



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Sanja D. Matić

**Uticaj polimorfizma *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4*
gena na težinu kliničke slike i ishod
COVID-19**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2023.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Sanja D. Matic

**Association of *ACE2*, *IFNL3*, and *IFNL4*
Gene Polymorphisms with COVID-19
Severity and Outcome**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

Autor
Ime i prezime: Sanja D. Matić
Datum i mesto rođenja: 02. 05. 1992. godine, Kosovska Mitrovica, Srbija
Sadašnje zaposlenje: asistent u užoj naučnoj oblasti Farmaceutska mikrobiologija na Fakultetu Medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: „Uticaj polimorfizma <i>ACE2</i> , <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena na težinu kliničke slike i ishod COVID-19“
Broj stranica: 164
Broj slika: 74 grafikona, 12 slika i 26 tabela
Broj bibliografskih podataka: 355
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina
Komentori: 1. Prof. dr Dejan Baskić, redovni profesor, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu 2. Prof. dr Nataša Đorđević, redovni profesor, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 14.04.2021.
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije:
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenost uslova kandidata: 1. Prof. dr Danijela Todorović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Genetika, predsednik 2. NS dr Suzana Popović, naučni saradnik Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član 3. Prof. dr Zoran Todorović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Farmakologija, Klinička farmakologija i toksikologija, član
Komisija za ocenu i odbrane doktorske disertacije: 1. Prof. dr Danijela Todorović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Genetika, predsednik 2. VNS dr Suzana Popović, viši naučni saradnik Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član 3. Prof. dr Zoran Todorović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Farmakologija, Klinička farmakologija i toksikologija, član
Datum odbrane disertacije:

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Autor
Name and surname: Sanja D. Matic
Date and place of birth: 02. 05. 1992., Kosovska Mitrovica, Serbia
Date and place of birth: Teaching assistant at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Pharmaceutical Microbiology
Doctoral Dissertation
Title: „Association of <i>ACE2</i> , <i>IFNL3</i> , and <i>IFNL4</i> Gene Polymorphisms with COVID-19 Severity and Outcome“
No. of pages: 164
No. of images: 74 graphics, 12 images and 26 tables
No. of bibliographic data: 355
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Co-mentors: 1. Prof. Dr. Dejan Baskic, full professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac 2. Prof. Dr. Natasa Djordjevic, full professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 14.04.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic:
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Prof. Dr. Danijela Todorović, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Genetics, President. 2. Dr. Suzana Popović, Research Associate at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Microbiology and Immunology, Member. 3. Prof. Dr. Zoran Todorović, Full Professor at the Medical Faculty, University of Belgrade for the narrow scientific field of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, Member.
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation: 1. Prof. Dr. Danijela Todorović, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Genetics, President. 2. Dr. Suzana Popović, Senior Research Associate at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Microbiology and Immunology, Member. 3. Prof. Dr. Zoran Todorović, Full Professor at the Medical Faculty, University of Belgrade for the narrow scientific field of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, Member.
Date of Dissertation Defense:

Zahvalnica

Teorija evolucije nas upućuje da je glavni pokretač evolutivnog napredka kod živih organizama borba za opstanak. Modernizacija 21. veka u ovu teoriju uključuje molekularnu genetiku koja smatra da umesto slučajnosti, evolucija nastaje na instruktivnim, kooperativnim interakcijama između organizama i njihove okoline koje omogućavaju opstanak, preživljavanje i napredak života u dinamičkom svetu. Kao zbunjujući faktor pridodato je vreme za dokaz ove sagregacije. Da bi se postigao pozitivan ishod, ključno je ostaviti materijalne dokaze o onome što je već dokazano i koristiti to kao polaznu tačku za dalje istraživanje i razumevanje. Ova doktorska disertacija je mali evolutivni iskorak nastao kao rezultat saradnje velikog broja ljudi i njihove međusobne interakcije, potrebe i želje za naučnom istinom, razumevanjem i smislom inerakcije ljudskog genoma u „COVID-nom“ okruženju.

Zahvaljujem svojim mentorima prof. dr Dejanu Baskiću i prof. dr Nataši Đorđević koji su činili nukleus ovog istraživanja, sa ciljanim idejama u kojim delovima genoma i njegove strukture treba potražiti odgovor, kao i u praćenju i formiranju istraživanja, oblikovanju i izradi završne forme doktorske disertacije.

Zahvaljujem se višem naučnom saradniku Suzani Popović na pedagoškom pristupu u učenju svakog postupka i principa laboratorijskog rada. Zasluge za moje znanje o laboratorijskom radu dugujem Vama.

Zahvaljujem prof. dr Danijeli Todorović što ste bili moja skripta u obučavanju rada u laboratoriji. Hvala Vam na metodičnom planiranju istraživanja, na brojnim laboratorijskim sveskama koje će me podsećati na ovaj proces i na važnosti forme postavljene na papir.

Zahvaljujem prof. dr Draganu Milovanoviću na učešću u ovom istraživanju, na proceni težine kliničke slike pacijenata sa COVID-19 i prikupljanju medicinskih podataka hospitalizovanih pacijenata iz baze podataka UKC Kragujevac.

Zahvaljujem prof. dr Srđanu Stefanoviću na pomoći u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem prof. dr Željku Mijailoviću i prof. dr Predragu Đurđeviću na regrutovanju hospitalizovanih COVID-19 pacijenata i prikupljanju bioloških uzoraka.

Zahvaljujem višem naučnom saradniku Marku Živanoviću i istraživaču saradniku Neveni Milivojević Dimitrijević na učešću u eksperimentalnom radu.

Zahvaljujem se kolegincama istraživaču pripravniku Tijani Marković, istraživaču pripravniku Vanji Čanović i doc.dr Katarini Vitošević na blagonaklonom tolerisanju stvaranja, od istraživanja do odbrane ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svojim prijateljima, što održavate balans, da u moru naučnih nejasnoća stvarate prostor za postojanje jednog sasvim spontanog socijalnog aspekta.

Zahvaljujem se svojoj porodici na neizmernoj podršci. Bez vas ova celina ne bi imala funkcionalnu formu, jer u jednoj evoluciji uvek je potrebna emotivna komponenta. Hvala Vam što ste verovali u uspeh mojih dela!

SAŽETAK

Uvod: Brojni faktori domaćina, uključujući i genetičke polimorfizme, mogu uticati na kompleksan mehanizam različitih infektivnih bolesti, poput COVID-19. Genotipizacijom funkcionalnih polimorfizama relevantnih gena u izloženim populacijama mogu se identifikovati genetički prediktori teške bolesti i smrtnog ishoda.

Cilj: Studija ima za cilj da utvrdi povezanost prisustva polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena, kao i koncentracija sACE2, IFN- λ 3 i IFN- λ 4 u serumu, sa težinom bolesti i ishodom COVID-19.

Ispitanici i metode: Ova opservaciona studija obuhvatila je 178 hospitalizovanih pacijenata sa SARS-CoV-2 infekcijom. Genotipizacija polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* izvršena je *Real-Time* PCR metodom, dok su serumski nivoi sACE2, IFN- λ 3 i IFN- λ 4 na prijemu određeni ELISA metodom.

Rezultati: Prisustvo varijantnog alela *ACE2* rs2106809 kod žena donosi 12 puta veći rizik od teške forme bolesti, ali i 10 puta manji rizik od kritično teške i smrtnog ishoda. Varijantni aleli *IFNL3* (rs8099917 i rs12980275) i *IFNL4* (rs12979860 i rs368234815) smanjuju rizik od umerene infekcije najmanje 5 puta. Prisustvo oba varijantna alela bilo kog ispitivanog *IFNL4* polimorfizma smanjuje rizik od pneumonije kod žena 29 puta i smrtnog ishoda za 93,6%. Šansa za smrtni ishod veća je kod nosilaca varijantnog alela *IFNL3* rs8099917. Niži nivoi IFN- λ 3 i viši nivoi sACE2 u serumu pacijenata na prijemu ukazuju na povećan rizik od ozbiljnijih kliničkih manifestacija i smrtnog ishoda infekcije SARS-CoV-2.

