

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marko D. Marković

POVEZANOST MARKERA INFLAMACIJE I
POLIMORFIZAMA GENA ZA PROTEINE
UKLJUČENE U REGULACIJU REDOKS
HOMEOSTAZE SA TEŽINOM KLINIČKE SLIKE I
PROGNOZOM TOKA BOLESTI KOD
BOLESNIKA SA COVID-19

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Marko D. Marković

THE ASSOCIATION OF INFLAMMATORY
MARKERS AND GENE POLYMORPHISMS OF
PROTEINS INVOLVED IN THE REGULATION
OF REDOX HOMEOSTASIS WITH THE
SEVERITY AND THE PROGNOSIS OF
DISEASE COURSE IN PATIENTS WITH
COVID-19

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

MENTOR 1:**Prof. dr Jovan Ranin**

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Klinika za infektivne i tropske bolesti, Univerzitetski klinički centar Srbije

MENTOR 2:**Prof. dr Marija Matić**

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Institut za medicinsku i kliničku biohemiju

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Goran Stevanović**, redovni profesor na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu, predsednik komisije
2. **Prof. dr Tatjana Đukić**, vanredni profesor na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu, član komisije
3. **Doc. dr Vesna Ćorić**, docent na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu, član komisije
4. **Doc. dr Marko Ercegovac**, docent na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu, član komisije
5. **Prof. dr Daniela Marić**, redovni profesor na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, član komisije

Datum odbrane doktorske disertacije:

, Beograd.

Posvećeno Vesni i Dobrivoju.

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem mojim mentorima:

Prof. dr Jovanu Raninu, na dobronamernosti i izuzetnoj privatnoj i profesionalnoj podršci,

Prof. dr Mariji Matić, na strpljenju i neizmernoj pomoći tokom izrade ove disertacije.

Zahvalan sam mojim učiteljima:

Prof. dr Goranu Stevanoviću, na nenadmašnoj pragmatičnosti i sposobnosti rasuđivanja,

Prof. dr Ivani Milošević, na neverovatnoj dobroti i blagonaklonosti.

Zahvalan sam *Doc. dr Vesni Ćorić*, na pravom prijateljstvu.

Veliko hvala *Prof. dr Danieli Marić*, na inspiraciji i entuzijazmu.

Posebno sam zahvalan *Prof. dr Tatjani Simić*, na pruženoj prilici i ukazanom poverenju.

Neizmerno sam zahvalan Timu koji je postavio temelje za moje istraživanje: *Prof. dr Mariji Plješi Ercegovac*, *Prof. dr Tatjani Đukić*, *Prof. dr Ani Savić Radojević*, *Asistentkinji dr sci med Đurđi Jerotić*, *dr Neveni Todorović*, *Doc. dr Marku Ercegovcu*, *Prof. dr Miliki Ašaninu* i *laborantkinji Msc. Sanji Sekulić*, kao i *Prof. dr Zoranu Bukumiriću*, na nesebičnoj pomoći.

Izuzetnu zahvalnost dugujem *Prof. dr Maji Stanojević*, na beskrajnom razumevanju i stručnoj pomoći u izradi ove disertacije.

Hvala *dr Ivanu Rajkoviću*, što je bio tu za mene na pravom mestu u pravo vreme.

Zahvaljujem se i svim pacijentima, učesnicima u istraživanju, na spremnosti i želji da daju doprinos nauci.

Takođe se zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja iz ove doktorske disertacije:

Prof. dr Jovan Ranin – supervizija, sakupljanje biološkog materijala i podataka, pisanje – recenzija i uređivanje

Prof. dr Zoran Bukumirić – obrada podataka, formalna analiza, pisanje – recenzija i uređivanje

Asistent dr Đurđa Jerotić- metodologija, validacija, sprovođenje istraživanja, pisanje – recenzija i uređivanje

Prof. dr Ana Savić-Radojević - pisanje – recenzija i uređivanje

Prof. dr Marija Plješa-Ercegovac - pisanje – recenzija i uređivanje

Prof. dr Tatjana Đukić- metodologija, validacija, sprovođenje istraživanja, pisanje – recenzija i uređivanje

Doc. dr Marko Ercegovac - sakupljanje podataka, pisanje – recenzija i uređivanje

Prof. dr Milika Ašanin - sakupljanje podataka, pisanje – recenzija i uređivanje

Prof. dr Ivana Milosević - sakupljanje biološkog materijala i podataka pisanje – recenzija i uređivanje

Prof. dr Goran Stevanović - sakupljanje biološkog materijala i podataka pisanje – recenzija i uređivanje

Prof. dr Tatjana Simić – supervizija, koncept, pisanje – recenzija i uređivanje

Doc. dr Vesna Corić – supervizija, koncept, pisanje – originalni nacrt, recenzija i uređivanje

Prof. dr Marija Matić – supervizija, koncept, pisanje -originalni nacrt, recenzija i uređivanje

Povezanost markera inflamacije i polimorfizama gena za proteine uključene u regulaciju redoks homeostaze sa težinom kliničke slike i prognozom toka bolesti kod bolesnika sa COVID-19

SAŽETAK

Uvod: Oksidativni stres u SARS-CoV-2 infekciji ima višestruku ulogu u različitim procesima kao što su interakcija virusa sa ćelijama domaćina, replikacija virusa, održavanje pojačanog inflamatornog odgovora i oštećenje različitih tkiva i organa. Smatra se da vrednosti nespecifičnih markera inflamacije, krvne slike, biohemijskih markera oštećenja organa, koagulacioni parametri i antioksidantni genetski profil imaju važnu ulogu u proceni rizika i prognozi toka bolesti kod pacijenata sa COVID-19. Pretpostavlja se da razvoj specifičnih kliničkih fenotipova dugotrajnog COVID-a može biti delimično objašnjen specifičnim genetskim varijacijama domaćina, posebno u genima povezanim sa oksidativnim stresom i zapaljenjem. Cilj istraživanja je bio da se utvrdi da li antioksidantni genetski profil i biohemijski parametri, samostalno i/ili udruženo, utiču na progresiju COVID-19 bolesti.

Materijal i metode: U retrospektivnu kohortnu studiju je uključeno 265 pacijenata sa COVID-19 lečenih u periodu od septembra 2020. do juna 2022. godine, koji su stratifikovani u dve grupe, 1. pacijenti sa lakšom kliničkom slikom i 2. pacijenti sa bilo kojom težom formom bolesti. Za prikupljanje rezultata kliničkih i laboratorijskih ispitivanja, korišćeni su podaci dobijeni specijalističkim pregledom pacijenata za potrebe studije, kao i podaci iz istorija bolesti. Polimorfizmi gena za proteine uključene u regulaciju redoks homeostaze (*Nrf2* rs6721961, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* (*AB*) rs1695, *SOD2* rs4880, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *GSTM3* rs1332018, *GPX3* rs8177412, *GPX1* rs1050450) određivani su odgovarajućim PCR metodama, a hematološko-biohemijske analize (krvna slika, CRP, IL-6, feritin, fibrinogen, d-dimer, AST, ALT, urea, kreatinin, LDH) određivane su metodama u okviru rutinske laboratorijske prakse. Linearna i logistička regresija korišćena je za model povezanosti zavisnih varijabli sa potencijalnim prediktorima. Prediktori iz univarijantnih analiza koje su statistički značajne sa nivoom značajnosti od 0,05 bili su uključeni u modele multivarijantne regresije.

Rezultati: Pokazano je da limfopenija ($< 1,0 \times 10^9/L$) nosi 3 puta veći rizik (OR=2,97, IP 0,22-1,00, $p=0,002$), povišena koncentracija IL-6 ($>8pg/L$) 8 puta (OR=8,52, IP 2,48-29,28, $p=0,002$), povišen CRP ($>10mg/L$) 10 puta (OR=10,97, IP 4,16-28,96, $p<0,001$), dok povišena koncentracija fibrinogena ($>3.5 g/L$) nosi oko 2 puta (OR=2,29, IP 1,09-4,81, $p=0,029$) povećan rizik od progresije COVID-19 u težu formu bolesti. Pored toga, pacijenti sa povišenom aktivnošću AST ($>37 U/L$) i LDH ($>227 U/L$) su 2 i 5 puta podložniji razvoju težih oblika COVID-19 (AST-OR=2,25, IP 1,13-4,49, $p=0,021$, LDH-OR=4,76, IP 2,22-10,22, $p<0,001$). Rezultati povezanosti antioksidantnog genetskog profila i razvoja težih formi COVID-19 su pokazali da nosioci *GPX3* varijantnog genotipa (*GPX3*TC+CC*), imaju 2,42 puta veći rizik za razvoj težih oblika COVID-19 u poređenju sa nosiocem *GPX3* referentnog genotipa (OR=2,42, IP 1,08-5,40, $p=0,032$). Kada su pacijenti stratifikovani po polu rezultati govore u prilog toga da osobe ženskog pola sa *GSTT1* nultim genotipom imaju 8 puta veću šansu da razviju težu formu COVID-19 bolesti u odnosu na žene nosioce aktivnog genotipa (OR=7,95, IP 1,28-49,50, $p=0,026$). Naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost ni za jedan od ispitanih genskih polimorfizama sa rizikom za nastanak neuroloških post-COVID sekvela.

Zaključci: *GPX3* i *GSTT-1* kao markeri progresije COVID-19 bolesti mogli bi se koristiti u prognostičke svrhe u lečenju u budućnosti, a saznanja do kojih se došlo u ovom istraživanju mogla bi se primeniti i na druge infektivne bolesti. Razumevanje genskih polimorfizama i njihove uloge u patogenezi COVID-19 je jedan od ključnih faktora koji bi mogao da omogućiti adekvatnu prevenciju, prognozu i terapiju bolesti.

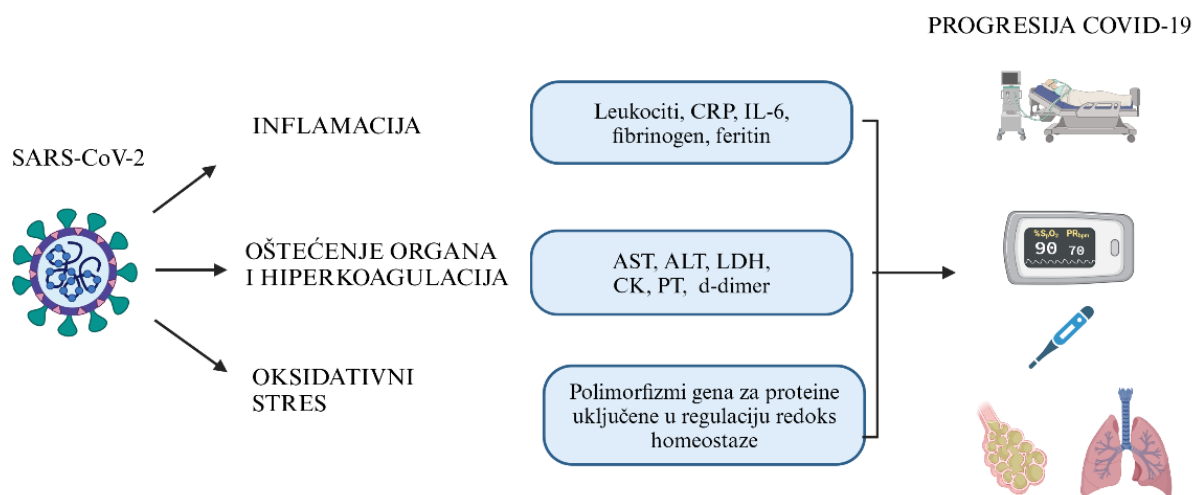
Ključne reči: COVID-19, oksidativni stres, antioksidantni genetski profil, inflamacija, progresija bolesti

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Mikrobi i infekcija

UDK broj:

Grafički apstrakt – Preuzeto iz Marković i sar. (1)



The association of inflammatory markers and gene polymorphisms of proteins involved in the regulation of redox homeostasis with the severity and the prognosis of disease course in patients with COVID-19

ABSTRACT

Background: Oxidative stress in SARS-CoV-2 infection has multiple roles in various processes such as the interaction of the virus with host cells, virus replication, maintaining an enhanced inflammatory response, and damage to various tissues and organs. It is assumed that the values of non-specific markers of inflammation, blood count, biochemical markers of organ damage, coagulation parameters and antioxidant genetic profile play an important role in risk assessment and prognosis of disease course in patients with COVID-19. Also, the development of specific clinical phenotypes of long COVID can be partially explained by specific genetic variations of the host, especially in genes related to oxidative stress and inflammation. The aim of the research was to determine whether the antioxidant genetic profile and biochemical parameters, independently and/or together, influence the progression of the COVID-19 disease.

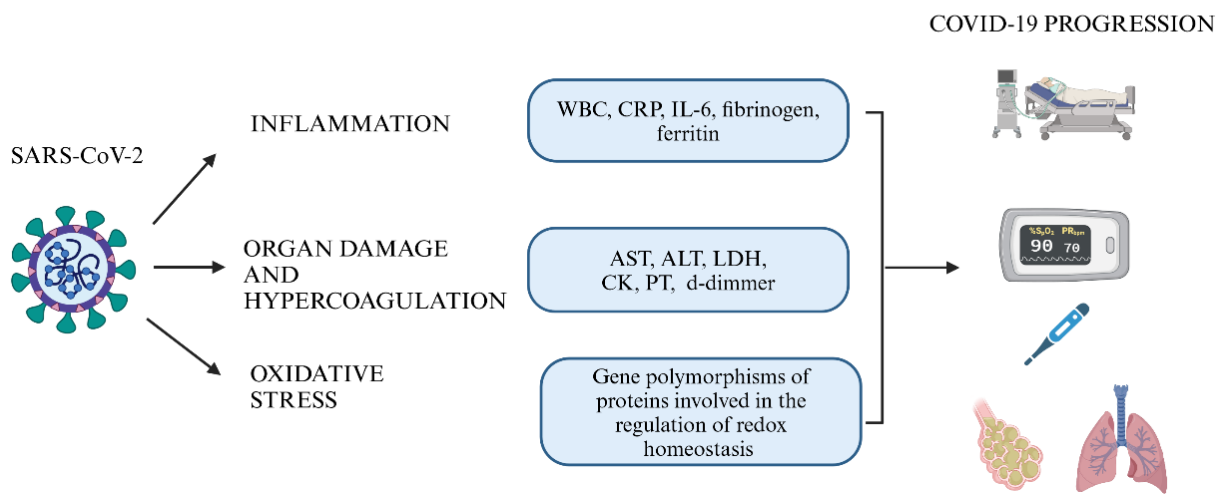
Materials and Methods: The retrospective cohort study included 265 patients with COVID-19 treated between September 2020 and June 2022, who were stratified into two groups, 1. patients with a mild clinical picture and 2. patients with any more severe form of the disease. Data obtained by a specialist examination of patients for the purpose of the study, as well as data from the medical history, were used to collect the results of clinical and laboratory tests. Gene polymorphisms for proteins involved in the regulation of redox homeostasis (*Nrf2* rs6721961, *GSTM1*, *GSTP1* (*AB*) rs1695, *SOD2* rs4880, *GSTO1* rs156697, *GSTM3* rs1332018, *GPX3* rs8177412, *GPX1* rs1050450) were determined by appropriate PCR methods, and hematologic - biochemical analyzes (blood count, CRP, IL-6, ferritin, fibrinogen, d-dimer, AST, ALT, urea, creatinine, LDH) were determined by methods within routine laboratory practice. Linear and logistic regression were used to model the association of dependent variables with potential predictors. Predictors from univariate analyzes that were statistically significant at the 0.05 significance level were included in multivariate regression models.

Results: It has been established that lymphopenia ($<1.0 \times 10^9/L$) carries a 3-fold higher risk (OR=2.97, CI 0.22-1.00, $p=0.002$), elevated IL-6 concentration ($>8\text{pg/L}$) 8-fold (OR=8.52, CI 2.48-29.28, $p=0.002$), elevated CRP ($>10 \text{ mg/L}$) 10 times (OR=10.97, CI 4.16-28.96, $p<0.001$), while elevated concentration of fibrinogen ($>3.5 \text{ g/L}$) carries about 2-fold (OR=2.29, CI 1.09-4.81, $p=0.029$) increased risk of progression of COVID-19 to a more severe form of the disease. In addition, patients with increased activity of AST ($>37 \text{ U/L}$) and LDH ($>227 \text{ U/L}$) were 2 and 5 times more susceptible to developing severe forms of COVID-19 (AST-OR=2.25, CI 1.13-4.49, $p=0.021$, LDH-OR=4.76, CI 2.22-10.22, $p<0.001$). The results of the association between the antioxidant genetic profile and the development of severe forms of COVID-19 showed that carriers of the *GPX3* variant genotype (*GPX3**TC + CC), have a 2.42 times higher risk of developing severe forms of COVID-19 compared to the carrier of the *GPX3* reference genotype (OR =2.42, CI 1.08-5.40, $p=0.032$). When patients were stratified by gender, the results support the fact that female persons with *GSTT1*-null genotype have an 8 times greater chance of developing a severe form of the COVID-19 disease compared to women carrying the active genotype (OR=7.95, CI 1.28 -49.50, $p=0.026$). Our results did not show a statistically significant association for any of the examined gene polymorphisms with the risk of developing neurological post-COVID sequelae.

Conclusions: *GPX3* and *GSTT1* could be used as markers of the progression of the COVID-19 for prognostic purposes in treatment in the future, and the knowledge gained in this research could be applied to other infectious diseases. Understanding gene polymorphisms and their role in the pathogenesis of COVID-19 is one of the key factors that could enable adequate prevention, prognosis and treatment of the disease.

Keywords: COVID-19, oxidative stress, antioxidant genetic profile, inflammation, disease progression
Scientific Field: Medicine
Scientific Discipline: Microbes and infection
UDK number:

Graphical abstract – Adapted from Markovic et al. (1)



SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Epidemiologija COVID-19	1
1.2 Osobine SARS-CoV-2 i patogeneza COVID-19	3
1.2.1 Struktura SARS-CoV-2 i interakcija sa ćelijom domaćina	3
1.2.2. Urođeni i adaptivni imunitet tokom SARS-CoV-2 infekcije	5
1.3 Klinička slika COVID-19	8
1.3.1. Klasifikacija COVID-19	9
1.4. Dijagnoza COVID-19	10
1.5 Terapija COVID-19.....	10
1.5.1 Potencijalna primena antioksidantne terapije u COVID-19	11
1.6. Post-COVID sindrom.....	11
1.7 Oksidativni stres u COVID-19.....	14
1.7.1. Polimorfizmi gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u COVID-19.....	15
1.7.2. Polimorfizmi gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u neurološkim manifestacijama post-COVID sindroma	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJAL I METODE	21
3.1 Dizajn studije	21
3.2 Mesto i period	21
3.3 Pravni i etički preduslovi	21
3.4 Selekcija pacijenata.....	21
3.5 Materijal	23
3.5.1 Uzorkovanje krvi.....	23
3.6 Instrumenti merenja	23
3.6.1 Određivanje polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke proteine uključene u regulaciju redoks homeostaze	23
3.6.2 Određivanje markera inflamacije i biohemijskih markera oštećenja organa	24
4. REZULTATI	26
4.1 Demografske i kliničke karakteristike pacijenata	26
4.2 Povezanost laboratorijskih parametara sa rizikom za razvoj težih oblika COVID-19	27
4.3 Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od nastanka težih oblika COVID-19	28
4.4. Udruženi efekat laboratorijskih parametara i polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19	29

4.5 Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19 kod pacijenata stratifikovanih po polu	30
4.6. Ispitivanje povezanosti polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za nastanak neuroloških post-COVID sekvela.....	32
5. DISKUSIJA	34
6. ZAKLJUČCI	42
7. LITERATURA	44

1. UVOD

1.1 Epidemiologija COVID-19

Koronavirusna bolest 19, (eng. *Coronavirus Disease 19*, COVID-19) je kontagiozno oboljenje koje izaziva virus teškog akutnog respiratornog sindroma 2 (eng. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) (2,3). SARS-CoV-2 je treći po redu koronavirus koji može da izazove težak akutni respiratorni sindrom kod ljudi. Prethodno identifikovani srodni virusi iz roda betakoronavirusa su virus teškog akutnog respiratornog sindroma (eng. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*, SARS-CoV) otkriven 2003. godine i virus bliskoistočnog akutnog respiratornog sindroma (eng. *Middle East Respiratory Syndrome-related coronavirus* MERS-CoV) otkriven 2012. godine (4). Epidemija infekcije virusom SARS-CoV-2 proglašena je u decembru 2019. godine u kineskoj pokrajini Vuhan, a pandemija je proglašena od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) u martu 2020.godine. Do marta 2023.godine u svetu je registrovano preko 700 miliona slučajeva ove bolesti i skoro 7 miliona umrlih (5). U Srbiji je prvi slučaj SARS-CoV-2 infekcije registrovan 6. marta 2020. godine, a epidemija je proglašena 13. marta iste godine. Do marta 2023. godine registrovano je ukupno oko 2,5 miliona slučajeva COVID-19 i oko 20 hiljada smrtnih slučajeva (6). Određeni faktori rizika za težu formu bolesti su identifikovani relativno rano tokom pandemije. To su starost preko 65 godina, muški pol i komorbiditeti kao što su: arterijska hipertenzija, dijabetes melitus i gojaznost (7). Od COVID-19 češće oboljevaju muškarci, stariji od 65 godina, osobe sa hipertenzijom, dijabetes melitusom, kardiovaskularnim komorbiditetima (8,9). Prema poslednjim izveštajima ukupan mortalitet od COVID-19 je 3,77-5,4%, ali se povećava do 41,1-61,5% kod teško ili kritično obolelih pacijenata (10). Takođe, zapaženo je da je mortalitet značajno veći kod starijih od 60 godina (11,12). Rezultati meta-analiza su takođe pokazali da je muški pol faktor rizika za smrtnost od COVID-19. Žene sa COVID-19 imaju manje hospitalizacija i smrtnih slučajeva nego muškarci. (13,14).

Tokom pandemije COVID-19, pojavilo se nekoliko genetskih varijanti SARS-CoV-2 koje su se proširile širom sveta (15,16). Varijante koje trenutno cirkulišu u populaciji prikazane su u tabeli 1.

Tokom evolucije SARS-CoV-2 od početka pandemije, SZO je definisala različite varijante SARS-CoV-2 na osnovu procenjenog potencijala za širenje i preovladavanje prethodnih varijanti, mogućnosti izazivanja novih talasa pandemije i potrebe prilagođavanja javnozdravstvenih mera. SZO sprovodi monitoring nad svim varijantama virusa koje cirkulišu u populaciji. Značajnije od ovih varijanti grupisane su u tri kategorije– varijante koje su pod nadzorom, varijante od interesa i varijante koje zahtevaju brigu (17).

Varijante koje su pod nadzorom (eng. *Variants under monitoring* - VUM) je termin koji se koristi da upozori nadležne da varijanta SARS-CoV-2 može zahtevati prioritetnu pažnju i praćenje. Svrstavanje u ovu kategoriju služi da se istraži da li ova varijanta (i druge s njom blisko povezane) može predstavljati dodatnu pretnju globalnom javnom zdravlju u poređenju sa drugim cirkulišućim varijantama.

Varijante od interesa (eng. *Variants of interest* - VOI) je termin koji se koristi da opiše varijantu SARS-CoV-2 sa promenama za koje se zna da utiču na ponašanje virusa ili njegov potencijalni uticaj na zdravlje ljudi. Ovo može uključivati, na primer, njegovu sposobnost širenja, njegovu sposobnost da izazove ozbiljnu bolest ili koliko lako se može otkriti ili lečiti. VOI se takođe može identifikovati jer ima povećanu sposobnost širenja u poređenju sa drugim cirkulišućim varijantama, što ukazuje na potencijalni rizik za globalno javno zdravlje.

Varijante koje zahtevaju brigu (eng. *Variants of concern* - VOC) je termin koji opisuje SARS-CoV-2 varijantu koja ispunjava definiciju VOI, ali takođe ispunjava najmanje jedan od sledećih kriterijuma:

- može izazvati težu kliničku sliku bolesti
- može imati značajan uticaj na sposobnost zdravstvenih sistema da pruži negu pacijentima sa COVID-19 ili drugim bolestima i zahteva značajne intervencije javnog zdravlja
- postoji značajno smanjenje efikasnosti dostupnih vakcina u zaštiti od teških oblika bolesti (17).

Tabela 1. Varijante SARS-CoV-2 koje trenutno cirkulišu u populaciji. Preuzeto sa: World Health Organization 2023 data.who.int, WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard > Variants [Dashboard]. <https://data.who.int/dashboards/covid19/variants>

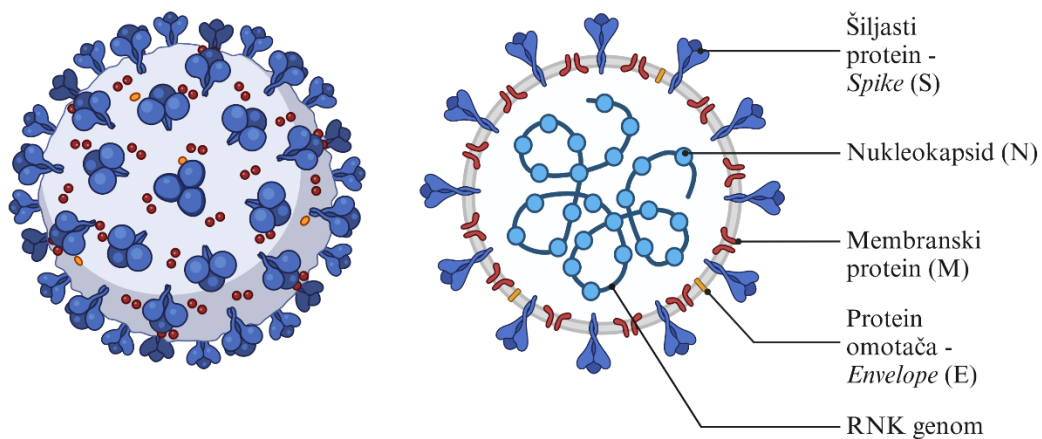
Pango linija	Genetske karakteristike	Trenutni status	Datum označavanja
<i>BA.2.86</i>	Mutacije bliske <i>BA.2</i>	VOI	Novembar 2023.
<i>JN.1</i>	<i>BA.2.86</i> + S:L455S	VOI	Februar 2024.
<i>JN.1.7</i>	<i>JN.1</i> + S:T572I, S:E1150D	VUM	Maj 2024.
<i>KP.2</i>	<i>JN.1</i> + S:R346T, S:F456L, S:V1104L	VUM	Maj 2024.
<i>KP.3</i>	<i>JN.1</i> + S:F456L, S:Q493E, S:V1104L	VUM	Maj 2024.
<i>JN.1.18</i>	<i>JN.1</i> + S:R346T	VUM	Maj 2024.
<i>LB.1</i>	<i>JN.1</i> + S:S31-, S:Q183H, S:R346T, S:F456L	VUM	Jun 2024.

VUM –Varijante koje su pod nadzorom, VOI - varijante od interesa

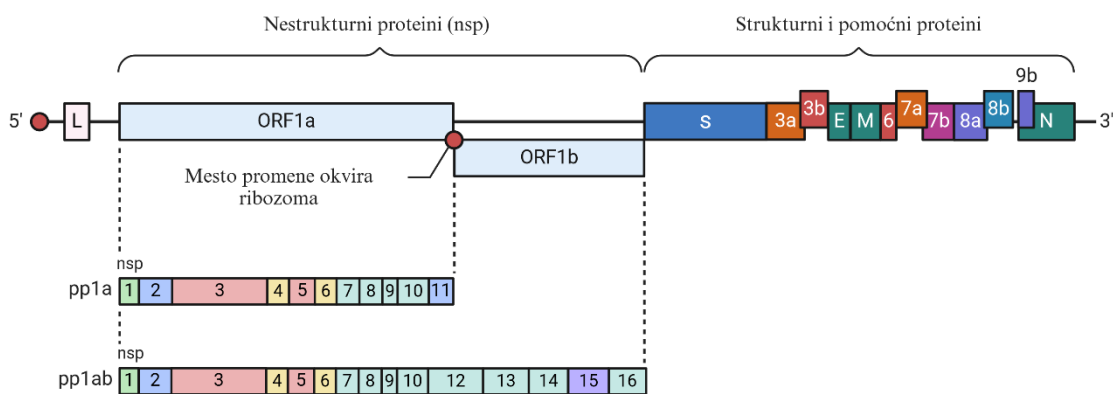
1.2 Osobine SARS-CoV-2 i patogeneza COVID-19

1.2.1 Struktura SARS-CoV-2 i interakcija sa ćelijom domaćina

SARS-CoV-2 spada u *Coronaviridae* i pripada rodu betakoronavirusa kao i SARS-CoV (Slika 1). SARS-CoV-2 ima jednolančanu RNK, sa genomom koji kodira četiri strukturalna proteina – *Spike* (*S*), *Envelope* (*E*), *Membrane* (*M*) i *Nucleocapsid* (*N*), kao i šest pomoćnih *open reading frame* proteina (ORF) (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, i ORF10) i 16 nestrukturalnih proteina (NSP1–NSP16) (18). Strukturni proteini sačinjavaju zreli virion, dok su nestrukturalni proteini neophodni za virusnu replikaciju i transkripciju (Slika 2) (19).

