

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 12.07.2024. godine, broj 19/XXVIII-3/3-MM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije 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 “

kandidata kliničkog asistenta dr Marka Markovića, zaposlenog u Klinici za infektivne i tropske bolesti UKCS u Beogradu. Mentori ove doktorske disertacije su Prof. dr Jovan Ranin i Prof. dr Marija Matić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

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, vanredni profesor na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, član komisije

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija Kliničkog asistenta dr Marka Markovića napisana je na ukupno 59 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 12 tabela i 9 slika. Doktorska disertacija sadrži: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, grafički apstrakt, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

Uvod je podeljen u nekoliko celina. Prvi deo posvećen je epidemiologiji COVID-19, globalno i u Srbiji, kao i klasifikaciji varijanti SARS-CoV-2 koje trenutno cirkulišu u populaciji. Drugi deo se bavi karakteristikama SARS-CoV-2 i patogenezi COVID-19. Opisana je struktura virusa, kao i mehanizmi interakcije sa ćelijom domaćina, a zatim su objašnjeni osnovni mehanizmi urođenog i adaptivnog imuniteta u SARS-CoV-2 infekciji. Treći deo Uvoda odnosi se na kliničku sliku COVID-19, opisane su karakteristike: inkubacionog perioda, simptomatske faze bolesti, spektar kliničkih manifestacija i komplikacija. Pored toga, detaljno je opisana "citokinska oluja" i citokinski profili, kao i karakteristične promene vrednosti biohemijskih parametara kod obolelih od COVID-19. Takođe je data i klasifikacija oblika COVID-19 prema težini bolesti. Četvrti deo Uvoda odnosi se na dijagnostiku COVID-19 bolesti inavedene su najznačajnije dijagnostičke metode. U petom delu Uvoda naveden je aktuelan terapijski protokol za COVID-19 i nabrojani su simptomatski i antivirusni lekovi. U šestom delu Uvoda definisan je post-COVID sindrom, sa svojim osnovnim epidemiološkim i kliničkim karakteristikama. Posebna pažnja usmerena je neurološkim manifestacijama dugotrajnog COVID-a. Sedmi deo Uvoda bavi se uticajem oksidativnog stresa u COVID-19. Najpre su navedena opšta saznanja o značaju kiseoničnih slobodnih radikala, oksidativnog stresa, kao i o redoks homeostazi i opštim mehanizmima antioksidantne zaštite u ljudskom organizmu. Objasnjeno je kako gubitak ravnoteže između povećane produkcije slobodnih radikala i odbrambenih antioksidantnih i reparatornih mehanizama, uvodi ćeliju u oksidativni stress koji može dovesti do oštećenja ćelija i aktivirati stresogeni odgovor i proinflamatornu kaskadu. Zatim su navedena najnovija saznanja iz oblasti oksidativnog stresa u COVID-19. 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. Shodno tome,

opisani su mogući mehanizmi kojima oksidativni stres i poremećena redoks homeostaza tokom COVID-19 dovode do dalje hiperprodukcije slobodnih kiseoničnih radikala, pojačane produkcije proinflamatornih citokina, te začaranog kruga zapaljenja i oksidativnog stresa što dovodi do oštećenja organa i teže kliničke slike bolesti. Poseban deo Uvoda bavi se polimorfizmima gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u COVID-19. Najpre su objašnjeni nivoi antioksidantne zaštite, gde 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. Potom je opisan, za sada, poznati uticaj polimorfizama gena koji kodiraju prethodno navedene proteine antioksidantne zaštite tokom COVID-19. Posebno su istaknuta dosadašnja saznanja o pojedinim polimorfizmima ovih gena koji utiču na ekspresiju, ili aktivnost antioksidantnih enzima i njihov uticaj na podložnost za nastanak i/ili progresiju COVID-19. Poslednji deo Uvoda odnosi se na efekat polimorfizam gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u neurološkim manifestacijama post-COVID sindroma.

