

Laboratorijska dijagnostika u COVID-19 bolesnika

Jelčić, Diana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:408577>

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

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



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Diana Jelčić

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA U COVID-19
BOLESNIKA**

Završni rad

Split, 2022. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Diana Jelčić

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA U COVID-19

BOLESNIKA

LABORATORY DIAGNOSIS IN COVID-19 PATIENTS

Završni rad/ Bachelor`s Thesis

Mentor:

Doc. dr. sc. Daniela Šupe-Domić

Split, 2022. godina

Ovaj rad posvećujem svim hrabrim ženama iznad 40 godina koje zakorače u nepoznato zbog znanja i napredovanja, koje ne poznaju granice i ne boje se promjena, koje probleme vide kao izazove i rješavaju ih sa smješkom.

La vita è bella.

Hvala dragoj mentorici doc.Danieli Šupe Domić na strpljivosti i ljubaznosti, Vi svijetlite!

Podrška moje obitelji puno znači. Vjekoslave, Karla i Katarina hvala što dijelite moju brigu i što trpите moju nesavršenost.

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Farmacija

Mentor: Doc. dr. sc. Daniela Šupe-Domić

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA U COVID-19 BOLESNIKA

Diana Jelčić, 311235

Sažetak:

Cilj istraživanja: istražiti da li je moguće uz pomoć analiziranih laboratorijskih parametara predvidjeti tijek i ishod bolesti COVID 19 kod starije populacije.

Ispitanici i metode: Ispitanici su 32 osobe hospitalizirane u jedinici intenzivne njege KBC Split radi COVID-19 infekcije preko 60 godina starosti od kojih je 8 preživjelih i 8 preminulih muškaraca te 8 preživjelih i 8 preminulih žena. Venepunkcija uzoraka seruma izvršila se u okviru standardnog uzorkovanja krvi u skladu s Nacionalnim preporukama za uzorkovanje venske krvi (Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) iz ožujka 2014.godine). Razine vitamina D analizirane su imunokemijskom elektrokemoluminiscentnom metodom proizvođača Roche na analizatoru Cobas e801. Razine kalcija, magnezija i fosfora analizirane su spektrofotometrijskom metodom proizvođača Roche na analizatoru Cobas c702. Broj leukocita, limfocita, neutrofilnih granulocita te trombocita su određeni na multiparametarskom hematološkom analizatoru, Advia 2120, za dijagnostiku in vitro u kliničkim laboratorijima. Pozitivan rezultat na virus SARS-Cov-2 je dokazan molekularnom PCR metodom.

Rezultati: Napravljena je usporedba razine vitamina D u skupini osoba koje su preživjele u odnosu na skupinu umrlih osoba od posljedica COVID-19 bolesti te nije uočena statistička značajnost, preživjeli vs umrli (44.0 ± 29.7 vs 36.1 ± 18.3), $p=0.376$. Ono što se primjećuje je kako obje skupine imaju sniženu razinu vitamina D u serumu. Svim uključenim pacijentima je napravljena krvna slika, razina kalcija, magnezija i fosfora u serumu. Uočavamo najveću statističku značajnost kod omjera neutrofila i limfocita $p=0.002$, te da dob osobe utječe na ishod bolesti $p=0.032$ kao i ukupni broj leukocita $p=0.028$ i razina kalcija $p=0.028$. Izmjerene razine vitamina D u korelaciji s analiziranim laboratorijskim parametrima nisu pokazale međuzavisnost odnosno nema poveznice između razine vitamina D i broja leukocita, neutrofilnih granulocita, limfocita, trombocita, neutrofilno-limfocitnog omjera, trombocitno-limfocitnog omjera, kalcija, fosfora i magnezija. Multivarijabilna logistička regresijska analiza pokazala je da je samo broj leukocita statistički značajan prediktor preživljenja COVID-19 bolesti (OR 1.570, 95% CI 1.016 - 2.427; $p = 0.041$) kada se stavi u model zajedno s osnovnim karakteristikama poput dobi i spola te s drugim osnovnim laboratorijskim parametrima (OR 1.570, 95% CI 1.016 - 2.427; $p = 0.041$).

Zaključak: Ishod bolesti COVID-19 kod istraživane populacije je lošiji što je dob starija te je još veći rizik uz visoki ukupan broj leukocita. Razina vitamina D je niska u proučavanoj skupini ali ne utječe na ishod bolesti i nema prognostički značaj. Neutrofilno-limfocitni omjer je prediktor tijekom COVID-19 bolesti te bi ga trebalo uzeti u obzir kod primjene terapije u liječenju.

Ključne riječi: COVID-19; NLR; prediktor; vitamin D

Rad sadrži: 38 stranica, 3 tablice, 4 slike, 34 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

University Department for Health Studies

Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine and health

Scientific field: Pharmacy

Supervisor: Doc. dr. sc. Daniela Šupe-Domić

LABORATORY DIAGNOSIS IN COVID-19 PATIENTS

Diana Jelčić, 311235

Summary:

Diploma thesis title: Laboratory diagnosis in COVID-19 patients

Objectives: Investigate is it possible to predict the course and outcome of COVID-19 disease in the elderly population with the help of analyzed laboratory parameters

Subjects and methods: Respondents were 32 people hospitalized in the intensive care unit of KBC Split due to COVID-19 infection over 60 years of age, of which 8 survivors and 8 deceased men and 8 survivors and 8 deceased women. Venepuncture of serum samples was performed as part of standard blood sampling in accordance with the National Recommendations for Venous Blood Sampling (Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory Medicine (HDMBLM) from March 2014). Vitamin D levels were analyzed by Roche immunochemical electrochemoluminescent method on a Cobas e801 analyzer. Calcium, magnesium and phosphorus levels were analyzed by spectrophotometric method from Roche on a Cobas c702 analyzer. A positive result for SARS-Cov-2 virus was proved by molecular PCR method.

Results: A comparison of vitamin D levels in the group of survivors compared to the group of deaths due to COVID-19 disease was made and no statistical significance was observed, survivors vs deaths (44.0 ± 29.7 vs 36.1 ± 18.3), $p = 0.376$. What is noticeable is that both groups have lowered serum vitamin D levels. A blood count, calcium, magnesium and serum phosphorus levels were performed on all patients involved. We observe the greatest statistical significance in the ratio of neutrophils and lymphocytes $p = 0.002$, and that the age of the person affects the outcome of the disease $p = 0.032$ as well as the total number of leukocytes $p = 0.028$ and calcium levels $p = 0.028$. Measured vitamin D levels in correlation with the analyzed laboratory parameters did not show interdependence, there is no connection between the level of vitamin D and the number of leukocytes, neutrophilic granulocytes, lymphocytes, platelets, neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-cell lymphocyte and lymphocyte lymphocytes. Multivariable logistic regression analysis showed that only leukocyte count was a statistically significant predictor of COVID-19 disease survival (OR 1,570, 95% CI 1,016 - 2,427; $p = 0.041$) when placed in the model along with basic characteristics such as age and sex and others basic laboratory parameters (OR 1,570, 95% CI 1,016 - 2,427; $p = 0.041$).

Conclusion: The outcome of COVID-19 disease in the elderly population is worse in the older age and the higher is the risk with a high total leukocyte count. Vitamin D levels are low in the study group but do not affect disease outcome and have no prognostic significance. The neutrophil-lymphocyte ratio is a predictor of the course of COVID-19 disease and should be considered in the treatment of therapy.