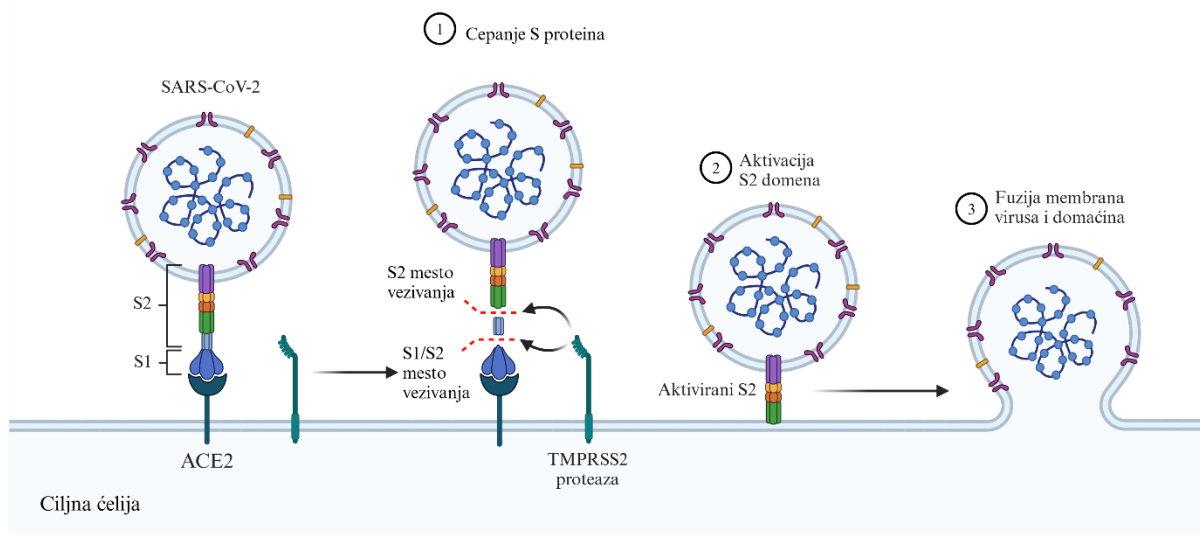


Slika 1. Struktura SARS-CoV-2 virusa. Slika izrađena u www.biorender.com. RNK – ribonukleinska kiselina.



Slika 2. Genom SARS-CoV-2 virusa. Slika izrađena u www.biorender.com. ORF – *Open reading frame*.

Genetska varijabilnost SARS-CoV-2 ostvaruje se putem supstitucije, delecije i insercije na *Spike* i ORF proteinu SARS-CoV-2 što dovodi do stvaranja mnogih varijanti virusa koje imaju različite biološke karakteristike kada su u pitanju transmisibilnost i izbegavanje imunskom odgovoru (20,21). Nekoliko dokumentovanih mutacija *Spike* proteina je od epidemiološkog značaja. Omikron varijanta, koja je trenutno predominantna, je akumulirala ukupno pedeset mutacija u genomu, od kojih su 32 bile u *Spike* proteinu, što ga čini najmodifikovanijim od svih pet VOC (22). S1 podjedinica *Spike* proteina koronavirusa je podeljena na dva funkcionalna domena, N-terminalni domen i C-terminalni domen. Pomoću strukturnih i biohemijskih analiza, identifikovan je region od 211 aminokiselina (aminokiseline 319–529) na S1 C-terminalnom domenu SARS-CoV-2 kao mesto za vezivanje receptora (eng. *receptor binding domain*, RBD), koji ima ključnu ulogu u ulasku virusa u ćeliju i meta je neutrališućih antitela. Poznato je da SARS-CoV-2 koristi humani angiotenzin konvertujući enzim 2 (eng. *Angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) receptor za ulazak u ćeliju, najpre u nazofarinksu, a dalje i u distalnim alveolama pluća (Slika 3) (23). RBD se vezuje za ACE2 receptor (aminokiseline 437–507 S proteina), a ovaj region u SARS-CoV-2 razlikuje se od onog u SARS-CoV po pet ostataka kritičnih za vezivanje ACE2. To su Y455L, L486F, N493Q, D494S i T501N. Zahvaljujući ovim promenama, interakcija SARS-CoV-2 sa njegovim receptorom dovodi do stabilizacije dva mesta za vezivanje virusa na ACE2. Štaviše, motiv sa četiri ostatka u RBD-u SARS-CoV-2 (aminokiseline 482–485: G-V-E-G) rezultira kompaktnijom konformacijom njegovog dela koji se vezuje za ACE2 nego kod SARS-CoV i omogućava bolji kontakt sa N-terminalnim heliksom ACE2 (24). Smatra se da je afinitet SARS-CoV-2 prema ACE2 receptoru čak dvostruko veći u odnosu na prethodni SARS-CoV (25).



Slika 3. Vezivanje SARS-CoV-2 za humani ACE2 receptor i fuzija sa membranom ćelije domaćina. Slika izrađena u www.biorender.com

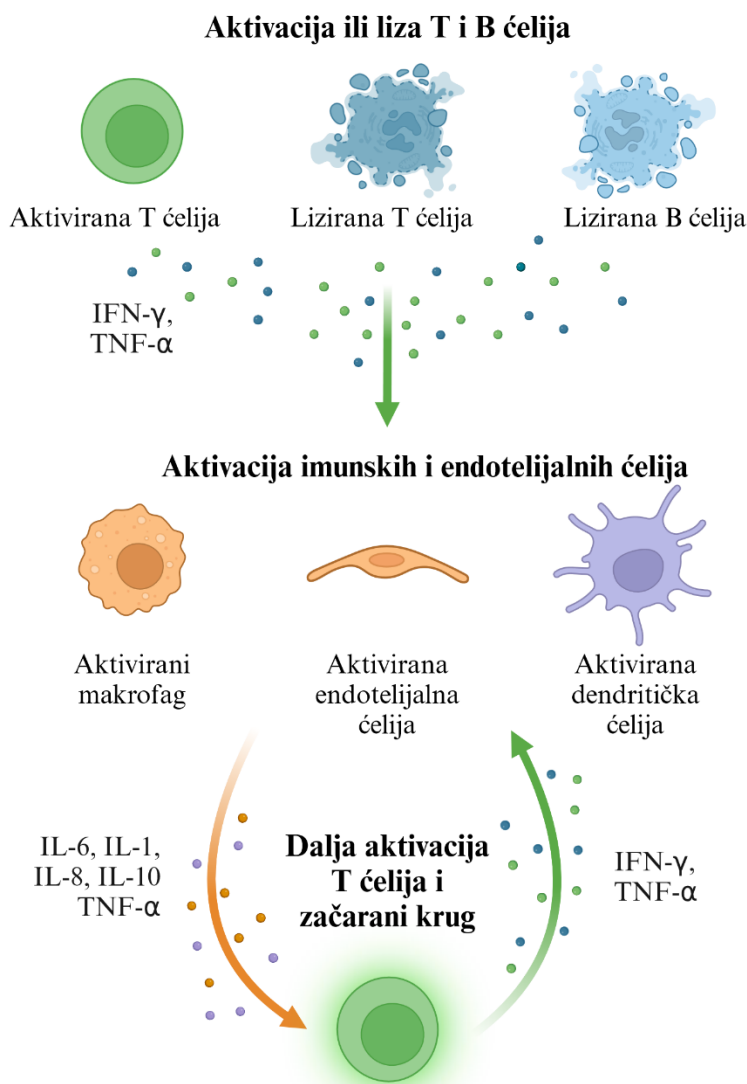
Pored toga, pokazalo se da proteaze domaćina učestvuju u cepanju S proteina i aktiviraju ulazak SARS-CoV-2, uključujući transmembransku proteazu – serin proteazu 2 (TMPRSS2), katepsin L i furin (26,27). Podaci sekvenciranja RNK pokazali su da je TMPRSS2 visoko eksprimirana u nekoliko tkiva u telu čoveka i da je koeksprimirana sa ACE2 u nazalnim epitelnim ćelijama, plućima i bronhijalnim granama, što objašnjava neke od tkivnih tropizama SARS-CoV-2 (28,29). Sa druge strane, atopija i tip 2 inflamacije su povezani sa smanjenom ekspresijom ACE2 u epitelnim ćelijama disajnih puteva što uzrokuje smanjenu osetljivost na SARS-CoV-2 (30). Nakon vezivanja *Spike* proteina SARS-CoV-2 za ACE2 receptor na ćelijskoj membrani, virus endocitozom ulazi u ćeliju gde se odigrava replikacija virusa i translacija prethodno navedenih virusnih strukturnih proteina i ORF-ova, kao i aktivacija oksidativnog stresa i inflamatornih kaskada. Stvaraju se

kiseonični slobodni radikali (KSR) i smanjuju nivoi glutaciona (GSH) i *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) što dovodi do povećanog oksidativnog stresa. Istovremeno se povećavaju nivoi *nuclear factor kappa B* (NF-kB) koji aktiviraju *NLR family pyrin domain containing 3* (NLRP3) inflamazom, što dovodi do aktivacije citokina i inflamacije (21). NLRP3 inflamazom je važna komponenta urođenog imuniteta koja posreduje u aktivaciji kaspaze-1 i lučenju proinflamatornih citokina IL-1 β /IL-18 u okviru odgovora na infekciju i oštećenje ćelija (31). ACE2 receptor ima dvostruku ulogu u SARS-CoV-2 infekciji. Pored toga što je receptor za SARS-CoV-2 *Spike* protein, on je značajan i za borbu protiv inflamacije i oksidativnog oštećenja tkiva tokom COVID-19. Aktivacija ACE2 receptora smanjuje angiotenzin II koji stimuliše nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) oksidazu čime se smanjuje stvaranje KSR. Dodatno, produkt enzimske aktivnosti ACE2 – angiotenzin 1-7, ima snažno antioksidativno dejstvo (32). Međutim, nakon što se *Spike* protein veže za ACE2 receptor, ACE2 više ne produkuje angiotenzin 1-7, tako da vezivanje virusa za receptor povećava koncentraciju angiotenzina II što dovodi do povećanog vezivanja angiotenzina II za angiotenzin 1 receptor i povećane aktivnosti NADPH oksidaze. Tako se povećava produkcija KSR i aktivnost NADPH oksidaze u ćeliji (33,34).

1.2.2. Urođeni i adaptivni imunitet tokom SARS-CoV-2 infekcije

Imunopatogeneza COVID-19 je složena i povezana je sa virulencijom SARS-CoV-2 i nedostatkom vremenske koordinacije između inicijacije urođenog i adaptivnog imunskog odgovora (35). Klinička evolucija infekcije SARS-CoV-2 oslanja se na prelazak između urođenog i adaptivnog imunskog odgovora. Ova tranzicija je odlučujuća za napredak ka zaštitnom imunskom odgovoru ili pogoršanom zapaljenju. Bez urođenog imunskog odgovora, virus se inicijalno replikuje neometano i, što je takođe važno, adaptivni imunitet još uvek nije pokrenut. Kod prosečnog slučaja COVID-19, privremeno odlaganje u pokretanju urođenog imunskog odgovora je dovoljno da se asimptomatska infekcija desi u 40% slučajeva, ili da se ispolji u vidu blagih simptoma. Prisustvo T-ćelija i antitela povezano je sa povoljnom prognozom COVID-19. Istraživanja na akutnim COVID-19 slučajevima i konvalescentima pokazala su da je SARS-CoV-2 specifični T-ćelijski odgovor značajno povezan sa blažom bolešću, što ukazuje da je T-ćelijski odgovor značajan za kontrolu i rezoluciju primarne SARS-CoV-2 infekcije (36). U slučaju SARS-CoV-2 infekcije, virus je veoma efikasan u izbegavanju pokretanja intracelularnog urođenog imunskog odgovora, kao što su tip 1 i 3 interferona (IFN) (36). S druge strane, neefikasni interferonski (IFN) urođeni imunitet ima jaku korelaciju sa neuspehom kontrole primarne SARS-CoV-2 infekcije i visokim rizikom za tešku formu COVID-19, praćenu imunopatologijom urođenog imuniteta i visokim nivoima CXCL10, interleukinom 6 i 8 (IL-6 i IL-8) u plazmi. Ukoliko je urođeni imunski odgovor previše odložen, ili defektan, dolazi do nekontrolisane replikacije virusa u gornjim respiratornim putevima i plućima i dolazi do odloženog pokretanja adaptivnog imunskog odgovora na duže vreme (37). To dovodi do oštećenja pluća i povećane potrebe za hospitalizacijom. Navedeni faktori su izraženiji u starijoj životnoj dobi, s obzirom na to da starije osobe imaju smanjen nivo T ćelija, što dalje ima za posledicu otežanu produkciju neutrališućih antitela. U slučaju odsustva T ćelijskog odgovora, urođeni imunitet pokušava to da nadoknadi putem preteranog aktiviranja proinflamatornih citokina što dovodi do značajne plućne imunopatologije usled citokinske oluje (Slika 4) (36). Infekcija SARS-CoV-2 izaziva adaptivni imunološki odgovor, koji se ne razlikuje u odnosu na onaj kod drugih analognih virusnih infekcija, što dovodi do proizvodnje specifičnih antitela i posledične serokonverzije koja se dešava nekoliko nedelja nakon početnog izlaganja. Posle 7–10 dana od početnog izlaganja SARS-CoV-2, rani odgovor antitela karakteriše proizvodnja i lučenje specifičnih IgM i IgA antitela (38). Proizvodnja anti-*Spike* IgG antitela od strane B ćelija pruža zaštitu izloženim osobama. Nivoi IgG dostižu vrhunac otprilike 50-60 dana nakon izlaganja i mogu trajati do 10 meseci, ali nije poznato da li njihov nestanak dovodi do iščezavanja specifičnog imuniteta na virus (38). Vredi napomenuti da snažan IgG odgovor na SARS-

CoV-2 može doprineti ozbiljnom sindromu oslobađanja citokina i može biti povezan sa težom formom bolesti i rizikom od smrti. Cirkulišuće SARS-CoV-2-specifične CD4+ i CD8+ T ćelije otkrivene su kod pacijenata koji su u fazi oporavka od COVID-19 (39). Pokazano je da je odgovor CD4+ T ćelija na *Spike* protein kod ovih osoba snažan i da je u korelaciji sa titrom anti-SARS-CoV-2 IgG i IgA. U adaptivnom imunološkom sistemu, muškarci imaju manje CD8 + T ćelija, CD4 T ćelija i smanjenu proizvodnju B ćelija nego žene. Pored toga, neki od gena koji učestvuju u regulaciji imunog sistema nalaze se na X hromozomu, a povećana ekspresija receptora sličnih tolu (eng. *Toll-like receptor*, TLR) 7 kod bolesnih žena može biti razlog povećane tolerancije na bolest i skрати njeno trajanje (13,14).



Slika 4. Uloga adaptivnog imuniteta u odbrani od COVID-19. Slika izrađena u www.biorender.com. IFN γ – interferon gama, TNF- α – faktor nekroze tumora alfa, IL-6 – interleukin 6, IL-1 – interleukin 1, IL-8 – interleukin 8, IL-10 – interleukin 10

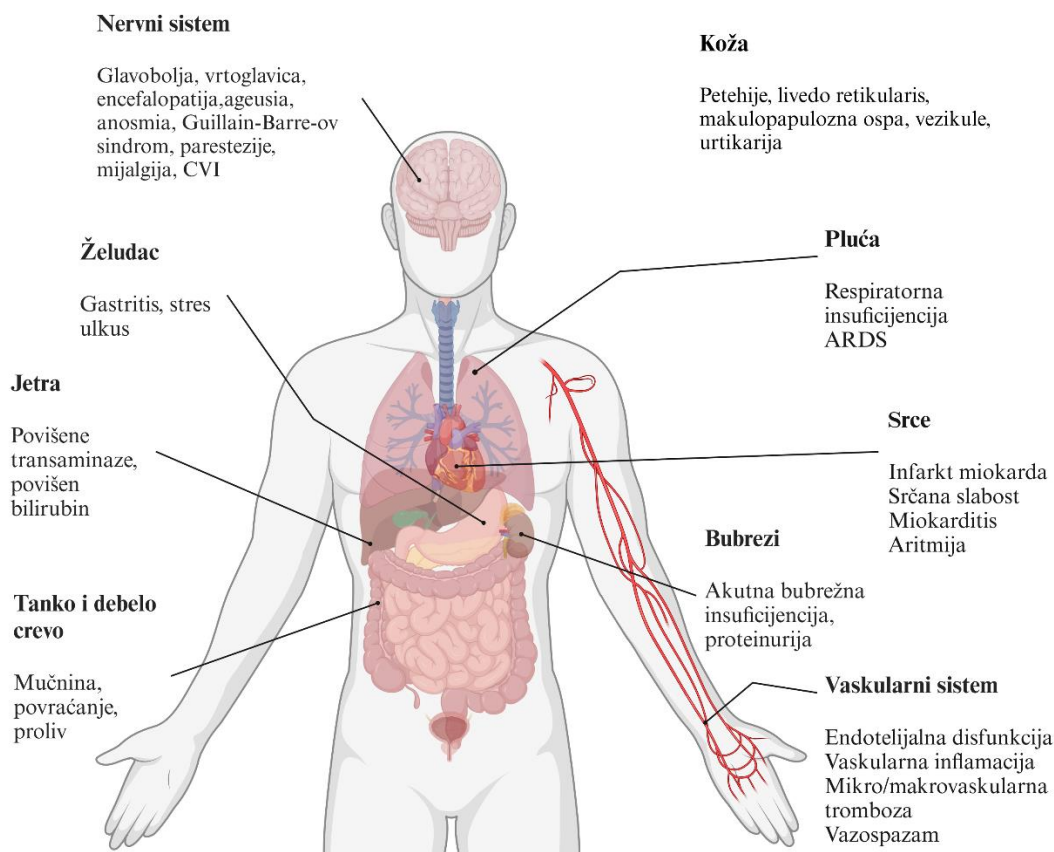
Nakon početne replikacije u epitelnim ćelijama respiratornog trakta, SARS-CoV-2 dalje inficira epitel disajnih puteva i ulazi u alveolarne epitelne ćelije u plućima. Brza replikacija SARS-CoV-2 u plućima može izazvati jak imunski odgovor. Sindrom citokinske oluje izaziva akutni respiratorni distres sindrom (ARDS) i respiratornu insuficijenciju, što se smatra glavnim uzrokom smrti kod pacijenata sa COVID-19 (24). Nakon što SARS-CoV-2 uđe u ciljnu ćeliju, biva detektovan putem TLR 3, 7, 8 i 9, kao i MDA5 (eng. *essential viral recognition receptor melanoma differentiation-associated protein 5*, MDA5) i RIG-I (eng. *retinoic acid-inducible gene-I*, RIG-I). Nakon vezivanja liganda, receptori za prepoznavanje aktiviraju ključne nishodne transkripcione faktore, uključujući IRF (eng. *interferon regulatory factor*, IRF), NF- κ B i AP-1. Detekcija SARS-CoV-2 aktivira tip 1 interferonskog (IFN) odgovora, sa posledičnom indukcijom IFN-zavisne ekspresije gena (40). Odgovor posredovan TLR3 indukuje transkripciju gena NLRP3, doprinoseći aktivaciji inflamazoma NLRP3 i posledičnoj piroptotičkoj smrti ćelije. Step en aktivacije inflamazoma povezan je sa težinom COVID-19. Oslobođanje enzima laktat dehidrogenaze (LDH) nastaje kao posledica piroptotske smrti ćelije. Povećani nivoi LDH u cirkulaciji su povezani sa težinom bolesti kod pacijenata obolelih od COVID-19. Inflamazom NLRP3 može takođe da indukuje koagulopatiju i trombotičke događaje, koji karakterišu teški COVID-19 (41). Poređenje patofizioloških mehanizama tokom COVID-19 sa onim prilikom infekcija drugim virusima pokazuje da SARS-CoV-2 indukuje poseban efekat koji karakterišu smanjeni odgovori IFN-I i IFN-III, sa značajnom indukcijom proinflamatornih citokina, kao što su IL-1, IL-6, TNF i IL1RA (40). Sistemsko oštećenje nastaje aktiviranjem molekularnih obrazaca povezanih sa patogenom (eng. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) i molekularnih obrazaca povezanih sa oštećenjem (eng. *damage-associated molecular patterns*, DAMP), koje, kada ih jednom prepoznaju rezidentni makrofazi u plućima, pokreću prethodno navedenu citokinsku oluju, u kojoj IL-6 igra istaknutu ulogu (42). Pored toga, ovaj interleukin ima važnu funkciju u vaskularnom endotelu, negativno regulišući molekule ćelijske adhezije (E-kadherini) i povećanje ekspresije endotelnih faktora rasta, čija je glavna posledica stvaranje edema i hipoalbuminemija. Ovo dovodi do začaranog kruga zapaljenja koji progresivno ometa alveolarnu razmenu gasova (43). Dodatno, ovaj proces favorizuje trombotičke događaje i formiranje plućnih mikroembolija, koji su takođe ograničavajući faktori za plućnu perfuziju i oksigenaciju kod COVID-19 (44).

1.3 Klinička slika COVID-19

Klinička slika COVID-19 može biti različita, od asimptomatske do veoma teške koja podrazumeva sindrom sepse i terminalnu respiratornu insuficijenciju, kao i multiorgansku disfunkciju (Slika 5) (45,46). SARS-CoV-2 se prenosi primarno kapljičnim putem tokom bližeg kontakta licem u lice. Infekcija se može prenositi od strane asimptomatskih, presimptomatskih i simptomatskih prenosilaca. Prosečni inkubacioni period je 5 dana, a kod preko 97% ljudi koji razviju simptomatsku bolest to se desi do 11,5 dana od kontakta (47). Infekcija SARS-CoV-2 je asimptomatska u oko 40-45% slučajeva i tada je mogućnost transmisije produžena verovatno i na duže od 14 dana (48). Prema jednoj sistemskoj meta-analizi srednje trajanje izlučivanja RNK SARS-CoV-2 bilo je 17 dana u gornjim disajnim putevima, 14,6 dana u donjim disajnim putevima, 17,2 dana u stolici i 16,6 dana u uzorcima seruma. (49).

Najčešći simptomi su povišena temperatura, kašalj i nedostatak vazduha, a ostali česti simptomi su: zamor, bolovi u mišićima, mučnina, povraćanje, proliv, glavobolja, slabost, curenje iz nosa. Olfaktorne i gustatorne disfunkcije kao što su anosmija i ageuzija, odnosno gubitak čula mirisa i ukusa, su takođe identifikovane kao posebni simptomi COVID-19 (50). U većini slučajeva klinički tok COVID-19 se sastoji od tri faze – kraćeg perioda inkubacije, nakon čega pacijenti razvijaju simptome: gubitak čula ukusa i mirisa, suv kašalj, povišenu telesnu temperaturu i dispneju, ili druge, manje česte kao što su glavobolja, zamaranje, proliv. Dodatno, kod većine pacijenata dolazi do razvoja bilateralne intersticijalne pneumonije (51,52). Nakon 7 do 10 dana, kod većine pacijenata sa dispnejom ona se smanjuje, uz redukovanje inflamatornih promena u plućima. Kod teške COVID-19 progresija pneumonije dovodi do pada arterijskog nivoa parcijalnog pritiska kiseonika (pO_2) što vodi ka respiratornoj insuficijenciji usled gubitka aktivne razmene gasova u bolesnom plućnom parenhimu i vaskularnih abnormalnosti. Takvim pacijentima je neophodna kiseonična potpora. Kod većine teških slučajeva dolazi do nastanka diseminovane intravaskularne koagulopatije (DIK), i/ili septičnog šoka i progresije respiratorne insuficijencije, kao i multiorganske disfunkcije, sa potrebom za lečenjem u jedinici intenzivne nege (JIN) i primenom mehaničke ventilacije (53). Oko 10–15% pacijenata sa COVID-19 inficiranim varijantama Delta i Omicron pokazuju akutnu respiratornu insuficijenciju i zahtevaju prijem u JIN da bi dobili respiratornu podršku (54). Citokinska oluja se obično dešava kod pacijenata u odmakloj fazi COVID-19 bolesti i odnosi se na aktiviranje inflamatorne kaskade proinflamatornih citokina (55,56). Ona nastaje kao odgovor na stanje hiperinflamacije i može uzrokovati hiperkoagulabilnost u mikrovaskulaturi koja dovodi do oštećenja tkiva, DIK i posledične multiorganske disfunkcije (57). Takav tok bolesti može progredirati do teškog oštećenja pluća i ostalih vitalnih organa i dovesti do ARDS-a, sindroma sistemskog inflamatornog odgovora (eng. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) i sindroma sepse (58). Težak oblik COVID-19 karakteriše značajno povišen nivo proinflamatornih citokina kao što su IL-6, IL-8, IL-10, IL-2R i TNF- α (58,59). Takođe su objavljeni su slučajevi COVID-19 sa kožnim promenama, poput sindroma sličnom Kavasakiju, hemoragičnim i nekrotičnim promenama na sluznici usne duplje, ili pustuloznim, makuloznim, makulopapularnim, ili buloznim enantemom (60). Širok spektar komplikacija može dovesti do teške forme bolesti i smrtnog ishoda uključujući: pneumoniju, ARDS, oštećenje jetre, srca, trombotske događaje, bubrežnu slabost, neurološku bolest i sepsu (47,61–63). Najčešće komplikacije u sklopu COVID-19 su respiratorne (pneumotoraks), potom srčana insuficijencija, akutna bubrežna insuficijencija i sepsa. Među ostale spadaju: koagulopatije, tromboembolijski događaji uključujući i plućnu emboliju, ali i srčani događaji poput razvoja akutnog koronarnog sindroma ili pogoršanja postojeće kongestivne srčane insuficijencije, aritmija (63–66). Pacijenti sa teškim oblikom COVID-19 su veoma podložni superponiranim bakterijskim, gljivičnim i virusnim infekcijama, uključujući pneumoniju povezanu sa mehaničkom ventilacijom i sepsu (67,68). Od gljivičnih infekcija češće se javljaju mukormikoza i aspergiloza paranazalnog sinusa, kao i oralna kandidijaza (69). Najčešći uzrok smrti kod pacijenata sa COVID-19 je ARDS. Pacijenti sa komorbiditetima su pod povećanim rizikom za infekciju, hospitalizaciju i smrtni ishod (70,71).

Brojni laboratorijski parametri su predloženi kao faktori rizika za lošiji ishod COVID-19 (72). Među njima su povišeni neutrofil, niski limfociti, povećan odnos neutrofila/limfocita, povišen CRP, povišen d-dimer, povišeni nivoi IL-1, IL-6, IL-8, I TNF. TNF i IL-6 pokreću sintezu CRP u jetri, dok IL-8 povećava regrutaciju neutrofila (73,74). Povišen prokalcitonin i feritin u serumu inficiranih pacijenata je nepovoljan prognostički faktor (75). Kod infekcije SARS-CoV-2, povećanje koncentracije d-dimera posledično dovodi do produženja protrombinskog vremena (PT) i aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTT) i na kraju značajno povećava verovatnoću smrtnosti. Studije pokazuju da visoki nivoi d-dimera nezavisno povećavaju rizik od teške infekcije i smrtnosti (76). Pored toga, studija u Kini otkrila je da su povećani nivoi d-dimera tokom hospitalizacije povezani sa najlošijim dugoročnim ishodima (77).