Sledeće poglavlje disertacije čine **Ciljevi istraživanja**, kojih ima tri: 1. da se ispita 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. da se ispita 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 i 3. da se ispita udruženi značaj navedenih laboratorijskih parametara i polimorfizama gena za proteine značajne u regulaciji redoks homeostaze sa rizikom za nastanak težeg oblika COVID-19.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da se radi o retrospektivnoj kohortnoj studiji sprovedenoj na Klinici za infektivne i tropske bolesti UKCS u saradnji sa Institutom za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog Fakulteta u Beogradu. Istraživanje je obavljeno u periodu od septembra 2020. do juna 2022. godine. U istraživanje je uključeno 265 COVID-19 pacijenata koji su bili primljeni na bolničko lečenje u Kliniku za infektivne i tropske bolesti UKCS. Detaljno su opisani kriterijumi za uključenje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje. Studija je sprovedena u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji, i u skladu

sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (saglasnost broj 17/X-10 od 24.10.2023. godine). Precizno je opisana metodologija uzorkovanja i skladištenja uzoraka krvi, plazme, kao i izolacija DNK. Takođe, opisan je način prikupljanja podataka iz istorija bolesti i specijalističkog neurološkog pregleda u cilju proučavanja neuroloških post-COVID sekvela. Delecioni polimorfizmi *GSTM1* i *GSTT1* su određivani multipleks PCR metodom po Abdel-Rahman-a i sar. 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*), Inverzioni polimorfizam rs6721961 *Nrf2* gena je određen PCR-CTTP metodom (engl. *Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers, PCR-CTTP*) prema modifikovanoj metodi autora Shimoyama Y i sar. Prilikom analize dobijenih podataka vrednosti prediktora iz univarijantnih analiza koje su bile statistički značajne bili su dalje uključeni u modele multivarijantne regresije. Vrednost p manje od 0,05 smatrana je pokazateljem statističke značajnosti.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati kroz 8 tabela i jednu sliku.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 231 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Proverom originalnosti doktorske disertacije „**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**“ dobijen je indeks podudaranja teksta od 17 %, što je posledica podudaranja teksta sa bibliografskim podacima o korišćenoj literaturi, opštim podacima iz literature i prethodno publikovanim rezultatima koji su proistekli iz disertacije kandidata, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacije koje se brane na Univerzitetu u Beogradu.

C) Kratak opis postignutih rezultata

U sprovedenom istraživanju 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 ($>8\text{pg/L}$) 8 puta (OR=8,52, IP 2,48-29,28, $p=0,002$), povišen CRP ($>10\text{mg/L}$) 10 puta (OR=10,97, IP 4,16-28,96, $p<0,001$), dok povišena koncentracija fibrinogena ($>3.5 \text{ g/L}$) 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 ($>37 \text{ U/L}$) i LDH ($>227 \text{ U/L}$) su 2, odnosno 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, $p=0,026$). **S druge strane**, dobijeni rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost ni za jedan od ispitanih genskih polimorfizama sa rizikom za nastanak neuroloških post-COVID sekvela.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Studijsku grupu u istraživanju sprovednom u okviru ove disertacije činili su pretežno muškarci, a prosečna starost bila je 56 godina, dok je najčešći komorbiditet bila hipertenzija, koju je imalo polovina pacijenata. Većina drugih studija takođe pokazuje da od COVID-19 češće oboljevaju muškarci nego žene, kao i da češće oboljevaju starije osobe (*Martin i sar. 2021, Shukla i sar. 2023*) Rezultati drugih studija pokazuju da su najčešći komorbiditeti kod COVID-19 pacijenata hipertenzija, dijabetes melitus i gojaznost (*Galo i sar 2022*). Rezultati ove studije su pokazali da su inflamatorni markeri kao što su: broj limfocita, CRP i nivoi IL-6 povezani sa povećanim rizikom za progresiju COVID-19. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima brojnih sličnih studija koje su se takođe bavile značajem hematoloških i inflamatornih markera u razvoju težih formi i prognozi COVID-19. Studije pokazuju da su povišene vrednosti IL-6 i CRP u pozitivnoj korelaciji sa stepenom inflamacije, stepenom progresije, težinom bolesti i njenom prognozom (*Smail i sar. 2023, Henri i sar. 2020*) . Meta-analiza Brandon Majkl i sar, pokazala je da pacijenti sa teškom i fatalnom bolešću imaju značajno povećan broj leukocita i smanjen broj limfocita i trombocita u poređenju sa pacijentima sa lakšim formama bolesti (*Henri i sar 2020*,