Zaključak: Polimorfizmi *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4*, kao i serumske koncentracije sACE2 i IFN- λ 3 na prijemu, povezani su sa težinom i ishodom COVID-19. Genotipizacija ovih gena i merenje serumskih nivoa njihovih produkata u ranim fazama infekcije mogu pomoći u proceni rizika od progresije bolesti i smrtnog ishoda.

Ključne reči: *ACE2*; *IFNL3*; *IFNL4*; COVID-19; SARS-CoV-2; težina; ishod bolesti; ženski pol

ABSTRACT

Introduction: Host factors, including genetic polymorphisms, impact the mechanisms of infectious diseases such as COVID-19. Genotyping exposed populations for functional polymorphisms of relevant genes might predict severe disease and fatal outcome.

Aim: This research explores the association of *ACE2*, *IFNL3*, and *IFNL4* gene polymorphisms and the sACE2, IFN- λ 3, and IFN- λ 4 serum levels with COVID-19 severity and outcome.

Participants and methods: This observational study included 178 hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection. Genotyping of *ACE2*, *IFNL3*, and *IFNL4* polymorphisms was performed by the Real-Time PCR method; serum levels of sACE2, IFN- λ 3, and IFN- λ 4 were determined upon admission using the ELISA method.

Results: The variant allele of *ACE2* rs2106809 in females indicates a 12-fold higher risk of severe disease and a 10-fold lower risk of critical severity and fatal outcome. *IFNL3* (rs8099917 and rs12980275) and *IFNL4* (rs12979860 and rs368234815) variant alleles are associated with at least a 5-fold reduced risk of moderate disease. Both variant alleles of any *IFNL4* polymorphisms are linked to a 29-fold lower risk of pneumonia in females and a 93.6% diminished risk of fatal outcome. The chance of a fatal outcome is higher in carriers of the *IFNL3* rs8099917 variant allele. Lower IFN- λ 3 and higher sACE2 levels in patients' serum at hospital admission indicate an increased risk of severe and fatal SARS-CoV-2 infection.

Conclusion: *ACE2*, *IFNL3*, and *IFNL4* polymorphisms, along with serum concentrations of sACE2 and IFN- λ 3 upon hospital admission, correlate with the COVID-19 severity and outcome. Genotyping these genes and measuring their product serum levels during the early stages of infection could assist in assessing the risk of disease progression and fatal outcome.

Key words: *ACE2*; *IFNL3*; *IFNL4*; COVID-19; SARS-CoV-2; severity; outcome; females

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. SARS-CoV-2 virus.....	4
1.1.1. Klasifikacija i poreklo virusa	4
1.1.2. Građa virusne partikule	5
1.1.3. Struktura i funkcija S glikoproteina	6
1.1.4. Struktura genoma	7
1.1.5. Replikacioni ciklus virusa	8
1.2. COVID-19.....	10
1.2.1. Imunopatogeneza COVID-19	10
1.2.2. Kliničke manifestacije i tok bolesti.....	13
1.2.3. Faktori rizika	14
1.3. ACE2: fiziološka funkcija i uloga u SARS-CoV-2 infekciji	15
1.4. Interferoni tip III: fiziološka funkcija i uloga u SARS-CoV-2 infekciji.....	17
1.5. Humani genetički polimorfizmi u infektivnim bolestima i COVID-19.....	18
1.5.1. Polimorfizmi ACE2 gena	20
1.5.2. Polimorfizmi <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena.....	21
2. Ciljevi i hipoteze istraživanja	24
3. Ispitanici i metodologija	26
3.1. Vrsta studije i etički aspekti	27
3.2. Studijska populacija	27
3.3. Uzorkovanje	27
3.3.1. Uzorkovanje i obrada krvi.....	28
3.3.2. Prikupljanje demografskih, kliničkih podataka i laboratorijskih parametara.....	28
3.4. Procena težine kliničke slike COVID-19	29
3.5. Izolacija molekula DNK.....	30
3.6. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK	30
3.7. Genotipizacija.....	32
3.7.1. Detekcija jednonukleotidnih polimorfizama reakcijom lančane polimerizacije u realnom vremenu	32
3.7.2. Alelska diskriminacija.....	34
3.8. Kvantifikacija solubilnog ACE2 i interferona IFN- λ 3 i IFN- λ 4 u serumu	35
3.9. Varijable koje su merene u studiji.....	36

3.10. Snaga studije i veličina uzorka.....	36
3.11. Statistička obrada podataka	36
4. Rezultati	38
4.1. Analiza demografskih, kliničkih podataka i laboratorijskih parametara.....	40
4.1.1. Demografske, kliničke i laboratorijske karakteristike ispitivane populacije	40
4.1.2. Analiza demografskih, kliničkih podataka i laboratorijskih parametara prema težini kliničke slike.....	42
4.1.3. Analiza demografskih, kliničkih podataka i laboratorijskih parametara prema ishodu bolesti.....	48
4.2. Analiza polimorfizama <i>ACE2</i> gena.....	51
4.2.1. Analiza polimorfizama <i>ACE2</i> gena u celoj populaciji.....	51
4.2.1.1. Učestalost alela, genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova u ispitivanoj populaciji.....	51
4.2.1.2. Analiza vezane neravnoteže polimorfizama <i>ACE2</i> gena.....	52
4.2.2. Analiza polimorfizama <i>ACE2</i> gena prema težini kliničke slike.....	53
4.2.2.1. Učestalost alela i njihov uticaj na težinu kliničke slike	53
4.2.2.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na težinu kliničke slike	54
4.2.2.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na težinu kliničke slike	57
4.2.2.4. Uticaj polimorfizama <i>ACE2</i> gena na težinu COVID-19: multivarijabilna logistička regresija.....	58
4.2.3. Analiza polimorfizama <i>ACE2</i> prema ishodu bolesti	59
4.2.3.1. Učestalost alela i njihov uticaj na ishod bolesti	59
4.2.3.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na ishod bolesti	60
4.2.3.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na ishod bolesti	61
4.2.3.4. Uticaj polimorfizama <i>ACE2</i> gena na ishod COVID-19: multivarijabilna logistička regresija.....	62
4.3. Koncentracija solubilnog s <i>ACE2</i> u COVID-19 kohorti	64
4.3.1. Koncentracija s <i>ACE2</i> u odnosu na polimorfizme <i>ACE2</i> gena.....	64
4.3.2. Koncentracija s <i>ACE2</i> u odnosu na težinu kliničke slike	65
4.3.3. Koncentracija s <i>ACE2</i> u odnosu na ishod COVID-19	66
4.3.4. Uticaj s <i>ACE2</i> na težinu kliničke slike i ishod COVID-19: multivarijabilna logistička regresija.....	66
4.4. Analiza polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i>	68
4.4.1. Analiza polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> u celoj populaciji.....	68
4.4.1.1. Učestalost alela, genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova u ispitivanoj populaciji.....	68
4.4.1.2. Analiza vezane neravnoteže polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena	70
4.4.2. Analiza polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> prema težini kliničke slike	71
4.4.2.1. Učestalost alela i njihov uticaj na težinu kliničke slike	71

