Utjecaj nealkoholne masne bolesti jetre na serumske koncentracije transformirajućeg čimbenika rasta beta u COVID-19

Šušak, Frano

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:428032

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Frano Šušak

UTJECAJ NEALKOHOLNE MASNE BOLESTI JETRE NA SERUMSKE KONCENTRACIJE TRANSFORMIRAJUĆEG ČIMBENIKA RASTA BETA U COVID-19

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za virusni hepatitis pri Zavodu za infekcije probavnog sustava u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Nevena Papića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

POPIS OZNAKA I KRATICA:

ACE – angiotenzin konvertirajući enzim

ALP – alkalna fosfataza (engl. *alkaline phosphatase*)

ALT – alanin-aminotransferaza

ARDS – akutni respiratorni distres sindrom

AST – aspartat-aminotransferaza

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

CCL – kemokinski ligand

CDC – engl. *Centers for Disease Control and Prevention*

CO – citokinska oluja

CRP – C-reaktivni protein

CXCL – C-X-C kemokinski ligand (eng. *C-X-C motif chemokine ligand*)

ENaC – epitelni natrijski kanali

FFA – slobodne masne kiseline (eng. *free fatty acids*)

G-CSF – stimulirajući faktor kolonija granulocita (eng. *granulocyte colony-stimulating factor*)

GGT – gamma-glutamil transferaza

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

GM-CSF – stimulirajući faktor kolonija granulocita-makrofaga (eng. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HCC – hepatocelularni karcinom

HCV – virus hepatitisa C

HSC – jetrene zvjezdolike stanice (eng. *hepatic stellate cells*)

IFN – interferon

Ig – imunoglobulin

IL – interleukin

IPP – inhibitor protonske pumpe

IQR – interkvartalni raspon

JAK – Janus kinaza

JIL – Jedinica intenzivnog liječenja

LDH – laktat dehidrogenaza

MCP – monocitni kemoatraktant protein (engl. *monocyte chemoattractant protein*)

MERS-CoV – Srednjoistočni respiratorni sindrom koronavirus (eng. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*)

MetS – metabolički sindrom

MIP – upalni protein makrofaga (engl. *macrophage inflammatory protein*)

NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease)*

NLR – omjer neutrofila i limfocita (engl. *neutrophil to leukocyte ratio)*

NK – prirodnoubilačke stanice (engl. *natural killer cells)*

PLR – omjer trombocita i limfocita (engl. *platelet to lymphocyte ratio)*

PV – protrombinsko vrijeme

ROC – engl. *receiver operating characteristic*

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction)*

RNK – ribonukleinska kiselina

SARS-CoV – teški akutni respiratorni sindrom koronavirus (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*)

SpO2 – saturacija kisikom

STAT1 – engl. *signal transducer and activators of transcriptions-1*

T2DM – dijabetes mellitus tipa 2

TG – trigliceridi

Th – pomoćnički T limfociti (engl. *T-helper lymphocytes)*

TGF-β – transformirajući faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor-beta*)

TNF – tumor nekrotizirajući faktor

Treg – regulacijske stanice T

WHR – omjer kukova i bokova (engl. *waist to hip ratio*)

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. Uvod 1
   1.1. Virusologija 1
   1.2. Kliničke karakteristike COVID-19 2
   1.3. Citokinska oluja u teškom i kritičnom COVID-19 3
   1.4. Povezanost NAFLD-a i COVID-19 6
   1.5. Uloga TGF-Beta signalnog puta u NAFLD i COVID-19 7
2. Hipoteza 9
3. Ciljevi 9
4. Materijali i metode 10
   4.1. Dizajn studije 10
   4.2. Ispitanici 10
   4.3. Prikupljanje podataka, definicije i promatrani ishodi 11
   4.4. Mjerenje serumskih koncentracija slobodnog TGF-β1 12
   4.5. Statistika 12
5. Rezultati 13
   5.1. Osnovne karakteristike bolesnika s COVID-19 13
   5.2. Serumske koncentracije TGF-β1 u bolesnika s COVID-19 i NAFLD-om 16
   5.3. Korelacija serumskih koncentracija TGF-β1 s težinom COVID-19 u bolesnika s i bez NAFLD-a 18
   5.4. ROC analiza povezanosti serumskih koncentracija TGF-β1 s težinom COVID-19 20
   5.5. Korelacija serumskih koncentracija TGF-β1 s kliničkim i laboratorijskim parametrima u bolesnika s COVID-19 21
   5.6. Povezanost serumskih koncentracija TGF- β1 s kliničkim tijekom i komplikacijama COVID-19 25
   5.7. Povezanost serumskih koncentracija TGF-β1 s mortalitetom 28
6. Rasprava 30
7. Zaključak 33
8. Zahvale 34
9. Literatura 35
10. Životopis 43

SAŽETAK

Utjecaj nealkoholne masne bolesti jetre na serumske koncentracije transformirajućeg čimbenika rasta beta u COVID-19

Frano Šušak

Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD) vodeći je uzrok kronične jetrene bolesti u razvijenom svijetu i prepoznata je kao rizični faktor za razvoj težih oblika COVID-19. Unatoč tome, imunološki mehanizmi kojima NAFLD pogoršava COVID-19 su i dalje nepoznati. Transformirajući čimbenik rasta beta 1 (TGF-β1) sa svojim imunomodulatornim i profibrotičkim djelovanjem ima važnu ulogu u NAFLD-u. Njegova uloga u COVID-19 je manje jasna, ali bi mogla biti patofiziološka poveznica između te dvije bolesti. Cilj ovog istraživanja parova bio je analizirati serumske koncentracije TGF-β1 u COVID-19 pacijenata ovisno o prisustvu NAFLD-a i težine bolesti. U istraživanje je uključeno 60 hospitaliziranih COVID-19 pacijenata (od kojih 30 je dijagnosticiran NAFLD) i 20 zdravih kontrola (od kojih 10 je dijagnosticiran NAFLD) koji se nisu razlikovali ovisno o dobi i spolu. Izmjerene su im serumske koncentracije TGF-β1 te su hospitalizirani pacijenti dodatno podijeljeni u podskupine ovisno o težini COVID-19 (srednje teški, teški i kritični). Oboljeli od COVID-19 imali su niže vrijednosti TGF-β1 u odnosu na zdrave kontrole. Prisustvo NAFLD-a bilo je povezano s višim koncentracijama TGF-β1 i u COVID-19 oboljelih i u zdravih kontrola. Nadalje, serumske razine TGF-β1 korelirale su s težinom COVID-19, a najviše su bile u kritično bolesnih. Iako su teži oblici bolesti bili praćeni višim koncentracijama TGF-β1, u non-NAFLD skupini, za razliku od NAFLD skupine, nije postojala statistički značajna razlika u razini TGF-β1 ovisno o težini COVID-19. Osim toga, koncentracije TGF-β1 pokazale su dobru diskriminativnu vrijednost u predikciji razvoja komplikacija i loših ishoda COVID-19 poput potrebe za naprednim mjerama respiratorne potpore, vremena oporavka, primitka u jedinicu intenzivnog liječenja (JIL), razvoja nozokomijalnih infekcija i smrtnosti. Zaključno, TGF-β1 bi mogao biti dobar prognostički biomarker za težinu bolesti i loše ishode COVID-19 u pacijenata s NAFLD-om.

Ključne riječi: COVID-19; SARS-CoV-2; NAFLD; TGF-β1; citokini

SUMMARY

The influence of non-alcoholic fatty liver disease on serum concentrations of transforming growth factor-beta in COVID-19

Frano Šušak

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the leading cause of chronic liver disease in Western countries, was identified as a possible risk factor for COVID-19 severity. However, immunological mechanisms by which NAFLD exacerbates COVID-19 remain unknown. Transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) has an important immunomodulatory and pro-fibrotic role, which has already been well described in NAFLD. However, the role of TGF-β1 in COVID-19 remains unclear but could also be the pathophysiology link between these two conditions. The aim of this case-control study was to analyze the expression of TGF-β1 in COVID-19 patients depending on the presence of NAFLD and disease severity. Serum TGF-β1 concentrations were measured in 60 hospitalized COVID-19 patients (30 subsequently diagnosed with NAFLD) and 20 healthy controls (10 subsequently diagnosed with NAFLD). There were no differences in age and sex between the groups and the COVID-19 group was further divided into subgroups depending on disease severity (moderate, severe, and critical). The COVID-19 group had lower levels of TGF-β1 compared to healthy controls. NAFLD was associated with higher serum TGF-β1 concentrations in both the COVID-19 group and healthy controls. TGF-β1 concentrations also correlated with COVID-19 severity. However, unlike in the NAFLD group, there was no significant correlation between TGF-β1 concentrations and disease severity in the non-NAFLD group. Furthermore, admission TGF-β1 concentrations showed good discriminative accuracy in predicting the development of critical disease and COVID-19 complications (need for advanced respiratory support, ICU admission, time to recovery, development of nosocomial infections, and mortality). In conclusion, TGF-β1 could be an efficient biomarker for predicting disease severity and adverse outcomes in patients with NAFLD.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV2; NAFLD; TGF-β1; cytokines

1. Uvod

1.1. Virusologija

Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (SARS-CoV-2 prema engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), novootkriveni je koronavirus koji se prvi puta pojavio u prosincu 2019. godine u kineskom gradu Wuhanu, uzrokujući pneumoniju tada nepoznatog uzroka. U rodu betakoronavirusa , osim novootkrivenog SARS-CoV-2, nalaze se SARS-CoV (SARS-CoV-1) i Srednjoistočni respiratorni sindrom koronavirus (MERS-CoV prema engl. *Middle East respiratory syndrome* coronavirus) koji su otkriveni 2003. i 2012. godine (1,2). Iako SARS i MERS imaju veću smrtnost, SARS-CoV-2 jedini poprima pandemijski značaj sa 767 milijuna slučajeva i 6,9 milijuna smrtnih ishoda zabilježenih do lipnja 2023 (3). To je vjerojatno zbog postojanja asimptomatskih nosilaca i bolje transmisibilnosti (4). Očekivane mutacije prilikom replikacije virusa dovode do pojave novih varijanti SARS-CoV-2. Prema Svjetskoj Zdravstvenoj Organizaciji (SZO) mutacije koje značajno utječu na transmisiju, virulenciju, kliničku sliku, odgovor na liječenje i/ili djelovanje cjepiva te zahtijevaju velike javnozdravstvene intervencije stvaraju varijante koje izazivaju zabrinutost (VOC prema engl. *Variants of Concern)* (5). Trenutno vodeći Omikron predstavlja najdivergentniju VOC sa sposobnošću izbjegavanja stečenog imunosnog odgovora i predilekcijom za infekciju gornjeg dišnog sustava, za razliku od prethodnih četiriju VOC koje su pretežno zahvaćale donji dišni sustav. Posljedično velikoj transmisibilnosti i stalnim mutacijama, ali blažim kliničkim slikama od prethodnih VOC, nastale su brojne podlinije Omikrona (6). Prva klasificirana SARS-CoV-2 VOC bila je Alfa (linija B.1.1.7), otkrivena u rujnu 2020. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu gdje je imala 43% do 90% veću transmisibilnost od prijašnjeg cirkulirajućeg divljeg soja. U samo nekoliko mjeseci proširila se i postala dominantni soj diljem svijeta (7). Ubrzo nakon Alfa varijante, varijanta Beta (linija B.1.351) otkrivena u Južnoj Africi i varijanta Gama (linija P.1) otkrivena u Brazilu, postaju klasificirane kao VOC (8,9). Delta varijanta (linija B.1.617.2), čiji je prvi slučaj otkriven u rujnu 2020. godine u Indiji, istiskuje Alfa varijantu sredinom 2021. godine i postaje dominantni soj sve do pojave Omikrona (10). Delta varijanta bila je obilježena većim rizikom razvoja teškog oblika bolesti i posljedičnom hospitalizacijom (11).

1.2. Kliničke karakteristike COVID-19

Virus SARS-COV-2 širi se s osobe na osobu (prijenos s čovjeka na čovjeka), najčešće prilikom kašljanja ili kihanja, respiratornim sekretom koji sadrži čestice virusa. Prijenos se događa na tri načina: inhalacijom sitnih respiratornih kapljica ili aerosola, izravno dodirom respiratornih kapljica s izloženim mukoznim membranama i neizravno dodirom ruku kontaminiranim česticama virusa s mukoznim membranama (12). Virus se veže za angiotenzin konvertirajući enzim 2 (ACE2) receptore i ulazi u stanice endocitozom ili membranskom fuzijom (13). Polimorfizmi *ACE2* dijelom su odgovorni za interindividualne razlike u podložnosti razvoja bolesti i/ili težine same bolesti (14). Glavni protein pomoću kojeg se virus veže za receptor je protein šiljka (engl. *Spike protein*) (13). Primarno mjesto ulaska virusa su epitelne stanice gornjeg dišnog sustava, gdje se događa lokalna replikacija i širenje virusa u susjedne cilijarne stanice. U većine ljudi adekvatan imunosni odgovor onemogućava daljnje širenje virusa pa je ovo završna faza infekcije (14).

Postoje različite težine bolesti uzrokovane koronavirusom (COVID-19), sve od asimptomatske infekcije pa do respiratorne insuficijencije s multiorganskim zatajenjem. Većina oboljelih ima blaži oblik bolesti (15). SZO-ova klasifikacija COVID-19 prema težini bolesti prikazana je na Slici 1. Iako simptomi variraju po učestalosti i težini, ovisno o varijanti SARS-CoV-2, najčešće su to umor, povišena tjelesna temperatura, kašalj, glavobolja, grlobolja, rinoreja te promjene okusa i mirisa (15). Postojanje nekih od navedenih simptoma bez znakova koji bi upućivali na pneumoniju, poput dispneje i radiološki vidljivih infiltrata na plućima, karakterizira klinički blagu bolest. U srednje teškom obliku bolesti zahvaćen je donji dišni sustav, kašalj postaje izraženiji i pojavljuje se dispneja, dok je saturacija kisikom i dalje veća ili jednaka 94% na sobnom zraku. Teška pneumonija koja zahtjeva oksigenoterapiju obilježje je klinički teškog oblika bolesti; saturacija kisikom na sobnom zraku je ispod 94%, a respiratorna frekvencija iznad 30/min. Kritični oblik bolesti obilježen je akutnim respiratornim distres sindromom (ARDS), sepsom, septičkim šokom ili bilo kojim drugim stanjem koje bi zahtijevalo terapiju nadomještanja funkcije organa poput mehaničke ventilacije ili primjene vazopresora (15).

Asimptomatska infekcija	• Pozitivan PCR test na SARS-CoV-2 • Bez simptoma i znakova bolesti
Blaga bolest	• Blagi simptomi COVID-19 • Bez znakova zahvaćenosti donjih dišnih puteva
Umjereno teška bolest	• Znakovi pneumonije (kašalj, zaduha, tahipneja), radiološki vidljivi infiltrati • SpO2 ≥ 94% na sobnom zraku
Teška bolest	• Znakovi pneumonije + jedno od navedenog : • Respiratorna frekvencija >30/min • SpO2 <94% na sobnom zraku
Kritična bolest	• ARDS, sepsa, septički šok, akutna tromboza, multiorgansko zatajenje

Slika 1. Klasifikacija težine COVID-19 prema SZO-u. Slika prilagođena prema: Vince A. i sur. Molekularna biologija SARS-COV-2, patogeneza, klinička slika, liječenje i profilaksa bolesti (16).