Keywords: COVID-19; NLR; predictor; vitamin D

Thesis contains: 38 pages, 3 tables, 4 figures, 34 references

Original in: Croatia

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. COVID-19	2
1.1.1. SARS-CoV-2 i citokinska oluja	2
1.1.2. Veza COVID-19 i vitamina D.....	4
1.2. VITAMIN D, VITAMIN I STEROIDNI HORMON	5
1.2.1. Vitamin D i receptori	6
1.2.2. Vitamin D i imunološki sustav	6
1.2.3. Vitamin D i dišni sustav	7
1.3. KALCIJ	7
1.3.1. Regulacija razine kalcija	8
1.3.2. Kalcij i neaktivnost tijela	8
1.3.3. Kalcij i SARS-CoV-2.....	9
1.4. MAGNEZIJ	9
1.5. FOSFOR	10
1.6. ZAŠTO SU MAGNEZIJ I FOSFOR BITNI U COVID-19 BOLESNIKA?	10
1.7. LEUKOCITI I TROMBOCITI U COVID-19 BOLESNIKA	11
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	12
3. ISPITANICI I METODE	14
3.1. Ispitanici.....	15
3.2. Materijali.....	15
3.3. Metode određivanja laboratorijskih parametara	15

3.4. Statistička obrada podataka	16
4. REZULTATI	17
5. RASPRAVA	21
6. ZAKLJUČCI	25
7. LITERATURA	27

PRILOG

1. UVOD

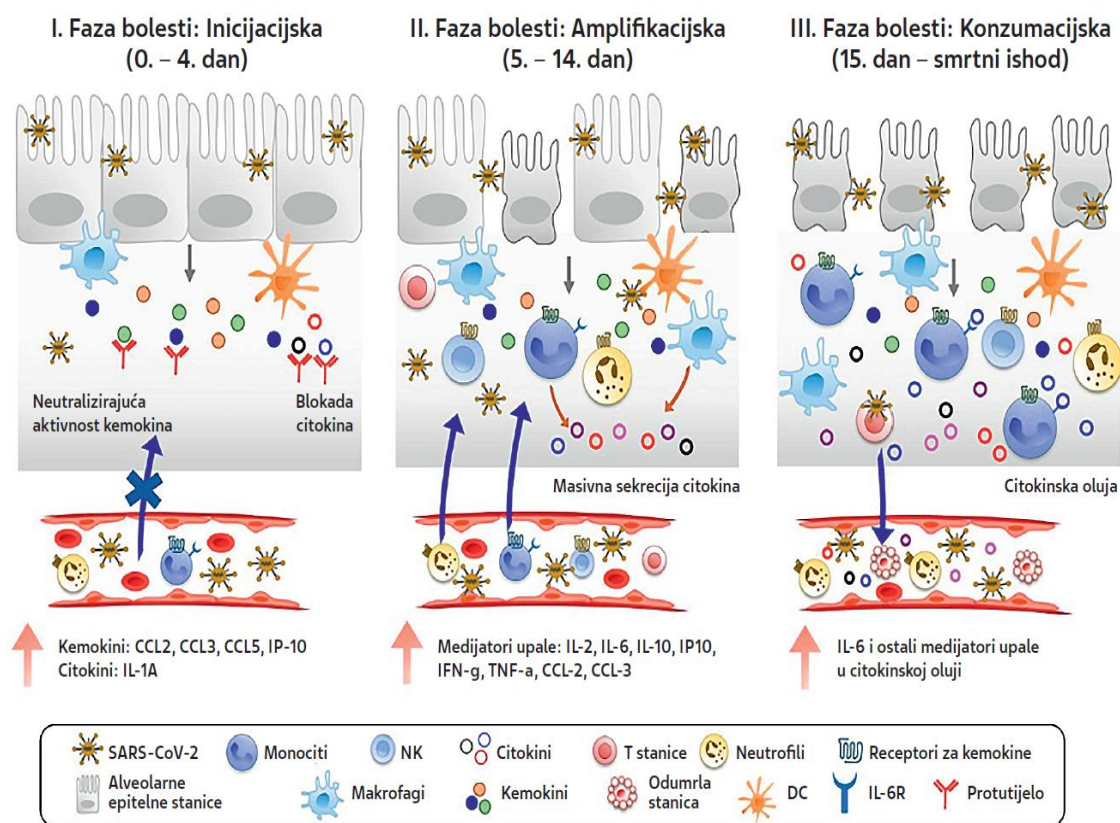
1.1. COVID-19

Koronavirusna bolest 2019 (COVID-19) je brzo rastuća pandemijska bolest uzrokovana virusom SARS-CoV-2, sedmim korona virusom koji je sposoban inficirati ljude, a uzrokuje akutne plućne poremećaje disanja. Virus ima mogućnost visoke prenosivosti, uglavnom kapljičnim putem, govorom, disanjem ili direktnim kontaktom (1,2). Klinička slika može biti u rasponu od kompletno asimptomatskog oblika do smrti uzrokovane akutnim respiracijskim distress sindromom, engl. ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrom) povezanim s višeorganskim zatajenjem, sepsom i septičkim šokom jer virus SARS-CoV-2 ne napada samo dišni sustav (1-3). Starija životna dob, pacijenti s kardiovaskularnom, šećernom ili nekim drugim pridruženim bolestima su povezani s većom smrtnošću. Do 01.travnja 2022 godine u svijetu je 490 milijuna ljudi inficirano od čega je 6,1 milijun završilo smrtnim slučajem. U očekivanju ciljanih antivirusnih pristupa, trenutno kliničko liječenje se u osnovi temelji na kontroli upalnog odgovora i respiratornoj podršci.

1.1.1. SARS-CoV-2 i citokinska oluja

Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (SARS-CoV-2) inficira plućne epitelne stanice koristeći receptore angiotenzin konvertirajućeg enzima 2 (ACE-2). Ulazak u stanicu posreduje transmembranski S glikoprotein koji strši iz površine virusa. On je podijeljen u 2 podjedinice, S1 i S2 koje posreduju u vezanju na membranu stanice i fuziju. ACE-2 receptor je dugačak transmembranski glikoprotein koji sadrži 805 aminokiselina i 2 funkcionalne domene, N terminalnu peptidaznu domenu i C terminalnu domenu. Peptidazna domena ima dva reznja u kojima se nalazi aktivno mjesto gdje se S1 podjedinica SARS-CoV-2 direktno veže (29). ACE-2 je izražen u epitelnim stanicama pluća, crijeva, bubrega, srca, adipoznog tkiva i krvnih žila (31). Visoka ekspresija ACE-2 receptora u usnoj šupljini povećava rizik infekcije SARS-CoV-2 virusom(30). Osim plućnog oštećenja, SARS-CoV-2 također inficira makrofage preko ACE-2 receptora te ih aktivira (4). Makrofagi, neutrofilni granulociti i T limfociti se kontinuirano aktiviraju citokinima, posebice interleukinima IL-1, IL-6 i faktorom tumorske nekroze α (TNF- α)

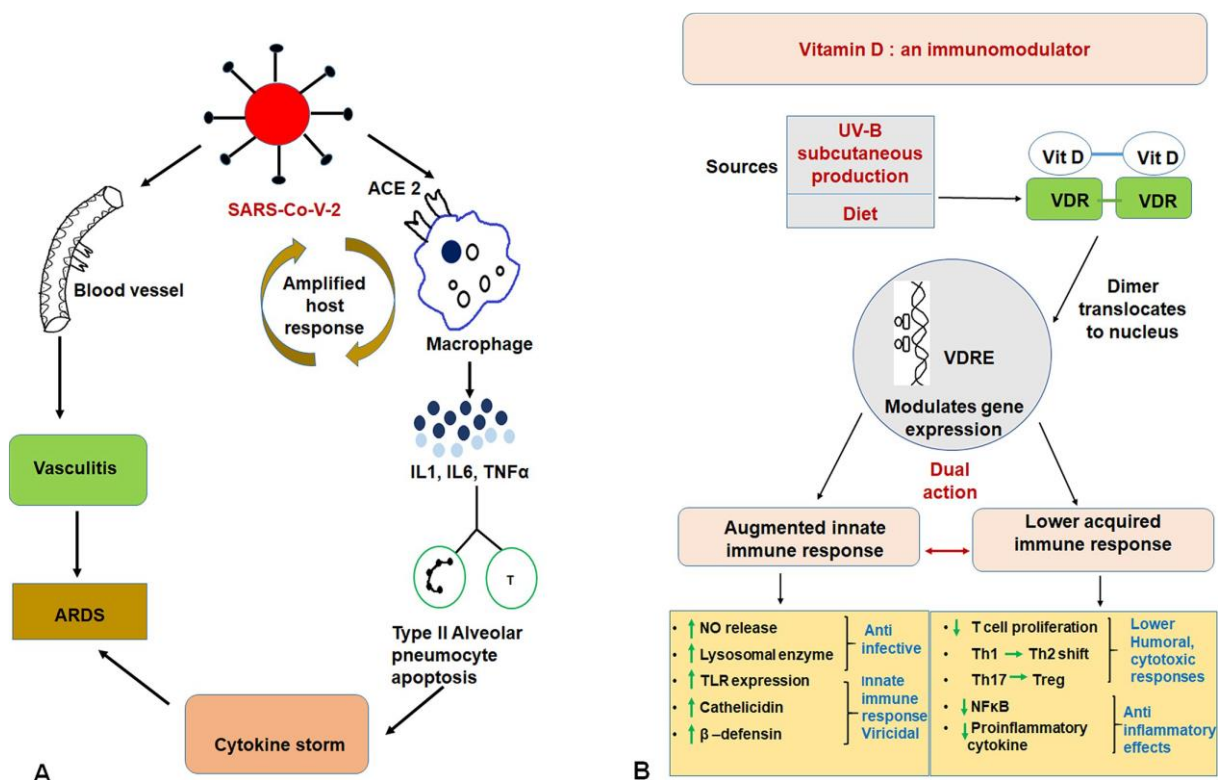
što rezultira apoptozom pneumocita i kod nekih pacijenata i ARDS-om (4). Odgovori domaćina su ponekad pojačani velikom ekspresijom proupalnih citokina (Slika 1). Pojednostavljeno bi se moglo reći kako su inicijacijska, amplifikacijska i konzumacijska faza sa slike ustvari pneumonija, ARDS i multiorgansko zatajenje. Mehanizam koji blokira lučenje prekomjernih citokina prestaje raditi. Hipoksemija i bilateralna infiltracija pluća zbog ozljede endotela, prekomjernih citokina i imunološkog preopterećenja daju sliku teške virusne upale pluća. Radi se o kaskadnom mehanizmu potencijalno smrtnog imunološkog odgovora, odnosno hiperinflamatorni odgovor na infekciju, tzv. „citokinska oluja“, a ima veliki utjecaj na smrtnost COVID-19 bolesnika (5).