4.4.2.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na težinu kliničke slike	72
4.4.2.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na težinu kliničke slike	75
4.4.3. Analiza polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> prema prisustvu pneumonije	79
4.4.3.1. Učestalost alela i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije	79
4.4.3.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije	80
4.4.3.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije	82
4.4.3.4. Uticaj polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena na razvoj COVID-19 pneumonije: multivarijabilna logistička regresija	84
4.4.4. Analiza polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> prema prisustvu pneumonije i polu	85
4.4.4.1. Učestalost alela i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije među polovima	85
4.4.4.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije među polovima	86
4.4.4.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije među polovima	89
4.4.4.4. Uticaj polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena na razvoj COVID-19 pneumonije kod žena: multivarijabilna logistička regresija	90
4.4.5. Analiza polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> prema ishodu bolesti	91
4.4.5.1. Učestalost alela i njihov uticaj na ishod bolesti	91
4.4.5.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na ishod bolesti	92
4.4.5.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na ishod bolesti	94
4.4.6. Uticaj polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena na ishod COVID-19: multivarijabilna logistička regresija	95
4.5. Koncentracije IFN – $\lambda 3$ i IFN – $\lambda 4$ u COVID-19 kohorti	97
4.5.1. Koncentracije IFN – $\lambda 3$ u odnosu na polimorfizme <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena	97
4.5.2. Koncentracije IFN – $\lambda 3$ u odnosu na težinu kliničke slike	98
4.5.3. Koncentracije IFN – $\lambda 3$ u odnosu na prisustvo pneumonije	99
4.5.4. Koncentracije IFN – $\lambda 3$ u odnosu na ishod COVID-19	100
4.5.5. Uticaj IFN – $\lambda 3$ na težinu kliničke slike, razvoj pneumonije i ishod COVID-19: multivarijabilna logistička regresija	100
4.6. Uticaj polimorfizama <i>ACE2</i> , <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena, serumskog nivoa sACE2 i IFN – $\lambda 3$ na težinu kliničke slike i ishod obolelih od COVID-19: multivarijabilna logistička regresija	102
5. Diskusija	103
5.1. Povezanost laboratorijskih parametara i kliničkih karakteristika sa težinom i ishodom COVID-19	104
5.2. Učestalost polimorfizama <i>ACE2</i> gena u ispitivanoj populaciji	106
5.3. Ambivalentan uticaj polimorfizma rs2106809 <i>ACE2</i> gena na težinu kliničke slike COVID-19 uz smanjenje rizika od smrtnog ishoda	107
5.4. Niži nivoi sACE2 prate teži oblik i smrtni shod COVID-19	110

5.5. Učestalost polimorfizama <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena u ispitivanoj populaciji.....	112
5.6. Protektivna uloga <i>IFNL4</i> na razvoj COVID-19 pneumonije kod žena.....	113
5.7. Polimorfizmi <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> gena kao mač sa dve oštrice: povezanost sa ishodom COVID-19	115
5.8. Povezanost koncentracije IFN- λ 3 sa težinom i ishodom COVID-19, nezavisno od <i>IFNL3</i> i <i>IFNL4</i> polimorfizama	117
5.9. Metodološki aspekti i ograničenja istraživanja	119
6. Zaključak	121
7. Literatura	124
LISTA SKRAĆENICA	145
PRILOG 1	148
PRILOG 2	163

1. Uvod

Savremeni život koji, između ostalog, definišu globalizacija, češća putovanja na daleke destinacije i život u gušće naseljenim područjima gde ljudi dolaze u bliži kontakt sa životinjama, dramatično povećava potencijal za brzo širenje novih zaraznih bolesti i pojavu globalnih epidemija. Prema procenama Svetske zdravstvene organizacije (SZO), preteće infektivne bolesti predstavljaju ozbiljnu pretnju globalnoj zdravstvenoj bezbednosti današnjice. U svom izveštaju iz 2007. godine, SZO je upozorila da se infektivne bolesti pojavljuju brzinom koja do sada nije viđena. Od 1970-ih, otkriveno je oko 40 novih infektivnih bolesti [1]. Smatra se da preteći infektivni agensi čine najmanje 15% svih humanih patogena prema izveštaju sa 10. Međunarodne konferencije o pretećim infektivnim bolestima [2].

Preteće infektivne bolesti se definišu kao infektivne bolesti koje su se nedavno pojavile u populaciji ili su prethodno bile prisutne, ali se njihova incidenca povećava ili ima tendenciju ka povećanju. Preteće infektivne bolesti mogu izazvati novi infektivni agensi, poznati infektivni agensi sa novim mehanizmom rezistencije na antibiotike, poznati infektivni agensi koji se šire na nova geografska područja ili populacije, ranije poznati agensi čija je uloga u specifičnim bolestima ranije bila neprepoznata, kao i „stari“ infektivni agensi koji su bili kontrolisani i čija je incidenca bolesti bila niska u prošlosti, ali ubrzano raste [3]. Mnogo je faktora koji utiču na pojavu novih zaraznih bolesti ili ponovnu pojavu „starih“ zaraznih bolesti. Neki su rezultat prirodnih procesa, kao što je evolucija patogena tokom vremena, ali mnogi su rezultat ljudskog ponašanja [4]. Faktori koji su doprineli ovim promenama su porast stanovništva, migracija iz ruralnih područja u gradove, međunarodni vazdušni saobraćaj, siromaštvo, ratovi i destruktivne ekološke promene usled ekonomskog razvoja i korišćenja zemljišta. Još jedan od faktora koji može dovesti do ponovne pojave pojedinih bolesti, a predstavlja i krucijalni javno-zdravstveni problem, je pad opsega vakcinacije. Posebno mesto zauzima neracionalna primena antibiotika koja je dovela do pojave mnogih multirezistentnih sojeva bakterija [4].

Krajem prošlog veka uočeno je da su divlje životinje rezervoar niza pretećih patogena koji su se pojavili u humanoj populaciji. Tada je prihvaćena često predlagana hipoteza da većina pretećih patogena potiče iz divljih životinja i „preliva“ se na humane domaćine usled niza ekoloških, demografskih i socio-ekonomskih promena [5]. U nizu radova analizirana je baza podataka svih poznatih slučajeva humanih pretećih patogena i potvrđeno je da su oko 60% svih do sada prepoznatih infektivnih bolesti kod ljudi i čak oko 70% pretećih infektivnih bolesti zapravo zoonoze [6-8]. Daljom analizom ažurirane verzije ove baze podataka utvrđeno je da se učestalost pojave pretećih patogena povećala, pri čemu se udeo onih koji su potekli iz divljih životinja značajno povećao tokom poslednje četiri decenije dvadesetog veka [8]. Slepí miševi su prepoznati kao rezervoari velikog broja zoonotskih virusa, naročito onih koji predstavljaju preteće patogene za ljude sa visokom stopom smrtnosti, kao što su paramiksovirusi Nipah i Hendra, filovirusi, koronavirusi. Razumevanje zašto slepi miševi „ugošćuju“ toliko zoonotskih patogena koji izazivaju smrtonosne bolesti kod ljudi i kako dolazi do „prelivanja“ sa slepih miševa na ljude je važno da bi se kontrolisale ove, i možda još neotkrivene bolesti [5].

Virusi su visoko kotirani na listi patogena sa potencijalom za izazivanje pretećih infektivnih bolesti. Konsenzusa o udelu virusa kao pretećih patogena u literaturi nema. Dok jedni autori procenjuju da oko 44% pretećih infektivnih bolesti kod ljudi izazivaju virusi [6], drugi tvrde da je taj udeo skoro upola niži, odnosno 25%, zbog vrtoglavog porasta multirezistentnih bakterija [8]. Ono u čemu se naučna zajednica slaže je da virusi sa genomskom ribonukleinskom kiselinom (RNK) igraju centralnu ulogu kao novi preteći patogeni, zbog njihove visoke stope supstitucije nukleotida, loše sposobnosti ispravljanja grešaka tokom replikacije i, stoga, većeg kapaciteta za prilagođavanje novim domaćinima, uključujući ljude

[7]. Ovome svedoči veliki broj RNK virusa koji su sa svojih prvobitnih domaćina, životinja, probili barijeru vrste i prilagodili se ljudima u poslednjih četrdeset godina. Pored Ebole, Marburga, Virus humane imunodeficijencije 1 i 2 (engl. *human immunodeficiency virus*; HIV-1 i 2), Nipah, Hendra, Menangle virusa i virusa Zapadnog Nila koji su se pojavili u humanoj populaciji u prošlom veku, tokom prve dve decenije 21. veka čovečanstvo se suočilo sa pandemijom H1N1 gripa i dve epidemije izazvane članovima familije koronavirusa: koronavirusom koji izaziva teški akutni respiratorni sindrom 1 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*; SARS-CoV) i koronavirusom bliskoistočnog respiratornog sindroma (engl. *middle east respiratory syndrome coronavirus*; MERS-CoV). Na pragu treće decenije, još jedan član iz familije koronavirusa paralisao je čitavu planetu [9].

