9.
48. Tan ZC, Fu LH, Wang DD, Hong K. [Cardiac manifestations of patients with COVID-19 pneumonia and related treatment recommendations]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2020;48(0):E005.
49. Xiong TY, Redwood S, Prendergast B, Chen M. Coronaviruses and the cardiovascular system: acute and long-term implications. *Eur Heart J.* 2020;41(19):1798-800.
50. Zhou Z, Kang H, Li S, Zhao X. Understanding the neurotropic characteristics of SARS-CoV-2: from neurological manifestations of COVID-19 to potential neurotropic mechanisms. *J Neurol.* 2020;267(8):2179-84.
51. Lemprière S. SARS-CoV-2 detected in olfactory neurons. *Nat Rev Neurol.* 2021;17(2):63.
52. Matschke J, Lütgehetmann M, Hagel C, Sperhake JP, Schröder AS, Edler C, et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol.* 2020;19(11):919-29.
53. Bougakov D, Podell K, Goldberg E. Multiple Neuroinvasive Pathways in COVID-19. *Mol Neurobiol.* 2021;58(2):564-75.
54. Peterson CJ, Sarangi A, Bangash F. Neurological sequelae of COVID-19: a review. *Egypt J Neurol Psychiatr Neurosurg.* 2021;57(1):122.
55. Ellul MA, Benjamin L, Singh B, Lant S, Michael BD, Easton A, et al. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol.* 2020;19(9):767-83.
56. Zubair AS, McAlpine LS, Gardin T, Farhadian S, Kuruvilla DE, Spudich S. Neuropathogenesis and Neurologic Manifestations of the Coronaviruses in the Age of Coronavirus Disease 2019: A Review. *JAMA Neurol.* 2020;77(8):1018-27.
57. Hawsawi Z, Khan D, Fischer I, Cornelius JF, Hänggi D, Muhammad S. SARS-CoV-2 infection increases risk of intracranial hemorrhage. *Front Hum Neurosci.* 2022;16:991382.
58. Margos NP, Meintanopoulos AS, Filioglou D, Ellul J. Intracerebral hemorrhage in COVID-19: A narrative review. *J Clin Neurosci.* 2021;89:271-8.
59. Sojka M, Drelich-Zbroja A, Kuczyńska M, Cheda M, Dąbrowska I, Kopyto E, et al. Ischemic and Hemorrhagic Cerebrovascular Events Related to COVID-19 Coagulopathy and Hypoxemia. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(18).
60. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 2020;369(6499):50-4.
61. Yantiss RK, Qin L, He B, Crawford CV, Seshan S, Patel S, et al. Intestinal Abnormalities in Patients With SARS-CoV-2 Infection: Histopathologic Changes Reflect Mechanisms of Disease. *Am J Surg Pathol.* 2022;46(1):89-96.
62. Westerhoff M, Jones D, Hrycaj SM, Chan MP, Pantanowitz L, Tu H, et al. Gastrointestinal Pathology in Samples From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-Positive Patients. *Arch Pathol Lab Med.* 2021;145(9):1062-8.
63. Borczuk AC, Yantiss RK. The pathogenesis of coronavirus-19 disease. *J Biomed Sci.* 2022;29(1):87.
64. Barton LM, Duval EJ, Stroberg E, Ghosh S, Mukhopadhyay S. COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. *Am J Clin Pathol.* 2020;153(6):725-33.
65. Srivastava A, Rockman-Greenberg C, Sareen N, Lionetti V, Dhingra S. An insight into the mechanisms of COVID-19, SARS-CoV2 infection severity concerning  $\beta$ -cell survival and cardiovascular conditions in diabetic patients. *Mol Cell Biochem.* 2022;477(6):1681-95.

