

# Prokoagulantna i trombogena stanja u COVID-19 infekciji

---

**Knezović, Jelena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:871411>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Jelena Knezović**

**Prokoagulantna i trombogena stanja u  
COVID-19 infekciji**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Suvremene biokemijske tehnike Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta uz mentorstvo izv. prof. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete te komentorstvo dr. sc. Manuele Miletić.

*Zahvaljujem se mentoricama dr. sc. Manieli Miletić i izv. prof. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti na savjetima i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se prijateljima i kolegama koji su ove studentske dane učinili nezaboravnima.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, Ivanki i Mati. Hvala vam za ljubav i bezuvjetnu podršku koju ste mi pružili tijekom cijelog mog školovanja.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Građa virusa.....	1
1.2. Ulazak virusa u stanice .....	3
1.3. Hemostaza i COVID-19 .....	4
1.3.1. Hemostaza .....	4
1.3.2. Utjecaj COVID-19 na hemostazu .....	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	6
3. MATERIJALI I METODE .....	7
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	8
4.1. Mehanizmi aktivacije koagulacije u COVID-19 .....	8
4.1.1. Vaskularna disfunkcija .....	8
4.1.2. Disregulacija kalikrein-kinin sustava .....	9
4.1.3. Imunosni odgovor .....	10
4.1.4. Hiperkaogulabilnost .....	10
4.2. Koagulacijski parametri u COVID-19.....	11
4.3. Makro- i mikrotromboza .....	13
4.4. Diseminirana intravaskularna koagulacija.....	14
4.5. Kardiovaskularne komplikacije .....	14
4.5.1. Rizični faktori .....	14
4.5.2. Ozljeda miokarda i miokarditis.....	15
4.5.4. Aritmije .....	16
4.5.5. Zatajenje srca .....	16
4.6. Terapijski pristup koagulopatiji u COVID-19.....	17
4.7. Autoimuna stečena deficijencija FXIII.....	18
5. ZAKLJUČAK .....	20
6. POPIS KRATICA .....	22

7. LITERATURA.....	24
8. SAŽETAK / SUMMARY.....	29
8.1. Sažetak.....	29

# 1. UVOD

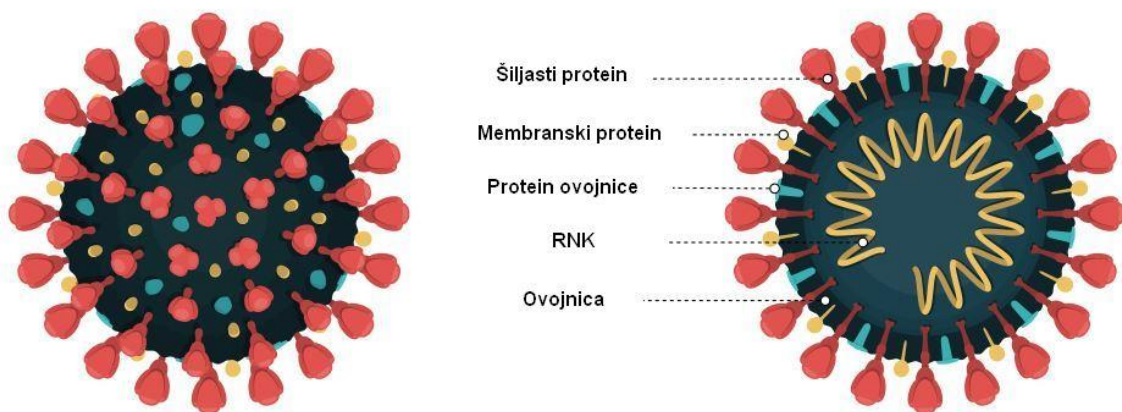
Korona virusi pripadaju redu Nidovirales, porodici Coronaviridae i potporodici Coronavirinae. Poznato je 7 sojeva korona virusa koji su patogeni za čovjeka. Većina virusa uzrokuje blage simptome, dok su SARS-CoV, SARS-CoV-2 i MERS-CoV uzročnici teškog akutnog respiratornog sindroma (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS). SARS-CoV-2 (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) otkriven je krajem 2019. u pokrajini Wuhan, u Kini. Kako se virus vrlo brzo proširio po cijelome svijetu, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) proglasila je početkom 2020. pandemiju. Bolest uzrokovana korona virusom SARS-CoV-2 (engl. *Coronavirus disease 2019*, COVID-19) može se manifestirati blagim simptomima sličnim gripi kao što su povišena tjelesna temperatura, kašalj, otežano disanje, bolovi u mišićima i umor. U težim slučajevima javlja se teška upala pluća, akutni sindrom respiratornog distresa, sepsa i septički šok. Najčešći uzrok smrti je zatajenje disanja, međutim aktivacija koagulacije praćena prekomjernom imunosnom/upalnom reakcijom (tzv. citokinska oluja), trombozom i diseminiranom intravaskularnom koagulacijom (DIK) može rezultirati zatajenjem organa (Asakura i Ogawa, 2021).

## 1.1. Građa virusa

SARS-CoV-2 je virus s ovojnicom koji sadrži jednolančanu RNA. Virus sadrži više strukturnih proteina: šiljasti (engl. *spike*, S), membranski (M), protein ovojnice (E) i nukleokapsidni protein (N) te hemaglutinin (HA). Proteini S, M i E ugrađeni su u virusnu ovojnicu dok se protein N nalazi u jezgri i uloga mu je zaštita virusne RNA (Kirtipal i sur, 2020). S protein građen je od dvije funkcionalne podjedinice, S1 i S2. S1 podjedinica sastoji se od N-terminalne domene (NTD) i receptor vezujuće domene (RBD) pa se pomoću nje virus veže na stanicu domaćina. S2 podjedinica sadrži fuzijski peptid (engl. *fusion peptide*, F1), heptamerni motiv (engl. *heptade repeat 1 i 2*, HR1 i HR2), konektorsku domenu (engl. *connector domain*, CD), transmembransku domenu (TM) i citoplazmatski rep (CT). Uloga S2 podjedinice je fuzija membrane virusa i domaćina (Wang i sur., 2020). Temeljna funkcija N proteina je pakiranje virusnog genoma u ribonukleokapsidu i interakcija s drugim virusnim proteinima tijekom sklapanja viriona. Virusni genom ispunjen je N proteinima koji tvore

spiralnu nukleokapsidu zaštićenu lipidnom ovojnicom. N protein uključen je i u replikacijski ciklus koronavirusa i odgovor stanice domaćina na virusnu infekciju. M protein definira oblik virusne ovojnice i najzastupljeniji je virusni protein. To je transmembranski protein s N- i C-krajem i tri transmembranske domene (TMD1-TMD3). C-terminalni dio može stupiti u interakciju s N i E proteinima, a TMD se veže na S protein. E protein je najmanji od glavnih strukturnih proteina i visoko je očuvan u različitim podtipovima virusa. U ovojnici funkcionira u interakciji s drugim strukturnim proteinima. Tako interakcija E i M proteina održava oblik virusne ovojnice te potiče otpuštanje (Cao i sur., 2021). Osim strukturnih proteina virus sadrži i 16 nestrukturnih proteina (nsp1-16) koji imaju različite uloge, primjerice nsp1 posreduje u obradi i replikaciji RNA, nsp2 modulira signalni put preživljavanja u stanici domaćina, nsp3 odvaja translirane proteine, nsp4 sadrži transmembransku domenu 2 i modulira membranu endoplazmatskog retikuluma, itd. (Wang i sur., 2020).

Na slici 1. prikazan je shematski prikaz virusa sa osnovnim strukturnim karakteristikama.