U protekle gotovo tri godine, glavna, a ponekad i jedina, tema koja je zavlada razgovorima na svim jezicima širom sveta svela se u samo jednu reč "COVID-19". Pandemija uzrokovana novim korona virusom nazvanim SARS-CoV-2, promenila je živote ljudi i njihove navike, uvela ograničenja u svakodnevni život, i čitavom čovečanstvu u 21. veku donela neizvesnost i novu dimenziju poimanja stvarnosti i brige o sopstvenom zdravlju. Zahvaljujući savremenim naučnim i tehnološkim dostignućima, koja su našla svoju primenu u medicini, omogućena je brza dijagnostika, kao i zbrinjavanje COVID-19 oboljenja. Pandemija COVID-19 je katalizovala uspešan razvoj većeg broja vakcina, do sada neviđenom brzinom. Uprkos tome, čitav svet se i dalje suočava sa značajnim brojem obolelih i teškom kliničkom slikom ove bolesti. Korona virus je pokazao da nema sezonski karakter, da se veoma lako širi sa jedne na drugu osobu ukoliko se mere prevencije ne primenjuju. U svetu je, u trenutku pisanja ove disertacije, do avgusta 2023. godine, zaraženo 769.806.130, a preminulo oko 6.955.497 ljudi, dok je u Srbiji, zaraženo 2.545.186, a preminulo 18.057 ljudi [10].

Sve je otpočelo decembra 2019. godine u gradu Vuhan, u kineskoj provinciji Hubeji, pojavom slučajeva teške atipične pneumonije. Već 31. decembra 2019. godine SZO je izvestila o klasteru slučajeva pneumonije nepoznate etiologije u Vuhanu kod ljudi koji su bili povezani sa lokalnom pijacom životinja i morskih plodova. Nedugo zatim, kineski naučnici podelili su sa svetskom naučnom zajednicom sekvencu genoma uzročnika ovih pneumonija, do sada nepoznatog virusa koji pripada porodici koronavirusa. Ovaj novi virus je inicijalno nazvan 2019-nCoV (engl. *novel coronavirus*). Na sastanku održanom 30. januara 2020. godine, prema Međunarodnim zdravstvenim propisima, SZO je epidemiju proglasila vanrednim stanjem za javno zdravlje od međunarodnog značaja jer se proširila na 18 zemalja, od kojih su četiri prijavile interhumani prenos. Dana 11. februara 2020. godine Međunarodni komitet za klasifikaciju virusa doneo je odluku po kojoj se 2019-nCoV preimenuje u koronavirus koji izaziva teški akutni respiratorni sindrom 2 - SARS-CoV-2, a SZO je bolest izazvanu ovim virusom imenovala COVID-19. U ovom akronimu „CO“ potiče od reči korona (engl. *corona*), „VI“ od reči virus (engl. *virus*), „D“ od reči bolest (engl. *disease*) i „19“ od godine u kojoj se pojavio. Ekstremno brz porast broja slučajeva COVID-19 i široka geografska distribucija, koji se ogledaju u 118000 slučajeva u 114 zemalja i preko 4000 smrtnih slučajeva do početka marta 2020. godine, podstakla je SZO da proglasi globalnu zdravstvenu vanrednu situaciju. Konačno, 11. marta 2020. godine je zvanično proglasio COVID-19 pandemijom [11].

1.1. SARS-CoV-2 virus

1.1.1. Klasifikacija i poreklo virusa

SARS-CoV-2 je novootkriveni član porodice koronavirusa (*Coronaviridae*). Kao i ostale viruse ove porodice, karakteriše ga pozitivna, nesegmentirana, jednolančana ribonukleinska kiselina koja čini deo tubularnog nukleokapsida spiralne simetrije, unutar omotača poreklom od membrane endoplazmatskog retikulama. Naziv „koronavirus“ potiče od latinske reči „*corona*“ što znači „kruna“ ili „oreol“, a odnosi se na jedinstven izgled viriona pod elektronskim mikroskopom: sa površine omotača „štrče“ glikoproteini u vidu šiljka koji podsećaju na krunu ili solarnu koronu [12].

Koronavirusi pripadaju redu *Nidovirales*, a dele se na dve potporodice, od kojih je *Orthocoronavirinae* od značaja i broji četiri roda:

1. *Alphacoronavirus* (alphaCoV),
2. *Betacoronavirus* (betaCoV),
3. *Deltacoronavirus* (deltaCoV) i
4. *Gammacoronavirus* (gammaCoV).

Grubom podelom, alphaCoV i betaCoV primarno inficiraju sisare, dok se deltaCoV i gammaCoV prevashodno susreću kod ptica [12]. Koronavirusi su postali glavni uzročnici pretećih respiratornih bolesti. Članovi ove velike porodice virusa mogu izazvati respiratorne, enterične, hepatične i neurološke bolesti kod različitih životinjskih vrsta, uključujući kamile, mačke i slepe miševе. Iz, do sada, nedovoljno poznatih razloga, ovi virusi imaju sposobnost da pređu barijere vrste i izazovu kod ljudi bolesti koje se kreću od obične prehlade do težih bolesti, kao što su teški respiratorni sindromi MERS (engl. *middle east respiratory syndrome*) i SARS (engl. *severe acute respiratory syndrome*). Do danas, identifikovano je sedam koronavirusa sposobnih da inficiraju čoveka (engl. *human coronaviruses*; HCoV). Oni pripadaju rodovima alphaCoV (HCoV-229E i HCoVNL63) i betaCoV (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV-1, MERS-CoV i SARS-CoV-2). Većina ovih virusa kod imunokompetentnih osoba izaziva prehlade, za razliku od SARS-CoV-1, MERS-CoV i SARS-CoV-2 koji daju respiratorne i ekstra-respiratorne manifestacije različite težine [12],

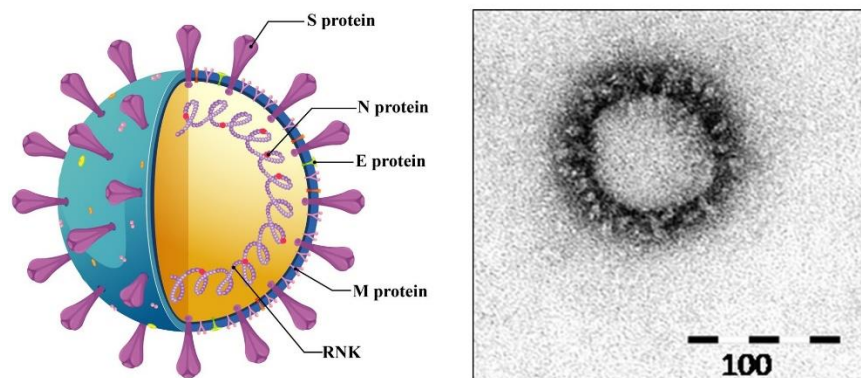
Filogenetičkom analizom ustanovljeno je da novi član ove porodice, SARS-CoV-2, pripada betaCoV rodu, podrod *Sarbecovirus*, zajedno sa SARS-CoV-1 i virusima srodnim SARS-u pronađenim kod slepih miševa [13]. Iako poreklo SARS-CoV-2 trenutno nije poznato, gotovo je sigurno da je animalnog porekla, kao i njemu srodni virusi. Sekvenciranjem genoma otkriveno je da SARS-CoV-2 i SARS-CoV-1 dele 79% homologije u nukleotidnoj sekvenci [14]. SARS-CoV-2 deli visok stepen homologije genoma sa koronavirusima izolovanim iz slepih miševa u Kini. Preciznije, reč je o 96,2% homologije sa RaTG13 koronavirusom izolovanog iz slepih miševa vrste *Rhinolophus affinis* i 93,3% poklapanja sa genomom RmYN02 koronavirusa identifikovanog kod slepih miševa iz vrste *Rhinolophus malayanus* [14]. Pored pomenutih virusa, otkriveni su i drugi koronavirusi slepih miševa srodni SARS-CoV-2, što ide u prilog hipotezi da su slepi miševi rezervoar SARS-CoV-2. Međutim, pokazalo se da homologija sekvenci SARS-CoV-2 i RaTG13 virusa u regionu koji kodira segment S proteina za vezivanje za receptor na humanim ćelijama (engl. *receptor binding domain*; RBD) nije visoka koliko se očekivalo. RaTG13 ima samo jednu od ključnih aminokiselina (rezidua 442) sa SARS-CoV-2 u RBD segmentu, tj. dele 89,2% homologije [15]. S druge strane, mnogo veća sličnost, čak 97,4%, pronađena je u RBD segmentu virusa koji inficira malajske pangoline *Manis javanica*, sisare iz grupe Ijuskavaca. Naime, ovaj virus poseduje identične aminokiseline u pet najvažnijih rezidua u RBD segmentu kao i SARS-CoV-2 virus. Zanimljivo je to da je ukupna sličnost genomske sekvence ova dva virusa (92,4%) niža od one uočene kod