66. Baj J, Karakuła-Juchnowicz H, Teresiński G, Buszewicz G, Ciesielka M, Sitarz R, et al. COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge. *J Clin Med*. 2020;9(6).
67. Gane SB, Kelly C, Hopkins C. Isolated sudden onset anosmia in COVID-19 infection. A novel syndrome? *Rhinology*. 2020;58(3):299-301.
68. Hopkins C, Surda P, Kumar N. Presentation of new onset anosmia during the COVID-19 pandemic. *Rhinology*. 2020;58(3):295-8.
69. Hannum ME, Ramirez VA, Lipson SJ, Herriman RD, Toskala AK, Lin C, et al. Objective Sensory Testing Methods Reveal a Higher Prevalence of Olfactory Loss in COVID-19-Positive Patients Compared to Subjective Methods: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chem Senses*. 2020;45(9):865-74.
70. Printza A, Constantinidis J. The role of self-reported smell and taste disorders in suspected COVID-19. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(9):2625-30.
71. von Bartheld CS, Hagen MM, Butowt R. Prevalence of Chemosensory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis Reveals Significant Ethnic Differences. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(19):2944-61.
72. Butowt R, Bilińska K, von Bartheld C. Why Does the Omicron Variant Largely Spare Olfactory Function? Implications for the Pathogenesis of Anosmia in Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis*. 2022;226(8):1304-8.
73. von Bartheld CS, Hagen MM, Butowt R. The D614G Virus Mutation Enhances Anosmia in COVID-19 Patients: Evidence from a Systematic Review and Meta-analysis of Studies from South Asia. *ACS Chem Neurosci*. 2021;12(19):3535-49.
74. Hernandez Acosta RA, Esquer Garrigos Z, Marcelin JR, Vijayvargiya P. COVID-19 Pathogenesis and Clinical Manifestations. *Infect Dis Clin North Am*. 2022;36(2):231-49.
75. Hassett CE, Gedansky A, Migdady I, Bhimraj A, Uchino K, Cho SM. Neurologic complications of COVID-19. *Cleve Clin J Med*. 2020;87(12):729-34.
76. Ye M, Ren Y, Lv T. Encephalitis as a clinical manifestation of COVID-19. *Brain Behav Immun*. 2020;88:945-6.
77. Qureshi AI, Abd-Allah F, Al-Senani F, Aytac E, Borhani-Haghighi A, Ciccone A, et al. Management of acute ischemic stroke in patients with COVID-19 infection: Report of an international panel. *Int J Stroke*. 2020;15(5):540-54.
78. Pimentel V, Luchsinger VW, Carvalho GL, Alcará AM, Esper NB, Marinowic D, et al. Guillain-Barré syndrome associated with COVID-19: A systematic review. *Brain Behav Immun Health*. 2023;28:100578.
79. Gibson PG, Qin L, Pua SH. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. *Med J Aust*. 2020;213(2):54-6.e1.
80. Tzotzos SJ, Fischer B, Fischer H, Zeitlinger M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. *Crit Care*. 2020;24(1):516.
81. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *Jama*. 2020;324(8):782-93.
82. Gandhi RT, Lynch JB, Del Rio C. Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1757-66.
83. Ravi AB, Singh VPP, Chandran R, Venugopal K, Haridas K, Kavitha R. COVID-19 Antibody Tests: An Overview. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021;13(Suppl 1):S48-s51.
84. Dong D, Tang Z, Wang S, Hui H, Gong L, Lu Y, et al. The Role of Imaging in the Detection and Management of COVID-19: A Review. *IEEE Rev Biomed Eng*. 2021;14:16-29.
85. Maia R, Carvalho V, Faria B, Miranda I, Catarino S, Teixeira S, et al. Diagnosis Methods for COVID-19: A Systematic Review. *Micromachines (Basel)*. 2022;13(8).
86. Kljakovic-Gaspic T, Tokic D, Martinovic D, Kumric M, Supe-Domic D, Stojanovic Stipic S, et al. Prognostic Value of Catestatin in Severe COVID-19: An ICU-Based Study. *J Clin Med*. 2022;11(15).

87. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. GDF15: an emerging modulator of immunity and a strategy in COVID-19 in association with iron metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2021;32(11):875-89.
88. Varikasuvu SR, Thangappazham B, Vykunta A, Duggina P, Manne M, Raj H, et al. COVID-19 and vitamin D (Co-VIVID study): a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2022;20(6):907-13.
89. Desai AD, Lavelle M, Boursiquot BC, Wan EY. Long-term complications of COVID-19. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;322(1):C1-c11.
90. National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines. COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE)

Copyright © NICE 2020.; 2020.

91. Carfi A, Bernabei R, Landi F. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *Jama.* 2020;324(6):603-5.
92. Chopra V, Flanders SA, O'Malley M, Malani AN, Prescott HC. Sixty-Day Outcomes Among Patients Hospitalized With COVID-19. *Ann Intern Med.* 2021;174(4):576-8.
93. Mandal S, Barnett J, Brill SE, Brown JS, Denneny EK, Hare SS, et al. 'Long-COVID': a cross-sectional study of persisting symptoms, biomarker and imaging abnormalities following hospitalisation for COVID-19. *Thorax.* 2021;76(4):396-8.
94. Raj SR, Arnold AC, Barboi A, Claydon VE, Limberg JK, Lucci VM, et al. Long-COVID postural tachycardia syndrome: an American Autonomic Society statement. *Clin Auton Res.* 2021;31(3):365-8.
95. Klok FA, Kruip M, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb Res.* 2020;191:148-50.
96. 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.
97. Salisbury R, Iotchkova V, Jaafar S, Morton J, Sangha G, Shah A, et al. Incidence of symptomatic, image-confirmed venous thromboembolism following hospitalization for COVID-19 with 90-day follow-up. *Blood Adv.* 2020;4(24):6230-9.
98. Mazza MG, De Lorenzo R, Conte C, Poletti S, Vai B, Bollettini I, et al. Anxiety and depression in COVID-19 survivors: Role of inflammatory and clinical predictors. *Brain Behav Immun.* 2020;89:594-600.
99. Sarkar S, Karmakar S, Basu M, Ghosh P, Ghosh MK. Neurological damages in COVID-19 patients: Mechanisms and preventive interventions. *MedComm (2020).* 2023;4(2):e247.
100. Li D, Wang Q, Jia C, Lv Z, Yang J. An Overview of Neurological and Psychiatric Complications During Post-COVID Period: A Narrative Review. *J Inflamm Res.* 2022;15:4199-215.
101. Rogers JP, David AS. A longer look at COVID-19 and neuropsychiatric outcomes. *Lancet Psychiatry.* 2021;8(5):351-2.
102. Abu-Rumeileh S, Abdelhak A, Foschi M, Tumani H, Otto M, Guillain-Barré syndrome spectrum associated with COVID-19: an up-to-date systematic review of 73 cases. *J Neurol.* 2021;268(4):1133-70.
103. Alshrefy AJ, Alwohaibi RN, Alhazzaa SA, Almaimoni RA, AlMusaiilet LI, AlQahtani SY, et al. Incidence of Bacterial and Fungal Secondary Infections in COVID-19 Patients Admitted to the ICU. *Int J Gen Med.* 2022;15:7475-85.
104. Musuuza JS, Watson L, Parmasad V, Putman-Buehler N, Christensen L, Safdar N. Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2021;16(5):e0251170.
105. Hui DS, Chow BK, Lo T, Tsang OTY, Ko FW, Ng SS, et al. Exhaled air dispersion during high-flow nasal cannula therapy versus CPAP via different masks. *Eur Respir J.* 2019;53(4).
106. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(25):2451-60.