Slika 1. Tri faze imunopatogeneze imunološkog odgovora kod COVID-19 koje prethode smrtnom ishodu. Preuzeto iz: COVID 19 i citokinska oluja, Marko Kutleša, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <https://hrcak.srce.hr/file/355052>

1.1.2. Veza COVID-19 i vitamina D

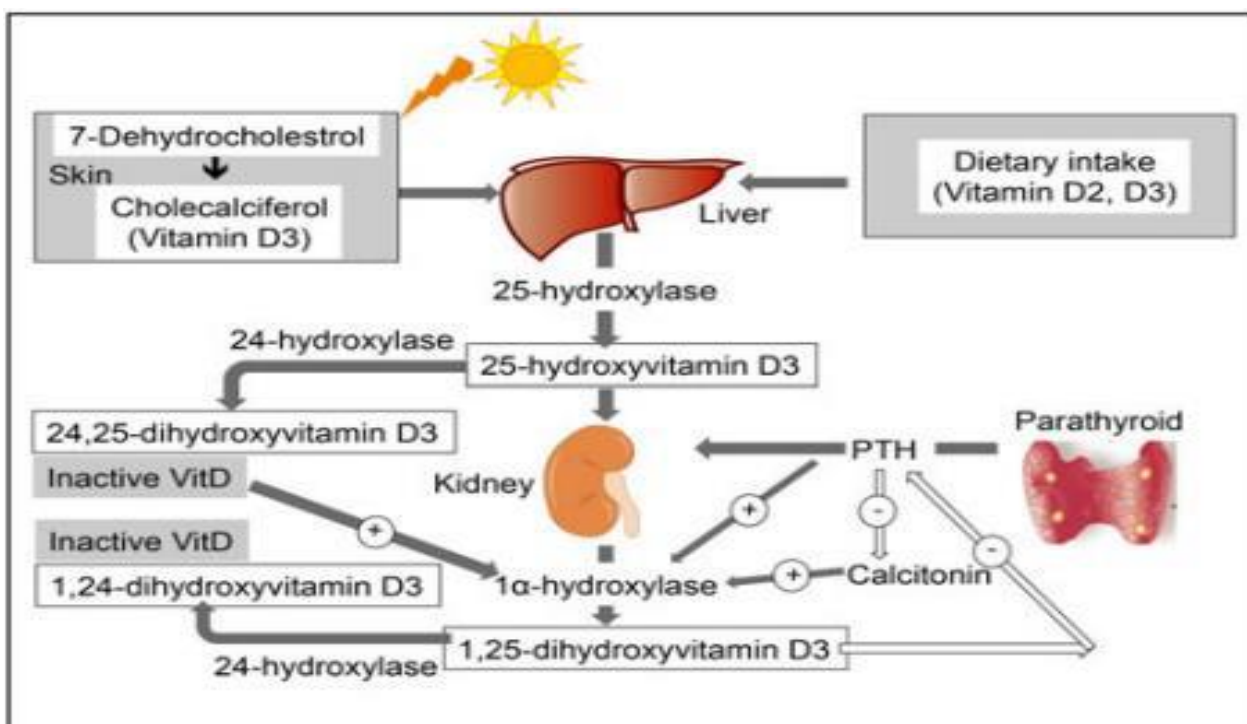
U prvoj fazi pandemije, SARS-CoV-2 infekcija je bila učestalija i agresivnija u južnim europskim zemljama, gdje je hipovitaminoza D najčešća (6,7). Razlog tome je nedovoljan boravak na suncu što zbog posla, škole, prekomjernog boravka u kući ili pak zbog straha od raka kože i korištenja zaštitnih krema od UV zraka(32). Dišne infekcije se pojavljuju češće zimi kada je i nedovoljan unos i niža razina vitamina D. Kako se infekcija koronavirusom proširila u zimskom periodu i prešla u pandemiju, tako se iznijela hipoteza da nedovoljan unos vitamina D može imati ulogu u razvoju i ozbiljnosti bolesti. Vitamin D je sposoban modulirati ekspresiju različitih gena što rezultira pojačanim urođenim imunološkim odgovorom i slabijim stečenim imunološkim odgovorom (11) (Slika 2). Dakle, postavljaju se pitanja postoji li povezanost između nedostatka vitamina D i osjetljivost na koronavirus bolest 2019 te može li se spriječiti infekcija ili promijeniti tijek bolesti suplementirajući vitamin D osobama s nedostatkom?



Slika 1. A) Osnovna patofiziologija COVID-19 i razvoj ARDS-a; B) Djelovanje vitamina D na imunološki odgovor i upalu. Preuzeto iz: Mohan M, Cherian JJ, Sharma A. Exploring links between vitamin D deficiency and COVID-19. PLoS Pathog. 2020 Sep 18;16(9):e1008874. doi: 10.1371/journal.ppat.1008874

1.2. VITAMIN D, VITAMIN I STEROIDNI HORMON

Vitamin D nije vitamin u pravome smislu jer se može sintetizirati u koži iz 7-dehidrokolesterola (međuprodukta u sintezi kolesterola koji se akumulira u koži) pod utjecajem ultraljubičastog svjetla, njegovom glavnom izvoru. U daljnim reakcijama nastaje kolekalciferol koji se apsorbira u krvotok. Drugi izvor vitamina D može biti iz hrane. Kolekalciferol, sintetiziran u koži ili iz hrane, prolazi dvostruku hidroksilaciju kako bi nastao aktivan metabolit 1,25-dihidroksi-vitamin D ili kalcitriol (Slika 3). Iako je najpoznatija njegova funkcija kontrola homeostaze kalcija, on sudjeluje u sekreciji inzulina, sintezi i sekreciji paratireoidnog i tireoidnih hormona, inhibiciji proizvodnje interleukina iz aktiviranih limfocita T i imunoglobulina iz aktiviranih limfocita B, diferencijaciji prekursora monocita i modulaciji stanične diferencijacije. U većini ovih aktivnosti vitamin D djeluje kao steroidni hormon, vezujući se na jezgrine receptore i pojačavajući ekspresiju gena i isto tako ima brzi učinak na prijenosnike kalcija u sluznici tankog crijeva (8-10)



Slika 2. Sinteza vitamina D. Preuzeto iz: Dastani Z, Li R, Richards B. Genetic regulation of vitamin D levels. *Calcif Tissue Int.* 2013 Feb;92(2):106-17

1.2.1. Vitamin D i receptori

Unutar stanice, vitamin D se veže na nuklearne receptore vitamina D (VDR). Aktivirani VDR dimeriziraju sami sebe ili s retinoidnim X receptorima (RXR) te translociraju u jezgru kako bi se uključio element receptora vitamina D (VDRE) koji regulira ekspresiju brojnih gena domaćina (Slika 2B). Osim toga, razine vitamina D mogu utjecati na ekspresiju toll-like receptora, transmembranskog proteina, koji pokreću urođeni imunološki odgovor prepoznavajući patogene (11)