koronavirusa iz slepih miševa [15]. Za razliku od slepih miševa, pangolini razvijaju kliničke znake infekcije i histopatološke promene. Takođe, kod zaraženih pangolina mogu se detektovati antitela koja unakrsno reaguju sa S proteinom SARS-CoV-2 virusa [16]. Na osnovu navedenih činjenica pretpostavlja se da su koronavirusi izloveni iz slepih miševa potencijalni evolutivni preci virusa, ali ne i direktni predak, jer iako se stepen sličnosti od 96-97% čini visokim, zahteva nekoliko decenija evolucije. Pangolinima je, pak, dodeljena uloga potencijalnog prelaznog domaćina. Svakako, dokaza o poslednjem koraku prelaska virusa sa pangolina na ljude nema. Poslednji objavljen izveštaj SZO koji opisuje moguće poreklo SARS-CoV-2 nije jasno precizirao poreklo virusa i njegovu transmisiju na humanu populaciju [17].

1.1.2. Građa virusne partikule

Strukturu SARS-CoV-2 virusne čestice čine četiri glavna strukturna proteina (slika 1):

1. površinski glikoprotein S koji nalikuje na šiljak (engl. *spike*; S),
2. membranski glikoprotein M (engl. *membrane*; M),
3. protein omotača E (engl. *envelope*; E) i
4. nukleokapsidni protein N (engl. *nucleocapsid*; N).



Slika 1. Struktura SARS-CoV-2 virusne čestice. Shematski prikaz strukture (levo) i elektronska mikrografija (desno)

S glikoprotein je najveći od četiri strukturna proteina SARS-CoV-2 virusa sa 1284 aminokiselina. Lokalizovan je na površini viriona i prominira iz fosfolipidnog omotača za koji je pričvršćen transmembranskim domenom. Prisutan je u formi homotrimeru, tj. tri kopije glikoproteina se međusobno povezuju i daju piramidalni oblik koji na elektronskim mikrografijama liče na šiljke. Površina homotrimeru je gusto glikozilovana N-glikanima koji imaju ulogu u zaštiti virusa od pokretanja imunskog odgovora. S glikoprotein igra glavnu ulogu u prvim fazama replikacionog ciklusa. Naime, ponaša se kao ligand kojim se virioni vezuju za receptor na površini ćelija domaćina, u ovom slučaju angiotenzin-konvertujući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme*; ACE2), a zatim indukuje ulazak virusa unutar ćelije [18].

M protein je najzastupljeniji strukturni protein SARS-CoV-2 virusa. On definiše oblik virusnog omotača i igra centralnu ulogu u sklapanju viriona, pošto većina proteina stupa u interakciju sa njim. Interakcija S i M proteina je neophodna za zadržavanje S u intermedijarnom odeljku endoplazmatskog retikuluma i Goldžijevog aparata i njegovu inkorporaciju u nove virione. Vezivanje M i N proteina stabilizuje nukleokapsid i unutrašnje jezgro viriona. M i E proteini koji čine omotač virusa i njihova interakcija je dovoljna za produkciju i sklapanje partikula sličnih virusu [12, 19].

E protein je najmanji među strukturnim proteinima SARS-CoV-2 virusa (75 aminokiselina) i ugrađen je u omotač virusa. Ipak, on igra više uloga u replikacionom ciklusu. Ovaj protein modifikuje membranu ćelije domaćina stvarajući pore kroz koje virion može da napusti inficiranu ćeliju. Odsustvo E proteina dovodi do formiranja nekompletnih i nezrelih virusnih čestica, uz posledično značajno smanjenje virusnog opterećenja, što ističe značaj E proteina u sklapanju i sazrevanju viriona [12, 19].

N protein (419 aminokiselina) odgovoran je za pakovanje virusnog genoma u ribonukleokapsid. Učestvuje u modifikaciji ćelijskih procesa i replikaciji virusa, kao i sklapanju i potpunom formiranju viriona. N protein obavlja RNK genom, te tako formira spiralnu, tubularnu strukturu. Ovaj spiralni nukleokapsid je okružen virusnim E proteinom, koji je povezan sa drugim strukturnim proteinima, kao što su M i S proteini [12, 19].

1.1.3. Struktura i funkcija S glikoproteina

Ovaj protein pripada klasi I fuzijskih proteina i izgrađen je od dve velike subjedinice S1 i S2. Subjedinicu S1 sačinjavaju N-terminalni domen (engl. *N-terminal domain*; NTD), C-terminalni domen -1 i -2 (engl. *C-terminal domain-1;-2*; CTD1 i -2) i domen koji se vezuje za receptor (RBD) koji igra esencijalnu ulogu u vezivanju virusa za ACE2 na ćelijama domaćina. Druga subjedinica S2, odgovorna za proces fuzije tokom penetracije virusa u ćeliju, takođe sadrži nekoliko komponenti: fuzioni peptid (engl. *fusion peptide*; FP), heptapeptidne ponavljajuće domene -1 i -2 (engl. *heptad repeat -1;-2*; HR-1 i -2), region centralnog heliksa (engl. *central helix*; CH), transmembranski domen (engl. *transmembrane domain*; TM) i citoplazmatski rep (engl. *cytoplasmic tail*; CT) [18].

Unutar RBD nalazi se region nazvan motiv vezivanja receptora (engl. *receptor-binding motif*; RBM), koji predstavlja visoko varijabilnu strukturu S glikoproteina na nivou koje se uspostavlja interakcija sa receptorom. Blago konkavna površina RBM stupa u interakciju sa N-terminalnim helixom peptidaznog domena ACE2. Ova interakcija podrazumeva formiranje vodoničnih veza, jonskih i hidrofobnih interakcija između 17 rezidua na nivou RBM i 20 rezidua sa ACE2 [20]. Pored glavne uloge u vezivanju za receptor, RBD je dominantna meta, kako celularnog, tako i humoralnog imunskog odgovora. Neutrališuća antitela na više različitih epitopa RBD, nastala kao posledica infekcije ili vakcinacije, imaju visok neutrališući kapacitet u *in vitro* testovima neutralizacije kako na nanomolarnom, tako i pikomolarnom nivou [21].

S glikoprotein u nativnoj formi figurira kao neaktivni prekursor S1 i S2 subjedinice, te je za njegovo aktiviranje neophodna proteolitička obrada. Za razliku od drugih poznatih korona virusa, S glikoprotein SARS-CoV-2 virusa na spoju S1 i S2 subjedinice nosi polibaznu inserciju sačinjenu od četiri aminokiseline 682-Arg-Arg-Ala-Arg-685, poznatiju kao RRAR, koju razlaže furin ili proteaze slične furinu, što je i dokazano u više studija s početka pandemije [22, 23]. Uzimajući u obzir da je furin ubikvitarna proteaza, prisutan intracelularno u trans-Golgi mreži, ekstracelularno na ćelijskoj membrani ili sekretovan u ekstracelularnom matriksu, S glikoprotein se može obraditi na nekoj od ovih lokacija i na taj način postati aktiviran pre ili posle sastavljanja virusnih čestica [24]. Najčešće se proteolitička obrada dešava unutar zaražene ćelije, tokom morfogeneze virusa. Naime, u *in vitro* eksperimentima na Calu3 ćelijama zaraženim SARS-CoV-2 virusom dokazano je da ćelije oslobađaju oko 87,3% zrelih viriona sa obrađenim S1/S2 mostom [25]. Stoga, većina zrelih virona nosi nekovalentno vezane S1 i S2 subjedinice S glikoproteina u prefuzijskom stanju.

