



UNIVERZITET U NOVOM SAD

MEDICINSKI FAKULTET



Specifičnosti hemostaznog mehanizma kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Biljana Vučković

Kandidat:

dr Igor Spasić

Novi Sad, 2022. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Игор Спасић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	др сци. мед. Биљана Вучковић, ванредни професор Катедра за патолошку физиологију и лабораторијску медицину Медицински факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Специфичности хемостазног механизма код оболелих од SARS-CoV-2 вирусне инфекције
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 104 Поглавља 7 Референци 141 Табела 8 Слика 5 Графикона 5 Прилога 0
Научна област:	Медицинске науке
Ужа научна област (научна дисциплина):	Патолошка физиологија, хемостаза
Кључне речи / предметна	COVID-19; SARS-CoV-2; хемостаза; коагулација крви; фибринолиза; тромбоза; тромбоемболија; плућна емболија; процена ризика;

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

одредница:	морталитет; исход лечења
Резиме на језику рада:	<p>Увод: Оболђење Covid-19, изазвано корона вирусом тешког акутног респираторног синдрома 2 (SARS-CoV-2) у 2020. и 2021. години наметнуло се као значајан узрок морбидитета и морталитета у свету. Већ на самом почетку пандемије уочен је значајан број случајева инфекције који су били праћени поремећајима функционалности хемостазног механизма, који се огледао у изразито повишеном нивоу стимулације тромбинске активности, манифестованим у виду дисеминоване интраваскуларне коагулације као и развојем артеријских и венских тромбоза различитих локализација. Прецизан механизам развоја коагулопатија при инфекцији SARS-CoV-2 вирусном инфекцијом није у потпуности разјашњен . Укљученост све три компоненте Вирхивљеве тријаде у садејству са инфламаторним променама насталим као последица инфекције али и самог имунског одговора организма моћу је објашњење патофизиолошког механизма коагулопатије.</p> <p>Материјал и методе: Испитивање је конципирано као у виду проспективне студије током чије израде је извршено регрутовање 60 пацијената са RT-PCR потврђеном инфекцијом SARS-CoV-2, хоспитализованих иницијално у COVID јединицама Клиничког центра Војводине, изузимајући пацијенте који су се налазили у јединицама интензивне неге. За потребе истраживања кориштени су основни анамнестички подаци као и подаци лабораторијских анализа узорака пацијената добијених флеботомијом и анализирањем узорака пуне гепаринизоване крви као и анализом EDTA крви и цитратне плазме. Одређивање параметара крвне слике, укључујући одређивање броја тромбоцита и тромбоцитних индекса извршено је на аутоматизованом хематолошком бројачу. Испитивање функционалности примарне хемостазе, поред одређивања броја тромбоцита и тромбоцитних индекса, обухватило је агрегометријска мерења методом импредансне агрегометрије одређивањем TRAP теста као показатеља базалне функционалности тромбоцита из узорка пуне крви са литијум-хепарином као антикоагулансом. Процена коагулационог механизма извршена је одређивањем активисаног парцијалног тромбопласминског времена (аРТТ), протромбинског времена (РТ), фибриногена и д-димера из узорака цитратне плазме на аутоматизованим коагулометрима. Еуглобулинско време лизе коагулума као тест процене функционалности фибринолизног механизма је одређивано методом према Макфарлану и Пилингуиз узорака цитратне плазме. За унос и обраду података коришћен је програм SPSS, верзија 24.0. У оквиру компаративне статистике у циљу одређивања ратлика између испитиваних група коришћен је Студентов т-тест за независне узорке, или одговарајућа непараметријска замена Ман-Витнијев тест. Како би се утврдила повезаност између различитих посматраних клиничких параметара примењен је Спирманов коефицијент ранг корелације и Пирсонов коефицијент линеарне корелације ако су у питању континуиране варијавле са нормалном дистрибуцијом. За процену утицаја појединачних испитиваних параметара на ризик од настанка</p>

смртног исхода или тромбозних компликација коришћена је некондиционална логистичка регресија.

Резултати: У групи испитаника је било 36 мушкараца (60%) и 24 жене (40%) испитаника. Просечна старост износила је 65 година, приликом чега је најмлађи испитаник имао 32 године, док је најстарији имао 96 година. Од укупног броја испитаника, код четири (6,7%) је дијагностикована тромбоза дубоких вена или плућна тромбоемболија док је смртни исход наступио код 12 пацијената што износи 20% укупног броја испитаника. Груписањем испитаника у погледу исхода лечења уочена су 44 позитивна исхода (73,3%). док је негативан исход, који обухвата тромбоемболијске компликације и смртни исход био присутан код 16 испитаника (26,7%). Испитивање статистичке значајности разлика у параметрима примарне хемостазе, коагулационог и фибринолизног механизма показало је постојање статистички значајне разлике ($p < 0,001$) за све испитиване параметре поредећи групу испитаника са негативним исходом, као и поредећи групу испитаника са смртним исходом са групом испитаника са позитивним исходом. Применом некондиционалне логистичке регресије извршена је процена релативног ризика за настанак негативног исхода код пацијената у односу на појединачне лабораторијске параметре хемостазног механизма испитиване у тренутку пријема на болничко лечење. Како сви примењивани тесови за процену примарне хемостазе, коагулационог и фибринолизног механизма имају униформне референтне опсеге који су једнаки за оба пола, логистичка регресија прилагођена је за године испитаника. Резултати процене ризика за настанак негативног исхода болести у односу на испитиване појединачне параметре примарне хемостазе показали су да испитивани параметри имају утицај на пораст ризика на негативан исход при чему њихов појединачни утицај износи 7%. Некондиционална логистика регресија примењена је и на параметре коагулационог механизма чији резултати су указали на благ утицај сваког од испитиваних параметара. Тест еуглобулинског времена лизе коагулума којим је вршена процена функционалности фибринолизног механизма, тестиран некондиционалном логистичком регресијом показао је благ утицај (OR 1.084 95%CI 1.023-1.160) овог параметра на исход самог обољења. Мултиваријантни регресиони модел показао је да, узимајући у обзир допринос сваког појединачног измереног параметра примарне хемостазе, коагулационог и фибринолизног механизма, њихову међусобну интеракцију и ефекат на исход обољења еуглобулинско време лизе коагулума се издвојило као статистички сигнификантан предиктор исхода, са статистичком значајношћу на нивоу $p < 0.001$.

Закључак: Резултати ове студије још једном су показали значај фибринолизног механизма у регулацији целокупног хемостазног механизма и показали потенцијалну корист од одређивања еуглобулинског времена лизе коагулума као показатеља глобалне процене фибринолизног механизма код особа оболелих од SARS-CoV-2 вирусне инфекције у тренутку пријема на болничко лечење код којих је

	дошло до развоја тромбозних компликација и негативног исхода.
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	22.11.2021.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OR CENTER

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Igor Spasic: MD
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof. Biljana Vuckovic: MD, Ph D
Thesis title:	Specific characteristics of hemostatic mechanism in patients with SARS-CoV-2 viral infection
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages 104 Chapters 7 References 141 Tables 8 Illustrations 5 Graphs 5 Appendices 0
Scientific field:	Medical sciences
Scientific subfield (scientific discipline):	Pathophysiology, hemostasis
Subject, Key words:	COVID-19; SARS-CoV-2; Hemostasis; Blood Coagulation; Fibrinolysis; Thrombosis; Thromboembolism; Pulmonary Embolism; Risk Assessment; Mortality; Treatment Outcome

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

Abstract in English language:

Introduction: Covid-19, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 2020 and 2021, has emerged as a significant cause of morbidity and mortality worldwide. At the very beginning of the pandemic, a significant number of cases of infection were observed, which were accompanied by dysfunctions of the hemostatic mechanism, which was reflected in markedly elevated levels of thrombin activity, manifested as disseminated intravascular coagulation and development of arterial and venous thrombosis. The exact mechanism of coagulopathy development in SARS-CoV-2 virus infection has not been fully elucidated. The involvement of all three components of the Virchow' triad in cooperation with inflammatory changes caused by infection, but also by the immune response of the organism itself, may be an explanation of the pathophysiological mechanism of coagulopathy.

Material and methods: The study was conducted as a prospective study during which 60 patients with RT-PCR confirmed SARS-CoV-2 infection were recruited, initially hospitalized in COVID units of the Clinical Center of Vojvodina, except for patients who were in intensive care units. For the purposes of the research, the basic anamnestic data and laboratory data of patient samples obtained by phlebotomy and analysis of whole heparinized blood as well as EDTA and citrate plasma were used. Determination of blood count parameters, including determination of platelet count and platelet indices, was performed on an automated hematology analyzer. Examination of the functionality of primary hemostasis, in addition to determining the number of platelets and platelet indices, included aggregometric measurements by the method of impedance aggregometry by determining the TRAP test as an indicator of basal platelet function from a whole blood sample with lithium heparin as an anticoagulant. Evaluation of coagulation mechanism was performed by determination of activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), fibrinogen and d-dimer from citrate plasma samples on automated coagulometers. Euglobulin clot lysis time as an assessment of the functionality of the fibrinolytic mechanism was determined by the method according to McFarlane and Peeling from citrate plasma samples SPSS program, version 24.0, was used for data entry and processing. In order to determine the correlation between the different observed clinical parameters, Spearman 's correlation rank coefficient and Pearson' s coefficient of linear correlation were applied in the case of continuous variables with normal distribution. Non - conditional logistic regression was used to assess the influence of individual examined parameters on the risk of death or thrombotic complications.

Results: In the group of respondents there were 36 male (60%) and 24 female (40%). The average age was 65, during which the youngest respondent was 32 years old, while the oldest was 96 years old. Of the total number of subjects, four (6.7%) were diagnosed with deep vein thrombosis or pulmonary thromboembolism, while death occurred in 12 patients, which is 20% of the total number of subjects. By grouping the respondents in terms of treatment outcomes, 44 positive outcomes were observed (73.3%). while a negative outcome, which includes thromboembolic complications and

	<p>death, was present in 16 subjects (26.7%). Examination of statistical significance of differences in the parameters of primary hemostasis, coagulation and fibrinolytic mechanism showed the existence of statistically significant differences ($p < 0.001$) for all examined parameters comparing the group of subjects with negative outcome and the group of subjects with fatal outcome with the group of subjects with positive outcome. Using non - conditional logistic regression, the assessment of the relative risk for the occurrence of a negative outcome in patients in relation to individual laboratory parameters of the hemostatic mechanism examined at the time of admission to hospital treatment was performed. As all applied tests for the assessment of primary hemostasis, coagulation and fibrinolytic mechanism have uniform reference ranges that are equal for both sexes, logistic regression was adjusted for the age of the subjects. The results of the risk assessment for the occurrence of a negative outcome of the disease in relation to the examined individual parameters of primary hemostasis showed that the examined parameters have an impact on the increase in risk of a negative outcome with their individual impact of 7%. Non-conventional regression logistics was also applied to the parameters of the coagulation mechanism, the results of which indicated a slight influence of each of the examined parameters. The euglobulin clot lysis time, which assessed the functionality of the fibrinolytic mechanism, tested by non-conditional logistic regression, showed a mild effect (OR 1,084 95% CI 1,023-1,160) of this parameter on the outcome of the disease. Multivariate regression model showed that, taking into account the contribution of each individual measured parameter of primary hemostasis, coagulation and fibrinolytic mechanism, their interaction and effect on disease outcome, euglobulin clot lysis time was isolated as a statistically significant predictor of outcome $p < 0.001$.</p> <p>Conclusion: The results of this study once again showed the importance of the fibrinolytic mechanism in the regulation of the overall hemostatic mechanism and showed the potential benefit of determining the euglobulin clot lysis time as an indicator of global assessment of fibrinolytic mechanism in persons with SARS-CoV-2 viral infection at hospital admission. in whom thrombotic complications and a negative outcome have developed.</p>
Accepted on Scientific Board on:	22.11.2021.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	

Contents

1. Uvod	1
1.1. Hemostazni mehanizam	1
1.2. Primarna hemostaza	2
1.3. Koagulacija	5
1.4. Regulatorni mehanizmi inicijacije i koagulacije	10
1.5. Fibrinolizni mehanizam	12
1.5.1. Činioci fibrinoliznog mehanizma	13
1.5.1.1. Plasminogen.....	13
1.5.1.2. Plazmin	15
1.5.1.3. Tkivni aktivator plazminogena (t-PA)	15
1.5.1.4. Urokinaza-mokraćni aktivator plazminogena (u-PA)	16
1.5.1.5. α 2-antiplazmin-inhibitor plazmina (PI).....	17
1.5.1.6. Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1)	18
1.5.1.7. Inhibitor aktivatora plazminogena 2 (PAI-2).....	19
1.5.1.8. Trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor (TAFI)	19
1.5.1.9. Dodatni fibrinolizni inhibitori	20
1.5.2. Fiziologija regulatornih mehanizama fibrinoliznog sistema	21
1.6. Tromboza	25
1.6.1. Klinički značaj venskog tromboembolizma	27
1.7. SARS-CoV-2 virusna infekcija	30
1.7.1. Struktura virusa	31
1.7.2. Replikacioni ciklus virusa	33
1.7.3. Patogeneza interakcije virusa sa humoralnim i celularnim imunim odgovorom domaćina ...	35
1.7.3.1. Urođeni imunski odgovor.....	36
1.7.3.2. Stečeni imunski odgovor	38
1.8. Spona imunskog odgovora i koagulationog mehanizma u SARS-CoV-2 virusnoj infekciji	39
1.8.1. Inteleukin-6 (IL-6)	40
1.9. Patogeneza tromboznih komplikacija u sklopu infekcije SARS-CoV-2 virusom	42
1.9.1. Virusom potaknuta endotelna disfunkcija	42
1.9.2. Inflamacija	43
1.9.3. Hipoksija, hiperkoagulabilnost i viskoznost	43
1.9.4. Antifosfolipidna antitela	44

1.9.5.	<i>Uloga trombocita</i>	44
1.9.6.	<i>Fibrinolizni mehanizam i Covid-19</i>	46
1.9.7.	<i>Venska staza pri SARS-CoV-2 virusnoj infekciji</i>	48
2.	Radna hipoteza i cilj istraživanja	49
3.	Materijal i metode istraživanja	51
3.1.	Način izbora, veličina i konstrukcija uzoraka	53
4.	Rezultati ispitivanja.....	56
4.1.	Selekcija ispitanika	56
4.2.	Osnovne karakteristike ispitanika	58
5.	Diskusija	77
6.	Zaključak	91
7.	Literatura:	92

Lista skraćenica

TF – tkivni faktor

GP – glikoprotein

vWF – fon Vilebrandov faktor

TXA2 – tromboksan A2

PC – protein C

TFPI – inhibitor puta tkivnog faktora

AT – antitrombin

ADP – adenzin difosfat

COAT – kolagenom i trombinom stimulisani trombociti

TAFI – trombinom aktivisani fibrinolizni inhibitor

HC II – heparin kofaktor 2

EPCR – endotelni protein C receptor

aPC – aktivisani protein C

PS – protein S

PC – protein C

α2AP – alfa-2-antiplaznim

t-PA – tkivni aktivator plazminogena

u-PA – urokinaza-mokraćni aktivator plazminogena

PI - α 2-antiplazmin-inhibitor plazmina

PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena 1

IL-1 – interleukin-1

TNF – faktor tumorske nekroze

TNF- α – faktor tumorske nekroze alfa

TNF- β - transformišući faktor β

PAI-2 - Inhibitor aktivatora plazminogena 2

DVT – tromboza dubokih vena

PTE – plućna tromboembolija

PTS – posttrombotski sindrom

BMI – body mass index

SARS-CoV-2 – korona virus teških akutnog respiratornog sindroma 2

SARS – teški akutni respiratorni sindrom

ACE 2 – angiotenzin konvertujući enzim 2

RBD- receptor vezujući domen

Mpro – main proteaza

NK-ćelije – prirodne ćelije ubice

IFN – interferon

ARDS – akutni respiratorni distres sindrom

TLR – toll-like receptor

PAMP – pathogen-associated molecular pattern

PRR – pattern recognition receptors

IRF – interferon regulatorni faktor

DĆ – dendritične ćelije

APĆ – antigen prezentujuće ćelije

IL-1 β – interleukin 1-beta

IL-6 – interleukin-6

Th1- T-helper tip 1

PAF – trombocit aktivirajući faktor

RAAS – sistem renin-angiotenzinogen-aldosteron

PGI₂ – prostaglandin I₂

NO – azot monoksid

aPTT – aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme

PT- protrombinsko vreme

ECLT – euglobulin clot lysis time

EVLK – euglobulinsko vreme lize koaguluma

RT-PCR – real time polymerase chain reaction

PLT – broj trombocita

PDW – raspon distribucije trombocita

MPV – srednji volumen trombocita

P-LCR – procenat velikih trombocita u odnosu na celokupnu populaciju trombocita u krvotoku

PCT – trombocitokrit

TRAP – trombin receptor aktivirajući peptid

INR – internacionalni normalizovani odnos

1. Uvod

1.1. Hemostazni mehanizam

Hemostazni sistem učestvuje u održavanju homeostaze organizma svojim brojnim ulogama, od kojih su najznačajnije zaustavljanje krvarenja iz oštećenog ili povređenog krvnog suda, što predstavlja fiziološki proces koji se naziva hemostaza, sprečavanje zaživotnog intravaskularnog i intrakardijalnog formiranja tromba kao i održavanje krvi u tečnom stanju. Hemostazni mehanizam je takođe u značajnoj meri uključen u fiziološke ali i patofiziološke mehanizme zapaljenskog procesa, proces zarastanja rana kao i proces reprodukcije.

Sama funkcionalnost hemostaznog mehanizma uslovljena je skladnim dejstvom njegovih integralnih komponenti koje moraju funkcionisati u savršenom sinergizmu kako bi se ostvarila fiziološka uloga hemostaze i sprečio razvoj patofizioloških mehanizama uslovljenih narušenom funkcionalnošću hemostaznog mehanizma i njegovih pojedinih komponenti koji za posledicu mogu imati razvoj tromboze ili krvarenja.

Osnovne komponente hemostaznog sistema su krvni sudovi, trombociti i plazmatski proteini koji se u zavisnosti od svoje osnovne uloge u hemostaznom mehanizmu mogu podeliti na činioce koagulacije, činioce fibrinolize i inhibitore koagulacije i fibrinolize. Samo fiziološko delovanje ovih komponenti može se posmatrati kroz tri faze hemostaznog mehanizma: fazu primarne hemostaze, koagulacije i fibrinolize. Svaka od ovih faza hemostaznog mehanizma njegov je integralni deo i samo apsolutno sadejstvo ovih faza, kao i činilaca koji su njihove

sastavne komponente omogućava apsolutnu homeostazu, dok svako narušavanje ovog delikatnog balansa ima za posledicu razvoj određenog patofiziološkog poremećaja i posledične patologije (1).

1.2. Primarna hemostaza

Ključni koncept koji prožima paradigmu „ćelijama posredovane hemostaze“ jeste da ćelije igraju presudnu aktivnu ulogu u regulaciji i lokalizaciji koagulacije. Pod pojmom primarne hemostaze podrazumevamo sadejstvo nekoliko konstituenata: zida krvnog suda, trombocita i adhezivnih proteina čija je primarna fiziološka uloga formiranje belog, trombocitima bogatog tromba, na mestu oštećenja krvnog suda. Mnoge ćelije organizma mogu učestvovati u procesu hemostaze i tromboze, međutim dva ključna igrača svakako jesu trombociti i endotelne ćelije krvnih sudova. Lokalizovanje generisanja trombina ključno je u sprečavanju formiranja krvnog ugruška na mestima gde bi se njegovo prisustvo smatralo štetnim, a ne protektivnim. Trombociti ne samo da obezbeđuju površinu na kojima će se odvijati prokoagulantne aktivnosti, već direktno usmeravaju stepen i mesto produkcije trombina, specifično adherirajući za mesto povrede. Epitelne ćelije, s druge strane, poseduju nekoliko mehanizama koji su aktivno antitrombotični, sprečavajući propagaciju zgrušavanja sa mesta povrede u udaljene delove vaskularnog sistema. Izostanak ćelijske regulacije ili lokalizovanja ovog procesa dovodi do narušavanja fiziološkog mehanizma primarne hemostaze (2–4).

Ipak, za proces primarne hemostaze postoji nekoliko ključnih uloga epitelnih ćelija. One, pored toga što predstavljaju mehaničku barijeru koja efikasno razdvaja različite činioce

hemostaznog mehanizma i subendotelne strukture, čija aktivnost je neophodna za odvijanje procesa primarne hemostaze, imaju i vodeću ulogu u aktivaciji primarne hemostaze, nastale kao posledica oštećenja samih epitelnih ćelija, prvenstveno jer su odgovorne za produkciju mnoštva faktora kako koagulacije tako i fibrinolize.

Fiziološka svrha primarne hemostaze jeste formiranje tromba na mestu oštećenja ili rupture zida krvnog suda. Ovaj proces biva inicijalizovan onog momenta kada ćelije nosioci tkivnog faktora (TF) postanu izložene krvi na mestu povrede. TF je strukturno sličan citokinskim receptorima, dok nije uočena strukturna sličnost sa ostalim faktorima koagulacije. Ova činjenica naglašava blisku evolutivnu i fiziološku vezu između hemostaznog mehanizma i komponenti odbrane organizma. TF je transmembranski protein koji eksprimuju epitelne ćelije, ćelije miokarda, cerebralnog korteksa kao i kapsule vezivnog tkiva koje okružuju različite organe. On fiziološki nije eksprimovan od strane ćelija koje su u direktnom kontaktu sa krvnom strujom i njenim komponentama ali jeste od strane ćelija koje okružuju krvne sudove (u mikrovaskulaturi to su miofibroblastima slične ćelije (periciti), kao i određeni broj još uvek nedovoljno ispitanih ćelija adventicije velikih arterija i vena) (5).

Nakon oštećenja krvnog suda dolazi do pojave vazokonstrikcije čija je osnovna uloga usporavanje toka krvi i njenog gubitka iz povređenog krvnog suda. Sam nastanak vazokonstrikcije posledica je oslobađanja supstanci sintetisanih od strane aktivisanih trombocita. Trombociti su bezjedarne ćelije porekla megakariocita čiji se životni vek u perifernoj cirkulaciji procenjuje na 7-10 dana. U krvotoku one cirkulišu kao neadhezivne ćelije diskoidnog oblika. Trombociti učestvuju u primarnoj hemostazi kroz različite mehanizme koji podrazumevaju adheziju, agregaciju, sekreciju, retrakciju ugruška, a istovremeno predstavljaju i

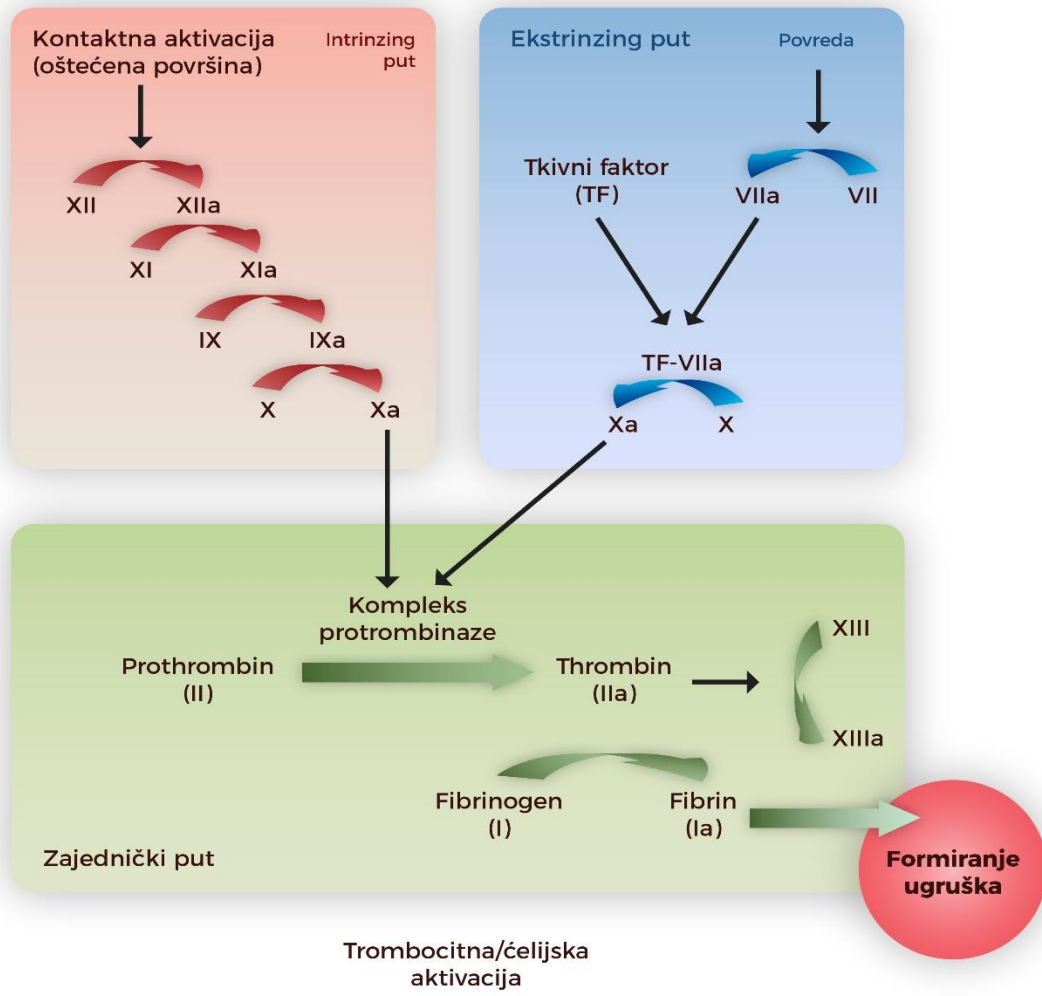
površinu na kojoj se formiraju makromolekulski enzimski kompleksi koagulacije. Oštećenjem krvnog suda započinje inicijalna faza aktivacije trombocita-adhezija koja za posledicu ima formiranje jednoslojnog ćelijskog pokrova koji oblaže ogoljenu površinu endotela krvnog suda. Jednom aktivirani prolaze kroz proces diskretnih transformacija. Sam intenzitet aktivacije trombocita zavisan je kako od vrste stimulansa koji do aktivacije dovodi, tako i od informacija dostupnih na interaktivnim domenima kompleksa celularnog matriksa. Tako aktivacija lamininom dovodi do minimalne aktivacije i pojave isključivo fokalne adhezije, aktivacija fibronektinom dovodi do kompletne aktivacije trombocita, dok će aktivacija prostaglandinima dovesti do aktivacije trombocita praćene formiranjem agregata i pražnjenjem intracelularnih granula trombocita (6). Adhezija trombocita podrazumeva njihovo direktno vezivanje za ogoljeni subendotelni kolagen pomoću njihovih kolagenskih receptora, glikoprotein (GP) Ia/IIa i GPVI, posredstvom von Willebrandovog faktora (vWF) koji služi kao most između trombocita i subendotelnog kolagena. Inicijalna adhezija trombocita ima za posledicu aktivaciju trombocita, koja rezultira promenom njihovog oblika kao i sekrecijom iz dva tipa granula prisutnih u njima. Alfa granule sadrže proteine kao što su faktor V, trombocitni faktor IV, fibrinogen i vWF, dok guste granule sadrže neproteinske komponente, kao što su epinefrin, serotonin, adenin nukleotid, neorganski fosfat i kalcijum. Aktivacija trombocita takođe doprinosi vazokonstrukciji, oslobađanjem tromboksana A₂ (TXA₂), najpotentnijeg aktivatora trombocita.