1.2.2. Vitamin D i imunološki sustav

Različiti su načini utjecaja na imunološki sustav. 1,25-dihidroksi vitamin D₃ regulira antimikrobne peptide kao što su defensin i katelicidin koji imaju sposobnost uništavanja stanične membrane mycobacteria, Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (12) te posjeduje antivirusni učinak na adenovirus, herpes simplex virus, retrovirus i gljivice. Prilikom oštećenja stanične membrane, ovi peptidi ulaze u inficiranu stanicu i neutraliziraju endotoksine (13). 1,25-dihidroksi vitamin D₃ također inhibira proizvodnju proupalnih citokina i povećava proizvodnju protuupalnih citokina što nam ukazuje na utjecaj 1,25-dihidroksi vitamin D₃ na učestalost i težinu virusnih infekcija kontrolirajući sintezu i lučenje proupalnih citokina (14). Postoje i dokazi kako 1,25-dihidroksi vitamin D₃ može smanjiti sposobnost faktora tumorske nekroze (TNF- α) da pojača transkripciju RNA iz latentno inficiranih stanica virusom humane insuficijencije (HIV) (15). Nadalje, 1,25-dihidroksi vitamin D₃ inhibira proliferaciju i aktivaciju T i B limfocita (18). 1,25-dihidroksi vitamin D₃ modulira adaptivne imunološke odgovore inhibirajući funkciju Th1 stanica što dovodi do smanjenja proizvodnje TNF- α , IL-2, faktora stimulacije granulocitno makrofagne kolonije (GM-CFU) i interferon- β (IFN- β). Također, 1,25-dihidroksi vitamin D₃ pojačava djelovanje Th2 stanica i proizvodnju njihovih protuupalnih citokina, IL-4, IL-5, i IL-10 (19). Sumarno, adekvatan unos vitamina D₃ može barem djelomično zaštititi pacijente s COVID-19, inhibirajući prekomjernu proizvodnju IL-6 i TNF- α (16,17)

1.2.3. Vitamin D i dišni sustav

Mnoge studije podupiru činjenicu kako je viša razina 1,25-dihidroksi vitamina D3 u serumu povezana s niskim rizikom od mikrobnih infekcija i smrti uzrokovane infekcijom respiratornog trakta zbog pneumonije i gripe. Osim toga, preporučena razina 1,25-dihidroksi vitamina D3 u serumu bi mogla smanjiti ozbiljnost bolesti i smrtnost u SARS-CoV-2 infekciji (20). Nažalost, ne postoji standardna preporuka doze i optimalna razina 1,25-dihidroksi vitamina D3 potrebna za zaštitu od infekcije respiratornog trakta tijekom zimskog perioda. 1,25-dihidroksi vitamin D3 štiti pluća od akutne ozljede modulacijom ekspresije renin-angiotenzin sustava uključujući angiotenzin konverirajući enzim 2 (ACE2) u plućnom tkivu. Vitamin D receptori (VDR) su široko rasprostranjeni u stanicama respiratornog epitela bronha i stanicama imunološkog sustava (B limfociti, T limfociti, makrofagi i monociti). Razvoj ARDS-a pokazuje tipične promjene u propusnosti membrane alveolarnih kapilara, progresivni edem, tešku arterijsku hipoksemiju i plućnu hipertenziju. U studiji na životinjama vitamin D je značajno umanjio oštećenje pluća uzrokovano lipopolisaharidima (21). Ovo otkriće je značajno, budući da lipopolisaharidi povećavaju plućnu ekspresiju renina i angiotenzina 2 koji potiču upalu. 1,25-dihidroksi vitamin D3 smanjuje povećanu ekspresiju renina i Ang 2 i time značajno smanjuje ozljedu pluća(20). Smanjenje ekspresije ACE2 zbog infekcije SARS-CoV povezana je s akutnim oštećenjem pluća (edem, povećana vaskularna propusnost, smanjena funkcija pluća) te kao i pridružena disregulacija RAS (renin angiotenzin sustav) dovodi do pojačane upale i vaskularne propusnosti u COVID-19.

1.3. KALCIJ

Za pravilno funkcioniranje ljudskog tijela ovaj makroelement je neophodan. Kalcij utječe na mnoge ekstracelularne i intracelularne procese, esencijalan je za razvoj, rast i održavanje kostiju te za stabilnost staničnog citoskeleta. Regulira aktivnost intracelularnih enzima i sudjeluje u neuronskom provođenju kroz ionske kanale. Važan je u funkcijama kao što su kontrakcija mišića, proces stanične signalizacije i imunološki odgovor (22). Intracelularna razina kalcija je kontrolirana preko membranskih staničnih

pumpi, ATPazom i ionskim kanalima. Tijekom virusne infekcije stanična dinamika kalcija je jako promijenjena jer infektivni agensi izazivaju disregulaciju signalnih kaskada stanice domaćina (22).

1.3.1. Regulacija razine kalcija

Glavni čimbenici koji održavaju konstantnu razinu kalcija u krvi su 1,25-dihidroksi vitamin D3, paratireoidni hormon (PTH) i faktor rasta fibroblasta 23 (FGF23). Homeostaza kalcija je jako bitna jer utječe na mnoge biološke funkcije. Smanjenje kalcija u serumu dovodi do inaktivacije receptora za kalcij (CaSR- calcium sensing receptor) u paratireoidnim žlijezdama te stimulira sintezu i lučenja PTH koji se pak veže za svoj receptor u bubrezima, gdje povećava reapsorpciju kalcija i proizvodnju 1,25-dihidroksi vitamina D3. PTH i 1,25-dihidroksi vitamin D3 se svojim receptorima vežu na osteoblaste čime se poboljšava ekspresija aktivatora receptora za faktor k B ligand na jezgri osteoblasta, koji potiče osteoklastičnu resorpciju kosti i oslobađanje kalcija i fosfora u cirkulaciju. Ti mehanizmi odgovorni su za normalizaciju razina kalcija. Normalizacijom razine se pokreće mehanizam negativne povratne sprege, uključujući oslobađanje kalcitonina iz štitnjače, što smanjuje bubrežnu reapsorpciju kalcija i crijevnu apsorpciju te inhibiciju osteoklasta (23).

1.3.2. Kalcij i neaktivnost tijela

U slučaju potpune fizičke neaktivnosti, kalcij se gubi iz kostiju što rezultira brzim smanjenjem koštane mase. To se događa kod osoba čiji su dijelovi tijela stavljeni u gips ili su imobilizirani zbog paraplegije i poliomijelitisa te kod astronauta u bestežinskom stanju. Gubitak kalcija iz kostiju tijekom razdoblja neaktivnosti uglavnom su uzrokovana gubitkom proteina iz koštanog matriksa, što je povezano s gubitkom proteina iz drugih dijelova tijela, posebice mišića (23).

1.3.3. Kalcij i SARS-CoV-2

Funkcija kalcija u interakciji stanica domaćina i virusa istražena je za različite viruse, uključujući i koronavirus. Nedavno istraživanje pretpostavlja potencijalno vezanje kalcija na šest kiselinskih ostataka koji se nalaze na fuzijskom proteinu (FP), dio SARS-Cov-2 šiljastog proteina (E819, D820, D830, D839, D843 i D848) koji modulira sposobnost virusa da se infiltrira u lipidne membrane. Korištenjem stimulacije molekularne dinamike predloženo je da vezanje kalcija pojačava interakciju između fuzijskog proteina i membrana stanica domaćina. Zbog toga se korištenje specifičnih inhibitora za kalcijeve ionske kanale pokazalo uspješno u liječenju protiv virusa gripe A, Japanskog encefalitisa (JEV), hemoragijske groznice uzrokovane arenavirusom (NWA) ili ebolavirus. Temeljeno na ovome, razmatra se pozitivni potencijalni efekt liječenja COVID-19 povezanog s moduliranjem unosa kalcija i staničnih signalnih puteva (22).

1.4. MAGNEZIJ

Kao element neophodan za pravilno funkcioniranje tijela, magnezij sudjeluje u mnogim metaboličkim putevima u stanicama. Aktivira preko 300 enzima uključenih u metabolizam ugljikohidrata, nukleinskih kiselina i proteina. Djeluje kao stabilizator stanične membrane, smanjujući njihovu propusnost. Odgovoran je za održavanje homeostaze u tijelu sudjelujući u transportu elektrolita kroz stanične membrane. Ioni magnezija također su neophodni za održavanje anatomskog i funkcionalnog integriteta raznih staničnih organela, uključujući mitohondrije i ribosome. Magnezij stabilizira molekule DNA i omogućuje održavanje tercijalne strukture tRNA. Odgovoran je za normalnu kontraktilnost mišića, osjetljivost neurona, oslobađanje hormona i neurotransmitera. Djeluje kao antikoagulant, stabilizira stanične membrane trombocita i inhibira njihovu agregaciju. Utječe na leukocite tako što utječe na proces fagocitoze i stvaranje limfocita te smanjuje upalne reakcije (23).