Vezivanjem za ACE2 receptor na ćelijama domaćina, S glikoprotein podleže velikom rearanžmanu strukture kao bi proces fuzije postao moguć. Shodno tome, uređenje strukture S proteina podrazumeva dva stanja: prefuzijsko i postfuzijsko. U prefuzijskom stanju, S1

fragment zauzima oblik latiničnog slova „V“, sa NTD na jednom kraku i RBD, CTD1 i CTD2 na drugom kraku, koji se pakuju umotavanjem po sve tri ose, skrivajući S2 subjedinicu. Većina polipeptidnih lanaca S2 subjedinice je gusto obmotana oko centralne navojnice koju čine tri CH regiona [26]. U prefuzijskom stanju, RBD može zauzeti dve konformacije: zatvorenu, kada se RBD nalazi u spušenom položaju, zaklonjen susednim protomerama, što onemogućava vezivanje za ACE2, i otvorenu, uz RBD u podignutom položaju, koja pogoduje vezivanju glikoproteina S za receptor na membrani domaćina [26]. Tri RBD strukture unutar trimernog S glikoproteina nisu sinhronizovane, tj. ne interreaguju sve tri istovremeno sa receptorom. Benton i saradnici ustanovili su da vezivanje RBD u otvorenoj konformaciji za ACE2 može podstaći konformacionu tranziciju drugih zatvorenih RBD kako bi bili dostupni. Prema tome, trimerni S glikoprotein se može vezati za jedan do tri ACE2, u zavisnosti od konformacije svakog pojedinačnog RBD-a [27].

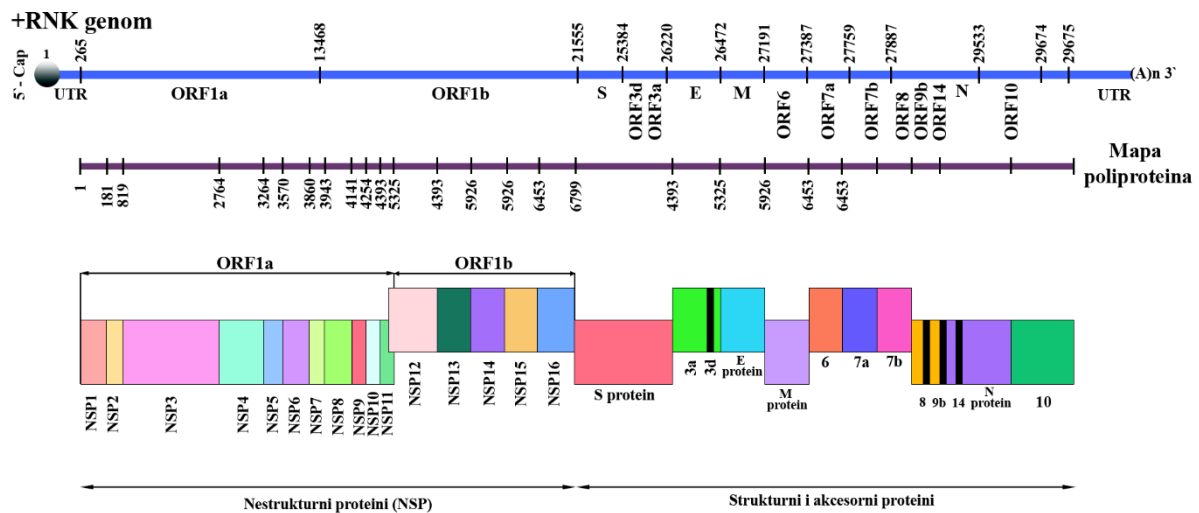
Prelazak u postfuzijsko stanje inicira se disocijacijom nekovalentno vezane S1 subjedinice koju prate ireverzibilne konformacijske promene, neophodne za fuziju membrana. Za to je potreban još jedan korak proteolize na poziciji S2' na S2 subjedinici. Za cepanje S2' mesta u najvećoj meri zaduženi su enzimi transmembranska serinska proteaza 2 (engl. *transmembrane protease serine 2*; TMPRSS2) na površini ćelije ili katepsin L (engl. *Cathepsin L*; CTSL) u endolizozomu nakon endocitoze [18]. Na ovaj način se S2 subjedinica izdužuje prema membrani ćelije domaćina i oslobađa se hidrofobni FP domen, koji se potom insertuje u ćelijsku membranu. HR1 i HR2 stupaju u interakciju formirajući šest spiralnih snopova koji približavaju membranu virusa i ćelije domaćina, što rezultuje fuzijom membrana i ulaskom virusa u ćeliju [18].

1.1.4. Struktura genoma

Kao što je prethodno pomenuto, genom SARS-CoV-2 virusa je u formi jednolančane, linearne, pozitivne RNK (+RNK). Zahvaljujući dužini RNK lanca, ubraja se u najveće RNK viruse sa sekvencom koja sadrži oko 30000 nukleotida, a kodira 9860 aminokiselina. Genom je na 5' kraju dekorisan kapom od metilovanog guanozina, a na 3' kraju nosi poliadenilatni rep, što mu daje strukturu i funkciju zrele informacione RNK (iRNK) [28].

Genom virusa je organizovan u 16 otvorenih okvira čitanja (engl. *open reading frames*; ORFs) oivičenih netrancelacionim regionima (engl. *untranslated region*; UTR) na 5' i 3' krajevima (slika 2). Počevši od 5' kraja, dve trećine genoma zauzimaju ORF1a i ORF1b koji kodiraju 16 nestrukturnih proteina (engl. *non-structural protein*; nsp), nsp1-11 i nsp12-16. Na prelazu između ORF1a i ORF1b nalazi se karakteristična sekundarna struktura, pseudočvor [29]. Ova struktura sastoji se od bar dve petlje pri čemu polovina jedne petlje interkalira između polovine druge petlje. Uplitanje RNK na ovaj način dovodi do delimičnog prostornog preklapanja ORF1a i ORF1b, što ima za posledicu programirano pomeranje okvira čitanja ribozoma (engl. *programmed ribosomal frameshift*; PRF). Dok se neki ribozomi zaustavljaju nakon translacije poliproteina samo sa ORF1a regiona (nsp1-11), pseudočvor uzrokuje da deo ribozoma „sklizne“ unazad za jedan nukleotid, zaobiđe stop kodon i sintetiše poliprotein iz celog ORF1ab regiona (nsp 1-10, 12-16). Efikasnost pomeranja okvira čitanja varira od 45% do 70%, što dovodi do približno dva puta veće ekspresije proteina kodiranih u ORF1a regionu u odnosu na proteine iz ORF1b regiona [29]. Ovakva strukturna manipulacija omogućava sintezu jednog od ključnih nestrukturnih proteina nsp12, odnosno RNK-zavisne RNK polimeraze (engl. *RNK-zavisna RNK polimeraza*; RdRp) [29]. Studije na koronavirusima pokazale su da je optimalna stopa pomeranja okvira čitanja ribozoma kritična tačka, te da male razlike u procentu pomeranja dovode do dramatičnih razlika u sintezi genomske RNK i infektivnosti. Stoga su strukture koje omogućavaju pomeranje okvira čitanja isplivale kao meta

za male molekule koji mogu uticati na brzinu „klizanja“ ribozoma u SARS-CoV-2 infekciji [30, 31].



Slika 2. Shematski prikaz organizacije genoma SARS-CoV-2 virusa.

Pored RdRp polimeraze, funkcije nestrukturalnih proteina u replikaciji i transkripciji virusa su uglavnom precizno definisane, a raspodela uloga je sledeća: nsp1 sprečava degradaciju virusne RNK u ćeliji domaćina vezujući se za 18S ribozomalne RNK blizu mesta ulaska iRNK u kanal 40S subjedinice ribozoma; nsp2 interferira sa signalnim putevima ćelije domaćina; nsp3 i nsp5 su proteaze koje učestvuju u postranslacionoj obradi poliproteina; nsp4 i nsp6 formiraju vezikule na endoplazmatskom retikulumu u kojima se odvija replikacija; nsp7 i nsp8 su pomoćni faktori RdRp; nsp9 je protein koji se vezuje za RNK; nsp10 je kofaktor nsp14 i nsp16; nsp11 je protein sa nepoznatom funkcijom; nsp13 je helikaza; nsp14 je 3'–5' egzoribonukleaza i guanozin-N7-metiltransferaza za formiranje RNK kape; nsp15 je uridin-specifična endoribonukleaza i antagonista interferona; nsp16 je 2'-O-metiltransferaza za formiranje kape genomske RNK [32].

