

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno – naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.09.2023. godine, broj 14/XVI-1/3-CK, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Mehanizmi redoks ravnoteže i inflamatornog odgovora nakon primene metilprednizolona u dece sa multisistemskim inflamatornim sindrom udruženim sa COVID-19“

kandidata dr Staše Krasić, zaposlene na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu.

Mentori doktorske disertacije su prof. dr Milica Bajčetić, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, i prof. dr Vladislav Vukomanović, Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Janko Samardžić, predsednik, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Srđan Pašić, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Jelena Vojinović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Nišu
4. N. Sav. Dr Ivan Spasojević, Institut za medicinska istraživanja
5. Doc. dr Bojana Božić Cvijan, docent Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Staše Krasić napisana je na srpskom jeziku, u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 81 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 8 shema, 7

tabela, 10 grafikona i 9 slika; prve 3 slike (ilustracija), slika 8 i 9 su preuzete i prevedene iz naučne literature koja je pravilno citirana u tekstu i u spisku referenci. Doktorska disertacija sadrži još: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, zahvalnicu, spisak skraćenica korišćenih u tekstu, publikovane radove, biografiju doktoranta, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** su opisani definicija, etiologija i patogeneza multisistemskog inflamatornog sindroma kod dece (MIS-C) udruženog sa COVID-19, sa posebnim osvrtom na virusom-indukovanu autoimunost i značaj slobodnih radikala, interleukina i hemokina u citokinskoj oluji koja je dalje povezana sa kliničkom slikom i odgovorom na primenjenu terapiju. Detaljno su opisani lekovi koji se koriste u terapiji MIS-C, sa posebnim naglaskom na mehanizme delovanja metilprednizolona u blokiranju inflamatorne kaskade, hiperinflamatorne reakcije i oksidativnog stresa koji se javljaju u akutnoj fazi bolesti.

Ciljevi rada su precizno definisani, a primarni ciljevi rada bili su da se utvrde promene: 1) aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritocitima pre i nakon terapije metilprednizolonom (MP) i indirektno proceni aktivnost dominantnih reaktivnih vrsta; 2) oksidaciono - redukcionog potencijala (ORP) tj. ukupnog oksidativnog statusa u plazmi, pre i nakon terapije MP; 3) inflamatornog odgovora određivanjem imunofenotipa limfocita periferne krvi. Sekundarni ciljevi rada bili su da se utvrdi povezanost između parametara oksidativnog stresa i inflamatornog odgovora sa: 1) biohemijskim i hematološkim parametrima krvi; 2) ehokardiografskim nalazom pre i nakon terapije MP; 3) promenama u kliničkom toku i ishodu bolesti.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da se radi o kohortnoj studiji koja je obuhvatila 67 dece (38 dečaka i 29 devojčica) uzrasta do 18 godina lečena pod dijagnozom MIS-C udruženog sa COVID-19 u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" od januara 2021. godine do aprila 2022. godine. Dijagnoza bolesti je postavljena na osnovu preporuka Svetske zdravstvene organizacije. Jasno su definisani kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije. Svakom bolesniku sa potvrđenom dijagnozom MIS-C je na prijemu u bolnicu uzeta detaljna anamneza, učinjen kompletan fizikalni pregled, urađene standardne hematološke i biohemijske analize krvi, uzeti uzorci krvi za određivanje parametara oksidativnog stresa i imunofenotipa limfocita periferne krvi, serološke analize na SARS-CoV-2, urađeni EKG zapis i ehokardiografski pregled. Protokol studije je shematski prikazan. Pacijenti su lečeni primenom suportivne i imunomodulatorne, kortikosteroidne terapije - pulsevi MP ili MP u standardnim dozama u zavisnosti od težine kliničke slike. Protokol lečenja je shematski prikazan. Način određivanja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u

eritrocitima, kao i određivanje oksidaciono-redukcionog potencijala i imunofenotipa limfocita periferne krvi su detaljno opisani. Način određivanja ehokardiografskih parametara je jasno objašnjen. Za statističku analizu korišćen je program SPSS 25.0 za Windows 10. Sve statističke metode su smatrane statistički značajnim ako $p \leq 0,05$. Kalkulatorom za određivanje veličine uzorka za nivo značajnosti (CI) 95% i za granicu greške od 5%, procenjena veličina uzorka je bila 23 bolesnika.

Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Svi ispitanici bili su detaljno informisani o protokolima i ciljevima studije i dali su pisani pristanak pre uključanja u studiju.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Rezultati rada su prikazani i statistički obrađeni na 17 strana uz grafičke i tabelarne prikaze i slike – 9 grafika, 6 tabela i 3 slike.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Plan diskusije dat na 20 strana napravljen u saglasnosti sa poglavljima iz **Rezultata** rada. Komparirani su rezultati rada sa najnovijim podacima iz literature, pri čemu su naglašena nova saznanja, proistekla iz rezultata ispitivanja kandidata, a posebno u odnosu na ulogu i značaj primene metilpredizolona u modulaciji oksidativnog stresa, urođenog i stečenog imuniteta.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Doktorova teza je potvrdila radne hipoteze i odgovorila na unapred definisane ciljeve.

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 140 referenci koje su najnovijeg datuma, dok su sami metodološki postupci preuzeti iz referenci u kojima se prvo opisuju.

C) Kratak opis postignutih rezultata

U ovoj studiji je učestvovalo ukupno 67 bolesnika, 38 dečaka (56,7%) i 29 devojčica (43,3%); prosečnog uzrasta 9,2 (IQR 6,3–12,9) godine. Svi bolesnici imali su povišenu telesnu temperaturu, gastrointestinalne tegobe su bile najzastupljenije, dok je 57% bolesnika imala kardiovaskularne (KV) manifestacije. Dužina trajanja bolesti nije uticala na težinu kliničke slike, kao ni na razvoj KV manifestacija. Šok je imalo 17,9% bolesnika, a najčešće se radilo o kombinaciji kardiogenog i vazoplegičnog šoka. Prijem u odeljenje intenzivne nege zahtevalo je 32,8% bolesnika.

Rezultati ove studije ukazali su da su kod svih bolesnika na prijemu povišene vrednosti reaktanata akutne faze (CRP, fibrinogen, D-dimeri), dok su negativni reaktanti akutne faze

zapaljenja bili sniženi (albumini, natrijum). Dalje registrovano je da su bile povišene vrednosti totalnog oksidativnog statusa plazme (TOPS), kao i da su bolesnici koji su primljeni u Odeljenje intenzivne nege imali statistički značajno više vrednosti TOPS. Takođe, na prijemu su bolesnici imali sniženu vrednost superoksid dizmutaze (SOD), što je rezultovalo, sa jedne strane intracelularnom akumulacijom superoksid anjona koji ima negativno intotropno dejstvo, a sa druge strane povećanom aktivnošću superoksid reduktaze i produkcijom vodonik peroksida, koji je kod naših bolesnika bio dominantna reaktivna kiseonična vrsta.

Rezultati su ukazali na to da humoralni imunitet ima značajnu ulogu u patogenezi MIS-C, dok je kod bolesnika sa KV manifestacijama relativna koncentracija *Natural Killer* (NK) ćelija bila snižena.

Pokazano je da su bolesnici sa KV manifestacijama imali više vrednosti CRP, proBNP i relativnu koncentraciju B limfocita, kao i da su bili stariji od bolesnika koji nisu imali KV manifestacije. Takođe, kod bolesnika koji su imali šok registrovane su više vrednosti CRP, proBNP i troponina I, kao i niže vrednosti natrijuma, albumina i NK ćelija. Kod bolesnika sa šokom na prijemu su bile statističke značajno niža aktivnosti eritrocitne SOD.

Pokazano je postojanje pozitivne korelacije između vrednosti CRP, proBNP i TOPS, kao i umerena negativna korelacija između ejsione frakcije leve komore (EF LK) i relativnog broja B limfocita i pozitivna korelacija između EF LK i relativnih NK ćelija. Pokazana je pozitivna korelacija između end-dijastolni dijametar (EDD) Z skora i TOPS; kao i negativna između EDD Z skora sa aktivnošću SOD. Umerena negativna korelacija je primećena između EF LK i CRP; i EF LK i TOPS.