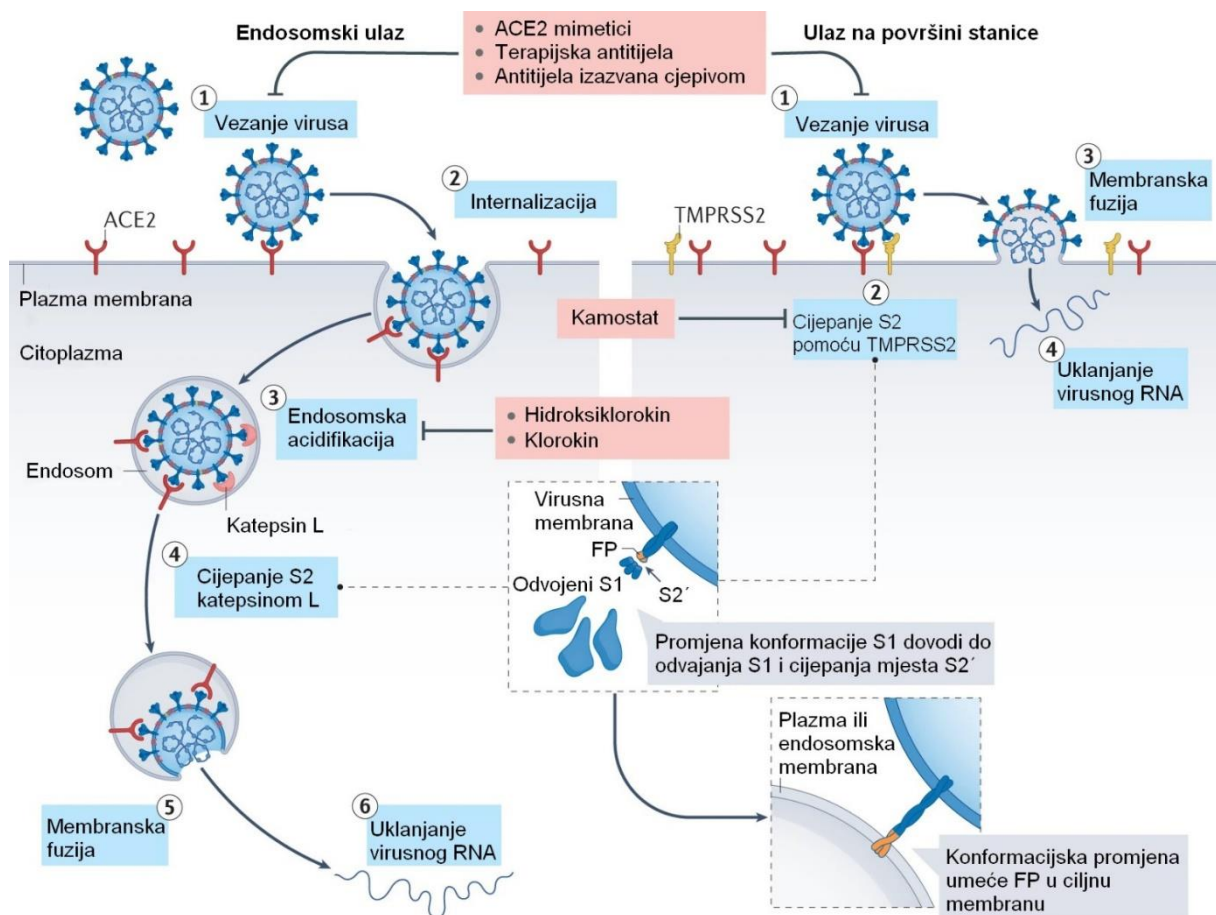
**Slika 1.** Shematski prikaz SARS-CoV-2

(Preuzeto i prilagođeno iz <https://magazine.medlineplus.gov/article/sars-cov-2-up-close>)

## 1.2. Ulazak virusa u stanice

Infekcija SARS-CoV-2 počinje vezanjem virusne čestice na površinu stanice domaćina putem S1 proteina. Proces fuzije virusne membrane s membranom domaćina potaknut je kada se S1 domena veže na receptore stanice domaćina. Potom, cijepanjem šiljastog glikoproteina djelovanjem proteaza domaćina, omogućuje se interakcija S2 domene i ulazak virusa u stanicu.

Glavni receptor na stanicama domaćina za SARS-CoV-2 je angiotenzin – konvertirajući enzim 2 (ACE2). ACE2 je aktivan u mnogim tkivima i široko je rasprostranjen u srcu, bubrezima, plućima i testisima. Također, eksprimiran je u alveolarnim epitelnim stanicama tip 2 i endotelu, čime se omogućuje ulazak virusa u stanice domaćina (Adu-Amankwaah i sur., 2021).



**Slika 2.** Shematski prikaz ulaska virusa u stanicu  
(preuzeto i prilagođeno prema Jackson i sur., 2022)



Slika 2 prikazuje dva različita načina ulaska virusa u stanicu. Potrebna su dva događaja kako bi virus ušao u stanicu: prvi je kidanje na spoju S1 i S2 podjedinice, a drugi je kidanje na S2' mjestu, unutar S2 podjedinice. Vežanjem virusa na ACE2 (korak 1) dolazi do konformacijske promjene u S1 podjedinici te se izlažu mjesta za kidanje na S2' u S2 podjedinici. Ovisno o putu ulaska, S2' kidaju različite proteaze. Lijevo je prikazan put ulaska virusa kada na ciljnoj stanici nije dovoljna ekspresija transmembranske proteaze serin 2 (TMPRSS2) ili ako kompleks virus-ACE2 ne susretne TMPRSS2. Tada je kompleks internaliziran endocitozom posredovanom klatrinom u endolizosom (korak 2), gdje se odvija kidanje S2' djelovanjem katepsina u kiseljoj sredini (korak 3 i 4). Desno, na slici 2 prikazan je ulazak virusa u stanicu u prisutnosti TMPRSS2 pa se kidanje S2' događa na staničnoj površini (korak 2). U oba ulazna puta, kidanjem S2' izlaže se fuzijski protein, a disocijacija S1 sa S2 izaziva konformacijske promjene u S2 podjedinici, gurajući fuzijski protein naprijed u ciljnu membranu, potičući fuziju membrane (korak 5 na lijevom dijelu slike i korak 3 na desnom dijelu slike). Spajanje virusne i stanične membrane stvara pore kroz koje se virusna RNA (engl. *ribonucleic acid*) otpušta u citoplazmu stanice domaćina te se replicira (korak 6 lijevo i korak 4 desno) (Jackson i sur., 2022).

### **1.3. Hemostaza i COVID-19**

#### **1.3.1. Hemostaza**

Hemostaza je složeni proces kojim se krv zadržava unutar vaskularnog prostora, popravljajući oštećenje na krvnim žilama te zaustavlja ili sprječava gubitak krvi. Rezultat je ravnoteže prokoagulacijskih i regulatornih faktora, a poremećaj ravnoteže može dovesti do hiperkaogulabilnog ili hipokoagulabilnog stanja. Sastavni dijelovi hemostaze su vaskularni sustav koji nadgleda brzinu protoka krvi, trombocitni sustav, sustav zgrušavanja, fibrinolitički sustav i inhibicijski sustav zgrušavanja. Tri su faze hemostaze: u primarnoj fazi zgrušavanje se događa kao odgovor na ozljedu pa se stvara primarni čep, u sekundarnoj fazi faktori zgrušavanja stvaraju fibrin, a početni se ugrušak dodatno stabilizira, i u trećoj fazi dolazi do fibrinolize, nakon zacjeljivanja rane ugrušak se razgrađuje.

Trombociti su stanični fragmenti diskoidnog oblika nastali iz megakariocita u koštanoj srži. Uključeni su u proces hemostaze, tromboze, zacjeljivanje rana, ateroskleroze i upale. Periferna zona trombocita obavijena je glikokaliksom koji se sastoji od mukopolisaharida,

glikoproteina, glikolipida, faktora koagulacije, fibrinolize i komplementa. Ispod glikokaliksa smještena je negativno nabijena fosfolipidna membrana ispod koje se nalaze mikrotubuli i filamenti. Unutrašnjost trombocita sadrži  $\alpha$ -granule i guste granule. Aktivacija trombocita, potaknuta izloženim molekulama izvanstaničnog matriksa ili topljivim agonistima trombocita, dovodi do funkcionalne i morfološke promjene samih trombocita. Iz diskoidnog oblika prelaze u nazubljene tako da dolazi do promjene površinskih receptora (GPIIb/IIIa, GPIb-IX-V, PAR-1, PAR-2). Za adheziju trombocita potreban je von Willebrandov faktor, VWF (eng. *von Willebrand factor*) koji se veže na GPIb-IX-V kompleks pa kao rezultat vezanja dolazi do usporavanja trombocita u cirkulaciji, interakcije s proteinima matriksa i naposljetku do adhezije trombocita (Labar i sur., 2017; Sang i sur., 2021).

Glavna uloga sustava zgrušavanja je stvaranje fibrina. Aktivacija sustava zgrušavanja počinje izlaganjem tkivnog faktora (TF) krvi, smještenog u membrani stanica koje okružuju krvne žile. Vezanjem FVII za TF u prisutnosti kalcija počinje aktivacija sustava zgrušavanja. Faktori zgrušavanja mogu se podijeliti u dvije 2 grupe: faktori proenzimi – protrombin, prekalikrein, faktori XII, XI, X, IX i VII i kofaktori – kininogen visoke molekularne mase, tkivni faktor, faktori V i VIII (Labar i sur., 2017).

Fibrinoliza je fiziološki proces odstranjivanja fibrina enzimskim cijepanjem pri čemu nastaju topljivi fibrinski fragmenti. Odvija se u tri faze: aktivacija plazminogena, pretvorba plazminogena u plazmin pomoću aktivatora plazminogena i razgradnja fibrina. Cijepanjem fibrina ili fibrinogena plazminom stvaraju se dva tipa produkta: mali fragmenti (A, B, C) i veliki fragmenti koji se dalje cijepaju. Najveći je fragment X, a daljnji manji su Y, E i D (Labar i sur., 2017).