Preostala jedna trećina genoma na 3' kraju nosi informacije za transkripciju strukturalnih proteina (S, M, E i N) [28]. Između ORF-ova koji determinišu strukturalne proteine smešten je set manjih ORF-ova (ORF 3a/b, ORF6, ORF7a/b, ORF8, ORF9b/c i ORF10) koji kodiraju akcesorne proteine. Funkcija ovih proteina još uvek nije u potpunosti rasvetljena. Nekolicina je temeljno ispitana, pa se, na primer, zna da ORF6 blokira pokretanje apoptoze, kao i da je antagonista interferona. Stoga, pretpostavlja se da i ostali pomoćni proteini imaju jedinstvene uloge u odbrani od mehanizama urođene imunosti pokrenute na početku infekcije [28].

1.1.5. Replikacioni ciklus virusa

Kako bi inficirali ćeliju, koronavirusi koriste receptore na površini ćelija domaćina, čiji obrasci ekspresije determinišu tropizam virusa. Isporuca u ćeliju i translacija velikog RNK genoma pokreće ciklus citoplazmatske replikacije koji integriše izuzetan niz strategija za fino podešavanje ekspresije virusnih gena i na translacionom i na transkripcionom nivou. Uzastopni koraci koji na kraju dovode do oslobađanja virusnih kopija su koordinisani vremenski i prostorno i u velikoj meri se oslanjaju na infrastrukturu i metabolizam ćelije domaćina.

Tokom prve faze replikacionog ciklusa - adsorpcije virusa za ćelije domaćina, S glikoprotein, u ulozi liganda, stupa u interakciju sa ACE2 proteinom na ćelijama domaćina, kao receptorom. Približavanjem viriona ciljnim ćelijama S glikoprotein prelazi u otvorenu

konformaciju, u kojoj se najmanje jedan od tri RBD segmenta S1 subjedinice nalazi u uspravnom položaju. RBM delovi RBD segmenta stupaju u nekovalentnu interakciju sa peptidaznim domenom ACE2 receptora [12].

Po ostvarivanju veze sa ACE2 receptorom, nastupa faza penetracije. Kako bi se realizovao ovaj proces neophodna su dva proteolitička cepanja S proteina: na nivou S1/S2 mosta, koji preseca furin pre izlaska virusa iz zaražene ćelije, i na S2` poziciji posredstvom TMPRSS2 ili CTSL proteaza. Virus može ući u ćelije domaćina na dva načina: ili fuzijom fosfolipidnog omotača virusa sa ćelijskom membranom domaćina ili procesom endocitoze. Način kojim će virus ući u ćeliju domaćina zapravo određuje ćelijska distribucija TMPRSS2 [33]. Ukoliko ciljane ćelije ekspimiraju TMPRSS2, proteolitička obrada S glikoproteina se završava na ćelijskoj membrani, a virus za vrlo kratko vreme prodire unutar ćelije putem fuzije omotača virusa sa membranom ćelije domaćina. U scenariju kada ciljna ćelija nedovoljno ili uopšte ne ekspimiraju TMPRSS2, vezivanjem virusa za ACE2 pokreće se proces endocitoze posredovan klatrinom. Neposredno po pripajanju virusa za receptor, na ćelijskoj membrani se pojavljuje invaginacija, za čiju je citoplazmatsku stranu vezan klatrin. Postepenim konformacionim promenama, klatrin od invaginacije pravi vezikulu koja se odvaja od membrane, tj. rani endozom. U citosolu se rani endozom sa internalizovanim SARS-CoV-2 virusom spaja sa lizozomom, formirajući kasni endozom. U ovakvoj sredini niske pH vrednosti CTSL seče S2 subjedinicu na S2` mestu, što oslobađa fuzioni peptid i vodi fuziji virusnog omotača i endozomalne vezikule [33]. Nedavno objavljena studija ustanovila je da pored ekspresije TMPRSS2 na put ulaska virusa u ćeliju, utiče i pH vrednost sredine. Naime, proces fuzije je favorizovan u uslovima kiselije sredine sa pH vrednošću oko 6,8 u prisustvu TMPRSS2, poput nazalne sluznice, dok se proces endocitoze odvija na pH > 6,8 bez obzira na ekspresiju TMPRSS2 [34]. Ishod bilo kog od puteva penetracije je isti - ribonukleokapsid se oslobađa u citoplazmu ćelije domaćina.

Dekapsidacijom u citoplazmi oslobađa se +RNK koja ujedno ima ulogu funkcionalne iRNK. Neposredno potom, otpočinje proces translacije nestrukturanih proteina, takozvanih ranih proteina. Na ribozomima hrapavog endoplazmatskog retikuluma prevode se ORF1a i ORF1b, a kao produkti nastaju poliprotein 1a (engl. *polyprotein 1a*; pp1a) i poliprotein 1ab (engl. *polyprotein 1ab*; pp1ab). Ova dva poliproteina se dalje autokatalitičkom razgradnjom, pomoću proteaza nsp3 i nsp5, cepaju na 16 nsp, koji zajedno moduliraju ili direktno sprovode proces replikacije [12].

U sledećem koraku, formiraju se specijalizovane vezikule u kojima se odigrava replikacija i transkripcija RNK. Vezikule nastaju preuređenjem membrane hrapavog endoplazmatskog retikuluma posredstvom prethodno sintetisanih proteina. Naime, proteini nsp4 i nsp6 se ugrađuju u njegovu membranu hidrofobnim domenima i nedovoljno jasnim mehanizmom formiraju vezikule sa dvostrukom membranom (engl. *double membrane vesicles*; DMVs). DMVs obezbeđuju fizičko odvajanje RNK od senzora u citoplazmi kako bi se izbegao urođeni imunitet domaćina. Unutar DMVs sklapa se replikaciono-transkripcioni kompleks (engl. *replication-transcription complex*; RTC), struktura sastavljena od enzima koji omogućavaju sintezu genomskih RNK i subgenomskih RNK. Sačinjen je od proteina nsp12-16, od kojih polimeraza RdRp (nsp12), kao nosilac ključne uloge u sintezi RNK, sa tri pomoćne jedinice: jednog nsp7 i dve kopije nsp8, formira jezgro RTC kompleksa. RTC kompleks je uključen u dva procesa - replikacija genoma i diskontinuirana transkripcija seta subgenomskih RNK. U prvom procesu, vezivanjem RTC kompleksa za 3` kraj +RNK otpočinje sinteza komplementarnog -RNK lanca pune dužine koji se, zatim, koristi kao matrica za sintezu +RNK genoma novih virusnih čestica. U drugom procesu, tokom sinteze negativnog lanca, RdRp pravi prekide čije je mesto determinisano prisustvom sekvenci za regulaciju transkripcije (engl. *transcription regulatory sequence*; TRS). TRS su lokalizovane na 5` kraju +RNK i između

sekvenci koje kodiraju strukturne i akcesorne proteine. Kao rezultat diskontinuirane transkripcije, nagrađuje se 6-9 lanaca -RNK različite dužine, tj. subgenomskih -RNK, komplementarnih sekvencama koje kodiraju strukturne i akcesorne proteine. Ove subgenomske -RNK dalje služe kao šablon za transkripciju subgenomskih +RNK [12, 28].

Funkcionalno gledano, novosintetisane subgenomske +RNK su iRNK koje nose informacije za sintezu kasnih proteina - strukturnih proteina S, M, E i N, i akcesornih proteina. Proces translacije S, M i E proteina odigrava se na ribozomima hrapavog endoplazmatskog retikuluma i oni ostaju insertovani na površini njegove membrane. Drugi virusni proteini, uključujući N protein, sintetišu se na ribozomima u citoplazmi ćelije domaćina [12].