Slika 5. Ciljni organi i kliničke manifestacije SARS-CoV-2 infekcije. Slika izrađena u www.biorender.com. CVI – cerebrovaskularni insult. ARDS – akutni respiratorni distress sindrom

1.3.1. Klasifikacija COVID-19

Težina COVID-19 bolesti se meri na osnovu potrebe za hospitalizacijom, dužinom boravka u bolnici, potrebe za upotrebom mehaničke ventilacije, vremena potrebnog za oporavak i smrtnosti. Stratifikacija težine bolesti COVID-19 kreće se u rasponu od asimptomatske ili blage do umerene, teške ili kritične i dobro je utvrđena tokom pandemije (78). Prema aktuelnoj klasifikaciji prema težini bolesti Nacionalnog protokola za lečenje COVID-19 bolesti (79), ona se deli u sledeće oblike:

1. asimptomatska/blago simptomatska
2. bolesnici bez komorbiditeta sa RTG znacima pneumonije
3. srednje tešku sa znacima citokinske oluje i potrebom za kiseoničnom terapijom
4. i 5. oblik u koji spadaju pacijenti sa teškom pneumonijom, ARDS-om i znacima citokinske oluje

1.4. Dijagnoza COVID-19

Dijagnoza COVID-19 bolesti postavlja se na osnovu kliničke slike, biohemijskih analiza (KKS inflamatorni markeri, koagulacioni parametri, biohemijski markeri oštećenja organa), mikrobiološke dijagnostike (serologija, antigenski testovi (Ag), reakcije lančanog umnožavanja engl. *polymerase chain reaction*, PCR), kao i radiološke dijagnostike (rentgen, kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonanca, ultrazvuk). Od značaja su i epidemiološki podaci o mogućim kontaktima sa osobama koje su obolele od COVID-19. Od mikrobioloških testova dostupni su Ag test i PCR iz uzorka nazofaringealnog brisa, serološka dijagnostika IgM i IgG antitela. Za pravilno tumačenje seroloških nalaza su potrebni anamnestički podaci o vremenu proteklom od SARS-CoV-2 infekcije, ili vakcinacije. Sami serološki testovi nisu pogodni za dijagnostikovanje akutne infekcije (80). Većina Ag testova pokazuje značajno podudaranje sa RT-PCR (eng. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) tokom prvih 5 dana bolesti i preporučuju se za testiranje simptomatskih pacijenata i za skrining asimptomatskih osoba koje imaju rizičan kontakt za COVID-19 (81,82). RT-PCR je zlatni standard za dijagnozu jer ima visoku senzitivnost i specifičnost (83,84). Testovi neutrališućih antitela imaju veliki potencijal u proučavanju imuniteta nakon infekcije i vakcinacije (85).

1.5 Terapija COVID-19

Prema Nacionalnom vodiču za COVID-19 terapiju čine simptomatska (antipiretici kao što su ibuprofen i acetaminophen, nazalni dekongestansi, probiotici i sl.), kiseonična, supstituciona (nadoknada elektrolita, transfuzije krvnih derivata itd.), antiokoagulantna, antiinflamatorna, antioksidativna terapija, kao i imunomodulatorna terapija i antivirusni lekovi (79). Među antivirusnim lekovima najznačajniji su remdesivir (nukleotidni analog koji svojim aktivnim metabolitima može inhibisati aktivnost RNK polimeraza i time uticati na replikaciju mnogih virusa, uključujući koronavirus), azvudin (nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze, ima antivirusnu aktivnost širokog spektra uključujući HIV-1), molnupiravir (ribonukleozidni prolek N-hidroksicitidina malih molekula i deluje protiv koronavirusa uključujući SARS-CoV-2), nirmatrelvir/ritonavir (inhibitor SARS-CoV-2 proteaze, a ritonavir je inhibitor HIV-1 proteaze i inhibitor CYP3A). Inhibicija SARS-CoV-2 proteaze onemogućava obradu prekursora poliproteina, sprečavajući replikaciju virusa. Ritonavir je inhibitor proteaze koji se primenjuje za povećanje nivoa nirmatrelvira i nema aktivnost protiv SARS-CoV-2 proteaze (86–89). Od imunosupresivne terapije sada se preporučuju deksametazon i hidrokortizon, uglavnom za pacijente sa COVID-19 koji primaju kiseoničnu potporu. Kada su u pitanju imunomodulatorni lekovi u lečenju COVID-19 koriste se inhibitori Janus Kinaze (JAK) i IL-6 antagonisti. Do sada su neki JAK inhibitori (Baricitinib, Rukolitinib, Tofacitinib i Nerizutinib) imali značajan klinički uticaj na poboljšanje kliničkih ishoda hospitalizovanih pacijenata sa COVID-19. Ovi inhibitori kinaze se koriste u lečenju COVID-19 jer inhibiraju virusom indukovanu imunološku aktivaciju i inflamatorne signalne puteve (90). Tocilizumab je od ranije korišćen IL-6 antagonist tokom lečenja različitih inflamatornih poremećaja.

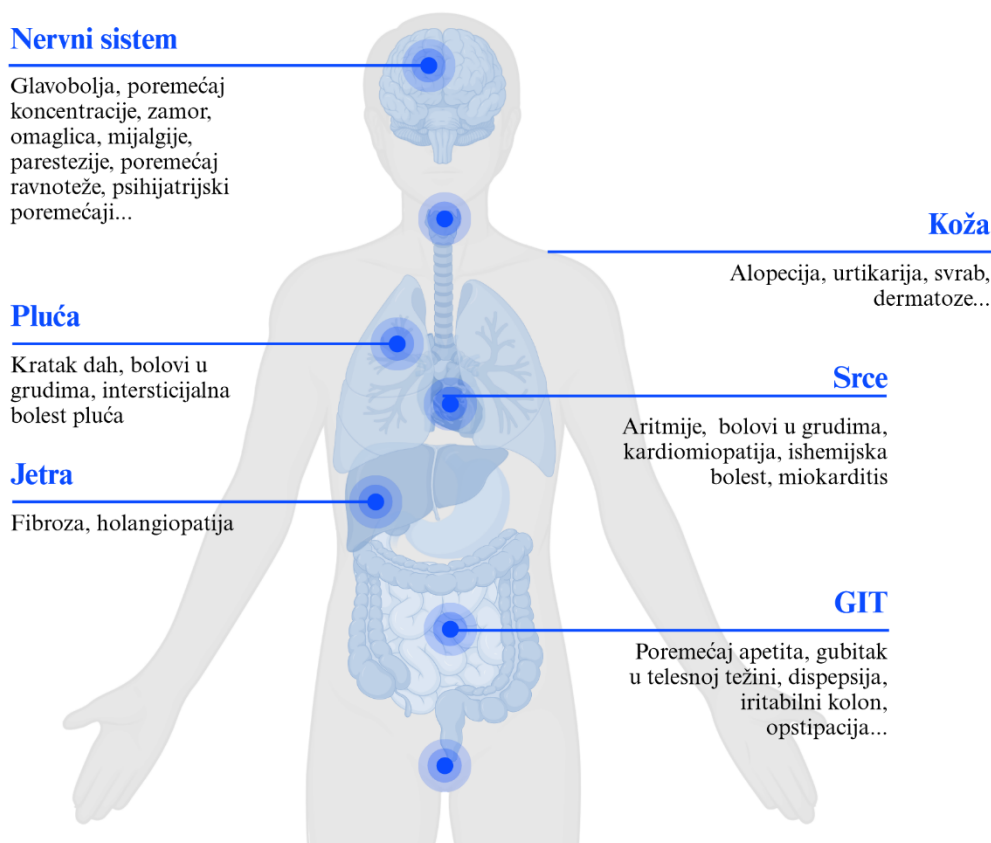
1.5.1 Potencijalna primena antioksidantne terapije u COVID-19

Od početka COVID-19 pandemije u većini terapijskih protokola nalazili su se vitamini, antioksidansi, suplementi. Kako su vremenom izostali snažni dokazi o njihovom pozitivnom efektu na tok i ishod bolesti većina modernih protokola za lečenje COVID-19 ne savetuju upotrebu ovih agenasa. Međutim, nekoliko kliničkih studija čiji je predmet istraživanja antioksidantna terapija kod COVID-19 se i dalje sprovode. Vitamin C (askorbinska kiselina) može predstavljati pogodno sredstvo protiv infekcije SARS-CoV-2 jer je ovaj vitamin redukcionni agens i antioksidans koji deluje na reakcije prenosa elektrona i stoga reaguje sa KSR kao što je hidrosil radikal. Međutim, njegova upotreba kod COVID-19 je još uvek nejasna kao što je i upotreba vitamina C kod ARDS-a ili sepse još uvek kontraverzna (91). Nrf-2 aktivatori uključuju razne vrste jedinjenja čija se zaštitna svojstva intenzivno istražuju. Među njima su kurkumin, kapsaicin, gingerol, EGCG, genistein, karotenoid likopen, resveratrol, fenetil estar kafeinske kiseline, dialil sulfid, indol-3-karbinol i sulforafan. Nrf2 aktivatori su široka kategorija antioksidantnih agenasa koji potencijalno mogu da inhibiraju SARS-CoV-2 (91). N-acetil cistein (NAC) je prekursor GSH. NAC funkcioniše preko širokog spektra mehanizama, koji se mogu iskoristiti za prevenciju i terapiju COVID-19. NAC primenjen intravenski, oralno ili inhalirano, može inhibirati replikaciju SARS-CoV-2 i može poboljšati prognozu ako se koristi pravovremeno. Potencijalne terapijske koristi od NAC uključuju ekstracelularno uklanjanje KSR, dopunjavanje intracelularnog GSH, supresiju citokinske oluje i zaštitu T ćelija, čime se ublažava zapaljenje i povreda tkiva. Administracija NAC u kombinaciji sa antivirusnim agensima može značajno smanjiti stopu prijema u bolnicu, potrebu za mehaničkom ventilacijom i mortalitet (92). Sa druge strane, klinički i eksperimentalni podaci sugerišu da NAC može delovati na mehanizme koji dovode do protrombotskog stanja uočenog kod teškog COVID-19 (93).

1.6. Post-COVID sindrom

Definicija post-COVID sindroma ili dugotrajnog COVID-a Svetske zdravstvene organizacije je perzistiranje ili pojava novih simptoma tri meseca nakon inicijalne infekcije virusom SARS-CoV-2 i koji traju najmanje dva meseca, pri čemu su isključene druge, alternativne dijagnoze (94). U okviru post-COVID sindroma dokumentovano je preko 200 različitih simptoma, koji mogu značajno da ometaju svakodnevne sposobnosti onih koji pate od ovog stanja. Procenjeno je da najmanje 10% pacijenata koji preleže težu kliničku sliku infekcije SARS-CoV-2 razviju post-COVID sindrom. Ovo stanje karakteriše raznovrstan spektar simptoma koji se multisistemske prezentuju i to najčešće na: respiratornom, kardiovaskularnom, muskuloskeletnom, neurološkom sistemu i koži (Slika 6) (95). Na osnovu podataka dobijenih iz SAD i iz Evrope, zaključeno je da je učestalost dugotrajnog COVID-a veća kod ženske populacije i pojedinaca koji pate od hroničnih oboljenja (96). U studiji u SAD veću šansu za pojavu dugotrajnog COVID-a imale su osobe ženskog pola, osobe sa komorbiditetima, osobe koje nisu primile buster dozu vakcine (naspram onih koji su primili), kao i osobe koje nisu bile vakcinisane (u poređenju sa onima koji su primili buster dozu vakcine). S druge strane, u istom istraživanju je uočena manja šansa za pojavu dugotrajnog COVID-a kod osoba starijih od 65 godina u poređenju sa osobama uzrasta od 25 do 34 godine. Čak 72% stanovnika Velike Britanije sa dugotrajnim COVID-om je kao najčešći simptom navelo zamor, nakon čega po učestalosti slede problemi sa koncentracijom (51%), bolovi u mišićima (49%) i kratak dah (48%) (97). Uporni simptomi kao što su zamor, omaglica, bolovi u telu i gubitak čula mirisa mogu da traju mesecima nakon akutne SARS-CoV-2 infekcije međutim, nakon jednogodišnjeg praćenja, većina pacijenata povratu svoje fizičke i funkcionalne sposobnosti, koje ipak ostaju na nižem nivou u odnosu na pojedince koji nisu imali infekciju (98,99). Incidenca post-COVID sekvela se procenjuje na između

10 i 35% (100). Rezultati ukazuju na manji rizik za pojavu dugotrajnog COVID-a kod osoba inficiranih Omikron sojem SARS-CoV-2, bez obzira na vakcinalni status, broj simptoma u akutnoj fazi infekcije, potrebu za hospitalizacijom, kao i sociodemografske karakteristike obolelih (97). S obzirom na povećan broj inficiranih Omikronom u odnosu na Alfa i Delta, moguće je da će se ukupna prevalencija dugotrajnog COVID-a u populaciji povećavati, čak i ako se verovatnoća njegove pojave smanji (101). Veruje se da pojava dugotrajnog COVID-a može nastati kao posledica produženog stanja inflamacije niskog stepena u kombinaciji sa pojačanim imunskim odgovorom, zatim hiperkoagulabilnim stanjem koje dovodi do tromboza, kao i nishodnom regulacijom ACE2 i promenama u organima u kojima je eksprimiran ovaj receptor (102).



Slika 6. Najčešće manifestacije post-COVID sindroma. Slika izrađena u www.biorender.com. GIT – gastrointestinalni trakt

Među najprevalentnijim kliničkim manifestacijama dugotrajnog COVID-a spadaju neurološke, koje su ujedno i među najproučavanijim. Neurološke manifestacije su registrovane tokom 6 meseci od preležane akutne COVID-19 bolesti kod oko jedne trećine pacijenata (103). Osobe koje su preležale COVID-19 prijavile su postvirusni sindrom hronične slabosti, difuzne mijalgije, simptome depresije i nerestorativnog sna. Gubitak osećaja ukusa i mirisa takođe može da traje nakon povlačenja drugih simptoma kod približno jedne desetine pacijenata tokom praćenja do 6 meseci (104). Zabeleženo je kognitivno oštećenje sa ili bez fluktuacija, uključujući omaglicu, koja se može manifestovati u vidu poteškoća sa koncentracijom, pamćenjem, receptivnom i/ili izvršnom funkcijom govora. Dugotrajno kognitivno oštećenje je dobro poznato nakon preležane teške forme bolesti, a javlja se kod 20–40% pacijenata otpuštenih iz intenzivne nege (105). Mehanizmi koji doprinose neuropatologiji kod COVID-19 mogu se grupisati u kategorije kao što su: direktan efekat virusa, teška sistemska inflamacija, neuroinflamacija, mikrovaskularne tromboze i neurodegeneracija. Serije obdukcija su pokazale da SARS-CoV-2 može direktno izazvati promene u moždanom parenhimu i krvnim sudovima, verovatno zbog uticaja na krvno-moždanu barijeru, izazivajući zapaljenje u

neuronima, potpornim ćelijama i moždanom vaskularnom sistemu (106). Štaviše, nivoi imunske aktivacije direktno koreliraju sa kognitivno-bihejvioralnim promenama. Zapaljenje (hronično zapaljenje mozga niskog nivoa), zajedno sa smanjenom sposobnošću da se reaguje na nove antigene i akumulacijom memorijskih T ćelija (obeležja imunosenescencije kod starenja i povrede tkiva), može igrati ulogu u patogenezi neuroloških manifestacija dugotrajnog COVID-a (102).

1.7 Oksidativni stres u COVID-19

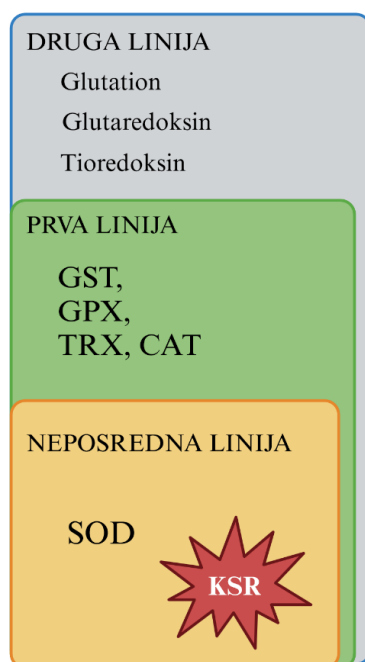
Oksidativni stres predstavlja stanje uzrokovano povišenim nivoom slobodnih radikala, uz neadekvatne mehanizme antioksidantne zaštite u ljudskom organizmu (107,108). KSR dovode do oštećenja biološki važnih makromolekula, poput prekidanje lanaca DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) i RNK (ribonukleinska kiselina), lipidne peroksidacije i modifikacije i degradacije proteina. KSR ne izazivaju samo oksidaciju proteina, lipida i DNK, već mogu delovati i kao signalni molekuli puteva koji su uključeni u opstanak i smrt ćelije (109). Gubitak ravnoteže između povećane produkcije slobodnih radikala i odbrambenih antioksidantnih i reparatornih mehanizama, može dovesti do oštećenja ćelija i aktivirati stresogeni odgovor i proinflamatornu kaskadu. Naime, KSR i H₂O₂ (vodonik peroksid) mogu aktivirati NF-κB što pokreće proizvodnju inflamatornih citokina (110). Povećana produkcija KSR i poremećaj regulacije antioksidantnih mehanizama domaćina ima značajnu ulogu u patogenezi različitih virusnih bolesti, uključujući COVID-19 (111). Tokom virusnih infekcija poreklo KSR može biti mitohondrijalno, ili usled povećane aktivnosti NADPH oksidaze. Od sedam NADPH oksidaza homologa, četiri učestvuju u patogenezi virusnih infekcija. To su Nox1, Nox2, Nox4 i DuoX2. Glavni izvor KSR u inflamiranim ćelijama je Nox2 (112,113). Višak KSR dovodi do aktivacije apoptotičnih signalnih puteva kako bi dovele do programirane ćelijske smrti, tako da inhibicija KSR atenuiše efekte virusa. Sve je više publikacija na temu oksidativnog stresa u COVID-19, međutim i dalje je nedovoljno podataka da bi se kompletno definisale promene redoks homeostaze kod pacijenata sa ovom bolešću (114). Pretpostavlja se da oksidativni stres u COVID-19 infekciji ima višestruku ulogu u različitim procesima, koji uključuju: interakciju virusa sa ćelijama domaćina, replikaciju virusa, održavanje pojačanog inflamatornog odgovora i nastanak različitih vidova oštećenja tkiva i organa (115,116). Pored toga, hiperprodukcija slobodnih radikala, među kojima su najvažniji KSR, kao i nemogućnost antioksidativnih mehanizama da to kompenzuju, dodatno doprinose razvijanju težih kliničkih manifestacija bolesti (115). Prooksidativni milje je neophodan za ulazak SARS-CoV-2 u ćelije domaćina jer ACE2 receptor virusa mora da zadrži svoje disulfidne veze netaknutim da bi se povezao sa *Spike* glikoproteinima koji su bogati cisteinom. Kada se nađe u ćeliji domaćina, virus koristi ćelijske komponente da se replikuje, što narušava oksidativnu ravnotežu i povećava stvaranje štetnih KSR i dovodi do mitohondrijalne disfunkcije (117). Većina pacijenata koji su umrli od SARS i MERS-a razvili su najteži oblik akutnog oštećenja pluća (*Acute Lung Injury* – ALI) - ARDS. Smatra se da su oksidativni stres i urođeni imunitet glavni putevi oštećenja pluća koji utiču na težinu ALI (118). Eksperimentalni modeli ARDS-a su pokazali povišene nivoe KSR i poremećaj antioksidantne odbrane tokom SARS-CoV infekcije (119). Slično se najverovatnije događa i u slučaju SARS-CoV-2 infekcije gde je, prema poslednjim podacima, dokazana značajna potrošnja egzogenih antioksidanasa poput vitamina C, alfa tokoferola, beta karotena (120,121). Takođe je registrovana poremećena homeostaza tiol-disulfida tokom COVID-19 (111,122). Pretpostavlja se da je još jedan od patogenetskih mehanizama COVID-19 endotelna disfunkcija indukovana poremećajem redoks homeostaze usled hipoksije (123). Oksidativni stres i citokinska oluja dovode do KSR zavisne apoptoze endotelnih ćelija u različitim organima, prvenstveno plućima, sa posledičnim oslobađanjem faktora koagulacije i formiranja ugrušaka krvi (124,125). Oksidativni stres može biti direktno pokrenut *Spike* proteinom SARS-CoV-2 i prooksidativnim enzimima, ili indirektno preko aktivacije inflamazoma, što takođe dovodi do aktiviranja inflamatornih kaskada što dovodi do nastanka začaranog kruga povećanog oksidativnog stresa i inflamacije. Tokom teške forme COVID-19 dolazi do oslobađanja citokina u sklopu imunskog odgovora, među kojima glavnu ulogu igraju IL-1β, IL-2, IL-6 i TNF. IL-1β je poznati generator KSR a na veoma sličan način i IL-2 stimuliše stvaranje drugih slobodnih radikala poput azotnih slobodnih radikala (126,127). IL-6 dovodi do aktivacije neutrofila i monocita što doprinosi povećanoj produkciji KSR (128). Obrnuto, KSR mogu povećati nivo IL-6 (129). Visoki nivoi IL-6 u sklopu COVID-19 povezani su sa povećanom stopom mortaliteta kod pacijenata u intenzivnoj nezi (130,131). Prethodni dokazi o tome da težina bolesti i progresija kod hospitalizovanih zbog COVID-19 može biti povezana sa sistemskih promenama u redoks ravnoteži su kontradiktorni (132,133). Više

publikacija je predložilo potencijalnu ulogu oksidativnog stresa u patogenezi COVID-19, uključujući citokinsku oluju, smrt endotelnih ćelija, koagulopatiju i ćelijsku hipoksiju (121,134). Pored toga, nivoi citokina i biohumoralnih inflamatornih markera su u pozitivnoj korelaciji sa markerima oksidativnog stresa kod pacijenata sa COVID-19 (135). Jedna studija je potvrdila poremećen metabolizam i redoks funkciju ćelijskog GSH u infekciji SARS-CoV2 (136). Sa druge strane, pojedine studije nisu pronašle korelaciju između težine bolesti i promena u redoks profilu kod hospitalizovanih osoba sa COVID-19 (116,133).

Oksidativni stres je ključan faktor u patofiziologiji COVID-19, a verovatno i kod dugotrajnog COVID-a. Zapaljenje i oksidativni stres se međusobno pojačavaju, doprinoseći nastanku sistemskog hiperinflamatornog stanja i koagulopatije, koji su kardinalni patološki mehanizmi teških stadijuma bolesti (137). Predloženo je da se razvoj specifičnih kliničkih fenotipova dugotrajnog COVID-a može delimično objasniti specifičnim genetskim varijacijama domaćina, posebno u genima povezanim sa oksidativnim stresom i zapaljenjem. Naime, osobe koje nose genetske varijante povezane sa izmenjenom redoks ravnotežom sklonije su razvoju kliničkih fenotipova povezanih sa dugotrajnim COVID-om. Ove genetske varijacije mogu dovesti do velikih međuindividualnih razlika koje podupiru mehanizme koji održavaju redoks homeostazu (138). Prethodno navedeni događaji, kao što je inflamacija izazvana KSR, posledično oštećeni endotel, što dovodi do formiranja mikrotromba, može uticati i na centralni nervni sistem, zbog postojeće neuroinflamacije i promovisati formiranje imuno-endotelno-neurološkog začaranog kruga (137).

1.7.1. Polimorfizmi gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u COVID-19

Da bi se zaštitio od oksidativnog oštećenja biološki važnih makromolekula ljudski organizam je razvio brojne ne-enzimske i enzimske mehanizme antioksidantne zaštite od slobodnih radikala (139) (Slika 7). Neposrednu liniju enzimske antioksidantne zaštite čine izoenzimi superoksid dizmutaze (SOD), dok u prvu liniju odbrane od slobodnih radikala spadaju izoenzimi glutathion peroksidaze (GPX) i glutathion transferaze (GST). S druge strane, jedan od najvažnijih regulatornih antioksidantnih proteina je Nrf2 (eng. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), transkripcioni faktor koji reguliše bazalnu aktivnost i koordiniranu ekspresiju gena za navedene antioksidantne enzime (140,141). Na aktivnost antioksidantnih enzima i regulatornih proteina utiče i polimorfizam gena koji kodiraju prethodno pomenute proteine. Smatra se da genetski profil antioksidantnih enzima igra veoma važnu ulogu u proceni rizika i prognozi toka bolesti kod pacijenata sa COVID-19 (142). U težim slučajevima COVID-19 bolesti dolazi do iscrpljivanja antioksidantne enzimske odbrane. Osnovni nivo antioksidantne odbrane je nedovoljan da potpuno neutrališe štetne efekte KSR, zbog teškog inflamatornog stanja i prekomernog stvaranja ekstracelularnih i intracelularnih slobodnih radikala (143). Ipak, podaci iz literature o povezanosti polimorfizama gena koji kodiraju proteine uključene u regulaciju redoks homeostaze sa težinom kliničke slike i prognozom toka bolesti kod bolesnika sa COVID-19, kako nezavisno, tako i udruženo sa markerima inflamacije, su još uvek ograničeni.



Slika 7. Enzimski i neenzimski nivoi antioksidantne zaštite. Preuzeto iz Marković M. (141). KSR – kiseonični slobodni radikali, SOD - superoksid dizmutaza, GST – glutation S transferaza, GPX – glutation peroksidaza, TRX – tioredoksin, CAT – katalaza.

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

Adekvatna ekspresija Nrf2 u ćelijama utiče na njihovu sposobnost da omoguće pravovremeni odgovor na oksidativni, inflamatorni i metabolički stres (144). Generalno posmatrano, aktivacija Nrf2 ima citoprotektivni efekat tokom virusnih infekcija, što je i dokazano tokom infekcija Zika, Ebola i Influenca A virusima (145). U uslovima adekvatne redoks homeostaze Nrf2 je povezan sa Kelch-like ECH-povezanim proteinom 1 (Keap 1), čije cisteinske residue kontrolišu aktivnost E3 ubikvitin ligaze, tako da se Nrf2 razlaže u proteazomu. Međutim, u stanju oksidativnog stresa, dolazi do konformacionalnih promena u Nrf2-Keap1 kompleksu, oslobađanja Nrf2 i njegove translokacije u jedro, gde formira heterodimer sa malim proteinom muskuloaponeurotičnog fibrosarkoma (sMaf) i vezuje se za elemente antioksidantnog odgovora (*antioxidant response element, ARE*) u promoterskom regionu gena uključenih u regulaciju redoks homeostaze. Na ovaj način Nrf2 aktivacija uzrokuje transkripciju velikog broja gena koji kodiraju antioksidantne enzime i druge citoprotektivne molekule uključujući i različite izoezime SOD i GPX i različite klase GST (146).

Sve je više dokaza koji ukazuju da je supresija Nrf2 povezana sa COVID-19. Nekoliko studija je pokazalo smanjenu ekspresiju Nrf2 kod pacijenata sa COVID-19 (147,148). Postoji nekoliko studija koje pokazuju da Nrf2 ima ulogu u supresiji ushodne regulacije proinflamatornih citokina (149–151). SARS-CoV-2 indukuje apoptozu i lokalno oslobađanje PAMP i različitih DAMP. Nrf2 prevenira oštećenje ćelija i tkiva i smanjuje proizvodnju DAMPs koje se oslobađaju nekrozom ćelija i važne su u amplifikaciji inflamatornog odgovora (146). Najznačajniji funkcionalni polimorfizam regulatornog antioksidantnog proteina *Nrf2* rs6721961 (-617C/A) se nalazi u promoterskom regionu i smanjuje Nrf-2 zavisnu transkripciju gena. (152)

Superoksid dizmutaza i glutation peroksidaza

Kao što je prethodno navedeno, SOD pruža neposrednu enzimsku antioksidantnu zaštitu. Izoenzim SOD2 se nalazi u mitohondrijama i prevodi superoksidni anjon u vodonik peroksid. *SOD2* rs4880 SNP (eng. *single nucleotid polymorphism*) uzrokuje zamenu aminokiseline valin alaninom, što redukuje efikasnost transporta SOD2 u mitohondrije za 30-40% i samim tim dovodi do smanjenog potencijala za neutralizaciju superoksidnog anjona (153). Nedavne studije su pokazale da SOD2 može biti potencijalno antiinflamatorno sredstvo zbog njene sposobnosti uklanjanja superoksidnog anjona. Pokazano je da *SOD2* rs4880 polimorfizam utiče na inflamatorni imuni odgovor (154). U daljoj neutralizaciji slobodnih radikala učestvuju GPX i CAT zajedno sa GST i oni čine prvu liniju enzimске antioksidantne odbrane. GPX1 je glavni enzim odgovoran za uklanjanje solubilnog vodonik peroksida, i prisutan je u citosolu i u mitohondrijama svih ćelija. *GPX1* rs1050450 SNP podrazumeva supstituciju citozina timinom koja je udružena sa smanjenjem aktivnošću GPX1 izoenzima (153). GPX3 pripada porodici selen-zavisnih peroksidaza i igra ključnu ulogu u smanjenju ekstracelularnog oksidativnog oštećenja redukovanjem H₂O₂ i organskih hidroperoksida u vodu. GPX3 igra značajnu ulogu u različitim inflamatornim oboljenjima (155,156). Smanjena aktivnost GPX3 registrovana je kod osoba sa SIRS-om, a nivoi GPX3 u plazmi su značajno niži kod pacijenata sa sindromom multiorganske insuficijencije (157). GPX3 je izoenzim GPX koji je dominantno prisutan u plazmi, a polimorfizam *GPX3* T-65C (rs8177412) čini haplotip sa još nekoliko polimorfizama prisutnih u nekodirajućem regionu *GPX3* gena što dodatno utiče na ekspresiju ovog proteina i njegovu aktivnost (158). Naime, navedeni polimorfizam u genu koji kodira GPX3 (rs8177412) je odgovoran za smanjenje transkripcije gena, što dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti GPX3 u plazmi (159).