Brojni su rizični čimbenici povezani s razvojem težih oblika i lošijih ishoda COVID-19, a najvažniji od njih svakako je dob. Osim dobi, kronične bolesti imaju važnu ulogu te imaju aditivni učinak; što je više komorbiditeta, veća je šansa razvoja težeg oblika bolesti (17). Prema podatcima *National Vital Statistics System* u sklopu *National Center for Health Statistics-Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) usporedno s dobnom skupinom 18-29 godina, rizik smrti je 25 puta veći u dobnoj skupini 50-64 godina, a 60 puta veći u onih 65-74 godina (18). Prema CDC-u, stanja koja na temelju meta-analiza ili sustavnog pregleda literature imaju jasne dokaze za barem jedan loš ishod COVID-19, kategoriziraju se kao stanja višeg rizika. Neka od tih stanja su astma, maligna bolest, kronična bolest bubrega, cerebrovaskularne bolesti, kronične jetrene bolesti, bolesti srca, dijabetes i pretilost (19).

1.3. Citokinska oluja u teškom i kritičnom COVID-19

Najteži klinički oblici COVID-19 posljedica su pretjerane aktivacije imunološkog sustava i nekontroliranog lučenja upalnih medijatora, to je stanje takozvane citokinske oluje (CO). Taj nekontrolirani upalni odgovor može inducirati staničnu smrt u raznim tkivima što može rezultirati multiorganskim zatajenjem i smrću (20). Pojednostavljeno rečeno, prije

multiorganskog zatajenja koje obilježava sistemsku CO, lokalna CO događa se u plućima uzrokujući ARDS. Širenjem virusa u donji dišni sustav dolazi do invazije alveolarnih epitelnih stanica tipa 2 (14). Smatra se da u blagoj i srednjoj teškoj kliničkoj slici ne dolazi do progresije bolesti zbog adekvatnog odgovora urođenog imunosnog sustava. Aktivacijom makrofaga dolazi do sekrecije antivirusnih interferona tipa 1 te posljedične pravovremene aktivacije T limfocita i adaptivnog imunosnog sustava. Ali, u teškom i kritičnom COVID-19 čini se da postoji supresija antivirusne interferonske kaskade (14). Neadekvatan odgovor T limfocita nastaje i zbog diferencijacije CD4+ stanica T u upalne pomoćničke T limfocite (Th prema engl. *T-helper cell*) 1 koji luče velike količine interleukina (IL)-6 i stimulirajućeg faktora kolonija granulocita-makrofaga (GM-CSF). Taj milje citokina snažno aktivira CD14+ CD16+ monocite koji migriraju iz krvi u pluća gdje postaju alveolarni makrofagi i luče visoke razine upalnih citokina uključujući IL-6 (21). Teške oblike bolesti karakterizira smanjen broj CD4+ i CD8+ T limfocita u perifernoj krvi, no oni su istovremeno u hiperaktiviranom stanju (22). Th1 limfociti, monociti, alveolarni makrofagi i Th17 limfociti oslobađaju velike količine citokina stvarajući hiperinflamatorni okoliš koji potiče ekstravazaciju neutrofila i makrofaga u pluća (23) uzrokujući dodatno oštećenje pneumocita i endotelnih stanica te posljedičnu disrupciju alveokapilarne membrane (14). Navedeno olakšava daljnje širenje virusnih čestica u susjedne pneumocite i novačenje novih upalnih stanica pa tako nastaje pozitivna povratna sprega upale i oštećenja tkiva (24). Spomenuto akutno i difuzno upalno oštećenje alveokapilarne membrane s povećanom propusnosti kapilara i redukcijom popustljivosti pluća, što kompromitira izmjenu plinova, karakterizira ARDS. Histopatološki, osim difuznog alveolarnog oštećenja u akutnoj eksudativnoj fazi, kao posljedica proliferativne faze može doći do razvoja plućne fibroze (24).

Postoji nekoliko hipoteza o nastanku CO u COVID-19. Prva je povezana s nesmetanom virusnom replikacijom koja dovodi do visoke razine piroptoze, upalnog oblika programirane stanične smrti karakteriziranog oslobađanjem brojnih citokina. Osobito zahvaća limfocite uzrokujući prije spomenutu perifernu limfopeniju koja je u snažnoj korelaciji s težinom i lošim ishodima bolesti (25,26). Unatoč limfopeniji, čini se da postoji povećan broj Th1, Th2 i Th17 stanica i njihovog citokinskog profila što pridonosi imunološki posredovanom oštećenju (27). Nesmetana virusna replikacija nastaje zbog ranije spomenutog utjecaja SARS-CoV-2 na funkciju urođenog imunosnog sustava gdje izostaje antivirusni odgovor interferona (IFN)-1 i IFN-3 na virusnu infekciju (14). Postoji nekoliko mogućih objašnjenja za smanjen interferonski odgovor poput urođenih grešaka IFN-1 imunosti, prisustva autoantitijela protiv IFN-1 i antagonističkog djelovanja virusnih proteina na interferonski signalni put (14). Neovisno o

mehanizmu, pretpostavlja se da inhibicijom interferonskog sustava dolazi do odgode aktivacije adaptivnog imunosnog sustava što omogućava porast SARS-CoV-2 virusne ribonukleinske kiseline (RNK). Posljedično tome, dolazi do kompenzatorne aktivacije i proliferacije stanica urođenog imunosnog sustava, poput neutrofila i monocita, koje pridonose hipercitokinemiji i njezinim posljedicama (14,28).

Druga hipoteza za nastanak CO povezana je sa stečenom imunosti i produkcijom neutralizirajućih protutijela na površinski antigen virusa. Kompleks virus-anti-S-IgG veže se na Fc receptore monocita/makrofaga i potiče upalnu kaskadu (29). Osim same CO i posrednim djelovanjem CO na koagulacijski sustav, oštećenje organa u COVID-19 može nastati i direktno vezanjem virusa za ACE-2 receptore. Oni su, osim na plućima kao najteže pogođenom organu, osobito izraženi na srcu i bubregu (30).

Odgovor imunosnog sustava, a time i citokinski profil, u COVID-19 oboljelih izrazito je heterogen i kompleksan (14). U teško i kritično bolesnih nađene su povišene razine IL-1β, IL-1Rα, IL-2, sIL-2Rα, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-17, IFN-γ, tumor nekrotizirajućeg faktora alfa (TNF-α), C-X-C motiv kemokinskog liganda 10/interferonom gama induciranog proteina 10 (CXCL10/IP10), kemokinskog liganda 2/monocitnog kemoatraktant proteina 1 (CCL2/MCP-1), CCL3/upalnog proteina makrofaga 1 alfa (MIP-1α), CCL4/MIP1b,CCL5 (RANTES), stimulirajućeg faktora kolonija granulocita (G-CSF), GM-CSF, faktora rasta fibroblasta (FGF) i vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) (31). Kako bi mogli stratificirati rizik za razvoj teških oblika COVID-19, važno je razlučiti citokinski profil u pacijenata koji će zahtijevati liječenje od onog u blažim oblicima COVID-19. Problem je što u početku infekcije različite težine bolesti mogu imati slične profile povišenih citokina. Unatoč heterogenom odgovoru, citokini koji su se pokazali kao potencijalno primjenjivi za praćenje u kliničkoj praksi, a da njihove povišene razine dokazano neovisno koreliraju s težinom bolesti i rizikom od smrti su IL-6, IL-10, TNF-α, IP-10 i MCP-2(CCL7) (14).

Osim stratifikacije težine bolesti, proučavanje upalnih medijatora odgovornih za CO u COVID-19 dalo je ideje za potencijalne mete ciljane imunomodulatorne terapije. Pri tome, osim problema pronalaska ciljanog upalnog medijatora, problematično je bilo utvrditi optimalan trenutak za početak primjene takve vrste terapije jer je prerana primjena mogla pogodovati virusnoj replikaciji. Povišene serumske koncentracije IL-6 u brojnim su istraživanjima nađene u pozitivnoj korelaciji s težinom kliničke slike i lošim ishodima COVID-19. Stoga se ovaj pleiotropni upalni medijator smatra potencijalno ključnim u CO (14,27,31). Tocilizumab je humanizirano rekombinantno anti-IL-6 receptor monoklonalno protutijelo koje inhibira vezanje

IL-6 za membranske i topljive forme receptora (32). Za razliku od blokatora IL-6 receptora više neselektivno terapijsko djelovanje ima baricitinib, lijek koji primarno inhibira Janus kinazu(JAK) 1 i JAK2 (33). Osim IL-6, brojni drugi citokini poput IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN-gamma i TNF-β vezanjem za svoje receptore pokreću unutarstanični signalni put vođen Janus kinazama. Baricitinib se tako suprotstavlja svim multifaktorskim učincima koje bi navedeni citokini imali (33). Trenutne smjernice SZO-a za teški i kritični oblik COVID-19 snažno preporučuju primjenu glukokortikoida, blokatora IL-6 receptora i baricitiniba, samostalno ili u kombinacijama (15).

1.4. Povezanost NAFLD-a i COVID-19

Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD, prema *engl. Non-alcoholic fatty liver disease*) vodeći je uzrok kronične jetrene bolesti u razvijenom svijetu s prevalencijom oko 25% (34). Porast incidencije NAFLD-a znatno je viši od ostalih uzroka ciroze, poput alkohola i hepatitisa C (HCV), zbog čega se očekuje da će on postati vodeća indikacija za transplantaciju jetre (35). Glavno je obilježje NAFLD-a pretjerana akumulacija masti u jetri, odnosno steatoza. Komorbiditeti koji su inače dio metaboličkog sindroma (MetS), ne samo da su visoko prevalentni u osoba s NAFLD-om, već su glavni rizični čimbenik za razvitak jetrene steatoze (34). NAFLD je tako sve više prepoznat kao jetrena manifestacija MetS te je usko povezan s pretilošću, inzulinskom rezistencijom, dijabetesom tipa 2, hipertenzijom i dislipidemijom (34,36). NAFLD uključuje dva patološki različita entiteta; nealkoholnu masnu jetru (NAFL) koju karakterizira steatoza bez hepatocelularne ozljede i nealkoholni steatohepatitis (NASH) koji je definiran steatozom uz prisustvo upale i ozljede hepatocita (34). NASH može sadržavati i komponentu jetrene fibroze koja daljnjom progresijom dovodi do ciroze i hepatocelularnog karcinoma (HCC) (36). Prema trenutnim smjernicama, dijagnoza NAFLD-a zahtijeva slikovni ili histološki dokaz jetrene steatoze uz isključenje značajne konzumacije alkohola, potencijalnih drugih uzroka jetrene steatoze i kronične jetrene bolesti (34,36).

Uloga NAFLD-a u zaraznim bolestima, prije pandemije COVID-19, bila je slabo istražena i stoga je NAFLD ostao neprepoznat kao ključan čimbenik u infekcijama. NAFLD, kao multisistemska bolest obilježena niskom razinom kronične upale, poremećenim imunosnim odgovorom i endotelnom disfunkcijom sigurno pridonosi razvoju SARS-CoV-2 infekcije (37,38). Prevalencija NAFLD-a u COVID-19 hospitaliziranih, barem kada se aktivno radi probir, kreće se od 30% do 55% (39). To je konzistentno s rezultatima da čak 95% pacijenata

nije svjesno da boluju od NAFLD-a (39). Neovisno o drugim komponentama MetS, NAFLD uzrokuje povećani rizik za SARS-CoV-2 infekciju i hospitalizaciju (40–42). Osim toga, NAFLD je povezan s razvojem teže kliničke slike, duljim trajanjem hospitalizacije i višim rizikom razvoja komplikacija COVID-19 poput plućne tromboze (39,42,43). U pacijenata s NAFLD-om postoji bazalno povišena razina CRP-a i IL-6, a ta su dva biomarkera povezana s težinom COVID-19 (37,44). COVID-19 pacijenti s NAFLD-om imaju specifični citokinski profil koji uključuje povišene razine IL-6, IL-8, IL-10 i CXCL10 te sniženu razinu IFN-gamma (45). Kao što je ranije navedeno, povišene razine tih citokina, dovedene su u korelaciju s težinom kliničke slike COVID-19 (14,44,46). Genskom analizom utvrđen je obrazac genske ekspresije u NAFLD-u izrazito sličan onom u COVID-19. U NAFLD pacijenata postoji povećana ekspresija *ACE2* i *FURIN* čiji su produkti ključni za ulazak SARS-CoV-2 u stanice (47). Nakon ulaska u stanice odgovor imunosnog sustava diktira daljnji tijek bolesti. U NAFLD-u postoji povećana ekspresija *JAK1, STAT1* (prema engl. *signal transducer and activators of transcriptions-1) i CXCL10* što uz povećane bazalne razine IL-6 vjerojatno pridonosi razvoju CO (47). Specifičnost NAFLD-a kao komorbiditeta u teškim oblicima COVID-19 uvjetuje i primijećen različit odgovor na terapiju kortikosteroidima i inhibitorima IL-6 signalnog puta (47).

1.5. Uloga TGF-Beta signalnog puta u NAFLD i COVID-19

Transformirajući čimbenik rasta-beta (TGF-β) pleiotropni je čimbenik rasta unutar nad-obitelji istoimenog naziva. Postoje tri njegove izoforme, pri čemu je TGF-β1 najrasprostranjenija u ljudskom organizmu (48). TGF-β signalni put, sa svojim predominantno imunosupresivnim učinkom, igra važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora. Sprječava proliferaciju i izvršne funkcije T limfocita, primarno Th1 stanica i citotoksičnih CD8 stanica. Istovremeno potiče diferencijaciju T limfocita u regulacijske stanice T (Treg) te inhibira djelovanje i aktivaciju B limfocita (49). Osim toga, djeluje i na urođeni imunosni sustav inhibicijom antigen-prezentirajuće funkcije dendritičkih stanica i inhibicijom prirodno ubilačkih (NK) stanica (49). Dualnost imunološke uloge, ovisno o stanju zahvaćenog organa, dolazi do izražaja činjenicom da TGF-β potiče ekspanziju upalnih Th17 stanica i da djeluje kemotaktički na ostale stanice imunološkog sustava (49). Kontrolirana aktivnost TGF-β1 ključna je za homeostazu imunološkog sustava, pri čemu se njegove povišene razine vide u procesima cijeljenja i fibroze. Odmah nakon ozljede, jedan od pokretača cijeljenja je upravo oslobođeni TGF-β1 iz trombocita oštećenih ili propusnih krvnih žila (49). Istim mehanizmima

kao u cijeljenju, samo ovaj put u patološkom kontekstu, TGF-β1 djeluje kao jedan od glavnih medijatora i pokretača fibroze tkiva (49). Osim djelovanja na imunološki sustav, TGF-β1 u početku tumorogeneze djeluje kao snažan tumor supresor, a kasnije potiče angiogenezu i tumorski rast (48).

Patogeneza NAFLD-a objašnjava se takozvanom „hipotezom višestrukih paralelnih udaraca“ (*multiple parallel hit hypothesis)*. Ona obuhvaća više faktora u nastanku NAFLD-a, poput stvaranja slobodnih radikala, oksidativnog stresa, disfunkcije mitohondrija, pretilosti, inzulinske rezistencije, smanjenja fizičke aktivnosti te neprimjerene produkcije adipokina i citokina (50). TGF-β1 kao upalni citokin, djeluje u gotovo svim fazama jetrene bolesti. Njegove povišene razine koreliraju s težinom NAFLD-a te su predložene kao marker jetrene fibroze (51,52). Osim toga, TGF-β signalni put doveden je u korelaciju s razvojem raznih komponenata MetS poput hipertenzije, hiperlipidemije i ateroskleroze (53). NAFLD započinje nakupljanjem slobodnih masnih kiselina (FFA) i posljedično triglicerida (TG) u jetri, što uzrokuje oksidativni stres. Takav okoliš potiče hepatocite na sekreciju proupalnih citokina, među kojima je i TGF-β1 (54). Visoke razine TGF-β kao posljedica kronične ozljede jetre rezultiraju masivnom staničnom smrti hepatocita te aktivacijom i pretvorbom zvjezdolikih stanica jetre (HSC) u miofibroblaste (54). Diferencirane HSC luče velike količine ekstracelularnog matriksa pa posljedično dolazi do fibroze (54). Postoje jasni dokazi da pretjerana aktivacija TGF-β signalnog puta s vremenom uzrokuje rezistenciju hepatocita na njegov inače tumor supresorski učinak, što kasnije pridonosi razvoju HCC (54).