### **1.3.2. Utjecaj COVID-19 na hemostazu**

Više je mehanizama kojima COVID-19 utječe na hemostazu i bolesti povezane s poremećajima zgrušavanja. Moguća je pojava krvarenja, hiperkoagulabilnosti, što povećava rizik od tromboze, ili diseminirane intravaskularne koagulacije, čija se patofiziologija razlikuje od one prisutne u sepsi. Bolest se može odraziti poremećajem koagulacijskih parametara, no nisu svi jednako pouzdani pokazatelji težine i progresije bolesti.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Virus SARS-CoV-2 i bolest koju uzrokuje, COVID-19, postao je glavni interes znanstvene zajednice, ali i cijele populacije kad se prvi put pojavio krajem 2019. godine. Iako u većine pacijenata simptomi bolesti budu lakši, uočeno je da postoje rizične skupine kod kojih bolest može biti kobna/smrtonosna. S obzirom da je to novi i nepoznati virus, provedena su mnoga istraživanja kako bi se istražila građa i mehanizam djelovanja virusa. U početku se smatralo kako virus primarno zahvaća samo respiratorni sustav jer su kao prvi simptomi navedeni kašalj i povišena tjelesna temperatura, međutim kasnije je uočeno kako je riječ o sistemskoj bolesti te da je sam mehanizam puno kompliciraniji. Kako je koagulacijski sustav jedan od složenijih sustava u ljudskom organizmu, cilj ovog diplomskog rada je prikazati utjecaj SARS-CoV-2 na hemostazu, mehanizme nastanka koagulopatije i njihov doprinos razvoju kardiovaskularnih bolesti, ali i potencijalni pristup terapiji pregledom najnovijih istraživanja na tu tematiku.

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

Diplomski rad teorijskog je karaktera, a temelji se na proćavanju stručne i znanstvene literature vezane uz temu COVID-19 i koagulopatije. Istraživanje literature provedeno je elektronićkim putem. Korištena je baza podataka PubMed, znanstveni radovi i članci iz javno dostupnih časopisa. U pretraživanju korišteni su ključni pojmovi SARS-CoV-2, COVID-19, coagulation, coagulopathy, vascular, thrombosis.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Koagulopatija povezana s COVID-19 (engl. *COVID-19-associated coagulopathy*, CAC) životno je ugrožavajuća komplikacija SARS-CoV-2 bolesti. CAC obuhvaća kompleksnu interakciju između urođenog imunosnog odgovora, koagulacijskog i fibrinolitičkog puta i vaskularnog endotela, rezultirajući prokoagulacijskim uvjetima. Tri su glavna puta koja su ključna u patološkim mehanizmima CAC: disfunkcija vaskularnih endotelnih stanica, pretjerani imunosni odgovor i hiperkoagulabilnost (Conway i sur., 2022).

### 4.1. Mehanizmi aktivacije koagulacije u COVID-19

#### 4.1.1. Vaskularna disfunkcija

Endotel se sastoji od sloja endotelnih stanica presvučenih glikokaliksom koji je bitna komponenta kapilara i sudjeluje u održavanju njihove strukture i funkcije. Glikokaliks ima važnu ulogu u mikrovaskularnoj fiziologiji jer regulira permeabilnost endotela, adheziju i migraciju leukocita, održava onkotski gradijent i inhibira vaskularnu trombozu (Suzuki i sur., 2022). Endotel ima antikoagulacijska i prokoagulacijska svojstva. Zbog glatke i negativno nabijene površine, trombociti se odbijaju od proteina omogućavajući protok krvi kroz krvnu žilu. Endotelne stanice sintetiziraju dušikov oksid (NO) pretvaranjem L-arginina u L-citrulin dušik-oksida sintazom. NO sprječava adheziju leukocita i trombocita, proliferaciju glatkih mišićnih stanica i suprimira apoptozu i upalu (Iba i sur., 2020). Važnu ulogu u antikoagulacijskim procesima ima i sekrecija prostaciklina, heparan sulfata i inhibitora faktora tkivnog puta. Prokoagulacijska svojstva endotela uvjetovana su sekrecijom von Willebrandovog faktora, adhezijskih molekula i izlaganjem tkivnog faktora.

Kod SARS-CoV-2 bolesti poremećaji vaskularnog endotela u velikoj mjeri doprinose patogenezi COVID-19 vaskulopatije. Najviše je izraženo u ranoj fazi bolesti koja primarno zahvaća pluća. Virus, vežući se na ACE2, inficira pneumocite tipa II, stanice koje su u izravnoj apoziciji s alveolarnom vaskularnom mrežom. Posljedica oštećenja alveola i mikrovaskularnog endotela je povećanje upale, infiltracija aktiviranih neutrofila, otpuštanje neutrofilnih izvanstaničnih mreža (engl. *neutrophil extracellular traps*, NETs), aktivacija komplementa i difuzne mikrovaskularne tromboze što doprinosi smanjenoj respiratornoj funkciji i pogoršanju bolesti (Conway i sur. 2022).

Von Willebrandov faktor nalazi se u subendotelu gdje je povezan s kolagenim tipa VI. Nakon ozljede endotela, subendotelni VWF se oslobađa, multimerizira i aktivira izlažući domene za vezanje trombocita i kolagena. Tako aktivirani multimerni vWF djeluje kao ljepilo koje povezuje trombocite i subendotelni kolagen i na taj način potiče agregaciju trombocita i nastanak tromboze. Visoke vrijednosti VWF pronađene su kod pacijenata s COVID-19 i ukazuju na povećani rizik tromboembolije (Ali i sur., 2021).

#### **4.1.2. Disregulacija kalikrein-kinin sustava**

Kalikrein-kinin sustav (KKS) je kompleksan multienzimski sustav koji ima važnu ulogu u fiziologiji, upalnim reakcijama i boli (Othman i sur., 2021). Kininogen, prekursor u sintezi bradikina, selektivno je eksprimiran na alveolarnim stanicama koje, također, eksprimiraju ACE2. Kalikrein je serinska proteaza koja katalizira pretvorbu kininogena u bradikinin i pretežito je eksprimiran u stanicama endotela i limfnim žilama (Sidarta-Oliveira i sur., 2020). Kinini su mali peptidi građeni od 9 do 11 aminokiselina, uključujući bradikinin, kalidin, peptid nalik kalidinu i T-kinin, koji nastaju iz kininogena velike molekularne mase (88 -120 kDa) i kininogena male molekularne mase (50 do 68 kDa) djelovanjem plazmatskog i tkivnog kalikreina (Othman i sur., 2021). Prethodno spomenuto su vazoaktivni peptidi koji uzrokuju relaksaciju glatkih mišićnih stanica i povećavaju vaskularnu permeabilnost.

Vežanjem SARS-CoV-2 na ACE2 receptore prisutne na epitelnim stanicama pluća dolazi do endocitoze kompleksa čime se smanjuje količina ACE2 eksprimiranih na površini stanice, rezultirajući lokalnom deficijencijom ACE2. Enzim ACE2 ima dvojnu ulogu, regulira i renin-angiotenzin-aldosteron sustav i kalikrein-kinin sustav. Disregulirana razgradnja kinina, kao posljedica utjecaja virusa na ACE2, može povećati kininsku aktivnost što dovodi do nastanka angioedema. Tako se KKS može sustavno aktivirati tijekom COVID-19, rezultirajući kininskom olujom, povećanjem vaskularne permeabilnosti, upalom, nakupljanjem tekućine i naposljetku oštećenjem organa (Conway i sur., 2022).

### 4.1.3. Imunosni odgovor

Neutrofili imaju veliku ulogu u urođenom imunosnom odgovoru i ranoj fazi infekcije. Osim fagocitnih svojstava, neutrofilni granulociti otpuštaju brojne proteolitičke enzime, kemokine, citokine i reaktivne kisikove spojeve. Značajno doprinose imunosnom odgovoru u ranoj fazi upale stvaranjem neutrofilnih izvanstaničnih mreža. NET su mrežne strukture koje sadrže DNA, histone, mikrobicidne proteine, oksidacijske enzime, faktore komplementa, a nastaju apoptozom neutrofila. Iako su važne u sprečavanju ulaska patogena u stanicu, aktivirani NET mogu doprinjeti patološkim protrombotskim učincima. Osim što mogu stimulirati nastanak duboke venske tromboze (DVT), slobodna cirkulirajuća DNA (engl. *cell-free deoxyribonucleic acid*) može aktivirati koagulacijski sustav. Također, ekspresija tkivnog faktora u NET i mikročestice porijeklom iz neutrofila mogu direktno aktivirati put zgrušavanja. Nekoliko mehanizama doprinosi stvaranju NET u COVID-19. SARS-CoV-2 može direktno doći u interakciju sa zdravim neutrofilima i potaknuti stvaranje NET putem ACE2, replikacije virusa i PAD-4 signalizacijom. Proupalni citokini kao što su IL-8 i IL-1 $\beta$  mogu izazvati otpuštanje NET u tkivima i intravaskularnim neutrofilima. Aktivacija trombocita je još jedan pokretački događaj za stvaranje NET putem receptora sličnom Toll receptoru *Drosophila* vrste (engl. *Toll-like receptor 4*, TLR4), trombocitnog faktora 4 (engl. *platelet factor 4*, PF4). Direktna interakcija između aktiviranih trombocita i neutrofila može pojačati formiranje NET i upalu tromba kod pacijenata s COVID-19 (Zhang i sur., 2022).