Prema jednoj studiji, pacijenti sa infekcijom SARS-CoV-2 imali su veću aktivnost serumske GPX od kontrolne grupe. Ista studija je pokazala veću serumsku aktivnost SOD i koncentraciju ukupnog antioksidativnog kapaciteta (eng. *Total antioxidant capacity* - TAC) kod pacijenata sa COVID-19 za razliku od kontrola (160). Golabi i saradnici sprovedli su studiju u kojoj su pokazali da ambulantno lečeni pacijenti sa COVID-19 imaju veće vrednosti serumskih SOD i GPX u odnosu na kontrolnu grupu (160). U studiji Tavasolifara i saradnika iz 2023. godine ekspresija i aktivnost SOD i CAT bili su povećani u monocitima i plazmi pacijenata sa COVID-19 (161). Međutim, u studiji Muhameda i saradnika, aktivnosti eritrocitnog GSH i GPX, kao i serumskih SOD i katalaze (CAT) bile su niže kod pacijenata sa COVID-19 nego u kontrolnoj grupi (162). U studiji koju su sprovedli Jerotić i saradnici, utvrđena je značajna povezanost za razvoj COVID-19 za polimorfizam *GPX3* rs8177412. Pored toga, Jerotić i sar. objavili su da polimorfizmi *SOD2* rs4880 i *GPX1* rs1050450 utiču na biohemijski profil pacijenata sa COVID-19. Konkretno, veći nivoi fibrinogena i feritina su bili u velikoj meri povezani sa alelom *SOD2**Val, dok su viši nivoi fibrinogena i d-dimera bili povezani sa alelom *GPX1**Leu (153).

Glutation S-transferaze

Glutation S-transferaze (GST) pripadaju familiji detoksifikacionih enzima faze II i prisutni su u skoro svim ćelijskim organizmima. One štite ćeliju od različitih karcinogena, terapijskih agenasa i produkata oksidativnog stresa, čineći ih manje toksičnim. Najveću grupu čine citosolne GST koje se dele u sedam različitih klasa imenovanih prema grčkom alfabetu: α (GSTA), μ (GSTM), ω (GSTO), π (GSTP), σ (GSTS), θ (GSTT), ζ (GSTZ) (163). Pored glavne uloge detoksifikacionih enzima, GST su uključeni u druge važne funkcije, kao ćelijski signali u procesima odgovora na stres, ćelijsku proliferaciju i apoptozu, u posttranslacione modifikacije i u rezistenciju na lekove (164,165). Polimorfizmi GST su česti u humanoju populaciji, kreću se od 20-60% (163). Pojava delecionih polimorfizama unutar klasa GSTM-1 i GSTT-1 utiče na raspoloživost enzima, pa kod osoba koje su homozigoti za nulti alel ovih gena ekspresija GSTM-1 i GSTT-1 enzima u potpunosti izostaje (140). Pored toga, veliki broj polimorfizama pojedinačnih nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) različitih GST klasa (*GSTP1* (AB) rs1695, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *GSTM3*

rs1332018) takođe utiče na ekspresiju, odnosno aktivnost ovih enzima (140,166). U slučaju polimorfizma *GSTP1* SNP (AB) rs1695, supstitucija A313G uzrokuje zamenu izoleucina valinom na poziciji 105 (Ile105Val), što utiče na afinitet *GSTP1* prema supstratu (140). U oba *GSTO* gena, najčešće su proučavana dva funkcionalna polimorfizma: *GSTO1* Ala140Asp (rs4925) i *GSTO2* Asn142Asp (rs156697). *GSTO1* SNP je na nukleotidnoj poziciji 419, uzrokujući supstituciju aminokiseline alanin aspartatom na AK poziciji 140 (Ala140Asp) egzona 4. SNP *GSTO2* rs156697 je zamena na nukleotidnoj poziciji 424 i dovodi do supstitucije aminokiseline asparagin aspartatom na AK poziciji 142 (Asn142Asp) egzona 4 (166). Pokazano je da polimorfizam *GSTO1* rs4925 prvenstveno uzrokuje promenu deglutationilazne aktivnosti *GSTO1*. S druge strane, varijantni *GSTO2**G alel dovodi do niže ekspresije gena *GSTO2* (166). Polimorfizam u okviru *GSTM3* (rs1332018, A-63C) gena nalazi se u promotorskom regionu na mestu vezivanja transkripcionih faktora, što ukazuje na njegov potencijalni regulatorni značaj. Stoga, nosioci *GSTM3**CC+AC genotipa pokazuju smanjenju ekspresiju *GSTM3*, zbog slabijeg vezivanja RNK polimeraze II (140).

Kada su u pitanju GST, neke studije su implicirale da je polimorfizam različitih GST gena povezan sa razvojem i kliničkim tokom COVID-19. Naime, osobe sa *GSTT1* nultim genotipom imaju pozitivnu vezu sa smrtnošću od COVID-19, što su pokazali Sadat i saradnici (167). Jedna od značajnijih posledica COVID-19 je fibroza pluća, koja je povezana sa *GSTT1* i *GSTM1*-nultim genotipovima kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom plućnom bolešću, prema istraživanju Dinga i saradnika (168). Prema drugoj studiji, pacijenti sa teškom COVID-19 imali su veću učestalost nultih alela *GSTM1*-/- i *GSTT1*-/- od pacijenata sa blažim kliničkim simptomima. Pored toga, pacijenti sa *GSTT1*-/- genotipom imali su veću stopu mortaliteta od onih sa *GSTT1*+/1 genotipom (169). Ćorić i saradnici su dokazali povezanost između dva polimorfizma *GSTP1* (rs113272 i rs1695) i *GSTM3* sa podložnosti za nastanak i težinom COVID-19 (170). Naime, njihovi rezultati govore u prilog toga da osobe sa *GSTP1* (rs1695) IleVal genotipom imaju skoro 3 puta manji rizik od razvoja COVID-19, u poređenju sa nosiocima divljeg *GSTP1* IleIle genotipa. U slučaju *GSTM3* (rs1332018, A-63C) polimorfizma, manja šansa za razvoj COVID-19 je pronađena kod nosilaca genotipa *GSTM3* AC u poređenju sa *GSTM3* AA. Prema studiji Đukić i saradnika koja se bavila analizom polimorfizama *GSTO1* i *GSTO2* kod obolelih od COVID-19 u srpskoj populaciji, pokazano je da nosioci polimorfizama *GSTO1**AA i *GSTO2**GG imaju veći rizik od infekcije u odnosu na nosioce *GSTO1* i *GSTO2* divljeg tipa (166). Ova studija je uključivala analizu haplotipa, kojom je otkriveno da su nosioci H2 haplotipova, koji su uključivali varijantne alele za *GSTO1**A i *GSTO2**G, imali dvostruko povećan rizik od razvoja COVID-19 (166).

1.7.2. Polimorfizmi gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u neurološkim manifestacijama post-COVID sindroma

Perzistiranje ili pojava neuroloških simptoma nakon akutne infekcije SARS-CoV-2 je veliki globalni zdravstveni problem. Oni traju mesecima nakon akutne COVID-19 i mogu biti iscrpljujući i uključuju zamor, neuropsihijatrijske posledice, poremećaje sna, senzomotorne simptome, kognitivno oštećenje/omaglicu, hipogeuziju/hiposmiju, gubitak sluha i očne manifestacije (171). Uloga neuroinflamacije u dugotrajnom COVID-u predmet je različitih studija koje su pokazale da abnormalni humoralni i ćelijski imunski odgovori, sistemski inflamatorni markeri kao što je IL-6 i autoantitela mogu igrati ulogu u sistemskim i neurološkim manifestacijama dugotrajnog COVID-a (172,173). Jedna studija je pokazala da je dugotrajni COVID povezan sa inflamatornim procesima i smanjenim antioksidantnim potencijalom, dominantno sniženim GPX, povećanom proizvodnjom azot oksida (NO), oksidativnim oštećenjem proteina i lipida sa povećanim stvaranjem malondialdehida (MDA) (174). U drugoj studiji, MDA u serumu bio je značajno veći kod pacijenata nakon 4 meseca od preležane COVID-19 u poređenju sa zdravim kontrolama, što pokazuje sistemski redoks disbalans tokom dužeg perioda nakon akutne infekcije (175).

Do sada se mali broj naučnoistraživačkih radova bavio značajem polimorfizama regulatornih i katalitičkih antioksidantnih enzima u neurološkim manifestacijama post-COVID sindroma. Kada je u pitanju mijalgija povezana sa dugotrajnim COVID-om, u studiji Ercegovac i sar. pokazano je da su osobe koje su posedovale najmanje jedan alel *GSTP1* AB Val imale značajno smanjenu podložnost za nastanak ovog neurološkog simptoma, uz smanjenje rizika od skoro dva puta (176). Pored toga, prisustvo alela *GSTO1* Asp bilo je povezano sa otprilike dvostrukim smanjenjem šanse za dugotrajnu COVID mijalgiju. Ista studija je takođe otkrila da postoji pozitivna povezanost između genetske varijabilnosti u glutathion peroksidazama i šanse za razvoj mijalgije povezane sa dugotrajnim COVID-om. Naime, aleli *GPX1* Leu i *GPX3* CC su pokazali značajne povezanosti, nadmašivši trostruko povećanje kod onih koji su posedovali kombinovani genotip *GPX1*LeuLeu/*GPX3*CC (176). Navedeni istraživači su otkrili da su pojedinci sa *GSTMI*-nultim genotipom i *GPX1* Leu alelima pokazali više od dva puta veću šansu da razviju simptome omaglice kod dugotrajnog COVID-a. Navedeni efekat je pojačan kada su ovi genotipovi bili kombinovani, pa je u slučaju kada su pojedinci bili nosioci *GSTMI*-nultog/*GPX1*LeuLeu genotipa za razliku od nosilaca *GSTMI*-aktivnog/*GPX1*ProPro genotipa to rezultiralo skoro 13 puta povećanjem šanse za razvoj ovog simptoma dugotrajnog COVID-a. Prisustvo polimorfizma Nrf2 bilo je povezano sa 50% većom verovatnoćom da će doći do dugotrajnog kognitivnog oštećenja povezanog sa COVID-om (176).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati značaj laboratorijskih parametara - nespecifičnih markera inflamacije (interleukin-6, C-reaktivni protein, fibrinogen, feritin, sedimentacija eritrocita), kompletne krvne slike, biohemijskih markera oštećenja organa (urea, kreatinin, transaminaze, laktat dehidrogenaza) i pokazatelja koagulacionog statusa (INR i d-dimer) u proceni težine kliničke slike u momentu prijema pacijenta na bolničko lečenje, kao i značaj korelacije njihovih vrednosti sa daljim tokom bolesti

2. Ispitati povezanost polimorfizama *GSTM1*, *GSTT1*, *Nrf2* rs6721961, *GSTM3* rs1332018, *GPX3* rs8177412, *GSTP1* rs1695, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *SOD2* rs4880, *GPX1* rs1050450, sa rizikom za nastanak težeg oblika COVID-19

3. Ispitati udruženi značaj navedenih laboratorijskih parametara i polimorfizama gena za proteine značajne u regulaciji redoks homeostaze sa rizikom za nastanak težeg oblika COVID-19

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Dizajn studije

Retrospektivna kohortna studija sprovedena je na Klinici za infektivne i tropske bolesti Univerzitetskog Kliničkog Centra Srbije (UKCS) u saradnji sa Institutom za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog Fakulteta u Beogradu (MFUB).

3.2 Mesto i period

Istraživanje je obavljeno u Klinici za infektivne i tropske bolesti Univerzitetskog Kliničkog Centra Srbije i Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i obuhvatilo je period od septembra 2020. do juna 2022. godine.

3.3 Pravni i etički preduslovi

Studija je planirana u skladu sa pravilima Etičkog komiteta UKCS (saglasnost broj 566/1 od 13.7.2020. godine, u okviru projekta „*The role of antioxidant and ACE2 genetic profile in risk stratification and mid-term prognosis of COVID-19 patients*“, akronim *AntioxIdentification*), kao i sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji. Svi ispitanici, čiji su lični podaci i biološki materijal korišćeni u studiji, dali su informisani pristanak za učešće u studiji.

3.4 Selekcija pacijenata

U istraživanje je uključeno 265 COVID-19 pacijenata koji su bili primljeni na bolničko lečenje u Kliniku za infektivne i tropske bolesti UKCS, u periodu od septembra 2020. do juna 2022. godine. Potrebna minimalna veličina uzorka za detekciju veličine efekta od 0,33 u analizi varijanse sa dve grupe (pacijenti sa lakšom formom bolesti i težim formama bolesti) za: nespecifične markere inflamacije, kompletnu krvnu sliku, biohemijske markere oštećenja organa i pokazatelje koagulacionog statusa za nivo statističke značajnosti od 0,05 i statističku snagu od 0,9, iznosila je 100 pacijenata. Veličina efekta dobijena je na osnovu pretpostavljenih odnosa vrednosti objašnjene i rezidualne varijanse od 0.1 prema 0.9. Izračunati minimalan broj pacijenata za uključivanje u studiju je povećan za 20% zbog podataka koji bi nedostajali te je stoga minimalni planirani broj pacijenata iznosio 120 ispitanika. Izračunavanje veličine uzorka urađeno je pomoću programa *G-power* 3.1.9.2 (177).

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju su obuhvatali:

1. SARS-CoV-2 infekciju, potvrđenu pozitivnim PCR testom, u uzorcima nazofaringealnih briseva
2. Punoletne osobe

Kriterijumi za neuključivanje pacijenata u studiju bili su:

1. Postojanje udružene infekcije (Virus Humane Imunodeficijencije - HIV, Hepatitis B Virus- HBV, Hepatitis C Virus- HCV),
2. Maligne bolesti

3. Klinička slika pacijenta koja je zahtevala lečenje u JIN
4. Smrtni ishod
5. Stav ispitanika da ne želi da učestvuje u istraživanju

Procena kliničkog stadijuma težine bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze i/ili hospitalizacije je vršena prema smernicama Nacionalnog protokola za COVID-19 verzija 11, koji je u tom periodu bio aktuelan (Slika 8). Prema tada aktuelnoj klasifikaciji COVID-19 bolesti Nacionalnog protokola za lečenje COVID-19 ona se deli u sledeće oblike: 1. asimptomatsku/blago simptomatsku, 2. bolesnici bez komorbiditeta sa RTG znacima pneumonije 3. srednje tešku sa znacima citokinske oluje i potrebom za kiseoničnom terapijom i 4. i 5. oblik u koje spadaju najteži pacijenti sa teškom pneumonijom, znacima citokinske oluje, ili ARDS-om i znacima multiorganske disfunkcije.

U našem istraživanju pacijente smo takođe stratifikovali prema težini kliničke slike, Oni su grupisani u dve grupe, u grupu 1 su svrstani pacijenti sa lakšom kliničkom slikom (prema Nacionalnom vodiču grupa 1 i 2), a u grupu 2 pacijenti sa bilo kojom težom formom bolesti, (oblik 3 prema Nacionalnom protokolu). Naša klasifikacija imala je za cilj lakšu i praktičniju procenu rizika od progresije iz jednog u bilo koji drugi, napredniji oblik bolesti.

<p>Oblik 1</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pozitivan nazofaringealni bris (PCR na SARS-CoV-2, Ag test) 2. Asimptomatska/vrlo blaga klinička slika 3. Bolesnici bez komorbiditeta i sa blagim oblikom infekcije (hospitalizovani pacijenti sa SpO₂ > 94% i bez Rtg znakova pneumonije) 	<p>Oblik 2</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pozitivan nazofaringealni bris (PCR na SARS-CoV-2, Ag test) 2. Blaga klinička slika 3. Bolesnici bez komorbiditeta i sa blagim oblikom infekcije (hospitalizovani pacijenti sa SpO₂ > 94% i sa Rtg znacima pneumonije sa ili bez znakova hipoksije pri prijemu)
<p>Oblik 3</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pozitivan nazofaringealni bris (PCR na SARS-CoV-2, Ag test) 2. Umereno teška klinička slika 3. Teška hipoksija sa potrebom za kiseoničnom terapijom (SpO₂ < 90%), febrilnost, multiple opacifikacije na Rtg-u pluća (ili specifične promene na plućima viđene na CT-u) 4. Citokinska oluja (pogoršanje opšteg stanja uz ↑CRP, ↑fibrinogen, ↑d-dimer, ↑IL-6) (bar jednog parametra) 	<p>Oblici 4 i 5</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pozitivan nazofaringealni bris 2. Veoma teška/teška klinička slika 3. Početak ili razvoj ARDS-a 4. Citokinska oluja (pogoršanje opšteg stanja uz ↑CRP, ↑fibrinogen, ↑d-dimer, ↑IL-6)

Slika 8. Klasifikacija oblika COVID-19 bolesti prema težini kliničke slike. Preuzeto iz Nacionalnog protokola za COVID-19, verzija 11. PCR – engl. *Polymerase chain reaction* (Reakcija lančanog umnožavanja), Ag – antigen, SpO₂ – saturacija kiseonikom arterijske krvi, CT – kompjuterizovana tomografija, CRP – C- reaktivni protein, IL-6 – interleukin 6

3.5 Materijal

3.5.1 Uzorkovanje krvi

Uzorci pune krvi sa EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina) kao antikoagulansom uzeti su jednokratno, u momentu uključivanja u studiju, a potom su transportovani i čuvani na -20°C do izolacije DNK, u Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.6 Instrumenti merenja

Za prikupljanje osnovnih demografskih i epidemioloških podataka su korišćeni podaci iz istorije bolesti, kao i strukturisani epidemiološki upitnik. U našem istraživanju, gojazni pacijenti su definisani kao osobe sa indeksom telesne mase (eng. *body mass index*, BMI) većim od 30 kg/m^2 , a pušači kao osobe koje su navele da su pušile svakog dana tokom perioda koji je minimalno iznosio 60 dana do trenutka uključivanja u studiju.

Za prikupljanje rezultata kliničkih i laboratorijskih ispitivanja, kao i drugih podataka dobijenih tokom regrutacije i praćenja pacijenata (arterijska hipertenzija, gojaznost, dijabetes, hronična respiratorna i bubrežna bolest) korišćeni su podaci dobijeni specijalističkim pregledom pacijenta za potrebe studije, kao i podaci iz istorija bolesti. Za potrebe istraživanja uticaja genskih polimorfizama na razvoj neuroloških sekvela u okviru post-COVID sindroma, regrutovali smo sve pacijente uključene u studiju koji su nakon 3 meseca od akutne faze COVID-19 imali neurološke simptome. Neurološki pregled sproveden je kod 167 pacijenata nakon akutne faze COVID-19 i uključivao je: procenu mentalnog statusa (orijentacija i kratkoročno pamćenje), pregled kranijalnih nerava putem procene veličine, simetrije i reaktivnosti zenica na svetlost, primarnog položaja očne jabučice, motornog (tonus, rigiditet i spastičnost) i senzornog odgovora, ispitivanja dubokih tetivnih refleksa i patoloških refleksa (znak Babinskog), ukočenosti vrata, testiranja koordinacije, nistagmusa, tremora, ataksije i ispitivanja hoda. Mijalgija je procenjena statičkom i dinamičkom ručnom palpacijom mekih tkiva i zglobova, kao i prisustva bolova u mišićima tokom kretanja. Zamor je procenjivan korišćenjem skale za procenu zamora (*Fatigue assessment score* - FAS), koja se sastoji od upitnika od 10 pitanja koja se odnose na to kako pojedinci obično osećaju zamor. Totalni FAS skor < 22 označava da nema zamora, dok skor ≥ 22 ukazuje na zamor (178). Omaglica je procenjena na osnovu odgovora ispitanika (slaže se ili ne slaže) na 19 pitanja koja se tiču omaglice (npr. zaboravan, otežano razmišljanje i fokusiranje, spor, pospan, itd.). Pozitivan odgovor na 10 ili više pitanja smatrano je prisustvom omaglice (179). Baza podataka formirana je preko servera Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu („RedCap system“).

3.6.1 Određivanje polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke proteine uključene u regulaciju redoks homeostaze

DNK je izolovana iz $200\mu\text{l}$ venske krvi sa EDTA, korišćenjem komercijalnog kita *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen, kataloški broj 51306, *Chatsworth CA, USA*). U prvom koraku membrane limfocita su lizirane u rastvoru deterdženata, a zatim su histoni i ostali proteini vezani za DNK uklonjeni enzimskom digestijom upotrebom proteinaze K, a ostaci RNK uz pomoć RNAze A. Nakon toga, dobijeni lizat je prenošen u mini spin kolone sa silikonskom membranom koja selektivno vezuje DNK. Ostatak lizata ispiran je serijom pufera koje u svom sastavu imaju soli i etanol što omogućava da se proteini i drugi kontaminanti, koji bi mogli da inhibiraju PCR kao i ostale reakcije nakon izolacije, ne zadržavaju na silikonskoj membrani. Kao krajnji korak, DNK je ispirana sa mini spin kolone, alikvotirana i čuvana na -20°C do izvođenja PCR-a. Iz izolovane DNK, određivani su

polimorfizmi gena za regulatorne i katalitičke proteine uključene u regulaciju redoks homeostaze primenom većeg broja molekularnih tehnika:

Delecioni polimorfizmi *GSTM1* i *GSTT1* su određivani multipleks PCR metodom po *Abdel-Rahman-a* i sar. (180). Kontrolni prajmeri (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA*), koji omogućavaju amplifikaciju egzona 7 *CYP1A1* gena, takođe su bili uključivani u PCR reakcije kako bi se potvrdilo prisustvo DNK u uzorku, kao i uslovi PCR reakcije.

Polimorfizmi *GSTP1* (AB) rs1695, *GSTP1* (CD) rs1138272, *SOD2* rs4880, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *GSTM3* rs1332018, *GPX3* rs8177412, *GPX1* rs1050450 su određivani metodom PCR umnožavanja u realnom vremenu (eng. *real time* PCR), upotrebom *Applied Biosystems TaqMan® Drug Metabolism Genotyping* eseja (*Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*), na *Mastercycler ep realplex* aparatu (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) (Tabela 2).

Tabela 2. Eseji korišćeni za određivanje SNP polimorfizama

Polimorfizam	Kataloški broj eseja <i>Applied Biosystems</i>
<i>GSTP1</i> (AB) rs1695	C 3237198 20
<i>GSTP1</i> (CD) rs1138272	C 1049615 20
<i>SOD2</i> rs4880	C 8709053 10
<i>GSTO1</i> rs4925	C 11309430 30
<i>GSTO2</i> rs156697	C 3223136 1
<i>GSTM3</i> rs1332018	C 3184522 30
<i>GPX3</i> rs8177412	C 25964717 20
<i>GPX1</i> rs1050450	C 175686987 10

Inverzioni polimorfizam rs6721961 *Nrf2* gena je određen PCR-CTTP metodom (engl. *Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers*) prema modifikovanoj metodi autora *Shimoyama Y* i sar. (181). Kako bi se potvrdila ispravnost PCR reakcije, u svaku analizu je uključena i negativna kontrola koju su činile sve komponente PCR smeše osim ispitivanog uzorka. Pored toga, pozitivne kontrole su obuhvatale prethodno genotipizirane uzorke koji su kroz minimum dve analize dali isti rezultat.

3.6.2 Određivanje markera inflamacije i biohemijskih markera oštećenja organa

Vrednosti nivoa nespecifičnih markera inflamacije (interleukin-6, C-reaktivni protein, fibrinogen, feritin, sedimentacija eritrocita), kompletne krvne slike, biohemijskih markera oštećenja organa (urea, kreatinin, transaminaze, laktat dehidrogenaza) i pokazatelja koagulacionog statusa (INR i d-dimer) određivani su metodama u okviru rutinske laboratorijske prakse Klinike za infektivne i tropske bolesti UKCS. Navedeni parametri za sve pacijente koji su uključeni u studiju preuzeti su iz istorija bolesti pacijenata. Referentne vrednosti laboratorije centra za Medicinsku biohemiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije su prikazane u Tabeli 3 i Tabeli 4.

Tabela 3. Referentni opseg parametara krvne slike i laboratorijskih parametara inflamacije

Parametri inflamacije	Referentni opseg
Leukociti (n)	4,0-10,0x10 ⁹
Neutrofili (n)	2,06-6,49x10 ⁹
Limfociti (n)	1,19-3,35x10 ⁹
Monociti (n)	0,12-0,84x10 ⁹
NLR	1-3
IL-6 (pg/ml)	0,0-5,9
CRP (mg/l)	<6,0
Feritin (ng/ml)	
Žene	5-159
Muškarci	28-397

NLR- *engl. neutrophil-lymphocytes ratio*; IL-6 – interleukin 6; CRP- C reaktivni protein

Tabela 4. Referentni opseg za biohemijske markere oštećenja organa

Biohemijski markeri oštećenja organa	Referentni opseg
Urea (mmol/L)	2,7-8,7
Kreatinin (μmol/L)	50,0-110,0
ALT (U/L)	16,0-63,0
AST (U/L)	8,0-40,0
LDH (U/L)	81,0-234,0
CK (U/L)	20,0-220,0

ALT- alanin aminotransferaza; AST- aspartat aminotransferaza; LDH- laktat dehidrogenaza; CK-kreatin kinaza

3.7 Statistička analiza

Za analiziranje primarnih podataka korišćene su deskriptivne statističke metode, statističke metode za testiranje hipoteze, metode za određivanje korelacije i metode za modelovanje povezanosti ishoda i potencijalnih prediktora. U zavisnosti od tipa varijabli i tipa distribucije, opisivanje podataka predstavljeno je kao ukupan broj (n) i procenat, srednja vrednost +/- standardna devijacija ili medijana (minimalna-maksimalna vrednost). Interval poverenja od 95% korišćen je za procenu populacionih parametara. Od metoda za testiranje statističkih hipoteza korišćen je t-test, χ^2 test i analiza varijanse. Od metoda za analizu korelacije korišćen je se *Pirsonov* linearni koeficijent korelacije i *Spirmanov* koeficijent korelacije rangova. Linearna i logistička regresija korišćena je za model povezanosti zavisnih varijabli sa potencijalnim prediktorima. Prediktori iz univarijantnih analiza koje su statistički značajne sa nivoom značajnosti od 0,05 bili su uključeni u modele multivarijantne regresije. Vrednost p manje od 0,05 smatrana je pokazateljem statističke značajnosti. Rezultati su predstavljeni u vidu tabela i grafikona. Svi podaci su obrađeni u *IBM SPSS Statistics* verzija 22 softveru (*SPSS Inc. Chicago, IL, USA*), ili softverskom paketu *R software environment* (*R Core Team* (2019)).

4. REZULTATI

4.1 Demografske i kliničke karakteristike pacijenata

Demografske i kliničke karakteristike COVID-19 pacijenata prikazane su na tabeli 5. U našoj grupi pacijenata 21% je imalo blagu kliničku sliku, većina, njih 53%, je imalo umerenu bolest, a tešku formu bolesti razvilo je 26% pacijenata. Našu studijsku grupu činili su pretežno muškarci (61%), a prosečna starost bila je 56 godina. Najčešći komorbiditet je hipertenzija, koja je bila prisutna kod polovine naših pacijenata. Drugi komorbiditeti kao što su dijabetes melitus i gojaznost su bili prisutni, kod 13% i 32% pacijenata, respektivno. Više od polovine učesnika naše studije izjasnilo se kao nepušači (55%).

Tabela 5. Osnovne demografske i kliničke karakteristike COVID-19 pacijenata

Parametar	n (%)
Oblik bolesti^a	
1	56 (21%)
2	141 (53%)
3	68 (26%)
Prosečna starost^b	56,24 ± 12,94 ^b
Pol	
Ženski	104 (39%)
Muški	161 (61%)
Hipertenzija	
Ne	121 (50%)
Da	120 (50%)
Dijabetes melitus	
Ne	230 (87%)
Da	35 (13%)
BMI kg/m²	
>30	83 (32%)
<30	176 (68%)
Pušenje	
Ne	139 (55%)
Bivši pušači	87 (34%)
Da	28 (11%)

^a 1. asimptomatski/blago simptomatski, pacijenti srednje težine sa rendgenskim znacima pneumonije i 2. pacijenti sa težom kliničkom slikom, potrebom za oksigenoterapijom, pacijenti sa teškom pneumonijom, znacima citokinske oluje ili sindromom akutnog respiratornog distresa i znacima multiorganske disfunkcije. ^b±vrednost je prikazana kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD),

Rezultati laboratorijskih parametara: zapaljenja, kompletne krvne slike, parametara oštećenja pojedinih organa i indikatora koagulacionog statusa kod pacijenata sa COVID-19 u trenutku prijema u bolnicu prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Laboratorijski parametri COVID-19 pacijenata pri prijemu

Parametar	Vrednost ^a	Referentni opseg i jedinice	Broj pacijenata sa laboratorijskim parametrima izvan referentnog opsega n (%) ^b
Broj leukocita	5,80 (2,00-19,00)	3,4-9,7 x10 ⁹ /L	↓59 (22%)
Broj limfocita	1,12 (0,27-9,68)	1,2-3,4 x10 ⁹ /L	85↓(32%)
Broj trombocita	201 (62-727)	150-450 x10 ⁹ /L	58↓ (22%)
IL-6	26 (1,40-205,50)	0-8 pg/L	136↑ (51%)
CRP	48,20 (1,10-355,40)	0-10 mg/L	194↑ (73%)
Feritin	538,30 (10,10-4937,20)	Žene 5-159 Muškarci 28-397 ng/L	85↑ (32%)
Fibrinogen	4,00 (0,42-9,00)	1,8-3,5 g/L	97↑ (37%)
D-dimer	0,52 (0,18-17,05)	<0,5 mg/L	133↑ (50%)
Urea	5,40 (2,0-95)	2,5-7,5 mmol/L	39↑ (15%)
Kreatinin	90 (47-539)	59-104 μmol/L	58↑ (22%)
AST	34 (12-152)	0-37 U/L	89↑ (34%)
ALT	43 (11-205)	14-63 U/L	49↑ (19%)
LDH	254 (106-2001)	85-227 U/L	128↑ (48%)

^a vrednosti su prikazane kao medijana (min-maks); IL-6 – interleukin 6, CRP – C-reaktivni protein, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, LDH – laktat dehidrogenaza; ^b↓ - ispod donje granice referentne vrednosti, ↑ -iznad gornje granice referentne vrednosti

U nalazu kompletne krvne slike, leukopenija je bila prisutna kod 22%, limfopenija kod 32%, dok je trombocitopenija je bila prisutna kod 22% pacijenata. Kao što se i očekivalo, kod velikog broja pacijenata pri prijemu postojale su povišene vrednosti inflamatornih markera: IL-6 (51%), CRP (73%) i feritina (32%). Kada je u pitanju koagulacioni status, 50% pacijenata imalo je povišen d-dimer, dok je 37% imalo povišen fibrinogen u trenutku prijema. Aktivnosti LDH i AST su takođe bile visoke pri prijemu kod značajnog broja pacijenata, LDH kod 48% i AST kod 34% pacijenata.