Uloga TGF-β1 u COVID-19 i dalje je nerazjašnjena zbog heterogenosti rezultata istraživanja. Istraživanja koja proučavaju razine serumskog TGF-β1 u COVID-19 pacijenata imaju različite rezultate. Jedni pronalaze povišene razine koje koreliraju s težinom bolest (55–58), drugi ne pronalaze razlike između COVID-19 i kontrola (59), a neki zapažaju snižene razine u COVID-19 skupini (60,61). Potencijalna uloga TGF-β1 u COVID-19 je njegovo djelovanje na razvoj ARDS-a. Osim povećane propusnosti krvnih žila i destrukcije alveokapilarne membrane, u podlozi alveolarnog edema u ARDS-u je i smanjen transport natrija i tekućine kroz dijelove s intaktnim epitelom. Transcelularni transporti natrija na apikalnoj membrani pneumocita, odvijaju se kroz epitelne natrijske kanale (ENaC). TGF-β1 uzrokuje endocitozu ENaC smanjujući transport natrija što posljedično smanjuje i količinu natrija u intersticiju. Zbog toga se gubi osmotski gradijent potreban za apsorpciju tekućine iz alveola pri čemu se pogoršava prisutni alveolarni edem (62). TGF-β1, kao što je ranije navedeno, djeluje imunosupresivno, a to je dokazano i u teškom COVID-19. NK stanice jedne

su od glavnih medijatora urođene imunosti, a supresija njihove funkcije zapažena je u direktnoj ovisnosti s povećanim serumskim razinama TGF-β1 u COVID-19 teško oboljelih (63). Supresija adaptivnog imunosnog odgovora vidi se u djelovanju TGF-β1 na plazmablaste uzrokujući prekapčanje na neefikasna IgA protutijela u teško COVID-19 oboljelih (58). Zbog heterogenosti istraživanja, uloga TGF-β1 u COVID-19 nije još posve jasna (64).

2. Hipoteza

Serumske koncentracije TGF-β1 više su u bolesnika s COVID-19 i NAFLD-om u odnosu na bolesnike bez NAFLD-a te koreliraju s težinom kliničke slike i ishodima COVID-19.

3. Ciljevi

Glavni cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj nealkoholne masne bolesti jetre na serumske koncentracije TGF-β1 u hospitaliziranih bolesnika s COVID-19.

Specifični ciljevi su:

- izmjeriti i usporediti serumske koncentracije TGF-β1 između 4 skupine ispitanika ovisno o prisustvu NAFLD-a i/ili infekcije SARS-CoV-2
- analizirati povezanost serumskih koncentracija TGF-β1 s težinom COVID-19 u bolesnika s ili bez NAFLD-a
- analizirati povezanost serumskih koncentracija TGF-β1 s kliničkim i laboratorijskim parametrima u bolesnika s COVID-19
- odrediti granične vrijednosti serumskih koncentracija TGF-β1 za razlikovanje kritičnog od teškog i srednje teškog oblika COVID-19
- utvrditi prediktivnu vrijednost serumskih koncentracija TGF-β1 za mortalitet u bolesnika s COVID-19

4. Materijali i metode

4.1. Dizajn studije

Ova monocentrična studija provedena je u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ retrospektivnom analizom prospektivno prikupljenih podataka u periodu od 1.4.2021. do 31.12.2021. godine. Ovo istraživanje dio je projekta CovidFAT (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04982328) odobrenog od strane Etičkog Povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“.

4.2. Ispitanici

Uključeno je ukupno 80 odraslih ispitanika: 60 hospitaliziranih bolesnika s postavljenom dijagnozom COVID-19 prema ispod navedenim kriterijima i 20 zdravih kontrola.

Zdravstveni radnici koji su pristupili cijepljenju prvom dozom cjepiva protiv COVID-19 u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ bez aktivne SARS-CoV-2 infekcije čine zdravu kontrolu ove studije: 10 zdravih ispitanika bez NAFLD-a i 10 ispitanika kojima je dijagnosticiran NAFLD.

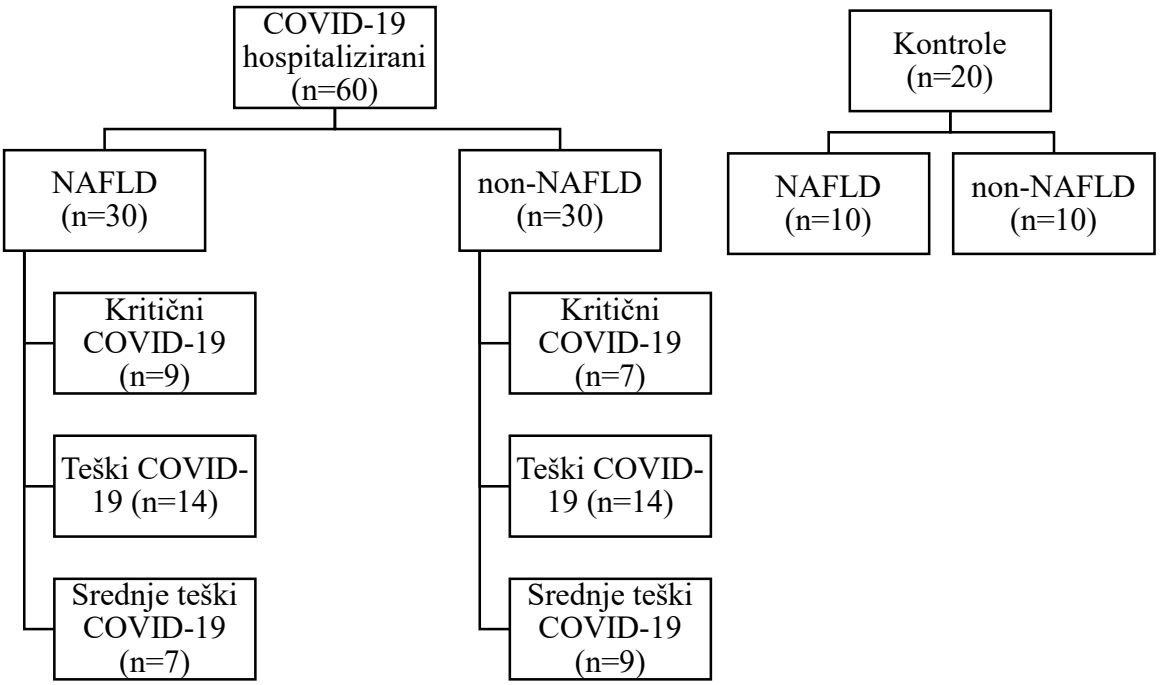
Uključni kriteriji za bolesnike s COVID-19: oblik COVID-19 koji zahtjeva bolničko liječenje, a definiran je prema prethodno navedenoj klasifikaciji SZO-a kao srednje teški, teški i kritični COVID-19 (15).

Isključni kriteriji: bolesnici s malignim bolestima, bolesnici s od prije poznatom kroničnom jetrenom bolesti ili cirozom, alkoholičari, trudnice, imunokompromitirani bolesnici, bolesnici na palijativnoj skrbi, bolesnici zaprimljeni u jedinicu za intenzivno liječenje unutar prvih 24 sata od prijema, bolesnici umrli unutar 48 sati od prijema, bolesnici koji su prije prijema u bolnicu primali kortikosteroidnu terapiju i bolesnici koji su kod prijema imali dokazanu bakterijsku infekciju.

Svim je ispitanicima prije prijema u Kliniku učinjen probir na komponente metaboličkog sindroma i ultrazvuk jetre, na temelju kojeg su podijeljeni u dvije skupine: bolesnici s NAFLD i bolesnici bez NAFLD-a (non-NAFLD grupa). Nadalje, ovisno o težini kliničke slike COVID-19 bolesnici su dalje podijeljeni u tri skupine: srednje teški, teški i kritični COVID-19, a prema kriterijima SZO-a (15).

Plan istraživanja prikazan je na Slici 2.

Svi sudionici imaju potpisani informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Navedeni ispitanici nisu do sada uključeni u druge publikacije.



Slika 2. Prikaz skupina ispitanika

4.3. Prikupljanje podataka, definicije i promatrani ishodi

Pri prijemu prikupljeni su sljedeći podatci: dob, spol, podatci o komorbiditetima, kronična medikamentozna terapija, simptomi s kojima su se prezentirali, vitalni parametri i laboratorijski parametri (hemoglobin, broj eritrocita, broj trombocita, broj leukocita, apsolutni broj neutrofila i limfocita, aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, gama-glutamil transferaza, laktat dehidrogenaza, alkalna fosfataza, protrombinsko vrijeme, fibrinogen, D-dimeri, glukoza, ureja, kreatinin, kreatninin-kinaza, albumini, natrij, CRP, prokalcitonin, IL-6, feritin). Također, napravljena su i antropometrijska mjerenja koja uključuju indeks tjelesne mase (eng. BMI), opseg struka, opseg bokova te omjer struka i bokova (WHR). BMI iznad 30 kg/m^2 definiran je kao pretilost. Prikupljeni su i podatci koje smo koristili kao pokazatelje ishoda, a oni uključuju trajanje hospitalizacije, razinu potrebne respiratorne potpore (tip oksigenoterapije), potrebu za invazivnom i ne-invazivnom ventilacijom, primitak u jedinicu

intenzivnog liječenja, plućnu trombozu, razvoj bakterijskih superinfekcija i mortalitet. Svi pacijenti liječeni su po tada važećim smjernicama uključujući primjenu remdesivira, deksametazona, tocilizumaba, baricitiniba i niskomolekularnog heparina.

SARS-CoV2 infekcija potvrđena je u uzorku nazofaringealnog obriska metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR).

Jetrena steatoza i stupanj težine steatoze procijenjeni su ultrazvučnom metodom, koja se bazira na prikazu hiperehogenosti jetre u odnosu na parenhim bubrega (65). Dijagnoza NAFLD-a postavljena je prema trenutnim smjernicama koje zahtijevaju slikovni dokaz jetrene steatoze uz isključenje značajne konzumacije alkohola, potencijalnih drugih uzroka jetrene steatoze i kronične jetrene bolesti (34,36).

Ultrazvuk je korišten i za procjenu debljine visceralne i supkutane abdominalne masti. Supkutana mast mjerena je na tri mjesta: između ksifoidnog nastavka i pupka, na desnoj srednjoj aksilarnoj liniji iznad bočnog grebena (lat. crista iliaca) i na lijevoj srednjoj aksilarnoj liniji iznad bočnog grebena. Visceralna mast procijenjena je mjerenjem perirenalnog masnog tkiva u tri točke mjerenja (66).

4.4. Mjerenje serumskih koncentracija slobodnog TGF-β1

Kod prijema u bolnicu bolesnicima je izvađen jedan dodatan uzorak krvi koji je korišten za mjerenje serumskih koncentracija slobodnog TGF-β1 upotrebom TGF beta 1 Human ProcartaPlex™ Simplex Kit prema uputama proizvođača. Svim ispitanicima, iz navedenog uzorka krvi, učinjena su dva mjerenja od kojih je uzeta srednja vrijednost za potrebe ovog rada.

4.5. Statistika

Rezultati su prikazani deskriptivno: distribucije vrijednosti kategorijskih varijabli prikazane su kao apsolutni i relativni brojevi, a vrijednosti kontinuiranih varijabli opisane aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom ovisno o normalnosti njihove distribucije. Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Bolesnici su stratificirani ovisno o prisutnosti NAFLD-a u dvije skupine, a razlike u distribuciji kontinuiranih varijabli analizirane su Mann-Whitney testom i Fisherovim egzaktnim testom za kategorijske varijable. Za

usporedbu više skupina korišten je ANOVA test, te za analizu razlika između skupina Dunn-Bonferroni post-hoc test. Spermanov korealcijski koeficjent izračunat je za procjenu odnosa između TGF-β1i drugih laboratorijskih varijabli. ROC analizom određene su granične vrijednosti serumskih koncentracija TGF-β1 za razlikovanje skupina, a njihove su prediktivne vrijednosti analizirane regresijskim modelima uz prilagodbu za odabrane sociodemografske, kliničke i laboratorijske parametre.

5. Rezultati

5.1. Osnovne karakteristike bolesnika s COVID-19

U istraživanje je uključeno 20 ispitanika koji čine zdravu kontrolu (10 muškaraca, median dobi 56, IQR 31-61 godina), a koji se nisu razlikovali ovisno o dobi i spolu od uključenih 60 COVID-19 bolesnika.

U skupini bolesnika s COVID-19, 30 bolesnika je imalo NAFLD (16 muškaraca, 53,33%; medijan dobi od 56 (IQR 36-65) godina). U skupini bez NAFLD-a bilo je 20 (66,67%) muškaraca, a medijan dobi iznosio je 64 (IQR 36-70) godina. Nije bilo statistički značajnih razlika u demografskim podatcima, komorbiditetima, korištenju kronične terapije, simptomima i vitalnim parametrima, kao što je prikazano u Tablici 1. Medijan dana bolesti pri prijemu sličan je između skupina (9, IQR 7-11 vs 9,5 IQR 7,3-11, p=0,717). Statistički značajna razlika nađena je u antropometrijskim mjerenjima; skupina s NAFLD-om ima značajno viši BMI (31 kg/m^2, IQR 26-34 vs 28 kg/m^2, IQR 24-31, p=0,015) i značajno veći omjer kukova i bokova (1, IQR 0,96-1,1 vs 0,98, IQR 0,83-1,1, p=0,030). Također, NAFLD skupina ima značajno veće ultrazvučno izmjerene markere za visceralnu-perirenalnu (12 mm, IQR 8-14 vs 6,5 mm, IQR 5-8 p<0,001) i supkutanu (24 mm, IQR 17-28 vs 18 mm, IQR 13-21 p=0,005) mast.