Nadalje, disregulacija aktivnosti komplementa doprinosi koagulopatiji manifestacijom proupalnih učinaka, direktnim protrombinskim učinkom kao posljedicom aktivacije trombocita i endotelnih stanica te povećanom ekspresijom tkivnog faktora i von Willebrandovog faktora (Franchini i sur., 2020.) Komponente komplementa C3 i kompleksa membranskih napadača (engl. *membrane attack complex*, MAC) direktno aktiviraju trombocite i potiču agregaciju. Komponenta C5a stimulira ekspresiju inhibitora aktivatora plazminogena 1 i na taj način potiče trombozu, te su povećane koncentracije inhibitora pronađene kod COVID-19 pacijenata (Ali i sur., 2021).

### 4.1.4. Hiperkaogulabilnost

Mnoge studije pokazale su povećanu aktivnost prokagulacijskih čimbenika i suprimiranu fibrinolitičku aktivnost kod COVID-19 pacijenata što može doprinjeti CAC. Usporedbom plazme pacijenata sa sepsom i pacijenata s COVID-19 uočene su razlike, ali i

sličnosti. U obje grupe pacijenata povišene su koncentracije trombomodulina, odgođeno je, ali pojačano stvaranje fibrina i povećana je otpornost fibrina na fibrinolizu. Kod pacijenata sa sepsom stvaranje trombina bilo je normalno, dok je stvaranje plazmina bilo odgođeno. U COVID-19 pacijenata povećano je stvaranje trombina, ali je normalno stvaranje plazmina (Conway i sur., 2022).

#### **4.2. Koagulacijski parametri u COVID-19**

Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) globalna je pretraga kod koje se mjeri vrijeme zgrušavanja plazme nakon aktivacije kontaktnih faktora, ali bez dodatka tkivnoga tromboplastina pa ova analiza odražava učinkovitost unutarnjeg puta zgrušavanja. Rezultati ne ovise samo o kontaktnim faktorima, faktorima VIII i IX, nego i o faktorima X, V, II i fibrinogenu. (Labar i sur., 2017). APTV je često povišen kod pacijenata s diseminiranom intravaskularnom koagulacijom, ali sam po sebi ne koristi se kao neovisni prediktor za DIK. Za razliku od klasične sepse, APTV je često normalan kod pacijenata s COVID-19 i tek je kod 6 % pacijenata bio produžen. Prosječna vrijednost APTV-a slična je kod pacijenata koji su kritično bolesni i koji nisu bili životno ugroženi stoga APTV nije pouzdan indikator progresije bolesti (Hadid i sur., 2020).

Protrombinsko vrijeme (PT) je globalna koagulacijska pretraga kojom se mjeri vrijeme zgrušavanja plazme u prisutnosti optimalne koncentracije tkivnog tromboplastina i prikazuje se djelotvornost vanjskog puta zgrušavanja koji uključuje faktore zgrušavanja II, V, VII i X i fibrinogen (Labar i sur., 2017). Za razliku od sepse, vrijednosti PT-a su normalne ili približno normalne kod većine COVID-19 pacijenata, tek 5 % imalo je produženo protrombinsko vrijeme. Međutim, kod kritično bolesnih pacijenata u fatalnim slučajevima, PT je bilo produženo. U prosjeku, PT je bilo 1,9 i duže u smrtnim slučajevima. Otprilike kod 48 % smrtnih slučajeva, u kasnijem stadiju bolesti PT je bio produžen i više od 6 s. Prema tome trend PT-a može pomoći u procjeni tijeka bolesti, osobito u teškim slučajevima. Progresivno produljenje PT-a se smatra zlokobnim znakom i predikcijom smrtnosti (Hadid i sur., 2020).

Fibrinogen je jedan od najvažnijih proteina plazme i ima važnu ulogu u procesu zgrušavanja krvi. Često je povišen kod pacijenata sa sepsom, ali može biti snižen u teškim slučajevima DIK-a. Povišen je kod većine pacijenata s COVID-19, ali stupanj porasta ne pokazuje korelaciju sa stopom mortaliteta. Ipak, progresivno smanjenje razine fibrinogena



snažno je povezano sa smrtnošću gdje otprilike 29 % smrtonosnih slučajeva razvije fibrinogen < 1 g/L, ali to se obično događa u kasnom stadiju bolesti. Kao rezultat toga, fibrinogen se ne čini korisnim u otkrivanju ranih znakova progresije COVID-19 (Hadid i sur., 2020).

Dok većina pacijenata s COVID-19 ima blagu trombocitopeniju pri primitku u bolnicu, značajan pad broja trombocita (<  $31 \cdot 10^9/L$ ) zabilježen je kod kritično bolesnih pacijenata i povezan je s povećanim mortalitetom. Postoji niz potencijalnih mehanizama nastanka trombocitopenije u COVID-19 i trombotska koagulopatija je kritičan faktor. Pluća pacijenata oboljelih od COVID-19 karakterizirana su difuznim oštećenjem alveola, pulmonarnom kongestijom, retencijom tekućine, fibrozom i širenjem hijaline membrane. Oštećeno plućno tkivo i mikrovaskularni endotel rezultiraju aktivacijom trombocita, agregacijom i formiranjem mikrovaskularnih tromba. Imajući u vidu široku rasprostranjenost uporabe heparina u profilaksi, primijećena je pojava trombocitopenije izazvane heparinom (engl. *heparin-induced thrombocytopenia*, HIT). HIT uključuje nastanak imunskog kompleksa heparin:trombocitni faktor 4 (PF4) antitijela, koji reagira s Fc $\gamma$ RIIa receptorom na površini trombocita dovodeći do aktivacije trombocita. Naknadne studije pokazale su prisutnost anti-heparin:PF4 antitijela kod COVID-19 pacijenata, ali rezultati koji pokazuju može li taj kompleks potaknuti aktivaciju trombocita su konfliktni (Mellema i sur., 2021). U svakom slučaju, HIT bi trebalo uzeti u obzir kod pacijenata sa srednjom ili visokom vjerojatnošću trombocitopenije. U odsustvu prihvatljivog objašnjenja za progresivnu trombocitopeniju, trebalo bi posumnjati na progresiju COVID-19 (Hadid i sur., 2020).

Razgradni produkti fibrinogena (engl. *fibrinogen split products*, FSP) nastaju djelovanjem proteolitičkog enzima plazmina na fibrin i fibrinogen. FSP su uglavnom normalni kod većine pacijenata s blagim oblikom bolesti te su značajno povišeni u smrtnim slučajevima (4  $\mu\text{g/mL}$  kod preživjelih vs 7.6  $\mu\text{g/mL}$  kod umrlih). Razgradni produkti fibrina smatraju se dobrim prognostičkim pokazateljem s obzirom da je progresivno povišenje koncentracije obrnuto u korelaciji s preživljenjem (Hadid i sur., 2020).

D-dimeri su razgradni produkti fibrinogena te povišeni u trombotskim događajima ukazuju na fibrinolizu. Povišeni D-dimeri ukazuju na lošu prognozu i visoku smrtnost. Visoke koncentracije mogu se pripisati aktivaciji koagulacijske kaskade u sindromu sustavnog upalnog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) kod COVID-19 pacijenata (Eljilany i Elzouki, 2020).

C protein serinska je proteaza koja ima antikoagulacijsku aktivnost te usmjerava stanične signalne aktivnosti, primarno endotelni protein C receptor (engl. *endothelial cell protein C receptor*, EPCR) i proteaza aktivirane receptore (engl. *protease-activated receptor*, PAR), PAR1 i PAR3. Sve je više dokaza da je sustav potreban za stvaranje aktiviranog proteina C oštećen u CAC. Niske koncentracije proteina C kod hospitaliziranih pacijenata povezane su s pogoršanjem bolesti i povećanom smrtnosti. Kod pacijenata oboljelih od sepse i diseminiranom intravaskularnom koagulacijom, niske vrijednosti proteina C pokazale su se kao koristan biomarker u identifikaciji pacijenata kod kojih postoji rizik razvoja teških bolesti. Niske koncentracije povećavaju rizik ishemijskog moždanog udara i demencije. Također, kod pacijenata s COVID-19 može biti povećavan rizik od moždanog udara ili se može javiti tzv. moždana magla, poznat kao postakutna posljedica SARS-CoV-2 infekcije (Conway i sur., 2022).

#### **4.3. Makro- i mikrotromboza**

U COVID-19 bolesti prisutne su i venska i arterijska tromboza. Arterijska tromboza uključuje cerebralni infarkt, infarkt miokarda i trombozu arterija udova. Venska tromboza podrazumijeva duboku vensku trombozu (DVT) i plućnu tromboemboliju (PTE). I DVT i PTE mogu se javiti istovremeno, za što se koristi naziv venska tromboembolija (VTE).