4.2 Povezanost laboratorijskih parametara sa rizikom za razvoj težih oblika COVID-19

Koristeći ordinalnu regresiju, dalje je analizirana povezanost između specifičnih laboratorijskih parametara i rizika od razvoja teških oblika COVID-19 (bilo srednjeg (2) ili teškog oblika (3 i 4) prema Nacionalnom protokolu), što je prikazano u tabeli 7. Među parametrima krvne slike, statistički značajna povezanost za progresiju COVID -19 je nađena za pacijente sa limfocitima ispod 1,0 x 10⁹/L (OR=2,97, p=0,002) koji su imali 3 puta veći rizik za progresiju bolesti. Povišene koncentracije inflamatornih markera IL-6 i CRP su takođe bile povezane sa progresijom bolesti (OR=8,52, p=0,001, odnosno OR=10,97, p<0,001). Naime, pacijenti sa povišenim IL-6 (>8 pg/L) imali su oko 9 puta veći rizik, a povišenim CRP (>10 mg/L), čak 11 puta povećan rizik od napredovanja u teže oblike COVID-19. Naši rezultati su takođe pokazali da povišena koncentracija fibrinogena (>3.5 g/L) nosi oko 2 puta povećan rizik od progresije bolesti (OR=2,29, p=0,029). Pored toga, na osnovu naših rezultata pacijenti sa povišenom aktivnošću AST i LDH bili su podložniji razvoju težih oblika COVID-19 (OR=2,25, p=0,021; OR=4,76, p<0,001). Povišena aktivnost AST (>37 U/L) povećava rizik za teže oblike COVID-19 oko 2 puta, a povišena vrednost LDH (>227 U/L) oko 5 puta.

Tabela 7. Povezanost laboratorijskih parametara sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19

Parametar	Cut-off vrednost	OR	IP 95%	p
Broj leukocita	<3,4x10 ⁹ /L	0,47	0,22-1,00	0,050
Broj limfocita	<1,0 x10 ⁹ /L	2,97	1,49-5,92	0,002
Broj trombocita	<100 x10 ⁹ /L	0,91	0,42-1,98	0,813
IL-6	>8 pg/L	8,52	2,48-29,28	0,001
CRP	>10 mg/L	10,97	4,16-28,96	<0,001
Feritin	>500ng/L	1,92	0,84-4,36	0,121
Fibrinogen	>3.5 g/L	2,29	1,09-4,81	0,029
D-dimer	>0,5 mg/L	1,37	0,68-2,79	0,382
Urea	>7,5 mmol/L	0,67	0,29-1,58	0,362
Kreatinin	>104 µmol/L	1,41	0,66-3,04	0,376
AST	>37 U/L	2,25	1,13-4,49	0,021
ALT	>63 U/L	1,16	0,53-2,54	0,703
LDH	>227 U/L	4,76	2,22-10,22	<0,001

IL-6 – interleukin 6, CRP – C-reaktivni protein, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, LDH – laktat dehidrogenaza; OR odnos šanse prilagođen polu, starosti, komorbiditetima (hipertenzija, dijabetes melitus, gojaznost) i pušačkom statusu; IP- interval poverenja

4.3 Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od nastanka težih oblika COVID-19

Sledeći deo rezultata se odnosi na povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za progresiju COVID-19 bolesti. Među analiziranim polimorfizmima nije pokazana značajnu povezanost za nulte/varijantne genotipove: *GSTM1* (OR=0,87, p=0,673), *GSTT1* (OR=0,75, p=0,455), *Nrf2* rs6721961 (OR=0,8, p=0,538), *GSTM3* rs1332018 (OR=1,76, p=0,091), *GPX3* rs8177412 (OR=1,51, p=0,247), *GSTP1* rs1695 (OR=1,02, p=0,978), *GSTO1* rs4925 (OR 0,99, p=0,968), *GSTO2* rs156697 (OR=1,23, p=0,551), *SOD2* rs4880 (OR=0,65, p=0,287), *GPX1* rs1050450 (OR=1,02, p=0,952) sa rizikom za progresiju bolesti (Tabela 8).

Tabela 8. Povezanost polimorfizma gena za katalitičke i regulatorne antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja teških oblika COVID-19

Varijantni vs. referentni genotip	OR	IP 95%	p
Delecioni polimorfizmi^a			
<i>GSTM1</i> nulti vs. <i>GSTM1</i> aktivni	0,87	0,46-1,66	0,673
<i>GSTT1</i> nulti vs. <i>GSTT1</i> aktivni	0,75	0,35-1,60	0,455
SNP u nekodirajućim regionima^b			
<i>Nrf2</i> *CA + AA vs. <i>Nrf2</i> *CC	0,80	0,4-1,62	0,538
<i>GSTM3</i> * AC+CC vs. <i>GSTM3</i> *AA	1,76	0,91-3,41	0,091
<i>GPX3</i> *TC + CC vs. <i>GPX3</i> *TT	1,51	0,75-3,03	0,247
SNP u kodirajućim regionima^c			
<i>GSTP1</i> *Ile/Val + Val/Val vs. <i>GSTP1</i> *Ile/Ile	1,02	0,35-2,94	0,978
<i>GSTO1</i> * Ala/Asp+Asp/Asp vs. <i>GSTO1</i> *Ala/Ala	0,99	0,53-1,85	0,968
<i>GSTO2</i> *Asn/Asp+Asp/Asp vs. <i>GSTO2</i> *Asn/Asn	1,23	0,62-2,46	0,551
<i>SOD2</i> *Ala/Val + Val/Val vs. <i>SOD2</i> *Ala/Ala	0,65	0-1,43	0,287
<i>GPXI</i> *Pro/Leu + Leu/Leu vs. <i>GPXI</i> * Pro/Pro	1,02	0,55-1,88	0,952

^abez prisutnog enzima; ^butiče na ekspresiju enzima; ^cutiče na aktivnost enzima; OR odnos šanse prilagođen po polu, starosti, komorbiditetima (hipertenzija, dijabetes melitus, gojaznost) i pušačkom statusu; IP-interval poverenja, SNP - polimorfizmi pojedinačnog nukleotida

4.4. Udruženi efekat laboratorijskih parametara i polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19

U daljoj analizi ispitivan je udruženi efekat laboratorijskih parametara i polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19 (tabela 9). U našoj studiji nismo našli značajnu povezanost za nulte/varijantne genotipove sledećih gena: *GSTM1*, *GSTT1*, *Nrf2* rs6721961, *GSTM3* rs1332018, *GSTP1* rs1695, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *SOD2* rs481961, *GSTM3* rs1332018, Međutim, nosioci *GPX3* varijantnog genotipa (*GPX3**TC + CC), koji ima za posledicu smanjenu ekspresiju enzima, imali su 2,42 povećan rizik za razvoj težih oblika COVID-19 u poređenju sa nosiocem *GPX3* referentnog genotipa (OR= 2,42, p=0,032) kada je OR prilagođen inflamatornim markerima (broj leukocita, limfocita i trombocita, IL-6, CRP, fibrinogen, feritin, koncentracija d-dimera).

Tabela 9. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19 prilagođena po inflamatornim markerima, broju leukocita, limfocita, trombocita, fibrinogenu i d-dimeru

Varijantni vs. referentni genotip	OR	IP 95%	p
Delecioni polimorfizmi^a			
<i>GSTM1</i> -nulti vs. <i>GSTM1</i> aktivni	1,01	0,50-2,05	0,982
<i>GSTT1</i> nulti vs. <i>GSTT1</i> aktivni	1,58	0,65-3,82	0,315
Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi u nekodirajućim regionima^b			
<i>Nrf2</i> *CA + AA vs. <i>Nrf2</i> *CC	0,62	0,28-1,40	0,253
<i>GSTM3</i> * AC+CC vs. <i>GSTM3</i> *AA	1,05	0,51-2,18	0,890
<i>GPX3</i> *TC + CC vs. <i>GPX3</i> *TT	2,42	1,08-5,40	0,032
Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi u kodirajućim regionima^c			
<i>GSTP1</i> *Ile/Val + Val/Val vs. <i>GSTP1</i> *Ile/Ile	1,94	0,55-6,87	0,305
<i>GSTO1</i> * Ala/Asp+ Asp/Asp vs. <i>GSTO1</i> *Ala/Ala	1,33	0,66-2,72	0,427
<i>GSTO2</i> *Asn/Asp+AspAsp vs. <i>GSTO2</i> *Asn/Asn	1,05	0,49-2,28	0,892
<i>SOD2</i> *Ala/Val + Val/Val vs. <i>SOD2</i> *Ala/Ala	0,72	0,31-1,70	0,460
<i>GPX1</i> *Pro/Leu + Leu/Leu vs. <i>GPX1</i> * Pro/Pro	1,45	0,71-2,94	0,309

^abez prisutnog enzima; ^butiče na ekspresiju enzima; ^cutiče na aktivnost enzima; OR odnos šanse prilagođen inflamatornim markerima, broju leukocita, limfocita i trombocita, IL-6, CRP-u, fibrinogenu, feritinu, d-dimeru; IP interval poverenja

4.5 Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19 kod pacijenata stratifikovanih po polu

S obzirom da su značajan broj pacijenata u našoj grupi činili muškarci izvršena je stratifikacija pacijenata po polu. Prvo je ispitivan efekat polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19 u grupi pacijenata muškog pola (tabela 10). Nije uočena statistički značajna asocijacija sa rizikom za nastanak težihiformi COVID-19 ni za jedan od ispitivanih genotipova u grupi pacijenata muškog pola.

Tabela 10. Povezanost polimorfizama gena za katalitičke i regulatorne antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19 u grupi pacijenata muškog pola

Varijantni vs. referentni genotip	OR	IP 95%	p
Delecioni polimorfizmi ^a			
<i>GSTM1</i> -nulti vs. <i>GSTM1</i> aktivni	1,11	0,44-2,85	0,821
<i>GSTT1</i> nulti vs. <i>GSTT1</i> aktivni	1,51	0,42-5,37	0,528
Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi u nekodirajućim regionima ^b			
<i>Nrf2</i> *CA + AA vs. <i>Nrf</i> *CC	0,69	0,25-1,90	0,478
<i>GSTM3</i> * AC+CC vs. <i>GSTM3</i> *AA	1,50	0,55-4,04	0,426
<i>GPX3</i> *TC + CC vs. <i>GPX3</i> *TT	3,33	1,101-10,94	0,047
Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi u kodirajućim regionima ^c			
<i>GSTP1</i> *Ile/Val + Val/Val vs. <i>GSTP1</i> *Ile/Ile	2,26	0,52-9,71	0,274
<i>GSTO1</i> * Ala/Asp+ Asp/Asp vs. <i>GSTO1</i> *Ala/Ala	0,87	0,34-2,27	0,767
<i>GSTO2</i> *Asn/Asp+AspAsp vs. <i>GSTO2</i> *Asn/Asn	0,84	0,31-2,26	0,732
<i>SOD2</i> *Ala/Val + Val/Val vs. <i>SOD2</i> *Ala/Ala	0,69	0,20-2,34	0,551
<i>GPXI</i> *Pro/Leu + Leu/Leu vs. <i>GPXI</i> * Pro/Pro	1,07	0,43-2,68	0,878

^abez prisutnog enzima; ^butiče na ekspresiju enzima; ^cutiče na aktivnost enzima; OR odnos šanse prilagođen po polu, muški; IP interval poverenja

Efekat ispitivanih polimorfizama na rizik za nastanak težih formi COVID-19 u grupi pacijenata ženskog pola prikazan je u tabeli 11. Naši rezultati pokazuju da povećani rizik za nastanak teže forme COVID-19 bolesti postoji kod žena nosioca *GSTT1* nultog genotipa (OR= 7,95, p= 0,026). Naime, ženske osobe sa *GSTT1* nultim genotipom imaju 8 puta veću šansu da razviju težu formu COVID-19 bolesti u odnosu na ženske osobe nosioce aktivnog genotipa.

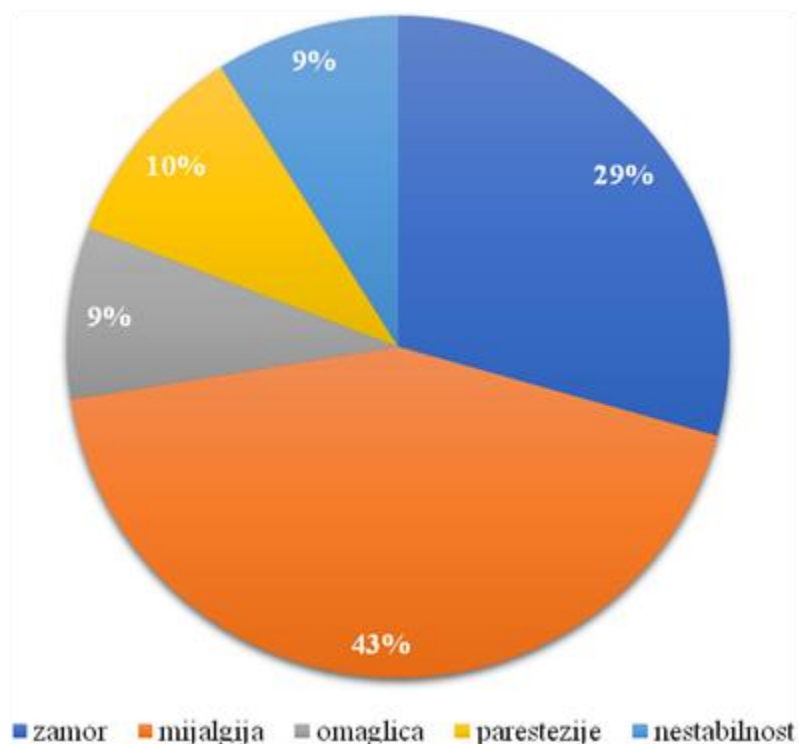
Tabela 11. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom od razvoja težih oblika COVID-19 u grupi pacijenata ženskog pola

Varijantni vs. referentni genotip	OR	IP 95%	p
Delecioni polimorfizmi ^a			
<i>GSTM1</i> -nulti vs. <i>GSTM1</i> aktivni	1,13	0,30-4,21	0,861
<i>GSTT1</i> nulti vs. <i>GSTT1</i> aktivni	7,95	1,28-49,50	0,026
Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi u nekodirajućim regionima ^b			
<i>Nrf2</i> *CA + AA vs. <i>Nrf</i> *CC	0,50	0,08-3,20	0,464
<i>GSTM3</i> * AC+CC vs. <i>GSTM3</i> *AA	0,38	0,09-1,61	0,192
<i>GPX3</i> *TC + CC vs. <i>GPX3</i> *TT	2,08	0,58-7,43	0,259
Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi u kodirajućim regionima ^c			
<i>GSTP1</i> *Ile/Val + Val/Val vs. <i>GSTP1</i> *Ile/Ile	1,96	0,08-29,37	0,677
<i>GSTO1</i> * Ala/Asp+ Asp/Asp vs. <i>GSTO1</i> *Ala/Ala	2,85	0,77-10,58	0,116
<i>GSTO2</i> *Asn/Asp+AspAsp vs. <i>GSTO2</i> *Asn/Asn	0,97	0,22-4,20	0,970
<i>SOD2</i> *Ala/Val + Val/Val vs. <i>SOD2</i> *Ala/Ala	1,35	0,29-6,22	0,700
<i>GPXI</i> *Pro/Leu + Leu/Leu vs. <i>GPXI</i> * Pro/Pro	2,44	0,62-9,57	0,200

^abez prisutnog enzima; ^butiče na ekspresiju enzima; ^cutiče na aktivnost enzima; OR odnos šanse prilagođen po polu, ženski; IP interval poverenja

4.6. Ispitivanje povezanosti polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za nastanak neuroloških post-COVID sekvela

Jedan deo pacijenata smo dalje pratili u smislu nastanka neuroloških manifestacija post-COVID sindroma. Od ukupno 265 pacijenata uključenih u istraživanje, neurološke manifestacije post-COVID sindroma dijagnostikovane su kod 167 pacijenata. Od toga je simptome i znake post-COVID zamora imalo 49 (29%), mijalgije 72 (43%), omaglice 14 (9%), nestabilnosti 15 (9%) i parestezija 17 (10%) pacijenata (Slika 9). Odlučili smo se za analizu povezanosti polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za nastanak post-COVID mijalgije sa različitim oblicima akutne bolesti s obzirom da je uzorak pacijenata u drugim grupama neuroloških post-COVID sekvela za statističku obradu bio mali (Tabela 12). Naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost ni za jedan od ispitanih genotipova, jedino što je rizik kod nosilaca *GPX1* i *GPX3* varijantnih genotipova bio povećan, ali sa graničnom statističkom značajnosti (*GPX1*: OR= 30,367, p= 0,060; *GPX3*: OR =8,801, p =0,064).



Slika 9. Distribucija neuroloških manifestacija post-COVID sindroma

Tabela 12. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za nastanak post-COVID mijalgije kod pacijenata sa različitim oblicima akutne bolesti

Varijantni vs. referentni genotip	OR	IP 95%	p
<i>GSTM1</i> -nulti vs. <i>GSTM1</i> -aktivni ^a			
Lakši	0,095	0,006-1,554	0,099
Srednji	1,483	0,429-5,124	0,533
Teži	0,157	0,024-1,027	0,053
<i>GSTP1</i> *Ile/Val + Val/Val vs. <i>GSTP1</i> *Ile/Ile ^c			
Lakši	0,05	0,01-2,55	0,135
Srednji	0,332	0,04-2,67	0,300
Teži	3,08	0,20-47,40	0,419
<i>GSTM3</i> *AC+CC vs. <i>GSTM3</i> *AA ^b			
Lakši	0,33	0,028-3,89	0,381
Srednji	0,57	0,15-2,11	0,570
Teži	2,29	0,43-12,02	0,325
<i>GSTT1</i> -nulti vs. <i>GSTT1</i> aktivni ^a			
Lakši	1,361	0,108-17,118	0,812
Srednji	1,518	0,351-6,564	0,577
Teži	/	/	/
<i>Nrf2</i> *CA + AA vs. <i>Nrf2</i> *CC ^b			
Lakši	2,098	0,181-24,317	0,553
Srednji	0,643	0,144-2,866	0,643
Teži	0,120	0,10-1,394	0,090
<i>GPX3</i> *TC + CC vs. <i>GPX3</i> *TT ^b			
Lakši	8,801	0,884-87,610	0,064
Srednji	1,292	0,334-5,005	0,711
Teži	1,782	0,228-13,905	0,582
<i>GSTO1</i> * Ala/Asp+ Asp/Asp vs. <i>GSTO1</i> *Ala/Ala ^c			
Lakši	1,085	0,135-8,701	0,939
Srednji	0,859	0,222-3,326	0,826
Teži	3,913	0,815-18,798	0,088
<i>GSTO2</i> *Asn/Asp+AspAsp vs <i>GSTO2</i> *Asn/Asn ^c			
Lakši	/	/	/
Srednji	1,453	0,299-7,064	0,644
Teži	2,084	0,374-11,607	0,402
<i>SOD2</i> *Ala/Val + Val/Val vs. <i>SOD2</i> *Ala/Ala ^c			
Lakši	0,424	0,043-4,146	0,461
Srednji	0,868	0,192-3,927	0,855
Teži	0,531	0,085-3,301	0,497
<i>GPXI</i> *Pro/Leu + Leu/Leu vs. <i>GPXI</i> * Pro/Pro ^c			
Lakši	30,367	0,866-1064,226	0,060
Srednji	0,298	0,074-1,207	0,090
Teži	0,580	0,135-2,499	0,465

^abez prisutnog enzima; ^butiče na ekspresiju enzima; ^cutiče na aktivnost enzima; OR odnos šanse prilagođen inflamatornim markerima, broju leukocita, limfocita i trombocita, IL-6, CRP-u, fibrinogenu, feritinu, d-dimeru; IP interval poverenja

5. DISKUSIJA

SARS-CoV-2 infekcija predstavlja jedan od najvećih izazova javnog zdravlja. Sa novim varijantama virusa poput Omikrona, sve je verovatnije da će infekcija poprimiti endemski karakter u mnogim delovima sveta i predstavljati javnozdravstveni problem i u predstojećim godinama. Među glavnim izazovima u lečenju COVID-19 jeste pravovremeno prepoznavanje onih osoba koje su pod rizikom za nastanak teške forme bolesti. Dobro poznati faktori rizika su starost, gojaznost, maligniteti i hronične bolesti poput: hipertenzije, dijabetes melitusa, srčane i bubrežne slabosti. Međutim postoje i one osobe kod kojih jasni faktori rizika ne postoje, a kod kojih ipak dolazi do progresije u tešku formu COVID-19. Iz tog razloga, može se pretpostaviti da i drugi faktori, poput genetske predispozicije, utiču na oboljevanje od COVID-19, kao i na razvoj teže kliničke slike.

U našem istraživanju ispitivali smo povezanost polimorfizama gena za regulatorne katalitičke antioksidantne proteine i laboratorijskih parametara, nezavisno i udruženo, sa rizikom za razvoj težih oblika COVID-19. Analizom dobijenih rezultata, uočili smo da su pacijenti sa limfocitima ispod $1,0 \times 10^9/L$, imali 3 puta veći rizik, sa povišenim IL-6 ($>8 \text{ pg/L}$) oko 9 puta veći rizik, a sa povišenim CRP ($>10 \text{ mg/L}$) čak 11 puta povećan rizik, dok je povišena koncentracija fibrinogena ($>3,5 \text{ g/L}$) nosila oko 2 puta povećan rizik od napredovanja u teže oblike COVID-19. Pored toga, naši rezultati pokazuju da povišena serumska aktivnost AST ($>37 \text{ U/L}$) povećava rizik za teže oblike COVID-19 oko 2 puta, a povišena serumska vrednost LDH ($>227 \text{ U/L}$) oko 5 puta. S druge strane, analizirani polimorfizmi gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (*GSTM1*, *GSTT1*, *Nrf2* rs6721961, *GSTM3* rs1332018, *GPX3* rs8177412, *GSTP1* rs1695, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *SOD2* rs4880, *GPX1* rs1050450) nisu pokazali značajnu povezanost za razvoj težih oblika COVID-19. Međutim, naši rezultati govore u prilog tome da nosioci *GPX3* varijantnog genotipa (*GPX3*TC+CC*) imaju oko 2,5 povećan rizik za razvoj težih oblika COVID-19 u poređenju sa nosiocima *GPX3* referentnog genotipa kada je analiza prilagođena biohemijskim parametrima (broj leukocita, limfocita i trombocita, IL-6, CRP, fibrinogen, feritin, koncentracija d-dimera). Dodatno, kod žena nosioca *GSTT1* nultog genotipa pokazan je 8 puta povećan rizik za nastanak teže forme COVID-19 u odnosu na ženske osobe nosioce *GSTT1* aktivnog genotipa. U slučaju neuroloških manifestacija post COVID sindroma naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost sa rizikom za nastanak post-COVID mijalgije sa različitim oblicima akutne bolesti ni za jedan od ispitanih polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine. Međutim, rizik za nastanak post-COVID mijalgije bio povećan kod nosilaca *GPX1* i *GPX3* varijantnih genotipova, ali sa graničnom statističkom značajnošću.

Prema aktuelnoj klasifikaciji COVID-19 prema težini bolesti Nacionalnog protokola za lečenje COVID-19 ona se deli u sledeće oblike: 1. asimptomatsku/blago simptomatsku, 2. bolesnici bez komorbiditeta sa RTG znacima pneumonije 3. srednje tešku sa znacima citokinske oluje i potrebom za kiseoničnom terapijom i 4. i 5. oblik u koje spadaju najteži pacijenti sa teškom pneumonijom, znacima citokinske oluje, ili ARDS-om i znacima multiorganske disfunkcije (79). U našem istraživanju pacijente smo stratifikovali takođe prema težini kliničke slike, sa tom razlikom što su u grupu 1 svrstani pacijenti sa lakšom kliničkom slikom (prema Nacionalnom vodiču grupa 1 i 2), a u grupu 2 pacijenti sa bilo kojom težom formom bolesti, (oblik 3 prema Nacionalnom protokolu). Naša klasifikacija imala je za cilj lakšu i praktičniju procenu rizika od progresije iz jednog u bilo koji drugi, napredniji oblik bolesti.

Na osnovu analize demografskih podataka našu studijsku grupu činili su pretežno muškarci, a prosečna starost pacijenata bila je 56 godina. Najčešći komorbiditet je hipertenzija, koja je bila prisutna kod polovine naših pacijenata. Demografski podaci ispitanika u našoj studiji su u skladu sa poznatim podacima iz literature. Naime, većina studija prijavljuje da su muškaraci češće oboljevali od COVID-19 u odnosu na žene. a da je prosečna starost pacijenata preko 50 godina starosti, što se poklapa sa globalnim statističkim podacima o polu i starosti kod infekcije SARS-CoV2 (1, 2).

Međutim, u radu Čen i saradnika, stopa infekcije COVID-19 bila je viša kod žena u tri talasa pandemije, dostigavši 65% ukupno inficiranih tokom aprila i maja 2020. godine što je suprotno našim rezultatima (183). Većina studija takođe pokazuje da su i tokom COVID-19 bile 1,5-2,5 puta češće kod muškaraca, nego kod žena, kao i da su smrtni ishodi bili češći kod starije životne dobi (4, 5). Takođe i rezultati Ramirez-Plasencija i saradnikanavode da su COVID-9 pacijenti stariji od 58 godina pod visokim rizikom od mortaliteta (185). Trenutni dokazi sugerišu da iako je hipertenzija često prisutna kod pacijenata sa COVID-19 (kao što je bio slučaj i u našem istraživanju), ovo patološko stanje ne igra nezavisnu ulogu u SARS-CoV-2 infekciji i napredovanju COVID-19. Tačnije, neregulisani sistolni pritisak u većoj meri može doprineti težim formama bolesti, zbog povezanosti sa hipertenzijom posredovanim subkliničkim oštećenjem organa, uključujući vaskularno remodelovanje, koje može pogoršati endotelnu disfunkciju, oštećenje endotela i endotelitis indukovano SARS-CoV-2 infekcijom (186). Pored toga, poznato je da su komorbiditeti kao što su: gojaznost, epilepsija, demencija, dijabetes melitus, maligne bolesti povezani sa većom stopom mortaliteta od COVID-19 (187). To potvrđuje i velika multicentrična studija koja je pokazala da su faktori rizika za težinu bolesti bili: stariji uzrast, muški pol, kardiovaskularne bolesti, hronične respiratorne bolesti, dijabetes melitus, gojaznost i hipertenzija. S druge strane, cerebrovaskularne bolesti, bolesti jetre, bubrežne bolesti ili dijaliza, solidni tumori i hiperlipidemija nisu uticali na težinu kliničke slike pri prijemu, međutim, uticali su na krajnji ishod COVID-19 bolesti (188).