107. Hussain Khan Z, Maki Aldulaimi A, Varpaei HA, Mohammadi M. Various Aspects of Non-Invasive Ventilation in COVID-19 Patients: A Narrative Review. *Iran J Med Sci.* 2022;47(3):194-209.
108. Spieth PM, Koch T, Gama de Abreu M. Approaches to ventilation in intensive care. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(42):714-20.
109. Grasselli G, Cattaneo E, Florio G, Ippolito M, Zanella A, Cortegiani A, et al. Mechanical ventilation parameters in critically ill COVID-19 patients: a scoping review. *Crit Care.* 2021;25(1):115.
110. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama.* 2012;307(23):2526-33.
111. Lu S, Huang X, Liu R, Lan Y, Lei Y, Zeng F, et al. Comparison of COVID-19 Induced Respiratory Failure and Typical ARDS: Similarities and Differences. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:829771.
112. Gattinoni L, Camporota L, Marini JJ. Prone Position and COVID-19: Mechanisms and Effects. *Crit Care Med.* 2022;50(5):873-5.
113. Dilken O, Rezoagli E, Yartaş Dumanlı G, Ürkmez S, Demirkıran O, Dikmen Y. Effect of prone positioning on end-expiratory lung volume, strain and oxygenation change over time in COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A prospective physiological study. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:1056766.
114. Chaudhuri D, Sasaki K, Karkar A, Sharif S, Lewis K, Mammen MJ, et al. Corticosteroids in COVID-19 and non-COVID-19 ARDS: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2021;47(5):521-37.
115. Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(8):693-704.
116. Ranieri VM, Pettilä V, Karvonen MK, Jalkanen J, Nightingale P, Brealey D, et al. Effect of Intravenous Interferon  $\beta$ -1a on Death and Days Free From Mechanical Ventilation Among Patients With Moderate to Severe Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *Jama.* 2020;323(8):725-33.
117. Rizk JG, Kalantar-Zadeh K, Mehra MR, Lavie CJ, Rizk Y, Forthal DN. Pharmaco-Immunomodulatory Therapy in COVID-19. *Drugs.* 2020;80(13):1267-92.
118. McCreary EK, Angus DC. Efficacy of Remdesivir in COVID-19. *JAMA.* 2020;324(11):1041-2.
119. Grundeis F, Ansems K, Dahms K, Thieme V, Metzendorf MI, Skoetz N, et al. Remdesivir for the treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev.* 2023;1(1):Cd014962.
120. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med.* 2022;386(4):305-15.
121. Popp M, Stegemann M, Metzendorf MI, Gould S, Kranke P, Meybohm P, et al. Ivermectin for preventing and treating COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;7(7):Cd015017.
122. Abdelwahab OA, Diab RA, Elsaedy KS, Albakri K, El-Samahy M, Ramadan O, et al. Efficacy of therapeutic plasma exchange in patients with severe COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2023;33(3):e2435.
123. Kudlay D, Svistunov A. COVID-19 Vaccines: An Overview of Different Platforms. *Bioengineering (Basel).* 2022;9(2).
124. Steffensen MA, Jensen BA, Holst PJ, Bassi MR, Christensen JP, Thomsen AR. Pre-existing vector immunity does not prevent replication deficient adenovirus from inducing efficient CD8 T-cell memory and recall responses. *PLoS One.* 2012;7(4):e34884.
125. Tatsis N, Ertl HC. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther.* 2004;10(4):616-29.
126. Bos R, Rutten L, van der Lubbe JEM, Bakkens MJG, Hardenberg G, Wegmann F, et al. Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *NPJ Vaccines.* 2020;5:91.
127. Knoll MD, Wonodi C. Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet.* 2021;397(10269):72-4.
128. Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, Foged C, Thakur A. Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-based Vaccines. *Pharmaceutics.* 2020;12(2).
129. Park JW, Lagniton PNP, Liu Y, Xu RH. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *Int J Biol Sci.* 2021;17(6):1446-60.

130. Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *NPJ Vaccines*. 2020;5:11.
131. Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, Jiskoot W, Mastrobattista E. Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *J Pharm Sci*. 2021;110(3):997-1001.
132. Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther Deliv*. 2016;7(5):319-34.
133. Patel R, Kaki M, Potluri VS, Kahar P, Khanna D. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Hum Vaccin Immunother*. 2022;18(1):2002083.
134. Robb MA, McInnes PM, Califf RM. Biomarkers and Surrogate Endpoints: Developing Common Terminology and Definitions. *Jama*. 2016;315(11):1107-8.
135. Dadas A, Washington J, Diaz-Arrastia R, Janigro D. Biomarkers in traumatic brain injury (TBI): a review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018;14:2989-3000.
136. Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*. 2015;38(6):364-74.
137. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*. 2000;25(9-10):1439-51.
138. Grundmann D, Loris E, Maas-Omlor S, Huang W, Scheller A, Kirchoff F, et al. Enteric Glia: S100, GFAP, and Beyond. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019;302(8):1333-44.
139. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*. 2014;565:30-8.
140. Michinaga S, Koyama Y. Pathophysiological Responses and Roles of Astrocytes in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12).
141. Early AN, Gorman AA, Van Eldik LJ, Bachstetter AD, Morganti JM. Effects of advanced age upon astrocyte-specific responses to acute traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):115.
142. Mayo S, Benito-León J, Peña-Bautista C, Baquero M, Cháfer-Pericás C. Recent Evidence in Epigenomics and Proteomics Biomarkers for Early and Minimally Invasive Diagnosis of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2021;19(8):1273-303.
143. Amalia L. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): Neuroinflammation Biomarker in Acute Ischemic Stroke. *J Inflamm Res*. 2021;14:7501-6.
144. Dvorak F, Haberer I, Sitzer M, Foerch C. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(1):37-41.
145. Hansen JH, Kissner L, Chitadze G, Logoteta J, Jung O, Dütschke P, et al. Glial Fibrillary Acid Protein and Cerebral Oxygenation in Neonates Undergoing Cardiac Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;67(S 04):e11-e8.
146. Sun M, Liu N, Xie Q, Li X, Sun J, Wang H, et al. A candidate biomarker of glial fibrillary acidic protein in CSF and blood in differentiating multiple sclerosis and its subtypes: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;51:102870.
147. Bishop P, Rocca D, Henley JM. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction. *Biochem J*. 2016;473(16):2453-62.
148. Bishop P, Rubin P, Thomson AR, Rocca D, Henley JM. The ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) C terminus plays a key role in protein stability, but its farnesylation is not required for membrane association in primary neurons. *J Biol Chem*. 2014;289(52):36140-9.
149. Kim HJ, Kim HJ, Jeong JE, Baek JY, Jeong J, Kim S, et al. N-terminal truncated UCH-L1 prevents Parkinson's disease associated damage. *PLoS One*. 2014;9(6):e99654.
150. Koharudin LM, Liu H, Di Maio R, Kodali RB, Graham SH, Gronenborn AM. Cyclopentenone prostaglandin-induced unfolding and aggregation of the Parkinson disease-associated UCH-L1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6835-40.
151. Day IN, Thompson RJ. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol*. 2010;90(3):327-62.

152. Chen XS, Wang KS, Guo W, Li LY, Yu P, Sun XY, et al. UCH-L1-mediated Down-regulation of Estrogen Receptor  $\alpha$  Contributes to Insensitivity to Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Theranostics*. 2020;10(4):1833-48.
153. Song YL, Yu R, Qiao XW, Bai CM, Lu CM, Xiao Y, et al. Prognostic relevance of UCH-L1 and  $\alpha$ -internexin in pancreatic neuroendocrine tumors. *Sci Rep*. 2017;7(1):2205.
154. Lee JE, Lim YH, Kim JH. UCH-L1 and UCH-L3 regulate the cancer stem cell-like properties through PI3 K/Akt signaling pathway in prostate cancer cells. *Anim Cells Syst (Seoul)*. 2021;25(5):312-22.
155. Wilson PO, Barber PC, Hamid QA, Power BF, Dhillon AP, Rode J, et al. The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. *Br J Exp Pathol*. 1988;69(1):91-104.
156. Kyratzis E, Pavlaki M, Stefanis L. The S18Y polymorphic variant of UCH-L1 confers an antioxidant function to neuronal cells. *Hum Mol Genet*. 2008;17(14):2160-71.
157. Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, et al. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet*. 2003;12(16):1945-58.
158. Wang YL, Takeda A, Osaka H, Hara Y, Furuta A, Setsuie R, et al. Accumulation of beta- and gamma-synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1-deficient gad mouse. *Brain Res*. 2004;1019(1-2):1-9.
159. Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, et al. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem*. 2004;279(13):13256-64.
160. Mondello S, Palmio J, Streeter J, Hayes RL, Peltola J, Jeromin A. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) is increased in cerebrospinal fluid and plasma of patients after epileptic seizure. *BMC Neurol*. 2012;12:85.
161. Radón V, Czesla M, Reichelt J, Fehlert J, Hammel A, Rosendahl A, et al. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 is required for regulated protein degradation through the ubiquitin proteasome system in kidney. *Kidney Int*. 2018;93(1):110-27.
162. Reichelt J, Sachs W, Frömbling S, Fehlert J, Studencka-Turski M, Betz A, et al. Non-functional ubiquitin C-terminal hydrolase L1 drives podocyte injury through impairing proteasomes in autoimmune glomerulonephritis. *Nat Commun*. 2023;14(1):2114.
163. Lohmann F, Sachs M, Meyer TN, Sievert H, Lindenmeyer MT, Wiech T, et al. UCH-L1 induces podocyte hypertrophy in membranous nephropathy by protein accumulation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(7):945-58.
164. Meyer-Schwesinger C, Meyer TN, Münster S, Klug P, Saleem M, Helmchen U, et al. A new role for the neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) in podocyte process formation and podocyte injury in human glomerulopathies. *J Pathol*. 2009;217(3):452-64.
165. Killinger DW. Testosterone. *Can Med Assoc J*. 1970;103(7):733-5.
166. Collongues N, Patte-Mensah C, De Seze J, Mensah-Nyagan AG, Derfuss T. Testosterone and estrogen in multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutics. *Expert Rev Neurother*. 2018;18(6):515-22.
167. Sheikh-Ahmad M, Nakhleh A, Riskin A, Yovanovich E, Chen-Konak L, Reut M, et al. The correlation between testosterone, inflammation and cytokine status in type-2 diabetes men. *Andrologia*. 2022;54(10):e14526.
168. Samuel RM, Majd H, Richter MN, Ghazizadeh Z, Zekavat SM, Navickas A, et al. Androgen Signaling Regulates SARS-CoV-2 Receptor Levels and Is Associated with Severe COVID-19 Symptoms in Men. *Cell Stem Cell*. 2020;27(6):876-89.e12.
169. Montopoli M, Zumerle S, Vettor R, Rugge M, Zorzi M, Catapano CV, et al. Androgen-deprivation therapies for prostate cancer and risk of infection by SARS-CoV-2: a population-based study (N = 4532). *Ann Oncol*. 2020;31(8):1040-5.
170. Welén K, Rosendal E, Gisslén M, Lenman A, Freyhult E, Fonseca-Rodríguez O, et al. A Phase 2 Trial of the Effect of Antiandrogen Therapy on COVID-19 Outcome: No Evidence of Benefit, Supported by Epidemiology and In Vitro Data. *Eur Urol*. 2022;81(3):285-93.