Makrotromboza, kao što je VTE, može se dijagnosticirati kontrastnim CT-om. Problem se javlja kod prisutnosti mikrotromboze koja je kod pacijenata uočena tek prilikom obdukcije. Pronađeni su trombi u perifernoj krvi pluća i u desnom ventrikulu. Mikroskopskim pregledom utvrđena je prisutnost mnogo malih tromba u malim arterijama i venama pluća, a sadržavali su fibrinske i trombocitne komponente. U odnosu na influenzu, stupanj mikrotromboze na alevolarnoj kapilarnoj razini je 9 puta veći. Angiogeneza kod COVID-19 je 2,7 puta veća nego kod gripe, ali novonastale krvne žile nisu pokazale normalnu antitrombotsku funkciju pa se pretpostavlja da ubrzavaju nastanak tromboze (Asakura i Ogawa, 2021).

#### **4.4. Diseminirana intravaskularna koagulacija**

Kombinacija trombocitopenije, produljenog PV-a i povišene koncentracije D-dimera kod COVID-19 bolesnika upućuju na prisutnost DIK-a, međutim sama manifestacija razlikuje se od one u sepsi. Trombocitopenija je u sepsi znatno teža jer pacijenti imaju manju razinu faktora zgrušavanja i izrazito smanjene plazmatske koncentracije inhibitora koagulacije kao što su antitrombin i protein C. Važno je napomenuti da koncentracije D-dimera ne dosežu vrijednosti prisutne u COVID-19. Trenutne spoznaje sugeriraju da je kaogulopatija uzrokovana COVID-19 kombinacija DIK niskog stupnja i pulmonarne trombotske mikroangiopatije, što može imati značajan utjecaj na organsku disfunkciju. Iako DIK u COVID-19 zadovoljava definiciju diseminirane intravaskularne koagulacije koju je predložilo Društvo za trombozu i hemostazu, ipak postoje razlike između DIK-a u COVID-19 i klasične diseminirane intravaskularne koagulacije koja je prisutna u sepsi (Gomez-Mesa i sur., 2021; Levi i Iba, 2021).

#### **4.5. Kardiovaskularne komplikacije**

##### **4.5.1. Rizični faktori**

Hipertenzija i dijabetes su najčešći komorbiditeti u pacijenata s COVID-19 kod kojih je bila potrebna hospitalizacija. Općenito, pacijenti s hipertenzijom imaju veću rizik mortaliteta u usporedbi s pacijentima koji nemaju hipertenziju. Kao kronična bolest, hipertenzija podrazumijeva upalno stanje i slabljenje urođenog imunskog odgovora koji je važna komponenta u patogenezi COVID-19. Nova istraživanja pokazala su povezanost hipertenzije i povećanja rizika nastanka teške bolesti uzrokovane infekcijom SARS-CoV-2. Provedena je studija u kojoj je sudjelovalo 126 pacijenata s COVID-19 i prethodno dijagnosticiranom hipertenzijom i 125 pacijenata iste dobi i spola bez hipertenzije. Među pacijentima s hipertenzijom, 21,3 % imalo je teški razvoj bolesti i 10,3 % veću stopu smrtnosti, naspram 6,4 % u grupi pacijenata bez hipertenzije. Navedeno upućuje da je hipertenzija veliki faktor rizika povezan s lošijim kliničkom ishodom. Također, kod pacijenata s hipertenzijom uočene su veće koncentracije visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina, prokalcitonina i IL-6 u usporedbi s kontrolnom grupi, što ukazuje da hipertenzija pojačava upalu u infekciji SARS-CoV-2 (Azevedo i sur., 2020).

Osim dijabetesa i hipertenzije, kao rizičan faktor opisana je i genska predispozicija, odnosno polimorfizmi gena ITGB3 PIA2 i  $\beta$ -Fbg. Geni IGTB3 i IGTB2 kodiraju podjedinice

gpIIb/IIa koji ima ulogu u adheziji i aktivaciji trombocita. Osobe koje su nositelj barem jednog ITGB PAI2 alela imaju 3,5 puta veći rizik trombotičkih i kardiovaskularnih posljedica kao što su duboka venska tromboza, moždani udar ili ishemija. Promjena jednog nukleotida u  $\beta$ -Fbg genu prisutna je kod teško bolesnih pacijenata s COVID-19. Taj polimorfizam povezan je s visokim koncentracijama fibrinogena u plazmi te se smatra neovisnim prediktorom koronarne bolesti srca (Lapić i sur., 2022).

#### **4.5.2. Ozljeda miokarda i miokarditis**

Ozljeda miokarda, karakterizirana povišenim koncentracijama troponina, može se dogoditi prije ishemije miokarda ili neishemičnih procesa kao što je miokarditis. Prema prijašnjim istraživanjima MERS-CoV (eng. *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) može izazvati zatajenje srca i miokarditis kod zaraženih pacijenata. SARS-CoV-2 i MERS-CoV imaju sličnu patogenost pa ozljede miokarda mogu biti prisutne kod osoba s COVID-19 kao rezultat miokarditisa ili hipoksije koji prethode teškim respiratornim infekcijama i akutnom respiratornom distress sindromu (engl. *Acute respiratory distress syndrome*, ARDS). Nalazi obdukcije pacijenata pokazuju infiltraciju miokarda mononuklearnim upalnim stanicama, kao što su makrofagi i u manjoj mjeri CD4+ T limfociti. Sukladno tome, slučajevi teškog miokarditisa sa smanjenom sistoličkom funkcijom primijećeni su kod pacijenata s COVID-19 (Adu-Amankwaah i sur., 2021).

Ozljeda miokarda dijagnosticira se povišenim serumskim koncentracijama srčanih markera ili abnormalnostima elektrokardiografije i ehokardiografije. Na temelju biomarkera, ozljeda miokarda kod COVID-19 pacijenata može se pripisati dvama obrascima. Jedan od obrazaca odražava citokinsku oluju, koja je karakterizirana povećanjem visoko osjetljivog cTnI i ostalih upalnih markera, poput D-dimera i IL-6. Drugi obrazac predstavlja pretežito srčane simptome koji ukazuju na virusni miokarditis ili stresnu kardiomiopatiju. Učestalost srčanih ozljeda vrlo je visoka kod COVID-19 pacijenata i pozitivno korelira s mortalitetom. (Liu i sur., 2021).

#### 4.5.4. Aritmije

Osim kašlja i povišene tjelesne temperature, aritmija je vrlo česti simptom kod COVID-19. Povišene vrijednosti troponina T vrlo vjerojatno pokazuju na potencijalni razvoj malignih aritmija (ventrikularna tahikardija i fibrilacija). Iako mehanizam nastanka aritmije u COVID-19 nije do kraja poznat, pretpostavlja se da je uzrok vjerojatno ozljeda miokarda, poremećaj u acido-baznom statusu, disbalans elektrolita. Primijećena je veća učestalost aritmija kod pacijenata s uznapredovalom bolesti, a pretpostavka je da uzimanje lijekova kao što su antivirusici i antibiotici može izazvati aritmije (Liu i sur., 2020; Nishiga i sur., 2020).

#### 4.5.5. Zatajenje srca

Jedna od najčešćih komplikacija koja se javlja u COVID-19 bolesti je zatajenje srca. Još uvijek nije do kraja razjašnjena sama etiologija zatajenja srca u bolesti, ali vjeruje se da je jedan od razloga već postojeći komorbiditeti. Većina pacijenata oboljelih od COVID-19 kod kojih je došlo do zatajenja srca su osobe starije životne dobi koje imaju od prije poznate bolesti kao što su hipertenzija, dijabetes ili bolest koronarnih arterija. Nadalje, akutna ozljeda miokarda i akutni koronarni sindrom potaknuti COVID-19 bolesti mogu pogoršati već postojeću bolest srca ili izazvati kontraktilnu disfunkciju. Pacijenti kod kojih je došlo do zatajenja srca su u rizičnoj skupini zbog smanjene imunosti, općenite slabosti i smanjene sposobnosti organizma da se izbori s upalom. Kod takvih osoba, monociti proizvode veće količine tumor-nekrotizirajućeg faktora alfa (engl. *Tumor necrosis factor*, TNF- $\alpha$ ) i manje količine interleukina 10, IL-10 što u kombinaciji sa sistemskom upalom uzrokovanom COVID-om zahtjeva visoki minutni volumen i općenito bolji rad srca, što predstavlja dodatni problem ( Nishiga i sur., 2020; Bader i sur., 2021) .

#### 4.6. Terapijski pristup koagulopatiji u COVID-19

Pristup terapiji kod pacijenata s COVID-19 trebao bi biti individualan. Smatra se da ne postoji univerzalna terapija kod bolesti uzrokovane korona virusom, već bi ju trebalo prilagoditi stanju pacijenta i stupnju bolesti.