Nakon primene metilprednizolona (MP) pokazano je da dolazi do brze modulacije TOPS, tj. značajnog smanjenja kiseoničnih radikala i porasta aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima. Dalje, registrovana je normalizacija kliničkog nalaz i biohemijskih analiza nakon primenjene terapije. Neuspeh lečenja registrovan je kod šest bolesnika. Pokazano je da su ovi bolesnici na prijemu imali nižu aktivnost katalaze, što dalje usmerava metabolizam reaktivnih kiseoničnih vrsta ka Fentonovoj reakciji i stvaranju hidroksi radikala. Nakon primene MP došlo je do normalizacije ehokardiografskih parametara.

U periodu praćenja, pokazano je da dolazi do postepenog oporavka i normalizacije aktivnosti enzima antioksidativne, kao i potpunog oporavka imunofenotipa limfocita periferne krvi. Ehokardiografski nalazi su već bili u granicama normale na otpustu iz bolnice, što se održavalo i u periodu praćenja.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Pokazano je da oksidativni stres (OS) ima značajnu ulogu u etiopatogenezi MIS-C, kao i da brza modulacija OS i inflamatornog odgovora primenom metilpredizolona, zaustavlja dalju progresiju i dovodi do promptnog kliničkog poboljšanja, koje se ogleda u normalizaciji telesne temperature, gubitku simptoma i regresiji akutno nastale srčane slabosti. Pokazano je da su u sindromu sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS) povišeni ROS, a sniženi enzimi antioksidativne zaštite, što odgovara našim rezultatima koji se odnose na hiperinflamaciju u MIS-C. Slično je dokazano i kod bolesnika sa Kavasakijevom bolešću (Perrone i sar., 2022). Pokazali smo da postoji pozitivna korelacija između TOPS i CRP, što potvrđuje da je OS u skladu sa stepenom inflamacije. Ova tvrdnja je dodatno potvrđena prisustvom pozitivne korelacije između TOPS i relativne koncentracije B limfocita, koji je inače povišena kod bolesnika sa MIS-C i govori o ekspanziji autoreaktivnih ćelija koje proizvode auto-antitela. Takođe, negativna korelacija TOPS sa relativnom koncentracijom T limfocita potvrđuje činjenicu da su autoimune reakcije u MIS-C uslovljene aktivacijom B-limfocita (Gruber i sar., 2020, Graciano-Machuca i sar., 2021, Ramaswamy i sar., 2021). Ovi rezultati govore da određivanje TOPS kod bolesnika sa MIS-C ima veliki značaj u proceni stepena inflamacije u akutnoj fazi bolesti.

Pokazali smo da pacijenti sa KV manifestacijama imaju više vrednosti TOPS. Osim što smo dokazali postojanje pozitivne korelacije TOPS i CRP, utvrdili smo da postoji pozitivna korelacija između TOPS i proBNP, što znači da su pacijenti sa mnogo intenzivnijom inflamacijom imali izraženiji OS, sa posledičnom izraženijom depresijom funkcije miokarda. Podaci iz literature pokazuju da ROS mogu direktno da naruše kontraktilnu funkciju kardiomiocita: 1) modifikujući funkciju proteina koji povezuju ekscitaciju i kontrakciju, 2) negativno utiču na dispoziciju kalcijuma u miokardu, 3) uzrokuju aritmiju, 4) aktiviraju zapaljenski odgovor, 5) doprinose remodelovanju srca izazivanjem hipertrofije, fibroze, apoptoze i nekroze (Tsutsui i sar., 2011, Münzel i sar., 2017).