Tablica 1. Osnovne karakteristike hospitaliziranih pacijenata

	NAFLD	non-NAFLD	p-vrijednost
Broj ispitanika	30	30	
Demografski podatci			
Dob, medijan(IQR)	56(36-65)	64(36-70)	0,297
Muški spol, broj(%)	16(53,33%)	20(66,67%)	0,429
Antropometrijska i ultrazvučna mjerenja			
BMI, kg/m^2	31(26-34)	28(24-31)	**0,015**
Omjer kukova i bokova	1(0,96-1,1)	0,98(0,83-1,1)	**0,030**
Visceralna mast, mm	12(8-14)	6,5(5-8)	**<0,001**
Subkutana mast, mm	24(17-28)	18(13-21)	**0,005**
Komorbiditeti			
Dijabetes mellitus tip 2 (T2DM), broj(%)	6(20,00%)	6(20,00%)	1,000
Hipertenzija	16(53,33%)	17(56,67%)	1,000
Pretilost (BMI>30kg/m^2)	16(53,33%)	10(33,33%)	0,192
Gastritis/GERB	3(10,00%)	1(3,33%)	0,612
Kardiovaskularne bolesti	3(10,00%)	2(6,67%)	1,000
Kronična medikamentozna terapija			
Inhibitor protonske pumpe (IPP), broj(%)	4(13,33%)	1(3,33%)	0,353
Beta blokator	9(30,00%)	8(26,67%)	1,000
Askorbinska kiselina	2(6,67%)	2(6,67%)	1,000
ACE inhibitor	21(70,00%)	15(50,00%)	0,187
Antihipertenzivi	7(23,33%)	8(26,67%)	1,000
Statini	5(16,67%)	5(16,67%)	1,000
Metformin	3(10,00%)	4(13,33%)	1,000
Peroralni antidijabetici	1(3,33%)	3(10,00%)	0,612
Simptomi			
Febrilitet, broj(%)	29(96,67%)	29(96,67%)	1,000
Opći algički sindrom	12(40,00%)	15(50,00%)	0,604
Gastrointestinalni simptomi	13(43,33%)	9(30,00%)	0,422
Gubitak njuha/mirisa	3(10,00%)	7(23,33%)	0,299
Neurološki simptomi	4(13,33%)	5(16,67%)	1,000
Kašalj	29(96,67%)	27(90,00%)	0,612
Dispneja	16(53,33%)	14(46,67%)	0,797
Vitalni parametri kod primitka			

Tjelesna temperatura, ºC	38(37-39)	38(37-38)	0,076
Respiratorna frekvencija, /min	24(22-31)	24(18-28)	0,141
Srčana frekvencija, /min	93(83-103)	95(81-100)	0,828
Saturacija kisikom (spO2) na sobnom zraku, %	93(88-96)	93(90-95)	0,828

Podatci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR) ili apsolutne vrijednosti s postotkom. GERB-gastroezofagealna refluksna bolest

U Tablici 2. prikazani su odabrani laboratorijski parametri hospitaliziranih bolesnika kod prijema. Kao što je vidljivo iz tablice, bolesnici s NAFLD-om imaju značajno više vrijednosti broja leukocita (7,4x10^9/L, IQR 5,6-10 vs 5,7x10^9/L, IQR 4,8-7,1, p=0,028), broja trombocita (219x10^9/L, IQR 160-270 vs 176x10^9/L, IQR 121-236, p=0,011), gama-glutamiltransferaze (61 IU/L, IQR 42-131 vs 38 IU/L, IQR24-62, p=0,018), C-reaktivnog proteina (140 mg/L, IQR71-221 vs 90 mg/L, IQR 39-139, p=0,032) i interleukina-6 (81 pg/L, IQR 15-150 vs 41 pg/L, IQR 14-62, p=0,035). Nisu nađene značajne razlike u ostalim laboratorijskim parametrima između navedenih dviju skupina.

Tablica 2. Laboratorijski parametari hospitaliziranih pacijenata

	NAFLD	**non-NAFLD**	**p-vrijednost**
Laboratorijske vrijednosti pri prijemu			
Broj leukocita , x10^9/L	7,4(5,6-10)	5,7(4,8-7,1)	**0,028**
Broj limfocita, x10^9/L	0,73(0,51-1,1)	0,63(0,44-0,81)	0,248
Broj neutrofila x10^9/L	5,9(4,1-8,8)	4,6(4,1-5,9)	0,097
Omjer neutrofila i limfocita (NLR)	8(4-14)	7(5,3-10)	0,889
Hemoglobin, g/L	138(129-146)	134(124-148)	0,447
Broj trombocita, x10^9/L	219(160-270)	176(121-236)	**0,011**
Omjer trombocita i limfocita (PLR)	16(13-37)	15(10-22)	0,197
Natrij, mmol/L	138(133-141)	137(135-139)	0,629
Ureja, mmol/L	5,7(4,4-7,2)	5,7(4,3-9,5)	0,689
Kreatinin, µmol/L	72(63-94)	79(63-99)	0,511
Aspartat-aminotransferaza (AST), IU/L	47(35-79)	46(35-85)	0,738
Alanin-aminotransferaza (ALT), IU/L	39(27-86)	38(21-58)	0,154
Gama-glutamiltransferaza (GGT), IU/L	61(42-131)	38/24-62)	**0,018**
Alkalna fosfataza (ALP), IU/L	59(52-86)	55(44-76)	0,293
Laktat-dehidrogenaza (LDH), IU/L	401(275-560)	415(283-510)	0,933
Bilirubin, µmol/L	12(8,8-14)	11(9-14)	0,997

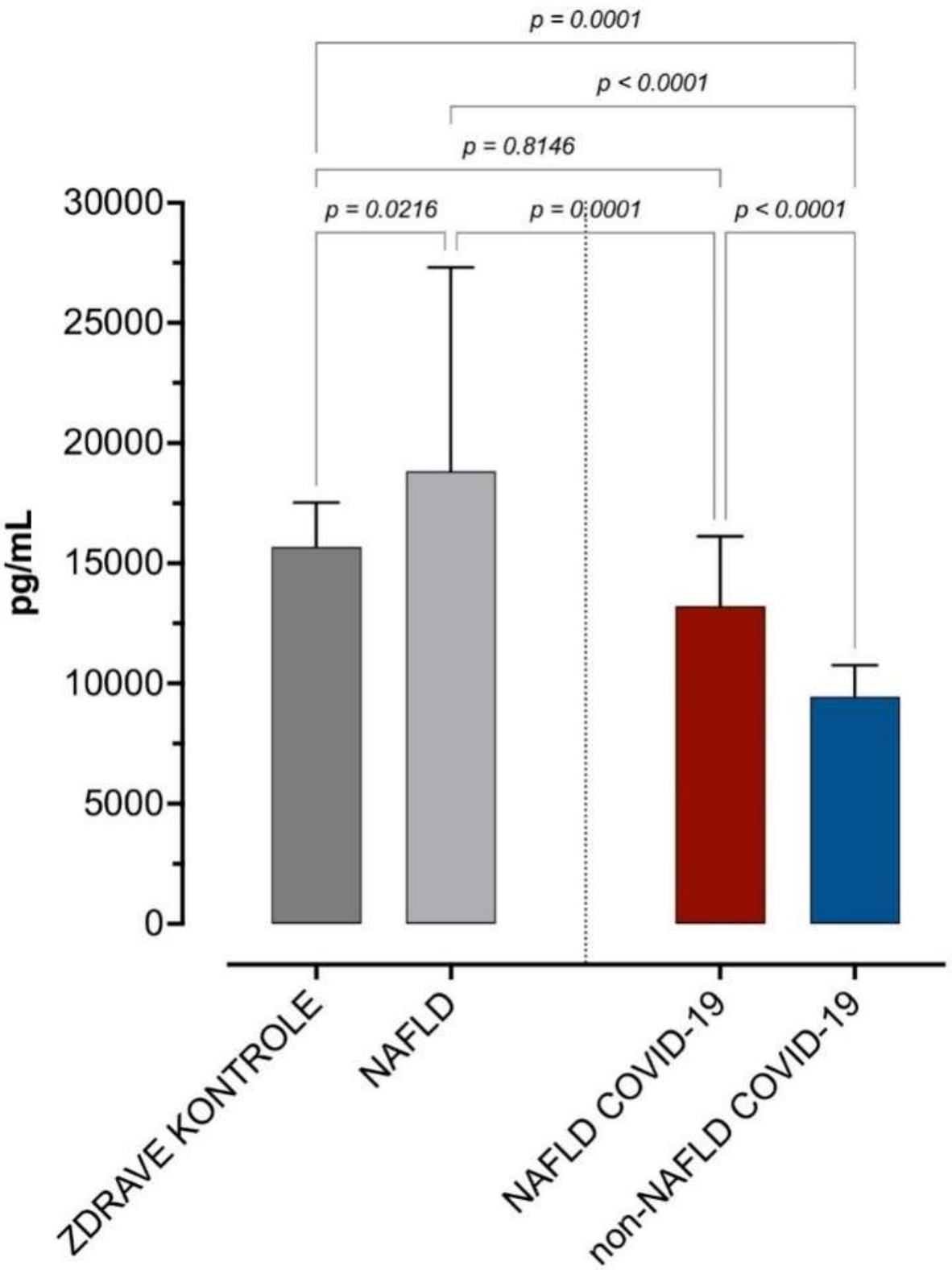
Protrombinsko vrijeme (PV)	1,2(1,1-1,3)	1,2(1-1,3)	0,892
Fibrinogen, g/L	6(5,4-6,9)	5,7(5,1-6,6)	0,425
D-dimeri, mg/L	1,1(0,54-2)	0,93(0,58-1,2)	0,425
CRP, mg/L	140(71-221)	90(39-139)	**0,032**
Prokalcitonin, µg/L	0,18(0,077-0,41)	0,14(0,069-0,32)	0,539
IL-6, pg/L	87(15-150)	41(14-62)	**0,035**
Feritin, µg/L	1111(706-1797)	711(505-1564)	0,207

Podatci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR) ili apsolutne vrijednosti s postotkom.

5.2. Serumske koncentracije TGF-β1 u bolesnika s COVID-19 i NAFLD-om

Izmjerene serumske koncentracije slobodnog TGF-β1 u zdravih ispitanika i bolesnika s COVID-19 prikazane su na Slici 3.

Utvrdili smo da među zdravim kontrolama, osobe bez NAFLD-a imaju značajno niže koncentracije TGF-β1 u odnosu na osobe s NAFLD-om (median 15684 pg/mL, IQR 14020-17528 vs 18826 pg/mL, IQR 15741-27311, razlika u medianima -5577pg/mL 95%CI -10545 do -608,9, p=0,0216). Slično je izmjereno i u COVID-19 bolesnika, osobe s NAFLD-om imale su značajno više koncentracije TGF-β1 u odnosu na osobe bez NAFLD-a (13221pg/mL, IQR 12148-16128 vs 9447pg/mL, IQR 6518-10758, razlika 5599, 95%CI 2731 do 8468 pg/mL, p<0,0001). Oboljeli od COVID-19 imali su niže vrijednosti TGF- β1 u odnosu na zdrave ispitanike, a te vrijednosti bile su niže u osoba bez NAFLD-a.



Slika 3. Usporedba serumskih koncentracija TGF-β1 ovisno o prisutnosti NAFLD-a i COVID-19.

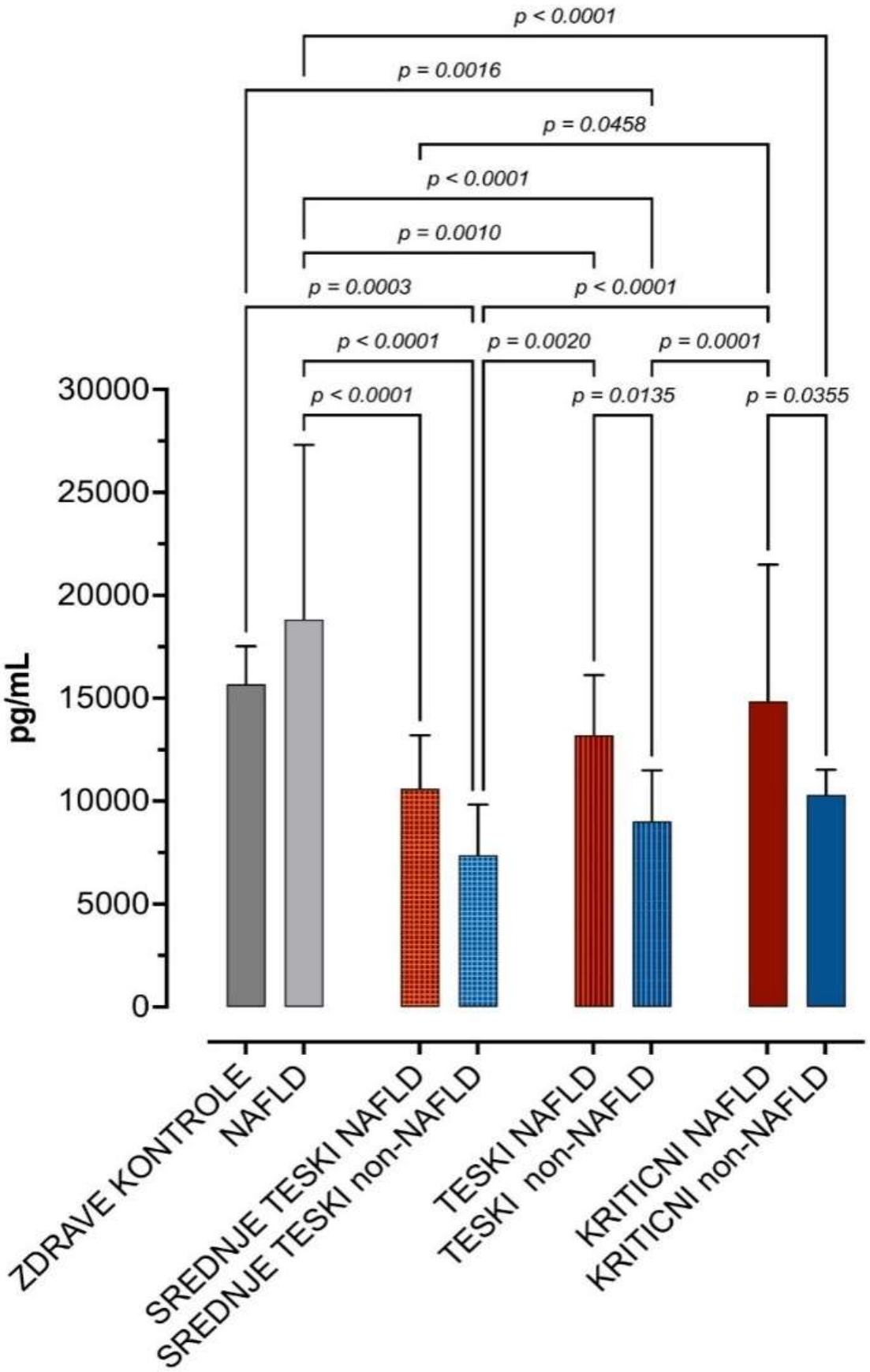
5.3. Korelacija serumskih koncentracija TGF-β1 s težinom COVID-19 u bolesnika s i bez NAFLD-a

Nadalje, analizirali smo i usporedili serumske koncentracije TGF-β1 ovisno o težini COVID-19. Bolesnici su razvrstani u podskupine po težini COVID-19 prema prethodno navedenoj klasifikaciji SZO-a; u skupini NAFLD-a 9 ih je imalo kritični oblik, 14 teški oblik i 7 srednje teški oblik COVID-19. Skupina bolesnika bez NAFLD-a imala je 7 bolesnika s kritičnim oblikom, 14 s teškim oblikom i 9 sa srednje teškim oblikom COVID-19. Vrijednosti serumskih koncentracija TGF-β1 ovisno o težini kliničke slike COVID-19 prikazane su u Tablici 3. Iz tablice je vidljivo da serumska koncentracija TGF-β1 korelira s težinom bolesti, a najviša je u kritično oboljelih. Pacijenti s teškim i kritičnim COVID-19 i NAFLD-om imali su više serumske koncentracije TGF-β1 nego pacijenti bez NAFLD-a.

Tablica 3. Serumske razine TGF-β1 ovisno o težini COVID-19

	TGF- β1, pg/mL medijan(IQR)
NAFLD kritični COVID-19	14848 (13352-21491)
NAFLD teški COVID-19	13203 (12287-16128)
NAFLD srednje teški COVID-19	10601 (10112-13199)
non-NAFLD kritični COVID-19	10302 (9558-11523)
non-NAFLD teški COVID-19	9016 (5931-11498)
non-NAFLD srednje teški COVID-19	7371 (4483-9830)

Usporedba razlika serumskih koncentracija slobodnog TGF-β1 između skupina ovisno o težini COVID-19 prikazana je na Slici 4. U skupini pacijenata s NAFLD-om oni sa kritičnim COVID-19 imali su značajno više razine TGF- β1 u odnosu na one sa srednje teškim COVID-19 (14848 pg/mL, IQR 13352-21491 vs 10601 pg/mL, IQR 10112-13199, MD 6166, p=0,0458). Unutar skupine bez NAFLD-a nije postojala statistički značajna razlika u razini TGF-β1 ovisno o težini COVID-19, ali teži oblici bolesti bili su praćeni većim koncentracijama TGF-β1.