1.5. FOSFOR

Uključen u mnoge biološke procese. Ključni je ljudski intracelularni anion koji sudjeluje u održavanju acidobazne ravnoteže, stvarajući puferske sustave u krvi i urinu. Ovaj element je dio nukleinskih kiselina i visokoenergetskih spojeva kao što su adenzin 5`-trifosfat (ATP), adenzin 5`-difosfat (ADP) i fosfokreatin. Sastojak je fosfolipida i staničnih membrana. Uključen je u provođenje živčanih podražaja. Fosfor je uz kalcij osnovni sastojak koštanog tkiva. Homeostazu fosfora reguliraju tri hormona: PTH, 1,25-dihidroksi vitamin D3 i FGF23 koje izlučuju osteociti. Odgovarajuća razina anorganskog fosfora je ključna za aktivnost osteoblasta i osteocita u procesu mineralizacije matriksa kosti. Apsorpciju fosfora inhibira kalcij i neki lijekovi (23).

1.6. ZAŠTO SU MAGNEZIJ I FOSFOR BITNI U COVID-19 BOLESNIKA?

Za sintezu i regeneraciju najvažnije energentske valute, ATP-a, potrebni su magnezij i fosfor. Zbog često nedovoljnog unosa hranom tijekom infekcije, kada su zahtjevi za ATP-om visoki zbog aktiviranih imunoloških stanica, potražnja za fosforom i magnezijem se nadoknađuje iz kostiju i mišića. Katabolizam u kostima i mišićima je odgovor na anabolizam u imunološkim stanicama koji može dovesti do intracelularnog smanjenja fosfora i ATP-a i konačno do razgradnje mišićnih stanica s otpuštanjem intracelularnog fosfora i magnezija u ekstracelularni prostor. Dakle, kod pojačanog imunološkog odgovora, kao u COVID-19 gdje dolazi do hiperreakcije i citokinske oluje, može doći do iscrpljivanja zaliha ATP-a što ozbiljno ometa imunološki sustav. Hipofosfatemija dodatno smanjuje 2,3-bifosfoglicerat u eritrocitima, koji je bitan kod oslobađanja kisika iz hemoglobina. Ovo dovodi do hipoksije tkiva. Komplikacije hipofosfatemije uključuju trombocitopeniju, koagulopatiju, disfunkciju jetre i bubrega, neurološke poremećaje, imunodeficijenciju, odgođeno odvajanje od respiratora, zatajenje srca i pluća te multiorgansko zatajenje, slično komplikacijama povezanima s COVID-19. Hipomagnezijemija može dovesti, između ostalog, do srčane aritmije, također uočene kod

pacijenata s COVID-19. Nadalje, magnezij je važan kofaktor membranske ATPaze, enzima uključenog u patogenezu sindroma akutnog respiratornog distresa. Intracelularno smanjenje ATPa zbog niskog sadržaja fosfora i magnezija može uzrokovati staničnu smrt nekrozom umjesto apoptozom što je povezano nestabilnom membranom i otpuštanjem ATPa u ekstracelularni prostor. Povećana koncentracija ekstracelularnog ATP-a započinje aktivaciju imunološkog sustava s mogućom posljedicom razvoja citokinske oluje ili ARDSa. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se povezale metaboličke promjene u koncentracijama fosfora i magnezija s težim oblicima infekcije COVID-19 (24).

1.7. LEUKOCITI I TROMBOCITI U COVID-19 BOLESNIKA

Tijekom razdoblja inkubacije, obično u rasponu od 1 do 14 dana, i tijekom rane faze bolesti, kada su nespecifični simptomi prisutni, broj leukocita i limfocita u perifernoj krvi je normalno ili blago smanjen. Otprilike 7 do 14 dana od pojave početnih simptoma, dolazi do porasta kliničkih manifestacija bolesti, povećanja upalnih medijatora i citokina. Uočljiva je i limfopenija. Razlozi limfopenije su razni. Limfociti eksprimiraju ACE2 receptor na svojoj površini te na taj način SARS-CoV-2 može izravno zaraziti te stanice i u konačnici dovesti do njihove lize. Nadalje, citokinsku oluju karakteriziraju izrazito povećane razine interleukina (uglavnom IL-6, IL-2, IL-7), stimulirajućeg faktora kolonija granulocita (CFS-G), interferona gama i TNF- α koji mogu potaknuti apoptozu limfocita. Značajna aktivacija citokina također može biti povezana s atrofijom limfnih organa, uključujući slezenu, što dodatno oštećuje promet limfocita. Povećan rizik od ARDS-a tijekom bolesti i rizik od smrti značajno je povezan s povećanim neutrofilima i smanjenim limfocitima (25). Nedavne studije pokazale su da su ozljede miokarda među bolničkim pacijentima s COVID-19 povezane s povećanom smrtnošću, višim brojem leukocita, niskim brojem limfocita i trombocita (26). Trombocitopenija je također značajno povezana s ozbiljnošću COVID-19 bolesti, uočena je osobito u onih koji nisu preživjeli (27). Predloženo je da visoki omjer trombocita i limfocita može ukazivati na izraženiju citokinsku oluju zbog pojačane aktivacije trombocita (28).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je otkriti da li je moguće uz pomoć analiziranih laboratorijskih parametara predvidjeti ishod bolesti COVID 19 kod starije populacije.

Sekundarni ciljevi istraživanja su:

1. Pružiti podatke o utjecaju koncentracije vitamina D na ishod bolesti COVID 19 u starije populacije
2. Pomoći u stjecanju informacija o povezanosti razine magnezija, fosfora, kalcija te broja leukocita, neutrofilnih granulocita, limfocita i trombocita na ishod bolesti COVID 19 u starije populacije
3. Utvrditi je li omjer neutrofilnih granulocita i limfocita te omjer trombocita i limfocita značajan za ishod bolesti COVID 19 u starije populacije
4. Odrediti međusobni odnos izmjerenih koncentracija vitamina D i laboratorijskih parametara kalcija, fosfora i magnezija

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Ispitanici su osobe hospitalizirane u jedinici intenzivnog liječenja, JIL-u Kliničkog bolničkog centra Split radi COVID-19 infekcije. Simptomi, kliničke karakteristike i anamneza dobiveni su iz elektroničkog medicinskog kartona pacijenta iz informacijskog sustava BIS (bolničko informacijski sustav). Hospitalizirani bolesnici su s pozitivnim obriskom nazofarinksa na SARS-CoV-2. Završna točka studije bio je prijem u jedinicu intenzivne njege najmanje 24 sata i bolnička smrtnost. U istraživanje je uključeno 32 bolesnika dobi preko 60 godina, od kojih je 8 preživjelih i 8 preminulih muškaraca te 8 preživjelih i 8 preminulih žena. Ispitanici su dobrovoljno uključeni u istraživanje bez kriterija isključivanja. Traženi podaci o umrlim osobama dobiveni su od članova njihovih obitelji koji su dobrovoljno pristali sudjelovati u istraživanju.

3.2. Materijali

Venepunkcija uzoraka seruma izvršila se u okviru standardnog uzorkovanja krvi u skladu s Nacionalnim preporukama za uzorkovanje venske krvi (Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) iz ožujka 2014.godine). Planirana je u okviru redovitog kontrolnog uzorkovanja te se iz spremnika odvojio volumen od 500 mikrolitara seruma koji su se do analize pohranili u laboratorijskoj ledenici na -80 stupnjeva u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku. Prikupljanje uzoraka seruma planirano je odmah nakon ishođenja odobrenja Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada i potpisanog informiranog pristanka sudionika istraživanja te se izvršilo tijekom ožujka i travnja 2021.g.

3.3. Metode određivanja laboratorijskih parametara

Razine vitamina D analizirane su imunokemijskom elektrokemoluminiscentnom metodom proizvođača Roche na analizatoru Cobas e801. Razine kalcija, magnezija i fosfora analizirane su spektrofotometrijskom metodom proizvođača Roche na

analizatoru Cobas c702. Broj leukocita, limfocita, neutrofilnih granulocita te trombocita su određeni na multiparametarskom hematološkom analizatoru, Advia 2120, za dijagnostiku in vitro u kliničkim laboratorijima. Pozitivan rezultat na virus SARS-Cov-2 je dokazan molekularnom PCR metodom.

3.4. Statistička obrada podataka

Analiza svih prikupljenih podataka je obavljena koristeći računalni program MedCalc (Medcal Software, Ostend, Belgija, verzija 20.110). Normalnost distribucije varijabli je procijenjena koristeći Kolmogorov-Smirnov test. Sve kvalitativne varijable su prikazane kao cijeli brojevi i postotak dok su kvantitativne varijable prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ili kao medijan i interkvartilni raspon. Usporedba između kategorijskih varijabli provedena koristeći Chi-kvadrat test, dok je usporedba između kontinuiranih varijabli provedena koristeći Student t-test za one s normalnom distribucijom ili Mann-Whitney U test za one s nenormalnom distribucijom. Korelacije između kvantitativnih varijabli su izračunate koristeći Pearsonov test korelacije ili Spearmanov test korelacije, ovisno o normalnosti distribucije. Nadalje, provedena je multivarijabilna logistička regresijska analiza te su prikazani OR, 95% CI i P-vrijednost. Stupanj statističke značajnosti je bio postavljen na $p < 0.05$.