Li i sar. 2020). Druga meta-analiza pokazala je da su povišeni serumski CRP, prokalcitonin, d-dimer i feritin povezani sa lošim ishodom kod COVID-19 (*Huang i sar 2020*) Više studija je prijavilo da tokom progresije bolesti dolazi do smanjenja broja limfocita, povećanja koncentracije CRP-a, feritina, TNF, IL-6, IL-10, d-dimera, produženja protrobinskog vremena (*Kosanovic i sar, 2021, Mahmood i sar. 2023, Srivastava i sar. 2020*) . U ovom istraživanju nije dokazana statistički značajna povezanost nivoa feritina i rizika za progresiju COVID-19. Međutim u drugim studijama nivo feritina ima visoku prediktivnu vrednost za prijem u intenzivnu negu, potrebu za mehaničkom ventilacijom i smrtnost u bolnici (*Shakaroun et al. 2023, Smail et al. 2023.*). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je vrednost aspartate aminotransferaze i nivo aktivnosti laktat dehidrogenaze od prediktivnog značaja za progresiju COVID-19 bolesti. Značajno povišene vrednosti laktat dehidrogenaze, kreatin kinaze, jetrinih enzima (AST i ALT), ukupnog bilirubina, uree i kreatinina na prijemu se obično registruju u teškim slučajevima i kod kritično obolelih pacijenata i prema drugim autorima (*Cheng et al. 2020.*). Kod teških, kritično bolesnih pacijenata i onih sa citokinskom olujom registrovani su povišen d-dimer, produženo protrombinsko vreme i smanjen fibrinogen kao prediktori progresije bolesti i neželjenog ishoda (*Al Saadi et al. 2022.*). Međutim, iako je polovina ispitivanih pacijenata imala povišen nivo d-dimera nije dobijena statistička značajnost za ovaj parametar, što nije u skladu sa većinom objavljenih podataka.

Rezultati povezanosti antioksidantnog genetskog profila i razvoja težih formi COVID-19 u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da nosioci *GPX3* varijantnog genotipa imaju veći rizik za razvoj težih oblika COVID-19. Kada su pacijenti stratifikovani po polu rezultati govore u prilog toga da osobe ženskog pola sa *GSTT1* nultim genotipom imaju veću šansu da razviju težu formu COVID-19 bolesti Međutim, podaci iz literaturesu pokazali da su polimorfizmi *GSTP1*, *GSTM3*, *GSTO1* i *GSTO2* značajno povezani sa podložnošću za nastanak COVID-19, kao i prognozom bolesti (*Ćoric i sar.. 2021, Orlevska i sar. 2023, Đukić i sar. 2022.*). Naime, Ćorić i sar. su pokazali da su osobe nosioci pojedinih *GSTP1* rs1695 i rs1138272), kao i *GSTM3* (rs1332018) genotipova manje sklone razvoju COVID-19, dok je studija Orlevska i sar. pokazala povezanost *GSTP1* polimorfizma sa težinom bolesti. S druge strane, Đukić i sar. prijavljuju da su osobe nosioci određenih *GSTO1*/*GSTO2* genotipova imale značajno povećan rizik od COVID-19. U slučaju polimorfizama antioksidantnih izoenzima GPX i SOD jedna studija je pokazala da je rizik od razvoja COVID-19 značajno smanjen među nosiocima varijantnog *GPX3* genotipa (*Jerotić i sar. 2022.*). Nekoliko studija je pokazalo smanjenu ekspresiju *Nrf2* kod pacijenata sa COVID-19 (*Zhang et. Al. 2020, Gumus et al. 2022.*). Rezultati istraživanja ove disertacije 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. Međutim, Ercegovac i sar. su prijavili da

su osobe koje su posedovale najmanje jedan alel *GSTPIABV* imale skoro dva puta smanjenu podložnost za nastanak mialgije neurološkog simptoma. Ova istraživačka grupa je takođe pokazala da postoji povezanost polimorfizama *GPXI* i *GPX3* i rizika za razvoj mialgije povezane sa dugotrajnim COVID-om.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

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

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „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“ kandidata kliničkog asistenta dr Marka Markovića, predstavlja originalni naučni doprinos u proučavanju uticaja polimorfizama gena za katalitičke i regulatorne proteine koji su uključeni u antioksidantnu zaštitu na progresiju COVID-19 bolesti. 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 i unaprede prevenciju, dijagnostiku, personalizovani terapijski pristup i prognozu ove bolesti.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju kliničkog asistenta dr Marka Markovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 16.07.2024. godine.

Članovi komisije:

Prof. dr Goran Stevanović

Prof. dr Tatjana Đukić

Doc. dr Vesna Ćorić

Doc. dr Marko Ercegovac

Prof. dr Daniela Marić

Mentori:

Prof. dr Jovan Ranin

Prof. dr Marija Matić