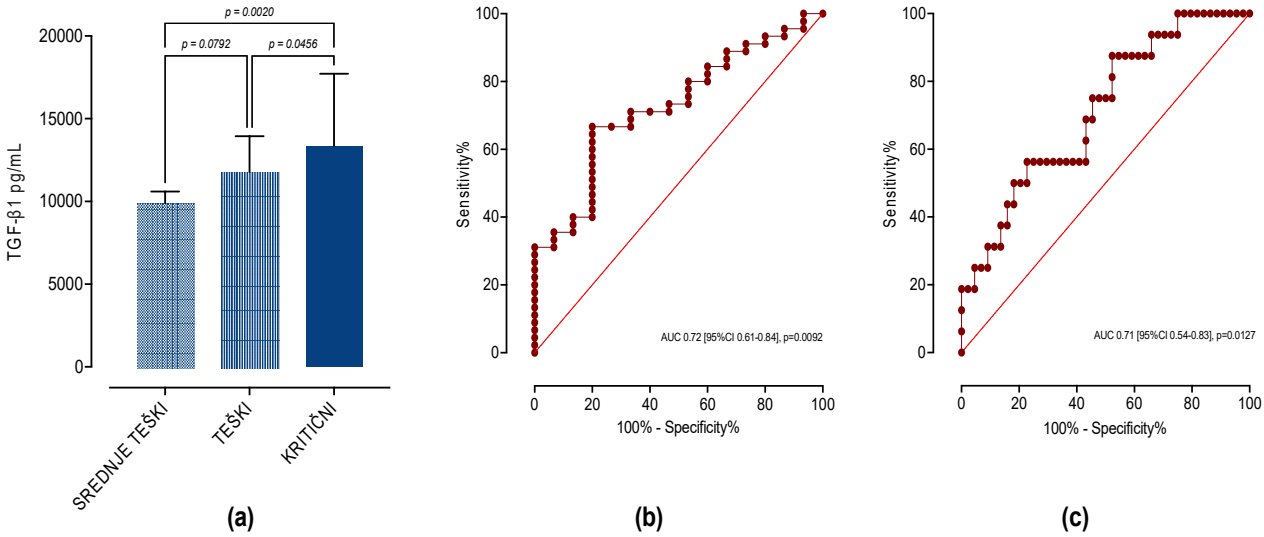


Slika 4. Usporedba serumskih koncentracija TGF-β1 među skupinama ovisno o težini COVID-19 kliničke slike.

5.4. ROC analiza povezanosti serumskih koncentracija TGF-β1 s težinom COVID-19

Kao što je prethodno pokazano, serumske koncentracije TGF-β1 korelirale su s težinom bolesti. Koristeći ROC (eng. receiver operating characteristic) analizu određena je površina ispod krivulje (AUC) i granične vrijednosti serumskih koncentracija TGF-β1 za razlikovanje podskupina pacijenata ovisno o težini COVID-19, kako je prikazano na Slici 5.

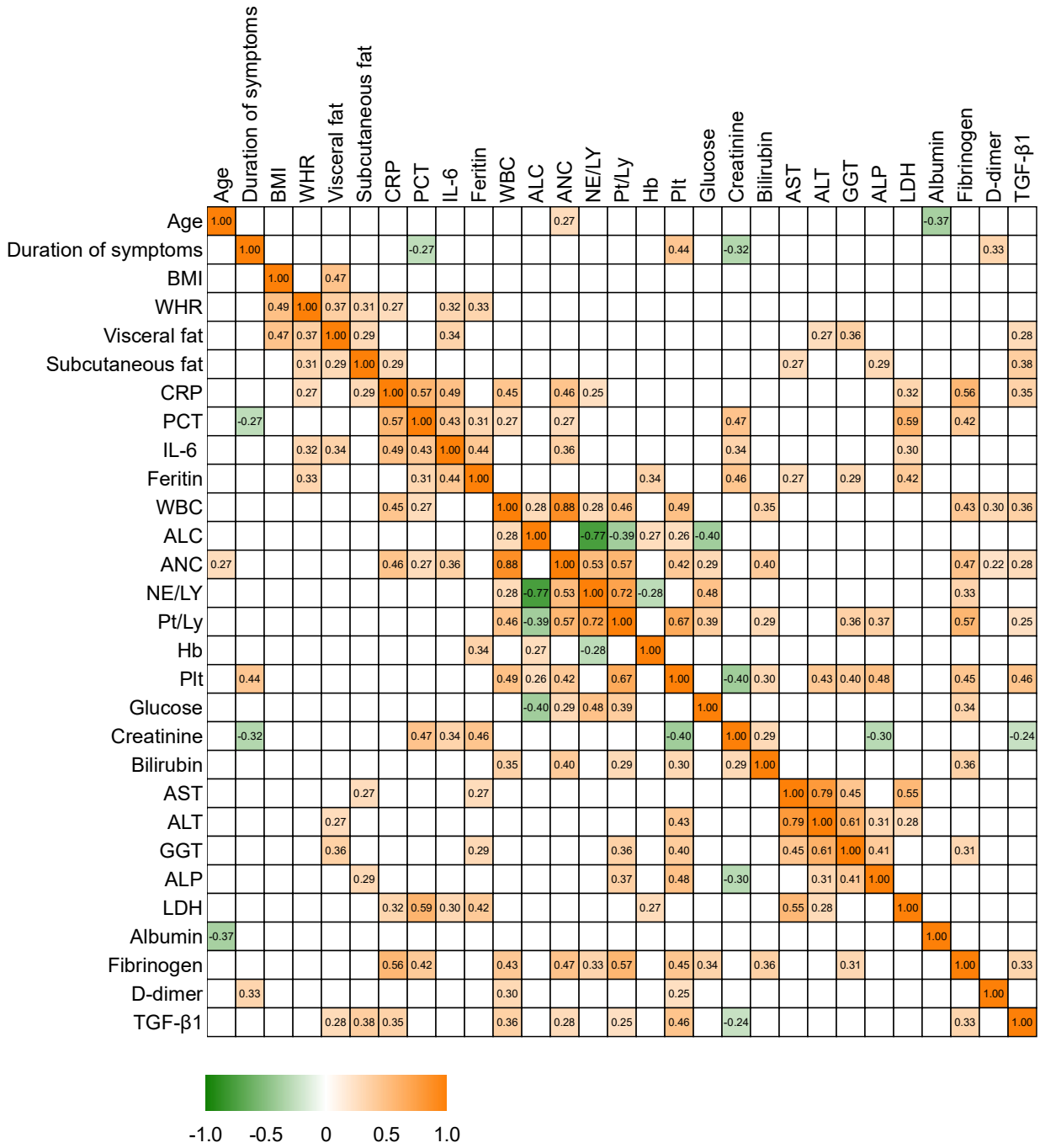
Serumske koncentracije TGF-β1 veće od 10,400 pg/mL imale su osjetljivost 66,67% (95CI 54,46% do 76,99%) i specifičnost 66,67% (95%CI 45,52% do 82,72%) u razlikovanju srednje teškog od kritičnog i teškog oblika bolesti (panel B) s AUC od 0,72 (95%CI 0,61 do 0,84, p=0,0092). Slično, razine TGF-B1 iznad 11,400 pg/mL pokazale su osjetljivost 68,75% (95%CI 48.20% to 83.87%) i specifičnost 61,36% (95%CI 48.97% to 72.44%) u razlikovanju kritičnog od blažih oblika bolesti (panel C) s AUC od 0.7116 (95%CI 0,54-0,83, p=0.0127).



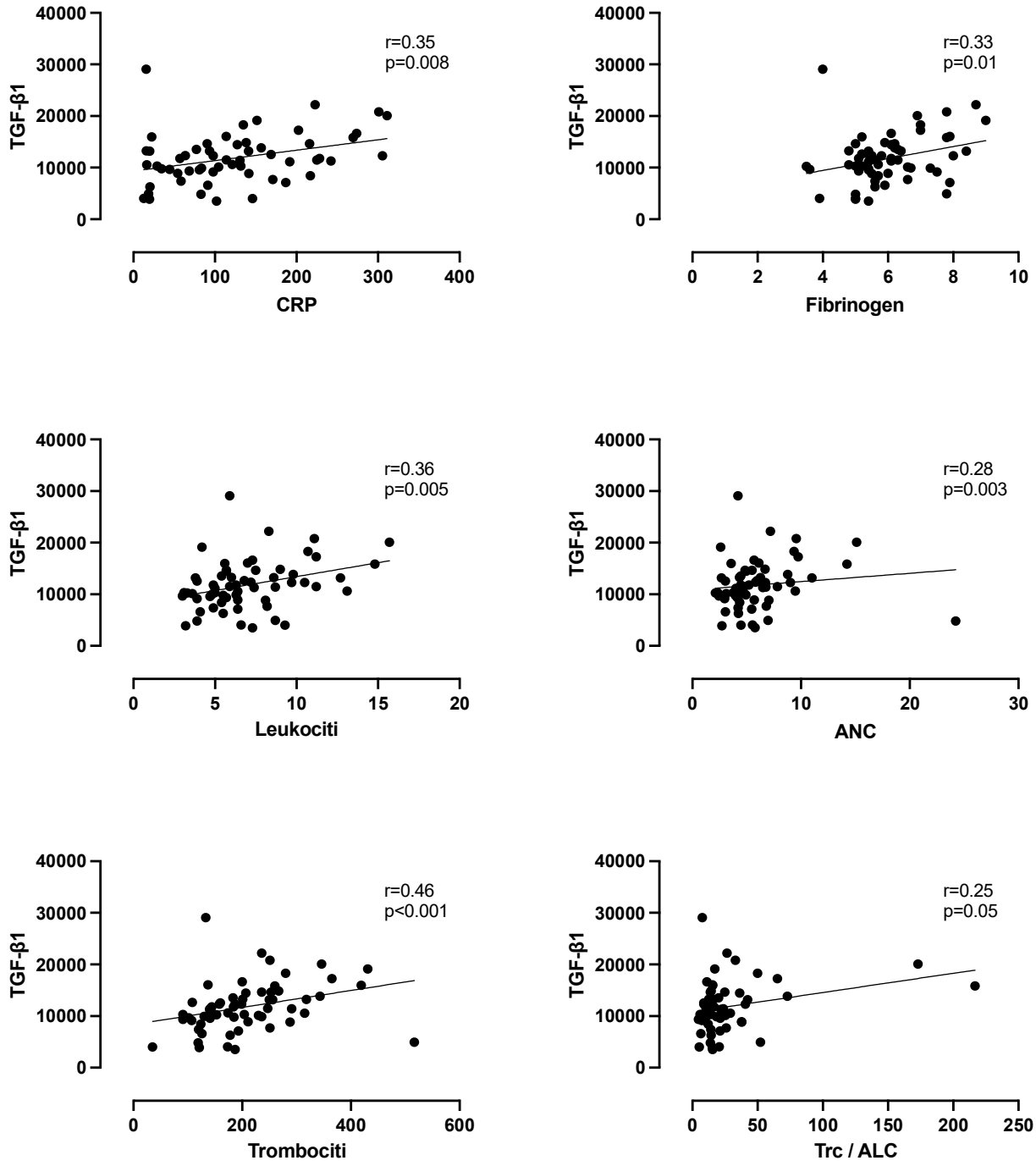
Slika 5. (A) Serumske koncentracije TGF-β1 ovisno o težini COVID-19. **(B i C)** ROC analiza serumskih koncentracija TGF-β1 za razlikovanje srednje teškog od kritičnog i teškog **(B)** te kritičnog od blažih oblika bolesti (**C**). Prikazane su AUC s 95%CI.

5.5. Korelacija serumskih koncentracija TGF-β1 s kliničkim i laboratorijskim parametrima u bolesnika s COVID-19

Nadalje, analizirali smo korelacije serumskih koncentracija TGF-β1 s ostalim laboratorijskim i kliničkim parametrima u bolesnika s COVID-19 kao što je prikazano na Slici 6. upotrebom Spearmanovog korelacijskog grafa. TGF-β1 je pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa sljedećim upalnim parametrima: CRP (r=0,35, p=0,008), brojem leukocita (r=0,36, p=0,005), apsolutnim brojem neutrofila (r=0,28, p=0,003), brojem trombocita (r=0,46, p<0,0001), omjerom trombocita i limfocita (r=0,25, p=0,05) i fibrinogenom (r=0,33, p=0,01). Značajna negativna korelacija utvrđena je s kreatininom (r=-0,24, p=0,034). Serumske koncentracije TGF-β1 korelirale su i s ultrazvučno izmjerenom visceralnom (r=0,28, p=0,032) i supkutanom masti (r=0.38, p=0,003), ali ne i s BMI i WHR. Nije utvrđena značajna korelacija između TGF-β1 i ostalih laboratorijskih parametara.

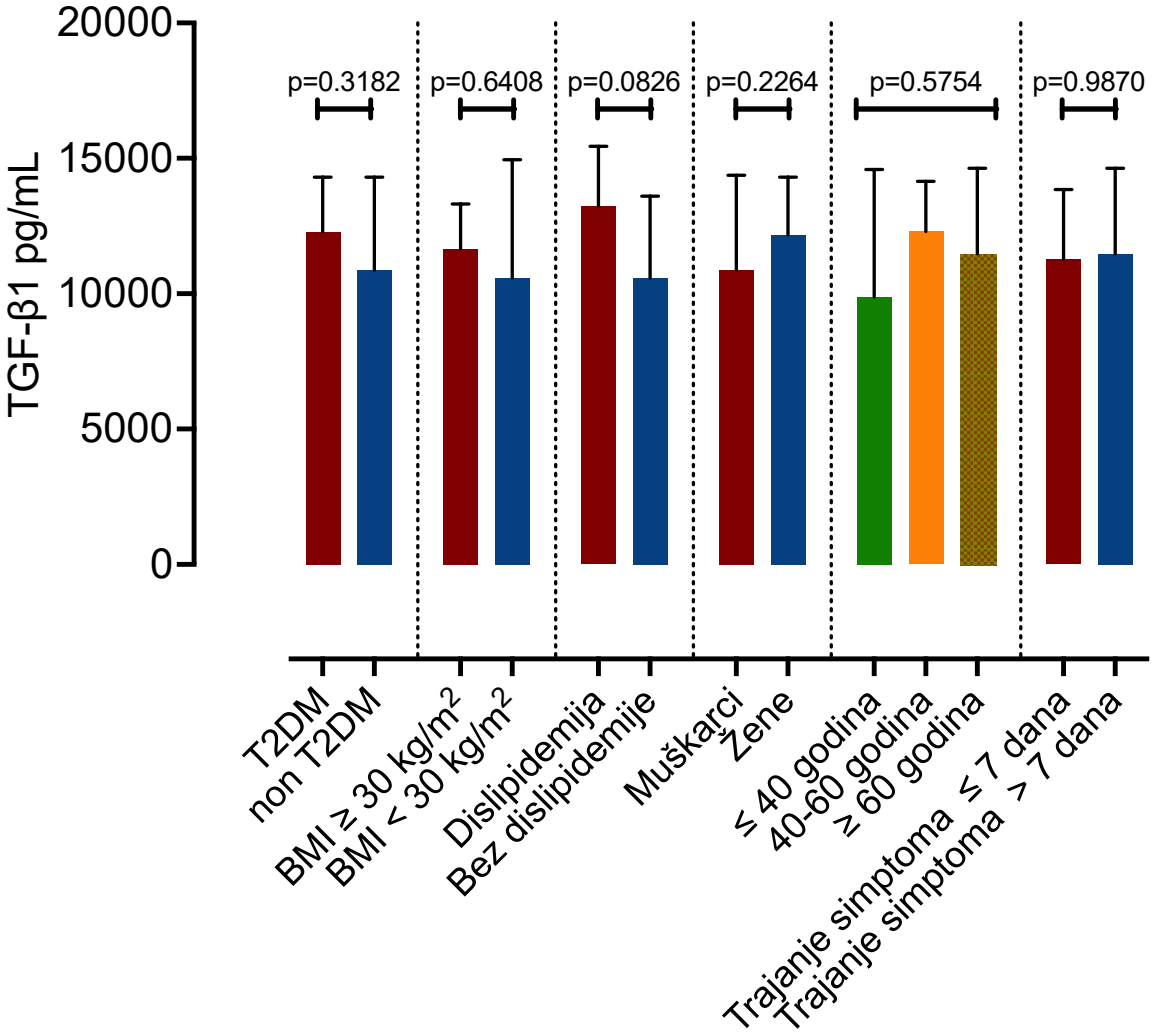


Slika 6. Spearmanov korelacijski graf. Snaga korelacije između dviju varijabli prikazana je bojom na sjecištu varijabli. Spektar boja ide od tamno zelene (snažna negativna korelacija; r=-1,0) do tamno narančaste (snažna pozitivna korelacija; r=1,0). Rezultati su prikazani samo ako je p<0,005.