Kao antikoagulatna terapija najčešće se koristi heparin, odnosno niskomolekularni heparin (engl. *Low-molecular-weight heparin*, LMWH). Može se koristiti kao profilaksa u početnoj fazi bolesti kada je prisutna upala pluća kako bi se spriječio nastanak venske tromboembolije ili u kasnijoj fazi kod hospitaliziranih pacijenata (Stasi i sur., 2020).

Nafamostat je inhibitor serinske proteaze koji snažno inhibira proteolitičke enzime kao što su trombin, plazmin i tripsin. Prednost nafamostata pred heparinom je što se krvarenje ne javlja kao nuspojava, ali ima slabiji antikoagulantni učinak u odnosu na antifibrinolitički. Lijek može djelovati na više načina, može inhibirati ulazak virusa u stanicu inhibicijom TMPRSS2 te ima antiplazmatsku aktivnost. Naime, plazmin može povećati patogenost i infektivnost SARS-CoV-2 cijepanjem S podjedinice. Uzevši u obzir svojstva nafamostata i heparina, smatra se kako bi kombinacija ta dva lijeka bila uspješna u liječenju pacijenata (Asakura i Ogawa, 2021).

Velik broj lijekova, među kojima su i antiviroci, metabolizira se enzimom CYP3A4 što otežava primjenu lijekova u COVID-19 zbog mogućih interakcija. Upravo zbog farmakokinetike i farmakodinamike, upotreba primjerice direktnih oralnih antikoagulanasa (engl. *Direct oral anticoagulants*, DOACs) ograničena je kod hospitaliziranih pacijenata, dok asimptomatski pacijenti koji nemaju teže simptome mogu koristiti DOAC. Kod pacijenata koji primaju antiviralnu terapiju, preporuka je koristiti parenteralne antikoagulanse kao što u LMWH i nefrakcionirani heparin (Roguljić i sur., 2022).

Kod primjene inhibitora agregacije trombocita treba uzeti u obzir interakcije lijeka s inhibitorima proteaze. Prasugrel se koristi kod terapije lopinavirom ili ritonavirom, a klopidogrel kod bolesnika s koagulopatijom kod kojih je mali rizik krvarenja. Inhibitori glikoproteina IIb/IIIa bi se trebali izbjegavati kod COVID-19 pacijenata (Šikić i sur., 2021).

#### 4.7. Autoimuna stečena deficijencija FXIII

Konstantnom mutacijom SARS-Cov-2 virusa javila se potreba za razvojem cjepiva. Proizvedeno je nekoliko vrsta cjepiva uz korištenje četiri različite tehnologije: mRNA, virusni vektor, proteinska osnova i inaktivirani virus. Novi pristup cjepivu je mRNA. Posebnost ove tehnologije je što cjepivo ne sadrži nijedan dio virusa nego daje uputu stanicama da proizvedu protein nalik koronavirusu i na taj se način potakne imunosti odgovor. Primjer cjepiva u kojima se koristi takva tehnologija su BioNTech/Pfizer i Moderna. (<https://www.consilium.europa.eu>) Nakon cijepjenja prijavljene su različite nuspojave i pojava raznih autoimunih bolesti, a jedna od njih je i autoimuna stečena deficijencija FXIII. Još uvijek nije jasan točan mehanizam kojim cjepivo pokreće autoimune reakcije, ali vjeruje se da je u podlozi nastanka autoimunih bolesti molekularna mimikrija, proizvodnja specifičnih autoantitijela te različiti adjuvansi korišteni u cjepivima.

Prvi slučaj AiF13D (engl. *autoimmune-acquired factor XIII/13(FXIII/13) deficiency*) prikazali su Shimoyama i sur., (2022). Pacijentici, 78 god, dva tjedna nakon druge doze mRNA cjepiva pojavila se modrica na bedru, potom i modrica na lijevoj ruci. Zbog boli i oticanja lijeve ruke, 50. dan od cijepjenja posjetila je bolnicu. Operacijom je otklonjen hematom, međutim, pacijentica je nastavila krvariti zbog čega prima dvije doze eritrocita. Nakon nekog vremena na udovima se pojavila ekhimoza, potkožno krvarenje manjeg inteziteta. Laboratorijskim pretragama uočena je normocitna anemija, smanjena koncentracija hemoglobina i smanjeni hematokrit, dok su broj trombocita, PV, APTV i fibrinogen bili normalni. Aktivnost FVIII i vWF bila je povećana, razina FXIII blago snižena, a aktivnost FXIII bila je ispod granice detekcije. Primila je koncentrat FXIII nakon čega joj se poboljšalo stanje i 74. dan od primitka druge doze puštena je kući. Dodatnim pretragama dijagnosticirana joj je autoimuna stečena deficijencija FXIII. Nakon nekog vremena ponovno je hospitalizirana, aktivnost FXIII joj je bila niska pa je ponovno primila koncentrat FXIII. Ubrzo se stanje pacijentice pogoršalo, te je došlo do krvarenja u središnjem živčanom sustavu.

Nakamura i sur., (2022) prikazali su slučaj autoimune stečene deficijencije FXIII praćene višestrukom purpustom, trombocitopenijom i proteinurijom nakon cijepjenja drugom dozom SARS-CoV-2 mRNA cjepiva. Pacijentica, 75 god, dva tjedna nakon primitka druge doze uočila je višestruku palpatornu purpuru, karakterističnu za trombocitopeniju, na gornjim udovima koja se uskoro proširila te je hospitalizirana. Pri dolasku u bolnicu, aktivnost faktora XIII bila je 7 %. Mjesec dana kasnije trombocitopenija i proteinurija su i dalje bile prisutne, a aktivnost FXIII

bila je 5 %. Intravenoznim primitkom imunoglobulina, trombocitopenija, purpura i proteinurija su poboljšane, ali je i dalje aktivnost FXIII ostala niska. Daljnjim pretragama otkrivena je prisutnost inhibitora FXIII. Kako u osobnoj i obiteljskoj anamnezi nije bilo prisutno krvarenje, a pacijentica nije koristila lijekove koji uzrokuju krvarenje, dijagnosticirana joj je autoimuna stečena deficijencija FXIII. U slučaju ponovnog krvarenja, pacijentici će biti propisana imunosupresivna terapija i nadomjesna terapija koncentratom FXIII.

FXIII je posljednji faktor u koagulacijskoj kaskadi i ima ulogu u stabilizaciji fibrinskog ugruška, zacjeljivanju rana, popravku oštećenog tkiva i slično. S obzirom da koagulacijske pretrage APTV i PV ne obuhvaćaju mjerenje aktivnosti FXIII, njihove će vrijednosti biti normalne u slučaju deficijencije FXIII. Ako je kod pacijenata koji su primili cjepivo, imaju ili su preboljeli COVID-19 prisutno krvarenje, unatoč normalnim vrijednostima koagulacijskih parametara, trebalo bi posumnjati na deficijenciju FXIII.



## 5. ZAKLJUČAK

Kraj 2019. obilježila je pojava novog i čovječanstvu nepoznatog virusa, SARS-CoV-2. Otkriven je u Kini u pokrajini Wuhan. Budući da se virus vrlo brzo širio cijelim svijetom, Svjetska zdravstvena organizacija proglasila je početkom 2020. pandemiju.

SARS-CoV-2 je virus s ovojnicom koji sadrži jednolančanu RNA, a sadrži i različite strukturne proteine. Virus uzrokuje bolest COVID-19 koja ima simptome vrlo slične gripi: povišena tjelesna temperatura, otežano disanje, umor i bolove u mišićima. U težim slučajevima dolazi do sepse, upale pluća i zatajenja disanja što dovodi do smrti pacijenta.

Način na koji virus ulazi u stanice domaćina jest preko ACE2 receptora, eksprimiranog u alveolarnim epitelnim stanicama. Osim toga, navedeni enzim prisutan je i u srcu, bubrezima, plućima i testisima. Provedena su brojna istraživanja kako bi se proučila struktura i način djelovanja virusa. Isprva se smatralo da virus zahvaća samo respiratorni sustav, no promatranjem je uočeno da je riječ o bolesti koja zahvaća/napada cijeli organizam. Upravo se zbog toga ovim radom želi prikazati utjecaj SARS-CoV-2 na hemostazu, mehanizme nastanka koagulopatije i njihov doprinos razvoju kardiovaskularnih bolesti.

Koagulopatija uzrokovana COVID-19 (CAC) po život je opasno stanje u čiji su mehanizam nastajanja uključeni imunوسي sustav, disfunkcija vaskularnog endotela i hiperkoagulabilnost. Pokazatelji za procjenu hemostaze i razvoj bolesti su: PV, fibrinogen, razgradni produkti fibrinogena, broj trombocita i koncentracija proteina C. Rezultati istraživanja kao najsigurniji marker prikazuju koncentraciju D-dimera.