Kompletna aktivacija trombocita dovodi do konformacione promene GPIIb/IIIa receptora na površini aktivisanih trombocita čime oni prelaze u svoju aktivnu formu, sposobnu da veže fibrinogen i samim tim dovede do agregacije trombocita.

Zahvaljujući sekreciji faktora V, fibrinogena i polifosfata trombociti obezbeđuju fosfolipidnu površinu neophodnu za formiranje makromolekulskih enzimskih kompleksa, značajno ubrzavajući formiranje trombina. Kontraktilni proteini trombocita dovode do retrakcije formiranog ugruška i jedan su od najranijih koraka u procesu zarastanja rane.(6–9)

1.3. Koagulacija

Šezdesetih godina prošlog veka grupe istraživača predstavile su kaskadni model koagulationog mehanizma koji se sastojao od niza proteolitičkih etapa. Aktivacija jednog faktora koagulacije vodila je do proteolitičke aktivacije sledećeg, konačno dovodeći do generisanja dovoljne količine trombina. Tada je smatrano da svaki aktivisani faktor ima proteolitičku aktivnost. Danas je pak dokazano da se ključne komponente koagulatione kaskade sastoje od proteaze u kompleksu sa neenzimskim kofaktorom. Dok je primarni koncept koagulatione kaskade opisivao isključivo unutrašnji (intrinzing) put, kasnije je koncept evoluirao u šemu Y oblika sa odvojenim intrinzing i spoljašnjim (ekstrinzing) putem, koji se susreću na nivou FXa/FVa (kompleks Xa), od koga počinje zajednički put koagulacije. Spoljašnji put koagulacije, poznat i kao put tkivnog faktora, biva inicijalizovan oslobađanjem TF. Unutrašnji put koagulacije, koji se naziva još i put kontaktne aktivacije, inicijalizovan je aktivacijom kontaktnih faktora plazme. Zajednički put nastaje kao posledica spajanja ova dva puta i uključuje finalni korak pre formiranja krvnog ugruška (6,10) (slika 1.).



Slika 1. Shema koagulacione kaskade

Koagulacija je kompleksan biološki proces koji podrazumeva prevođenje solubilnog molekula fibrinogena u nesolubilni fibrin. *In vivo* proces koagulacije prolazi kroz faze inicijacije, amplifikacije i propagacije.

TF prisutan u zidovima krvnih sudova vezan je za FVII čak i u odsustvu povrede. Jednom vezan za TF, zimogen FVII biva brzo aktiviran procesom autoaktivacije ili kao posledica prisustva niskih koncentracija aktivisanog faktora X (FXa), aktivisanog faktora IX (FIXa) i prethodno aktivisanog FVIIa čime započinje inicijacija koagulacionog procesa. FVIIa/TF kompleks katalizuje aktivaciju niskih koncentracija FX i FIX. Novonastalo generisanje niskih koncentracija aktivisanih faktora koagulacije govori u prilog tome da proces koagulacije može biti brzo aktiviran kada povreda omogući ulazak krvi u ekstravaskularni prostor. Formirani FX na površini ćelija koje imaju sposobnost sekrecije TF stupa u interakciju sa svojim kofaktorom FVa kako bi formirao kompleks Xa i generisao niske početne koncentracije trombina na površini ćelija nosilaca tkivnog faktora. Generisanje trombina tokom procesa inicijacije predominantno je potpomognuto oslobađanjem FV od strane trombocita koji adheriraju na mesto povrede krvnog suda. Trombociti su odgovorni za oslobađanje posebnog oblika FV koji su preuzeli iz plazmatskog pula i aktivirali u aktivni prokoagulant rezistentan na inaktivaciono dejstvo proteina C (PC). Dakle, saradnja između ćelija nosilaca tkivnog faktora i prvopristiglih trombocita dovodi do generisanja niske koncentracije trombina, koja je kritična za nastavak procesa koagulacije i prelazak u fazu amplifikacije (11–15).

FXa i FIXa, formirani na površini ćelija koje su nosioci TF, imaju različite funkcije u procesu koagulacije. Dejstvo FXa, formiranog od strane kompleksa FVIIa/TF, ograničeno je na površinu ćelija nosilaca tkivnog faktora, jer FXa disocijacijom sa ćelijske površine biva brzo inhibisan

deјstvom inhibitora puta tkivnog faktora (TFPI) ili antitrombina (AT) u tečnoј fazi. Nasuprot tome, FIXa ima mogućnost difuzije kroz tečnu fazu jer nije inhibisan od strane TFPI, dok je inhibicija od strane AT daleko sporija u poređenju sa FXa. FIXa koji dosegne površinu aktivisanih trombocita ima mogućnost vezivanja za specifične receptore i time učestvuje u generisanju trombina na površini trombocita tokom faze propagacije (16).

Vezivanje trombocita za mesto povrede dovodi do delimične aktivacije trombocita. Aktivacija je najverovatnije podstaknuta vezivanjem za kolagen ekscelularnog matriksa. Aktivacija trombocita dovodi do oslobađanja adenozin difosfata (ADP) iz gustih granula, čime se potencira dalja aktivacija dodatnog broja trombocita. Trombin je takođe potentan aktivator trombocita posredstvom određenih receptora. Simultano dejstvo kolagena i trombina na receptore trombocita dovodi trombocite u visoko prokoagulantno stanje (kolagenom i trombinom stimulisani trombociti (COAT)). Pretpostavka je da je najveća prokoagulantna aktivnost prisutna upravo na trombocitima koji su prvi prispeli na mesto povrede. Aktivisani trombociti inicijalno obezbeđuju površinu za povratnu aktivaciju FV, FVIII i FXI od strane trombina i amplifikaciju prokoagulantnog stimulusa. Iako niske koncentracije trombina generisanog u inicijalnoj fazi nisu dovoljne da prevedu fibrinogen u fibrin, one su odgovorne za kasniju izraženu aktivaciju trombinske aktivnosti uslovljene potpunom aktivacijom trombocita, aktivacijom FV, FVIII i njegovom disocijacijom od vWF kao i aktivacijom FX (17–20).

Jednom kada su trombociti aktivisani, kofaktori FVa i FVIIIa brzo se orijentišu ka površini trombocita. FIXa aktivisan od strane kompleksa FVIIa/TF ima mogućnost kretanja kroz tečnu fazu i takođe se vezuje za površinu aktivisanih trombocita. FXI aktivisan primarnom količinom generisanog trombina tokom faze inicijacije ima mogućnost aktivacije dodatne količine FIX čime

vrši suplementaciju inicijalne količine FIXa generisanog kompleksom FVIIa/TF. Jednom uspostavljena specijalna konfiguracija FIXa i FVIIIa na površini aktivisanih trombocita, dovodi do toga da FX prisutan u plazmi biva preveden u svoju aktivnu formu FXa na površini trombocita.

Daljim vezivanjem FXa sa FVa generiše se dovoljna količina trombina neophodna za produkciju stabilnog fibrinskog ugruška, koji pak stabilizuje primarni beli tromb bogat trombocitima. Još jedan od načina na koji trombin utiče na stabilizaciju fibrinskog ugruška jeste i aktivacijom FXIII koji dovodi do međusobnog ukrštanja fibrinskih monomera ali i aktivacijom trombinom aktivisanog fibrinoliznog inhibitora (TAFI) koji snižava aktivaciju plazmina u fibrinskom ugrušku.

Ćelijski model koagulacije pokazuje da spoljašnji i unutrašnji put nisu dva zasebna procesa, već dobro integrisane etape koagulacionog mehanizma koje se neprestano prepliću i nadopunjuju čineći jedinstven mehanizam. Uprošćeno, spoljašnji put možemo posmatrati kao sadejstvo kompleksa FVIIa/TF i kompleksa FXa/Va dok se unutrašnji put sastoji od dejstva FXIa sa kompleksima FVIIIa/FIXa i FXa/FVa. Spoljašnji put svoje dejstvo ispoljava prevashodno na ćelijama koje su nosioci tkivnog faktora, dovodeći do inicijacije, dok unutrašnji put svoje dejstvo usmerava na površinu aktivisanih trombocita u cilju produkcije velike količine trombina, što dalje vodi do formiranja i stabilizacije fibrinskog ugruška (21–23).

Generisanje fibrina kontrolisano je nekolicinom mehanizama koji uključuju određen broj različitih inhibitora i puteva, gde spadaju kontrola inicijacije, inhibicija pojedinih aktivisanih faktora koagulacije antitrombinom kao i kontrola kofaktorske funkcije faktora V i faktora VIII posredstvom puta proteina C.

1.4. Regulatorni mehanizmi inicijacije i koagulacije

Faza inicijacije je kontrolisana od strane TFPI koji inhibiše kako faktor Xa tako i kompleks TF/FVIIa-fosfolipidi mehanizmom koji se odvija u dva koraka. Prvo se TFPI vezuje za FXa, inhibišući njegovu aktivnost. Potom se kompleks TFPI/FXa vezuje za TF/FVIIa, putem posebnog dela TFPI molekula. Na ovaj način dolazi do potpunog gašenja faze inicijacije i samo ukoliko su prisutne dovoljne količine FX koje bi nadvladale ovaj inhibitorni mehanizam proces može da produži u fazu koagulacije. Antikoagulantno dejstvo proteina S (PS) je nedavno otkriveno kao komponenta puta proteina C, čime je dokazano da PS potencira efekat TFPI pospešujući formiranje kompleksa TFPI/FXa (24).

Jednom kada je faza koagulacije inicirana, različite enzimske reakcije, mahom potencirane dejstvom serin proteaza, dovode do kaskadne aktivacije faktora koagulacije u cilju generisanja trombina. One su pak podređene kontroli od strane inhibitora serin proteaza koji se jednim imenom nazivaju serpini, od kojih je svakako najznačajniji antitrombin (AT). Serpini se prvenstveno vezuju za ciljni enzim, formirajući kovalentni kompleks, čime se proteaza ireverzibilno prevodi u inaktivisano stanje. AT prevashodno inhibiše trombin, FXa i FIXa, a njegovo dejstvo zavisno je od kofaktora heparina, od kojih je *in vivo* svakako jedan od najbitnijih heparan sulfat, prisutan na površini endotelnih ćelija. Interakcija AT i heparan sulfata lokalizuje aktivnost AT isključivo na prostor krvnog suda. Usled toga, tokom oštećenja krvnog suda, izostaje formiranje ovog kompleksa, što omogućava trombinu da izbegne ovu kontrolnu tačku i dovede do akceleracije faze koagulacije. Jednom kada se nađe u krvnom ugrušku, trombin je zaštićen od inhibitornog dejstva AT. S druge strane, serpin po imenu heparin kofaktor II (HC II)

ima mogućnost da ispolji inhibitorno dejstvo na trombin, nezavisno od toga da li je on u cirkulaciji ili vezan u krvnom ugrušku. Gotovo četvrtina inhibicije trombina odvija se putem HC II. Međutim, iako je nedostatak AT predstavlja trombofiliju i snažno je povezan sa nastankom tromboze, to nije slučaj sa HC II deficitom (25). Kritični kompleks FIXa/FVIIIa kao i kompleks FX/FVa sa jonima kalcijuma, koji dovode do generisanja FXa i protrombina, imaju nekoliko zajedničkih karakteristika. Oba bivaju formirani kalcijum zavisnim mehanizmom organizacije kompleksa faktora koagulacije na površini fosfolipida. Takođe, oba kompleksa zahtevaju prisustvo kofaktora neophodnih za odvijanje enzimske reakcije i to u dovoljnoj količini kako bi aktivacija enzima prevazišla kontrolne mehanizme usmerene prema njima. FVIII nakon aktivacije prelazi u FVIIIa i predstavlja kofaktor neophodan za aktivaciju FX. Sa druge strane, FV, nakon konverzije u FVa, sličnim mehanizmom dovodi do formiranja trombina. Funkcija FVa i FVIIIa regulisana je od strane puta proteina C.

Aktivacija PC generisana je kompleksom trombin/trombomodulin. Trombomodulin je protein prisutan na površini endotela. Ceo proces je posredovan vezivanjem proteina C za endotelni PC receptor (EPCR), koji omogućava prezentovanje PC kompleksu trombin/trombomodulin. Jednom kada se nađe u kompleksu sa trombomodulinom, protrombin gubi svoja prokoagulantna svojstva i preuzima antikoagulantnu ulogu aktivacijom PC. Nakon toga, aktivisani protein C (aPC) procesom proteolitičke degradacije FVa i FVIIIa u prisustvu kalcijuma, fosfolipida ali i svog kofaktora proteina S atenuiše produkciju trombina (26).

1.5. Fibrinolizni mehanizam

Fibrinolizni mehanizam predstavlja integralni deo hemostaznog mehanizma čija je osnovna regulatorna uloga enzimska degradacija fibrinskog ugruška, kako onog formiranog intravaskularno, omogućavajući rekanalizaciju okludiranog krvnog suda, tako i istaloženog fibrina u ekstravaskularnim tkivima. Ova funkcija zavisna je od lokalne aktivacije plazminogena i njegovog prevođenja u aktivni oblik koji se naziva plazmin. Hemostazni mehanizam je fino podešen, kako bi omogućio zaceljivanje vaskularne lezije, bez da kompromituje ranu stabilnost hemostatskog ugruška i ograničio fibrinolitičku aktivnost isključivo na mesto povrede. Hemostazni mehanizam se konstantno nalazi u stanju dinamičkog ekvilibrijuma koji postoji između koagulantne i fibrinolizne aktivnosti, kao i između različitih proteolitičkih i inhibitornih proteina koji su sastavni deo ovih mehanizama.

Ipak, ulogu fibrinoliznog mehanizma nije moguće svesti samo na ovu funkciju jer je brojnim istraživanjima ustanovljena njegova upletenost u različite fiziološke mehanizme i procese, gde pre svega mislimo na obnavljanje oštećenog tkiva, uticaj na funkcionalnost makrofaga, ovulaciju ali i malignu alteraciju.

Kada procesi depozicije fibrina i njegovog uklanjanja funkcionišu skladno i adekvatno su regulisani oni izvršavaju svoju homeostaznu ulogu, međutim, svaki disbalans njihovog delikatnog odnosa dovodi do patofizioloških posledica koje se manifestuju tendencijom ka krvarenju ili tromboziranju. Zbog toga hemostazni mehanizam bi trebalo posmatrati kao niz uzajamnih procesa čija je osnovna uloga da u pravom momentu ostvare svoju funkciju

formiranja tromba, kada je to svrsishodno, i njegovu razgradnju, kada njegovo postojanje više ne predstavlja poželjno fiziološko stanje, a u cilju održavanja krvi u tečnom stanju. Intravaskularna depozicija fibrina takođe je povezana sa razvojem ateroskleroze, što upućuje na to da efikasan fibrinolizni mehanizam teži da zaštiti organizam od aterosklerotskih promena, kao i od akutnog procesa tromboze.

1.5.1. Činioci fibrinoliznog mehanizma

Molekulski mehanizmi koji koordinišu formiranje fibrina i fibrinolizu, struktura i funkcija svih važnih fibrinoliznih proteina, gde spadaju serin proteze, njihovi inhibitori, aktivatori i receptori, danas je dobro poznata (Slika 2.). Poznavanje ovih struktura i njihove funkcije daje uvid u važnost samog fibrinoliznog mehanizma, omogućava bolje poznavanje patofizioloških mehanizama koji dovode do njegove disfunkcije, dok trasira put ka pronalaženju novih terapijskih modaliteta usmerenih prema patološkim stanjima koja ova disfunkcija izaziva.

1.5.1.1. Plasminogen

Plazminogen je glikoprotein molekulske mase 92-kDa prisutan u plazmi. Kao jednolančani molekul predstavlja klasičan zimogen koji odvajanjem jedne peptidne veze prelazi u svoj aktivni oblik plazmin. Molekul plazminogena sastoji se iz 791 aminokiseline koje formiraju nekoliko blago savijenih domena. Posmatrano sa N-terminalnog kraja molekula razlikuju se aktivacioni peptid, „pan apple“ domen, kringle (pereca) 1-5 domeni i domen proteaze.

Kristalna struktura plazminogena ukazuje na prisustvo jona hlora koji u sadejstvu sa pan apple i serin proteaza domenom održavaju zimogen u svojoj neaktivnoj formi. Kringle domeni, posebno kringle 1, omogućavaju plazminogenu da se veže za ćelije i druge proteine, a pre svega za fibrin, alfa-2-antiplazmin(α 2AP) i TAFI što ima veliki značaj za aktivaciju molekula plazminogena. Sinteza plazminogena prevashodno se odvija u hepatocitima, a plazminogen spada i u reaktante akutne faze zapaljenja. Osim hepatocita, mogućnost sinteze plazminogena poseduju i brojne druge ćelije gde spadaju eozinofili, pojedine ćelije bubrega, kornee, mozga i srži nadbubrežne žlezde.

Sinteza plazminogena je pod kontrolom gena na dugom kraku hromozoma 6. Aktivatori konvertuju plazminogen u dvolančani molekul plazmina raskidajući Arg56-Val561 vezu na mestu spajanja teških i lakih lanaca (27–30).

Molekul plazminogena poseduje nekoliko varijanti koje se razlikuju u pogledu obima proteolize, stepena glikozilacije kao i genskog polimorfizma. Dve najzastupljenije varijante jesu Glu-plazminogen, koji na svom aminoterminalnom kraju sadrži aminokiselinu glutamin i predstavlja varijantu pune dužine, i Lys-plazminogen koji je procesuiran u različitom stepenu od strane plazmina prisutnog u tragovima. Ove dve forme značajno se razlikuju po efikasnosti njihove aktivacije. Glu- plazminogen je relativno zatvorena struktura, dok je Lys-plazminogen fleksibilniji i otvoren što omogućava da njegovo vezivanje za plazminogen aktivator bude deset puta efikasnije, kao i vezivanje za fibrin i receptore za plazminogen koje je daleko većeg afiniteta. Lys-plazminogen varijanta zahvaljujući ovim mehanizmima biva aktivirana daleko efikasnije od Glu varijante, pogotovo na fibrinu i površini različitih ćelija (31–33). Karboksiterminalni kraj molekula plazminogena predstavlja aktivni centar

sastavljen iz aminokiselina histidina, asparagina i serina. Na aktivni centar molekula plazminogena mogu delovati činioci prisutni u plazmi koji spadaju u unutrašnji put aktivacije, FXII, trombin, prekalikrein i kininogen. Činioci spoljašnjeg puta aktivacije plazminogena su aktivatori koji nisu prisutni u plazmi već se stvaraju u tkivima i endotelnim ćelijama od kojih su najvažniji tkivni i mokraćni aktivator plazminogena (31).

1.5.1.2. *Plazmin*

Plazmin je proteolizni enzim iz grupe serin proteaza, aktivni oblik plazminogena, molekulske težine 82 kDa, sastavljen iz teškog i lakog polipeptidnog lanca koji su međusobno povezani disulfidnom vezom. Svoje proteolitičko dejstvo ispoljava prvenstveno na molekulu fibrina, dovodeći do njegove razgradnje, a kao posledica ovog proces nastaju fragmenti koji se nazivaju fibrin degradacioni produkti (34).

1.5.1.3. Tkivni aktivator plazminogena (t-PA)

Tkivni aktivator plazminogena spada u grupu serin proteaza čija je molekulska težina 68-kDa (EC 3.4.21.68). Po svojoj strukturi je glikoprotein koji se sastoji od 527 aminokiselinskih ostataka. Njegovu sintezu kodira gen prisutan na kracima p12-p11 hromozoma 8. Sintetisani protein prisutan je u dve izoforme u organizmu u zavisnosti od prisustva serina i glicina na N-terminalnom delu molekula, pri čemu serin izoforma predstavlja predominantni oblik

enzima u organizmu. Primarni izvor t-PA u bazalnim uslovima jesu endotelne ćelije iz kojih se kontinuirano oslobađa. Sekundarni pul prisutan je u specijalizovanim vezikulama prisutnim u endotelnim, neuroendokrinim i adrenalnim hromatofilnim ćelijama, odakle se oslobađanje odigrava kao posledica ekstracelularnih stimulusa. Supstance koje se mogu pojaviti kao ekstracelularni stimulusi, izazivajući oslobađanje t-PA iz vezikula, jesu bradikinin, acetilholin, endotelin, tkivna acidoza i brojni drugi. U ekstracelularnoj tečnosti gotovo svi molekuli t-PA nalaze se u kompleksu sa inhibitorom aktivatora plazminogena 1 (PAI-1). Osnovna uloga ovog enzima je u aktivaciji plazminogena, u prisustvu fibrina koji je obligatorni kofaktor prevođenju plazminogena u plazmin, čime sprečava nastanak i širenje intravaskularne koagulacije (35–38).

1.5.1.4. Urokinaza-mokraćni aktivator plazminogena (u-PA)

Urokinaza je serin proteaza (EC 3.4.2.73) čija je sinteza kodirana od strane gena prisutnog na hromozomu 10q24. Za sintezu enzima odgovorne su epitelne ćelije, monociti, makrofagi ali i ćelije koje su po svojoj morfologiji slične fibroblastima. Najviše koncentracije enzima prisutne su u urinu, kao posledica sinteze od strane ćelija bubrežnog epitela, dok se u plazmi nalazi u niskim koncentracijama. Urokinaza vrši aktivaciju plazminogena cepanjem veze Arg561-Val562, na identičan način kao i t-PA, ali za razliku od njega ne zahteva prisustvo fibrina kao kofaktora kako bi izvršila svoju enzimsku funkciju. Upravo ova činjenica dovela je do zaključka da tPA prvenstveno ima ulogu u fibrinolitičkim procesima koji se odigravaju u vaskularnom odeljku, dok uPA primarnu ulogu ima u degradaciji ekstracelularnog matriksa,

zaceľjivanja rana, inflamaciji, embriogenezi kao i invaziji tumorskih ćelija i metastaza. Ipak uloge koje poseduje van fibrinoliznog mehanizma ne umanjuju njen značaj prilikom degradacije fibrina (39–42).

1.5.1.5. α 2-antiplazmin-inhibitor plazmina (PI)

α 2-antiplazmin predstavlja brzodelujući inhibitor plazmina sastavljen iz 452 aminokiselinske sekvence koje čine jednolančanu molekulsku strukturu težine 70-kDa. Gen odgovoran za sintezu PI lokalizovan je na hromozomu 17p13. Primarno mesto sinteze je u jetri usled čega su prisutne niske koncentracije kod pacijenata sa jetrenom insuficijencijom. Poluvreme eliminacije iznosi prosečno 3 dana za razliku od plazmina čiji je poluživot svega 12 časova.

Funkcija α 2-antiplazmina ogleda se u formiranju kompleksa sa molekulom plazmina čime vrši njegovu inhibiciju. Ovaj proces odvija se u dva koraka. Prvi podrazumeva formiranje kompleksa sa plazminom vezanim za fibrin uz pomoć nekovalentnih veza. Drugi je ireverzibilno vezivanje serina plazmina sa aktivnim mestom α 2-antiplazmina. U ovom procesu i sam antiplazmin biva delimično razgrađen plazminom. Vezivanje plazminogena za fibrin, α 2-antiplazmin sprečava putem kompetitivne inhibicije za zajednička receptorska mesta (43,44).

1.5.1.6. *Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1)*

Inhibitor aktivatora plazminogena 1 je glikoprotein izgrađen iz 379 aminokiselinskih rezidua, molekulske težine 52-kDa, sastavljen iz jednog polipeptidnog lanca sa reaktivnom peptidnom vezom na mestu Arg345-Met346 čija je sinteza kodirana genom na hromozomu 7.

PAI-1 predstavlja jedan od najvažnijih fizioloških inhibitora t-PA i u-PA, formiranjem kompleksa sa odgovarajućim aktivatorom u plazmi u odnosu 1:1. Takođe, PAI-1 zajedno sa TAFI predstavlja glavni inhibitor plazmina u trombu.

Sama sinteza ovog serpina dokazana je u brojnim ćelijskim kulturama uključujući hepatocite, trombocite, megakariocite, adipocite kao i miocite glatkih mišića i epitelne ćelije. Stimulacija sinteze odigrava se posredstvom brojnih stimulusa gde spadaju trombin, deksametazon, interleukin-1 (IL-1), faktor tumorske nekroze (TNF), transformišući faktor β (TNF- β) i drugi. Uočeno je postojanje aktivne forme ovog serpina kao i posebne latentne forme koja nastaje kao posledica spontane insercije aktivnog centra enzima u unutrašnjost polipeptidne strukture. Koncentracija PAI-1 u plazmi je izuzetno varijabilna kod svakog pojedinca i može se kretati u rasponu od 1-40 ng/ml. Istraživanja još uvek nisu sa sigurnošću utvrdila koje ćelije predstavljaju primarni izvor PAI-1 u plazmi. Dokazano je da normalan epitel i hepatociti ne ekspimiraju PAI-1, što dalje upućuje na zaključak da bi izvor mogli biti adipociti. Međutim alfa granule trombocita predstavljaju signifikantan rezervoar ovog

serpina u plazmi i odgovorne su za sintezu gotovo polovine njegove ukupne koncentracije u plazmi, s tim da je ustanovljeno da je ovaj oblik manje aktivan u odnosu na ostatak plazmatskog PAI-1. Visoke koncentracije ovog oblika detektovane su u trombima što direktno korelira sa mogućnošću lize samog tromba, zahvaljujući inhibiciji t-PA i u-PA. Ustanovljen je i porast ekspresije ovog enzima od strane hepatocita u akutnim inflamatornim stanjima (45–48).

1.5.1.7. Inhibitor aktivatora plazminogena 2 (PAI-2)

PAI-2 je primarno izolovan kao inhibitor urokinaze u placenti. Kasnija istraživanja su utvrdila da je on primarni inhibitor PA skvamoznih epitelnih ćelija epidermisa, ezofagusa, kornee, oralne mukoze jezika i vagine. Monociti takođe predstavljaju značajan izvor PAI-2.

Istraživanja su dokazala njegovu hemostaznu ulogu koju ostvaruje u toku trudnoće i porođaja. Uočen je porast koncentracije ovog serpina u plazmi tokom trudnoće i pad koji nastaje neposredno nakon porođaja (49).

1.5.1.8. Trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor (TAFI)

Generisanje c-terminalnih lizil rezidua je važan mehanizam vezivanja plazminogena za fibrin i dalje podsticanje fibrinoliznog mehanizma. Ove rezidue mogu biti uklonjene dejstvom

trombinom aktivišućeg fibrinoliznog inhibitora (TAFI) čime on učestvuje u regulaciji i inhibiciji fibrinoliznog mehanizma.

TAFI predstavlja metaloperksidazu (EC 3.4.17.20), jednolančani glikoprotein molekulske težin 60-kDa. Primarno mesto sinteze se nalazi u jetri. U obliku zimogena biva aktiviran posredstvom trombin/trombomodulin kompleksa i plazmina, u reakciji koja je posredovana prisustvom glikozaminoglikana. TAFI se smatra molekularnom vezom između koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma (50–52).