4. REZULTATI

Istraživanje je obuhvatilo 32 osobe starije od 60 godina, hospitalizirane u JIL-u, od čega je 16 preživjelih i 16 umrlih od posljedica COVID-19 bolesti. Svim uključenim pacijentima je napravljena krvna slika, razina kalcija, magnezija i fosfora u serumu. Uočavamo najveću statistički značajnu razliku između dvije ispitivane skupine u omjeru neutrofila i limfocita ($p=0.002$). Također, dob osobe utječe na ishod bolesti ($p=0.032$) kao i ukupni broj leukocita ($p=0.028$) i razina kalcija s $p=0.028$ (Tablica 1.)

Tablica 1. Proučavani uzorci i usporedba između preživjele i umrle skupine

Parameter	Uzorak studije (N=32)	Preživjeli (N=16)	Umrli (N=16)	<i>p</i>
Dob (godine)	76.8 ± 7.3	74.1 ± 7.3	79.6 ± 6.5	0.032*
Muški spol	16 (50)	8 (50)	8 (50)	0.723 [#]
Broj leukocita (10 ⁹ /L)	9.3 ± 5.0	7.4 ± 2.8	11.2 ± 6.0	0.028*
Broj neutrofila (10 ⁹ /L)	7.7 ± 4.8	5.7 ± 2.6	9.7 ± 5.7	0.015*
Broj limfocita (10 ⁹ /L)	0.6 (0.4-1.4)	1.1 ± 0.6	0.6 ± 0.5	0.028*
Broj trombocita (10 ⁹ /L)	246.4 ± 129.1	270.3 ± 139.4	222.5 ± 117.5	0.302*
NLR	7.0 (4.0-24.5)	4.0 (2.5-7.0)	22.0 (6.0-56.0)	0.002†
PLR	296 (182 -532)	280 (212-322)	532 (171-972)	0.128†
Ca (mmol/L)	2.1 (2.0-2.3)	2.2 (2.1-2.4)	2.0 (1.9-2.1)	0.028†
P (mmol/L)	1.0 (0.8-1.2)	0.9 (0.8-1.0)	1.1 (0.7-1.5)	0.258†
Mg (mmol/L)	0.9 (0.79-0.96)	0.86 (0.79-0.90)	0.94 (0.82-1.16)	0.093†

Svi podaci su prikazani kao cijeli brojevi (postoci), glavna ± standardna devijacija ili medijan (interkvartilni raspon)

* student's t-test

† Mann-Whitney U test

chi-square test

Izmjerene razine vitamina D u korelaciji s analiziranim laboratorijskim parametrima nisu pokazale međuzavisnost odnosno nema poveznice između razine vitamina D i broja leukocita, neutrofilnih granulocita, limfocita, trombocita, neutrofilno-limfocitnog omjera, trombocitno-limfocitnog omjera, kalcija, fosfora i magnezija (Tablica 2.)

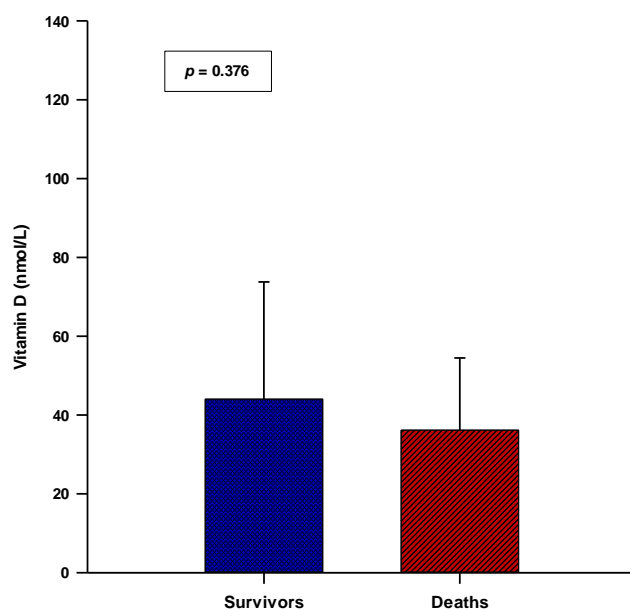
Tablica 2. Korelacije između vitamina D i laboratorijskih parametara u ispitivanoj populaciji

Parameter	r	p
Broj leukocita ($10^9/L$)	-0.105	0.566*
Broj neutrofila ($10^9/L$)	-0.167	0.361*
Broj limfocita ($10^9/L$)	0.323	0.071*
Broj trombocita ($10^9/L$)	0.317	0.077*
NLR	-0.196	0.282†
PLR	-0.015	0.934†
Ca (mmol/L)	0.297	0.098†
P (mmol/L)	0.052	0.776†
Mg (mmol/L)	-0.040	0.827†

* Pearson's correlation

† Spearman's correlation

Napravljena je usporedba razine vitamina D u skupini osoba koje su preživjele u odnosu na skupinu umrlih osoba od posljedica COVID-19 bolesti te nije uočena statistička značajnost, preživjeli vs umrli (44.0 ± 29.7 vs 36.1 ± 18.3), $p=0.376$. Ono što se primjećuje je kako obje skupine imaju sniženu razinu vitamina D u serumu (Slika 4.)



Slika 4 Usporedba razine vitamina D između preživjele skupine ($N=16$) i umrle skupine.

Student's t-test

Multivarijabilna logistička regresijska analiza pokazala je da je samo broj leukocita statistički značajan prediktor preživljenja COVID-19 bolesti (OR 1.570, 95% CI 1.016 - 2.427; $p = 0.041$) kada se stavi u model zajedno s osnovnim karakteristikama poput dobi i spola te s drugim osnovnim laboratorijskim parametrima. (OR 1.570, 95% CI 1.016 - 2.427; $p = 0.041$) (Tablica 3.)

Tablica 3. Multivarijabilna logistička regresijska analiza neovisnih prediktora za preživljavanje bolesti COVID-19

Parameter	OR	95% CI	<i>p</i>
Dob (godine)	1.1193	0.8846 to 1.4163	0.347
Muški spol ¹	0.4527	0.0378 to 5.4279	0.531
Vitamin D (nmol/L)	0.9933	0.9407 to 1.0487	0.807
Broj leukocita ($10^9/L$)	1.5708	1.0166 to 2.4271	0.041
Broj trombocita ($10^9/L$)	0.9942	0.9783 to 1.0104	0.480
NLR	0.9771	0.8654 to 1.1031	0.708
PLT	1.0071	0.9983 to 1.0161	0.115

¹ Referentna grupa je ženski spol

5. RASPRAVA

Poremećaj imunološkog sustava je obilježje teškog kliničkog tijeka bolesti COVID-19 te je sprječavanje citokinske oluje ključno u borbi protiv lošeg ishoda COVID-19 bolesti. Imunomodulatorne terapije mogu biti dvosjekli mač jer potiskuju imunوسي odgovor te je za primjenu vrlo bitno u kojim se fazama virus replicira a u kojima ne. Uloga vitamina D u početnoj replikaciji virusa i kasnije u prigušivanju proupalnih citokina je neosporna. Opaženo je kako niske razine vitamina D mogu negativno utjecati na ishod pacijenata oboljelih od COVID-19 (11). Naše istraživanje je uključilo dvije skupine bolesnika pozitivnih na SARS-Cov-2 i hospitaliziranih u jedinici intenzivne njege. U jednu skupinu je uključeno 8 preživjelih muškaraca i 8 preživjelih žena starije dobi te je u drugu skupinu uključeno 8 umrlih muškaraca i 8 umrlih žena iste dobi. Svima je izmjerena niska razina vitamina D. Nismo uspjeli dokazati njegov utjecaj na ishod bolesti s obzirom da umrla skupina nije imala značajno nižu razinu od preživjele (preživjeli vs umrli: 44.0 ± 29.7 vs 36.1 ± 18.3 , $p=0,376$). Također, nismo dokazali međuodnos vitamina D i ostalih, ovim radom, analiziranih laboratorijskih pretraga (Tablica 2). Iako je suplementacija vitaminom D jeftina i obećavajuća, nije preporučena svima. Naime, neki često korišteni lijekovi kao što su statini, antiturbekolitici i entiepileptici djeluju u interakciji s vitaminom D. Nadalje, rijetko ali vitamin D može izazvati dehidriranost i visoke razine kalcija u serumu. Iako su većina studija podržale suplementaciju, korištenje vitamina D za liječenje ili prevenciju infekcije COVID-19 još uvijek nije preporuka jer su potrebna daljnja istraživanja (11,32).