Pokazali smo da su naši pacijenti imali sniženu aktivnost SOD pre lečenja MP, posebno oni koji su primljeni u odeljenje intenzivne nege. Ovo je u skladu sa nalazima da kod pacijenata sa dijagnozom hiperinflamatornog sindroma, uključujući MIS-C, postoji povećanje lipoperoksidacije kao i smanjeni antioksidativni kapacitet (Alonso de Vega i sar., 2002). Povećan nivo O_2^- može dovesti do smanjene produkcije azotmonoksida (NO), endotelne disfunkcije i poremećaja angiogenze (Andrés CMC i sar., 2023). Kako je kod naših bolesnika aktivnost SOD bila snižena pre terapije, može se zaključiti da ona povećava aktivnost superoksid reduktaze (SOR), koja katalizuje redukciju O_2^- čime se dobija H_2O_2 . Samim tim, zaključeno je da je H_2O_2 dominantna oksidativna vrsta kod bolesnika sa MIS-C.

Kod naših pacijenta registrovana je povišena koncentracija B limfocita i smanjena koncentracija T limfocita, kako CD4+, tako i CD8+. U studiji Carter i saradnika prikazani su slični rezultati – koncentracija CD4+, CD8+ i $\gamma\sigma$ T ćelijske subpopulacije su bili snižene u akutnoj fazi, dok su se u periodu rekonvalescencije koncentracije subpopulacija T ćelija normalizovale (Carter i sar, 2020).

Kod naših pacijenata pre terapije MP, registrovano je postojanje pozitivne korelacije između proBNP i relativnog broja B limfocita, kao i negativna između proBNP i NK ćelija. Posledično, stepen srčane slabosti bio je izraženiji u koliko su bile više koncentracije B limfocita i niže NK ćelija. Pokazano je postojanje jake pozitivne korelacije između proBNP i IL10, kao i negativne između IL2 i proBNP. Dakle, povećanje koncentracije pro-BNP u krvi povezano je sa inhibicijom imunokompetentnih ćelija preko IL10 i smanjenjem nivoa IL2 u krvi, čija je funkcija da aktivira ćelije u imunološkim reakcijama (Scioli i sar., 2020).

U lečenju bolesnika sa MIS-C korišćeni su samo kortikosteroidi kao imunomodulatorna terapija. Ouldali i saradnici sproveli su meta analizu koja se odnosila na lečenje bolesnika sa MIS-C mlađe od 21 godine. U zaključku meta-analize proizilazi je da je lečenje IVIG sa KS povezano sa bržim poboljšanjem kardiovaskularne funkcije u poređenju sa monoterapijom IVIG-om (Ouldali i sar., 2023). Pokazano je da su IVIG nezavisan faktor za neuspeh lečenja, jer se kod ovih bolesnika održavala povišena telesna temperatura duže od 48h nakon primenjena terapije, kao i da je tokom lečenja dolazilo do deterioracije funkcije LK i razvoja kardiogenog šoka. To se može objasniti drugačijim mehanizmom delovanja u odnosu na KS, kao i opterećenjem tečnosti tokom davanja IVIG (Vukomanovic i sar, 2021).

Nakon primene MP dolazi do značajnog porasta aktivnosti eritrocitne SOD i CAT. Gavan i saradnici su pokazali da topikalna primena KS kod atopijskog dermatitisa povećava aktivnost SOD (Gavan i sar., 1997), dok su Pennings i saradnici utvrdili da postoji porast aktivnosti eritrocitne CAT nakon primene KS kod bolesnika sa astmom (Pennings i sar., 1999). Bednarek i saradnici su zaključili da primena MP u Graves oftalmopatiji značajno redukuje koncentraciju H₂O₂ za koji smo pokazali da je glavni ROS kod naših bolesnika (Bednarek i sar., 2004).

Kod bolesnika odmah nakon primene MP, zabeležen je značajan pad CRP, fibrinogena i D-dimera, kao i proBNP. Registrovan je i porast serumske koncentracije natrijuma, albumina i broja trombocita. Sve ovo govori u prilog brzog modulaciji imunog odgovora nakon primene MP sa značajnom supresijom produkcije proinflamatornih citokina. Reverzijom kapilarne permeabilnosti, koja je jedan od glavnih patofizioloških mehanizama u razvoju KB i MIS-C, potiskivanjem migracije fibroblasta i polimorfonukleara, kontrolom brzine sinteze proteina i

stabilizacijom lizozoma na ćelijskom nivou, MP takođe može kontrolisati ili sprečiti inflamaciju (Ocej i sar., 2023).