1.5.1.9. *Dodatni fibrinolizni inhibitori*

Pojedini činioci čija primarna uloga nije modeliranje funkcije fibrinoliznog sistema mogu imati određeni uticaj na njegovu funkcionalnost.

C1-inhibitor: visoko glikozilirani serpin molekulske težine 105-kDa sastavljen iz 478 aminokiselinskih rezidua čiju sintezu kodira gen lokalizovan na hromozomu 11q12-q13. Njegova fiziološka uloga jeste inhibicija aktivisanih subkomponenti komplekta C1r i C1s, kontaktnih proteaza, FXIIa, FXIa, kalikreina, tPA i uPA. U plazmi, u situacijama kada postoji povišena koncentracija tPA u odnosu na PAI-1 uočeno je formiranje kompleksa C1 inhibitora i tPA. Takođe je dokazano da prevenira nespecifičnu aktivaciju plazminogena od strane urokinaze (53,54).

α -2 makroglobulin: glikoprotein molekulske težine 72.5-kDa koji se sastoji iz 1451 aminokiselinske rezidue čiju sintezu kodiraju lokusi na hromozomu 12p13.3-12.3. U

organizmu poseduje funkciju inhibitora nekoliko različitih proteaza. U pogledu fibrinoliznog sistema njegova inhibitorna uloga dolazi do izražaja kada je sam fibrinolizni sistem aktiviran u svom punom obimu, a kapacitet α 2-antiplazmina u potpunosti iscrpljen. Takođe poseduje mogućnost formiranja kompleksa sa tPA i uPA (55,56).

Lipoprotein (a): ima mogućnost vezivanja za fibrin, ekstracelularni matriks različitih ćelija kao i za trombocite. Dokazan je antifibrinolitički efekat lipoproteina (a) koji nastaje kao posledica njegove kompeticije sa plazminogenom i tPA za vezujuća mesta na molekulu fibrina. Samim tim vezivanje plazminogena za molekul fibrina ali i površinu trombocita biva atenuisano od strane lipoproteina (a). Pored toga, ustanovljeno je da interferira sa samo-propagirajućom fazom aktivacije plazminogena sprečavajući plazminom posredovanu konverziju Glu-PLG u Lys-PLG formu (55,57).

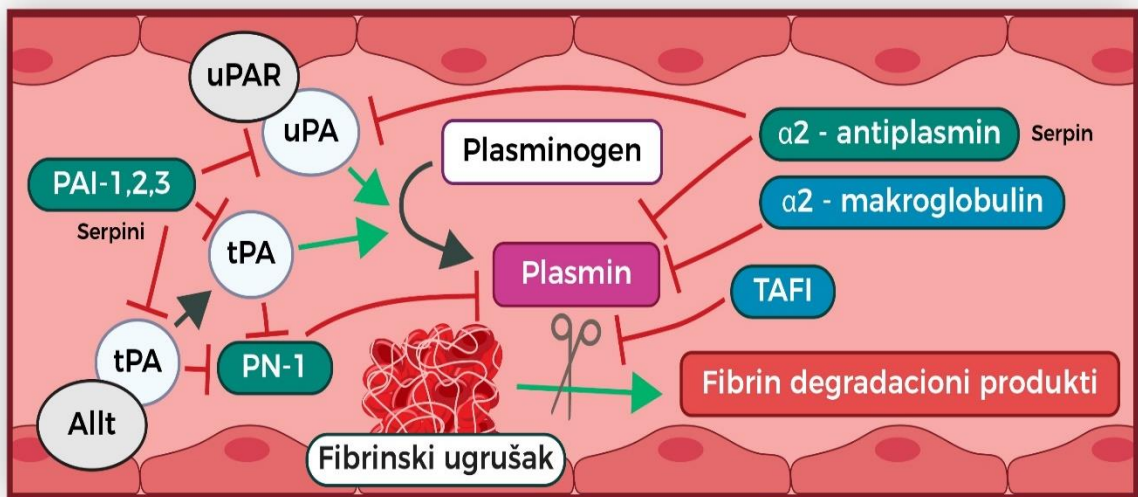
1.5.2. Fiziologija regulatornih mehanizama fibrinoliznog sistema

U fiziološkom, homeostaznom stanju organizma, koagulacija i fibrinoliza su precizno regulisane pristustvom brojnih supstrata, aktivatora, inhibitora, kofaktora i receptora. Molekularne veze uspostavljene između ovih sistema omogućavaju lokalizovano i pravovremeno uklanjanje akutno istaloženih fibrinskih depozita. Ovi koordinisani molekularni mehanizmi osiguravaju stalno stanje krvi u tečnom obliku, istovremeno sprečavajući njen gubitak iz vaskularnog prostora i organizma.

Aktivacija koagulacionog mehanizma dovodi do generisanja trombina, koji dovodi do konverzije fibrinogena u fibrin i aktivacije trombocita što rezultira formiranjem tromba.

Plazmin kao ključna proteaza fibrinoliznog mehanizma aktivira se iz zimogenog prekursora plazminogena posredstvom tkivnog plazminogen aktivatora i urokinaze. Mehanizmom pozitivne povratne sprege plazmin vrši konverziju tPA i uPA iz jednolančanog u dvolančani polipeptidni oblik. Fibrin, kao važan substrat plazmina, reguliše sopstvenu degradaciju vezivanjem plazminogena i tPA na svojoj površini, čime lokalizuje i pospešuje dalje generisanje plazmina. Iako je tPA slab aktivator plazminogena u odsustvu fibrina, njegova katalitička efikasnost biva gotovo duplirana u prisustvu fibrina. Jednom formirani plazmin dovodi do razgradnje molekula fibrina prilikom čega nastaju solubilni degradacioni produkti sa izloženim lizin reziduama na svom karboksilnom kraju. „Kringle“ 2 domen tPA i domeni 1 i 4 molekula plazminogena poseduju lizin-vezujuća mesta koja posreduju u daljem vezivanju za fibrin pojačavajući aktivaciju plazmina i uklanjanje fibrina. Ovo vezivanje može biti blokirano brojnim molekulima koji se ponašaju kao lizin-analozi od kojih svakako najzanimljiviji u etipatogenetskom smislu jeste trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor (TAFI) koji, jednom aktiviran od strane trombina, uklanja oslobođene lizin-rezidue čime atenuiše generisanje plazmina i dovodi do stabilizacije fibrinskog tromba i uspostavlja regulatornu komponentu između koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma. Takođe, različiti ćelijski tipovi pospešuju generaciju plazmina eksprimujući receptore na svojoj ćelijskoj površini. Endotelne ćelije, monociti, makrofagi, neutrofil i određene tumorske ćelije poseduju mogućnost vezivanja plazminogena, kao i tPA i uPA. Njihovi receptori lokalizuju fibrinoliznu aktivnost na ćelijsku površinu prilikom čega služe kao kofaktori u akutno prisutnom generisanju trombina i obezbeđuju specifičnu sredinu koja služi kao zaštita od cirkulišućih inhibitora (11,58).

Regulacija fibrinoliznog procesa odvija se i na nivou trombocita zahvaljujući sadržaju granula trombocita. Tako trombociti mogu vezivati i plazminogen i t-PA povećavajući na taj način stvaranje plazmina, ali mogu i ograničavati fibrinolizni proces putem sekrecije PAI-1 i inhibitora plazmina skladištenih u α -granulama (59).

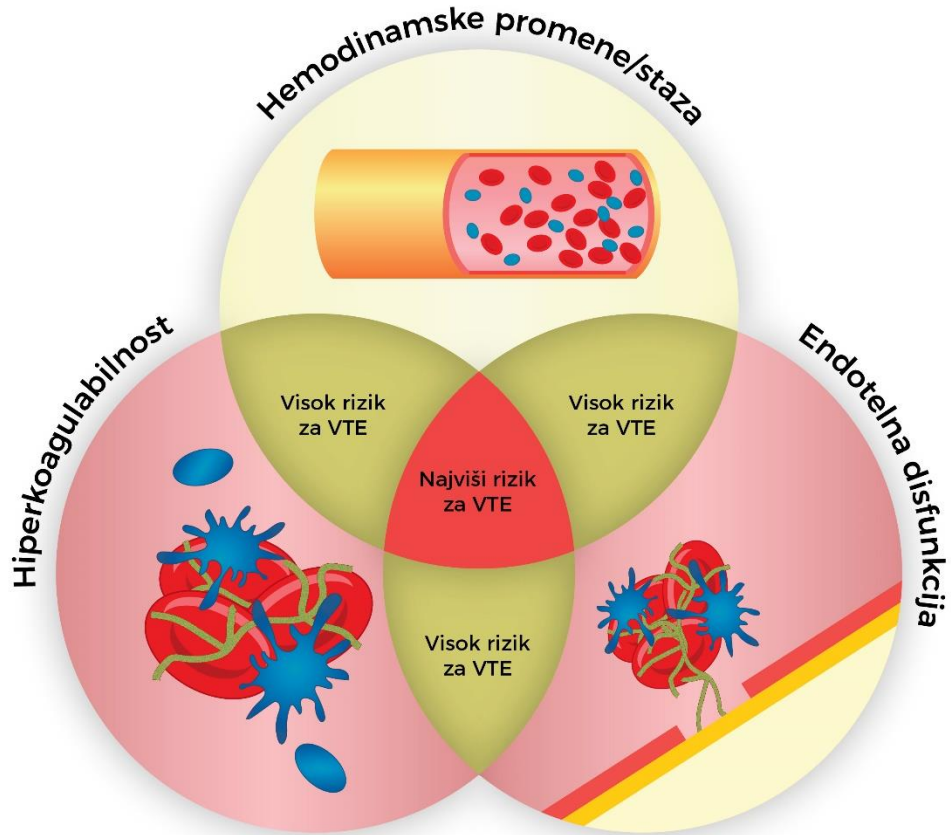


Slika 2. Činioci fibrinmoliznog mehanizma u svojoj fiziološkoj ulozi

1.6. Tromboza

Tromboza podrazumeva zaživotno intravaskularno ili intrakardijalno formiranje krvnog ugruška nastalo kao posledica poremećaja hemostaznog mehanizma, odnosno njegovih sastavnih činilaca - trombocita, faktora koagulacije, faktora fibrinolize i inhibitora koagulacije i fibrinolize. Tromboza se može razviti i u arterijskom i u venskom delu kardiovaskularnog sistema. Između arterijskih i venskih tromboza postoje razlike u etiopatogenezi, strukturi tromba i kliničkim manifestacijama koje izazivaju (3).

Osnovni patofiziološki mehanizam razvoja venske tromboze objašnjen je Virchow-ljevim trijasom čiji sastavni činoci podrazumevaju postojanje usporenog toka krvi i prestanak njenog laminarnog kretanja, promenu zida krvnog suda i promene u sastavu krvi (60) (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz Virchow-ljeve trijade

Najčešće kliničke manifestacije venske tromboze su tromboza dubokih vena (DVT) i plućna tromboembolija (PTE).

Incidenca venskog tromboembolizma u svetu je različita u različitim zemljama i na različitim kontinentima. U SAD incidenca iznosi 117/100 000, pri čemu je incidenca tromboze dubokih vena 48/100 000, a plućne tromboembolije 69/100 000, uz 250 000 novootkrivenih slučajeva godišnje (61), dok u Evropi incidenca tromboembolizma iznosi 160-180/100 000 (62). Uočeno je da incidenca raste eksponencijalno sa godinama života. Viša incidenca u ženskoj populaciji u toku reproduktivnog perioda pripisuje se dodatnim faktorima rizika kojima su žene izložene, gde se pre svega misli na trudnoću, puerperijum i primenu oralnih kontraceptiva. Takođe, treba istaći da je najviša incidenca uočena kod pacijenata sa malignitetima. Podaci ukazuju i da je smrtnost u prvih 30 dana od nastanka prve epizode venske tromboze veća kod pacijenata sa plućnom embolijom, nego kod pacijenata sa DVT (9.7% prema 4.6%), kao i kod pacijenata sa malignitetom u odnosu na pacijente bez maligniteta (19.1% prema 3.6%). Sa druge strane, jednogodišnja stopa mortaliteta, koja iznosi oko 20% približno je ista za TDV i za PE (63).

1.6.1. Klinički značaj venskog tromboembolizma

Klinički značaj venske tromboze ogleda se kako u samim kliničkim manifestacijama, DVT i PTE i riziku po zdravlje pacijenta do kojih ova stanja dovode, tako i u visokoj stopi recidiva koja je zastupljena kod pacijenata ali i komplikacijama koje se mogu javiti nakon prve epizode venskog tromboembolizma, opisanih skupom simptoma i znakova koji se zajednički nazivaju posttrombotski sindrom (PTS).

Istraživanja su pokazala da recidivi venskog tromboembolizma povećavaju stopu mortaliteta kod pacijenata koji dožive tromboembolijsku bolest, kao i razvoj PTS nakon pojave DVT. Uočeno je da je incidenca recidiva nakon inicijalne epizode venskog tromboembolizma izrazito visoka, a najveći rizik je uočen 6-12 meseci nakon prve epizode. Takođe, mogućnost recidiva ostaje na visokom nivou i do 10 godina nakon inicijalne epizode. Epidemiološki podaci ukazuju na incidencu recidiva nakon prve pojave epizode venskog tromboembolizma u sledećim procentima: nakon 7 dana 1.6%, 30 dana 5.2%, 180 dana 10.1%, 1 godine 12.9% i 10 godina čak 30.4%. (64) Ovakvi podaci ukazuju da u periodu od 10 godina nakon prve epizode venskog tromboembolizma trećina obolelih doživi recidiv oboljenja, što jasno ukazuje na njegov klinički značaj. Cilj antitrombozne terapije u sklopu akutnog VTE jeste da prevenira propagaciju tromba i embolizaciju. Trajanje antikoagulantne terapije je individualno za svakog pacijenta ali prosečno traje između tri i šest meseci. Nakon ovog vremena tromb je ili liziran ili organizovan i mala je mogućnost njegovog kretanja i embolizacije. Nakon ovog vremena, svaka dalja antitrombozna terapija ima za cilj prevenciju nastanka recidiva VTE, a primenjuje se kod pacijenata kod kojih je procenjeno da rizik od nastanka nove epizode venske tromboze prevazilazi rizik od nastanka komplikacija usled dugoročne primene antikoagulantne terapije. Trajanje primene terapije ne utiče na incidencu pojave recidiva nakon prestanka njene primene, što nas navodi na zaključak da VTE jeste zapravo hronična bolest sa epizodama rekurencije. Stopa recidiva raste sa porastom godina života obolelih, viša je kod pacijenata sa neurološkim oboljenjima kod kojih je prisutna paraliza donjih ekstremiteta, pacijenata sa malignitetom, a takođe je uočena povezanost stope recidiva sa body mass indeksom (BMI) pacijenata. Među pacijentima sa

malignom bolešću najviša incidenca recidiva javlja se kod karcinoma pluća, gastrointestinalnih i genitourinarnih maligniteta (65).

Posttrombotski sindrom predstavlja bitnu hroničnu sekvelu DVT koja se razvija kod 20-50% pacijenata sa DVT, čak i nakon adekvatne primene antitrombozne terapije. Klinički značaj ovog sindroma proističe iz kliničkih manifestacija i komplikacija koje se mogu javiti u vidu oskudnih ali i ozbiljnih simptoma i znakova u vidu neizdrživog bola, pojave edema i venskih ulkusa, što dodatno pogoršava kvalitet života obolelog. U simptome PTS koji su prisutni na donjim ekstremitetima spadaju osećaj težine ekstremiteta, bol, otok, osećaj svraba, pojava grčeva, osećaj žarenja. Klinički znaci koje objektivno možemo uočiti jesu edem, teleangiektazije, sekundarni varikoziteti vena, hiperpigmentacija i venski ekcem, crvenilo ili cijanoza, lipodermatoskleroza, zaceljeni ili otvoreni ulkus (66).

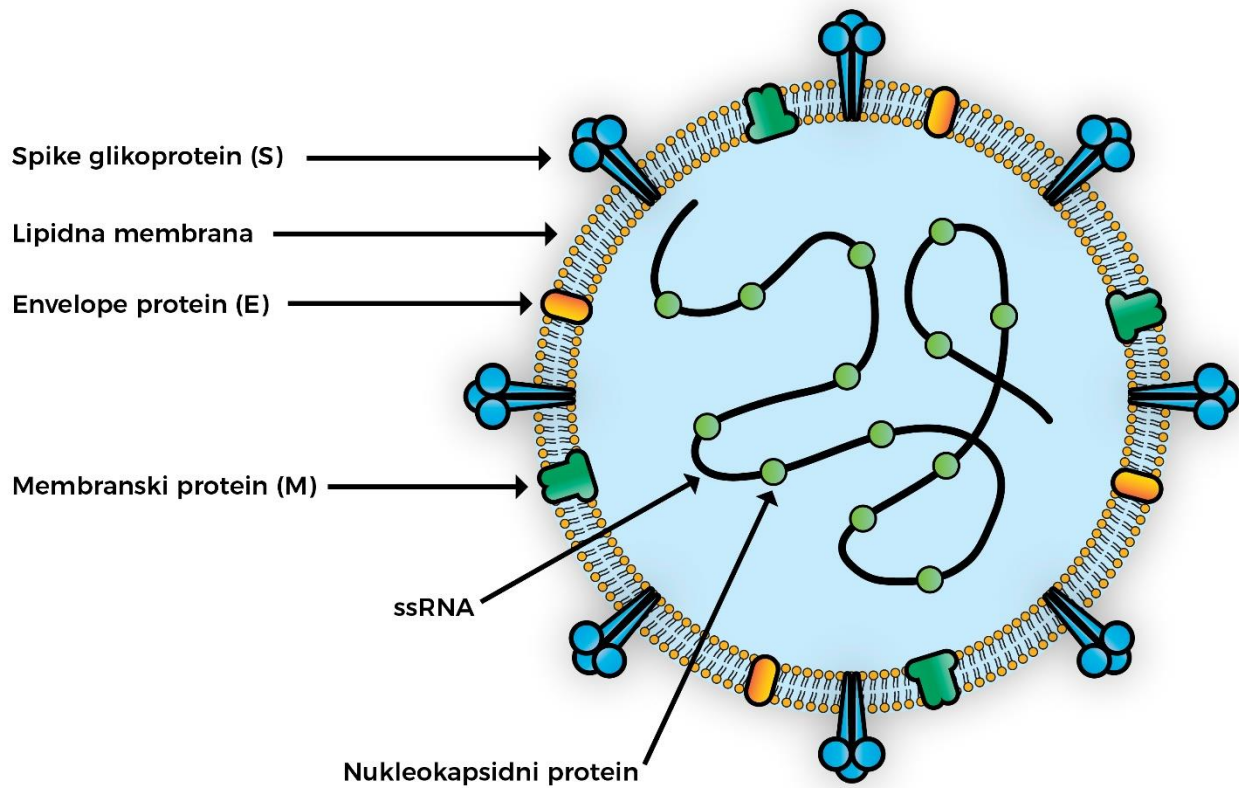
1.7. SARS-CoV-2 virusna infekcija

Oboljenje Covid-19, izazvano korona virusom teškog akutnog respiratornog sindroma 2 (SARS-CoV-2) u 2020. i 2021. godini nametnulo se kao značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta u svetu(67,68). Do 01.08.2021. je zabeleženo preko 196,5 miliona slučajeva infekcije ovim virusom, sa preko 4,2 miliona preminulih. Sredinom decembra 2019. godine zdravstvene vlasti provincije Wuhan u Kini detektovale su nekoliko slučajeva atipičnih pneumonija za koje se kasnije dokazalo da su uzrokovane novim korona virusom. Pretpostavlja se da se prenos virusa sa životinjskog rezervoara na čoveka odigrao početkom prve nedelje novembra 2019. godine (69). Iako još uvek nije utvrđeno koja životinja je intermedijarni rezervoar infekcije, dobro je poznato da su slepi miševi primarni rezervoar ovakvih tipova virusa (70). Ispitivanja koja su usledila utvrdila su da je uzročnik RNK virus koji pripada istoj porodici korona virusa koja je uzročnik pandemija teškog akutnog respiratornog sindroma (SARS) kao i respiratornog sindroma Bliskog istoka (MERS-CoV) 2003. i 2012. godine (71).

Porodica koronaviride je velika grupa virusa koja ima mogućnost inficiranja ljudi i životinja. Postoji sedam tipova humanih korona virusa koji su primarno respiratorni patogeni: 229E, NL63, OC43, KHU1, MERS-CoV, SARS-CoV i SARS-CoV-2. Poslednja tri svrstavaju se u genus beta korona virusa i sve ih karakteriše visoka stopa mutacija koja za posledicu ima visoku stopu genetskog diverziteta, plastičnost i adaptibilnost što im omogućava invaziju velikog broja različitih domaćina (72).

1.7.1. *Struktura virusa*

SARS-CoV-2 je sferičnog ili blago pleomorfnog viriona, diametra 60-140 nm, obavijenog omotačem (73). Virusna membrana poseduje omotač koji sadrži spike (S) glikoprotein koji formira peplomere na površini viriona dajući kruni-sličnu morfologiju uočljivu elektronskom mikroskopijom. Membranski glikoprotein (M) i „Envelope“ (E) protein daju strukturu prstena. U unutrašnjosti viriona prisutan je helikalni nukleokapsid izgrađen iz nukleokapsidnog (N) proteina koji formira kompleks sa jednolančanim RNK genomom dužine 30 kb (74). Genom virusa poseduje određene sličnosti sa genomima drugih virusa: sličnost sa korona virusom slepog miša (BatCoV RaTH13) iznosi 96%, sličnost sa SARS-CoV iznosi 80% dok je u slučaju MERS-CoV sličnost oko 50% (71). Jednolančani RNK genom sastavljen iz 30 000 baza poseduje 5' kapa strukturu i 3' poli A rep. Uočeno je 14 otvorenih okvira za čitanje (open reading frames-ORFs) koji kodiraju 29 proteina. 5' kraj sadrži ORF1ab, najveći gen koji kodira sintezu pp1ab proteina koji sadrži 15 različitih nestrukturnih proteina. 3' terminalni kraj genoma sadrži četiri strukturalna proteina: spike protein (S), protein omotača (E), membranski glikoprotein (M) i nukleokapsidni fosfoprotein (N) (71) (Slika 4.).



Slika 4. Struktura viriona SARS-CoV-2

1.7.2. Replikacioni ciklus virusa

Kao obligatorno intracelularni organizam, korona virus koristi resurse ćelije domaćina kako bi obezbedio sopstvenu replikaciju i širenje. S obzirom da interakcija između virusa i ćelija domaćina formira osnovu oboljenja, poznavanje ove interakcije je od velikog značaja, pogotovo kako bi se identifikovali adekvatni mehanizmi na koje bi delovala antiviralna terapija.

SARS-CoV-2 u ćeliju domaćina dospeva pomoću transmembranskog S glikoproteina koji formira homotrimere koji protrudiraju sa površine virusne partikule. S protein korona virusa sastoji se iz dve funkcionalne subjedinice; S1 subjedinica, na kojoj se nalazi domen za vezivanje receptora (RBD), odgovorna je za vezivanje za površinske receptore prisutne na površini ćelije domaćina, dok je S2 subjedinica odgovorna za fuziju virusne membrane i ćelijske membrane domaćina. Receptor vezujući domen virusa vezuje se direktno za peptidni domen angiotenzin konvertujućeg enzima 2 (ACE 2) koji takođe služi i kao celularni receptor za virusnu partikulu (75). RBD je najvarijabilniji deo SARS-CoV-2 genoma (71,76).

ACE 2 je membranski protein koji učestvuje u maturaciji angiotenzina. U respiratornom traktu rasprostranjen je u epitelnim ćelijama, alveocitima, traheji, bronhu i bronhijalnim seroznim žlezdama, alveolarnim monocitima i makrofagima. Nakon vezivanja RBD u S1 subjedinici za receptor ACE 2, S protein biva odstranjen dejstvom transmembranske serin proteaze 2 (TMPRSS2), dovodi do aktiviranja S2 domena i omogućava fuziju virusne membrane i membrane ćelije domaćina (77). Pretpostavka je da prodor SARS-CoV-2 u ćeliju, kao i SARS-CoV, teče kroz receptor posredovanu endocitozu gde fuzija virusa sa ćelijom dovodi do obmotavanja njegovog omotača membranama endozoma dovodeći do oslobađanja virusnog nukleokapsida u citosol inficirane ćelije. Nakon oslobađanja i odvijanja virusne RNK u citoplazmi replikacija virusa

započinje translacijom ORF1a i ORF1b i sintezom poliproteina pp1a i pp1ab kroz tzv. „frameshifting“ mehanizam. Posledično, poliproteini pp1a i pp1ab bivaju obrađeni od strane unutrašnje virusne proteaze, uključujući main proteazu (Mpro), potencijalni target antivirusnih lekova čija je kristalna struktura nedavno otkrivena (71,78). Sama replikacija virusne RNK odigrava se na virusno indukovanoj retikulovezikularnoj mreži membrane modifikovanog endoplazmatskog retikuluma. Formiranje viriona je osigurano akumulacijom RNK i strukturnih komponenti prilikom čega N protein sa njima formira strukturu oblika heliksa. Potom M protein lokalizovan na intracelularnoj membrani Goldžijevog intermedijernog kompartmana endoplazmatskog retikuluma stupa u interakciju sa proteinima S, E i N čime se omogućava vezivanje viriona. Nakon ovog procesa virion biva transportovan u vezikule i na kraju oslobođen egzocitozom (79–81).

1.7.3. Patogeneza interakcije virusa sa humoralnim i celularnim imunim odgovorom domaćina

Fiziološki imunski odgovor protiv većine virusnih parikula uključuje ranu fazu posredovanu komponentama nespecifičnog urođenog imunskog odgovora i, ukoliko je neophodno, kasnu fazu posredovanu daleko sofisticiranijim mehanizmima adaptivnog (stečenog) imuniteta koji bi trebalo da eliminiše patogen i generiše dugoročnu imunološku memoriju za datu antigensku strukturu. Nespecifični imunski odgovor podrazumeva produkciju tip I antiviralnih interferona (IFN), makrofaga, neutrofila koji dovode do proinflamatorne produkcije citokina kao i prirodnih ćelija ubica (NK-ćelija). S druge strane antiviralni specifični odgovor uključuje virusnim antigenim determinantama uzrokovanu aktivaciju CD8+ citotoksičnih T limfocita i Th1 subklase CD4+ pomoćničkih limfocita koji dovode do odgovora protiv virusne partikule i drugih intracelularnih patogena, aktivaciju specifičnih plazma ćelija koje poseduju sposobnost sinteze antitela i konačno produkciju memorijskih T i B ćelija. Imunski odgovor na SARS-CoV-2 može dovesti do brzog, interferonom, posredovanog odgovora koji dovodi do brzog klirensa virusne partikule iz organizma i do aktivacije antivirusnih limfocita sa posledičnom pojavom memorijskih ćelija. S druge strane, zakasnela aktivacija urođenog imuniteta smatra se odgovornom za teške kliničke oblike infekcije praćene pneumonijom, akutnim respiratornim distres sindromom (ARDS), septičnim šokom, multiorganskim otkazivanjem, koagulopatijom praćenom tromboznim komplikacijama i konačno smrću. U ovom slučaju se pretpostavlja da neadekvatan odgovor na dejstvo interferona dovodi do neefikasnog uklanjanja virusnih parikula od strane alveolarnih makrofaga što predstavlja dobru podlogu za ubzanu replikaciju virusa, dovodeći do razvoja težih kliničkih slika ali i povećane transmisibilnosti virusa s jedinke

na jedinku. Uočeno je da kod pacijenata koji poseduju oslabljen ili na neki drugi način disregulisan imunski odgovor, kao što su starije osobe sa komorbiditetima, češće se ispoljava teški oblik COVID-19 infekcije (79,81,82).