171. Corona G, Vena W, Pizzocaro A, Pallotti F, Paoli D, Rastrelli G, et al. Andrological effects of SARS-Cov-2 infection: a systematic review and meta-analysis. *J Endocrinol Invest*. 2022;45(12):2207-19.
172. Groti Antonic K, Antonic B, Caliber M, Dhindsa S. Men, testosterone and Covid-19. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2023.
173. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med*. 2021;385(7):585-94.
174. Cooper J, Stukas S, Hoiland RL, Fergusson NA, Thiara S, Foster D, et al. Quantification of Neurological Blood-Based Biomarkers in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Explor*. 2020;2(10):e0238.
175. Kanberg N, Simrén J, Edén A, Andersson LM, Nilsson S, Ashton NJ, et al. Neurochemical signs of astrocytic and neuronal injury in acute COVID-19 normalizes during long-term follow-up. *EBioMedicine*. 2021;70:103512.
176. Mondello S, Papa L, Buki A, Bullock MR, Czeiter E, Tortella FC, et al. Neuronal and glial markers are differently associated with computed tomography findings and outcome in patients with severe traumatic brain injury: a case control study. *Crit Care*. 2011;15(3):R156.
177. Natoli S, Oliveira V, Calabresi P, Maia LF, Pisani A. Does SARS-Cov-2 invade the brain? Translational lessons from animal models. *Eur J Neurol*. 2020;27(9):1764-73.
178. Baig AM, Khaleeq A, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(7):995-8.
179. Kljakovic Gaspic T, Pavicic Ivelja M, Kumric M, Matetic A, Delic N, Vrkic I, et al. In-Hospital Mortality of COVID-19 Patients Treated with High-Flow Nasal Oxygen: Evaluation of Biomarkers and Development of the Novel Risk Score Model CROW-65. *Life (Basel)*. 2021;11(8).
180. Chou SH, Beghi E, Helbok R, Moro E, Sampson J, Altamirano V, et al. Global Incidence of Neurological Manifestations Among Patients Hospitalized With COVID-19-A Report for the GCS-NeuroCOVID Consortium and the ENERGY Consortium. *JAMA Netw Open*. 2021;4(5):e2112131.
181. Aghagoli G, Gallo Marin B, Katchur NJ, Chaves-Sell F, Asaad WF, Murphy SA. Neurological Involvement in COVID-19 and Potential Mechanisms: A Review. *Neurocrit Care*. 2021;34(3):1062-71.
182. Sykes DL, Holdsworth L, Jawad N, Gunasekera P, Morice AH, Crooks MG. Post-COVID-19 Symptom Burden: What is Long-COVID and How Should We Manage It? *Lung*. 2021;199(2):113-9.
183. He M, Shi X, Yang M, Yang T, Li T, Chen J. Mesenchymal stem cells-derived IL-6 activates AMPK/mTOR signaling to inhibit the proliferation of reactive astrocytes induced by hypoxic-ischemic brain damage. *Exp Neurol*. 2019;311:15-32.
184. Murta V, Villarreal A, Ramos AJ. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Impact on the Central Nervous System: Are Astrocytes and Microglia Main Players or Merely Bystanders? *ASN Neuro*. 2020;12:1759091420954960.
185. Salonia A, Pontillo M, Capogrosso P, Gregori S, Tassara M, Boeri L, et al. Severely low testosterone in males with COVID-19: A case-control study. *Andrology*. 2021;9(4):1043-52.
186. Salonia A, Pontillo M, Capogrosso P, Gregori S, Carenci C, Ferrara AM, et al. Testosterone in males with COVID-19: A 7-month cohort study. *Andrology*. 2022;10(1):34-41.
187. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):383-95.
188. Rubinow DR, Roca CA, Schmidt PJ, Danaceau MA, Putnam K, Cizza G, et al. Testosterone suppression of CRH-stimulated cortisol in men. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(10):1906-12.
189. Rosen H, Jameel ML, Barkan AL. Dexamethasone suppresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion and has direct pituitary effects in male rats: differential regulation of GnRH receptor and gonadotropin responses to GnRH. *Endocrinology*. 1988;122(6):2873-80.
190. Faw CA, Brannigan RE. Hypogonadism and cancer survivorship. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2020;27(6):411-8.

191. Wihersaari L, Reinikainen M, Tiainen M, Bendel S, Kaukonen KM, Vaahersalo J, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 after out-of-hospital cardiac arrest. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2023;67(7):964-71.
192. Tajbakhsh A, Gheibi Hayat SM, Taghizadeh H, Akbari A, Inabadi M, Savardashtaki A, et al. COVID-19 and cardiac injury: clinical manifestations, biomarkers, mechanisms, diagnosis, treatment, and follow up. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2021;19(3):345-57.