Od početka epidemije starija je životna dob povezana s težom manifestacijom COVID-19 bolesti kao i lošijim ishodom. Poznato je kako veća dob može učiniti dijagnozu složenijom jer kod starijih osoba infekcije često imaju atipične manifestacije. Česti simptomi povezani s upalom pluća u starijih osoba su pad i promjenjeni mentalni status (34). Također je udio osnovnih kroničnih bolesti daleko veći u starijih, posebno demencija, kronična opstruktivna plućna bolest, zatajenje srca i kronične bolesti bubrega što liječenje čini kompleksnijim. Iako je naše istraživanje obuhvatilo mali broj ispitanika, vrijednosti koje smo dobili idu u prilog tome da starija životna dob ima lošiji ishod bolesti, preživjeli vs umrli: 74.1 ± 7.3 vs 79.6 ± 6.5 , $p=0,032$. Kako je imunokompromitiranost izraženija u starijoj dobi, tako bi prema ovoj osjetljivoj skupini ljudi trebalo pristupiti s većom pažnjom bez obzira o kojoj se zaraznoj bolesti radilo. Oni su nas ipak donijeli na ovaj svijet.

NLR je kombinacija dva parametra iz kompletne krvne slike: broj neutrofilnih granulocita i broj limfocita. Sistemske upale povećavaju broj neutrofilnih granulocita dok je limfopenija uzrokovana apoptozom limfocita. Omjer ova dva parametara su značajna u predviđanju ishoda COVID-19 bolesti (33) što je i dokazano ovim radom. Umrle skupina je imala visok NLR i u usporedbi s preživjelom skupinom smo dokazali značajnost u ishodu bolesti ($p=0,002$). Ukupan broj leukocita, koji je u multivarijabilnoj logističkoj regresijskoj analizi neovisnih prediktora za preživljavanje bolesti COVID-19 jedini značajni pokazatelj ishoda bolesti, te NLR su dvije laboratorijske stavke koje bi liječnicima mogle pomoći u dijagnozi tijekom bolesti i pri praćenju djelotvornosti primjenjene terapije. Što se tiče trombocitopenije i trombocitno-limfocitnog omjera (TLR), ovim radom nije dokazan utjecaj na ishod bolesti. Kod broja trombocita p je 0,302 između preživjele i umrle skupine te to ne ide u prilog teoriji kako je trombocitopenija uočena kod skupine koja nije preživjela od COVID-19 bolesti (27). Ovim radom obuhvaćen je mali broj ispitanika te bi trombocitopeniju i TLR trebalo dodatno istražiti na većem broju uzoraka.

Uloga kalcija tijekom virusne infekcije, a posebno u SARS-Cov-2 se sve više proučava ali još nije u potpunosti istražena (22). Inhibicija transporta kalcija kroz membrane i unutar stanica terapijski je ciljno mjesto kod infekcije SARS-CoV-2 (22). Hipotetski bi smanjenje razine intracelularnog kalcija utjecalo na virusni kalcij u stanicama domaćina te na taj način inhibiralo virus ali postoje nuspojave kao što je depolarizacija membranskog potencijala (22). Hipokalcijemija odnosno razina ionskog kalcija ispod 1,18 mmol/L se javlja kod brojnih virusnih bolesti kao i kod pacijenata oboljelih od COVID-19. Ovim radom se dobila negativna potvrda utjecaja hipokalcijemije na ishod bolesti. Pacijenti koji su preživjeli su imali više vrijednosti od umrlih, preživjeli vs umrli: 2.2 (2.1-2.4) vs 2.0 (1.9-2.1), $p= 0,028$. Ima li hipokalcijemija zaštitni ili štetni učinak na pacijente s COVID-19 još treba istražiti.

Hipofosfatemija i hipomagnezijemija ometaju proizvodnju ATPa. Ljudi koji imaju niske rezerve ATPa razvijaju teške simptome COVID-19, kao što su citokinska oluja i ARDS (24). Iako su magnezij i fosfor uključeni u ovaj rad zbog utjecaja na rad stanica tokom bolesti, nismo dokazali imaju li vezu s ishodom. Unatoč neizvjesnoj ulozi kalcija,

magnezija i fosfora brojne studije su izvjestile o blagotvornom učinku adekvatne suplementacije vitaminima i mikronutrijentima na ishod infekcije SARS-CoV-2 (22, 24).

Nedostaci ove studije osim malog broja ispitanika je i u malom broju analiziranih biljega te ju je neophodno proširiti većim brojem laboratorijskih biljega kako bi se dale smjernice liječnicima koje bi pretrage bile prediktivne u praćenju i tijeku bolesti COVID-19.

6. ZAKLJUČCI

Glavni i sporedni ciljevi istraživanja su nam omogućili slijedeće zaključke:

1. Ishod bolesti COVID-19 kod starije populacije je lošiji, starija životna dob predstavlja veći rizik kao i visoki ukupan broj leukocita.
3. Razina vitamina D je niska u obje istraživane skupine ali ne utječe na ishod bolesti i nema prognostički značaj.
4. Neutrofilno-limfocitni omjer je prediktor tijekom COVID-19 bolesti te bi ga trebalo uzeti u obzir kod primjene terapije u liječenju.

Rezultate laboratorijskih pretraga kao i tijekom bolesti neophodno je tumačiti zajedno s kliničkom slikom pacijenta i s ostalim dijagnostičkim testovima.

7. LITERATURA

1. Zhou M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Front Med*. 2020 Apr;14(2):126-135. doi: 10.1007/s11684-020-0767-8
2. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Mar;19(3):141-154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7
3. Huang C, Soleimani J, Herasevich S, Pinevich Y, Pennington KM, Dong Y, Pickering BW, Barwise AK. Clinical Characteristics, Treatment, and Outcomes of Critically Ill Patients With COVID-19: A Scoping Review. *Mayo Clin Proc*. 2021 Jan;96(1):183-202. doi: 10.1016/j.mayocp.2020.10.022
4. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev*. 2020 Jun;19(6):102537. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102537.
5. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol*. 2021 Jan;93(1):250-256. doi: 10.1002/jmv.26232.
6. Manios Y, Moschonis G, Lambrinou CP, Tsoutsouloupoulou K, Binou P, Karachaliou A, Breidenassel C, Gonzalez-Gross M, Kiely M, Cashman KD. A systematic review of vitamin D status in southern European countries. *Eur J Nutr*. 2018 Sep;57(6):2001-2036. doi: 10.1007/s00394-017-1564-2
7. Laird E, Rhodes J, Kenny RA. Vitamin D and Inflammation: Potential Implications for Severity of Covid-19. *Ir Med J*. 2020 May 7;113(5):81. PMID: 32603576
8. Ao T, Kikuta J, Ishii M. The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. *Biomolecules*. 2021 Nov 3;11(11):1624. doi: 10.3390/biom11111624
9. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):252-62. doi: 10.1172/JCI1050

10. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology*. 2011 Oct;134(2):123-39. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03482.x.
11. Mohan M, Cherian JJ, Sharma A. Exploring links between vitamin D deficiency and COVID-19. *PLoS Pathog*. 2020 Sep 18;16(9):e1008874. doi: 10.1371/journal.ppat.1008874.
12. Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, Gombart AF, Borregaard N, Modlin RL, Hewison M. Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol*. 2009 Apr 1;182(7):4289-95. doi: 10.4049/jimmunol.0803736.
13. Herr C, Shaykhiev R, Bals R. The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2007 Sep;7(9):1449-61. doi: 10.1517/14712598.7.9.1449.
14. Gombart AF, Pierre A, Maggini S. A Review of Micronutrients and the Immune System-Working in Harmony to Reduce the Risk of Infection. *Nutrients*. 2020 Jan 16;12(1):236. doi: 10.3390/nu12010236.
15. Nunnari G, Fagone P, Lazzara F, Longo A, Cambria D, Di Stefano G, Palumbo M, Malaguarnera L, Di Rosa M. Vitamin D3 inhibits TNF α -induced latent HIV reactivation in J-LAT cells. *Mol Cell Biochem*. 2016 Jul;418(1-2):49-57. doi: 10.1007/s11010-016-2732-z.
16. Hansdottir S, Monick MM. Vitamin D effects on lung immunity and respiratory diseases. *Vitam Horm*. 2011;86:217-37. doi: 10.1016/B978-0-12-386960-9.00009-5.
17. Khare D, Godbole NM, Pawar SD, Mohan V, Pandey G, Gupta S, Kumar D, Dhole TN, Godbole MM. Calcitriol [1, 25[OH] $_2$ D $_3$] pre- and post-treatment suppresses inflammatory response to influenza A (H1N1) infection in human lung A549 epithelial cells. *Eur J Nutr*. 2013 Jun;52(4):1405-15. doi: 10.1007/s00394-012-0449-7.
18. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, Dubnov-Raz G, Esposito S, Ganmaa D, Ginde AA, Goodall EC, Grant CC, Griffiths CJ, Janssens W, Laaksi I, Manaseki-Holland S, Mauger D, Murdoch DR, Neale R, Rees JR, Simpson

S Jr, Stelmach I, Kumar GT, Urashima M, Camargo CA Jr. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ*. 2017 Feb 15;356:i6583. doi: 10.1136/bmj.i6583.