1.7.3.1. Urođeni imunski odgovor

Nakon ulaska virusa u ćeliju domaćina njegove antigenske determinante bivaju prepoznate od strane obrazac prepoznajućih receptora (Pattern recognition receptors-PRR), koji prepoznaju patogen-asocirane molekulske obrasce (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs) kao što su Toll-like receptori (TLR), TLR7 i TLR8 u slučaju jednolančanih RNK virusa, RIG-I-like (RLR) i NLR koje eksprimiraju epitelne ćelije kao i lokalno prisutne ćelije urođenog imuniteta kao što su alveolarni makrofagi (83). PAMPs su antigenske strukture grupno prisutne na različitim patogenima prepoznate od strane PRR koji su nastali tokom evolucije nespecifičnog imuniteta čovekovog organizma.

Vezivanjem liganda za PRR potencira se sinteza proteina koji aktiviraju transkripciju različitih faktora, kao što su interferon regulatorni faktor (IRF), NF- κ B i AP-1, što dalje rezultira produkcijom tip-I i III antiviralnih interferona i različitih hemokina (84). Upravo ovi hemokini dovode do daljeg privlačenja ćelija urođenog imunskog odgovora na mesto kontakta sa patogenom, pre svega polimorfonukleara, monocita, NK-ćelija, dendritičnih ćelija (DĆ) koje i same vrše produkciju hemokina sposobnih za regrutaciju i aktivaciju limfocita koji će konačno izvršiti prepoznavanje obrađenog i prezentovanog antigena od strane antigen prezentujućih ćelija (APĆ), u prvom redu makrofaga i dendritičnih ćelija (85).

Nedavna istraživanja pokazala su da inicijalne faze SARS-CoV-2 infekcije u poređenju sa SARS-CoV mogu podjednako da inficiraju tip-I i tip-II pneumocita i alveolarne makrofage. S druge strane SARS-CoV je pokazao sposobnost da indukuje ekspresiju IFN-I, IFN-II i IFN-III dok to nije bio slučaj sa SARS-CoV-2 koji je takođe bio manje efikasan u indukciji drugih citokina. Dokazano je da u odnosu na druge korona viruse SARS-CoV-2 karakteriše snižen odgovor IFN-I i IFN-II odgovor ali i signifikantna profukcija proinflamatornih hemokina IL-1B, IL-6, TNF i IL1RA. Ovi podaci su kasnije i potvrđeni detekcijom povišenih koncentracija ovih molekula u plazmi obolelih od COVID-19. Ovakvi podaci samim tim pokazuju da SARS-CoV-2 ostvaruje drugačiju interakciju sa nespecifičnim imunitetom domaćina u odnosu na druge korona viruse što se ogleda u njegovoj daleko većoj mogućnosti replikacije u plućnom tkivu, izbegavanju antiviralnog dejstva IFN-I i II, aktivaciji nespecifičnog imuniteta i izazivanju produkcije visokih vrednosti citokina neophodnih za dalju aktivaciju specifičnog imunskog odgovora (86).

1.7.3.2. *Stečeni imunski odgovor*

Interakcija između različitih komponenti nespecifičnog i specifičnog imunskog odgovora upravo je ključni momenat u daljoj progresiji SARS-CoV-2 virusne infekcije. Nedovoljno razjašnjeni patofiziološki mehanizmi odgovorni su za kretanje imunskog odgovora u jednom od dva pravaca koji podrazumevaju ili razvoj protektivnog i svrsishodnog imunskog odgovora organizma domaćina ili pak egzacerbacije preterano snažnog imunskog odgovora (87,88).

Protektivni odgovor je zavisn od posredstva T-limfocita gde CD4 subpopulacija u sadejstvu sa B-limfocitima podstiče produkciju specifičnih neutrališućih antitela dok sa CD8 citotoksičnim limfocitima dovodi do liziranja inficirane ćelije. S druge strane, disfunkcionalan imunski odgovor koji nije u mogućnosti da izvrši inhibiciju replikacije virusne partikule i eliminaciju inficirane ćelije može za posledicu imati upravo egzacerbaciju inflamatornog odgovora sa posledičnim razvojem citokinske oluje koja se klinički manifestuje akutnim respiratornim distres sindromom ili diseminovanom intravaskularnom koagulacijom. Istraživanje na modelu primata sprovedeno od strane Clay i saradnika (89) pokazalo je da se virusna replikacija u plućima odigrava do 10. dana od infekcije. Međutim, zapaljenske promene uočene u plućnom parenhimu postaju intenzivnije nakon klirensa samog virusa i dostižu pik 14. dana održavajući se sve do 28. dana. Ovi rezultati govore u prilog tome da je rana faza inflamacije zavisna od virusa dok su kasnije faze nezavisne od njegovog prisustva, imunski posredovane i upravo praćene egzacerbacijom inflamatornih komponenti.

1.8. Spona imunskog odgovora i koagulacionog mehanizma u SARS-CoV-2 virusnoj infekciji

Već na samom početku pandemije uočen je značajan broj slučajeva infekcije koji su bili praćeni poremećajima funkcionalnosti hemostaznog mehanizma, koji se ogledao u izrazito povišenom nivou stimulacije trombinske aktivnosti, manifestovanim u vidu diseminovane intravaskularne koagulacije kao i razvojem arterijskih i venskih tromboza različitih lokalizacija. Iako podaci o incidenciji ovih komplikacija nisu još uvek konzistentni uočena je ozbiljnost ovih komplikacija kao i njihov uticaj na konačan ishod bolesti.

Precizan patofiziološki mehanizam razvoja koagulopatije pri infekciji SARS-CoV-2 virusom nije u potpunosti razjašnjen. Uključenost sve tri komponente Virhovljeve trijade u sadejstvu sa inflamatornim promenama nastalim kao posledica infekcije ali i samog imunskog odgovora organizma, kako celularnog tako i humoralnog dela, moguće je objašnjenje patofiziološkog mehanizma koagulopatije.

Naime uočeno je da prisustvo povišenih koncentracija proinflamatornih citokina i hemokina, a pre svega faktora tumorske nekroze alfa (TNF- α), interleukina 1-beta (IL-1 β), interleukina-6 (IL-6) kao i monocitnog hemoatraktantnog proteina 1.

1.8.1. *Inteleukin-6 (IL-6)*

Interleukin-6 je pleotropni citokin sintetisan od strane velikog broja ćelija imunskog sistema, mastocita, tkivnih makrofaga, dendritskih ćelija, T i B limfocita, kao i ćelija koje nisu deo imunskog sistema. Prethodna istraživanja pokazala su da disbalans u sintezi IL-6 u toku virusnih infekcija ima značajan uticaj na klirens virusa iz organizma, perzistiranje, širenje virusa kroz organizam kao i održavanje hronične virusne infekcije. Postoje dokazi da IL-6 učestvuje u kritičnim celularnim dešavanjima kao što su proliferacija, diferencijacija, preživljavanje i pokretljivost samih ćelija. U tom pogledu IL-6 poseduje dvojaku ulogu sa mogućnošću aktivacije i regulacije kako inflamatornog, tako i antiinflamatornog odgovora, direktno modelirajući funkciju nespecifične imunske odbrane organizma, celularnog i humoralnog imuniteta. U pogledu celularnog imuniteta odgovoran je za produkciju antimikrobnih peptida (AMP), stimulaciju diferencijacije monocita u makrofage, maturaciju dendritskih ćelija, kao i stimulaciju produkcije reaktanata akutne faze. Sam patogen svojim ulaskom u organizam domaćina biva detektovan od strane imunskog sistema prepoznavanjem PAMP pomoću PRR prisutnih na različitim ćelijama organizma. U slučaju virusnih infekcija kao što je SARS-CoV-2 ovi receptori omogućavaju vezivanje za PAMP što predstavlja transkripcioni signal koji omogućava sintezu IL-6 i drugih inflamatornih citokina (90).

Kada govorimo o stečenom imunskom odgovoru IL-6 takođe poseduje mnoštvo regulatornih uloga kao što je podsticanje sinteze imunoglobulina G (IgG), ali i diferencijacija naivnih T CD4+ limfocita, inhibicija aktivnosti T-helper tip 1 ćelija (Th1) i stimulacija aktivnosti Th2 ćelija. Takođe je dokazano i njegovo pozitivno dejstvo na aktivaciju CD8+ citotoksičnih T limfocita (91).

Dosta značaja se pridaje samoj ulozi IL-6 na patogenezu SARS-CoV-2 virusne infekcije, a posebno njegovoj ulozi pri nastanku citokinske oluje kod zaraženih pacijenata.

Dosadašnja istraživanja pokazala su značajnu pozitivnu korelaciju između virusnog opterećenja i koncentracije IL-6 u organizmu obolelih od COVID-19, a koji su razvili tešku kliničku sliku praćenu signifikantnim oštećenjima plućnog parenhima. Gotovo svi dokazi govore o mogućoj destruktivnoj ulozi IL-6 kod ovih pacijenata (92,93).

Istraživanja su pokazala da IL-1 i TNF- α poseduju antikoagulantna svojstva, dok IL-6 može stimulisati koagulacionu kaskadu svojim uticajem na generisanje TF i posledičnom produkcijom trombina. Prisustvo povišenih koncentracija proinflamatornih citokina i hemokina dovodi do aktivacije i privlačenja ćelija imunskog sistema čoveka u zapaljensko tkivo u svrhu njegove odbrane ali i oštećenja samog tkiva uz favorizovanje endotelne disfunkcije. Kao posledica prirode virusne infekcije uočen je snažniji odgovor limfoidnog tkiva, dok prisustvo TNF- α ima za posledicu aktivaciju apoptoze u samim limfocitima što rezultira limfopenijom kao čestim laboratorijskim nalazom u ovoj infekciji. Aktivacija imunskog sistema stimuliše ekspresiju TF na površini samog monocitno-makrofagnog sistema ali i ćelijama endotela. Koagulaciona kaskada biva aktivirana prevashodno na ćelijskoj površini posredstvom TF (94). Takođe, pretpostavlja se da urođene i stečene abnormalnosti inhibitora koagulacije, antitrombina i proteina C i S značajno utiču na patogenezu koagulopatije jer u inflamatornim stanjima njihova koncentracija biva dodatno snižena (90,95,96).

1.9. Patogeneza tromboznih komplikacija u sklopu infekcije SARS-CoV-2 virusom

Nekoliko faktora mogu doprineti razvoju poremećaja hemostaznog mehanizma pri COVID-19 infekciji. Ovi faktori imaju posredan ili neposredan uticaj na sve tri komponente Virhovljeve trijade što podrazumeva pojavu endotelne disfunkcije, heperkoagulabilnosti i hemodinamske nestabilnosti u vidu staze ili turbulentnog toka krvi u vaskularnom sistemu.

1.9.1. *Virusom potaknuta endotelna disfunkcija*

Direktno oštećenje endotela od strane patogena na nivou plućnog parenhima i periferne cirkulacije nesumnjivo je jedan od najvažnijih mehanizama aktivacije koagulationog sistema. Oštećenje endotela može dovesti do sistemske cirkulatorne disfunkcije koja se karakteriše vazokonstrikcijom praćenom posledičnom ishemijom tkiva i inflamatornim promenama u mikrocirkulaciji koje dovode do pojave edema. Elektronskom mikroskopijom dokazana je akumulacija inflamatornih ćelija i virusnih inkluzija u endotelu srca, tankog creva, pluća i bubrega (97). Prisustvo patogena i odgovor imunskog sistema domaćina rezultuju povećanom ekspresijom i sintezom IL-1 koji se smatra odgovornim za formiranje retikularnih inkluzija glikoproteinskog i fosfolipidnog porekla dovodeći do oštećenja samih ćelija vaskularnog endotela, razvoja njihove disfunkcije i ekspresije protrombotičnih gena. SARS-CoV-2 je RNK virus, a dosadašnja istraživanja su pokazala da prisustvo ekstracelularne RNK, slično DNK oslobođenoj iz oštećenih ćelija endotela, može biti nezavisni trombogeni faktor zahvaljujući vezivanju proteaza koje dovode do promocije aktivacije FVII, FXI i FXII (98,99).

1.9.2. Inflamacija

Stanje inflamacije samo po sebi predstavlja bitan faktor aktivacije koagulacione kaskade. Aktivisani trombociti i oštećene endotelne ćelije mogu dovesti do ekspresije TF, što za posledicu ima sintezu trombina. Istovremeno, proinflamatorni citokini i hemokini kao što je IL-6 mogu dovesti do aktivacije koagulacione kaskade ali i do inaktivacije prirodnih antikoagulanata i supresije fibrinolize. Neprimereno snažan inflamatorni odgovor uzrokuje citokinsku oluju dovodeći do difuznog alveolarnog oštećenja, bubrežne insuficijencije, miokarditisa i multiorganskog zatajenja. Infekcija uzrokuje oslobađanje proinflamatornih citokina koji su povezani sa nastankom sistemskog inflamatornog odgovora uzorkujući ćelijisku smrt u plućnom parenhimu, jetri, srčanom mišiću, bubrezima i adrenalnom korteksu (100).

1.9.3. Hipoksija, hiperkoagulabilnost i viskoznost

Hipoksija kao posledica smanjene razmene kiseonika na nivou plućnog parenhima nameće se kao još jedan od relevantnih faktora u patogenezi koagulopatije pri infekciji SARS-CoV-2 dovodeći do stimulacije koagulacionog mehanizma i nastanka tromboze putem vazokonstrikcije i povećane viskoznosti krvi. Hipoksija može dovesti do promene funkcije endotela, čija je fiziološka uloga prevashodno antitrombotična i antiinflamatorna, u jedan prokoagulantni i proinflamatorni fenotip, prilikom čega dolazi do indukcije tzv. hipoksijom aktiviranih prokoagulatnih fakotra.

1.9.4. Antifosfolipidna antitela

Istraživanje Harzallah i saradnika ukazalo je na prolazni porast koncentracije antifosfolipidnih antitela kod pacijenata sa potvrđenom COVID-19 infekcijom. Poznato je da inflamatorna etiopatogeneza nesumnjivo dovodi do porasta koncentracije ovih antitela u organizmu, ne samo kod SARS-CoV-2 virusne infekcije, ali poznavajući doprinos antifosfolipidnih antitela etiopatogenezi prokoagulantnog stanja nameće se pitanje njihovog značaja i rutinskog određivanja pri ovoj virusnoj infekciji, a pogotovo kod pacijenata koji već poseduju određene faktore rizika za nastanak venske tromboze (101).

1.9.5. Uloga trombocita

Fiziološka uloga trombocita u hemostaznom mehanizmu, kao i dosadašnja saznanja o njihovoj funkciji prilikom inflamatornih promena u organizmu usmerila su istraživače u pravcu otkrivanja potencijalnog patofiziološkog mehanizma kojim trombociti doprinose nastanku koagulopatije u SARS-CoV-2 virusnoj infekciji.

Nedavne publikacije iz različitih istraživačkih centara pokazale su prisustvo povišenih koncentracija markera koagulacije kao i pojavu mikrotromba u plućnom parenhimu i drugim organima obolelih. Pored toga uočena je patološka aktivacija i agregacija trombocita kod ovih pacijenata (102–104).

Najpotentniji aktivator trombocita svakako jeste lipid inflamatorni molekul, trombocit aktivirajući faktor (PAF), čija biohemijska struktura je 1-Oalkyl-2acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. Sintetisan je od strane mnogih ćelija prokariotskih i eukariotskih organizama. PAF igra izuzetno važnu ulogu u inflamatornim procesima (105,106).

S obzirom na to da trombociti imaju mogućnost degranulacije perivaskularnih mastocita, čime dolazi do inflamatornog odgovora i tkivnog oštećenja, a sami tkivni makrofagi mogu biti aktivirani od strane PAF, ali ga i sami sintetišu i oslobađaju u sopstvenu mikrosredinu, postavlja se pitanje kompleksnog odnosa trombocita i mastocita u etiopatogenezi inflamatornih i prokoagulantnih dešavanja tokom infekcije.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da brojni receptori za PAF imaju značajnu ulogu prilikom ulaska brojnih, prevashodno virusnih, patogena u ljudski organizam. Tako je dokazana njihova uloga prilikom infekcije virusima H1N1, H3N2 kao i HIV virusom (107,108).

PAF takođe utiče i na sistem renin-angitenzinogen-aldosteron (RAAS), prevashodno putem ACE2 koji se pokazao kao receptor neohodan za ulazak SARS-CoV-2 u plućni parenhim zaraženih. Angitenzinogen II direktno stimuliše produkciju PAF, dok on sam povećava aktivnost ACE2 receptora (109).

Kao što je već pomenuto, oštećenje endotela čest je deo patogeneze virusne infekcije koji direktno utiče na hemostazni mehanizam. Virusne i bakterijske infekcije kao i inflamatorni stimulusi mogu dovesti to ekspresije TF, ne samo od strane endotela, nego i od strane cirkulišućih monocita i granulocita. Ove ćelije takođe nakon aktivacije od strane brojnih stimulusa dovode do oslobađanja mikrovezikula u krvotok od kojih su fosfatidil serin i TF

prepoznati kao prokoagulanti i direktno doprinose aktivaciji koagulacije. Sistemske infekcije praćene izrazitim inflamatornim promenama i endotelnom disfunkcijom mogu dodatno izmeniti hemostazni mehanizam posredstvom smanjene produkcije prostaglandina I₂ (PGI₂) i azot monoksida (NO) koji imaju izrazito značajnu ulogu u kontroli aktivacije trombocita (110).

Nizak broj trombocita koji se često sreće prilikom infekcije sugerise povišenu potrošnju trombocita usled obilne trombocitne aktivacije i formiranja tromba. Aktivisani trombociti i sami poseduju mogućnost ekspresije TF. Jasno je da sopstvenom agregacijom trombociti, ne samo da obezbeđuju adekvatnu negativno naelektrisanu fosfolipidnu podlogu za dalju aktivaciju faktora koagulacije, nego su i sami odgovorni upravo za aktivaciju koagulacione kaskade (111,112).

Posebno zamiljivo pokazalo se istraživanje Manne i saradnika (113) u okviru koga je vršena analiza celokupnog transkriptoma trombocita obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije, prilikom čega je dokazana različita ekspresija preko 3000 gena u trombocitima obolelih osoba u odnosu na kontrolnu grupu, što je još jedan od pokazatelja značajnih promena koje trombociti trpe prilikom infekcije, kao i njihovog doprinosa patogenezi koagulopatije.

1.9.6. Fibrinolizni mehanizam i Covid-19

Sam značaj fibrinoliznog mehanizma i njegovog doprinosa očuvanju homeostaze hemostaznog mehanizma dovodi do potrebe da se odgovor na razvoj koagulopatije kod

COVID-19 potraži upravo u njegovoj izmenjenoj funkcionalnosti. Naime dokazano je da alveolarni prostor u fiziološkim uslovima predstavlja profibrinolitičko područje organizma.

Dosadašnja istraživanja ukazala su na određene osobitosti fibrinoliznog mehanizma plućnog parenhima u fiziološkim stanjima, kao i stanjima poremećene homeostaze plućnog parenhima u različitim patološkim stanjima čiji je primarni patofiziološki supstrat upravo plućni parenhim.

Ispitivanja koja su podrazumevala analizu bronhoalveolarnih lavata kod pacijenata sa različitim pulmološkim oboljenjima pokazala su određene karakteristike i razlike u odnosu na lavate zdravih osoba. Naime, bronhoalveolarni lavat u fiziološkim uslovima poseduje mogućnost prevođenja plazminogena u plazmin, prilikom čega se dejstvo uPA smatra najodgovornijom za ovu enzimsku reakciju, dok su koncentracije PAI-1 i drugih inhibitora aktivnosti plazminogena bile nedovoljne kako bi izvršile supresiju fibrinoliznog mehanizma. S druge strane, značajno snižene koncentracije aktivnosti PAI-1 pronađene su kod osoba sa različitim pulmološkim oboljenjima što je najčešće rezultiralo pojačanom sintezom bronhoalveolarne tečnosti, akumulacije fibrina, formiranja hijalinih membrana i posledičnog fibroziranja plućnog parenhima. Pri tom, brojna inflamatorna stanja upravo karakteriše porast PAI-1, što nije karakteristično samo za plućni parenhim, nego i za parenhim bubrega, sinoviju, arterijske krvne sudove i jetrin parenhim (114). Smatra se da upravo porast koncentracije PAI-1, kako u plazmi, tako i u bronhoalveolarnoj tečnosti vrši supresiju fibrinoliznog mehanizma.

Dokazano je da plazmin ima veliki značaj u odstranjivanju fibrina ali takođe i brojnih matriks proteina, gde ubrajamo i brojne proteinske produkte nekrotičnog tkiva. Upravo supresija fibrinoliznog mehanizma, potaknuta inhibicijom aktivnosti plazmina, usled povišenih koncentracija PAI-1 ima za posledicu akumulaciju ovih nekrotičnih proteinskih produkata u tkivima koja imaju direktan uticaj na nastanak i razvoj hijalinih membrane u plućnom parenhimu (115,116).

Doprinos patogenezi koagulopatije kod COVID-19 pozitivnih pacijenata smatra se da ima i sam fenotip fibrinoliznog mehanizma koji je moguće klasifikovati kao hiperfibrinolizni, hipofibrinolizni, okultna fibrinoliza, fiziološka fibrinoliza i zatajenje fibrinoliznog mehanizma (117). Može se postaviti hipoteza da i određeni fenotip ima značajan uticaj na sam ishod oboljenja pacijenata obolelih od COVID-19.

1.9.7. Venska staza pri SARS-CoV-2 virusnoj infekciji

Patološka stanja i komorbiditeti koja dovode do dugotrajno smanjene pokretljivosti, nepokretljivosti i imobilizacije izazivaju pojavu venske staze, treće komponente Virchow-ljeve trijade, što je značajan doprinoseći faktor razvoja tromboznih komplikacija kod pacijenata sa SARS-CoV-2 virusnom infekcijom. Imobilizacija dovodi prvenstveno do smanjene mišićne aktivnosti, a samim tim i smanjene aktivnosti mišićne pumpe, koja je pak neophodna za adekvatno odvođenje venske krvi sa periferije što rezultira nastankom venske staze (118).

2. Radna hipoteza i cilj istraživanja

Aktuelna pandemija izazvana virusom SARS-CoV-2, težina kliničke slike koja se može razviti kod određenog broja pacijenta, zahtevi za bolničkim lečenjem i još uvek nepoznate posledice koje ova infekcija može imati na dalji kvalitet života obolelih zahtevaju dalje ispitivanje patogeneze ovog oboljenja i njegovih propratnih stanja.

Kako je poremećaj funkcionalnosti hemostaznog mehanizma jedna od najtežih posledica infekcije ovim virusom, koja u mnogome komplikuje ishod samog oboljenja, a dosadašnji radovi i istraživanja od strane naučne zajednice ne pružaju kompletan uvid u sve specifičnosti funkcionalnosti hemostaznog mehanizma u okviru ovog oboljenja, potencijalno rezultati ovog istraživanja mogli bi odgovoriti na neke od nepoznanica na ovom polju čime bi se pomoglo u sprečavanju razvoja težih kliničkih manifestacija i uticalo na skraćenje dužine trajanja hospitalizacije kao i smanjenje materijalnih troškova vezanih za lečenje oboljenja.

Ciljevi istraživanja i očekivani rezultati:

1. Ispitati funkcionalnost primarne hemostaze kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije kao i njen uticaj na rizik od nastanka smrtnog ishoda i tromboznih komplikacija.
2. Ispitati funkcionalnost koagulacionog mehanizma kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije i njegov uticaj na nastanak smrtnog ishoda i tromboznih komplikacija.
3. Proceniti uticaj i funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma na rizik od nastanka smrtnog ishoda i tromboznih komplikacija kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije.

Hipoteze istraživanja:

1. Pacijenti oboleli od SARS-CoV-2 virusne infekcije, koji imaju suprimiranu primarnu hemostazu imaju veći rizik od nastanka smrtnog ishoda i tromboznih komplikacija u poređenju sa pacijentima obolelim od ove infekcije koji imaju fiziološki nivo funkcionalnosti primarne hemostaze.
2. Poremećaj funkcionalnosti koagulacionog mehanizma u pravcu hiperkoagulabilnosti kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije povećava rizik od nastanka tromboznih komplikacija i smrtnog ishoda.
3. Suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma povećava rizik od nastanka tromboznih komplikacija i smrtnog ishoda kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije.

3. Materijal i metode istraživanja

Ispitivanje je koncipirano u vidu prospektivne studije. Tokom njene izrade izvršeno je regrutovanje 60 pacijenata sa RT-PCR potvrđenom infekcijom SARS-CoV-2, hospitalizovanih inicijalno u COVID jedinicama Kliničkog centra Vojvodine. Prilikom regrutovanja pacijenata izuzeti su oni pacijenti koji su se već nalazili u jedinicama intenzivne nege.

Za potrebe istraživanja korišteni su osnovni anamnestički podaci, uočene kliničke manifestacije kao i podaci o primenjenoj terapiji i ishodu oboljenja, dobijeni uvidom u medicinsku dokumentaciju ispitanika.

Pored anamnestičkih podataka, korišćeni su i podaci laboratorijskih analiza uzoraka pacijenata dobijenih flebotomijom i analiziranjem uzoraka pune heparinizirane krvi kao i analizom EDTA krvi i citratne plazme.

Deo analiza koji spada u standardnu paletu analiza, a koje se po protokolu traže kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije, odrađen je u sklopu laboratorija Centra za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine, uz poštovanje propisanih procedura od strane same laboratorije, koje se odnose na način uzorkovanja, transport i obradu uzoraka.

Određivanje parametara krvne slike, uključujući određivanje broja trombocita i trombocitnih indeksa izvršeno je na automatizovanom hematološkom brojaču firme Sismex, istog dana kada je izvršeno uzorkovanje biološkog materijala. Sam biološki materijal

upotrebljen za određivanje parametra kompletne krvne slike podrazumevao je uzorkovanje pune krvi sa EDTA kao antikoagulansom.

Ispitivanje funkcionalnosti primarne hemostaze, pored određivanja broja trombocita i trombocitnih indeksa, obuhvatilo je agregometrijska merenja izvedena na aparatu Multiplate koji funkcioniše na principu impedansne agregometrije. U sklopu procene agregabilnosti trombocita određivani su testovi TRAP, kao pokazatelj bazalne funkcionalnosti trombocita. Za ispitivanje agregabilnosti trombocita kao biološki materijal upotrebljena je puna krv sa litijum-heparinom kao antikoagulansom. Samo ispitivanje agregabilnosti trombocita sprovedeno je u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Medlab. Usled nestabilnosti uzorka i ograničenog životnog veka trombocita koji iznosi svega 4 sata vršen je redovan transport uzoraka iz Kliničkog centra Vojvodine u Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medlab, odmah nakon uzorkovanja biološkog materijala, a njegovoj obradi se pristupalo istog trenutka kada je uzorak stigao u laboratoriju ili najkasnije 3 sata od trenutka uzorkovanja biološkog materijala.