Slika 7. Korelacijska analiza povezanosti serumskih koncentracija TGF-β1 s laboratorijskim parametrima (CRP, fibrinogen, Leukociti, ANC, Trombociti i omjer Trc/ALC. Prikazani su korelacijski koeficijenti (r) i statistička razina značajnosti (p).

Nadalje, kao što je vidljivo na Slici 8. nije bilo značajnih razlika u serumskim koncentracijama TGF-β1 među pacijentima ovisno o prisustvu dijabetesa mellitusa tipa 2 (T2DM), pretilosti, dislipidemije, duljini trajanja simptoma prije hospitalizacije, spoli i dobnim skupinama.



Slika 8. Serumske koncentracije TGF-β1 u COVID-19 pacijenata ovisno o prisustvu T2DM, pretilosti, dislipidemije, spolu, dobnoj skupini i duljini trajanja simptoma.

5.6. Povezanost serumskih koncentracija TGF- β1 s kliničkim tijekom i komplikacijama COVID-19

U Tablici 4. prikazani su promatrani pokazatelji ishoda u hospitaliziranih COVID-19 pacijenata. Iz tablice je vidljivo da nije bilo značajne razlike u trajanju hospitalizacije, kao ni u razini potrebne respiratorne potpore između NAFLD i non-NAFLD skupina. Također, razlika nije postojala ni u učestalosti razvitka plućne tromboze, primitka u jedinicu intenzivnog liječenja (JIL) i mortalitetu.

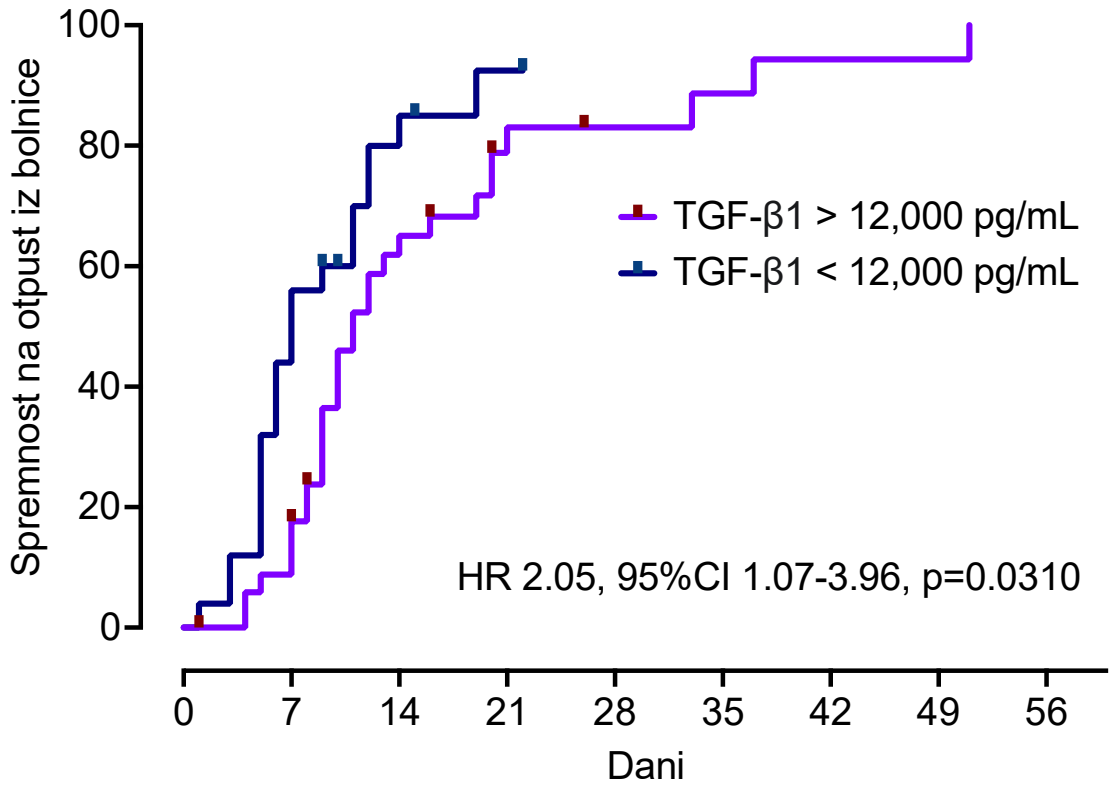
Tablica 4. Prikaz pokazatelja ishoda hospitaliziranih pacijenata

	NAFLD	**non-NAFLD**	**p-vrijednost**
Pokazatelji ishoda			
Trajanje hospitalizacije	9,5 (7.0-17)	9.0 (5.8-13)	0,5147
Visokoprotočna nazalna kanila (HFNC)	11(36,67%)	8(26,67%)	0,579
Neinvazivna ventilacija (NIV)	5(16,67%)	2(6,67%)	0,424
Mehanička ventilacija (MV)	4(13,33%)	5(16,67%)	1,000
Pućna tromboza (PT)	7(23,33%)	5(16,67%)	0,748
Primitak u jedinicu intenzivne skrbi (ICU)	8(26,67%)	7(23,33%)	1,000
Smrtni ishod	7(23,33)	3(10,00%)	0,299

Podatci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR) ili apsolutne vrijednosti s postotkom.

5.7.1. Spremnost za otpust iz bolnice

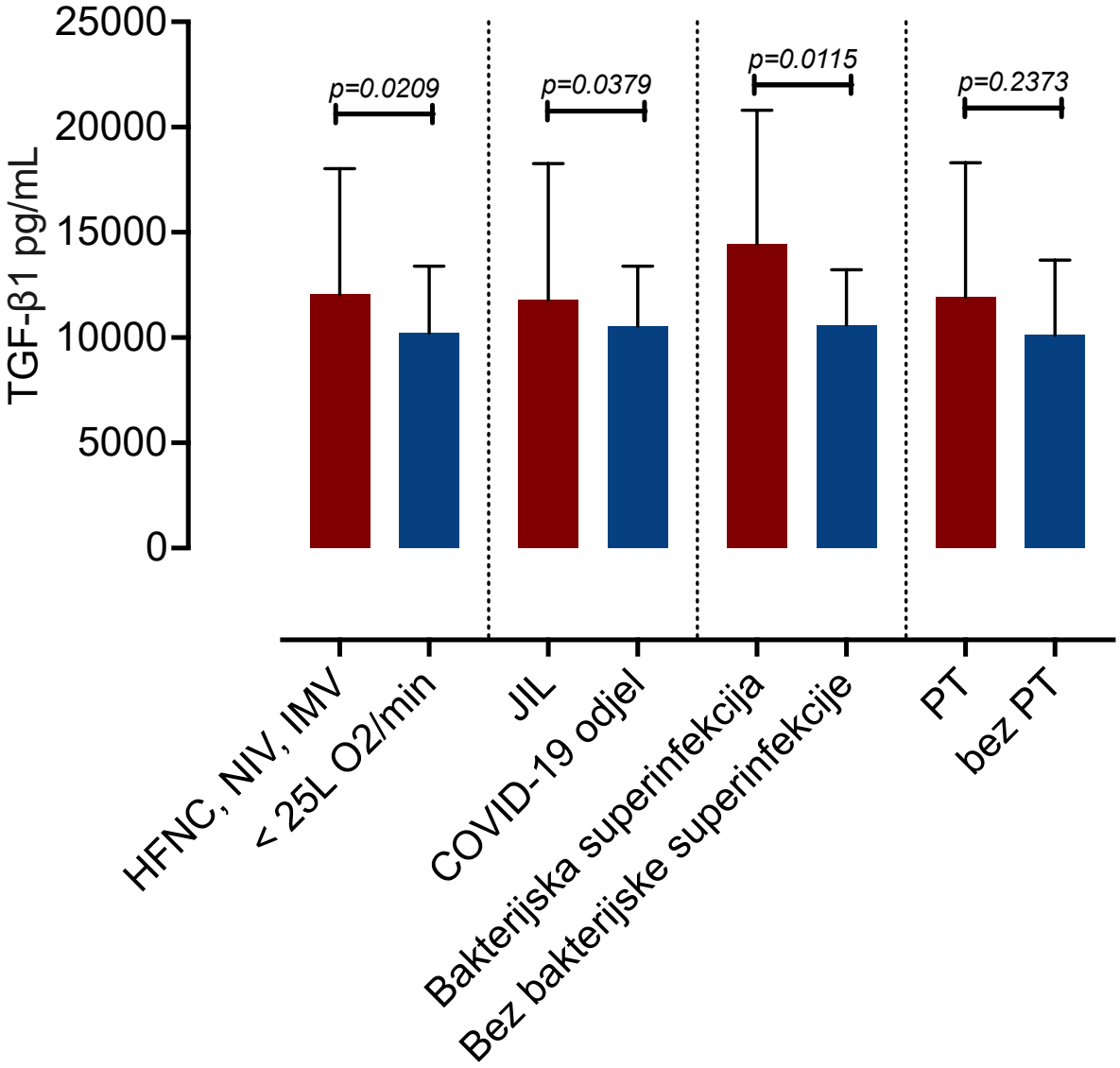
Nadalje, koristili smo Kaplan-Meierovu analizu za izradu krivulje preživljenja i krivulje spremnosti otpusta iz bolnice što prikazuju Slika 9. Analizom smo utvrdili da pacijenti s TGF-β1 većim od 12000 pg/mL imaju značajno dulje vrijeme do spremnosti otpusta iz bolnice (HR 2,05, 95%CI 1,07-3,96, log-rank test, p=0,03).



Slika 9. Povezanost spremnosti otpusta iz bolnice sa serumskim koncentracijama TGF-β1 koristeći Kaplan-Meierovu analizu u pacijenata s COVID-19. Omjer ugroženosti (eng. Hazard ratio, HR) s 95% CI i p-vrijednostima izračunat je koristeći log-rank test.

5.7.2. Klinički tijek i komplikacije

Nadalje, analizirali smo povezanost izmjerenog TGF-β1 pri prijemu s kliničkim tijekom i razvitkom komplikacija COVID-19 tijekom hospitalizacije, kako je prikazano na Slici 10.



Slika 10. Serumske koncentracije TGF-β1 u COVID-19 pacijenata ovisno o razini respiratorne potpore, primitku u JIL, razvoju nozokomijalnih infekcija i plućne tromboze (PT).

U našoj kohorti 19 bolesnika zahtijevalo je napredne mjere oksigenoterapije (što uključuje HFNC, NIV i IMV). Bolesnici koji su zahtijevali naprednije mjere oksigenoterapije kod prijema su imali više koncentracije TGF-β1 nego oni stabilni bez ili na niskim protocima kisika (12033 pg/mL, IQR 10507-18014 vs 10216 pg/mL, IQR 7521-13384, p=0,0209, razlika u medijanima 2681, 95%CI 580 do 5591).

15 bolesnika liječeno je u JIL. Bolesnici koji su zahtijevali prijem u JIL imali su značajno više serumske koncentracije TGF-β1 (11774 pg/mL, IQR 11123-18270 vs 10543 pg/mL, IQR 8253-13384, p=0,0379, razlika u medijanima 2656, 95%CI 368 do 6255).

Od 60 hospitaliziranih pacijenata 12 ih je razvilo plućnu trombozu (PT); 7 u skupini s NAFLD-om i 5 u skupini bez NAFLD-a. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama TGF-β1 između bolesnika koji su razvili i onih koji nisu razvili PT (11907 pg/mL, IQR 9202-18306 vs 10112 pg/mL, IQR 7226-13684, p=0,2373).

Nadalje, analizirali smo povezanost serumskih koncentracija TGF-β1 s razvojem bakterijskih superinfekcija. Ukupno je 11 bolesnika razvilo bakterijsku komplikaciju tijekom hospitalizacije (9 bolesnika s NAFLD i 2 non-NAFLD) te su statistički imali značajno više serumske koncentracije TGF-β1 (14459 pg/mL, IQR 11123-20794 vs 10601 pg/mL, 8626-13221, p=0,0115, razlika u medijanima 4827, 95%CI 1125 do 8575).

5.7. Povezanost serumskih koncentracija TGF-β1 s mortalitetom

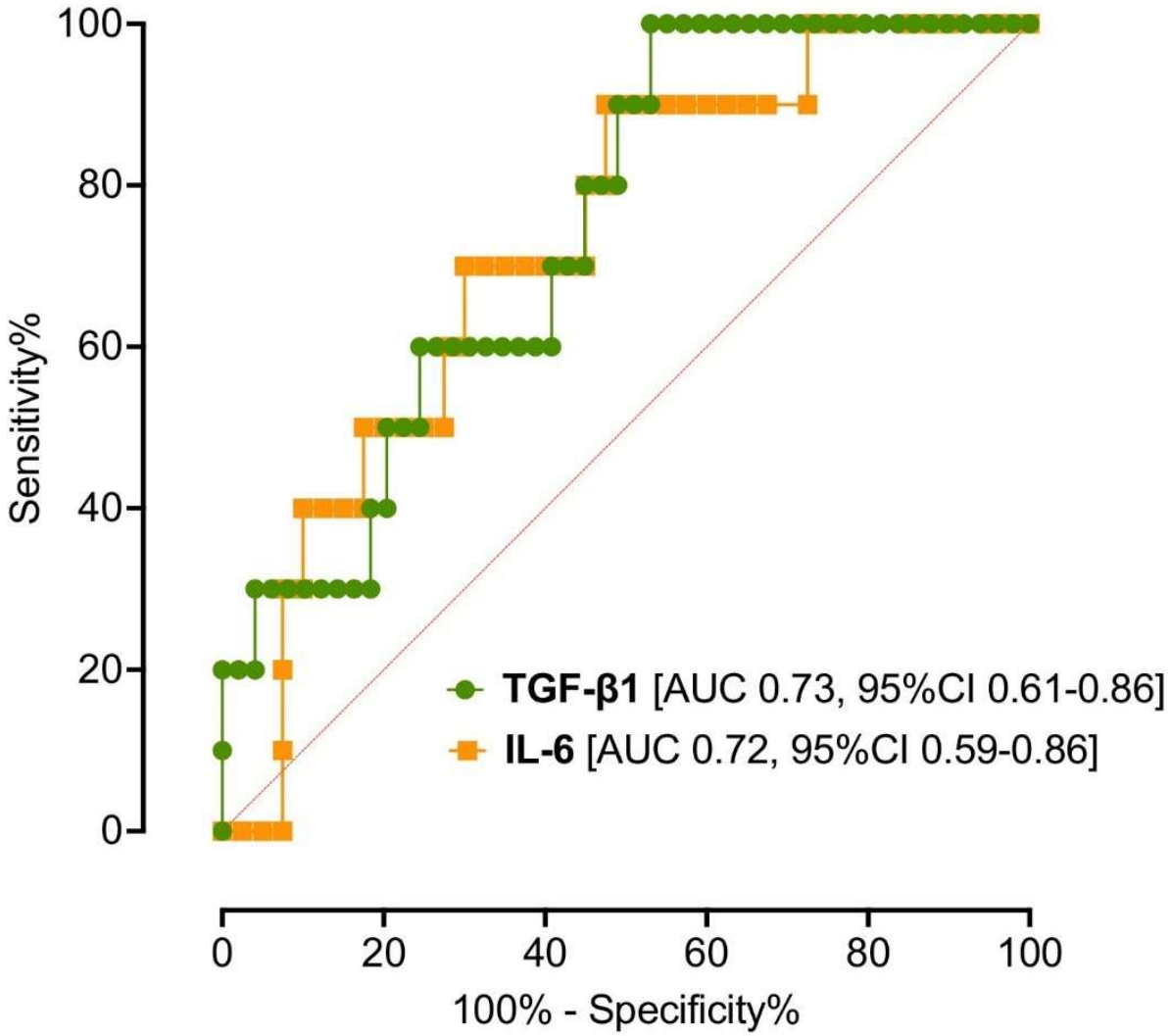
Nakraju smo analizirali utjecaj izmjerene serumske koncentracije slobodnog TGF-β1 pri prijemu na COVID-19 mortalitet. U našoj kohorti umrlo je ukupno 10 bolesnika od kojih je 7 imalo NAFLD. U Tablici 5. prikazana je usporedba serumskih koncentracija TGF-β1 i ostalih učestalo primjenjivanih prognostičkih laboratorijskih parametara između umrlih i preživjelih COVID-19 bolesnika. Serumske koncentracije TGF-β1 bile su značajno više u pacijenata koji su umrli za razliku od onih koji su preživjeli (13352 pg/mL, IQR 11090-1925 vs 10572 pg/mL, IQR 8731-20794, p=0,0192). Nije bilo razlike u usporedbi serumskih koncentracija ostalih često primjenjivanih biomarkera poput feritina, CRP-a i LDH, osim u IL-6 koji je bio značajno viši u umrlih (95 pg/mL, IQR 49-164 vs 41 pg/mL, IQR 6,9-90, p=0,0262).