19. Howell MD, Jones JF, Kisich KO, Streib JE, Gallo RL, Leung DY. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1763-7. doi: 10.4049/jimmunol.172.3.1763

20. Wimalawansa, S. J. (2020). Global epidemic of coronavirus-COVID-19: what we can do to minimize risks. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.* 7, 432–438. Available at: https://www.ejbps.com/ejbps/abstract_id/6656

21. Xu J, Yang J, Chen J, Luo Q, Zhang Q, Zhang H. Vitamin D alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulation of the renin-angiotensin system. *Mol Med Rep*. 2017 Nov;16(5):7432-7438. doi: 10.3892/mmr.2017.7546.

22. Berlansky S, Sallinger M, Grabmayr H, Humer C, Bernhard A, Fahrner M, Frischau I. Calcium Signals during SARS-CoV-2 Infection: Assessing the Potential of Emerging Therapies. *Cells*. 2022 Jan 12;11(2):253. doi: 10.3390/cells11020253.

23. Ciosek Ż, Kot K, Kosik-Bogacka D, Łanocha-Arendarczyk N, Rotter I. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules*. 2021 Mar 28;11(4):506. doi: 10.3390/biom11040506.

24. van Kempen TATG, Deixler E. SARS-CoV-2: influence of phosphate and magnesium, moderated by vitamin D, on energy (ATP) metabolism and on severity of COVID-19. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021 Jan 1;320(1):E2-E6. doi: 10.1152/ajpendo.00474.2020.

25. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, Huang H, Zhang L, Zhou X, Du C, Zhang Y, Song J, Wang S, Chao Y, Yang Z, Xu J, Zhou X, Chen D, Xiong W, Xu L, Zhou F, Jiang J, Bai C, Zheng J, Song Y. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020 Jul 1;180(7):934-943. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994.

26. Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F, Gong W, Liu X, Liang J, Zhao Q, Huang H, Yang B, Huang C. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol.* 2020 Jul 1;5(7):802-810. doi: 10.1001/jamacardio.2020.0950.
27. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2020 Jul;506:145-148. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.022.
28. Qu R, Ling Y, Zhang YH, Wei LY, Chen X, Li XM, Liu XY, Liu HM, Guo Z, Ren H, Wang Q. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J Med Virol.* 2020 Sep;92(9):1533-1541. doi: 10.1002/jmv.25767
29. Antony P, Vijayan R. Role of SARS-CoV-2 and ACE2 variations in COVID-19. *Biomed J.* 2021 Jun;44(3):235-244. doi: 10.1016/j.bj.2021.04.006.
30. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020 Feb 24;12(1):8. doi: 10.1038/s41368-020-0074-x
31. Li MY, Li L, Zhang Y, Wang XS. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty.* 2020 Apr 28;9(1):45. doi: 10.1186/s40249-020-00662-x.
32. Alfredsson L, Armstrong BK, Butterfield DA, Chowdhury R, de Grujil FR, Feelisch M, Garland CF, Hart PH, Hoel DG, Jacobsen R, Lindqvist PG, Llewellyn DJ, Tiemeier H, Weller RB, Young AR. Insufficient Sun Exposure Has Become a Real Public Health Problem. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Jul 13;17(14):5014. doi: 10.3390/ijerph17145014

32. Boulkrane MS, Ilina V, Melchakov R, Fedotova J, Drago F, Gozzo L, Das UN, Abd El-Aty AM, Baranenko D. COVID-19 Disease and Vitamin D: A Mini-Review. *Front Pharmacol.* 2020 Dec 17;11:604579. doi: 10.3389/fphar.2020.604579

33. Sayah W, Berkane I, Guermache I, Sabri M, Lakhel FZ, Yasmine Rahali S, Djidjeli A, Lamara Mahammed L, Merah F, Belaid B, Berkani L, Lazli NZ, Kheddouci L, Kadi A, Ouali M, Khellafi R, Mekideche D, Kheliouen A, Hamidi RM, Ayoub S, Raaf NB, Derrar F, Gharnaout M, Allam I, Djidjik R. Interleukin-6, procalcitonin and neutrophil-to-lymphocyte ratio: Potential immune-inflammatory parameters to identify severe and fatal forms of COVID-19. *Cytokine.* 2021 May;141:155428. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155428.

34. Gómez-Belda AB, Fernández-Garcés M, Mateo-Sanchis E, Madrazo M, Carmona M, Piles-Roger L, Artero A. COVID-19 in older adults: What are the differences with younger patients? *Geriatr Gerontol Int.* 2021 Jan;21(1):60-65. doi: 10.1111/ggi.1410

8. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije:

Ime i prezime: Diana Jelčić (rođ. Giljanović)

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 05.Svibnja 1978.g u Splitu

Adresa stanovanja: Rimski put 41, Kaštel Sućurac

E-mail: diana.jelcic78@gmail.com

Obrazovanje:

Zdravstvena škola, Split (1992 – 1996)

Smjer: laboratorijski

Zvanje: zdravstveno laboratorijski tehničar

Radno iskustvo:

Institut Virion – molekularna mikrobiologija – 9 mjeseci

Specijalističko medicinsko-biokemijski laboratorij „Poliklinika Analiza“ - 18 godina

Centralni laboratorij KBC Firule – 1 godina

Znanje i vještine:

glavni laboratorijski tehničar od 2008g u specijalističko medicinsko biokemijskom laboratoriju Poliklinike Analiza do 09/2021

odlično znanje vađenja krvi

znanje rada na hematološkom brojaču (Celly, Sysmex, CellDin) te mikroskopu

(urini, DKS- dijagnostika mladih patoloških stanica)

znanje rada na imunokemijskom i biokemijskom analizatoru te urinskom analizatoru (Arhitect, Hitachi, Axsym, Elecsys, Sysmex)

znanje rada u mikrobiološkom laboratoriju (uzimanje uzoraka te nasijavanje na podlogama, čitanje antibiograma, izdavanje nalaza)

znanje rada u molekularnoj dijagnostici (izrada PCRa na Covid 19, spolnih bolesti)

administrativne obrade uputnica, vođenje radnog rasporeda djelatnika, vođenje skladišta
i narudžba potrošnog materijala

uzimanje uzoraka za transfuziologiju

uzimanje uzoraka za genetiku

uzimanje uzoraka za PCR testiranja i brza antigenska testiranja na Covid 19-9

obrada i izrada nalaza alergološkog testiranja (nanotehnologija, microarray)

3 godine rada u transportu krvi i kućnim posjetama

PRILOZI

POPIS KRATICA:

ACE-2 - angiotenzin konvertirajuć enzim 2

ADP- adenzin 5`-difosfat

ARDS engl.Acute Respiratory Distress Syndrom - akutni respiracijski distress sindrom

ATP - adenzin 5`-trifosfat

BIS - bolničko informacijski sustav

CFS-G - stimulirajući faktor kolonija granulocita

COVID-19 - koronavirusna bolest 2019

CaSR engl. Calcium Sensing Receptor - receptor za kalcij

FGF23 - faktor rasta fibroblasta 23

FP - fuzijski protein

GM-CFU - faktor stimulacije granulocitno makrofagne kolonije

HDMBLM - Hrvatsko Društvo za Medicinsku Biokemiju i Laboratorijsku Medicinu

HIV - virus humane insuficijencije

IL - interleukin

IFN- β - interferon- β

JEV - Japanski encefalitis

JIL - jedinica intenzivnog liječenja

NF κ B – nuklearni faktor kapa lakih lanaca aktiviranih B limfocita

NLR - neutrofilno-limfocitni omjer

NWA - hemoragijska groznica uzrokovana arenavirusom

PCR engl.polymerase chain reaction – lančana reakcija polimeraze

PTH - paratireoidni hormon

RAS - renin angiotenzin sustav

RXR - retinoidni X receptor

SARS-CoV-2 - teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2

TLR - trombocitno-limfocitni omjer

TNF engl. Tumor Necrosis Factor - faktor tumorske nekroze

VDR – receptor za vitamin D

VDRE – element receptora za vitamin D