Koagulacioni testovi su vršeni na aparatu Siemens BCS-XP u sklopu Centra za laboratorijsku medicinu i obuhvatili su određivanje aktivisanog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT), protrombinskog vremena (PT), koncentracije fibrinogena i vrednosti D-dimera iz uzorka citratne plazme. Prilikom obrade uzorka poštovale su se sve preporuke i standardi dobre laboratorijske prakse u pogledu preanalitičke, analitičke i postanalitičke faze laboratorijskog ispitivanja.

Euglobulinsko vreme lize koaguluma, kao test globalne procene funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, je određivano metodom prema Macfarlane-u i Pilling-u koja se zasniva na prvobitnom razblaživanju citratne plazme destilovanom vodom, a zatim acidifikacijom iste rastvorom sirćetne kiseline što dovodi do taloženja euglobulinske frakcije plazme. Zatim dobijeni talog biva resuspendovan u boratnom puferu, dodatkom 0,025 M rastvora CaCl₂ do koagulacije i potom se registruje vreme lize koaguluma koji se inkubira u vodenom kupatilu na 37C°. Vreme lize koaguluma je izražavano u minutima.

Uzorci venske krvi za sve analize uzimani su odmah po prijemu pacijenta u Klinički centar Vojvodine, a pre primene bilo kakvih terapijskih ili dijagnostičkih procedura koje bi mogle da imaju efekta na same vrednosti ispitivanih parametara.

Neadekvatno uzorkovani uzorci koji ne sadrže poželjan odnos uzorka i antikagulansa, koagulisali ili hemolizovani uzorci nisu korišćeni za izvođenje analiza.

3.1. Način izbora, veličina i konstrukcija uzoraka

U studiju je uključeno 60 ispitanika inicijalno hospitalizovanih u COVID jedinicama Kliničkog centra Vojvodine, izuzev jedinica intenzivne nege, kod kojih je RT-PCR metodom potvrđeno prisustvo SARS-CoV-2 virusne infekcije.

Samo uzorkovanje biološkog materijala neophodnog za laboratorijske analize izvršeno je prilikom samog prijema pacijenata, a pre nego što su preduzeti dalji terapijski zahvati.

Nakon urađenih laboratorijskih analiza izvršeno je klasifikovanje pacijenata u odnosu na dobijene vrednosti ispitivanih parametara na sledeći način:

1. Na osnovu procene funkcionalnosti primarne hemostaze: na ispitanike sa očuvanom i suprimiranom funkcionalnošću primarne hemostaze
2. Na osnovu vrednosti D-dimera na ispitanike sa fiziološkim i nesignifikantno povišenim nivoom stimulacije trombinske aktivnosti (vrednosti D-dimera do 1000 ng/ml) i ispitanike sa signifikantno povišenim nivoom trombinske aktivnosti (vrednosti D-dimera više od 1000ng/ml)
3. Na osnovu vrednosti euglobulinskog vremena lize koaguluma na ispitanike sa očuvanom (vrednost EVLK do 240 min.) i suprimiranom funkcionalnošću fibrinoliznog mehanizma (vrednost EVLK duža od 240 min.).

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u uzorak:

- Uzrast stariji od 18 godina
- Pozitivan rezultat na SARS-CoV-2, dokazan RT-PCR tehnikom
- Potpisan pristanak informisanog ispitanika

Kriterijumi za isključenje ispitanika iz uzorka:

- Uzrast mlađi od 18 godina
- Negativan rezultat na SARS-CoV-2, dokazan RT-PCR tehnikom
- Nepotpisan ili povučen pristanak informisanog ispitanika

- Istorija ranijih tromboza ili aktuelnih malignih oboljenja
- Prethodna primena antitrombozne terapije

U odnosu na ishod bolesti pacijenti su klasifikovani na grupe sa:

- Izlečenom SARS-CoV-2 infekcijom bez razvoja tromboznih komplikacija
- Pacijente kod kojih je nastupio smrtni ishod
- Pacijente kod kojih je došlo do nastanka arterijskih ili venskih tromboznih komplikacija

Za unos i obradu podataka korišćen je statistički program SPSS, verzija 24.0. Za potrebe analize i opisa strukture uzorka istraživanja korišćeni su deskriptivni statistički pokazatelji: frekvencije, procenti, medijana i drugi. Rezultati su prikazani u vidu tabela i grafikona.

U okviru komparativne statistike, u cilju određivanja razlika između ispitivanih grupa, korišćen je Studentov t-test za nezavisne uzorke, ili odgovarajuća neparametrijska zamena Man-Vitnijev test u zavisnosti od prirode ispitivanih parametara i veličine podgrupa.

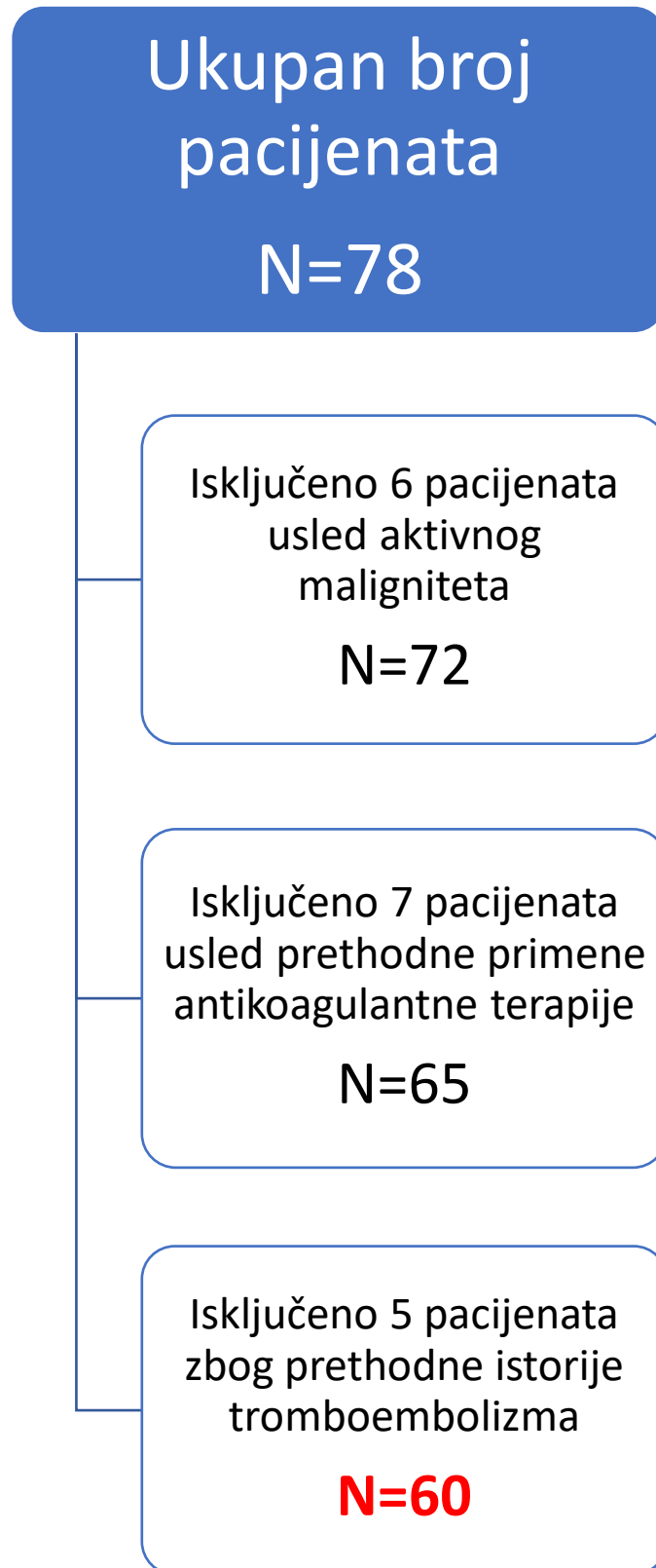
Kako bi se utvrdila povezanost između različitih posmatranih kliničkih parametara primenjen je Spirmanov koeficijent rang korelacije ili Pirsonov koeficijent linearne korelacije, ako su u pitanju kontinuirane varijable sa normalnom distribucijom. Vrednost $p < 0,05$ smatra se statistički značajnom.

Za procenu uticaja pojedinačnih ispitivanih parametara na rizik od nastanka smrtnog ishoda ili tromboznih komplikacija korišćena je nekondicionalna logistička regresija.

4. Rezultati ispitivanja

4.1. Selekcija ispitanika

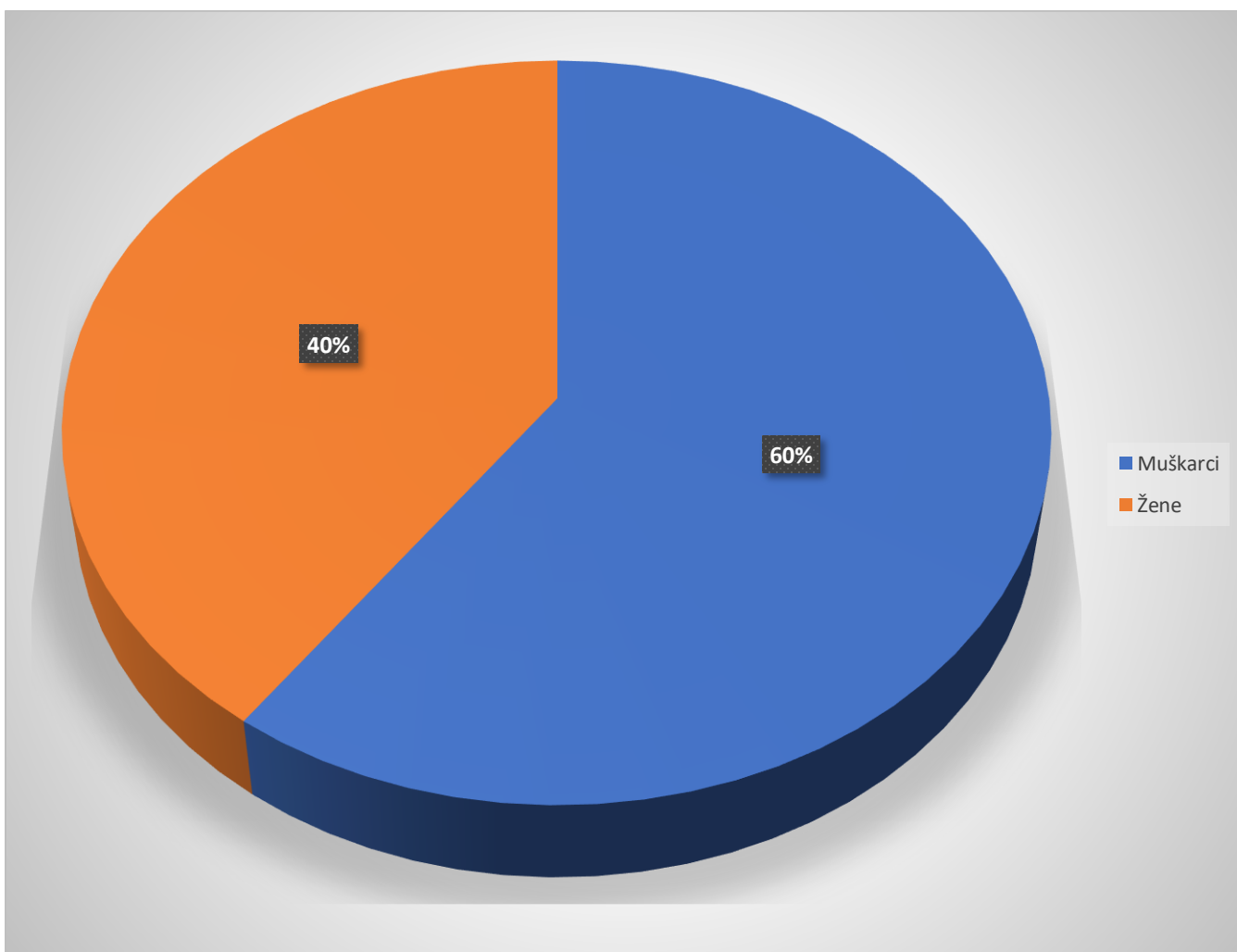
Ispitivanjem je prvobitno obuhvaćeno ukupno 78 ispitanika. Primenom prethodno formiranih kriterijuma iz studije je isključeno 6 pacijenata usled akutno prisutnog maligniteta. Dodatnih 7 pacijenata je isključeno usled prethodne primene antikoagulantne terapije u momentu prijema. Takođe, iz ispitivanja je isključeno 5 osoba kod kojih postoji ranija istorija tromboembolizma. U ispitivanje je uključeno ukupno 60 ispitanika kod kojih su ispunjeni svi kriterijumi za uključanje u ispitivanje (Slika 5).



Slika 5. Selekcija ispitanika na osnovu kriterijuma za isključivanje

4.2. Osnovne karakteristike ispitanika

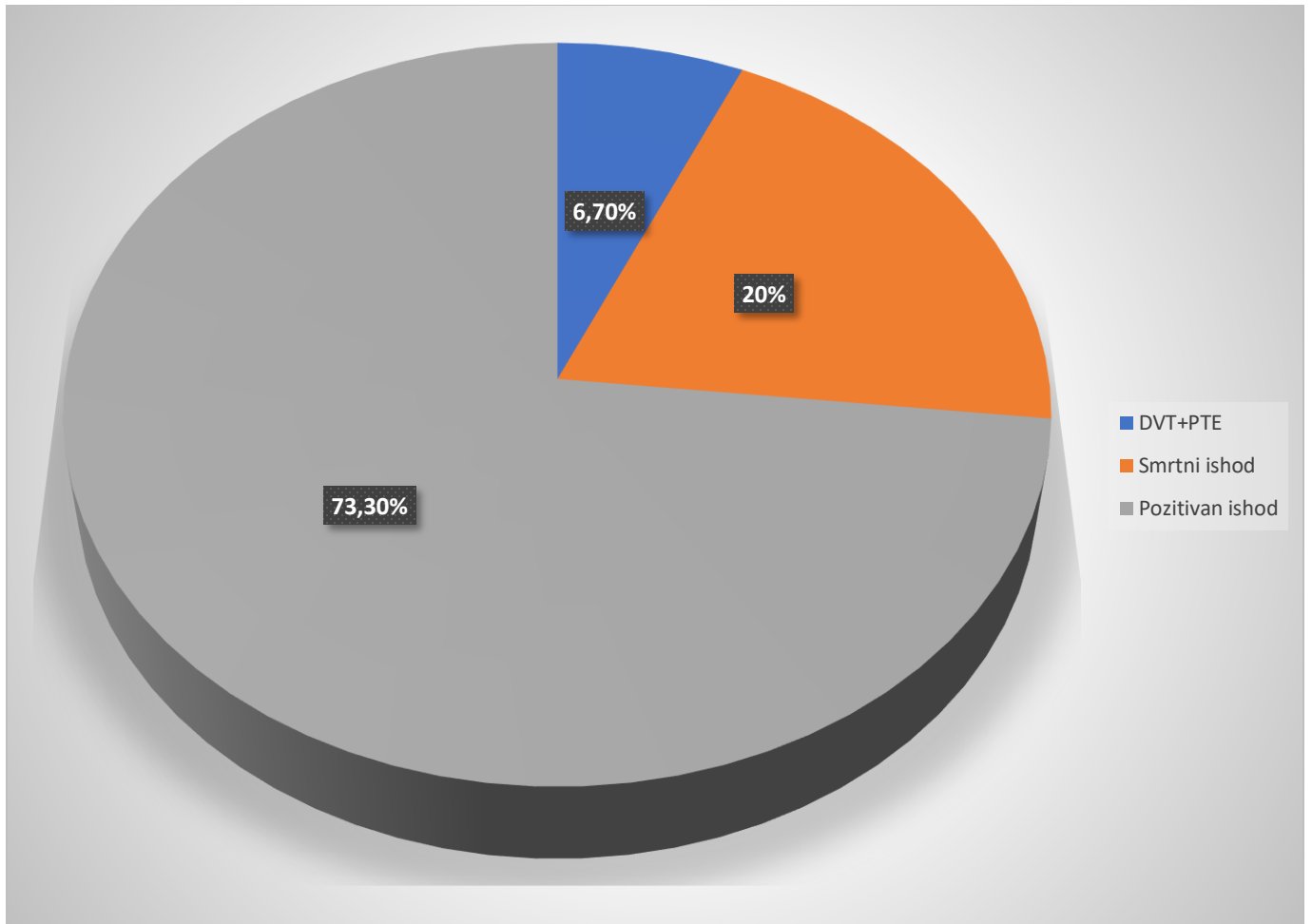
U grupi ispitanika je bilo 36 muškaraca (60% ispitanika) i 24 žene (40% ispitanika), što je predstavljeno grafikonom 1. Prosečna starost ispitanika iznosila je 65 godina, prilikom čega je najmlađi ispitanik imao 32 godine, dok je najstariji ispitanik imao 96 godina.



Grafikon 1. Polna struktura ispitanika

Od ukupnog broja ispitanika, kod 4 (6,7%) je dijagnostikovana tromboza dubokih vena ili plućna tromboembolija dok je smrtni ishod nastupio kod 12 pacijenata što iznosi 20% ukupnog broja ispitanika.

Grupisanjem ispitanika u pogledu ishoda lečenja uočena su 44 pozitivna ishoda (73,3%), dok je negativan ishod, koji obuhvata tromboembolijske komplikacije i smrtni ishod bio prisutan kod 16 ispitanika (26,7%) što je prikazano na grafikonu broj 2.



Grafikon 2. Zastupljenost smrtnih ishoda i tromboembolijskih komplikacija

Ispitivanje statističke značajnosti razlika u parametrima primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma pokazalo je postojanje izrazito statistički značajne razlike ($p < 0,001$) za sve ispitivane parametre poredeći grupu ispitanika sa negativnim ishodom bolesti i grupu sa pozitivnim ishodom, kao i poredeći grupu ispitanika sa smrtnim ishodom sa grupom ispitanika sa pozitivnim ishodom (Tabela 1).

Tabela 1. Ispitivanje statističke značajnosti razlika vrednosti ispitivanih parametara primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma

Naziv varijable	Pozitivan ishod	DVT+PTE	Smrtni ishod	Ukupni negativni ishod
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
PLT ($\times 10^9/L$)	218,14 \pm 82,582	270,5 \pm 122,34 p 0,45	225 \pm 133,682 p <0,001	225,88 \pm 125,839 p <0,001
PDW (fL)	12,741 \pm 2,4172	12,825 \pm 2,2065 p 0,045	12,1 \pm 2,542 p <0,001	12,281 \pm 2,4699 p <0,001
MPV (fL)	10,318 \pm 1,01358	10,6250 \pm 1,3073 p 0,045	10,4833 \pm 1,0692 p <0,001	10,5750 \pm 1,0792 p <0,001
P-LCR (%)	30,675 \pm 7,9756	29,0 \pm 9,3499 p 0,045	29,755 \pm 8,3023 p <0,001	30,15 \pm 8,2998 p <0,001
PCT (L/L)	0,22955 \pm 0,07551	0,25 \pm 0,1303 p 0,045	0,2316 \pm 0,1288 p <0,001	0,23625 \pm 0,1250 p <0,001
TRAP (AU*min)	788.3 \pm 300.584	829,25 \pm 299,75 p 0,045	792,17 \pm 302,87 p <0,001	803,00 \pm 295,57 p <0,001
aPTT (ratio)	0,9266 \pm 0,17942	0,8450 \pm 0,6245 p 0,045	0,9167 \pm 0,2025 p <0,001	0,9750 \pm 0,3460 p <0,001
PT-INR (ratio)	1,0786 \pm 0.49281	1,46 \pm 1,007 p0,045	1,05 \pm 0,338 p <0,001	1,1525 \pm 0,5664 p <0,001
Fibrinogen (g/L)	6,2209 \pm 0,90053	7,485 \pm 1,253 p 0,45	6,2475 \pm 0,880 p <0,001	6,484 \pm 1,062 p <0,001
D-dimer (ng/mL)	1291,77 \pm 974,655	985,0 \pm 480,31 p 0,045	2190,33 \pm 2616,24 p <0,001	1870,25 \pm 2324,25 p <0,001
ECLT (min)	261,93 \pm 89,678	460,00 \pm 111,65 p 0,045	523,33 \pm 70,108 p <0,001	480,63 \pm 112,87 p <0,001

PLT- broj trombocita, PDW-raspon distribucije trombocita, MPV-srednji volume trombocita, P-LCR- procenat velikih trombocita u odnosu na celokupnu populaciju trombocita u krvotoku, PCT- trombocitokrit, TRAP-trombin receptor aktivirajući peptid, aPTT- aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme, PT-INR- protrombinsko vreme izraženo kao internacionalni normalizovani odnos ECLT- euglobulinsko vreme lize koaguluma

Ispitivani parametri primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma prikazani su u pogledu njihove zastupljenosti u grupama ispitanika u odnosu na pozitivan ili negativan ishod bolesti.

Parametri kojima je određivana funkcionalnost primarne hemostaze pokazali su različitu zastupljenost u pojedinim grupama u odnosu na ishod samog oboljenja (Grafikon 3).

Posmatrajući broj trombocita u grupi ispitanika koji su imali pozitivan ishod bolesti uočeno je da snižen ili fiziološki nivo trombocita ima 41 osoba (93,2%), dok je povišen broj trombocita uočen kod tri pacijenta (6,8%). U grupi ispitanika sa negativnim ishodom pak, registrovano je 15 (93,8%) osoba sa sniženim ili fiziološkim brojem trombocita dok je kod jedne osobe (6,3%) zapažena trombocitoza.

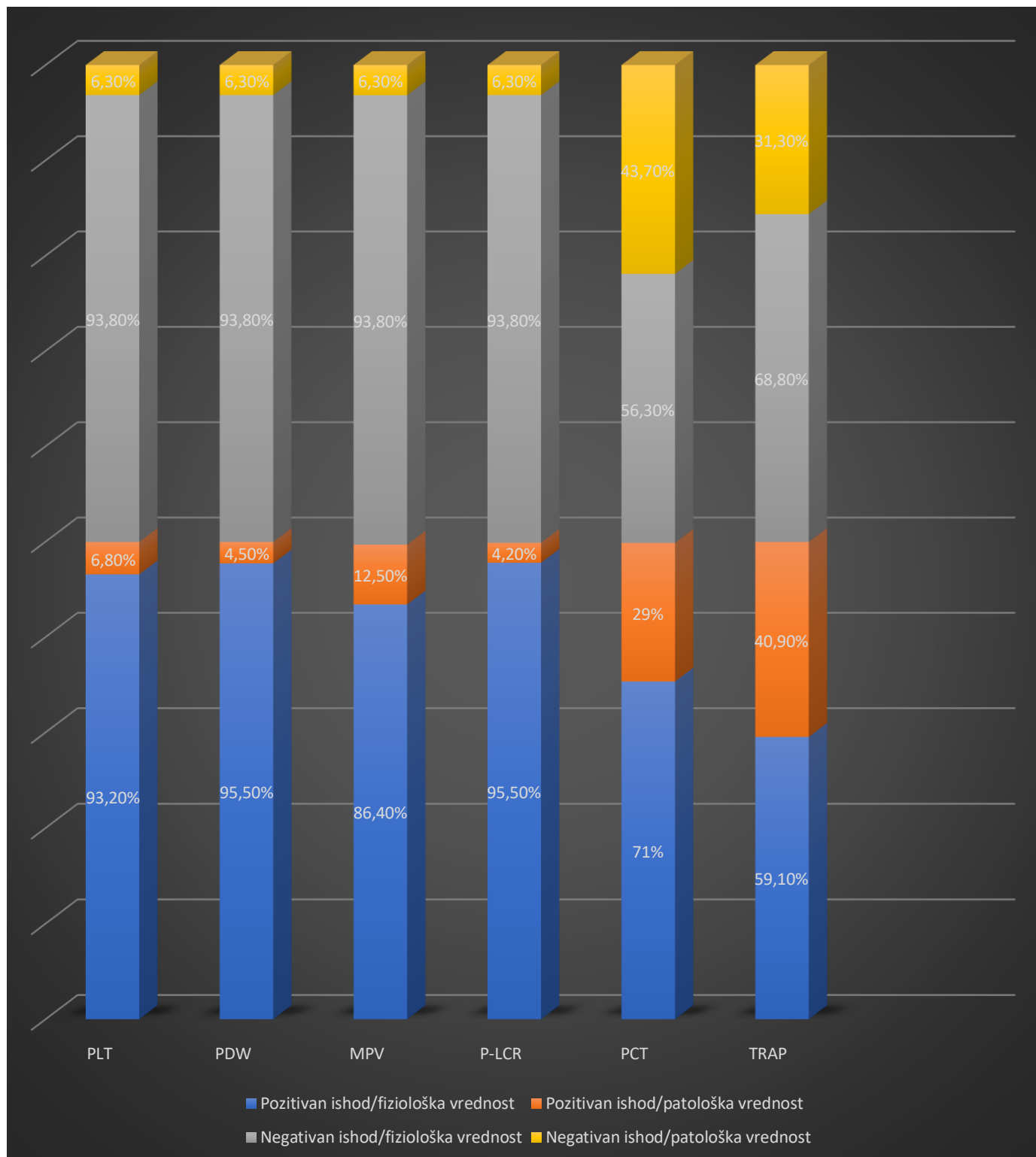
Kada govorimo o rasponu distribucije trombocita (PDW), u grupi ispitanika sa pozitivnim ishodom, kod 42 ispitanika (95,5%) je uočena fiziološka vrednost, dok je kod dva (4,5%) uočena povišena vrednost ovog parametra. S druge strane u grupi ispitanika sa negativnim ishodom 15 (93,8%) imalo je fiziološke vrednosti PDW dok je kod jedne osobe (6,3%) uočena povišena vrednost.

Ispitivanjem srednjeg volumena trombocita (MPV), u grupi ispitanika sa pozitivnim ishodom, registrovano je 38 (86,4%) ispitanika sa fiziološkim vrednostima i šest (12,5%) ispitanika sa povišenim vrednostima datog parametra. U grupi ispitanika kod kojih je zabeležen negativan ishod oboljenja 15 (93,8%) ispitanika je imalo fiziološke vrednosti dok je jedan pacijent (6,3%) imao povišene vrednosti.

Parametar koji pokazuje odnos velikih trombocita u odnosu na celokupnu populaciju prisutnih trombocita u krvotoku (P-LCR) bio je u fiziološkim granicama kod 42 ispitanika (95,5%), a povišen kod dva (4,2%) ispitanika u grupi koja je imala pozitivan ishod oboljenja. U grupi sa negativnim ishodom pak, registrovano je 15 (93,8%) ispitanika sa fiziološkim vrednostima i jedan (6,3%) sa povišenim vrednostima P-LCR.

Trombocitokrit (PCT) u grupi ispitanika sa pozitivnim ishodom bio je snižen kod devet (20,5%) ispitanika, fiziološki kod 31 (70,5%) i povišen kod četiri (9%) ispitanika, dok je u grupi sa negativnim ishodom pet ispitanika (31,3%) imalo snižene, devet (56,3%) fiziološke, a dva (12,4%) povišene vrednosti trombocitokrita.