Rezultati naše studije su pokazali da su vrednosti inflamatornih markera pri prijemu kao što su: broj limfocita, CRP i nivoi IL-6 povezani sa povećanim rizikom za progresiju COVID-19. Pored toga, laboratorijski markeri oštećenja organa, odnosno povećane serumske vrednosti AST i LDH enzima, takođe doprinose razvoju težih oblika COVID-19. Naime, pacijenti sa limfocitima ispod $1,0 \times 10^9/L$ su imali oko 3 puta veći rizik za nastanak teže forme COVID-19, dok koncentracija IL-6 $>8 \text{ pg/L}$ podiže rizik oko 9, fibrinogena $>3,5 \text{ g/L}$ oko 2,5 a CRP $>10 \text{ mg/l}$ čak 11 puta. Interesantno je da u našoj studiji nije dokazana prediktivna vrednost trombocitopenije za razvoj težih formi COVID-19 što nije u skladu sa rezultatima drugih istraživača. Opšte je prihvaćeno da trombocitopenija ukazuje na ozbiljnost i progresiju bolesti, a progresivni pad broja trombocita je značajno povezan sa povećanim mortalitetom COVID-19 pacijenata (189). Trenutno se spekuliše da su mogući mehanizmi pomoću kojih SARS-CoV-2 može da izaziva trombocitopeniju sledeći: 1 - oštećeno hematopoetsko mikrokruženje uzrokovano sistemskim zapaljenjem, citokinskom olujom, povišenim IL-6, što je uobičajena pojava kod SARS-CoV-2 infekcije, što može da poremeti hematopoezu. 2 - SARS-CoV-2 može direktno da inficira hematopoetske matične ćelije ili megakariocite preko ACE2, CD13 ili CD66a, receptora kao i kod drugih infekcija koronavirusom koje izazivaju trombocitopeniju i 3 - postojanje antivirusnih antitela koja unakrsno reaguju sa hematopoetskim ćelijama i/ili trombocitima, npr. anti-adenovirus antitela, mogu unakrsno reagovati sa integrinom trombocita GPIIb/IIIa i dovesti do njihovog pada (44). Trombocitopenija se javlja uglavnom u teškim slučajevima COVID-19, kao i kod onih pacijenata sa smrtnim ishodom, prema rezultatima velike multicentrične studije (192,193). Pored limfopenije, značaj markera inflamacije kao što su CRP i IL-6 u razvoju težih formi i prognozi COVID-19 dobro je prepoznat u dosadašnjem toku COVID-19 pandemije. Stoga se u literaturi mogu pronaći brojne studije koje su se bavile značajem hematoloških i inflamatornih markera u razvoju težih formi i prognozi COVID-19. Brojne studije pokazuju da su limfopenija i povišene vrednosti IL-6 i CRP u pozitivnoj korelaciji sa stepenom inflamacije, stepenom progresije, težinom bolesti, kao i njenom prognozom (187,191). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima tih brojnih studija. U jednoj studiji sprovedenoj na 139 pacijenata sa COVID-19 pronađene su smanjene vrednosti ukupnih limfocita, CD3+ i CD4+ T-ćelija, naivnih T-ćelija, T-ćelija centralne memorije i citotoksičnih ćelija prirodnih ubica (NK), a istovremeno dokumentovano povećanje broja efektorskih T ćelija i efektorskih memorijskih T-ćelija kod pacijenata sa teškim COVID-19 u poređenju sa zdravim kontrolama. Težina SARS-CoV-2 infekcije utiče na podgrupe limfocita, što dovodi do smanjenja memorijskih T ćelija i NK ćelija, ali povećanja efektorskih T ćelija u teškim slučajevima (192). Slično našim rezultatima studija Zhang i saradnika je pokazala da je smanjen broj limfocita pri prijemu,

posebno CD4+ i CD8+ T limfocita, bio najvažniji prediktor za progresiju i nepovoljan ishod bolesti (193).

Velika meta-analiza Henri i saradnika, koja je obuhvatila oko 3400 pacijenata i čak 33 laboratorijska parametra, pokazala je da pacijenti sa teškom i fatalnom bolešću imaju značajno povećan broj leukocita i smanjen broj limfocita i trombocita, kao i povećane serumske vrednosti IL-6, IL-10 i feritina u poređenju sa pacijentima sa lakšim formama bolesti (193). Druga meta-analiza Huanga i saradnika sa ukupno 5350 pacijenata, pokazala je slične rezultate, odnosno govori u prilog toga da su povišeni serumski CRP, prokalcitonin, d-dimer i feritin povezani sa lošim ishodom kod COVID-19 pacijenata (75). Više studija je isto prijavilo da tokom progresije bolesti dolazi do smanjenja broja limfocita, povišenog odnosa neutrofil/limfociti (NLR), povećanja koncentracije serumskog CRP-a, feritina, TNF, IL-6, IL-10, d-dimera, produženja protrobinskog vremena (64,116,195). Dobro je poznato da tokom zapaljenskih stanja u organizmu TNF i IL-6 pokreću sintezu CRP u jetri, dok IL-8 povećava regrutaciju neutrofila (73,190). Pored toga, IL-6 aktivira neutrofile i monocite što dovodi do povećane proizvodnje KSR (128). U isto vreme, KSR mogu da podignu nivo IL-6 dovodeći tako do nastanka začaranog kruga citokinske oluje i oksidativnog stresa (129). To je verovatno i jedan od razloga zašto su visoki nivoi IL-6 tokom COVID-19 povezani sa visokom stopom mortaliteta kod pacijenata lečenih u JIN (59,60). S druge strane, hematološke promene nisu primećene u značajnoj meri kod asimptomatskih, ili presimptomatskih pacijenata sa COVID-19. Kod lakših slučajeva, hematološke promene su suptilne, uključujući uglavnom limfopeniju (196). Kod teških, kritično bolesnih pacijenata i onih sa citokinskom olujom prisutni su neutrofilija i limfopenija (196). Pokazano je da je broj neutrofila od prediktivnog značaja za klinički ishod kod hospitalizovanih pacijenata sa COVID-19, dok je odnos neutrofila i limfocita bio značajno povezan sa težinom kliničke slike i mortalitetom od COVID-19 (197, 198). Pored toga, studija Binsaleha saradnika bavila se poređenjem vrednosti hematoloških parametara na prijemu između preživelih i umrlih od COVID-19. I ova istraživačka grupa je pokazala da je kod umrlih od COVID-19 registrovana povišena vrednost neutrofila, niža vrednost limfocita i trombocita u odnosu na preživele pacijente (198,199). U studiji sprovedenoj od strane Mehri i saradnika pacijenti su podeljeni u grupe lečenih u intenzivnoj nezi i pacijente lečene van intenzivne nege. Njihovi rezultati su pokazali da je SE, CRP i nivo feritina u serumu je bio značajno viši u grupi koja je lečena u JIN (200). Slične rezultate prijavljuju i Smail i saradnici koji jer su pokazali da su vrednosti neutrofila, NLR CRP, feritina i d-dimera bile veće u grupi kritično obolelih u odnosu na grupu sa blažom kliničkom slikom COVID-19 (187). Pored ove studije i istraživačka grupa Shakaroun i saradnika je pokazala da su nivoi feritina na prijemu imali visoku prediktivnu vrednost za prijem u intenzivnu negu, potrebu za mehaničkom ventilacijom i smrtnost u bolnici što u grupi naših pacijenata nije dobijeno (187,201). Pored toga, studija Taşkin i saradnika je identifikovala odnos feritin/albumin kao potencijalni parametar u određivanju mortaliteta kritično bolesnih pacijenata od COVID-19 lečenih u intenzivnoj nezi (202). Studija Urazova i saradnika ispitivala je značaj novijih inflamatornih markera za prognozu COVID-19 (203). Istraživači su utvrdili da su nivoi sekretorne fosfolipaze A2 (PLA2), IL-6, AST, CRP, LDH, IL-6, d-dimera i feritina, kao i broj neutrofila, značajno povećani kod pacijenata sa blagim do teškim COVID-19 infekcijama. U navedenoj studiji, nivoi IL-6 bio je u pozitivnoj korelaciji sa nivoima AST, LDH, CRP, d-dimera, feritina i brojem neutrofila. Povećanje nivoa PLA2 bilo je u pozitivnoj korelaciji sa nivoima CRP, LDH, d-dimera i feritina, brojem neutrofila, a u negativnoj korelaciji sa brojem limfocita. Utvrđeno je da visoki nivoi IL-6 i PLA2 značajno povećavaju rizik od teškog oblika i smrti od COVID-19, pokazavši tako da navedeni markeri mogu biti korišćeni kao rani prediktori pogoršanja COVID-19 bolesti (203). U studiji Parange i saradnika procenjena je efikasnost predviđanja ishoda COVID-19 na osnovu vrednosti CRP i nedavno objavljenih inflamatornih modulatora novije generacije (kao što su *Soluble urokinase plasminogen activator receptor* (suPAR), *triggering receptor expressed on myeloid cells* (TREM-1) i faktor rasta hepatocita (eng. *Hepatocyte growth factor* - HGF)) i klasičnih biomarkera (IL-1b, IL-6, NLR, feritin, fibrinogen i LDH) kod COVID-19 pacijenata (205). Utvrđeno je da pacijenti sa teškom formom bolesti imaju više serumske nivo CRP, suPAR, sTREM-1, HGF i klasičnih biomarkera u poređenju sa blagim i umerenim

slučajevima. U istoj studiji CRP je identifikovan kao najprecizniji pokazatelj teške bolesti što odgovara našim rezultatima, dok su se LDH, sTREM-1 i HGF pokazali kao odlični prediktori mortaliteta od COVID-19 (204).

Naši rezultati su takođe pokazali da su povišene serumske aktivnosti AST i LDH povezane sa povećanim rizikom za razvoj teže forme COVID-19. Naime pacijenti sa AST >37 U/L bili su u oko 2,5 puta, a LDH >227 U/L čak u 5 puta većem riziku od razvoja težeg COVID-19. Rezultati različitih studija takođe prijavljuju značaj biohemijskih markera oštećenja organa, poput AST i LDH, tokom razvoja težih formi COVID-19 (205,206). U skladu sa tim su i rezultati Bataljini i saradnika koji su pokazali da su niži broj limfocita i trombocita i veće vrednosti feritina, d-dimera, LDH i AST pri prijemu korelirali sa težinom kliničke slike pacijenata sa COVID-19 što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja (207). Pored toga, velika meta-analiza sa ukupno 15.354 slučaja COVID-19 pokazala je da je povišena aktivnosti LDH, povezana sa težinom COVID-19 (207). U jednoj studiji je utvrđeno da su uzrast, nivoi LDH i d-dimera značajno viši u grupi pacijenata sa smrtnim ishodom (208). COVID-19 može direktno izazvati oštećenje bubrega i jetre infekcijom ćelija, putem imunskog odgovora domaćina i poremećaja imunske tolerancije, vaskulitisa povezanog sa endotelom, formiranjem tromba, poremećajem metabolizma glukoze ili hipoksijom tkiva. Kao posledica, biomarkeri funkcije endotela, bubrega i jetre mogu pomoći u otkrivanju ugroženog organa, kao i daljem lečenju pacijenata (207). Značajno povišene serumske vrednosti LDH, kreatin kinaze (CK), jetrinih enzima (AST i ALT), ukupnog bilirubina, uree i kreatinina na prijemu se obično registruju u teškim slučajevima i kod kritično obolelih COVID-19 pacijenata (26). Patofiziologija lezije jetre u sklopu COVID-19 još nije u potpunosti objašnjena, ali je opisano da se povišene vrednosti serumskih transaminaza mogu videti u 14-53% slučajeva i da se češće javljaju kod teških oblika bolesti (210). Mogući mehanizmi koji mogu biti povezani sa oštećenjem jetre tokom COVID-19 su: 1. imunološki posredovana upala; 2. direktan citotoksični efekat izazvan replikacijom virusa u hepatocitima; 3. povreda jetre izazvana lekovima, kao što su remdesivir, tocilizumab, hlorokin; i 4. reaktivacija prethodno postojećih bolesti jetre (210).

Kada je u pitanju koagulacioni status, 50% naših pacijenata imalo je povišen d-dimer, dok je 37% imalo povišen fibrinogen u trenutku prijema. U kontekstu COVID-19, dokumentovane su i kvantitativne i kvalitativne promene u cirkulišućem fibrinogenu, kao i u svakom njegovom krajnjem proizvodu (tj. monomeri fibrina, fibrinski polimeri (matrica) i proizvodi razgradnje fibrina) (211). Interesantno je da su slične promene u vrstama fibrinogena otkrivene i kod drugih tromboinflamatornih bolesti, kao što su dijabetes, hipertenzija i gojaznost, a ova stanja bolesti su najčešći prateći komorbiditeti povezani sa COVID-19 (211). Izloženost faktorima životne sredine, kao što su zagađivači vazduha i pušenje, takođe je povezana sa poremećajem fibrinogena i pogoršanjem težine COVID-19. Kod pacijenata sa COVID-19, povišen cirkulišući fibrinogen verovatno nije samo biomarker inflamacije i rizika od tromboze, već i doprinosi tromboembolijskim događajima (211). Poremećaj koagulacije je dobro poznati sistemski efekat COVID-19 koji može da potiče od direktnog ili indirektnog uticaja virusa na endotel, ili imunološki posredovane tromboze. Tokom COVID-19 dolazi do promena u koagulacionoj kaskadi, sa neravnotežom regulatornih mehanizama koagulacije i fibrinolize, izmenjenom funkcijom trombocita i hiperinflamatornim odgovorom. Najčešće opisani poremećaj u vezi sa koagulopatijom u sklopu COVID-19 je povećanje nivoa d-dimera u plazmi. U našoj studiji je polovina pacijenata imala povišen nivo d-dimera i bili su u 1,5 puta većem riziku za nastanak teže forme bolesti, ali bez dobijene statističke značajnosti, što nije u skladu sa većinom objavljenih podataka u literaturi. Naime, poremećaj koagulacije i fibrinoliza u plućnoj cirkulaciji i bronhoalveolarnom prostoru su verovatno važni faktori u patogenezi ARDS-a u COVID-19 (212). Kod teških, kritično bolesnih pacijenata i onih sa citokinskom olujom registrovani su povišen d-dimer, produženo PT i smanjen fibrinogen kao prediktori progresije bolesti i neželjenog ishoda (196). Predložena su tri stadijuma koagulopatije povezane sa COVID-19: stadijum 1 koji pokazuje povišen d-dimer, stadijum 2 pokazuje povišen d-dimer zajedno sa blago produženim PT/INR i aPTT i blagom trombocitopenijom, i stadijum 3 sa kritičnom bolešću i laboratorijskim parametrima koji odgovaraju klasičnom DIK-u (213). U ovom kontekstu, d-dimer je identifikovan među prvim izmenjenim biomarkerima koagulacije u COVID-19 i pokazao se kao

prediktor smrtnog ishoda pri prijemu (214). Studije su pokazale povećanje koncentracije d-dimera i fibrinogena u ranim stadijumima COVID-19 bolesti što je u saglasnosti sa našim rezultatima, a povećanje nivoa d-dimera od 3 do 4 puta povezano je sa lošom prognozom (130,214). Pored toga, osnovne bolesti kao što su dijabetes melitus, malignitet, moždani udar i trudnoća mogu izazvati povećanje nivoa d-dimera kod pacijenata sa COVID-19. Stoga, određivanje nivoa d-dimera i ostalih parametara koagulacije tokom ranih stadijuma bolesti takođe može biti korisno u prognozi i terapiji COVID-19 (214).

Sledeći deo naših rezultata se odnosi na povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa težinom kliničke slike COVID-19. Među analiziranim polimorfizmima gena, nismo našli značajnu povezanost za nulte/varijantne genotipove: *GSTM1*, *GSTT1*, *Nrf2* rs6721961, *GSTM3* rs1332018, *GSTP1* rs1695, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *SOD2* rs481961, *GSTM3* rs1332018 i rizika za progresiju bolesti kada je redovna regresija prilagođena polu, starosti, pušačkom statusu. Međutim, nosioci varijantnog *GPX3* alela (*GPX3**TC + CC), koji je povezan sa smanjenom ekspresijom intracelularnog enzima, imali su oko 2,5 puta veći rizik od razvoja težih oblika COVID-19 u poređenju sa nosiocima *GPX3* referentnog genotipa. Rezultati drugih istraživačkih grupa su pokazali da su SNP-ovi gena koji kodiraju *GSTP1*, *GSTM3*, *GSTO1* i *GSTO2* značajno povezani sa podložnošću za nastanak COVID-19, kao i prognozom bolesti što nije potvrđeno u našem istraživanju (140,166). Naime, Ćorić i saradnici su pokazali da su osobe nosioci *GSTP1**Val/Val (Ile105Val rs1695) ili *GSTP1**Val/Val (Ala114Val rs1138272), kao i *GSTM3**AA (C/A rs1332018) genotipova manje sklone razvoju COVID-19, dok su Đukić i saradnici pokazali da su osobe nosioci *GSTO1**AA i *GSTO2**GG genotipova imale značajno povećan rizik od COVID-19 (140). Pored toga, istraživačka grupa Sadata i saradnika je pokazala da osobe sa *GSTT1*-/- genotipom imaju pozitivnu korelaciju sa mortalitetom od COVID-19 (167). U studiji sprovedenoj od strane Ding i saradnika pokazana je povezanost između *GSTT1* i *GSTM1*-nultih genotipova sa povećanim rizikom od fibroze pluća kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća, što predstavlja jednu od važnijih posledica COVID-19 (168). Naši rezultati su u suprotnosti sa studijom Abasa i saradnika sprovedenoj na populaciji domorodaca Severne Amerike koja je izvestila da je učestalost nultih alela *GSTM1*-/- i *GSTT1*-/- bila češća kod pacijenata sa teškim oblikom COVID-19 u poređenju sa onima koji su imali blažu kliničku sliku (44). Nedavna poljska studija koju su sproveli Orlevska i saradnici. prijavljuje da je *GSTP1* Ile/Val genotip povezan sa većim rizikom od razvoja teškog oblika bolesti. Međutim, njihovi rezultati govore u prilog toga da s *GSTM1* i *GSTT1* nulti genotipovi nemaju značajnu povezanost sa rizikom od razvoja teških oblika COVID-19, što je u skladu sa rezultatima naše studije (215). S druge strane, rezultati naše studije su pokazali da osobe ženskog pola sa *GSTT1* nultim genotipom imaju 8 puta veću šansu da razviju težu formu COVID-19 bolesti u odnosu na ženske osobe nosioce aktivnog genotipa. Ovo je, prema našem saznanju, prvi put da je sprovedeno istraživanje koje je analiziralo značaj *GSTT1* polimorfizama kod žena u prognozi COVID-19 i respiratornim infekcijama uopšte.

U plućima, koja su praktično neprekidno izložena prooksidantnom okruženju, razvili su se različiti mehanizmi za redukciju oksidativnog stresa, koji igraju značajnu ulogu u respiratornim bolestima kao što su astma, hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) i infekcije (216,217). U plućnom parenhimu, *GPX3* je eksprimiran unutar bronhijalnih epitelnih ćelija i mezenhimalnih fibroblasta, pretežno lokalizovanih duž bazalne membrane bronhijalnog epitela, endotela i ekstracelularnog matriksa (156). Budući da je *GPX3* ključni antioksidans u plućnom miljeu, modulacija ekspresije *GPX3* u patologiji respiratornog trakta i inflamatornim bolestima predmet je velikog broja istraživanja (218). U slučaju polimorfizama antioksidantnih izoenzima *GPX* i *SOD* studija sprovedena od strane Jerotić i saradnika pokazala je da je rizik od razvoja COVID-19 značajno smanjen među nosiocima *GPX3**TC + CC genotipa u poređenju sa nosiocima *GPX3**TT genotipa (153). Međutim, naši rezultati govore u prilog tome da nosioci ovog varijantnog *GPX3* rs8177412 alela imaju oko 2,5 povećan rizik za razvoj težih oblika COVID-19 u odnosu na nosioce referentnog *GPX3* genotip. Među osam poznatih *GPX* izoformi, *GPX3* je jedina lokalizovana u vanćelijskom prostoru. Prisutan u plazmi, služi kao glavni antioksidantni enzim odgovoran za uklanjanje vodonik-

peroksida i organskih hidroperoksida (155,219). Pojava polimorfizma unutar *GPX3* gena (rs8177412), dovodi do smanjenja transkripcije gena i posledično do izrazitog smanjenja aktivnosti GPX3 u plazmi (1,220,221). Ovo smanjenje aktivnosti GPX3 u plazmi kasnije doprinosi smanjenoj neutralizaciji vodonik peroksida što za posledicu ima razvoj ekstracelularnog oksidativnog stresa, smanjenoj bioraspoloživosti azotnog oksida i stimulaciji aktivacije trombocita. Ovi aktivirani putevi oksidativnog stresa negativno utiču na vaskularni endotel i pokreću zapaljenske procese koji doprinose patofiziologiji COVID-19 i potencijalno progresiji ka težim oblicima bolesti (124,222,223). U prethodno navedenoj studiji Jerotić i saradnika takođe je pokazana povezanost polimorfizama *SOD2* rs4880 i *GPX1* rs1050450 sa biohemijskim profilom COVID-19 pacijenata. Naime, *SOD2**Val alel bio je značajno povezan sa povećanim nivoima fibrinogena i feritina, dok je *GPX1**Leu alel bio povezan sa višim nivoima fibrinogena i d-dimera (153). Pored toga, studija Golabi i saradnika bavila se aktivnošću GPX i SOD u serumu i oni su pokazali da ambulantno lečeni pacijenti sa COVID-19 imaju više aktivnosti SOD i GPX u odnosu na kontrole (160). S druge strane, sve je više dokaza koji ukazuju da je supresija *Nrf2* povezana sa COVID-19, mada naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost ovog regulatornog antioksidantnog proteina sa rizikom za nastanak težih formi COVID-19. Nekoliko studija je pokazalo smanjenu ekspresiju *Nrf2* kod pacijenata sa COVID-19 što je u suprotnosti sa našim rezultatima (147,148). U revijalnom radu Vang i saradnici izložili su glavne uloge *Nrf2* i mehanizme njegove antioksidantne zaštite tokom COVID-19 bolesti kao što su antivirusna uloga *Nrf2* (visoka aktivnost *Nrf2* nakon infekcije ćelije, što sugerise da *Nrf2* može imati antivirusnu ulogu), stimulacija proizvodnje IFN tipa I, kao i regulacija ekspresije HO-1 od strane *Keap1/Nrf2* (146). Interesantno istraživanje Jankauskas i saradnika bavilo se poređenjem markera oksidativnog stresa između preživelih i umrlih od COVID-19 (224). Istraživači u ove studije su izdvajali serum od pacijenata sa COVID-19 prilikom prijema u bolnicu i inkubirali ove serume na primarnoj kulturi humanih endotelih ćelija, upoređujući njihove efekte na stvaranje KSR i peroksidaciju lipida. Njihovi rezultati su pokazali da serum pacijenata koji nisu preživeli COVID-19 dovode do povećanog stepena peroksidacije lipida na kulturi endotelih ćelija (224).

Sve je veći broj istraživanja koje se bave ulogom oksidativnog stresa u patogenezi dugotrajnog COVID-a. Definicija post-COVID sindroma ili dugotrajnog COVID-a Svetske zdravstvene organizacije je perzistiranje ili pojava novih simptoma tri meseca nakon inicijalne infekcije virusom SARS-CoV-2 i koji traju najmanje dva meseca, pri čemu su isključene druge, alternativne dijagnoze (94). U okviru post-COVID sindroma dokumentovano je preko 200 različitih simptoma, koji mogu značajno da ometaju svakodnevne sposobnosti onih koji pate od ovog stanja. Procenjeno je da će najmanje 10% pacijenata koji preleže težu kliničku sliku infekcije SARS-CoV-2 razviti neku formu post-COVID sindroma. Ovo stanje karakteriše raznovrstan spektar simptoma koji se multisistemski prezentuju i to najčešće na: respiratornom, kardiovaskularnom, muskuloskeletnom, neurološkom sistemu i koži (95). Smatra se da je oštećenje endotela jedan od glavnih mehanizmima dugotrajnog COVID-a. Prisustvo proinformativnih medijatora dovodi do prokoagulantnog stanja, aktivacije trombocita, tromboze i oštećenja vaskularne barijere (225). Promene u normalnoj funkciji mitohondrija kompromituju funkciju epitelne barijere i povećavaju njenu propustljivost i podložnost infekciji, što dodatno pogoršava zapaljenje, stvarajući začarani krug između mitohondrijalne disfunkcije i oštećenja epitela i endotela. Smatra se da ovi navedeni procesi značajno doprinose razvoju post-COVID sekvela (225).

Poremećaji na mitohondrijalnom nivou, uključujući anaerobnu glikolizu, metabolizam laktata i formiranje KSR, moguća su objašnjenja za održavanje hroničnog zapaljenja i simptoma nakon akutne COVID-19 (226). Informativni markeri, kao što su CRP, IL-6, IL-1b, IL-18, i TNF- α , ključni su u procesima koji su povezani sa oksidativnim stresom, poput inflamacije, starenja i imunosenesencije, ali i se njihove povišene vrednosti registruju i u slučajevima dugotrajnog COVID-a (227, 228). Prema rezultatima studije Al-Hakeim i saradnika dugotrajni COVID je povezan sa smanjenim antioksidantnim potencijalom, uključujući smanjenu aktivnost GPX enzima i perzistentnim informativnim procesom blažeg stepena (174). Pored toga, Stufano i saradnici pokazuju da je MDA u serumu bio je značajno veći kod pacijenata čak i nakon 4 meseca od preležane COVID-

19 u poređenju sa zdravim kontrolama, što pokazuje poremećaj redoks homeostaze tokom dužeg perioda nakon akutne infekcije (175). Značajna heterogenost dugotrajnog COVID-a otežava proučavanje patofiziologije ovog stanja. Razvoj specifičnih kliničkih fenotipova dugotrajnog COVID-a može se delimično objasniti specifičnim genetskim varijacijama domaćina, posebno u genima povezanim sa oksidativnim stresom i zapaljenjem (138). Osobe koje nose genetske varijante povezane sa izmenjenom redoks homeostazom sklonije su razvoju kliničkih fenotipova povezanih sa produženim COVID-om. Ove genetske varijacije mogu dovesti do značajnih individualnih razlika koje čine osnovu redoks homeostaze. Rezultati dosadašnjih genomskih studija pokazali su povezanost 20 genetskih lokusa sa podložnošću za nastanak i težinom kliničke slike COVID-19 bolesti, među kojima je najznačajniji 3p21.31 (228). Međutim, i dalje mnogo toga ostaje nepoznato u kontekstu uticaja genetskih varijacija na dugotrajni COVID. Stoga smo se i mi u sklopu našeg istraživanja bavili povezanosti polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za nastanak post-COVID sindroma. U sklopu kardioloških manifestacija dugotrajnog COVID-a značajna disregulacija redoks homeostaze je može biti povezana sa prethodno opisanim polimorfizmima u genima koji kodiraju katalitičke i regulatorne antioksidantne proteine. To i potvrđuju rezultati studije Ašanina i saradnika koji su pokazali da *SOD2* rs4880, *GPXI* rs1050450, *GPX3* rs8177412 i *Nrf2* rs6721961 polimorfizmi utiču na individualnu osetljivost na pojavu srčanih manifestacija u okviru post-COVID sindroma (229). Navedena studija je pokazala da nosioci varijantnih *GPX* alela češće pokazuju izmenjene ehokardiografske parametre leve pretkomore i desne komore, a nosioci varijantnog *SOD2* alela češće imaju smanjenu sistolnu funkciju leve komore (229). Pored toga rezultati istraživačke grupe Siekacz i saradnika su pokazali da povišene vrednosti TNF- α imaju dijagnostičku vrednost u predviđanju razvoja plućnih manifestacija post-COVID sindroma (226).

Uloga neuroinflamacije u dugotrajnom COVID-u predmet je različitih studija koje su pokazale da abnormalni humoralni i ćelijski imunski odgovori, sistemski inflamatorni markeri kao što je IL-6 i autoantitela koja ciljaju na ćelijske receptore mogu igrati ulogu u sistemskim i neurološkim manifestacijama dugotrajnog COVID-a (172,173). Prethodno navedeni događaji, kao što su zapaljenje izazvano KSR i posledično oštećeni endotel koji dovodi do formiranja mikrotromba, mogu uticati i na centralni nervni sistem, zbog perzistentne neuroinflamacije i pospešiti formiranje imuno-endotelno-neurološkog začaranog kruga (137). Jedno od mogućih objašnjenja na pitanje molekularne osnove izmenjenog endotela pericita, ili astrocita jeste oksidativni stres. Delovanjem samog virusa može doći do karakteristične genotipske ekspresije onih ćelija koje utiču na ekspresiju citoprotektivnih enzima i proteina zaduženih za antioksidantnu zaštitu, kao što je ključni redoks-senzitivni faktor transkripcije, Nrf2. Povećanjem brzine transkripcije putem Nrf2 dovodi do dalje aktivacije citoprotektivnih gena za antioksidativne enzime kao što je glutamat-cistein-ligaza enzima uključenog u sintezu GSH, čime se povećava njegova sinteza. Takođe, Nrf2 suprimira NF- κ B signalnog puta i dovodi do nishodne regulacije NLRP3 inflamazoma (230). Studija Al-Hakeima i saradnika imala je za cilj da odredi da li je povezanost e povišene telesne temperature i saturacije kiseonikom tokom akutne faze SARS-CoV-2 infekcije i neuropsihijatrijskih post-COVID sekvela posredovana neurotoksičnošću koja je rezultat aktiviranih imunoinflamatornih puteva i oksidativnog stresa. Istraživači ove grupe su pokazali da su najvažniji prediktori fizio-afektivnog poremećaja u okviru post-COVID-a vrednosti serumskog kalcijuma, CRP, IL-1b, naprednih oksidativnih proteinskih produkata i mijeloperoksidaza (231).

Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali da postoji značajna povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine i težine kliničke slike tokom akutne COVID-19 bolesti na rizik za nastanak post-COVID mijalgije, jedne od neuroloških sekvela post-COVID sindroma. Istraživačka grupa Ercegovac i saradnika se takođe bavila neurološkim manifestacijama post-COVID sindroma i njegovom vezom sa antioksidantnim genetskim profilom (177). Njihovi rezultati su pokazali da su pacijenti sa *GSTM1*-nultim genotipom i *GPX1*Leu alelom imali oko dva puta veću šansu da razviju simptome omaglice kod dugotrajnog COVID-a. Pored toga, prijavili su da je prisustvo polimorfizma *Nrf2*rs672196 bilo povezano sa 50% većom verovatnoćom da će doći do

dugotrajnog kognitivnog oštećenja povezanog sa COVID-om (176). Poznato je da prisustvo virusa u ćeliji dovodi do poremećaja redoks homeostaze i aktivira Nrf2 (144). *Nrf2* rs6721961 SNP pozicioniran je u ARE i utiče na vezivanje Nrf2 za ARE. Stoga, osobe koje nose homozigotni varijantni AA genotip pokazuju niži nivo Nrf2 informacione RNK, što dalje dovodi do njegove snižene ekspresije (176). Kada je u pitanju mijalgija, Ercegovac i saradnici. su prijavili da su osobe koje su posedovale najmanje jedan alel *GSTPIABVal* imale skoro dva puta smanjenu podložnost za nastanak ovog neurološkog simptoma (176). Ova istraživačka grupa je takođe pokazala da postoji povezanost polimorfizama *GPX1* i *GPX3* i rizika za razvoj mijalgije povezane sa dugotrajnim COVID-om, što je slično rezultatima dobijenim u našoj studiji. Naime, naši rezultati su takođe pokazali povećan rizik za razvoj mijalgije u sklopu neuroloških sekvela post-COVID-a kod nosilaca *GPX1* i *GPX3* varijantnih genotipova, ali još uvek na granici statističke značajnosti.

6. ZAKLJUČCI

1. Nespecifični markeri inflamacije- broj limfocita i serumske koncentracije IL-6, CRP i fibrinogena su povezani sa progresijom COVID-19
 - Limfopenija $<1,0 \times 10^9/L$ nosi 3 puta veći rizik od progresije u težu formu COVID-19
 - Koncentracija IL-6 $>8 \text{ pg/L}$ nosi 8 puta veći rizik od progresije u težu formu COVID-19
 - Koncentracija CRP $>10 \text{ mg/L}$ nosi 10 puta veći rizik od progresije u težu formu COVID-19
 - Koncentracija fibrinogena $>3.5 \text{ g/L}$ nosi oko 2 puta veći rizik od progresije u težu formu COVID-19
2. Biohemijski markeri oštećenja organa - serumske aktivnosti AST i LDH su povezani sa progresijom COVID-19
 - Aktivnost AST $>37 \text{ U/L}$ nosi oko 2 puta veći rizik od progresije u težu formu COVID-19
 - Aktivnost LDH $>227 \text{ U/L}$ nosi oko 5 puta veći rizik od progresije u težu formu COVID-19
3. Polimorfizmi gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (*GSTM1*, *GSTT1*, *Nrf2* rs6721961, *GSTM3* rs1332018, *GPX3* rs8177412, *GSTP1* rs1695, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *SOD2* rs4880, *GPX1* rs1050450) ne predstavljaju nezavisan faktor rizika za progresiju u težu formu COVID-19
4. Polimorfizam *GPX3* gena je povezan sa povećanim rizikom za razvoj težih oblika COVID-19 kada je analiza prilagođena broju leukocita, limfocita i trombocita, vrednostima IL-6, CRP, fibrinogena, feritina i koncentraciji d-dimera
 - Nosioци *GPX3* varijantnog genotipa (*GPX3*TC + CC*) imaju 2,42 povećan rizik za razvoj težih oblika COVID-19 u poređenju sa nosiocem *GPX3* referentnog genotipa
5. Polimorfizam *GSTT1* gena je povezan sa povećanim rizikom za razvoj težih oblika COVID-19 kod osoba ženskog pola
 - Osobe ženskog pola sa *GSTT1*-nultim genotipom imaju 8 puta veći rizik da razviju težu formu COVID-19 bolesti u odnosu na žene nosioce *GSTT1*-aktivnog genotipa.
6. Ne postoji značajna povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine i težine kliničke slike tokom akutnog COVID-19 sa rizikom za nastanak post-COVID mijalgije. Međutim, povećan rizik za razvoj mijalgije postoji kod nosilaca *GPX1* i *GPX3* varijantnih genotipova, ali na granici statističke značajnosti.

Nova saznanja o povezanosti antioksidantnog genetskog profila i određenih laboratorijskih parametara sa rizikom za nastanak težih formi COVID-19 mogu da upotpune postojeća saznanja iz patofiziologije COVID-19 bolesti, definisanjem uzročnih mehanizama koji objašnjavaju zašto se kod nekih pojedinaca ispoljavaju teže manifestacije bolesti. Razumevanje uloge polimorfizama gena proteina uključenih u redoks ravnotežu u patogenezi i prognozi toka COVID-19 je jedan od važnih faktora koji bi mogao da omogući adekvatnu prevenciju, personalizovani terapijski pristup i prognozu.

7. LITERATURA

1. Markovic M, Ranin J, Bukumiric Z, Jerotic D, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, et al. GPX3 Variant Genotype Affects the Risk of Developing Severe Forms of COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 10;24(22):16151.
2. Tan W, Zhao X, Ma X, Wang W, Niu P, Xu W, et al. A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases - Wuhan, China 2019-2020. *China CDC Wkly*. 2020 Jan 24;2(4):61–2.
3. Ciotti M, Ciccozzi M, Terrinoni A, Jiang WC, Wang CB, Bernardini S. The COVID-19 pandemic. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020 Aug 17;57(6):365–88.
4. 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;395(10224):565–74.
5. datadot [Internet]. [cited 2024 Jun 22]. COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard. Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
6. COVID-19 [Internet]. [cited 2024 Jun 22]. Available from: <https://covid19.rs/>
7. Gao Y, Ding M, Dong X, Zhang J, Kursat Azkur A, Azkur D, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy*. 2021 Feb;76(2):428–55.
8. 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;395(10223):497–506.
9. Pustahija T, Ristić M, Medić S, Vuković V, Štrbac M, Rajčević S, et al. Epidemiological characteristics of COVID-19 travel-associated cases in Vojvodina, Serbia, during 2020. *Samy AM*, editor. *PLOS ONE*. 2021 Dec 23;16(12):e0261840.
10. Zhang L, Zhu F, Xie L, Wang C, Wang J, Chen R, et al. Clinical characteristics of COVID-19-infected cancer patients: a retrospective case study in three hospitals within Wuhan, China. *Ann Oncol*. 2020 Jul;31(7):894–901.
11. Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklöv J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J Travel Med*. 2020 Mar 13;27(2):taaa021.
12. Liu K, Chen Y, Lin R, Han K. Clinical features of COVID-19 in elderly patients: A comparison with young and middle-aged patients. *J Infect*. 2020 Jun;80(6):e14–8.
13. Kharroubi SA, Diab-El-Harake M. Sex-differences in COVID-19 diagnosis, risk factors and disease comorbidities: A large US-based cohort study. *Front Public Health*. 2022;10:1029190.
14. Chaturvedi R, Lui B, Aaronson JA, White RS, Samuels JD. COVID-19 complications in males and females: recent developments. *J Comp Eff Res*. 2022 Jun;11(9):689–98.
15. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. [cited 2024 Jul 11]. Available from: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
16. Alm E, Broberg EK, Connor T, Hodcroft EB, Komissarov AB, Maurer-Stroh S, et al. Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020 Aug 13 [cited 2024 Jul 11];25(32).

Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001410>

17. Updated working definitions and primary actions for SARSCoV2 variants [Internet]. [cited 2024 Jul 11]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants>
18. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*. 2021 Apr 6;10(4):821.
19. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Maier HJ, Bickerton E, Britton P, editors. *Coronaviruses* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [cited 2023 Jul 11]. p. 1–23. (Methods in Molecular Biology; vol. 1282). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
20. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr;181(2):271–280.e8.
21. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020 May 14;581(7807):215–20.
22. Tian D, Sun Y, Xu H, Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol*. 2022 Jun;94(6):2376–83.
23. Niemi MEK, Daly MJ, Ganna A. The human genetic epidemiology of COVID-19. *Nat Rev Genet*. 2022 Sep;23(9):533–46.
24. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Mar;19(3):141–54.
25. Lei C, Qian K, Li T, Zhang S, Fu W, Ding M, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig. *Nat Commun*. 2020 Apr 24;11(1):2070.
26. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020 Mar 27;11(1):1620.
27. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci*. 2020 May 26;117(21):11727–34.
28. HCA Lung Biological Network, Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med*. 2020 May;26(5):681–7.
29. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, et al. SARS -CoV-2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J*. 2020 May 18;39(10):e105114.
30. Kimura H, Francisco D, Conway M, Martinez FD, Vercelli D, Polverino F, et al. Type 2 inflammation modulates ACE2 and TMPRSS2 in airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jul;146(1):80–88.e8.

31. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 6;20(13):3328.
32. Liu Y, Hu G, Wang Y, Ren W, Zhao X, Ji F, et al. Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci.* 2021 Mar 23;118(12):e2025373118.
33. Yang Q, Hughes TA, Kelkar A, Yu X, Cheng K, Park S, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 viral entry upon blocking N- and O-glycan elaboration. *eLife.* 2020 Oct 26;9:e61552.
34. Singh RD, Barry MA, Croatt AJ, Ackerman AW, Grande JP, Diaz RM, et al. The spike protein of SARS-CoV-2 induces heme oxygenase-1: Pathophysiologic implications. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2022 Mar;1868(3):166322.
35. Zhang H, Sun Y, Wang Y, Yazici D, Azkur D, Ogulur I, et al. Recent developments in the immunopathology of COVID -19. *Allergy.* 2023 Feb;78(2):369–88.
36. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021 Feb;184(4):861–80.
37. Eskandarian Boroujeni M, Sekrecka A, Antonczyk A, Hassani S, Sekrecki M, Nowicka H, et al. Dysregulated Interferon Response and Immune Hyperactivation in Severe COVID-19: Targeting STATs as a Novel Therapeutic Strategy. *Front Immunol.* 2022 May 17;13:888897.
38. Silva MJA, Ribeiro LR, Lima KVB, Lima LNGC. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 infection: A systematic review. *Front Immunol.* 2022 Oct 10;13:1001198.
39. Pothast CR, Dijkland RC, Thaler M, Hagedoorn RS, Kester MG, Wouters AK, et al. SARS-CoV-2-specific CD4+ and CD8+ T cell responses can originate from cross-reactive CMV-specific T cells. *eLife.* 2022 Nov 21;11:e82050.
40. Bellanti F, Lo Buglio A, Vendemiale G. Redox Homeostasis and Immune Alterations in Coronavirus Disease-19. *Biology.* 2022 Jan 19;11(2):159.
41. Gedefaw L, Ullah S, Leung PHM, Cai Y, Yip SP, Huang CL. Inflammasome Activation-Induced Hypercoagulopathy: Impact on Cardiovascular Dysfunction Triggered in COVID-19 Patients. *Cells.* 2021 Apr 16;10(4):916.
42. Kim JS, Lee JY, Yang JW, Lee KH, Effenberger M, Szpirt W, et al. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Theranostics.* 2021;11(1):316–29.
43. Nagashima S, Mendes MC, Camargo Martins AP, Borges NH, Godoy TM, Miggiolaro AFRDS, et al. Endothelial Dysfunction and Thrombosis in Patients With COVID-19—Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Oct;40(10):2404–7.
44. Abou-Ismaïl MY, Diamond A, Kapoor S, Arafah Y, Nayak L. The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. *Thromb Res.* 2020 Oct;194:101–15.
45. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet.* 2021 Dec;22(12):757–73.

46. 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;395(10223):507–13.
47. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 2020 Aug 25;324(8):782.
48. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020 Sep 1;173(5):362–7.
49. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021 Jan;2(1):e13–22.
50. Qiu C, Cui C, Haufort C, Haehner A, Zhao J, Yao Q, et al. Olfactory and Gustatory Dysfunction as an Early Identifier of COVID-19 in Adults and Children: An International Multicenter Study. *Otolaryngol Neck Surg*. 2020 Oct;163(4):714–21.
51. Hushmandi K, Bokaie S, Hashemi M, Moghadam ER, Raei M, Hashemi F, et al. A review of medications used to control and improve the signs and symptoms of COVID-19 patients. *Eur J Pharmacol*. 2020 Nov;887:173568.
52. Mostaza JM, García-Iglesias F, González-Alegre T, Blanco F, Varas M, Hernández-Blanco C, et al. Clinical course and prognostic factors of COVID-19 infection in an elderly hospitalized population. *Arch Gerontol Geriatr*. 2020 Nov;91:104204.
53. Ryan C, Minc A, Caceres J, Balsalobre A, Dixit A, Ng BK, et al. Predicting severe outcomes in Covid-19 related illness using only patient demographics, comorbidities and symptoms. *Am J Emerg Med*. 2021 Jul;45:378–84.
54. Alhazzani W, Møller MH, Arabi YM, Loeb M, Gong MN, Fan E, et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Intensive Care Med*. 2020 May;46(5):854–87.
55. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID -19. *Am J Hematol*. 2020 Jul;95(7):834–47.
56. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol*. 2020 Jun;215:108427.
57. Magro C, Mulvey JJ, Berlin D, Nuovo G, Salvatore S, Harp J, et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Transl Res*. 2020 Jun;220:1–13.
58. Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest [Internet]*. 2021 Jan [cited 2023 Jul 11];51(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.13429>
59. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, Jacobson SD, Meyer BJ, Balough EM, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *The Lancet*. 2020 Jun;395(10239):1763–70.

60. Erbaş GS, Botsali A, Erden N, Arı C, Taşkın B, Alper S, et al. COVID-19-related oral mucosa lesions among confirmed SARS-CoV-2 patients: a systematic review. *Int J Dermatol*. 2022 Jan;61(1):20–32.
61. Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Cardiovascular complications in COVID-19. *Am J Emerg Med*. 2020 Jul;38(7):1504–7.
62. Mao R, Qiu Y, He JS, Tan JY, Li XH, Liang J, et al. Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jul;5(7):667–78.
63. Chen YT, Shao SC, Hsu CK, Wu IW, Hung MJ, Chen YC. Incidence of acute kidney injury in COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2020 Dec;24(1):346.
64. Srivastava S, Garg I, Bansal A, Kumar B. COVID-19 infection and thrombosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2020 Nov;510:344–6.
65. Gibson PG, Qin L, Pua SH. COVID -19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre- COVID -19 ARDS. *Med J Aust*. 2020 Jul;213(2):54.
66. Bader F, Manla Y, Atallah B, Starling RC. Heart failure and COVID-19. *Heart Fail Rev*. 2021 Jan;26(1):1–10.
67. Ippolito M, Misseri G, Catalisano G, Marino C, Ingoglia G, Alessi M, et al. Ventilator-Associated Pneumonia in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics*. 2021 May 7;10(5):545.
68. Ippolito M, Simone B, Filisina C, Catalanotto FR, Catalisano G, Marino C, et al. Bloodstream Infections in Hospitalized Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms*. 2021 Sep 23;9(10):2016.
69. Oh KH, Lee SH. COVID-19 and Fungal Diseases. *Antibiotics*. 2022 Jun 15;11(6):803.
70. Yang F, Shi S, Zhu J, Shi J, Dai K, Chen X. Analysis of 92 deceased patients with COVID-19. *J Med Virol*. 2020 Nov;92(11):2511–5.
71. Zhang XB, Hu L, Ming Q, Wei XJ, Zhang ZY, Chen LD, et al. Risk factors for mortality of coronavirus disease-2019 (COVID-19) patients in two centers of Hubei province, China: A retrospective analysis. *PloS One*. 2021;16(1):e0246030.
72. Bivona G, Agnello L, Ciaccio M. Biomarkers for Prognosis and Treatment Response in COVID-19 Patients. *Ann Lab Med*. 2021 Nov 1;41(6):540–8.
73. Lee EE, Hwang W, Song KH, Jung J, Kang CK, Kim JH, et al. Predication of oxygen requirement in COVID-19 patients using dynamic change of inflammatory markers: CRP, hypertension, age, neutrophil and lymphocyte (CHANeL). *Sci Rep*. 2021 Jun 22;11(1):13026.
74. Chan L, Karimi N, Morovati S, Alizadeh K, Kakish JE, Vanderkamp S, et al. The Roles of Neutrophils in Cytokine Storms. *Viruses*. 2021 Nov 21;13(11):2318.
75. Huang I, Pranata R, Lim MA, Oehadian A, Alisjahbana B. C-reactive protein, procalcitonin, D-dimer, and ferritin in severe coronavirus disease-2019: a meta-analysis. *Ther Adv Respir Dis*. 2020;14:1753466620937175.

76. Kouhpayeh H. Clinical features predicting COVID-19 mortality risk. *Eur J Transl Myol.* 2022 Apr 12;32(2):10268.
77. Li H, Chen S, Wang S, Yang S, Cao W, Liu S, et al. Elevated D-dimer and Adverse In-hospital Outcomes in COVID-19 Patients and Synergism with Hyperglycemia. *Infect Drug Resist.* 2022 Jul;Volume 15:3683–91.
78. Shang W, Dong J, Ren Y, Tian M, Li W, Hu J, et al. The value of clinical parameters in predicting the severity of COVID-19. *J Med Virol.* 2020 Oct;92(10):2188–92.
79. Pelemiš M, Stevanović G, Turkulov V, Vučinić V, Matijašević J, Milošević B i saradnici. Nacionalni protokol Republike Srbije za lečenje COVID-19 infekcije. In: Nacionalni protokol Republike Srbije za lečenje COVID-19 infekcije. 2020.
80. tile-1_diagnostic-testing.png (PNG Image, 397 × 552 pixels) [Internet]. [cited 2024 Jul 11]. Available from: https://cdn.who.int/media/images/default-source/health-topics/coronavirus/infographics/tile-1_diagnostic-testing.png?sfvrsn=3126c5fe_5
81. Widyasari K, Kim S. Rapid Antigen Tests during the COVID-19 Era in Korea and Their Implementation as a Detection Tool for Other Infectious Diseases. *Bioeng Basel Switz.* 2023 Mar 3;10(3):322.
82. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/345948/WHO-2019-nCoV-Antigen-Detection-2021.1-eng.pdf?sequence=1> [Internet]. [cited 2024 Jul 11]. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/345948/WHO-2019-nCoV-Antigen-Detection-2021.1-eng.pdf?sequence=1>
83. Melo-Vallès A, Ballesté-Delpierre C, Vila J. Review of the Microbiological Diagnostic Approaches of COVID-19. *Front Public Health.* 2021 Apr 27;9:592500.
84. Cheng L, Lan L, Ramalingam M, He J, Yang Y, Gao M, et al. A review of current effective COVID-19 testing methods and quality control. *Arch Microbiol.* 2023 Jun;205(6):239.
85. Hedges JF, Thompson MA, Snyder DT, Robison A, Taylor MP, Jutila MA. Titers, Prevalence, and Duration of SARS-CoV-2 Antibodies in a Local COVID-19 Outbreak and Following Vaccination. *Vaccines.* 2021 Jun 2;9(6):587.
86. Du Z, Wang L, Bai Y, Liu Y, Lau EH, Galvani AP, et al. A retrospective cohort study of Paxlovid efficacy depending on treatment time in hospitalized COVID-19 patients. *eLife.* 2024 Apr 16;13:e89801.
87. Ombelet S, Castanares-Zapatero D, Desimpel F, Hulstaert F, Stordeur S, Roberfroid D. Effectiveness of nirmatrelvir-ritonavir on severe outcomes of COVID-19 in the era of vaccination and Omicron: An updated meta-analysis. *J Med Virol.* 2024 Feb;96(2):e29434.
88. Sakander N, Ahmed A, Bhardwaj M, Kumari D, Nandi U, Mukherjee D. A path from synthesis to emergency use authorization of molnupiravir as a COVID-19 therapy. *Bioorganic Chem.* 2024 Jun;147:107379.
89. Grundeis F, Ansems K, Dahms K, Thieme V, Metzendorf MI, Skoetz N, et al. Remdesivir for the treatment of COVID-19. *Cochrane Haematology Group, editor. Cochrane Database Syst Rev [Internet].* 2023 Jan 25 [cited 2023 Aug 1];2023(1). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD014962.pub2>

90. Yuan Y, Jiao B, Qu L, Yang D, Liu R. The development of COVID-19 treatment. *Front Immunol.* 2023 Jan 26;14:1125246.
91. La Maestra S, De Flora S, BALANSKY R. Antioxidants and COVID-19. *J Prev Med Hyg.* 2021 Jul 5;E34 Pages.
92. Shi Z, Puyo CA. N-Acetylcysteine to Combat COVID-19: An Evidence Review. *Ther Clin Risk Manag.* 2020 Nov;Volume 16:1047–55.
93. Di Marco F, Foti G, Corsico AG. Where are we with the use of N-acetylcysteine as a preventive and adjuvant treatment for COVID-19? *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2022 Jan;26(2):715–21.
94. Post COVID-19 condition (Long COVID) [Internet]. [cited 2024 Jun 22]. Available from: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/post-covid-19-condition>
95. Scharf RE, Anaya JM. Post-COVID Syndrome in Adults—An Overview. *Viruses.* 2023 Mar 4;15(3):675.
96. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol.* 2023 Mar;21(3):133–46.
97. Atchison CJ, Davies B, Cooper E, Lound A, Whitaker M, Hampshire A, et al. Long-term health impacts of COVID-19 among 242,712 adults in England. *Nat Commun.* 2023 Oct 24;14(1):6588.
98. Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis.* 2021 Oct 3;53(10):737–54.
99. Desai AD, Lavelle M, Boursiquot BC, Wan EY. Long-term complications of COVID-19. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2022 Jan 1;322(1):C1–11.
100. Pavli A, Theodoridou M, Maltezou HC. Post-COVID Syndrome: Incidence, Clinical Spectrum, and Challenges for Primary Healthcare Professionals. *Arch Med Res.* 2021 Aug;52(6):575–81.
101. Thi Khanh HN, Cornelissen L, Castanares-Zapatero D, De Pauw R, Van Cauteren D, Demarest S, et al. Association between SARS-CoV-2 variants and post COVID-19 condition: findings from a longitudinal cohort study in the Belgian adult population. *BMC Infect Dis.* 2023 Nov 8;23(1):774.
102. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med.* 2021 Apr;27(4):601–15.
103. Taquet M, Geddes JR, Husain M, Luciano S, Harrison PJ. 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. *Lancet Psychiatry.* 2021 May;8(5):416–27.
104. Printza A, Katotomichelakis M, Valsamidis K, Metallidis S, Panagopoulos P, Panopoulou M, et al. Smell and Taste Loss Recovery Time in COVID-19 Patients and Disease Severity. *J Clin Med.* 2021 Mar 2;10(5):966.

105. Khatib S, Sabobeh T, Habib A, John S, Gomez R, Sivasankar S, et al. Post-COVID-19 fatigue as a major health problem: a cross-sectional study from Missouri, USA. *Ir J Med Sci* 1971 -. 2023 Apr;192(2):699–705.
106. Sodagar A, Javed R, Tahir H, Razak SIA, Shakir M, Naeem M, et al. Pathological Features and Neuroinflammatory Mechanisms of SARS-CoV-2 in the Brain and Potential Therapeutic Approaches. *Biomolecules*. 2022 Jul 11;12(7):971.
107. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:613–9.
108. Chen L, Liu HG, Liu W, Liu J, Liu K, Shang J, et al. [Analysis of clinical features of 29 patients with 2019 novel coronavirus pneumonia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi Chin J Tuberc Respir Dis*. 2020 Feb 6;43(0):E005.
109. Zhang H, Gong W, Wu S, Perrett S. Hsp70 in Redox Homeostasis. *Cells*. 2022 Feb 28;11(5):829.
110. Nanduri J, Yuan G, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Transcriptional responses to intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Dec;164(1–2):277–81.
111. Polonikov A. Endogenous Deficiency of Glutathione as the Most Likely Cause of Serious Manifestations and Death in COVID-19 Patients. *ACS Infect Dis*. 2020 Jul 10;6(7):1558–62.
112. Vlahos R, Selemidis S. NADPH Oxidases as Novel Pharmacologic Targets against Influenza A Virus Infection. *Mol Pharmacol*. 2014 Dec;86(6):747–59.
113. Boudreau HE, Emerson SU, Korzeniowska A, Jendrysik MA, Leto TL. Hepatitis C Virus (HCV) Proteins Induce NADPH Oxidase 4 Expression in a Transforming Growth Factor β -Dependent Manner: a New Contributor to HCV-Induced Oxidative Stress. *J Virol*. 2009 Dec 15;83(24):12934–46.
114. Delorey TM, Ziegler CGK, Heimberg G, Normand R, Yang Y, Segerstolpe Å, et al. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature*. 2021 Jul 1;595(7865):107–13.
115. Delgado-Roche L, Mesta F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Arch Med Res*. 2020 Jul;51(5):384–7.
116. Kosanovic T, Sagic D, Djukic V, Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Bukumiric Z, et al. Time Course of Redox Biomarkers in COVID-19 Pneumonia: Relation with Inflammatory, Multiorgan Impairment Biomarkers and CT Findings. *Antioxidants*. 2021 Jul 14;10(7):1126.
117. Singh J, Dhindsa RS, Misra V, Singh B. SARS-CoV2 infectivity is potentially modulated by host redox status. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:3705–11.
118. Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, Van Loo G, et al. Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell*. 2008 Apr;133(2):235–49.
119. Van Den Brand JMA, Haagmans BL, Van Riel D, Osterhaus ADME, Kuiken T. The Pathology and Pathogenesis of Experimental Severe Acute Respiratory Syndrome and Influenza in Animal Models. *J Comp Pathol*. 2014 Jul;151(1):83–112.

120. Chiscano-Camón L, Ruiz-Rodriguez JC, Ruiz-Sanmartin A, Roca O, Ferrer R. Vitamin C levels in patients with SARS-CoV-2-associated acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2020 Dec;24(1):522.
121. Pincemail J, Cavalier E, Charlier C, Cheramy-Bien JP, Brevers E, Courtois A, et al. Oxidative Stress Status in COVID-19 Patients Hospitalized in Intensive Care Unit for Severe Pneumonia. A Pilot Study. *Antioxidants*. 2021 Feb 7;10(2):257.
122. Giustarini D, Santucci A, Bartolini D, Galli F, Rossi R. The age-dependent decline of the extracellular thiol-disulfide balance and its role in SARS-CoV-2 infection. *Redox Biol*. 2021 May;41:101902.
123. Polidori MC, Sies H, Ferrucci L, Benzing T. COVID-19 mortality as a fingerprint of biological age. *Ageing Res Rev*. 2021 May;67:101308.
124. Chernyak BV, Popova EN, Prikhodko AS, Grebenchikov OA, Zinovkina LA, Zinovkin RA. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochem Mosc*. 2020 Dec;85(12–13):1543–53.
125. Zinovkin RA, Grebenchikov OA. Transcription Factor Nrf2 as a Potential Therapeutic Target for Prevention of Cytokine Storm in COVID-19 Patients. *Biochem Mosc*. 2020 Jul;85(7):833–7.
126. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 2003 Jun;34(12):1507–16.
127. Hibbs JB, Westenfelder C, Taintor R, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, et al. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest*. 1992 Mar 1;89(3):867–77.
128. Kharazmi A, Nielsen H, Rechnitzer C, Bendtzen K. Interleukin 6 primes human neutrophil and monocyte oxidative burst response. *Immunol Lett*. 1989 May;21(2):177–84.
129. Makris AC, Sotzios Y, Zhou Z, Makropoulou M, Papapetropoulos N, Zacharatos P, et al. Nitric Oxide Stimulates Interleukin-6 Production in Skeletal Myotubes. *J Interferon Cytokine Res*. 2010 May;30(5):321–7.
130. Arachchillage DRJ, Laffan M. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020 May;18(5):1233–4.
131. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020 Apr;18(4):844–7.
132. Violi F, Oliva A, Cangemi R, Ceccarelli G, Pignatelli P, Carnevale R, et al. Nox2 activation in Covid-19. *Redox Biol*. 2020 Sep;36:101655.
133. Gadotti AC, Lipinski AL, Vasconcellos FTf, Marqueze LF, Cunha EBB, Campos AC, et al. Susceptibility of the patients infected with Sars-Cov2 to oxidative stress and possible interplay with severity of the disease. *Free Radic Biol Med*. 2021 Mar;165:184–90.