## **8. SAŽETAK**

**Uvod:** Koronavirusna bolest 2019. je visoko zarazna bolest uzrokovana SARS-CoV-2 virusom, prvi put potvrđena u Wuhanu, Kini, 2019. godine. Njeno brzo širenje i katastrofalne globalne posljedice na zdravlje i ekonomiju prisilile su cijelu zdravstvenu zajednicu na zajedničku borbu za rješanjem. Biomarkeri moždane ozljede su objektivni indikatori kako bioloških i patoloških procesa u organizmu te mogu biti korišteni u dijagnostičke, preventivne i terapijske svrhe. Ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza L1 je protein neurona koji se nalazi u citoplazmi. Glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein je strukturalni protein astrocita. Oba biomarkera su istraživana u traumatskim ozljedama mozga, ali i kod netraumatskih patoloških procesa, kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest. Testosteron je primarni muški spolni hormon odgovoran za regulaciju diferencijacije spola. Zbog češće pojavnosti COVID-19 kod muškaraca, testosteron je uvelike istraživan u bolesnika s COVID-19. Glavni cilj ovog istraživanja bio je istražiti dinamiku GFAP-a i UCH-L1 tijekom boravka bolesnika s teškom i kritičnom COVID-19 u Jedinici intenzivnog liječenja. Nadalje, sekundarni ciljevi istraživanja bili su istražiti jesu li razine GFAP i UCH-L1 više kod pacijenata koji su razvili neurološke posljedice tijekom boravka u bolnici te istražiti jesu li razine testosterona povezane s GFAP-om i UCH-L1.

**Metode:** Ova retrospektivna studija provedena je u Jedinici intenzivnog liječenja Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Split u razdoblju od siječnja do svibnja 2022. godine. U studiju je uključeno 65 muških bolesnika u dobi od 18 do 65 godina koji su liječeni u JIL-u zbog teške i kritične COVID-19 bolesti. Svi uključeni pacijenti bili su intubirani i mehanički ventilirani pri prijemu u JIL. Po prijemu u JIL bolesnicima je uzet uzorak krvi. Uzorci periferne venske krvi korišteni u ovoj studiji su izvađeni prvi, sedmi i četrnaesti dan od prijema u JIL, osim u slučaju premještanja iz JIL-a ili smrtnog ishoda bolesnika. Uzorci krvi su centrifugirani na 3000x g kroz 10 minuta te potom skladišteni na -80°C do trenutka korištenja. Koncentracije GFAP i UCH-L1 su određivane iz seruma koristeći kemiluminiscentnu imunokemijsku metodu (CMIA). Razine ukupnog testosterona su određivane pomoći imunokemijske metode. Sve pretrage su napravljene po uputama proizvođača.

**Rezultati:** Nije bilo značajne dinamike u serumskim koncentracijama biomarkera moždane ozljede UCH-L1 i GFAP u razdoblju od dva tjedna boravka u JIL-u u muških bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19. Bolesnici s razvijenim neurološkim posljedicama imali su značajnije duže vrijeme boravka u JIL-u i dulje su mehanički ventilirani ( $p = 0,014$  i  $p = 0,010$ ).

Razine testosterona pokazale su porast u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 liječenih u JIL-u kroz tri točke mjerenja ( $p < 0,001$ ). Prvi put je pokazana negativna korelacija između UCH-L1 i serumskih razina testosterona ( $p < 0,001$ ). Korelacija između GFAP i testosterona nije utvrđena. Od bolesnika koji su preživjeli teški ili kritični oblik COVID-19, bolesnici s razvijenim neurološkim posljedicama imaju značajno više razine UCH-L1 u serumu ( $p = 0,022$ ). Pronađena je značajna pozitivna korelacija između UCH-L1 i visokoosjetljivog troponina ( $p = 0,007$ ).

**Zaključak:** Nije utvrđena dinamika serumskih razina GFAP i UCH-L1 u bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 liječenih u JIL-u, dok su razine testosterona pokazale porast u tri točke mjerenja. Razine UCH-L1 bile su više pri prijemu u bolesnika s razvijenim neurološkim posljedicama u odnosu na bolesnike bez, dok se razine GFAP pri prijemu nisu se razlikovale u ispitivanim skupinama. Ovakav rezultat otvara mogućnost budućim ispitivanjima te potencijalnim prognostičkim i terapijskim metodama. Razine UCH-L1 negativno su korelirale s razinama testosterona u sve tri točke mjerenja, dok razine GFAP nisu pokazale korelaciju s testosteronom. GFAP je imao pozitivnu korelaciju s dobi bolesnika. Razine UCH-L1, GFAP i testosterona nisu se razlikovale u bolesnika koji su preživjeli i bolesnika koji su preminuli. Pronađena je značajna pozitivna korelacija između UCH-L1 i visokoosjetljivog troponina.