Procena bazalne funkcije agregabilnosti trombocita izvršena TRAP testom pokazala je u grupi ispitanika sa pozitivnim ishodom da je 26 (59,1%) ispitanika imalo sniženu agregabilnost trombocita dok je 18 ispitanika (40,9%) imalo fiziološku bazalnu agregabilnost trombocita. S druge strane u grupi ispitanika sa negativnim ishodom registrovano je 11 (68,8%) ispitanika sa sniženom agregabilnošću, dok je pet (31,3%) ispitanika imalo fiziološku agregabilnost trombocita pri TRAP testu.



Grafikon 3. Prikaz distribucije patoloških vrednosti ispitivanih parametara primarne hemostaze

u grupama ispitanika u odnosu na ishod oboljenja

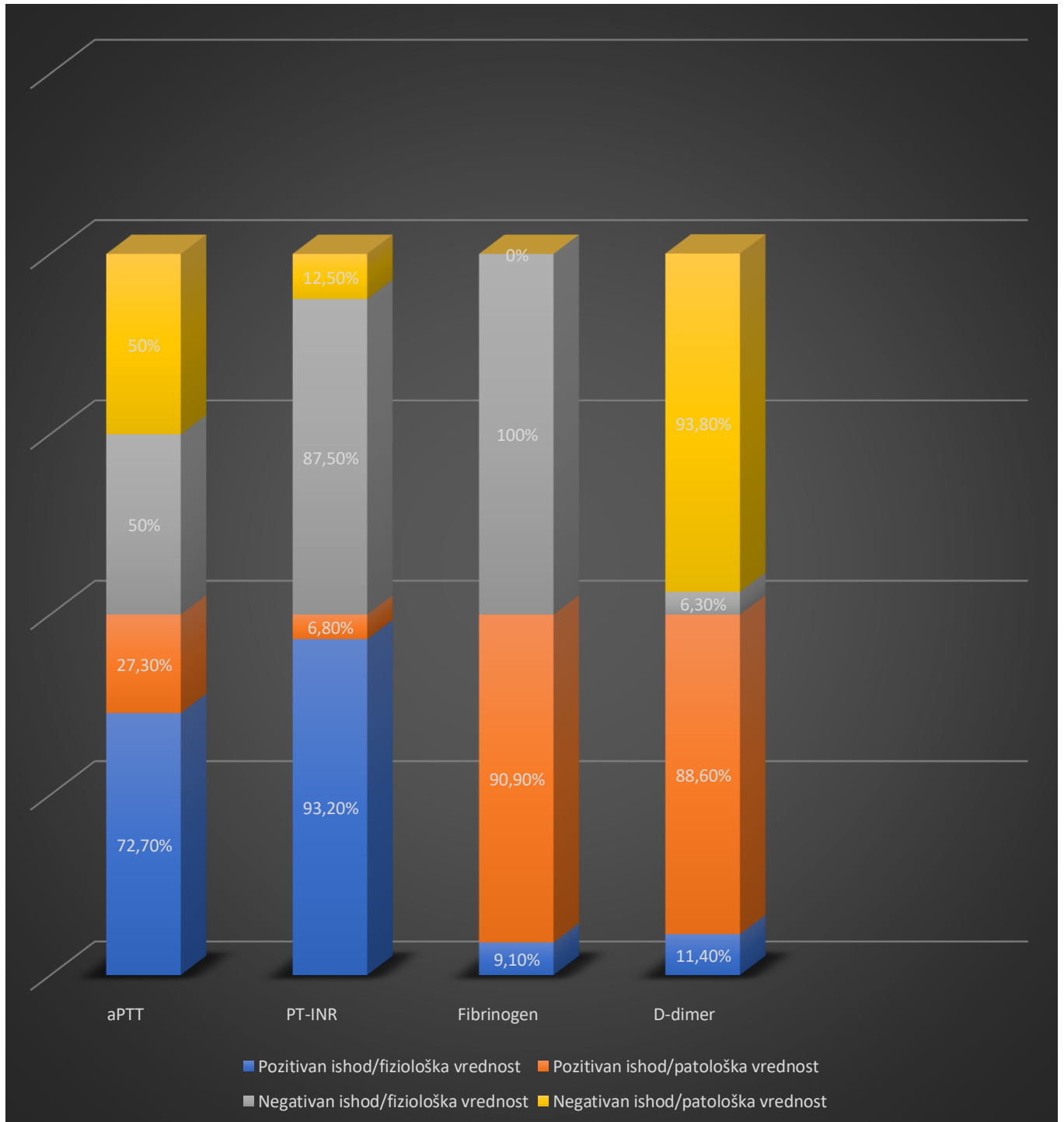
Procena funkcionalnosti koagulacionog mehanizma izvršena odgovarajućim laboratorijskim testovima pokazala je sledeću distribuciju (Grafikon 4.):

Aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme (aPTT) izraženo kao ratio u grupi ispitanika sa pozitivnim ishodom bilo je skraćeno kod 12 (27,3%) ispitanika dok je u fiziološkom opsegu bilo kod 32 (72,7%) ispitanika. U grupi ispitanika sa negativnim ishodom osam ispitanika (50%) imalo je skraćeno, a osam ispitanika (50%) fiziološko aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme.

Protrombinsko vreme (PT), izraženo kao internacionalni normalizovani ratio (INR) bilo je u granicama referentnog opsega kod 41 (93,2%) ispitanika, a produženo kod tri (6,8%) ispitanika u grupi ispitanika sa pozitivnim ishodom. Grupu sa negativnim ishodom oboljenja karakteriše 14 (87,5%) ispitanika sa fiziološkim vrednostima PT-INR i dva (12,5%) ispitanika sa produženim vrednostima pomenutog parametra.

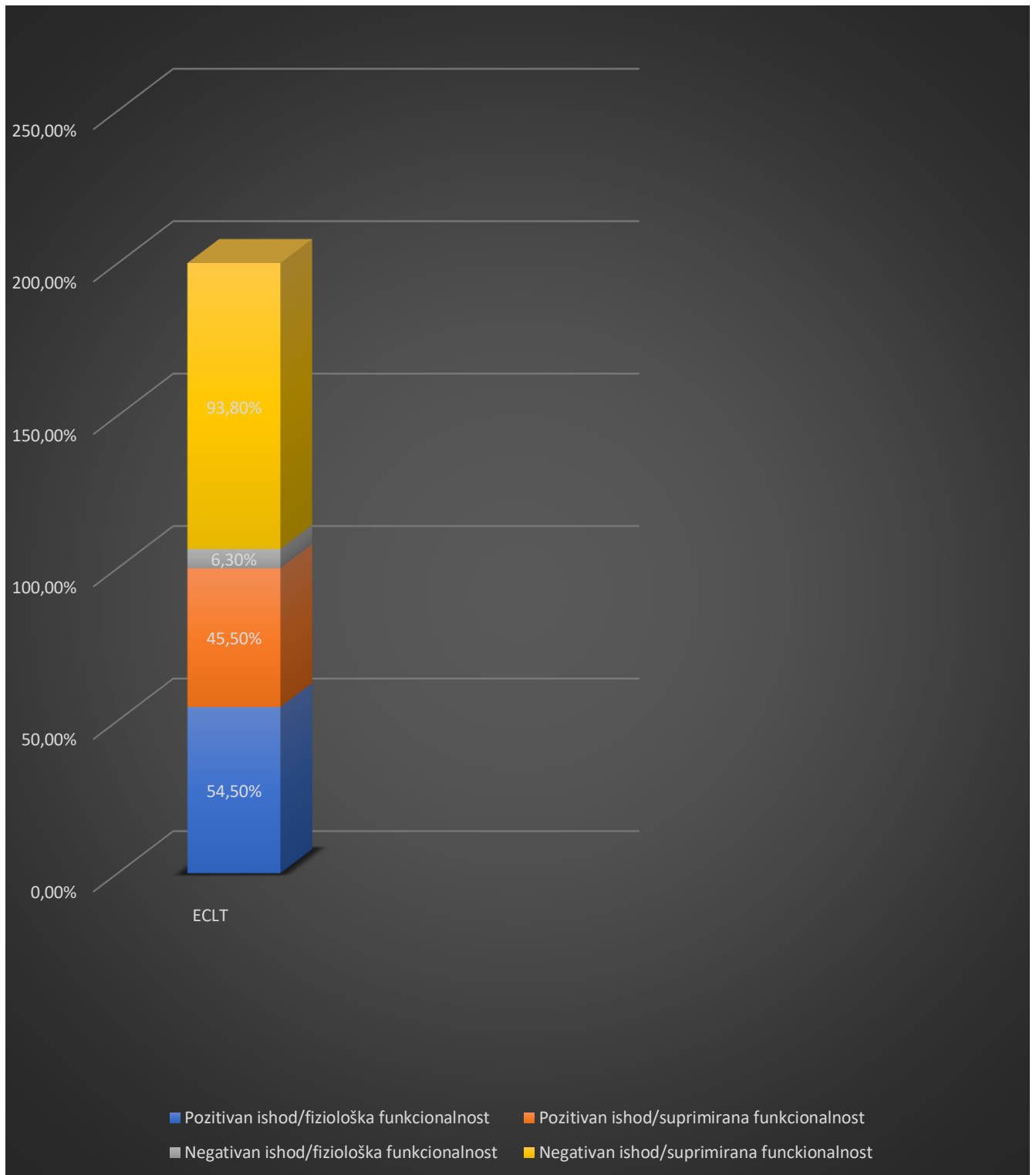
Vrednosti fibrinogena u grupi ispitanika sa pozitivnim ishodom bile su u fiziološkim granicama kod četiri (9,1%) ispitanika i povišene kod 40 (90,9%) ispitanika, dok je u grupi sa negativnim ishodom registrovano 16 (100%) ispitanika sa povišenim vrednostima fibrinogena.

Koncentracija d-dimera bila je fiziološka kod pet (11,4%), a povišena kod 39 (88,6%) ispitanika grupe kod koje je registrovan pozitivan ishod oboljenja, za razliku od grupe kod koje je registrovan negativan ishod oboljenja gde je jedan (6,3%) ispitanik imao fiziološku vrednosti d-dimera, a 15 (93,8%) povišenu vrednost ispitivanog parametra.



Grafikon 4. Prikaz distribucije zastupljenosti patoloških vrednosti parametara koagulacionog mehanizma u grupama ispitanika u odnosu na ishod oboljenja

Procena fibrinoliznog mehanizma, laboratorijski ispitana analizom euglobulinskog vremena lize koaguluma, jedina je pokazala statistički značajnu razliku u zastupljenosti patoloških vrednosti između ispitivanih grupa sa vrednošću χ^2 testa $<0,001$ pri čemu je u grupi ispitanika sa pozitivnim ishodom registrovano 24 (54,5%) ispitanika sa očuvanom, a 20 (45,5%) sa suprimiranom fibrinoliznom aktivnosti, dok je u grupi ispitanika sa negativnim ishodom oboljenja uočeno da svega jedna osoba (6,3%) ima očuvanu fibrinoliznu aktivnost, dok 15 (93,8%) ispitanika pokazuje suprimiranu fibrinoliznu aktivnost (Grafikon 5.).



Grafikon 5. Prikaz distribucije zastupljenosti patoloških vrednosti euglobinskog vremena lize koaguluma u grupama ispitanika u odnosu na ishod oboljenja

Vrednosti ispitivanih parametara primarne hemostaze, koagulacionog mehanizma kao i fibrinoliznog mehanizma predstavljene su u tabeli broj 2.

Tabela 2. Prikaz vrednosti ispitivanih parametara primarne hemostaze, koagulacije i fibrinolize

	SV±SD	raspon
PLT (x10 ⁹ /L)	220,20 ± 94,912	31-616
PDW (fL)	12,618 ± 2,4190	8,7-20,7
MPV (fL)	10,690 ± 1,02456	9-13,5
P-LCR (%)	30,535 ± 7,9955	17-50,9
PCT (L/L)	0.23133 ± 0,0902	0,04-0,61
TRAP (AU*min)	792,22 ± 296,820	148-1401
aPTT (ratio)	0.9395 ± 0,23316	0,67-2,09
PT-INR (ratio)	1,0983 ± 0,50955	0,85-3,37
Fibrinogen (g/L)	6,2912 ± 0,94430	4,37-8,87
D-dimer (ng/mL)	1446,03 ± 1460,246	340-9870
ECLT (min)	320,25 ± 136,424	140-640

PLT- broj trombocita, PDW-raspon distribucije trombocita, MPV-srednji volume trombocita, P-LCR-procentat velikih trombocita u odnosu na celokupnu populaciju trombocita u krvotoku, PCT-trombocitokrit, TRAP-trombin receptor aktivirajući peptid, aPTT- aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme, PT-INR- protrombinsko vreme izraženo kao internacionalni normalizovani odnos ECLT- euglobulinsko vreme lize koaguluma

U sledećoj fazi statističke obrade primenom nekondicionalne logističke regresije izvršena je procena relativnog rizika za nastanak negativnog ishoda kod pacijenata u odnosu na pojedinačne laboratorijske parametre hemostaznog mehanizma ispitivane u trenutku prijema na bolničko lečenje. Kako svi primenjivani testovi za procenu primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma imaju uniformne referentne opsege koji su jednaki za oba pola, logistička regresija prilagođena je za godine ispitanika. Obzirom na uniformnost ispitivane grupe u smislu kriterijuma za uključanje u studiju a koje se odnose na faktore koji utiču na funkcionalnost hemostaznog mehanizma analizu nismo morali da prilagođavamo za druge potencijalne confounding faktore.

Posmatrajući rezultate procene rizika za nastanak negativnog ishoda bolesti u odnosu na ispitivane pojedinačne parametre primarne hemostaze, uočavamo da svi ispitivani parametri imaju uticaj na porast rizika za negativan ishod ali da njihov pojedinačni uticaj iznosi oko 7% za svaki parametar (Tabela 3.).

Tabela 3. Procena rizika za nastanak negativnog ishoda bolesti u odnosu na pojedinačne parametre primarne hemostaze

	Pozitivan ishod n (%)	Negativan ishod n (%)	Odds ratio* (95% CI)	Odds ratio† (95% CI)
Parametri primarne hemostaze			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
PLT fiziološki broj	41 (93,2%)	15 (93,8%)		
PLT patološki broj	3 (6,8%)	1 (6,3%)	1.001 (0.995-1.008)	1.072 (1.014-1.134)
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
PDW fiziološki nivo	42 (95,5%)	15 (93,8%)		
PDW patološki nivo	2 (4,5%)	1 (6,3%)	0.915 (0.702-1.193)	1.071 (1.013-1.132)
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
MPV fiziološki nivo	38 (86,4%)	15 (93,8%)		
MPV fiziološki nivo	6 (12,5%)	1 (6,3%)	0.817 (0.444-1.503)	1.072 (1.014-1.133)
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
P-LCR fiziološki nivo	42 (95,5%)	15 (93,8%)		
P-LCR patološki nivo	2 (4,2%)	1 (6,3%)	0.983 (0.910-1.062)	1.072 (1.014-1.133)
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
PCT fiziološki nivo	31 (70,5%)	9 (56,3%)		
PCT patološki nivo	13 (20,5%)	7 (43,7%)	3.710 (0.005-2645.16)	1.072 (1.014-1.134)
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
TRAP fiziološka agregabilnost	18 (40,9%)	5 (31,1%)		
TRAP patološka agregabilnost	26 (59,1%)	11 (68,8%)	1.00 (0.998-1.002)	1.072 (1.014-1.134)

*Bez prilagođavanja † Prilagođeno za godine

Nekondicionalna logistička regresija primenjena je i na parametre koagulacionog mehanizma. Prilagođavanje je takođe izvršeno za godine ispitanika a rezultati ukazuju na blag uticaj svakog ispitivanog parametra na negativan ishod oboljenja (Tabela 4.).

Tabela 4. Procena rizika za nastanak negativnog ishoda bolesti u odnosu na pojedinačne parametre koagulacionog mehanizma

	Pozitivan ishod n (%)	Negativan ishod n (%)	Odds ratio* (95% CI)	Odds ratio† (95% CI)
Parametri koagulacionog mehanizma				
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
aPTT ratio fiziološki nivo	32 (72,7%)	8 (50%)		
aPTT ratio patološki nivo	12 (27,3%)	8 (50%)	2.455 (0.237-25.403)	1.073 (1.014-1.135)
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
PT-INR fiziološki nivo	41 (93,2%)	14 (87,5%)		
PT-INR patološki nivo	3 (6,8%)	2 (12,5%)	1.217 (0.411-3.601)	1.071 (1.013-1.133)
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
Fibrinogen fiziološki nivo	4 (9,1%)	0 (0%)		
Fibrinogen patološki nivo	40 (90,9%)	16 (100%)	1.927 (0.926-4.011)	1.093 (1.025-1.165)
			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
D-dimer fiziološki nivo	5 (11,4%)	1 (6,3%)		
D-dimer patološki nivo	39 (88,6%)	15 (93,8%)	1.00 (1.00-1.00)	1.067 (1.007-1.131)

*Bez prilagođavanja † Prilagođeno za godine

Test euglobulinskog vremena lize koaguluma kojime je vršena procena funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, testiran nekondicionalnom logističkom regresijom pokazao je blag uticaj ovog parametra na rizik vezan za negativan ishod samog oboljenja (Tabela 5.).

Tabela 5. Procena rizika za nastanak negativnog ishoda bolesti u odnosu na funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma

	Pozitivan ishod n (%)	Negativan ishod n (%)	Odds ratio* (95% CI)	Odds ratio† (95% CI)
Parametri funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma			1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
ECLT očuvana fibrinolizna aktivnost	24 (54,5%)	1 (6,3%)		
ECLT suprimirana fibrinolizna aktivnost	20 (45,5%)	15 (93,8%)	1.015 (1.007-1.022)	1.084 (1.023-1.160)

*Bez prilagođavanja † Prilagođeno za godine

Kako bi se ispitao kombinovani uticaj pojedinačnih ispitivanih parametara, njihova međusobna interakcija, efekat i doprinos svake od njih na sam ishod oboljenja upotrebljen je multivarijabilni model logističke regresije (Tabele 6, 7 i 8.). Posmatranjem modela multivarijantne regresione analize uočava se pre svega da je model dobar prediktor ishoda (Prilagođeni R square 0,447) i to na statistički značajnom nivou ($p < 0.001$), govoreći u prilog tome da predstavljeni regresioni model može da predvidi 44,7% varijanse ishoda (Tabela 6. i Tabela 7).

Tabela 6. Rezime modela^b

Model	R	R Square	Prilagođeni R Square	Procena standardne greške
1	.742 ^a	.550	.447	.332

a. Prediktori: (Constant), Euglobinsko vreme lize koaguluma, Fibrinogen, TRAP, PT INR, D-dimer, MPV, PCT, aptt ratio, PDW, P-LCR, PLT

b. Zavisna varijabla: ishod

Tabela 7. ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	6.453	11	.587	5.333	.000 ^b
	Residual	5.280	48	.110		
	Total	11.733	59			

a. Zavisna varijabla: ishod

b. Prediktori: (Constant), Euglobinsko vreme lize koaguluma, Fibrinogen, TRAP, PT INR, D-dimer, MPV, PCT, aptt ratio, PDW, P-LCR, PLT

Multivarijantni regresioni model pokazao je da, uzimajući u obzir doprinos svakog pojedinačnog izmerenog parametra primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma, njihovu međusobnu interakciju i efekat na ishod oboljenja euglobulinsko vreme lize koaguluma izdvojilo se kao statistički signifikantan prediktor ishoda, sa statističkom značajnošću na nivou $p < 0.001$ (Tabela 8.).

Tabela 8. Multivarijantni regresioni model primenjen na sve ispitivane parametre primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma

Model		p	(95% CI)	
			Donja granica	Gornja granica
1	(Constant)	.948	-4.101	3.842
	PLT	.774	-.013	.010
	PDW	.404	-.217	.089
	MPV	.961	-.579	.552
	P-LCR	.759	-.050	.068
	PCT	.824	-10.067	12.594
	aptt ratio	.629	-.623	1.021
	PT INR	.837	-.430	.350
	Fibrinogen	.435	-.058	.133
	D-dimer	.913	.000	.000
	TRAP	.848	.000	.000
	Euglobinsko vreme lize koaguluma	.000	.002	.003

5. Diskusija

Pojavom pandemije virusa SARS-CoV-2 krajem 2019. godine ubrzo su u sklopu kliničke slike same infekcije uočene brojne trombozne komplikacije, kako arterijske, tako i venske.

Približno 5-10% osoba obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije zahteva hospitalizaciju u jedinicama intenzivne nege. Od ovog broja 20-30% obolelih razvija kliničku sliku tromboznih manifestacija u vidu DVT i/ili PTE kao i arterijskih tromboza u vidu ishemijskog moždanog udara i infarkta miokarda (119,120).

Naučnoj zajednici je postalo jasno da hemostazni mehanizam zauzima značajno mesto u patofiziološkim dešavanjima i mehanizmima podstaknutim infekcijom novim virusom. Ova spoznaja usmerila je deo naučne zajednice i medicinskih radnika da pokušaju da odgonetnu razlog poremećaja hemostaznog mehanizma koji se javlja tokom infekcije SARS-CoV-2 virusom, mapiraju jasne etiopatogenetske čvorove i spoznaju dodatne faktore rizika i komorbiditete koji mogu biti doprinoseći faktor disfunkciji hemostaznog mehanizma, a sve u cilju buduće pravovremene dijagnostike poremećaja hemostaznog mehanizma kod obolelih, kao i moguće prevencije razvoja težih kliničkih stanja i oblika tromboembolizma. Kako su trombozni procesi po svojoj etiopatogenetskoj prirodi multifaktorska oboljenja, pri čemu se faktori rizika razlikuju za trombozne komplikacije nastale u venskom i arterijskom delu kardiovaskularnog sistema ali i delimično prepliću, potrebno je i njihovo poznavanje i identifikacija u svetlu oboljenja COVID-19 sa ciljem prepoznavanja posebno rizičnih pacijenata kod kojih postoji mogućnost poremećaja hemostaznog mehanizma kao i prevencije kasnijih komplikacija koje bi nastale kao posledica tromboembolijskih događaja.

Aktuelna istraživanja na polju poremećaja hemostaznog mehanizma kod osoba inficiranih SARS-CoV-2 virusnom infekcijom pokušavaju da odgonetnu ne samo etiopatogenezu nastanka koagulopatije nego i adekvatne dijagnostičke modalitete kako bi se pravovremeno uočili pacijenti koji su u riziku da razviju neki od poremećaja hemostaznog mehanizma, a samim tim i odrede adekvatni terapijski protokoli koji bi bili primenjeni u slučaju njegovog nastanka.

Ono što je svakako doprinoseći činilac u svetlu COVID-19 jeste racionalna i svrsishodna primena dijagnostičkih testova u cilju adekvatne procene očuvanosti ili disfunkcije hemostaznog mehanizma kod obolelih kojim bi se izvršila stratifikacija rizika za razvoj tromboembolijskih poremećaja.

Posmatrajući hemostazni mehanizam kao kompleksnu slagalicu sastavljenu iz njegovih činilaca: koagulacije, fibrinolize i inhibitora koagulacije i fibrinolize kao i primarne hemostaze, neophodno je ispitati svaki od navedenih činilaca i potencijalne patofiziološke procese koji se javljaju u svetlu oboljenja COVID-19. Dosadašnje istraživačke aktivnosti na polju ispitivanja poremećaja hemostaznog mehanizma akcenat su stavljale pretežno na koagulacioni mehanizam i primarnu hemostazu, dok je fibrinolizni mehanizam često bio tretiran kao propratni fenomen čija je uloga prosto da ograniči prethodno aktiviranu koagulaciju, bez mogućnosti uticaja na sam proces fibrinolize i bez davanja na značaju fibrinolitičkim procesima koji su svakako neotuđivi deo hemostaznog mehanizma. Nova otkrića u pogledu regulatornih mehanizma fibrinoliznog mehanizma doprinela su shvatanju značaja same fibrinolize i njene krucijalne uloge u etiopatogenezi tromboze.

Stoga ova studija je pokušaj da se da potencijalni doprinos aktuelnoj pandemiji u cilju uočavanja potencijalnih zbivanja u hemostaznom mehanizmu obolelih, a pridajući jednak značaj svakom od činilaca hemostaznog mehanizma, pa tako i fibrinolizi.

Cilj ovog istraživanja bio je da se uoče potencijalne promene u funkcionalnosti hemostaznog mehanizma u samom momentu prijema na bolničko lečenje i potencijalno da doprinos proceni rizika kod pacijenata i potencijalnom ishodu oboljenja uzimajući u obzir podatke dobijene laboratorijskim testiranjem primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma.

Studijom je obuhvaćeno 60 ispitanika koji su u trenutku prijema na bolničko lečenje, usled PCR metodom potvrđenog prisustva SARS-CoV-2 virusne infekcije i kliničke slike koja je zahtevala hospitalizaciju, ispunili dodatne uslove za uključanje u istraživanje. Tok oboljenja i sama priroda bolesti omogućili su da ispitivanje postavimo kao prospektivnu studiju.

Kako bi se izbeglo unošenje bias-a u studiju posebna pažnja posvećena je selekciji ispitanika, njihovoj randomizaciji, ali i kvalitetu sakupljenog biološkog materijala u trenutku prijema na bolničko lečenje kao i njegovoj pravovremenoj obradi u skladu sa dobrom kliničkom i dobrom laboratorijskom praksom. Randomizacija ispitanika je omogućena činjenicom da su uzorci ispitanika sakupljeni na uniforman način, ali su ispitanici koji su bivali hospitalizovani upućivani u Klinički centar Vojvodine iz različitih delova teritorije Autonomne pokrajine Vojvodine i u različitim vremenskim periodima, čime su izbegnute zajedničke karakteristike uzorka koje bi mogla da unesu bias u studiju, pre svega etiološki faktori životne sredine, radne sredine, uzrasta ili pola. Tendencija je bila da se prikupi približno jednak broj ispitanika po pitanju pola kao i da

se obezbedi heterogenost uzorka po pitanju uzrasta, koliko je to moguće uzimajući u obzir samu prirodu oboljenja.

Strogo definisanim pravilima za isključenje u studiju težili smo da eliminišemo greške po pitanju kvaliteta informacija, što je pre svega omogućeno kreiranjem upitnika koji je popunjavan isključivo od strane jedne ovlašćene osobe za to. Samim tim osigurali smo uniformnost ispitivanog uzorka čime u daljoj statističkoj obradi dobijenih podataka nije bilo neophodno prilagođavanje dobijenih rezultata za confounding faktore koji su ujedno i najveći izvor bias-a u istraživanjima. Kvalitet samih analiza biološkog materijala zagarantovan je ISO 15189 standardom koji poseduju laboratorije u kojima je vršeno određivanje parametara hemostaznog mehanizma kao i principima dobre laboratorijske prakse kojih se laboratorije pridržavaju.

U skladu sa aktuelnim istraživačkim dilemama vezanim za poremećaj hemostaznog mehanizma kod pacijenata obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije nametnula su se pitanja: Da li je moguće već na samom prijemu na bolničko lečenje predvideti mogući razvoj poremećaja funkcije hemostaznog mehanizma? Da li na osnovu lako pristupačnih i rutinski primenjivanih testova za procenu hemostaznog mehanizma možemo izvršiti stratifikaciju rizika i preduprediti razvoj težih kliničkih oblika poremećaja hemostaznog mehanizma? Da li se neki od laboratorijskih testova za procenu primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma posebno izdvaja kao test koji bi mogao da ukaže na ishod samog toka bolesti?