134. Karkhanei B, Talebi Ghane E, Mehri F. Evaluation of oxidative stress level: total antioxidant capacity, total oxidant status and glutathione activity in patients with COVID-19. *New Microbes New Infect.* 2021 Jul;42:100897.
135. Passos FRS, Heimfarth L, Monteiro BS, Corrêa CB, Moura TR de, Araújo AA de S, et al. Oxidative stress and inflammatory markers in patients with COVID-19: Potential role of RAGE, HMGB1, GFAP and COX-2 in disease severity. *Int Immunopharmacol.* 2022 Mar;104:108502.
136. Silvagno F, Vernone A, Pescarmona GP. The Role of Glutathione in Protecting against the Severe Inflammatory Response Triggered by COVID-19. *Antioxidants.* 2020 Jul 16;9(7):624.
137. Vollbracht C, Kraft K. Oxidative Stress and Hyper-Inflammation as Major Drivers of Severe COVID-19 and Long COVID: Implications for the Benefit of High-Dose Intravenous Vitamin C. *Front Pharmacol.* 2022 Apr 29;13:899198.
138. Ćorić V. The implications of oxidative stress in long COVID pathogenesis. *Med Podml.* 2023;74(4):6–14.
139. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul;21(7):363–83.
140. Coric V, Milosevic I, Djukic T, Bukumiric Z, Savic-Radojevic A, Matic M, et al. GSTP1 and GSTM3 Variant Alleles Affect Susceptibility and Severity of COVID-19. *Front Mol Biosci.* 2021 Dec 20;8:747493.
141. Marković Marko. The role of disturbed redox homeostasis in COVID-19. *Medicinski podmladak.* 76(6). Vol. 76 br. 6. (2025). doi 10.5937/mp76-49373
142. Tsermpini EE, Glamočlija U, Ulucan-Karnak F, Redenšek Trampuž S, Dolžan V. Molecular Mechanisms Related to Responses to Oxidative Stress and Antioxidative Therapies in COVID-19: A Systematic Review. *Antioxidants.* 2022 Aug 19;11(8):1609.
143. Camini FC, Da Silva Caetano CC, Almeida LT, De Brito Magalhães CL. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch Virol.* 2017 Apr;162(4):907–17.
144. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jul 14;2019:1–20.
145. Herengt A, Thyrsted J, Holm CK. NRF2 in Viral Infection. *Antioxidants.* 2021 Sep 18;10(9):1491.
146. Wang Y, Ma J, Jiang Y. Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for COVID-19. *Cell Stress Chaperones.* 2023 Jan;28(1):11–20.
147. Zhang X, Yu Y, Lei H, Cai Y, Shen J, Zhu P, et al. The Nrf-2/HO-1 Signaling Axis: A Ray of Hope in Cardiovascular Diseases. *Cardiol Res Pract.* 2020 Jan 30;2020:1–9.
148. Gümüş H, Erat T, Öztürk İ, Demir A, Koyuncu I. Oxidative stress and decreased Nrf2 level in pediatric patients with COVID-19. *J Med Virol.* 2022 May;94(5):2259–64.

149. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun.* 2016 May 23;7(1):11624.
150. Zhu H, Jia Z, Li Y. Nrf2 Signaling in Macrophages. *React Oxyg Species* [Internet]. 2016 [cited 2023 Jul 15]; Available from: <http://www.rosj.org/index.php/ros/article/view/66>
151. Davuljigari CB, Ekuban FA, Zong C, Fergany AAM, Morikawa K, Ichihara G. Nrf2 Activation Attenuates Acrylamide-Induced Neuropathy in Mice. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 1;22(11):5995.
152. Đukić T, Stevanović G, Ćorić V, Bukumirić Z, Plješa-Ercegovac M, Matić M, Jerotić Đ, Ašanin M, Ercegovac M, Ranin J, Milošević I, Simić T, Savić-Radojević A. Povezanost polimorfizama glutation transferase omega sa laboratorijskim pokazateljima zapaljenja u COVID-19. *Medicinska Istraživanja.* 2022;55(1):59-66.
153. Jerotic D, Ranin J, Bukumiric Z, Djukic T, Coric V, Savic-Radojevic A, et al. *SOD2* rs4880 and *GPXI* rs1050450 polymorphisms do not confer risk of COVID-19, but influence inflammation or coagulation parameters in Serbian cohort. *Redox Rep.* 2022 Dec 31;27(1):85–91.
154. Montano MAE, Da Cruz IBM, Duarte MMMF, Da Costa Krewer C, De Ugalde Marques Da Rocha MI, Mânica-Cattani MF, et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* 2012 Oct;60(1):30–3.
155. El-far MA, Bakr MA, Farahat SE, El-Fattah EAA. Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders. *Clin Exp Nephrol.* 2005 Jun 24;9(2):127–31.
156. Schamberger AC, Schiller HB, Fernandez IE, Sterclova M, Heinzelmann K, Hennen E, et al. Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease. *Sci Rep.* 2016 Jul 20;6(1):29952.
157. Manzanares W, Biestro A, Galusso F, Torre MH, Mañay N, Pittini G, et al. Serum selenium and glutathione peroxidase-3 activity: biomarkers of systemic inflammation in the critically ill? *Intensive Care Med.* 2009 May;35(5):882–9.
158. Chang C, Worley BL, Phaëton R, Hempel N. Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer. *Cancers.* 2020 Aug 6;12(8):2197.
159. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Benke KS, Kenet G, Simioni P, et al. Promoter Polymorphisms in the Plasma Glutathione Peroxidase (*GPx-3*) Gene: A Novel Risk Factor for Arterial Ischemic Stroke Among Young Adults and Children. *Stroke.* 2007 Jan;38(1):41–9.
160. Golabi S, Ghasemi S, Adelipour M, Bagheri R, Suzuki K, Wong A, et al. Oxidative Stress and Inflammatory Status in COVID-19 Outpatients: A Health Center-Based Analytical Cross-Sectional Study. *Antioxidants.* 2022 Mar 22;11(4):606.
161. Tavassolifar MJ, Aghdaei HA, Sadatpour O, Maleknia S, Fayazzadeh S, Mohebbi SR, et al. New insights into extracellular and intracellular redox status in COVID-19 patients. *Redox Biol.* 2023 Feb;59:102563.
162. Muhammad Y, Kani YA, Iliya S, Muhammad JB, Binji A, El-Fulaty Ahmad A, et al. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-

sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria. *SAGE Open Med.* 2021 Jan;9:205031212199124.

163. Mazari AMA, Zhang L, Ye ZW, Zhang J, Tew KD, Townsend DM. The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. *Biomolecules.* 2023 Apr 18;13(4):688.
164. Tew KD, Townsend DM. Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug Metab Rev.* 2011 May;43(2):179–93.
165. Zhang J, Ye Z wei, Singh S, Townsend DM, Tew KD. An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2018 May;120:204–16.
166. Djukic T, Stevanovic G, Coric V, Bukumiric Z, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, et al. GSTO1, GSTO2 and ACE2 Polymorphisms Modify Susceptibility to Developing COVID-19. *J Pers Med.* 2022 Mar 14;12(3):458.
167. Saadat M. An evidence for correlation between the glutathione S-transferase T1 (GSTT1) polymorphism and outcome of COVID-19. *Clin Chim Acta.* 2020 Sep;508:213–6.
168. Ding Z, Wang K, Li J, Tan Q, Tan W, Guo G. Association between glutathione S-transferase gene M1 and T1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease risk: A meta-analysis. *Clin Genet.* 2019 Jan;95(1):53–62.
169. Abbas M, Verma S, Verma S, Siddiqui S, Khan FH, Raza ST, et al. Association of *GSTM1* and *GSTT1* gene polymorphisms with COVID-19 susceptibility and its outcome. *J Med Virol.* 2021 Sep;93(9):5446–51.
170. Coric V, Milosevic I, Djukic T, Bukumiric Z, Savic-Radojevic A, Matic M, et al. GSTP1 and GSTM3 Variant Alleles Affect Susceptibility and Severity of COVID-19. *Front Mol Biosci.* 2021;8:747493.
171. Reiss AB, Greene C, Dayaramani C, Rauchman SH, Stecker MM, De Leon J, et al. Long COVID, the Brain, Nerves, and Cognitive Function. *Neurol Int.* 2023 Jul 6;15(3):821–41.
172. Stefanou MI, Palaiodimou L, Bakola E, Smyrnis N, Papadopoulou M, Paraskevas GP, et al. Neurological manifestations of long-COVID syndrome: a narrative review. *Ther Adv Chronic Dis.* 2022 Jan;13:204062232210768.
173. Brown RL, Benjamin L, Lunn MP, Bharucha T, Zandi MS, Hoskote C, et al. Pathophysiology, diagnosis, and management of neuroinflammation in covid-19. *BMJ.* 2023 Aug 18;e073923.
174. Al-Hakeim HK, Al-Rubaye HT, Al-Hadrawi DS, Almulla AF, Maes M. Long-COVID post-viral chronic fatigue and affective symptoms are associated with oxidative damage, lowered antioxidant defenses and inflammation: a proof of concept and mechanism study. *Mol Psychiatry.* 2023 Feb;28(2):564–78.
175. Stufano A, Isgrò C, Palese LL, Caretta P, De Maria L, Lovreglio P, et al. Oxidative Damage and Post-COVID Syndrome: A Cross-Sectional Study in a Cohort of Italian Workers. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 18;24(8):7445.
176. Ercegovac M, Asanin M, Savic-Radojevic A, Ranin J, Matic M, Djukic T, et al. Antioxidant Genetic Profile Modifies Probability of Developing Neurological Sequelae in Long-COVID. *Antioxidants.* 2022 May 12;11(5):954.

177. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007 May;39(2):175–91.
178. Michielsen HJ, De Vries J, Van Heck GL. Psychometric qualities of a brief self-rated fatigue measure. *J Psychosom Res*. 2003 Apr;54(4):345–52.
179. Ross AJ, Medow MS, Rowe PC, Stewart JM. What is brain fog? An evaluation of the symptom in postural tachycardia syndrome. *Clin Auton Res*. 2013 Dec;23(6):305–11.
180. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett*. 1996 Oct 22;107(2):229–33.
181. Shimoyama Y, Mitsuda Y, Tsuruta Y, Hamajima N, Niwa T. Polymorphism of *Nrf2*, an Antioxidative Gene, is Associated with Blood Pressure and Cardiovascular Mortality in Hemodialysis Patients. *Int J Med Sci*. 2014;11(7):726–31.
182. Shukla D, Bhadoria S, Bansal M, Changulani R. Evolution of the pandemic: Analysis of demographic characteristics of COVID-19-infected patients during its two waves in Gwalior district of central India. *J Fam Med Prim Care*. 2022;11(4):1314.
183. Chen YH, Cheuh YN, Chen CM, Kuo HW. Epidemiological characteristics of the three waves of COVID-19 epidemic in Taiwan during April 2022 to March 2023. *J Formos Med Assoc*. 2023 Nov;122(11):1174–82.
184. Martín U, Bacigalupe A, Jiménez Carrillo M. [COVID-19 and gender: certainties and uncertainties in monitoring the pandemic.]. *Rev Esp Salud Publica*. 2021 Apr 30;95:e202104066.
185. Ramírez-Plascencia LE, Vázquez-León AP, Villaseñor-Magaña A, Correa-Valdéz M, Carrillo-Ibarra S, Sifuentes-Franco S. Factors Possibly Associated with Mortality in Intubated COVID-19 Patients: A Retrospective Study. *Pathogens*. 2022 Feb 11;11(2):235.
186. Gallo G, Calvez V, Savoia C. Hypertension and COVID-19: Current Evidence and Perspectives. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2022 Mar;29(2):115–23.
187. Smail SW, Babaei E, Amin K. Hematological, Inflammatory, Coagulation, and Oxidative/Antioxidant Biomarkers as Predictors for Severity and Mortality in COVID-19: A Prospective Cohort-Study. *Int J Gen Med*. 2023 Feb;Volume 16:565–80.
188. Terada M, Ohtsu H, Saito S, Hayakawa K, Tsuzuki S, Asai Y, et al. Risk factors for severity on admission and the disease progression during hospitalisation in a large cohort of patients with COVID-19 in Japan. *BMJ Open*. 2021 Jun;11(6):e047007.
189. El-Khaiat MM, El-lehlah AM, Kesheita MA, Abdel-Samiee M, Teima AAA. Association between thrombocytopenia and the severity of Covid-19 infection among hospitalized Egyptian patients. *Ann Med Surg [Internet]*. 2022 Jul [cited 2024 Jul 15];79. Available from: <https://journals.lww.com/10.1016/j.amsu.2022.103973>
190. Chen R, Sang L, Jiang M, Yang Z, Jia N, Fu W, et al. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jul;146(1):89–100.

191. Henry BM, De Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 2020 Jun 25;58(7):1021–8.
192. Suryawanshi P, Takbhate B, Athavale P, Jali P, Memane N, Mirza S, et al. Lymphopenia with Altered T Cell Subsets in Hospitalized COVID-19 Patients in Pune, India. *Viral Immunol*. 2023 Mar 10;vim.2022.0123.
193. Zhang X, Tan Y, Ling Y, Lu G, Liu F, Yi Z, et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. *Nature*. 2020 Jul 16;583(7816):437–40.
194. Li Q, Cao Y, Chen L, Wu D, Yu J, Wang H, et al. Hematological features of persons with COVID-19. *Leukemia*. 2020 Aug;34(8):2163–72.
195. Mahmood N, Riaz Z, Sattar A, Kiran M. Hematological findings in COVID-19 and their correlation with severity of Disease. *Pak J Med Sci*. 2023;39(3):795–8.
196. Al-Saadi EAKD, Abdulnabi MA. Hematological changes associated with COVID-19 infection. *J Clin Lab Anal [Internet]*. 2022 Jan [cited 2023 Aug 7];36(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.24064>
197. Kåsine T, Dyrhol-Riise AM, Barratt-Due A, Kildal AB, Olsen IC, Nezvalova-Henriksen K, et al. Neutrophil count predicts clinical outcome in hospitalized COVID-19 patients: Results from the NOR-Solidarity trial. *J Intern Med*. 2022 Feb;291(2):241–3.
198. Awoke MA, Adane A, Assefa B, Getawa S, Legese GL, Yimer M. Hematological parameters and their predictive value for assessing disease severity in laboratory-confirmed COVID-19 patients: a retrospective study. *Am J Blood Res*. 2023;13(4):117–29.
199. Binsaleh NK, Eltayeb R, Sherwani S, Almishaal AA, Hindi E, Qanash H, et al. Comparison of Hematological Parameters Between Survivors and Non-Survivors COVID-19 Patients in Saudi Arabia. *Int J Gen Med*. 2023 Aug;Volume 16:3955–62.
200. Mehri F, Rahbar AH, Ghane ET, Souri B, Esfahani M. Changes in oxidative markers in COVID-19 patients. *Arch Med Res*. 2021 Nov;52(8):843–9.
201. Shakaroun DA, Lazar MH, Horowitz JC, Jennings JH. Serum Ferritin as a Predictor of Outcomes in Hospitalized Patients with Covid-19 Pneumonia. *J Intensive Care Med*. 2023 Jan;38(1):21–6.
202. Taşkin Ö, Yilmaz A, Soylu VG, Demir U, Çatan Inan F. Ferritin / albumin ratio could be a new indicator of COVID-19 disease mortality. *J Infect Dev Ctries*. 2023 Jan 31;17(01):37–42.
203. Urazov S, Chernov A, Popov O, Klenkova N, Sushentseva N, Polkovnikova I, et al. Secretary Phospholipase A2 and Interleukin-6 Levels as Predictive Markers of the Severity and Outcome of Patients with COVID-19 Infections. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 14;24(6):5540.
204. Paranga TG, Pavel-Tanasa M, Constantinescu D, Plesca CE, Petrovici C, Miftode IL, et al. Comparison of C-reactive protein with distinct hyperinflammatory biomarkers in association with COVID-19 severity, mortality and SARS-CoV-2 variants. *Front Immunol*. 2023 Jun 14;14:1213246.

205. Benedé-Ubieto R, Estévez-Vázquez O, Flores-Perojo V, Macías-Rodríguez RU, Ruiz-Margáin A, Martínez-Naves E, et al. Abnormal Liver Function Test in Patients Infected with Coronavirus (SARS-CoV-2): A Retrospective Single-Center Study from Spain. *J Clin Med*. 2021 Mar 3;10(5):1039.
206. Fialek B, Pruc M, Smereka J, Jas R, Rahnama-Hezavah M, Denegri A, et al. Diagnostic value of lactate dehydrogenase in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Cardiol J*. 2022 Sep 30;29(5):751–8.
207. Battaglini D, Lopes-Pacheco M, Castro-Faria-Neto HC, Pelosi P, Rocco PRM. Laboratory Biomarkers for Diagnosis and Prognosis in COVID-19. *Front Immunol*. 2022 Apr 27;13:857573.
208. Pan F, Yang L, Li Y, Liang B, Li L, Ye T, et al. Factors associated with death outcome in patients with severe coronavirus disease-19 (COVID-19): a case-control study. *Int J Med Sci*. 2020;17(9):1281–92.
209. Cheng S, Wu D, Li J, Zou Y, Wan Y, Shen L, et al. Risk factors for the critical illness in SARS-CoV-2 infection: a multicenter retrospective cohort study. *Respir Res*. 2020 Dec;21(1):277.
210. Pott-Junior H, Bittencourt NQP, Chacha SFG, Luporini RL, Cominetti MR, Anibal FDF. Elevations in Liver Transaminases in COVID-19: (How) Are They Related? *Front Med*. 2021 Jul 15;8:705247.
211. Kangro K, Wolberg AS, Flick MJ. Fibrinogen, Fibrin, and Fibrin Degradation Products in COVID-19. *Curr Drug Targets*. 2022 Dec;23(17):1593–602.
212. Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020 Sep;18(9):2103–9.
213. Wool GD, Miller JL. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. *Pathobiology*. 2021;88(1):15–27.
214. Rostami M, Mansouritorghabeh H. D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review. *Expert Rev Hematol*. 2020 Nov 1;13(11):1265–75.
215. Orlewska K, Klusek J, Zarębska-Michaluk D, Kocańda K, Oblap R, Cedro A, et al. Association between Glutathione S-Transferases Gene Variants and COVID-19 Severity in Previously Vaccinated and Unvaccinated Polish Patients with Confirmed SARS-CoV-2 Infection. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Feb 20;20(4):3752.
216. Otoupalova E, Smith S, Cheng G, Thannickal VJ. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2020 [cited 2024 Jun 22]. p. 509–47. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c190017>
217. Dua K, Malya V, Singhvi G, Wadhwa R, Krishna RV, Shukla SD, et al. Increasing complexity and interactions of oxidative stress in chronic respiratory diseases: An emerging need for novel drug delivery systems. *Chem Biol Interact*. 2019 Feb;299:168–78.
218. Yamada Y, Limmon GV, Zheng D, Li N, Li L, Yin L, et al. Major Shifts in the Spatio-Temporal Distribution of Lung Antioxidant Enzymes during Influenza Pneumonia. Le Grand R, editor. *PLoS ONE*. 2012 Feb 15;7(2):e31494.

219. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* 2007 May;274(9):2163–80.
220. Kasai S, Shimizu S, Tatara Y, Mimura J, Itoh K. Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules.* 2020 Feb 17;10(2):320.
221. Radic Savic Z, Coric V, Vidovic S, Vidovic V, Becarevic J, Milovac I, et al. GPX3 rs8177412 Polymorphism Modifies Risk of Upper Urothelial Tumors in Patients with Balkan Endemic Nephropathy. *Med Kaunas Lith.* 2023 Aug 4;59(8):1421.
222. Fodor A, Tiperciuc B, Login C, Orasan OH, Lazar AL, Buchman C, et al. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress in COVID-19—Mechanisms and Therapeutic Targets. Jakovljevic V, editor. *Oxid Med Cell Longev.* 2021 Aug 21;2021:1–15.
223. Forcados GE, Muhammad A, Oladipo OO, Makama S, Meseko CA. Metabolic Implications of Oxidative Stress and Inflammatory Process in SARS-CoV-2 Pathogenesis: Therapeutic Potential of Natural Antioxidants. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 May 26;11:654813.
224. Jankauskas SS, Kansakar U, Sardu C, Varzideh F, Avvisato R, Wang X, et al. COVID-19 Causes Ferroptosis and Oxidative Stress in Human Endothelial Cells. *Antioxidants.* 2023 Jan 31;12(2):326.
225. Georgieva E, Ananiev J, Yovchev Y, Arabadzhiev G, Abrashev H, Abrasheva D, et al. COVID-19 Complications: Oxidative Stress, Inflammation, and Mitochondrial and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 4;24(19):14876.
226. Siekacz K, Kumor-Kisielewska A, Miłkowska-Dymanowska J, Pietrusińska M, Bartczak K, Majewski S, et al. Oxidative Biomarkers Associated with the Pulmonary Manifestation of Post-COVID-19 Complications. *J Clin Med.* 2023 Jun 25;12(13):4253.
227. Müller L, Di Benedetto S. Inflammaging, immunosenescence, and cardiovascular aging: insights into long COVID implications. *Front Cardiovasc Med.* 2024 Jun 26;11:1384996.
228. Cappadona C, Rimoldi V, Paraboschi EM, Asselta R. Genetic susceptibility to severe COVID-19. *Infect Genet Evol.* 2023 Jun;110:105426.
229. Asanin M, Ercegovic M, Krljanac G, Djukic T, Coric V, Jerotic D, et al. Antioxidant Genetic Variants Modify Echocardiography Indices in Long COVID. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 16;24(12):10234.
230. Jarrott B, Head R, Pringle KG, Lumbers ER, Martin JH. “LONG COVID”—A hypothesis for understanding the biological basis and pharmacological treatment strategy. *Pharmacol Res Perspect.* 2022 Feb;10(1):e00911.
231. Al-Hakeim HK, Al-Rubaye HT, Almulla AF, Al-Hadrawi DS, Maes M. Chronic Fatigue, Depression and Anxiety Symptoms in Long COVID Are Strongly Predicted by Neuroimmune and Neuro-Oxidative Pathways Which Are Caused by the Inflammation during Acute Infection. *J Clin Med.* 2023 Jan 8;12(2):511.

LISTA SKRAĆENICA

ACE2	eng. <i>angiotensin 2 converting enzyme</i>
AF	alkalna fosfataza
Ag	antigen
ALI	eng. <i>acute lung injury</i>
ALT	alanin aminotransferaza
APTT	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme
ARDS	akutni respiratorni distres sindrom
ARE	eng. <i>antioxidant response element</i>
AST	aspartat aminotransferaza
BMI	eng. <i>body mass index</i>
CAT	katalaza
CDC	eng. <i>Center for disease control</i>
CK	kreatin kinaza
COVID-19	eng. <i>coronavirus disease 19</i>
CRP	C-reaktivni protein
DAMP	eng. <i>damage-associated molecular pattern proteins</i>
DIK	diseminovana intravaskularna koagulopatija
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EUA	eng. <i>emergency use authorisation</i>
GGT	gama glutamat transferaza
GPX	glutation peroksidaza
GSH	glutation
GST	glutation s transferaza
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	eng. <i>hepatocyte growth factor</i>
HIV	Virus Humane Imunodeficijencije
HOBP	hronična opstruktivna bolest pluća
INR	eng. <i>international normalized ratio</i>
IFN	interferon
IL	interleukin
IRF	eng. <i>interferon regulatory factor</i>
JAK	janus kinaza
JIN	jedinica intenzivne nege
Keap-1	kelch-like ech-povezan protein 1
KSR	kiseonični slobodni radikali
LDH	laktat dehidrogenaza
MDA	malondialdehid
MDA5	eng. <i>essential viral recognition receptor melanoma differentiation-associated protein 5</i>

MERS-CoV	eng. <i>middle east respiratory syndrome–related coronavirus</i>
NAC	n-acetilcistein
NADPH	eng. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NO	azot oksid
NLR	odnos neutrofila i limfocita
Nrf2	eng. <i>nuclear factor erythroid 2–related factor 2</i>
NSP	nestrukturni protein
NF-kB	eng. <i>nuclear factor kappa B</i>
NK	eng. <i>-natural killer</i>
ORF	eng. open reading frame
PAMP	eng. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	eng. <i>polymerase chain reaction</i>
PCR-CTTP	engl. <i>polymerase chain reaction with confronting two-pair primers</i>
PLA2	sekretorna fosfolipaza A2
pO ₂	parcijalni pritisak kiseonika
PT	protrombinsko vreme
RBD	eng. receptor binding domain
RIG-I	eng. <i>retinoic acid-inducible gene-i</i>
RNK	ribonukleinska kiselina
RT-PCR	eng. <i>real-time polymerase chain reaction</i>
SARS-CoV	eng. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SARS-CoV-2	eng. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SIRS	eng. <i>systemic inflammatory response syndrome</i>
sMAF	mali protein muskuloaponeurotičnog fibrosarkoma
SNP	eng. <i>single nucleotide polymorphism</i>
SOD	superoksid dizmutaza
SpO ₂	saturacija kiseonikom
suPAR	eng. <i>soluble urokinase plasminogen activator receptor</i>
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TAC	eng. <i>total antioxidant capacity</i>
TLR	eng. <i>toll-like receptor</i>
TMPRSS2	transmembranska serin proteaza 2
TNF- α	faktor nekroze tumora alfa
TREM-1	eng. <i>triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
VUM	eng. <i>variants under monitoring</i>
VOC	eng. <i>variants of concern</i>
VOI	eng. <i>variants of interest</i>

Objavljeni rezultati iz ove doktorske disertacije:

Rad *in extenso* u časopisu sa JCR liste:

Markovic M, Ranin J, Bukumiric Z, Jerotic D, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, et al. *GPX3* Variant Genotype Affects the Risk of Developing Severe Forms of COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2023 Nov 10;24(22):16151.

Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:

Marković Marko. The role of disturbed redox homeostasis in COVID-19. *Medicinski podmladak.* Vol. 76 br. 6. (2025). doi 10.5937/mp76-49373

Biografija autora

Marko Marković je rođen 02.09.1985. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu sa odličnim uspehom. Studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu započeo je 2004. godine, a diplomirao 2010.godine sa prosečnom ocenom 8,50. Deo obaveznog lekarskog staža obavio je u Kliničkom centru Srbije u Beogradu i u Domu Zdravlja Vračar od 2010. do 2011. godine. Od 2011. godine radi u Klinici za infektivne i tropske bolesti u Beogradu, Kliničkog Centra Srbije. U oktobru 2020. godine položio je stručni specijalistički ispit iz infektivnih bolesti na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu, sa najvišom ocenom. Doktorske akademske studije smer „Mikrobi i infekcija“ na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisao je 2016. godine. Od 2021. godine angažovan je kao Klinički asistent na katedri za infektivne i tropske bolesti Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Član je Lekarske komore Srbije i HIV Asocijacije Srbije. Dr Marko Marković je autor i koautor više naučno-istraživačkih radova od kojih je 6 indeksirano na SCI listi. Učestvovao je na većem broju kongresa u zemlji i inostranstvu.

IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora Marko Marković

Broj indeksa 5094/2016

Izjavljujem da je doktorska disertacija pod naslovom “POVEZANOST MARKERA INFLAMACIJE I POLIMORFIZAMA GENA ZA PROTEINE UKLJUČENE U REGULACIJU REDOKS HOMEOSTAZE SA TEŽINOM KLINIČKE SLIKE I PROGNOZOM TOKA BOLESTI KOD BOLESNIKA SA COVID-19”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica

Potpis autora

U Beogradu, _____

IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Ime i prezime autora Marko Marković

Broj indeksa 5094/2016

Studijski program DAS "Mikrobi i infekcija"

Naslov rada "POVEZANOST MARKERA INFLAMACIJE I POLIMORFIZAMA GENA ZA
PROTEINE UKLJUČENE U REGULACIJU REDOKS HOMEOSTAZE SA TEŽINOM
KLINIČKE SLIKE I PROGNOZOM TOKA BOLESTI KOD BOLESNIKA SA COVID-19"

Mentor 1 Prof. dr Jovan Ranin, Mentor 2 Prof. dr Marija Matić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku “Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: “POVEZANOST MARKERA INFLAMACIJE I POLIMORFIZAMA GENA ZA PROTEINE UKLJUČENE U REGULACIJU REDOKS HOMEOSTAZE SA TEŽINOM KLINIČKE SLIKE I PROGNOZOM TOKA BOLESTI KOD BOLESNIKA SA COVID-19” koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom format pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

- 1. Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
- 2. Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
- 3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
- 4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
- 5. Autorstvo – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
- 6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.