## **9. SUMMARY**

## **Association between serum concentration of brain injury biomarkers and testosterone in patients with severe and critical form of COVID-19**

**Background:** Coronavirus disease 2019. is a highly contagious disease caused by the SARS-CoV-2 virus, first confirmed in Wuhan, China, in 2019. Although it primarily affects the respiratory system, it also causes damage to several other organ systems. Its rapid spread and catastrophic global consequences on health and economy forced the entire health community to fight together for a solution. Brain injury biomarkers are objective indicators of both biological and pathological processes and thus can be used for diagnostic, preventive and therapeutic purposes. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 is a protein found in the cytoplasm of neurons. Glial fibrillary acid protein is a structural protein of astrocytes. Both of these biomarkers have been extensively investigated in traumatic brain injuries, but also in non-traumatic pathological processes, such as Parkinson's and Alzheimer's disease. Testosterone is the primary male sex hormone responsible for regulating sex differentiation. Due to the more frequent occurrence of COVID-19 in men, testosterone has been extensively investigated in patients with COVID-19. The main goal of this study was to investigate the dynamics of GFAP and UCH-L1 during the hospitalization of patients with severe and critical COVID-19 in the Intensive Care Unit. Furthermore, secondary study objectives were to investigate whether GFAP and UCH-L1 levels were higher in patients who developed neurological sequelae during the hospital stay and to investigate whether testosterone levels were associated with GFAP and UCH-L1.

**Participants and methods:** This retrospective study was conducted in the Intensive Care Unit of the Department for Anesthesiology, Reanimatology and Intensive Care, University Hospital of Split, Croatia in the period from January to May 2022. The study included 65 male patients between the ages of 18 and 65 who were treated in the ICU for severe and critical form of COVID-19. All included patients were intubated and mechanically ventilated upon admission to the ICU. Exclusion criteria were: female sex, active malignant disease in the past year, neuromuscular diseases, previous cerebrovascular incidents, autoimmune diseases, previously diagnosed hypogonadism, heart failure, liver failure, and kidney failure. Upon admission to the ICU blood samples were taken from the patients. Peripheral venous blood samples used in this study were taken on the first, seventh and fourteenth day after admission to the ICU, except in the case of transfer from the ICU or death of the patient. Blood samples were centrifuged at 3000x g for 10 minutes and then stored at -80°C. GFAP and UCH-L1 concentrations were

determined from serum using a chemiluminescent immunochemical method (CMIA). Total testosterone levels were determined using an immunochemical method. All tests were performed according to the manufacturer's instructions.

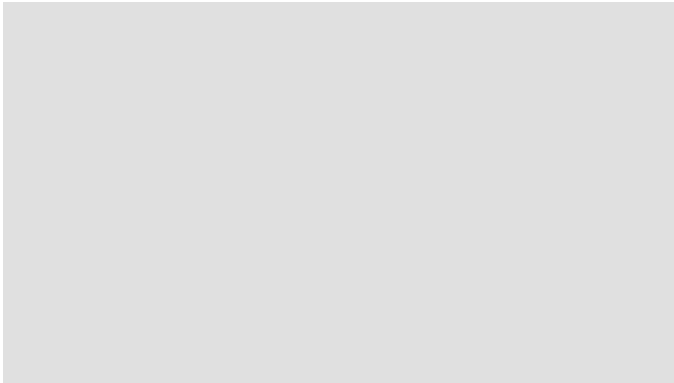
**Results:** There were no significant differences in the serum concentrations of brain injury biomarkers UCH-L1 and GFAP during a two-week stay in the ICU in male patients with severe and critical form of COVID-19. Patients with developed neurological sequelae had longer ICU stay and were mechanically ventilated for a longer period of time ( $p = 0.014$  and  $p = 0.010$ ). A negative correlation between UCH-L1 and serum testosterone levels was demonstrated for the first time ( $p < 0.001$ ). A correlation between GFAP and testosterone has not been established. Among patients who survived the severe or critical form of COVID-19, patients with developed neurological sequelae have significantly higher levels of serum UCH-L1 ( $p = 0.022$ ). A significant positive correlation was found between UCH-L1 and high-sensitivity troponin ( $p = 0.007$ ).

**Conclusions:** There was no significant difference in serum levels of GFAP and UCH-L1 in patients with severe and critical form of COVID-19 treated in the ICU for two weeks, while testosterone levels showed increase. UCH-L1 levels were higher at the admission in patients with developed neurological sequelae compared to patients without, however, GFAP levels at the admission did not differ between investigated groups. Also, UCH-L1 levels were negatively correlated with testosterone levels at all three measurement points, while GFAP levels did not show a correlation with testosterone. GFAP had a positive correlation with the age. The levels of UCH-L1, GFAP and testosterone did not differ between patients who survived and patients who died. A significant positive correlation was found between UCH-L1 and high-sensitivity troponin.



## **10. ŽIVOTOPIS**

Ime i prezime: Daria Tokić



**OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:**

2018. doktorica medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

**RADNO ISKUSTVO:**

2018.-2019. pripravnik doktor medicine, KBC Zagreb

2019.-2020. liječnik opće medicine, Zavod za hitnu medicinu SDŽ

2020.-danas specijalizant anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja, KBC Split

**NASTAVNA AKTIVNOST:**

2020.- danas, vanjski suradnik, Katedra za anesteziologiju (studij medicine, studij dentalne medicine, studij medicine na engleskom jeziku), Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

**STRANI JEZICI:**

Engleski jezik (napredno), njemački jezik (osnovno)

**PUBLIKACIJE:**

1. **Tokić D**, Mikacic M, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Rancic I, Martinovic D, Bukic J, Vrdoljak J, Lizatovic IK, Stipic SS, Supe Domic D, Bozic J. Association between Brain Injury Markers and Testosterone in Critically-Ill COVID-19 Male Patients. *Microorganisms*. 2022;10(11):2095.

2. Boric-Skaro D, Mizdrak M, Luketin M, Martinovic D, **Tokić D**, Vilovic M, Supe-Domic D, Kurir TT, Bozic J. Serum Adropin Levels in Patients on Hemodialysis. *Life (Basel)*. 2021;11(4):337.