U našoj studiji dijagnostikovano je ukupno četiri slučaja simptomatskog venskog tromboembolizma što čini 6,7% ukupnog broja ispitanika uključenih u nju. To se zaista čini kao veoma nizak broj tromboznih komplikacija međutim mora se imati na umu ukupni broj

negativnih ishoda bolesti. Naime u trenutku prikupljanja podataka i uključivanja ispitanika u studiju nisu vršene obdukcije osoba preminulih od COVID-19. Pregledom literature i objavljenih naučnih članaka zemalja i zdravstvenih centara gde su vršene obdukcije, obdukcijski nalazi govore u prilog visokoj incidenci tromboznih komplikacija kod osoba kod kojih je zabeležen negativan ishod bolesti. Tako rad Wichmann-a i sar. (121) govori da je gotovo 58% smrtnih ishoda posledica upravo tromboze dubokih vena i plućne tromboembolije iako su istraživači stavili do znanja da je studija izvedena na malom uzorku što predstavlja jednu od njenih ograničenja. Drugi istraživački timovi takođe su objavili slične podatke. Tako u radu Edler i sar. (122) preko 40% slučajeva smrtnog ishoda bilo je pripisano dubokoj venskoj trombozi, a dodatnih 25% autopsija pokazalo je prisustvo mikrotromba u vaskulaturi različitih tkiva i organa, dok studija Elsoukkary i sar. (123) govori da je u čak 88% smrtnih ishoda na obdukciji ustanovljena plućna tromboembolija i/ili duboka venska tromboza. Upravo iz ovog razloga odlučili smo se da grupu ispitanika sa negativnim ishodom bolesti posmatramo kao reprezentativnu grupu u kojoj bismo pratili parametre hemostaznog mehanizma u odnosu na grupu sa pozitivnim ishodom bolesti uz pretpostavku da je velika većina ispitanika sa negativnim ishodom bolesti imala signifikantnu disfunkcionalnost hemostaznog mehanizma koja je doprinela negativnom ishodu ili bila direktni njegov uzrok.

Poznato je da primarna hemostaza igra značajnu ulogu u nastanku venskih i arterijskih tromboza. Činjenica da trombociti na mestu povrede zidova krvnih sudova stupaju u kontakt sa ogoljenim kolagenom čime prelaze u izrazito aktivisano stanje, učestvuju u procesu formiranja tromba procesima adhezije i agregacije ali i predstavljaju površinu na kojoj će se odvijati dalja

trombinska aktivnost i amplifikacija prokoagulantnog stimulusa predstavlja razlog zašto smo se odlučili za ispitivanje agregabilnosti trombocita kao i trombocitnih parametara kod obolelih.

Trombociti su sve više prepoznati kao ključni medijatori inflamatornih procesa i imunske disfunkcije (124). Trombocitopenija je čest nalaz kod kritično obolelih pacijenata i često govori u prilog ozbiljne organske disfunkcije kao i mogućeg razvoja diseminovane intravaskularne koagulopatije. Kako COVID-19 prati izrazit imunski odgovor organizma i opsežne inflamatorne promene, tako je i sama funkcionalnost trombocita kao i njihov broj, stepen aktivacije i diferencijacije veoma značajan u patofiziološkim mehanizmima ovog oboljenja i smatra se značajnim doprinosećim faktorom koagulopatije. Razvoj trombocitopenije kod osoba obolelih od COVID-19 je najverovatnije multifaktorijalno uslovljen uz pretpostavku da kombinacija mehaničke ventilacije i oštećenja endotela dovode do aktivacije trombocita, njihove adhezije i agregacije i posledičnog utroška (125). Podaci naše studije govore u prilog tome da postoji statistički značajna razlika ($p < 0.001$) u broju trombocita u zavisnosti od ishoda oboljenja, dok je nestandardna logistička regresija, pak pokazala blag uticaj (OR 1.072; 95%CI 1.014-1.134) broja trombocita na nastanak negativnog ishoda oboljenja kod pacijenata obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije. Slični rezultati publikovani su u studiji Zhao i sar. (126) koji govore u prilog tome da snižene vrednosti broja trombocita na prijemu mogu biti pokazatelj kasnijeg lošijeg ishoda oboljenja. S druge strane studija Polat E. i Demir MC nije pokazala statistički značajnu razliku između grupa pacijenata koji su hospitalizovani i pacijenata koji su lečeni u kućnim uslovima niti u pogledu broja trombocita niti u pogledu ostalih trombocitnih parametara (127).

Kada govorimo o brojnim trombocitnim pokazateljima, našom studijom pokušali smo da ustanovimo da li bi neki od njih mogli da daju nagoveštaj o mogućem ishodu oboljenja.

Raspon distribucije trombocita (PDW), volumen trombocita (MPV), procenat velikih trombocita u odnosu na celokupnu populaciju (P-LCT) kao i trombocitokrit (PCT) predstavljaju lako dostupne trombocitne parametre. Njihove vrednosti često bivaju povišene prilikom aktivacije trombocita u sklopu aktivacije hemostaznog mehanizma. Kako su uočene promene u broju trombocita usled njihove aktivacije tokom infekcije SARS-CoV-2, želeli smo da ispitamo i potencijalnu prediktivnu vrednost ovih trombocitnih parametara u odnosu na ishod bolesti. Rezultati naše studije pokazali su izrazitu statistički značajnu razliku ($p < 0.001$) prilikom ispitivanja statističke značajnosti razlika vrednosti ispitivanih parametara za svaki od navedenih parametara. Ipak primenom nekondicionalne logističke regresije svaki od pojedinačnih pobrojanih parametara pokazao je blagu statističku značajnost. Broj trombocita (OR 1.072; 95%CI 1.014-1.134), PDW (OR 1.071; 95%CI 1.013-1.132), MPV (OR 1.072; 95%CI 1.014-1.333), P-LCR (OR 1.072; 95%CI 1.014-1.333), PCT (OR 1.072 95%CI 1.014-1.134). Ovakvi podaci iako pokazuju blagu statističku značajnost svakako su i posledica ograničenja same studije. S obzirom na trend na koji sami podaci ukazuju, optimisti smo da bi veći broj ispitanika u studiju dodatno učvrstio zapažanja proistekla iz naše studije i pokazala veću statističku značajnost ispitivanih parametara. Dobijene rezultate naše studije uporedili smo sa do sada objavljenim radovima koji su se bavili ovom tematikom. Meta analiza Daniels S. , Wei H. i Denning WD (128), pokazala je značaj ispitivanja trombocitnih parametara MPV, P-LCR i PDW kod COVID-19 pozitivnih pacijenata. Podaci ove studije govore u prilog značajnog uticaja MPV i P-LCR na težinu kliničke slike i mortalitet, dok je povišena vrednost PDW značajno povezana sa mortalitetom. Naime, prisustvo mladih trombocita u krvotoku oslikava aktivnost samih trombocita i predstavlja koristan prognostički biomarker i prediktor tromboznih komplikacija (129,130). Rad Bhandary

CP i sar. takođe je pokazao značajne promene u trombocitnim parametrima kod COVID-19 (131). Ono što je neophodno napomenuti jeste heterogenost podataka u različitim studijama nastalih kao posledica različitog momenta koji su uzeti kao polazna tačka za određivanje datih parametra. Određene studije za polaznu tačku uzimaju prijem pacijenata na intenzivno lečenje kada su ovi pacijenti već pod određenom imunosupresivnom terapijom kao što je kortikosteroidna terapija i koja ima efekat na inflamatorna dešavanja u organizmu.

Takođe u obzir se mora uzeti i eventualna antiagregaciona terapija kojoj su pacijenti bili izloženi u trenutku određivanja pomenutih parametara. S obzirom na protokole lečenja u Republici Srbiji, svi pacijenti u trenutku prijema su bili na antiagregacionoj terapiji acetil-salicilnom kiselinom. Kako bismo ispitali uticaj same agregabilnosti trombocita na ishod bolesti, odlučili smo se za izvođenje TRAP testa kao pokazatelja bazalne funkcionalnosti trombocita. Rezultati naše studije govore u prilog statistički značajne razlike ($p < 0.001$) prilikom ispitivanja značajnosti razlika vrednosti ispitivanih parametara, dok je univarijantna nekondicionalna logistička regresija pokazala blagi uticaj ovog ispitivanog parametra na konačni negativan ishod bolesti (OR 1.072; 95%CI 1.014-1.134). TRAP kao osetljiv parametar bazalne funkcionalnosti trombocita uslovljen je takođe i brojem trombocita pacijenta. Usled toga se uvidom u sirovu matricu podataka stiče utisak da je sama bazalna agregabilnost zapravo snižena. Međutim, obzirom na navedenu vezu ovog parametra sa brojem trombocita, zaključuje se da to nije slučaj i da je njihova funkcionalnost zapravo očuvana. Antiagregaciona terapija acetil-salicilnom kiselinom nema uticaja na ovaj parametar tako da njena eventualna primena nije ugrozila validnost dobijenih podataka. Uzimajući u obzir veliku varijabilnost ovog parametra i nemogućnost međusobnog poređenja različitih metoda određivanja agregabilnosti trombocita postoje

suprotstavljeni naučni podaci i stepenu agregabilnosti kod pacijenata obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije. Tako je studija Heinz C. i sar. pokazala da agregabilnost trombocita nema značajan uticaj na ishod bolesti. (132). Ipak, iako je ova studija izvedena na identičnom agregometru kao i naša, postoji ograničenje u smislu broja ispitanika koji iznosi svega 27 pri čemu su ispitanici bili regrutovani sa jedinica intenzivnog lečenja. S druge strane studija Bhanu KM. i sar. (133) iako nije određivala agregabilnost trombocita kao takvu, pristupila je određivanju koncentracije p-selektina koja je bila povišena kod pacijenata obolelih od COVID-19. P-selektin je važan transmembranski protein eksprimovan na površini endotelnih ćelija ali i aktivisanih trombocita, direktno učestvujući u agregabilnosti trombocita pri čemu se može smatrati indirektnim pokazateljem kako povišene aktivnosti trombocita tako i njihove povišene agregabilnosti.

Ispitivanje koagulacionog mehanizma u našoj studiji zasnovano je na određivanju vrednosti fibrinogena, aktivisanog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT), protrombinskog vremena izraženog kao internacionalizovani ratio (PT-INR) i d-dimera. Kriterijum za isključenje iz studije bila je primena antikoagulantne terapije, bilo da se radi o parenteralnoj primeni heparinskih preparata ili oralnoj antikoagulantnoj terapiji.

Rezultati naše studije pokazali su izrazitu statistički značajnu razliku ($p < 0.001$) u koncentraciji fibrinogena pacijenata sa negativnim ishodom oboljenja u odnosu na pacijente sa pozitivnim ishodom, dok je univarijantna nekondicionalna logistička regresija pokazala blag doprinos koncentracije fibrinogena na sam ishod bolesti (OR 1.093; 95%CI 1.025-1.165).

Kod pacijenata obolelih od COVID-19 dolazi do porasta koncentracije fibrinogena i VWF u sklopu odbrambenih mehanizama organizma domaćina. U inicijalnoj fazi bolesti povišene vrednosti fibrinogena mogu predstavljati odraz protektivnog dejstva fibrinogena jer su ove povišene koncentracije praćene samo blago povišenim vrednostima d-dimera. Ovakva slika hemostaznog mehanizma sreće se u brojnim inflamatornim stanjima, postoperativno i tokom trudnoće kada blagi porast d-dimera prolazi bez kliničkih pokazatelja tromboze. Ipak ukoliko inflamatorno stanje potraje, hemostazni mehanizam ima tendenciju da ograniči dalje širenje patogena kroz organizam upravo formiranjem krvnih ugrušaka. Ovakav razvoj patofizioloških dešavanja rezultira signifikantnim porastom nivoa d-dimera, kao i iscrpljivanjem sadržaja granula trombocita. Kako je fibrinogen delimično prisutan u granulama trombocita, njihovo iscrpljivanje dovodi do pada koncentracije fibrinogena paralelno sa porastom koncentracije d-dimera (134). Upravo ovakvo stanje hemostaznog mehanizma prikazano je u radu Tang i sar. (135) čiji podaci govore u prilog visokim vrednostima d-dimera i niskim vrednostima fibrinogena u grupi pacijenata sa negativnim ishodom bolesti. S druge strane kohortna studija Di Micco-a i sar. pokazala je statistički značajan porast koncentracije fibrinogena u trenutku prijema pacijenta u grupi obolelih kod kojih se kasnije razvio ARDS (136). Naša studija je pak pokazala statistički značajnu razliku između grupa pacijenata sa negativnim ishodom u odnosu na preživjele ($p < 0.001$) uz veoma blag uticaj d-dimera na sam ishod bolesti meren nekondicionalnom logističkom regresijom (OR 1.067 95%CI (1.007-1.131) što govori u prilog prethodno navedenim rezultatima studije. Naši uzorci uzimani su od pacijenata u trenutku hospitalizacije pri čemu hipotetički možemo zaključiti da u tom trenutku inflamacija nije dobila

svoj pun oblik da bi narušena ravnoteža hemostaznog mehanizma pokazala izražajni porast vrednosti d-dimera.

Vrednosti aPTT-a i PT-INR-a u našoj studiji pokazali su statistički značajnu razliku u grupi pacijenata sa negativnim ishodom poredeći ovu grupu sa grupom pacijenata kod koje je zabeležen pozitivan ishod bolesti ($p < 0.001$) dok je univarijantna logistička regresija pokazala blag uticaj ovih parametara: aPTT (OR 1.073 95%CI 1,014-1,1359) i PT-INR (OR 1.071 95%CI 1.013-1.133). Do sada objavljene studije dale su različite podatke u pogledu koagulacionih testova kod osoba obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije. Studija Cui S, Li X, Chen S i Wang F. pokazala je produžene vrednosti aPTT i povišene vrednosti d-dimera u grupi pacijenata sa dijagnostikovanom DVT uzrokovanom SARS-CoV-2 virusnom infekcijom (137). S druge strane rad Han H. i sar. (138) nije dokazao statistički značajne razlike u vrednostima aPTT-a i PT-INR-a kod pacijenata obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije.

Konačno, u svrhu globalne procene fibrinoliznog mehanizma i rizika od tromboze u sklopu naše studije vršili smo određivanje euglobulinskog vremena lize koaguluma. S obzirom na neosporni značaj fibrinoliznog mehanizma u održavanju fiziološke funkcionalnosti hemostaznog mehanizma kao i brojnim patofiziološkim mehanizmima kojima njegova disfunkcija doprinosi prilikom nastanka koagulopatija, smatrali smo da njegovo određivanje u sklopu SARS-CoV-2 virusne infekcije može imati određeni značaj i ukazati na mogući razvoj tromboze. Rezultati ispitivanja fibrinoliznog mehanizma u brojnim studijama pokazali su značaj određivanja ovog parametra kod pacijenata sa venskim tromboembolizmom kod kojih se nalaze produžene vrednosti euglobulinskog vremena lize koaguluma koje ukazuju upravo na suprimiranu funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma.

Sama globalna procena fibrinoliznog mehanizma omogućena je razvojem testova kao što su upravo ECLT koji u obzir uzima samo euglobulinsku frakciju, kao i vreme lize koaguluma razblažene cele krvi (DWBCLT). Potrebno je imati na umu da sistemski nivoi fibrinoliznih komponenti nisu uvek dobar pokazatelj lokalnog fibrinoliznog statusa ali kako je COVID-19 sistemsko oboljenje koje zahvata različita tkiva i organe smatrali smo da primena globalne procene fibrinoliznog mehanizma može biti značajan pokazatelj narušenosti hemostaznog mehanizma i objasniti deo nastalih tromboembolijskih komplikacija. Iako nedovoljno specifičan i senzitan, ovaj test je lako dostupan kliničkim laboratorijama i uz kratko obrtno vreme daje brze informacije o funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma pacijenata.

Rezultati naše studije prilikom ispitivanja statističke značajnosti razlika između grupa ispitanika sa pozitivnim i negativnim ishodom oboljenja pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0.001$) između pomenutih ispitivanih grupa. Univarijantna nekondicionalna logistička regresija pokazala je blagu statističku značajnost (OR 1.084 95%CI 1.023-1.160) produženja euglobulinskog vremena lize koaguluma u grupi pacijenata kod kojih je nastupio negativan ishod bolesti. Iako blaga, ova statistička značajnost ipak bila je ubedljivija od ostalih ispitivanih parametara primarne hemostaze i koagulationog mehanizma. Do sada je objavljen određeni broj studija koje su se fokusirale na funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma kod osoba obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije. Iako heterogene po pitanju izbora ispitanika, trenutka kada su ispitanici uključeni u ispitivanje, kao i izbora dijagnostičkih metoda za procenu fibrinoliznog mehanizma, veliki broj njih pokazao je upravo disfunkciju fibrinoliznog mehanizma u ovoj grupi ispitanika. Tako je studija Frenklin L. i sar. (139) primenom tromboelastografije kod pacijenata obolelih od COVID-19 smeštenih u jedinicama intenzivne nege pokazala suprimiranost

fibrinoliznog mehanizma i pokazala se kao dobar prediktor nastanka venskog tromboembolizma u daljem toku oboljenja. Još jedna studija Bachler M. i sar. (140) uspela je da demonstrira suprimiranost fibrinoliznog mehanizma kod obolelih od SARS-CoV-2 primenom sistema ClotPro analizatora koji funkcioniše po principu viskoelastografije pune krvi. Studija Blasi A. i sar. (141) pokazala je da i pored primene antikoagulantne terapije postoji konstantno prisutna trombinska aktivnost kod obolelih uz prisutan suprimiran fibrinolizni mehanizam.

Svesni isprepletenosti same fiziologije hemostaznog mehanizma, međusobne interakcije njegovih različitih komponenti, kao i kompleksnih i još uvek nedovoljno istraženih odnosa samih ćelija, enzima, proteinskih struktura i molekularnih mehanizama genske ekspresije odlučili smo da ispitamo same međusobne odnose svake od ispitivanih komponenti hemostaznog mehanizma, odnosno, primarne hemostaze, koagulacije i fibrinolize. To je podrazumevalo primenu multivarijantne logističke regresije gde smo uvrstili svaki od ispitivanih parametara kako bismo procenili njihovu međusobnu interakciju, isključili pojedine bias-e u studiji i pokušali da dobijemo što jasniju sliku njihovog doprinosa ishodu oboljenja. Konačnim prilagođavanjem rezultati multivarijantne logističke regresije pokazali su da je pre svega naš model dobar prediktor ishoda (Prilagođeni R square 0,447) i to na statistički značajnom nivou ($p < 0.001$), govoreći u prilog tome da predstavljeni regresioni model može da predvidi 44,7% varijanse ishoda. Nakon izvedene statističke obrade euglobulinsko vreme lize koaguluma pokazalo je izrazitu statističku značajnost ($p < 0.001$) i pokazalo se kao jedini relevantnan prediktor ishoda oboljenja.

Iako studiju karakteriše mali broj ispitanika, činjenica je da su uporedne studije sa kojima smo poredili naše rezultate često imale broj ispitanika 2-3 puta manji nego broj ispitanika naše

studije. Trendovi rezultata naše studije govore u prilog određene statističke značajnosti parametara primarne hemostaze i koagulacionog mehanizma što može govoriti u prilog tome da bi veća grupa ispitanika mogla da pokaže i veći statistički značaj ispitivanih parametara. Ipak kako je naša studija pokazala izraziti značaj suprimiranosti fibrinoliznog mehanizma kod osoba obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije u grupi ispitanika kod kojih je uočen negativan ishod bolesti, možemo pretpostaviti da je globalna procena fibrinoliznog mehanizma dobar prediktor ishoda oboljenja i njeno rutinsko određivanje u trenutku prijema na bolničko lečenje može omogućiti bolju stratifikaciju rizika i skrenuti pažnju na osobe kod kojih je moguć razvoj poremećaja hemostaznog mehanizma u pravcu koagulopatije.

6. Zaključak

Naše istraživanje bilo je pokušaj da se stekne uvid i identifikuju potencijalni pokazatelji povećanog rizika za nastanak tromboembolijskih komplikacija na osnovu parametara primarne hemostaze, koagulacionog i fibrinoliznog mehanizma.

Rezultati ove studije još jednom su pokazali značaj fibrinoliznog mehanizma u regulaciji celokupnog hemostaznog mehanizma i pokazali potencijalnu korist od određivanja euglobulinskog vremena lize koaguluma kao pokazatelja globalne procene fibrinoliznog mehanizma kod osoba obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije u trenutku prijema na bolničko lečenje kod kojih je došlo do razvoja tromboznih komplikacija i negativnog ishoda.

1. Pacijenti oboleli od SARS-CoV-2 virusne infekcije, koji imaju suprimiranu primarnu hemostazu imaju veći rizik od nastanka smrtnog ishoda i tromboznih komplikacija u poređenju sa pacijentima obolelim od ove infekcije koji imaju fiziološki nivo funkcionalnosti primarne hemostaze.
2. Poremećaj funkcionalnosti koagulacionog mehanizma u pravcu hiperkoagulabilnosti kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije povećava rizik od nastanka tromboznih komplikacija i smrtnog ishoda.
3. Suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma povećava rizik od nastanka tromboznih komplikacija i smrtnog ishoda kod obolelih od SARS-CoV-2 virusne infekcije.

7. Literatura:

1. Borota Radoslav, Ćurić Nikola, Dujmović Ferenc, Đerić Mirjana, Mitić Gorana, Stošić Zoran. Osnovi kliničke patofiziologije. Vol. 600. Novi Sad: Biblioteka Matice srpske; 2012.
2. Hoffman M, Monroe D, Oliver J, Roberts H. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood*. 1995 Sep 1;86(5).
3. Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *British Journal of Haematology*. 1994 Oct;88(2).
4. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cells to platelets. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 1996 Jun;7(4).
5. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 1989 [cited 2021 Jul 18];134(5):1087. Available from: [/pmc/articles/PMC1879887/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1879887/)
6. JB S, CM I, MJ S. Platelet prostaglandin production and its implications. *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research* [Internet]. 1976 Jan 1 [cited 2021 Jul 18];2:747–53. Available from: <https://europepmc.org/article/med/983875>
7. Hantgan R, Hindriks G, Taylor R, Sixma J, de Groot P. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood*. 1990 Jul 15;76(2):345–53.
8. Kainoh M, Ikeda Y, Nishio S, Nakadate T. Glycoprotein Ia/IIa-mediated activation-dependent platelet adhesion to collagen. *Thrombosis Research*. 1992 Jan 15;65(2):165–76.
9. Tong M, Seth P, Penington D. Proplatelets and stress platelets. *Blood* [Internet]. 1987 Feb 1 [cited 2021 Jul 18];69(2):522–8. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/69/2/522/596051/522.pdf>
10. Mechanisms of Platelet Activation and Control - Google Књиге [Internet]. [cited 2021 Jul 18]. Available from: https://books.google.rs/books?hl=sr&lr=&id=PAjrBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Authi+KS,+Watson+SP,+Kakkar+W.+Mechanisms+of+platelet+activation.+New+York:+Academic+Press,+1993.&ots=zA-S8Y3JEM&sig=gxhBARjuStLq-_cj9QBTsiwQml0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
11. Hoffman M, Monroe DM. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2017 Dec 12 [cited 2021 Jul 19];85(06):958–65. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0037-1615947>
12. Hoffman M, Monroe D, Oliver J, Roberts H. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* [Internet]. 1995 Sep 1 [cited 2021 Jul 19];86(5):1794–801. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/86/5/1794/617069/1794.pdf>
13. Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *British Journal of Haematology* [Internet]. 1994 Oct 1 [cited 2021 Jul

- 19];88(2):364–71. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.1994.tb05032.x>
14. Rao L v, Rapaport SI. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 1988 Sep 1 [cited 2021 Jul 19];85(18):6687–91. Available from: <https://www.pnas.org/content/85/18/6687>
 15. HOFFMAN M, COLINA CM, MCDONALD AG, AREPALLY GM, PEDERSEN L, MONROE DM. Tissue factor around dermal vessels has bound factor VII in the absence of injury. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2021 Jul 19];5(7):1403–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2007.02576.x>
 16. Rawala-Sheikh R, Ahmad S, Monroe D, Roberts H, Walsh P. Role of gamma-carboxyglutamic acid residues in the binding of factor IXa to platelets and in factor-X activation. *Blood* [Internet]. 1992 Jan 15 [cited 2021 Jul 19];79(2):398–405. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/79/2/398/606036/398.pdf>
 17. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of α -granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*. 2000 Mar 1;95(5):1694–702.
 18. Mazepa M, Hoffman M, Monroe D. Superactivated Platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Jul 19];33(8):1747–52. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/ATVBAHA.113.301790>
 19. Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood* [Internet]. 2000 Oct 1 [cited 2021 Jul 19];96(7):2469–78. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/96/7/2469/1668295/h8190002469.pdf>
 20. Lechtenberg BC, Freund SMV, Huntington JA. Gplb α Interacts Exclusively with Exosite II of Thrombin. *Journal of Molecular Biology*. 2014 Feb 20;426(4):881–93.
 21. Mosnier LO, Elisen MGLM, Bouma BN, Meijers JCM. Protein C Inhibitor Regulates the Thrombin-Thrombomodulin Complex in the Up- and Down Regulation of TAFI Activation. *Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2017 Dec 9 [cited 2021 Jul 19];86(10):1057–64. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0037-1616533>
 22. LORAND L. Factor XIII: Structure, Activation, and Interactions with Fibrinogen and Fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2021 Jul 19];936(1):291–311. Available from: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03516.x>
 23. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2021 Jul 19];1(7):1504–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1538-7836.2003.00298.x>

24. HACKENG TM, MAURISSEN LFA, CASTOLDI E, ROSING J. Regulation of TFPI function by protein S. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2009 [cited 2021 Jul 20];7(SUPPL. 1):165–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2009.03363.x>
25. RAU JC, BEAULIEU LM, HUNTINGTON JA, CHURCH FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2007 [cited 2021 Jul 20];5(SUPPL. 1):102–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2007.02516.x>
26. CASTELLINO FJ, PLOPLIS VA. The protein C pathway and pathologic processes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2009 [cited 2021 Jul 20];7(SUPPL. 1):140–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2009.03410.x>
27. Zhang L, Seiffert D, Fowler BJ, Jenkins GR, Thinnis TC, Loskutoff DJ, et al. Plasminogen Has a Broad Extrahepatic Distribution. *Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2017 Dec 14 [cited 2021 Jul 24];87(03):493–501. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0037-1613030>
28. TWINING SS, WILSON PM, NGAMKITIDECHAKUL C. Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-1 α and -1 β . *Biochemical Journal* [Internet]. 1999 May 1 [cited 2021 Jul 24];339(3):705–12. Available from: </biochemj/article/339/3/705/34940/Extrahepatic-synthesis-of-plasminogen-in-the-human>
29. Highsmith RF, Kline DL. Kidney: Primary Source of Plasminogen after Acute Depletion in the Cat. *Science* [Internet]. 1971 Oct 8 [cited 2021 Jul 24];174(4005):141–2. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/174/4005/141>
30. Raum D, Marcus D, Alper C, Levey R, Taylor P, Starzl T. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* [Internet]. 1980 May 30 [cited 2021 Jul 24];208(4447):1036–7. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/208/4447/1036>
31. Sjöholm I, Wiman B, Walléan P. Studies on the Conformational Changes of Plasminogen Induced during Activation to Plasmin and by 6-Aminoheptanoic Acid. *European Journal of Biochemistry* [Internet]. 1973 Nov 1 [cited 2021 Jul 24];39(2):471–9. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03146.x>
32. Urano T, Chibber BA, Castellino FJ. The reciprocal effects of epsilon-aminoheptanoic acid and chloride ion on the activation of human [Glu1]plasminogen by human urokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 1987 Jun 1 [cited 2021 Jul 24];84(12):4031–4. Available from: <https://www.pnas.org/content/84/12/4031>
33. Mangel W, Lin B, Ramakrishnan V. Characterization of an extremely large, ligand-induced conformational change in plasminogen. *Science* [Internet]. 1990 Apr 6 [cited 2021 Jul 24];248(4951):69–73. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/248/4951/69>
34. Novokhatny V. Structure and activity of plasmin and other direct thrombolytic agents. *Thrombosis Research*. 2008 Jan 1;122(SUPPL. 3):S3–8.