Tablica 5. Usporedba serumskih koncentracija biomarkera između umrlih i preživjelih bolesnika s COVID-19

	Umrli	**Preživjeli**	**p vrijednost**
TGF-β1	13352(11090-19250)	10572(8731-20794)	**0,0192**
IL-6	95(49-164)	41(6,9-90)	**0,0262**
Feritin	948(679-1797)	743(553-1591)	0,6015
CRP	129(80-162)	103(56-188)	0,7324
LDH	436(330-614)	399(273-512)	0,3604

Podatci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR).

Nadalje, pomoću ROC analize utvrdili smo osjetljivost i specifičnost TGF-β1 za predikciju letalnog ishoda što je prikazano na Slici 11. u obliku ROC krivulje. AUC iznosi 0,73 (95%CI 0,61-0,86), a analizom je utvrđeno da TGF-β1 veći od 12000 pg/mL ima 60% osjetljivost (95%CI 35,16% do 68,58%) i 63% specifičnost (95%CI 51,52% do 73,62%) u predikciji mortaliteta. Sličnu osjetljivost i specifičnost za COVID-19 mortalitet imale su serumske koncentracije IL-6 iznad 60pg/mL; 70% osjetljivost (95%CI 44,17% do 87,13%) i 60% specifičnost (95%CI 47,02% do 71,71%) s AUC od 0,72 95%CI 0,59 do 0,86, p=0,0273).



Slika 11. ROC analize TGF-β1 i IL-6, s pripadajućim AUC, za predikciju COVID-19 mortaliteta

6. Rasprava

U našem istraživanju, po prvi puta prikazujemo rezultate koji ukazuju na to da pacijenti s NAFLD-om i COVID-19 imaju značajno više koncentracije slobodnog serumskog TGF-β1 nego oni bez NAFLD-a. Osim toga, porast razine TGF-β1 u NAFLD pacijenata značajno korelira s težinom COVID-19. Za razliku od toga, u skupini COVID-19 pacijenata koji nemaju NAFLD nije bilo statistički značajne razlike u razini TGF-β1 ovisno o težini COVID-19, iako su teži oblici bolesti bili praćeni višim koncentracijama TGF-β1. Ovi rezultati su bili neovisni o prisutnosti drugih komponenata MetS, poput T2DM, pretilosti ili hiperlipidemije. Također, serumske razine TGF-β1 pokazale su se kao dobar prognostički biomarker povezan sa spremnosti otpusta iz bolnice, potrebom za naprednim mjerama respiratorne potpore, primitkom u JIL, razvojem nozokomijalnih infekcija i smrtnosti.

Citokinska oluja ključno je zbivanje u najtežim oblicima COVID-19 (19). Većina istraživanja pronalazi IL-6, IL-8, IL-10 i CXCL10 kao jedne od ključnih citokina u tom nekontroliranom upalnom odgovoru (14,43,45). Isti profil citokina povišen je i u COVID-19 pacijenata s NAFLD-om (44), a TGF-β1 rijetko je promatrani citokin. Po našem saznanju, ne postoji istraživanje koje promatra razine TGF-β1 u ovoj populaciji pacijenata.

TGF-β1 kao pleiotropni citokin sudjeluje u raznim procesima u tijelu poput stanične proliferacije, cijeljenja, fibroze, tumorogeneze i imunološkim reakcijama (48). Primarno djeluje protuupalno; direktno inhibirajući T limfocite, B limfocite, NK stanice i dendritičke stanice te indirektno tako što potiče diferencijaciju Treg limfeocita koji dodatnu inhibiraju prethodno navedene stanice (49). Unatoč tome, TGF-β1 djeluje i kao upalni citokin potičući diferencijaciju Th17 stanica (48). Dvojna, kontrolirana uloga TGF-β1 ključna je za imunološku homeostazu i sprječavanje ozljede tkiva; TGF-β1 potiče cijeljenje utišavanjem imunološkog odgovora, ali istovremeno ključni je pokretač fibroze s apoptotskim učinkom na endotelne stanice (48,49).

Brojni mikroorganizmi poput virusa hepatitisa C, Trypanosome cruzi i Plasmodiuma, pošto ne mogu sintetizirati vlastiti, koriste domaćinov TGF-β kako bi umanjili imunološki odgovor (proces poznat kao „otmica TGF-β“ ili prema engl. *„TGF-β hijacking“)* (64). Osim toga, uloga TGF-β1 u infekcijama izrazito je ovisna o tkivu i uzročniku, što je pokazano u nekoliko istraživanja koja promatraju njegovo djelovanje u virusnim respiratornim infekcijama. U istraživanju Rendon-Ramireza i suradnika pacijenti s influencom tip A (H1N1) imali su

značajno niže koncentracije serumskog TGF-β1 usporedno sa zdravim kontrolama (67). Suprotno, u *in vivo* eksperimentu Denney L. i suradnika, pokazano je da influenca tip A uzrokuje nagli porast epitelnog plućnog TGF-β1, koji inhibicijom interferonskog puta suprimira rani antivirusni odgovor (68). U drugom *in vivo* eksperimentu pokazano je da influenca tip A, putem neuraminidaze, koristi domaćinov TGF-β1 za povećanje ekspresije staničnih adhezina ključnih za bakterijsku koinfekciju, koja je važan uzrok smrtnosti i komplikacija tijekom gripe (69). Usporedno, u ranoj fazi SARS-CoV infekcije nađene su povišene razine serumskog i u plućima tkivnog TGF-β1, koje su bile povezane s povećanom virusnom replikacijom i razvojem plućne fibroze (70,71). Pretpostavlja se da i SARS-CoV-2, upravo putem eksploatacije domaćinovog TGF-β signalnog puta, povećava svoju infektivnost.

Iznenađujuće, uloga TGF-β1 u COVID-19 nije još posve jasna, a istraživanja produciraju različite rezultate. U istraživanju parova od Ghazavia i suradnika zabilježene su više serumske koncentracije TGF-β1 u COVID-19 oboljelih (55). Slično je nađeno i u turskoj kohorti; 50 COVID-19 pacijenata imali su značajno više razine TGF-β1 u odnosu na 45 zdravih kontrola (56). U oba istraživanja, kao i u istraživanju Wanga i suradnika (57), serumske koncentracije TGF-β1 koreliraju s težinom COVID-19 što se slaže s rezultatima našeg istraživanja. Nasuprot tome, Karadeniz i suradnici u njihovom presječnom istraživanju nisu pronašli značajne razlike u razinama TGF-β1 između 59 COVID-19 oboljelih i 30 zdravih kontrola (59). Kada se promatra povezanost TGF-β1 i težina COVID-19 postoje i suprotni rezultati; Jovanovic M i suradnici (60) pronalaze značajno niže koncentracije TGF-β1 u težim oblicima COVID-19, a Zivancevic-Simonovic S i suradnici (61) pokazuju kako su te niže koncentracije povezane s lošijim ishodima COVID-19. TGF-β1 kao inicijator fibroze djeluje i nakon preboljene SARS-CoV-2 infekcije. Colarusso i suradnici našli su da u pacijenata koji su razvili plućnu fibrozu u sklopu post COVID-19 sindroma, postoje povišene serumske razine TGF-β1 (72). Slično je nađeno i u pacijenata koji su umrli od COVID-19; u njihovim uzorcima pluća postojale su znatno više razine TGF-β1 nego u plućima umrlih od drugih uzroka (73).

Heterogenost rezultata ovih istraživanja ne može se u potpunosti objasniti samo nedostatkom standardizirane metode mjerenja citokina, postoje i drugi čimbenici koji sigurno utječu na serumske koncentracije TGF-β1 poput prisutnih komorbiditeta promatrane populacije, vremena uzimanja uzorka i varijabilnosti u cirkulirajućim varijantama SARS-CoV-2. Shodno tome, u našem istraživanju po prvi puta smo pokazali niže razine TGF-β1 u COVID-19 pacijenata nego u zdravim kontrolama. Također, u skupini COVID-19 pacijenata koji nisu

imali NAFLD, iako je postojao trend više razine TGF-β1, nije pronađena statistički značajna korelacija s težinom COVID-19.

Postoji nekoliko mogućih uloga TGF-β1 u COVID-19 patogenezi. Witkovski i suradnici u svojem istraživanju na teškim COVID-19 pacijentima primijetili su znatno suprimiran odgovor NK stanica koji je bio direktno povezan s visokim razinama TGF-β1 (63). Ferreira-Gomes i suradnici promatrajući plazmablaste u COVID-19 pacijentima u JIL-u, pronalaze TGF-β1 kao jedan od uzroka utišanog imunosnog odgovora praćenog neučinkovitim IgA protutijelima (58). Shodno tome, čini se da TGF-β1 inhibicijom i urođenog i adaptivnog imunosnog odgovora omogućuje nesmetanu SARS-CoV-2 replikaciju, što rezultira težim oblicima bolesti. Osim toga, TGF-β1 sudjeluje i u ranom i u terminalnom stadiju ARDS-a, koji je glavni patološki entitet teških oblika COVID-19. Uzrokujući endocitozu apikalnih ENaC na pneumocitima tipa 2, inhibira resorpciju alveolarne tekućine što pogoršava alveolarni edem (62). Također, kao glavni pokretač fibroze uzrokuje remodelaciju pluća (73).

Pretpostavlja se da SARS-CoV-2, kao i ostali mikroorganizmi, koristi domaćinov TGF-β1 kako bi izbjegao rani antivirusni interferonima vođen odgovor. Kasnije, te povišene razine TGF-β1 pogoduju upalnom oštećenju i fibrozi (63). Svi navedeni učinci TGF-β1 u skladu su s rezultatima našeg istraživanja u kojem serumske koncentracije TGF-β1 koreliraju s težinom bolesti, vremenom oporavka, naprednim mjerama respiratorne potpore, primitkom u JIL, razvojem nozokomijalnih infekcija i smrtnosti.

Za razliku od COVID-19, uloga TGF-β1 u NAFLD je već dugo poznata. On sudjeluje u svim fazama NAFLD-a; uzrokuje masivnu apoptozu hepatocita i diferencijaciju HSC u miofibroblaste koji luče velike količine ekstracelularnog matriksa (54). Pacijenti s NAFLD-om imaju intrinzično više razine TGF-β1 koje koreliraju s progresijom u NASH te su predložene kao marker jetrene fibroze (51,52). To je vidljivo i u našem istraživanju gdje u obje skupine, neovisno o prisustvu SARS-CoV-2 infekcije, podskupina s NAFLD-om ima više razine TGF-β1.

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja. Prvo je svakako opservacijski oblik istraživanja iz kojeg ne možemo povući uzročno-posljedičnu vezu. Drugo je mali uzorak od 60 pacijenata i 20 zdravih kontrola; rezultat se ne može poopćiti na generalnu populaciju te je statistička značajnost ograničena, osobito zbog još manjeg uzorka unutar podskupina po težini COVID-19. Treće ograničenje je što je dijagnoza NAFLD-a postavljena isključivo korištenjem ultrazvuka. Nismo mogli objektivno evaluirati stadij fibroze i utjecaj potencijalno naprednih

stadija NAFLD-a na razine TGF-β1. Četvrto ograničenje je uzimanje uzorka za mjerenje TGF-β1 samo pri prijemu; citokinski profil, tako i razine TGF-β1, mijenjaju se iz dana u dan kako se bolest razvija.

Unatoč navedenim ograničenjima, po prvi puta smo analizirali TGF-β1 signalni put u pacijenata s NAFLD-om i COVID-19. Kako bi se bolje istražio značaj TGF-β1 signalnog puta u pacijenata s komponentama MetS i NAFLD-om, potrebna su istraživanja longitudinalnog tipa.

7. Zaključak

Pacijenti s NAFLD-om prilikom SARS-CoV-2 infekcije imaju značajno povišene razine slobodnog serumskog TGF-β1 koje koreliraju s težinom i lošim ishodima bolesti. To djelomično objašnjava veći rizik od COVID-19 komplikacija u ovoj populaciji pacijenata. Imajući na umu da se COVID-19 i NAFLD pandemija preklapaju, potrebna su daljnja istraživanja kako bi bolje razumjeli patofiziologiju i prisutne imunološke mehanizme u ovoj skupini pacijenata. U budućnosti bi nam to koristilo za otkriće novih prognostičkih biomarkera i više individualizirani pristup u liječenju određenih podskupina bolesnika u COVID-19.

FINANCIRANJE

Diplomski rad izrađen je u sklopu Uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „The role of immune semaphoris in NAFLD and sepsis - SepsisFAT“ (UIP-2019-04-7194)

8. Zahvale

Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Nevenu Papiću na ideji, pomoći, strpljenju i izrazitoj pristupačnosti prilikom izrade ovog rada. Također, zahvale svim djelatnicima Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ koji su sudjelovali u zbrinjavanju COVID-19 pacijenata uključenih u ovo istraživanje.

Posebno hvala obitelji, prijateljima i kolegama koji su mi pružali neizmjernu podršku tijekom studija.

9. Literatura

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, i sur. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020 Feb 20;382(8):727–33.

2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, i sur. ; Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Vol. 5, Nat Microbiol. 2020. p. 536–44.

3. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data [Internet]. [pristupljeno 7. lipnja 2023]. Dostupno na: https://covid19.who.int/

4. Pustake M, Tambolkar I, Giri P, Gandhi C. SARS, MERS and CoVID-19: An overview and comparison of clinical, laboratory and radiological features. J Family Med Prim Care. 2022 Jan;11(1):10. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_839_21. Epub 2022 Jan 31.

5. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. [pristupljeno 7. lipnja 2023]. Dostupno na: https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants

6. World Health Organization. Statement on the update of WHO's working definitions and tracking system for SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest [Internet]. [pristupljeno 7. lipnja 2023.]. Dostupno na: https://www.who.int/news/item/16-03-2023-statement-on-the-update-of-who-s-working-definitions-and-tracking-system-for-sars-cov-2-variants-of-concern-and-variants-of-interest

7. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, i sur. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. Science. 2021 Apr 9;372(6538).

8. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, i sur. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. Nature. 2021 Mar 9;592(7854):438–443.

9. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DDS, Mishra S et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus. Science. 2021 May 21;372(6554):815-821

10. Bolze A, Luo S, White S, Cirulli ET, Wyman D, Dei Rossi A, i sur. SARS-CoV-2 variant Delta rapidly displaced variant Alpha in the United States and led to higher viral loads. Cell Rep Med. 2022 Mar 15;3(3).

11. Twohig KA, Nyberg T, Zaidi A, Thelwall S, Sinnathamby MA, Aliabadi S, i sur. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) compared with alpha (B.1.1.7) variants of concern: a cohort study. Lancet Infect Dis. 2022 Jan 1;22(1):35–42.

12. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Transmission [Internet]. [pristupljeno 11. siječnja 2023]. Dostupno na: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html

13. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2021 Oct 5;23(1):3–20.

14. Mather MW, Jardine L, Talks B, Gardner L, Haniffa M. Complexity of immune responses in COVID-19. Semin Immunol. 2021 Jun 1;55:101545.

15. World Health Organization. Guideline Clinical management of COVID-19 patients: living guideline [Internet]. [ažurirano 13. siječnja 2023; pristupljeno 7. lipnja 2023] 2022. Dostupno na: https://app.magicapp.org/#/guideline/j1WBYn

16. Vince A, Papić N, Židovec Lepej S, Kutleša M, Stemberger Marić L, Tešović G, i sur. Molekularna biologija SARS-COV-2, patogeneza, klinička slika, liječenje i profilaksa bolesti. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2023. Slika 2, Klasifikacija težine bolesti COVID-19 (SZO); str. 26

17. Centers for Disease Control and Prevention. People with Certain Medical Condition. [Internet]. [pristupljeno 7. lipnja 2023]. Dostupno na: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html

18. Centers for Disease Control and Prevention. Risk for COVID-19 Infection, Hospitalization, and Death By Age Group. [Internet]. [pristupljeno 7. lipnja 2023]. Dostupno na: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/covid-data/investigations-discovery/hospitalization-death-by-age.html

19. Centers for Disease Control and Prevention. Underlying Medical Conditions [Internet]. [pristupljeno 8. veljače 2023]. Dostupno na: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/underlyingconditions.html

20. Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, Tarhriz V, Farjami A, Ghasemian Sorbeni F, i sur. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. Virology J. 2022 May 26;19(1):1–15.

21. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, i sur. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. Natl Sci Rev. 2020 Jun 1;7(6):998–1002.

22. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, i sur. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. Lancet Respir Med. 2020 Apr 1;8(4):420–2.

23. Pelaia C, Tinello C, Vatrella A, de Sarro G, Pelaia G. Lung under attack by COVID-19-induced cytokine storm: pathogenic mechanisms and therapeutic implications. Ther Adv Respir Dis. 2020 Jan-Dec;14:1753466620933508

24. Batah SS, Fabro AT. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. Respir Med. 2021 Jan 1;176:106239.

25. Yang M. Cell Pyroptosis, a Potential Pathogenic Mechanism of 2019-nCoV Infection. SSRN Electronic Journal [Internet]. 2020 Jan 29 [pristupljeno 17. siječnja 2023]; Dostupno na: https://papers.ssrn.com/abstract=3527420

26. Tavakolpour S, Rakhshandehroo T, Wei EX, Rashidian M. Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. Immunol Lett. 2020 Sep 1;225:31–2.

27. Liu Y, Zhang C, Huang F, Yang Y, Wang F, Yuan J, i sur. Elevated plasma levels of selective cytokines in COVID-19 patients reflect viral load and lung injury. Natl Sci Rev. 2020 Jun 1;7(6):1003–11.

28. 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 1;19(6):102537.

29. Liu L, Wei Q, Lin Q, Fang J, Wang H, Kwok H, i sur. Anti–spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. JCI Insight. 2019 Feb 21;4(4).

30. Eskandarian Boroujeni M, Sekrecka A, Antonczyk A, Hassani S, Sekrecki M, Nowicka H, i sur. Dysregulated Interferon Response and Immune Hyperactivation in Severe COVID-19: Targeting STATs as a Novel Therapeutic Strategy. Front Immunol. 2022 May 17;13:2153.

31. Lu L, Zhang H, Zhan M, Jiang J, Yin H, Dauphars DJ, i sur. Preventing Mortality in COVID-19 Patients: Which Cytokine to Target in a Raging Storm? Front Cell Dev Biol. 2020 Jul 17;8:677.

32. Abani O, Abbas A, Abbas F, Abbas M, Abbasi S, Abbass H, i sur. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. The Lancet. 2021 May 1;397(10285):1637–45.

33. Abani O, Abbas A, Abbas F, Abbas J, Abbas K, Abbas M, i sur. Baricitinib in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial and updated meta-analysis. The Lancet. 2022 Jul 30;400(10349):359–68.

34. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, i sur. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology. 2018 Jan 1;67(1):328–57.

35. Gadiparthi C, Spatz M, Greenberg S, Iqbal U, Kanna S, Satapathy SK, i sur. NAFLD Epidemiology, Emerging Pharmacotherapy, Liver Transplantation Implications and the Trends in the United States. J Clin Transl Hepatol. 2020 Jun 6;8(2):215.

36. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratziu V, i sur. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol. 2016 Jun 1;64(6):1388–402.

37. Foroughi M, Maghsoudi Z, Khayyatzadeh S, Ghiasvand R, Askari G, Iraj B. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver. Adv Biomed Res. 2016;5(1):28.

38. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. J Hepatol. 2015;62(1 Suppl):S47–64.

39. Vrsaljko N, Samadan L, Viskovic K, Mehmedovic A, Budimir J, Vince A, i sur. Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease With COVID-19 Severity and Pulmonary Thrombosis:

CovidFAT, a Prospective, Observational Cohort Study. Open Forum Infect Dis. 2022 Apr 1;9(4).

40. Hegyi PJ, Váncsa S, Ocskay K, Dembrovszky F, Kiss S, Farkas N, i sur. Metabolic Associated Fatty Liver Disease Is Associated With an Increased Risk of Severe COVID-19: A Systematic Review With Meta-Analysis. Front Med (Lausanne). 2021 Mar 12;8:626425.

41. Mahamid M, Nseir W, Khoury T, Mahamid B, Nubania A, Sub-Laban K, i sur. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with COVID-19 severity independently of metabolic syndrome: a retrospective case-control study. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2021 Dec 1;33(12):1578–81.

42. Pan L, Huang P, Xie X, Xu J, Guo D, Jiang Y. Metabolic associated fatty liver disease increases the severity of COVID-19: A meta-analysis. Dig Liver Dis. 2021 Feb 1;53(2):153.

43. Hayat U, Ashfaq MZ, Johnson L, Ford R, Wuthnow C, Kadado K, i sur. The Association of Metabolic-Associated Fatty Liver Disease with Clinical Outcomes of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. Kans J Med. 2022 Jul 21;15(2):241.

44. Gao F, Zheng KI, Yan HD, Sun QF, Pan KH, Wang TY, i sur. Association and Interaction Between Serum Interleukin-6 Levels and Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease in Patients With Severe Coronavirus Disease 2019. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Mar 8;12:1.

45. Papic N, Samadan L, Vrsaljko N, Radmanic L, Jelicic K, Simicic P, i sur. Distinct Cytokine Profiles in Severe COVID-19 and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Life. 2022 Jun 1;12(6).

46. Nagant C, Ponthieux F, Smet J, Dauby N, Doyen V, Besse-Hammer T, i sur. A score combining early detection of cytokines accurately predicts COVID-19 severity and intensive care unit transfer. Int J Infect Dis. 2020 Dec 1;101:342.

47. Singh MK, Mobeen A, Chandra A, Joshi S, Ramachandran S. A meta-analysis of comorbidities in COVID-19: Which diseases increase the susceptibility of SARS-CoV-2 infection? Comput Biol Med. 2021 Mar 1;130:104219.

48. Mantel PY, Schmidt-Weber CB. Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. Methods Mol Biol. 2011;677:303–38.

49. Lodyga M, Hinz B. TGF-β1 – A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. Semin Cell Dev Biol. 2020 May 1;101:123–39.

50. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Metabolism. 2016 Aug 1;65(8):1038–48.

51. Briansó-Llort L, Fuertes-Rioja L, Ramos-Perez L, Salcedo-Allende MT, Hernandez C, Simó R, i sur. Transforming growth factor-beta 1: A new factor reducing hepatic SHBG production in liver fibrosis. J Cell Physiol. 2022 Sep 1;237(9):3598–613.

52. Ahmed H, Umar MI, Imran S, Javaid F, Syed SK, Riaz R, i sur. TGF-β1 signaling can worsen NAFLD with liver fibrosis backdrop. Exp Mol Pathol. 2022 Feb 1;124:104733.

53. Lin E, Kuo PH, Liu YL, Yang AC, Tsai SJ. Transforming growth factor-β signaling pathway-associated genes SMAD2 and TGFBR2 are implicated in metabolic syndrome in a Taiwanese population. Sci Rep.2017 Oct 19;7(1):13589

54. Nair B, Nath LR. Inevitable role of TGF-β1 in progression of nonalcoholic fatty liver disease. J Recept Signal Transduct Res. 2020 May 3;40(3):195–200.

55. Ghazavi A, Ganji A, Keshavarzian N, Rabiemajd S, Mosayebi G. Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. Cytokine. 2021 Jan 1;137:155323.

56. Laloglu E, Alay H. Role of transforming growth factor-beta 1 and connective tissue growth factor levels in coronavirus disease-2019-related lung Injury: a prospective, observational, cohort study. Rev Soc Bras Med Trop. 2022;55:e06152021.

57. Wang E yi, Chen H, Sun B qing, Wang H, Qu HQ, Liu Y, i sur. Serum levels of the IgA isotype switch factor TGF-β1 are elevated in patients with COVID-19. FEBS Lett. 2021 Jul 1;595(13):1819.

58. Ferreira-Gomes M, Kruglov A, Durek P, Heinrich F, Tizian C, Heinz GA, i sur. SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF-β-dominated chronic immune response that does not target itself. Nat Commun. 2021 Mar 30;12(1):1–14.

59. Karadeniz H, Avanoğlu Güler A, Özger HS, Yıldız PA, Erbaş G, Bozdayı G, i sur. The Prognostic Value of Lung Injury and Fibrosis Markers, KL-6, TGF-β1, FGF-2 in COVID-19 Patients. Biomark Insights. 2022 Nov 17;17: 11772719221135443.

60. Jovanovic M, Sekulic S, Jocic M, Jurisevic M, Gajovic N, Jovanovic M, i sur. Increased Pro Th1 And Th17 Transcriptional Activity In Patients With Severe COVID-19. Int J Med Sci. 2023 Mar 13;20(4):530–41.

61. Zivancevic-Simonovic S, Minic R, Cupurdija V, Stanojevic-Pirkovic M, Milosevic-Djordjevic O, Jakovljevic V, i sur. Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) in COVID-19 patients: relation to platelets and association with the disease outcome. Mol Cell Biochem. 2023 Mar 4;1–11.

62. Peters DM, Vadász I, Wujak Ł, Wygrecka M, Olschewski A, Becker C, i sur. TGF-β directs trafficking of the epithelial sodium channel ENaC which has implications for ion and fluid transport in acute lung injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jan 21;111(3):E374–83.

63. Witkowski M, Tizian C, Ferreira-Gomes M, Niemeyer D, Jones TC, Heinrich F, i sur. Untimely TGFβ responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. Nature. 2021 Oct 25;600(7888):295–301.

64. Arguinchona LM, Zagona-Prizio C, Joyce ME, Chan ED, Maloney JP. Microvascular significance of TGF-β axis activation in COVID-19. Front Cardiovasc Med. 2022 Jan 6;9.

65. Ferraioli G, Monteiro LBS. Ultrasound-based techniques for the diagnosis of liver steatosis. World J Gastroenterol. 2019 Oct 28;25(40):6053–62.

66. Kawasaki S, Aoki K, Hasegawa O, Numata K, Tanaka K, Shibata N, i sur. Sonographic evaluation of visceral fat by measuring para- and perirenal fat. J Clin Ultrasound. 2008 Mar;36(3):129–33.

67. Rendón-Ramirez EJ, Ortiz-Stern A, Martinez-Mejia C, Salinas-Carmona MC, Rendon A, Mata-Tijerina VL, i sur. TGF-β Blood Levels Distinguish Between Influenza A (H1N1)pdm09 Virus Sepsis and Sepsis due to Other Forms of Community-Acquired Pneumonia. Viral Immunol. 2015 Jun 6;28(5):248.

68. Denney L, Branchett W, Gregory LG, Oliver RA, Lloyd CM. Epithelial derived TGF-β1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza A infection. Mucosal Immunol. 2018 Mar 1;11(2):523.

69. Li N, Ren A, Wang X, Fan X, Zhao Y, Gao GF, i sur. Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection through TGF-β - Mediated expression of host cell receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jan 6;112(1):238–43.

70. Beijing Group of National Research Project for SARS.Dynamic changes in blood cytokine levels as clinical indicators in severe acute respiratory syndrome. Chin Med J(Engl). 2003 Sep;116(9):1283-7

71. Lee CH, Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Chang JC, Liu PM, i sur. Altered p38 mitogen-activated protein kinase expression in different leukocytes with increment of immunosuppressive mediators in patients with severe acute respiratory syndrome. J Immunol. 2004 Jun 15;172(12):7841–7.

72. Colarusso C, Maglio A, Terlizzi M, Vitale C, Molino A, Pinto A, i sur. Post-COVID-19 Patients Who Develop Lung Fibrotic-like Changes Have Lower Circulating Levels of IFN-β but Higher Levels of IL-1α and TGF-β. Biomedicines. 2021 Dec 1;9(12).

73. Vaz de Paula CB, Nagashima S, Liberalesso V, Collete M, da Silva FPG, Oricil AGG, i sur. COVID-19: Immunohistochemical Analysis of TGF-β Signaling Pathways in Pulmonary Fibrosis. Int J Mol Sci. 2021 Dec 24;23(1).

10. Životopis

Rođen sam 27.4.1997. u Virovitici gdje sam završio Osnovnu školu Vladimira Nazora, a potom i prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Petra Preradovića u istom gradu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2017./2018. akademske godine. Zbog uspjeha u istoj studentskoj godini dobio sam i Dekanovu nagradu. Bio sam demonstrator na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju u akademskoj godini 2018./2019. te na Katedri za internu medicinu u sklopu kolegija *History taking and physical examination* 2021./2022. akademske godine te kolegija Klinička propedeutika 2022./2023. akademske godine. Tijekom pandemije COVID-19 u 2021./2022. akademskoj godini, kao aktivni član Studentske sekcije za infektologiju, volontirao sam na Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u sklopu projekta „Volontiraj na Zaraznoj“. U 2022./2023. akademskoj godini postajem dio vodstva Studentske sekcije za anesteziologiju i intenzivnu medicinu. Aktivno sam sudjelovao na brojnim kongresima i simpozijima te sam autor i koautor dva znanstvena članka objavljena u indeksiranim časopisima.