Uz povišenu temperaturu i kašalj vrlo česti simptomi bolesti COVID-19 su aritmije i zatajenje srca. Još uvijek nije poznat uzrok nastanka aritmije, ali pretpostavlja se da je uzrok vjerojatno ozljeda miokarda. Nedovoljno istražen je i problem zatajenja srca. Smatra se da do zatajenja dolazi zbog već otprije poznatih bolesti (dijabetes, hipertenzija, bolest koronarnih arterija) u bolesnika starije životne dobi.

Liječenje osobe s COVID-19 treba biti prilagođeno. Smatra se da ne postoji univerzalni lijek niti terapija koja će se primjenjivati na većinu pacijenata. Terapiju i liječenje treba prilagoditi stanju pacijenta i težini bolesti. Opća preporuka je koristiti niskomolekularni heparin, po mogućnosti u kombinaciji s nafamostatom.

Prema tome, virus SARS-CoV-2 je svaki put iznova iznenadio svojim simptomima i ostavio dugotrajne posljedice na čovječanstvo. Zdravstvene ustanove i sustavi diljem svijeta suočili su se s novim izazovima. Pandemijska je istaknula važnost suradnje između država, ali i pripreme za izvanredne situacije.

## 6. POPIS KRATICA

ACE2 – angiotenzin-konvertirajući enzim 2, engl. *angiotensin-converting enzyme 2*

AiF13D- autoimuna stečena deficijencija FXIII, engl. *autoimmune-acquired factor XIII deficiency*

APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

ARDS- akutni respiratorni distress sindrom, engl. *acute respiratory distress syndrome*

CAC – koagulopatija povezana s COVID-19, engl. *COVID-19-associated coagulopathy*

COVID-19 - bolest uzrokovana koronavirusom, engl. *coronavirus disease 2019*

DIK – diseminirana intravaskularna koagulacija

DOAC – direktno oralni antikoagulansi, engl. *direct oral anticoagulants*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

DVT – duboka venska tromboza

EPCR – engl. *Endothelial cell protein C receptor*

FSP – razgradni produkti fibrina, engl. *fibrin split products*

HIT- trombocitopenija izazvana heparinom, engl. *heparin-induced thrombocytopenia*

IL-6- interleukin 6

KKS – kalikrein-kinin sustav

LMWH – niskomolekularni heparin, engl. *low-molecular-weight heparin*

MAC - engl. *membrane attack complex*

MERS-CoV-2 – engl. *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*

NET – neutrofilna izvanstanična mreža, engl. *neutrophil extracellular traps*

NO – dušikov oksid

NTD – N-terminalna domena, engl. *N-terminated domain*

PAR – engl. *protease activated receptor*

PF4- trombocitni faktor 4, engl. *platelet-factor 4*

PTE – plućna tromboembolija

PV – protrombinsko vrijeme

RBD – receptor vezujuća domena, engl. *receptor-binding domain*

SARS-CoV-2 – engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SIRS – sindrom sustavnog upalnog odgovora, engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*

TLR4- engl. *Toll-like receptor 4*

TM – transmembranska domena

TMPRSS2 – transmembranska serinska proteaza 2 , engl. *Transmembrane Serine Protease 2*

TNF- $\alpha$  – engl. *tumor necrosis factor*

VTE – venska tromboembolija

VWF- von Willebrandov faktor

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija, engl. *World Health Organization*

## 7. LITERATURA

Adu-Amankwaah, J., Mprah, R., Adekunle, A. O., Ndzie Noah, M. L., Adzika, G. K., Machuki, J. O. A., & Sun, H. (2021). The cardiovascular aspect of COVID-19. *Annals of Medicine*, *53*(1), 227-236.

Ali, M. A., & Spinler, S. A. (2021). COVID-19 and thrombosis: From bench to bedside. *Trends in cardiovascular medicine*, *31*(3), 143-160.

Asakura, H., & Ogawa, H. (2021). COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *International journal of hematology*, *113*, 45-57.

Azevedo, R. B., Botelho, B. G., Hollanda, J. V. G. D., Ferreira, L. V. L., Junqueira de Andrade, L. Z., Oei, S. S. M. L., ... & Muxfeldt, E. S. (2021). Covid-19 and the cardiovascular system: a comprehensive review. *Journal of human hypertension*, *35*(1), 4-11.

Bader, F., Manla, Y., Atallah, B., & Starling, R. C. (2021). Heart failure and COVID-19. *Heart failure reviews*, *26*(1), 1-10.

Cao Y, Yang R, Lee I, Zhang W, Sun J, Wang W, Meng X. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Sci*. 2021 Jun;30(6):1114-1130..

Conway, E. M., Mackman, N., Warren, R. Q., Wolberg, A. S., Mosnier, L. O., Campbell, R. A., ... & Morrissey, J. H. (2022). Understanding COVID-19-associated coagulopathy. *Nature Reviews Immunology*, *22*(10), 639-649.

Eljilany, I., & Elzouki, A. N. (2020). D-dimer, fibrinogen, and IL-6 in COVID-19 patients with suspected venous thromboembolism: a narrative review. *Vascular health and risk management*, 455-462.

Franchini, M., Marano, G., Cruciani, M., Mengoli, C., Pati, I., Masiello, F., ... & Liumbruno, G. M. (2020). COVID-19-associated coagulopathy. *Diagnosis*, 7(4), 357-363.

Gomez-Mesa, J. E., Galindo-Coral, S., Montes, M. C., & Martin, A. J. M. (2021). Thrombosis and Coagulopathy in COVID-19. *Current problems in cardiology*, 46(3), 100742.

Hadid T, Kafri Z, Al-Katib A. Coagulation and anticoagulation in COVID-19. *Blood Rev.* 2021 May;47:100761.

<https://www.consilium.europa.eu/hr/policies/coronavirus/covid-19-research-and-vaccines/> - pristupljeno 18. kolovoza 2023.

Iba, T., Connors, J. M., & Levy, J. H. (2020). The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflammation Research*, 69, 1181-1189.

Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Jan;23(1):3-20.

Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol.* 2020 Nov;85:104502.

Labar B. i suradnici, Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 2017, str. 94., 99-100, 717

Lapić, I., Radić Antolic, M., Horvat, I., Premužić, V., Palić, J., Rogić, D., & Zadro, R. (2022). Association of polymorphisms in genes encoding prothrombotic and cardiovascular risk factors with disease severity in COVID-19 patients: A pilot study. *Journal of Medical Virology*, *94*(8), 3669-3675.

Levi, M., & Iba, T. (2021). COVID-19 coagulopathy: is it disseminated intravascular coagulation?. *Internal and emergency medicine*, *16*, 309-312.

Liu, F., Liu, F., & Wang, L. (2021). COVID-19 and cardiovascular diseases. *Journal of molecular cell biology*, *13*(3), 161-167.

Mellema, R. A., Crandell, J., & Petrey, A. C. (2022). Platelet dysregulation in the pathobiology of COVID-19. *Hämostaseologie*, *42*(04), 221-228.

Nakamura, S., Sugasaki, M., Souri, M., Akazawa, H., Sogawa, M., Hori, T., ... & Ichinose, A. (2022). Autoimmune Acquired Factor XIII/13 Deficiency after SARS-CoV-2 mRNA Vaccination. *Thrombosis and Haemostasis*, *122*(10), 1837-1842.

Nishiga, M., Wang, D. W., Han, Y., Lewis, D. B., & Wu, J. C. (2020). COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, *17*(9), 543-558.

Othman, R., Cagnone, G., Joyal, J. S., Vaucher, E., & Couture, R. (2021). Kinins and their receptors as potential therapeutic targets in retinal pathologies. *Cells*, *10*(8), 1913.

Roguljić, H., Arambašić, J., Ninčević, V., Kuna, L., Šesto, I., Tabll, A., ... & Smolić, M. (2022). The role of direct oral anticoagulants in the era of COVID-19: are antiviral therapy and pharmacogenetics limiting factors?. *Croatian medical journal*, 63(3), 287.

Sang, Y., Roest, M., de Laat, B., de Groot, P. G., & Huskens, D. (2021). Interplay between platelets and coagulation. *Blood reviews*, 46, 100733.

Shimoyama, S., Kanisawa, Y., Ono, K., Souri, M., & Ichinose, A. (2022). First and fatal case of autoimmune acquired factor XIII/13 deficiency after COVID-19/SARS-CoV-2 vaccination. *American Journal of Hematology*, 97(2), 243.

Sidarta-Oliveira, D., Jara, C. P., Ferruzzi, A. J., Skaf, M. S., Velandar, W. H., Araujo, E. P., & Velloso, L. A. (2020). SARS-CoV-2 receptor is co-expressed with elements of the kinin–kallikrein, renin–angiotensin and coagulation systems in alveolar cells. *Scientific reports*, 10(1), 19522.

Stasi, C., Fallani, S., Voller, F., & Silvestri, C. (2020). Treatment for COVID-19: An overview. *European journal of pharmacology*, 889, 173644.

Suzuki, A., Tomita, H., & Okada, H. (2022). Form follows function: The endothelial glycocalyx. *Translational Research*, 247, 158-167.