35. Loscalzo J, Braunwald E. Tissue Plasminogen Activator. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198810063191407> [Internet]. 2010 Jan 14 [cited 2021 Jul 25];319(14):925–31. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/nejm198810063191407>
36. Smith D, Gilbert M, Owen W. Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents. *Blood* [Internet]. 1985 Oct 1 [cited 2021 Jul 25];66(4):835–9. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/66/4/835/593669/835.pdf>
37. Egberg N, Gallimore M, Gréen K, Jakobsson J, Vesterqvist O, Wiman B. Effects of plasma kallikrein and bradykinin infusions into pigs on plasma fibrinolytic variables and urinary excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites. *Fibrinolysis*. 1988 Apr 1;2(2):101–6.
38. Madison EL, Goldsmith EJ, Gerard RD, Gething MJ, Sambrook JF, Bassel-Duby RS. Amino acid residues that affect interaction of tissue-type plasminogen activator with plasminogen activator inhibitor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(9).
39. Duffy M. The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. *Current Pharmaceutical Design*. 2005 Mar 23;10(1):39–49.
40. Husain SS, Gurewich V, Lipinski B. Purification and partial characterization of a single-chain high-molecular-weight form of urokinase from human urine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1983 Jan 1;220(1):31–8.
41. Manchanda N, Schwartz BS. Lipopolysaccharide-induced modulation of human monocyte urokinase production and activity. *The Journal of Immunology*. 1990;145(12).
42. Grau E, Moroz LA. Fibrinolytic activity of normal human blood monocytes. *Thrombosis Research*. 1989 Jan 15;53(2):145–62.
43. M N. Fibrinolysis and the plasma carboxypeptidase. *Current Opinion in Hematology* [Internet]. 1998 Sep 1 [cited 2021 Jul 25];5(5):309–13. Available from: <https://europepmc.org/article/med/9776208>
44. Collen D. On the Regulation and Control of Fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2018 Jul 13 [cited 2021 Jul 25];43(02):077–89. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1650023>
45. Johnson SA, Schneider CL. The Existence of Antifibrinolysin Activity in Platelets. *Science* [Internet]. 1953 Feb 27 [cited 2021 Jul 26];117(3035):229–30. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/117/3035/229>
46. Booth NA, Simpson AJ, Croll A, Bennett B, MacGregor IR. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *British Journal of Haematology* [Internet]. 1988 Nov 1 [cited 2021 Jul 26];70(3):327–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.1988.tb02490.x>
47. Kruithof EKO, Gudinchet A, Bachmann F. Plasminogen Activator Inhibitor 1 and Plasminogen Activator Inhibitor 2 in Various Disease States. *Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2018 Apr

- 18 [cited 2021 Jul 26];59(01):007–12. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1642556>
48. Declerck PJ, de Mol M, Alessi MC, Baudner S, Paques EP, Preissner KT, et al. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). *Journal of Biological Chemistry*. 1988 Oct 25;263(30):15454–61.
49. KAWANO T, MORIMOTO K, UEMURA Y. Partial Purification and Properties of Urokinase Inhibitor from Human Placenta. *The Journal of Biochemistry* [Internet]. 1970 Mar 1 [cited 2021 Jul 26];67(3):333–42. Available from: <https://academic.oup.com/jb/article/67/3/333/800156>
50. Bajzar L, Nesheim M, Morser J, Tracy PB. Both Cellular and Soluble Forms of Thrombomodulin Inhibit Fibrinolysis by Potentiating the Activation of Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor *. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1998 Jan 30 [cited 2021 Jul 26];273(5):2792–8. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925818949616/fulltext>
51. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or Plasma Procarboxypeptidase B, Couples the Coagulation and Fibrinolytic Cascades through the Thrombin-Thrombomodulin Complex *. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1996 Jul 12 [cited 2021 Jul 26];271(28):16603–8. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925818319185/fulltext>
52. M N. Fibrinolysis and the plasma carboxypeptidase. *Current Opinion in Hematology* [Internet]. 1998 Sep 1 [cited 2021 Jul 26];5(5):309–13. Available from: <https://europepmc.org/article/med/9776208>
53. Salvesen GS, Catanese JJ, Kress LF, Travis J. Primary structure of the reactive site of human C1-inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. 1985 Feb 25;260(4):2432–6.
54. Gurewich V, Pannell R. Recombinant human C1-inhibitor prevents non-specific proteolysis by mutant pro-urokinase during optimal fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2017 Nov 22 [cited 2021 Jul 28];102(08):279–86. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1160/TH08-09-0598>
55. Travis J, Salvesen GS. HUMAN PLASMA PROTEINASE INHIBITORS. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi52070183003255> [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2021 Jul 28];Vol. 52:655–709. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.52.070183.003255>
56. Sottrup-Jensen L, Lonblad PB, Jones CM, Stepanik TM. Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. II. Primary structure of eight CNBr fragments located in the NH₂-terminal half of alpha 2-macroglobulin, accounting for 603 amino acid residues. *Journal of Biological Chemistry*. 1984 Jul 10;259(13):8304–9.
57. Miles LA, Fless GM, Levin EG, Scanu AM, Plow EF. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). *Nature* 1989 339:6222 [Internet]. 1989 [cited 2021 Jul 28];339(6222):301–3. Available from: <https://www.nature.com/articles/339301a0>

58. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. 2005 May;129(3):307–21.
59. Braaten J, Handt S, Jerome W, Kirkpatrick J, Lewis J, Hantgan R. Regulation of fibrinolysis by platelet-released plasminogen activator inhibitor 1: light scattering and ultrastructural examination of lysis of a model platelet-fibrin thrombus. *Blood* [Internet]. 1993 Mar 1 [cited 2021 Jul 30];81(5):1290–9. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/81/5/1290/609126/1290.pdf>
60. Dujmović F, Stošić Z, Đerić M. *Praktikum iz patološke fiziologije*. 68th ed. Vol. 600. Novi Sad: Biblioteka Matice srpske; 2012.
61. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Trends in the Incidence of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: A 25-Year Population-Based Study. *Archives of Internal Medicine* [Internet]. 1998 Mar 23 [cited 2021 Jul 30];158(6):585–93. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/191629>
62. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. *Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Jul 30];98(10):756–64. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1160/TH07-03-0212>
63. NÆSS IA, CHRISTIANSEN SC, ROMUNDSTAD P, CANNEGIETER SC, ROSENDAAL FR, HAMMERSTRØM J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2021 Jul 30];5(4):692–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2007.02450.x>
64. Heit JA, Mohr DN, Silverstein MD, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Predictors of Recurrence After Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: A Population-Based Cohort Study. *Archives of Internal Medicine* [Internet]. 2000 Mar 27 [cited 2021 Jul 30];160(6):761–8. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/485265>
65. Heit JA, Mohr DN, Silverstein MD, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Predictors of Recurrence After Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: A Population-Based Cohort Study. *Archives of Internal Medicine* [Internet]. 2000 Mar 27 [cited 2021 Jul 30];160(6):761–8. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/485265>
66. Kahn SR, Ginsberg JS. Relationship Between Deep Venous Thrombosis and the Postthrombotic Syndrome. *Archives of Internal Medicine* [Internet]. 2004 Jan 12 [cited 2021 Jul 30];164(1):17–26. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/216501>
67. Muniyappa R, Gubbi S. COVID-19 pandemic, coronaviruses, and diabetes mellitus. <https://doi.org/10.1152/ajpendo001242020> [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Aug 1];318(5):E736–41. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpendo.00124.2020>
68. Fauci AS, Lane HC, Redfield RR. Covid-19 — Navigating the Uncharted. <https://doi.org/10.1056/NEJMe2002387> [Internet]. 2020 Feb 28 [cited 2021 Aug 1];382(13):1268–9. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejme2002387>

69. Shanker A. The Possible Origins of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. 2020 [cited 2021 Aug 1]; Available from: <https://osf.io/a83r4/>
70. Lorusso A, Calistri P, Petrini A, ... GS-V, 2020 undefined. Novel coronavirus (SARS-CoV-2) epidemic: a veterinary perspective. *veterinariaitaliana.izs.it* [Internet]. [cited 2021 Aug 1];2020(1):5–10. Available from: <https://www.veterinariaitaliana.izs.it/index.php/VetItt/article/download/2173/665>
71. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020 Feb 22;395(10224):565–74.
72. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6.
73. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* [Internet]. 2020 Mar 27 [cited 2021 Aug 2];367(6485):1444–8. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/367/6485/1444>
74. Gralinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* 2020, Vol 12, Page 135 [Internet]. 2020 Jan 24 [cited 2021 Aug 2];12(2):135. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/2/135/htm>
75. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003 426:6965 [Internet]. 2003 Nov 27 [cited 2021 Aug 3];426(6965):450–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature02145>
76. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* 2020 26:4 [Internet]. 2020 Mar 17 [cited 2021 Aug 3];26(4):450–2. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0820-9>
77. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez- Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2020 Sep 1;98(1):115094.
78. Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, Shy BR, Yu R, Yamamoto TN, et al. Test performance evaluation of SARS-CoV-2 serological assays. *Nature biotechnology* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Aug 3];38(10):1174. Available from: </pmc/articles/PMC7740072/>
79. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):507–13.
80. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*. 2011 Apr 1;174(1):11–22.

81. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497–506.
82. He X, Zhang Z, Zheng J, Zhu Z. One patient with an anomalous origin of the left pulmonary artery directly from the right ventricle: a case report. *European Heart Journal - Case Reports* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Aug 5];4(6):1–4. Available from: <https://academic.oup.com/ehjcr/article/4/6/1/5956362>
83. Zhao X, Sehgal M, Hou Z, Cheng J, Shu S, Wu S, et al. Identification of Residues Controlling Restriction versus Enhancing Activities of IFITM Proteins on Entry of Human Coronaviruses. *Journal of Virology* [Internet]. 2018 Mar 15 [cited 2021 Aug 6];92(6):1535–52. Available from: <https://doi.org/10.1128/JVI.01535-17>.
84. Hur S. Double-Stranded RNA Sensors and Modulators in Innate Immunity. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041356> [Internet]. 2019 Jan 23 [cited 2021 Aug 6];37:349–75. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-042718-041356>
85. Chen J, Subbarao K. The Immunobiology of SARS*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol25022106141706> [Internet]. 2007 Mar 21 [cited 2021 Aug 6];25:443–72. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141706>
86. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, Møller R, Panis M, Sachs D, et al. SARS-CoV-2 launches a unique transcriptional signature from in vitro, ex vivo, and in vivo systems. *bioRxiv* [Internet]. 2020 Mar 24 [cited 2021 Aug 6];2020.03.24.004655. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.24.004655v1>
87. Manjili RH, Zarei M, Habibi M, Manjili MH. COVID-19 as an Acute Inflammatory Disease. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Aug 6];205(1):12–9. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/205/1/12>
88. Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *The Lancet Respiratory Medicine* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Aug 6];8(6):e46–7. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2213260020302162/fulltext>
89. Clay C, Donart N, Fomukong N, Knight JB, Lei W, Price L, et al. Primary Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Limits Replication but Not Lung Inflammation upon Homologous Rechallenge. *Journal of Virology* [Internet]. 2012 Apr 15 [cited 2021 Aug 6];86(8):4234–44. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jvi>
90. Conti P, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Frydas I, et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Aug 25];34(2):327–31. Available from: <https://covid19.elsevierpure.com/en/publications/induction-of-pro-inflammatory-cytokines-il-1-and-il-6-and-lung-in>

91. Green AM, DiFazio R, Flynn JL. IFN- γ from CD4 T Cells Is Essential for Host Survival and Enhances CD8 T Cell Function during Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2021 Aug 29];190(1):270–7. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/190/1/270>
92. X C, B Z, Y Q, Y C, J X, Y F, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Aug 29];71(8):1937–42. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC7184354>
93. Chen W, Lan Y, Yuan X, Deng X, Li Y, Cai X, et al. Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity. <https://doi.org/10.1080/2222175120201732837> [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Aug 29];9(1):469–73. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/22221751.2020.1732837>
94. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497–506.
95. Weiler H. Regulation of inflammation by the protein C system. *Critical Care Medicine* [Internet]. 2010 [cited 2021 Aug 25];38(SUPPL. 2). Available from: https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2010/02001/Regulation_of_inflammation_by_the_protein_C_system.4.aspx
96. Esmon CT. Inflammation and the Activated Protein C Anticoagulant Pathway. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [Internet]. 2006 May 2 [cited 2021 Aug 25];32(S 1):049–60. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2006-939554>
97. Willicombe M, Moss J, Moran L, Brookes P, Santos-Nunez E, McLean AG, et al. Tubuloreticular Inclusions in Renal Allografts Associate with Viral Infections and Donor-Specific Antibodies. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Aug 29];27(7):2188–95. Available from: <https://jasn.asnjournals.org/content/27/7/2188>
98. Sharma A, Garcia G, Wang Y, Plummer JT, Morizono K, Arumugaswami V, et al. Human iPSC-Derived Cardiomyocytes Are Susceptible to SARS-CoV-2 Infection. *Cell Reports Medicine*. 2020 Jul 21;1(4):100052.
99. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2007 Apr 10 [cited 2021 Aug 29];104(15):6388–93. Available from: <https://www.pnas.org/content/104/15/6388>
100. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in immunopathology* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Mar 14];39(5):517–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28555385/>
101. Harzallah I, Debliquis A, Drénou B. Lupus anticoagulant is frequent in patients with Covid-19: Response to Reply. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2021 Aug 30]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.14980>

102. McFadyen JD, Stevens H, Peter K. The Emerging Threat of (Micro)Thrombosis in COVID-19 and Its Therapeutic Implications. *Circulation Research* [Internet]. 2020 Jul 31 [cited 2021 Aug 30];127(4):571–87. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.120.317447>
103. Bösmüller H, Traxler S, Bitzer M, Häberle H, Raiser W, Nann D, et al. The evolution of pulmonary pathology in fatal COVID-19 disease: an autopsy study with clinical correlation. *Virchows Archiv* 2020 477:3 [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2021 Aug 30];477(3):349–57. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00428-020-02881-x>
104. Ranucci M, Ballotta A, Dedda U di, Baryshnikova E, Poli MD, Resta M, et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Aug 30];18(7):1747–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.14854>
105. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators. <http://dx.doi.org/101146/annurev.biochem.69.1.419> [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2021 Aug 30];69:419–45. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.69.1.419>
106. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of Platelet-Activating Factor in Cardiovascular Pathophysiology. <https://doi.org/101152/physrev20008041669> [Internet]. 2000 [cited 2021 Aug 30];80(4):1669–99. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.2000.80.4.1669>
107. Kelesidis T, Papakonstantinou V, Detopoulou P, Fragopoulou E, Chini M, Lazanas MC, et al. The Role of Platelet-Activating Factor in Chronic Inflammation, Immune Activation, and Comorbidities Associated with HIV Infection. *AIDS reviews* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 30];17(4):191. Available from: </pmc/articles/PMC5056589/>
108. Garcia CC, Russo RC, Guabiraba R, Fagundes CT, Polidoro RB, Tavares LP, et al. Platelet-Activating Factor Receptor Plays a Role in Lung Injury and Death Caused by Influenza A in Mice. *PLOS Pathogens* [Internet]. 2010 Nov [cited 2021 Aug 30];6(11):e1001171. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1001171>
109. Neuwirth R, Satriano JA, DeCandido S, Clay K, Schlondorff D. Angiotensin II causes formation of platelet activating factor in cultured rat mesangial cells. *Circulation Research* [Internet]. 1989 [cited 2021 Aug 30];64(6):1224–9. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.RES.64.6.1224>
110. Golshiri K, Ataabadi EA, Fernandez ECP, Danser AHJ, Roks AJM. The importance of the nitric oxide-cGMP pathway in age-related cardiovascular disease: Focus on phosphodiesterase-1 and soluble guanylate cyclase. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Aug 30];127(2):67–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.13319>
111. Hottz ED, Bozza FA, Bozza PT. Platelets in Immune Response to Virus and Immunopathology of Viral Infections. *Frontiers in Medicine*. 2018 Apr 1;0(APR):121.

112. Camera M, Toschi V, Brambilla M, Lettino M, Rossetti L, Canzano P, et al. The Role of Tissue Factor in Atherothrombosis and Coronary Artery Disease: Insights into Platelet Tissue Factor. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [Internet]. 2015 Sep 26 [cited 2021 Aug 30];41(07):737–46. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0035-1564041>
113. Manne BK, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood* [Internet]. 2020 Sep 10 [cited 2021 Aug 30];136(11):1317–29. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/136/11/1317/1757264/bloodbld2020007214.pdf>
114. Kruithof EKO, Gudinchet A, Bachmann F. Plasminogen Activator Inhibitor 1 and Plasminogen Activator Inhibitor 2 in Various Disease States. *Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2018 Apr 18 [cited 2021 Sep 7];59(01):007–12. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1642556>
115. Samson AL, Knaupp AS, Sashindranath M, Borg RJ, Au AEL, Cops EJ, et al. Nucleocytoplasmic Coagulation: An Injury-Induced Aggregation Event that Disulfide Crosslinks Proteins and Facilitates Their Removal by Plasmin. *Cell Reports*. 2012 Oct 25;2(4):889–901.
116. Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S. Effect of Plasminogen Activator (Urokinase), Plasmin, and Thrombin on Glycoprotein and Collagenous Components of Basement Membrane. *Cancer Research*. 1981;41(11 Part 1).
117. Moore HB, Moore EE, Gonzalez E, Chapman MP, Chin TL, Silliman CC, et al. Hyperfibrinolysis, physiologic fibrinolysis, and fibrinolysis shutdown: The spectrum of postinjury fibrinolysis and relevance to antifibrinolytic therapy. *The journal of trauma and acute care surgery* [Internet]. 2014 Dec 11 [cited 2021 Sep 7];77(6):811. Available from: </pmc/articles/PMC4370273/>
118. Mehta JL, Calcaterra G, Bassareo PP. COVID-19, thromboembolic risk, and Virchow's triad: Lesson from the past. *Clinical Cardiology* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Oct 28];43(12):1362–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/clc.23460>
119. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2021 Dec 25];382(18):1708–20. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejMoa2002032>
120. Helms J, Tacquard C, Severac F, Leonard-Lorant I, Ohana M, Delabranche X, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Medicine* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 25];46(6):1089–98. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00134-020-06062-x>
121. Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, et al. Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19. <https://doi.org/10.7326/M20-2003> [Internet]. 2020 May 6 [cited 2021 Dec 26];173(4):268–77. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/M20-2003>
122. Edler C, Schröder AS, Aepfelbacher M, Fitzek A, Heinemann A, Heinrich F, et al. Dying with SARS-CoV-2 infection—an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany.

- International journal of legal medicine [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Dec 26];134(4):1275–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32500199/>
123. Elsoukary SS, Mostyka M, Dillard A, Berman DR, Ma LX, Chadburn A, et al. Autopsy Findings in 32 Patients with COVID-19: A Single-Institution Experience. *Pathobiology* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Dec 26];88(1):56–68. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/511325>
 124. Barrett TJ, Schlegel M, Zhou F, Gorenchtein M, Bolstorff J, Moore KJ, et al. Platelet regulation of myeloid suppressor of cytokine signaling 3 accelerates atherosclerosis. *Science Translational Medicine* [Internet]. 2019 Nov 6 [cited 2021 Dec 27];11(517). Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/scitranslmed.aax0481>
 125. Yang M, Ng MHL, Chi KL. Thrombocytopenia in patients with severe acute respiratory syndrome (review). <https://doi.org/101080/10245330400026170> [Internet]. 2013 Apr [cited 2021 Dec 27];10(2):101–5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10245330400026170>
 126. Zhao X, Wang K, Zuo P, Liu Y, Zhang M, Xie S, et al. Early decrease in blood platelet count is associated with poor prognosis in COVID-19 patients—indications for predictive, preventive, and personalized medical approach. *The EPMA Journal* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 27];11(2):139. Available from: </pmc/articles/PMC7224348/>
 127. Polat E, Demir MC. Platelet Indices' Usefulness in Determining whether Patients with COVID-19 Should be Treated as an Outpatient or Inpatient: a Retrospective Study. *Clinical Laboratory* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2021 Dec 27];67(7):1662–7. Available from: <https://europepmc.org/article/med/34258979>
 128. Daniels S, Wei H, Denning DW. Platelet size as a predictor for severity and mortality in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *medRxiv* [Internet]. 2021 Jul 19 [cited 2021 Dec 28];2021.07.15.21260576. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.07.15.21260576v1>
 129. Huang HL, Chen CH, Kung C te, Li YC, Sung PH, You HL, et al. Clinical utility of mean platelet volume and immature platelet fraction in acute coronary syndrome. *Biomedical Journal*. 2019 Apr 1;42(2):107–15.
 130. Thompson C, Jakubowski J, Quinn P, Deykin D, Valeri C. Platelet Size and Age Determine Platelet Function Independently. *Blood*. 1984 Jun 1;63(6):1372–5.
 131. Bhandary CP, Agarkar PL, Manivannan P, Kar R, Basu D. Hematological parameters in covid-19 illness: Emphasis on platelet indices as a marker of severity of disease. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* [Internet]. 2020 Nov [cited 2021 Dec 28];36(S1):S128–S128. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12288-020-01384-8>
 132. Heinz C, Miesbach W, Herrmann E, Sonntagbauer M, Raimann FJ, Zacharowski K, et al. Greater Fibrinolysis Resistance but No Greater Platelet Aggregation in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesthesiology* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Dec 28];134(3):457–67. Available from: <http://pubs.asahq.org/anesthesiology/article-pdf/134/3/457/512454/20210300.0-00019.pdf>

133. Kanth Manne B, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood* [Internet]. 2020 Sep 10 [cited 2021 Dec 28];136(11):1317–29. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/136/11/1317/1757264/bloodbld2020007214.pdf>
134. Thachil J. The protective rather than prothrombotic fibrinogen in COVID-19 and other inflammatory states. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Dec 28];18(8):1849–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.14942>
135. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Dec 28];18(4):844–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32073213/>
136. di Micco P, Russo V, Carannante N, Imperato M, Cardillo G, Lodigiani C. Prognostic Value of Fibrinogen among COVID-19 Patients Admitted to an Emergency Department: An Italian Cohort Study. *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol 9, Page 4134 [Internet]. 2020 Dec 21 [cited 2021 Dec 28];9(12):4134. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/12/4134/htm>
137. Cui S, Chen S, Li X, Liu S, Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 28];18(6):1421–4. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.14830>
138. Han H, Yang L, Liu R, Liu F, Liu F, Wu KL, et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Dec 28];58(7):1116–20. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2020-0188/html>
139. Wright FL, Vogler TO, Moore EE, Moore HB, Wohlauer M v., Urban S, et al. Fibrinolysis Shutdown Correlation with Thromboembolic Events in Severe COVID-19 Infection. *Journal of the American College of Surgeons*. 2020 Aug 1;231(2):193-203.e1.
140. Bachler M, Bösch J, Stürzel DP, Hell T, Giebl A, Ströhle M, et al. Impaired fibrinolysis in critically ill COVID-19 patients. *British Journal of Anaesthesia*. 2021 Mar 1;126(3):590–8.
141. Blasi A, von Meijenfeldt FA, Adelmeijer J, Calvo A, Ibañez C, Perdomo J, et al. In vitro hypercoagulability and ongoing in vivo activation of coagulation and fibrinolysis in COVID-19 patients on anticoagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 29];18(10):2646–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.15043>

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Специфичности хемостазног механизма код оболелих од SARS-CoV-2 вирусне инфекције
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Клинички центар Војводине-Covid јединице б) Клинички центар Војводине-Центар за лабораторијску медицину в) Завод за лабораторијску дијагностику Медлаб
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије-смер клиничка истраживања
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Испитивање је коципирано у виду проспективне студије. Током њене израде извршено је регрутовање 60 пацијената са RT-PCR потврђеном инфекцијом SARS-CoV-2, хоспитализованих иницијално у COVID јединицама Клиничког центра Војводине који су испунили услове за укључивање у студију. Приликом регрутовања пацијената изузети су они пацијенти који су се већ налазили у јединицама интензивне неге као и пацијенти који су испуњавали један од критеријума за искључење из студије.</p> <p>За потребе истраживања коришћени су основни анамнестички подаци, уочене клиничке манифестације као и подаци о примењеној терапији и исходу обољења, добијени увидом у медицинску документацију испитаника.</p> <p>Поред анамнестичких података коришћени су и подаци лабораторијских анализа узорака пацијената добијених флеботомијом и анализирањем узорака пуне хепаринизираних крви као анализом EDTA крви и цитратне плазме.</p>
<p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p>

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту _____

г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: навести врсту Узорци пацијената добијених флеботомијом и анализирањем узорака пуне хепаринизираних крви као анализом EDTA крви и цитратне плазме.

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) текст, навести врсту _____

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека

б) SPSS фајл, датотека .sav

в) PDF фајл, датотека .pdf

г) Текст фајл, датотека .doc; .docx

д) JPG фајл, датотека .jpg

е) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли 11

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) 60

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је _____
- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип: **израда докторске дисертације**
- б) корелационо истраживање, навести тип: **проспективно**
- ц) анализа текста, навести тип: **прикупљање података из литературе**
- д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Анамнестички подаци испитаника прикупљени су увидом у медицинску документацију путем болничког инфомрационог система.

Резултати лабораторијских испитивања су унети директно у матрицу

Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода и њиховом валидацијом.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је вршена вишеструким личним проверавањем и незаивном провером од стране ментора. Након тога су подаци уношени у матрицу

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у _____ репозиторијум.

3.1.2. URL адреса адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertation.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) **Да**

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? **Да Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? **Да Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? **Да Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Етичка комисија Клиничког вентра Војводине

25.2.2021. Етичка комисија Клиничког центра Војводине

17.3. 2021. Етичка комисија Медицинског факултета у Новом Саду.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? **Да Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни (након објављивања појединих публикација)

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално - без прераде. Дозвољава се умножавање, дистрибуција и јавно саопштавање дела, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце.)

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Игор Спасић

igsp92@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Игор Спасић

igsp92@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Игор Спасић

igsp92@gmail.com