Osim značajnog poboljšanja laboratorijskih markera, registrovano je i poboljšanje kliničkog stanja, kao i ehokardiografskih parametara nakon primene MP. Naime, registrovan je značajan porast EF LK već trećeg dana hospitalizacije. Naši rezultati su u skladu sa drugim studijama (Belhadjer i sar., 2020, Vukomanovic i sar., 2021, Ouldali i sar., 2023).

Neuspeh lečenja zabeležen je kod 8,9% bolesnika, dok je taj procenat pre primene MP bio značajno veći (Vukomanovic i sar., 2021). Pokazali smo da su devojčice imale skoro 10 puta veći rizik za neuspeh lečenja, kao i mlađi pacijenti. Sugunan i saradnici su pokazali da neinvazivna ili invazivna potpora disanju, zahvaćenost šest ili više organa, trombocitopenija i patološki nalaz na rentgenografiji srca i pluća predstavljaju faktore rizika za neuspeh lečenja MP (Sugunan i sar., 2022). U našoj kohorti, nakon primene MP, kod ovih pacijenata sa zabeleženim neuspehom lečenja došlo je do povećanja TOPS. Komatsu i saradnici su pokazali da kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća došlo do normalizacije ROS nakon primene KS, kao i da kod onih koji su umrli došlo je do porast ROS (Komatsu i sar., 2007). Stoga TOPS, može biti koristan biomarker prilikom procene odgovora na terapiju.

U našoj grupi pacijenata, H_2O_2 je bio dominantna ROS. Glutation peroksidaza i CAT glavni enzimi antioksidativne zaštite koji redukciju toksični H_2O_2 u H_2O . Naime, kod naših bolesnika na prijemu nije registrovana povišena aktivnost GSH-Px niti GR, čime nije bila moguća redukcija H_2O_2 , što je rezultovalo insuficijencijom puferskih sistema i značajnim OS. Naime kako je aktivnost CAT bila snižena kod bolesnika kod kojih je registrovan neuspeh lečenja, može se zaključiti da je Fentonovom reakcijom H_2O_2 u potpunosti prelazio u hidroksi-radikal (OH-) (Schieber i sar., 2014). To može objasniti i porast TOPS nakon primenjene terapije.

E) Objavljen rad koji čini deo doktorske disertacije

Krasic S, Vukomanovic V, Ninic S, Pasic S, Samardzija G, Mitrovic N, Cehic M, Nestic D, Bajcetic M. Mechanisms of redox balance and inflammatory response after the use of methylprednisolone in children with multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19. *Front Immunol.* 2023 Aug 14;14:1249582. doi: 10.3389/fimmu.2023.1249582. PMID: 37646033; PMCID: PMC10461094. (kategorija M21, IF 8,0)

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Mehanizmi redoks ravnoteže i inflamatornog odgovora nakon primene metilprednizolona u dece sa multisistemskim inflamatornim sindrom udruženim sa COVID-19“ dr Staše Krasić, predstavlja originalni naučni doprinos i pruža nova saznanja o uticaju primene metilprednizolona na oksidativni stres i inflamatorni odgovor kod dece sa MIS-C, kao

i saznanja o značaju oksidativnog stresa i reaktivnih kiseoničnih vrsta u patogenzi MIS-C. Studija je jedinstvena, jer totalni oksidativno-redukcioni potencijal i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima kod bolesnika sa MIS-C do sada nisu analizirani. Najveći naučni doprinos disertacije se ogleda u mogućnosti brzog određivanja totalnog oksidativnog statusa u plazima i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u cilju praćenja odgovora na primenjenu terapiju i toka bolesti kod dece sa MIS-C.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila 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 dr Staše Krasić i odobri njegovu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 28.09.2023. godine

Članovi komisije:

Prof. dr Janko Samardžić

Prof. dr Srđan Pašić

Prof. dr Jelena Vojinović

N. Sav. Dr Ivan Spasojević

Doc. dr Bojana Božić Cvijan

Mentori:

Prof. dr Milica Bajčetić

Prof. dr Vladislav Vukomanović