Šikić, J., Planinić, Z., Matišić, V., Friščić, T., Molnar, V., Jagačić, D., ... & Primorac, D. (2021). COVID-19: The impact on cardiovascular system. *Biomedicines*, 9(11), 1691.

Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 25;10:587269.



Zhang H, Lao Q, F J, Zhu J. Coagulopathy in COVID-19 and anticoagulation clinical trials.  
*Best Pract Res Clin Haematol.* 2022 Sep;35(3):101377

## 8. SAŽETAK / SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Krajem 2019. godine u kineskoj pokrajini Wuhan pojavio se novi virus SARS-CoV-2 pa je Svjetska zdravstvena organizacija ubrzo proglasila pandemiju. Bolest uzrokovana ovim korona virusom, COVID-19, može se manifestirati blažim simptomima sličnima gripi ili težim koji mogu dovesti do smrtnoga ishoda. Glavni put ulaska virusa u stanicu domaćina je putem ACE2 receptora koji je eksprimiran na alveolarnim epitelnim stanicama, srcu, bubrežima, plućima, itd. Koagulopatija uzrokovana COVID-19 (CAC) po život je opasno stanje u čiji su mehanizam nastajanja uključeni imunosni sustav, disfunkcija vaskularnog endotela i hiperkoagulabilnost. Parametri koji se koriste za procjenu hemostaze, tijek i progresiju bolesti su PV, fibrinogen, razgradni produkti fibrinogena, broj trombocita, koncentracija proteina C. Kao najpouzdaniji marker pokazala se koncentracija D-dimera. Rizični faktori za nastanak CAC i kardiovaskularnih bolesti su genske predispozicije kao što su polimorfizmi gena ITGB3 PIA1/PIA2 i  $\beta$ -Fbg, te prisutnost hipertenzije i dijabetes. Komplikacije koje su često prisutne su mikro- i makrotromboza, diseminirana intravaskularna koagulacija, miokarditis, aritmije i zatajenje srca. U antikoagulantnoj terapiji najbolji se pokazao niskomolekularni heparin, dok direktne oralne antikoagulanse i inhibitore agregacije trombocita treba koristiti s oprezom zbog brojnih interakcija, ponajprije s antivirusicima. Također, preporuča se koristiti nafamostat, ako je moguće u kombinaciji s heparinom. Pojavom cjepiva protiv SARS-CoV-2 i njegovom širokom primjenom, uočene su brojne nuspojave kao i nastanak autoimunih bolesti, poput stečene autoimune deficijencije FXIII.

## 8.2. Summary

At the end of 2019, a new SARS-CoV-2 virus appeared in the Chinese province of Wuhan, and the World Health Organization soon declared it a pandemic. The disease caused by this corona virus, COVID-19, can manifest itself with mild flu-like symptoms or more severe ones that can lead to death. The main way the virus enters the host cell is through the ACE2 receptor, which is expressed on alveolar epithelial cells, the heart, kidneys, lungs, etc. Coagulopathy caused by COVID-19 (CAC) is a life-threatening condition in which the immune system, vascular endothelium dysfunction and hypercoagulability are involved. The parameters used to assess hemostasis and the course and progression of the disease are PV, fibrinogen, fibrinogen degradation products, platelet count, protein C concentration, and D-dimer concentration proved to be the most reliable marker. Risk factors for CAC and cardiovascular diseases are genetic predispositions such as ITGB3 PIA1/PIA2 and  $\beta$ -Fbg gene polymorphisms, as well as the presence of hypertension and diabetes. Complications that are often present are micro- and macrothrombosis, disseminated intravascular coagulation, myocarditis, arrhythmias and heart failure. In anticoagulant therapy, low-molecular-weight heparin proved to be the best, while direct oral anticoagulants and platelet aggregation inhibitors should be used with caution due to numerous interactions, primarily with antivirals. Also, it is recommended to use nafamostat, if possible in combination with heparin. With the advent of the vaccine against SARS-CoV-2 and its widespread use, numerous side effects and the emergence of autoimmune diseases have been observed, such as autoimmune-acquired factor XIII deficiency.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Prokoagulantna i trombogena stanja u COVID-19 infekciji

Jelena Knezović

#### SAŽETAK

Krajem 2019. godine u kineskoj pokrajini Wuhan pojavio se novi virus SARS-CoV-2 pa je Svjetska zdravstvena organizacija ubrzo proglasila pandemiju. Bolest uzrokovana ovim korona virusom, COVID-19, može se manifestirati blažim simptomima sličnima gripi ili težim koji mogu dovesti do smrtnoga ishoda. Glavni put ulaska virusa u stanicu domaćina je putem ACE2 receptora koji je eksprimiran na alveolarnim epitelnim stanicama, srcu, bubrezima, plućima, itd. Koagulopatija uzrokovana COVID-19 (CAC) po život je opasno stanje u čiji su mehanizam nastajanja uključeni imunوسي sustav, disfunkcija vaskularnog endotela i hiperkoagulabilnost. Parametri koji se koriste za procjenu hemostaze, tijek i progresiju bolesti su PV, fibrinogen, razgradni produkti fibrinogena, broj trombocita, koncentracija proteina C. Kao najpouzdaniji marker pokazala se koncentracija D-dimera. Rizični faktori za nastanak CAC i kardiovaskularnih bolesti su genske predispozicije kao što su polimorfizmi gena ITGB3 PIA1/PIA2 i  $\beta$ -Fbg, te prisutnost hipertenzije i dijabetes. Komplikacije koje su često prisutne su mikro- i makrotromboza, diseminirana intravaskularna koagulacija, miokarditis, aritmije i zatajenje srca. U antikoagulantnoj terapiji najbolji se pokazao niskomolekularni heparin, dok direktne oralne antikoagulanse i inhibitore agregacije trombocita treba koristiti s oprezom zbog brojnih interakcija, ponajprije s antivirusicima. Također, preporuča se koristiti nafamostat, ako je moguće u kombinaciji s heparinom. Pojavom cjepiva protiv SARS-CoV-2 i njegovom širokom primjenom, uočene su brojne nuspojave kao i nastanak autoimunih bolesti, poput stečene autoimune deficijencije FXIII.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 29 stranica, 2 grafička prikaza i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: SARS-CoV-2, COVID-19, koagulacija, koagulopatija, vaskularna, thrombosis.

Mentor: **Izv. prof. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Komentor: **Dr. sc. Manuela Miletić**, *specijalist medicinske biokemije, Dom zdravlja Zagrebačke županije, Velika Gorica*

Ocjenjivači: **Izv. prof. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Najda Rudman**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Manuela Miletić**, *specijalist medicinske biokemije, Dom zdravlja Zagrebačke županije, Velika Gorica*

Rad prihvaćen: rujan, 2023 .

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Biochemistry and Molecular  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia  
ili druga adresa

Diploma thesis

### Procoagulant and thrombogenic conditions in COVID-19 infection

Jelena Knezović

#### SUMMARY

At the end of 2019, a new SARS-CoV-2 virus appeared in the Chinese province of Wuhan, and the World Health Organization soon declared it a pandemic. The disease caused by the corona virus, COVID-19, can manifest itself with mild flu-like symptoms or more severe ones that can lead to death. The main way the virus enters the host cell is through the ACE2 receptor, which is expressed on alveolar epithelial cells, the heart, kidneys, lungs, etc. Coagulopathy caused by COVID-19 (CAC) is a life-threatening condition in which the immune system, vascular endothelium dysfunction and hypercoagulability are involved. The parameters used to assess hemostasis and the course and progression of the disease are PV, fibrinogen, fibrinogen degradation products, platelet count, protein C concentration, and D-dimer concentration proved to be the most reliable marker. Risk factors for CAC and cardiovascular diseases are genetic predispositions such as ITGB3 PIA1/PIA2 and  $\beta$ -Fbg gene polymorphisms, as well as the presence of hypertension and diabetes. Complications that are often present are micro- and macrothrombosis, disseminated intravascular coagulation, myocarditis, arrhythmias and heart failure. In anticoagulant therapy, low-molecular-weight heparin proved to be the best, while direct oral anticoagulants and platelet aggregation inhibitors should be used with caution due to numerous interactions, primarily with antivirals. Also, it is recommended to use nafamostat, if possible in combination with heparin. With the advent of the vaccine against SARS-CoV-2 and its widespread use, numerous side effects and the emergence of autoimmune diseases have been observed, such as autoimmune-acquired factor XIII deficiency.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 29 pages, 2 figures and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, coagulation, coagulopathy, vascular, thrombosis.

Mentor: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Manuela Miletić, Ph.D.**, *European Specialist in Laboratory Medicine*, Zagreb County Health Center Velika Gorica

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Dr. sc. Najda Rudman**, *Postdoctoral researcher* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Manuela Miletić, Ph.D.**, *European Specialist in Laboratory Medicine*, Zagreb County Health Center Velika Gorica

The thesis was accepted: September, 2023.