3. Kljakovic-Gaspic T, **Tokic D**, Martinovic D, Kumric M, Supe-Domic D, Stojanovic Stipic S, Delic N, Vrdoljak J, Vilovic M, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Prognostic Value of Catestatin in Severe COVID-19: An ICU-Based Study. *J Clin Med.* 2022;11(15):4496.
4. Martinovic D, **Tokic D**, Martinovic L, Rakusic M, Kumric M, Rusic D, Vilovic M, Vrdoljak J, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Orthorexia nervosa and its association with narcissism in fitness center users. *Eat Weight Disord.* 2022;27(6):2155-2163.
5. Martinovic D, Lupi-Ferandin S, **Tokic D**, Usljebrka M, Rados A, Pojatina A, Kadic S, Puizina E, Mihovilovic A, Kumric M, Vilovic M, Leskur D, Bozic J. Objective Skin Quality Assessment after Reconstructive Procedures for Facial Skin Defects. *J Clin Med.* 2022;11(15):4471.
6. Mikacic M, Kumric M, Baricevic M, **Tokic D**, Stojanovic Stipic S, Cvitkovic I, Supe Domic D, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Dynamic of Serum TWEAK Levels in Critically Ill COVID-19 Male Patients. *J Clin Med.* 2022;11(13):3699
7. Martinovic D, **Tokic D**, Martinovic L, Vilovic M, Vrdoljak J, Kumric M, Bukic J, Ticinovic Kurir T, Tavra M, Bozic J. Adherence to Mediterranean Diet and Tendency to Orthorexia Nervosa in Professional Athletes. *Nutrients.* 2022;14(2):237.
8. Martinovic D, **Tokic D**, Vilovic M, Rusic D, Bukic J, Bozic J. Sport Dietary Supplements and Physical Activity in Biomedical Students. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(4):2046.
9. Alicic D, Martinovic D, Rusic D, Zivkovic PM, Tadin Hadjina I, Vilovic M, Kumric M, **Tokic D**, Supe-Domic D, Lupi-Ferandin S, Bozic J. Urotensin II levels in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2021;27(36):6142-6153.
10. Luketin M, Mizdrak M, Boric-Skaro D, Martinovic D, **Tokic D**, Vilovic M, Supe-Domic D, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Plasma Catestatin Levels and Advanced Glycation End Products in Patients on Hemodialysis. *Biomolecules.* 2021;11(3):456.
11. Ivkovic N, Martinovic D, Kozina S, Lupi-Ferandin S, **Tokic D**, Usljebrka M, Kumric M, Bozic J. Quality of Life and Aesthetic Satisfaction in Patients Who Underwent the "Commando Operation" with Pectoralis Major Myocutaneous Flap Reconstruction-A Case Series Study. *Healthcare (Basel).* 2022;10(9):1737.

12. Brnić D, Martinovic D, Zivkovic PM, **Tokic D**, Tadin Hadjina I, Rusic D, Vilovic M, Supe-Domic D, Tonkic A, Bozic J. Serum adropin levels are reduced in patients with inflammatory bowel diseases. *Sci Rep*. 2020;10(1):9264.
13. Brnic D, Martinovic D, Zivkovic PM, **Tokic D**, Vilovic M, Rusic D, Tadin Hadjina I, Libers C, Glumac S, Supe-Domic D, Tonkic A, Bozic J. Inactive matrix Gla protein is elevated in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2020;26(32):4866-4877.
14. Martinovic D, **Tokic D**, Puizina-Mladinic E, Kadic S, Lesin A, Lupi-Ferandin S, Kumric M, Bozic J. Oromaxillofacial Surgery: Both a Treatment and a Possible Cause of Obstructive Sleep Apnea-A Narrative Review. *Life (Basel)*. 2023;13(1):142.
15. Martinovic D, **Tokic D**, Martinovic L, Kumric M, Vilovic M, Rusic D, Vrdoljak J, Males I, Ticinovic Kurir T, Lupi-Ferandin S, Bozic J. Adherence to the Mediterranean Diet and Its Association with the Level of Physical Activity in Fitness Center Users: Croatian-Based Study. *Nutrients*. 2021;13(11):4038.
16. Martinovic D, **Tokic D**, Usljebrka M, Lupi-Ferandin S, Cigic L, Vanjaka Rogosic L, Ercegovic S, Kontic M, Kumrić M, Rusic D, Vilovic M, Leskur M, Bozic J. The Association between the Level of Advanced Glycation End Products and Objective Skin Quality Parameters. *Life (Basel)*. 2023;13(2):256.
17. Martinovic D, **Tokic D**, Puizina Mladinic E, Usljebrka M, Kadic S, Lesin A, Vilovic M, Lupi-Ferandin S, Ercegovic S, Kumric M, Bukic J, Bozic J. Nutritional Management of Patients with Head and Neck Cancer-A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2023;13(8):1864.
18. Mihovilovic A, Dogas Z, Martinovic D, **Tokic D**, Puizina Mladinic E, Kumric M, Ivkovic N, Vilovic M, Bozic J. Serum Urotensin II Levels Are Elevated in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Biomolecules*. 2023;31(6):914.
19. Frka Separovic I, Martinovic D, Lesin A, Puizina Mladinic E, **Tokic D**, Kumric M, Jurina L, Lupi-Ferandin M, Bukic J, Bozic J. Temporomandibular Disorder Prevalence and Its Association with Lifestyle Habits in Biomedicine Students-A Cross-Sectional Study. *Healthcare (Basel)*. 2023;11;(16):2261.