Sklapanje SARS-CoV-2 virona konvergira u intermedijernom kompartmanu endoplazmatskog retikuluma i Goldžijevog aparata (engl. *endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment*; ERGIC), koji je strukturni, ali i funkcionalni deo endoplazmatskog retikuluma. Proteini iz endoplazmatskog retikuluma sekretornim putevima dospevaju do membrane ERGIC odeljaka. M protein usmerava gotovo sve protein-protein interakcije potrebne za sklapanje koronavirusa. M protein, zajedno sa E proteinom, pomaže u formiranju čestica sličnih virusu. Ova dva proteina funkcionišu zajedno u stvaranju omotača koronavirusa. U međuvremenu, N protein u citoplazmi oblaže genomsku RNK i formira spiralni ribonukleokapsid. Interakcijom M i N proteina stabilizuje se unutrašnje jezgro i formira virusna čestica. Finalni korak u sklapanju virona je stabilizacija i N-glikozilacija trimernog S proteina [12].

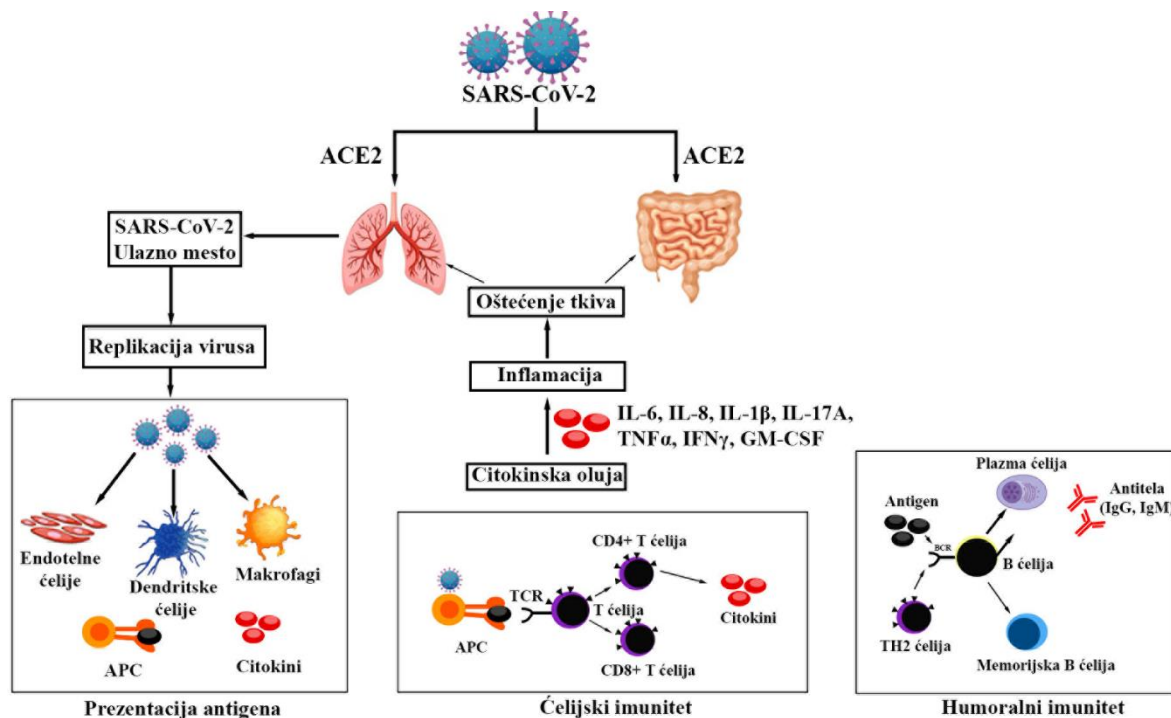
Novoformirani virioni dospevaju do Goldžijevog aparata i trans Goldži mreže sekretornim putevima, gde se S glikoprotein furinskom proteolizom deli sa S1 i S2 subjedinicu. U poslednjem koraku replikacionog ciklusa, zreli virioni se transportuju vezikulama do ćelijske membrane i oslobađaju se iz ćelije procesom egzocitoze [12].

1.2. COVID-19

1.2.1. Imunopatogeneza COVID-19

Transmisija SARS-CoV-2 virusa odvija se direktnim kontaktom, putem aerosola ili, značajno ređe, feko-oralnim putem [35]. Stoga, ulazna vrata SARS-CoV-2 virusa predstavljaju nazalne i nazofaringealne epitelne ćelije gornjih partija respiratornog trakta, ali i epitel creva. Posledično, primarna replikacija virusa se odigrava u ovim epitelnim ćelijama po ulasku virusa posredstvom ACE2 receptora. Imunski sistem domaćina se aktivira kada bilo koji patogen, u ovom slučaju virus, uđe u ćelije (slika 3). Rani i efikasni, antigen nespecifični urođeni imunski odgovor igra ključnu ulogu u početnom ograničavanju replikacije virusa, kao i u eliminaciji virusa u gornjim partijama respiratornog trakta [36-38]. Prisustvo virusa detektuju kako zaražene epitelne ćelije, tako i ćelije urođene imunosti koji prepoznaju molekulske obrasce patogena (engl. *pathogen-associated molecular pattern*; PAMP) preko sistema receptora za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptor*; PRR). Naime, u zaraženim ćelijama dvolančani intermedijeri RNK, nastali u procesu replikacije, se prepoznaju senzorima u citoplazmi kao što su gen I indukovani retinoičnom kiselinom (engl. *retinoic acid-inducible gene 1*; RIG-I) i protein 5 asociiran sa diferencijacijom melanoma (engl. *melanoma differentiation-associated protein 5*; MDA5), a u imunskim ćelijama, prevashodno dendritskim ćelijama i makrofazima, virusna RNK se detektuje u endozomu putem receptora sličnih Tolu (engl. *Toll-like receptor*; TLR) TLR3, TLR7 i TLR8. Nakon angažovanja ovih PRR, nishodnom signalnom trasdukcijom u ovim ćelijama aktivira se transkripcija glavnih antivirusnih medijatora, interferona (engl. *interferon*; IFN) tip I i tip III. Pored interferona,

aktivirani makrofazi i dendritske ćelije proizvode citokine - interleukine (engl. *interleukin*; IL) IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 i faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*; TNF- α), čime promovišu lokalni i sistemski inflamatorni odgovor [36-38]. Zaražene ćelije, eksprimirajući virusne antigene u sklopu sopstvenih molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*; MHC) I klase, laka su meta za ćelije-ubice (engl. *natural killer*; NK), koje ih na taj način prepoznaju i ubijaju. Štaviše, NK ćelije odgovaraju na IL-12, proizveden u aktiviranim makrofazima, i luče IFN- γ koji zauzvrat dodatno aktivira efektorske mehanizme makrofaga. Citopatogeni efekti virusa i mehanizmi urođene imunosti indukuju smrt inficiranih ćelija iz kojih se oslobađaju molekularni obrasci oštećenja (engl. *damage-associated molecular patterns*; DAMP). Nagomilavanje DAMP molekula dodatno stimuliše produkciju proinflamatornih citokina i hemokina u makrofazima i dendritskim ćelijama [37, 38]. Ćelije urođenog imuniteta pobuđuju mehanizme adaptivnog imunskog odgovora u lokalnom limfoidnom tkivu nekoliko dana nakon infekcije. Naime, profesionalne antigen-prezentujuće ćelije, prvenstveno dendritske ćelije, prezentuju virusne antigene u sklopu MHC molekula I i II klase naivnim T limfocitima. Na ovaj način se T limfociti aktiviraju i diferenciraju u efektorske ćelije: citotoksične T CD8⁺ limfocite (engl. *cytotoxic T lymphocytes*; CTL) koji direktno ubijaju inficirane ćelije; i pomoćničke T CD4⁺ limfocite (engl. *T helper*; Th) koje kroz produkciju IFN- γ stimulišu fagocite, NK ćelije i CTL, ali i aktiviraju B limfocite, promovišu promenu klase i sazrevanje afiniteta antitela [38]. Pravovremena i brza koordinacija urođene i adaptivne imunosti u gornjim partijama respiratornog trakta vodi do eliminacije uzročnika uz blage kliničke simptome.



Slika 3. Shematski prikaz imunopatogeneze COVID-19.

U alternativnom scenariju, kada SARS-CoV-2 virus opstaje na ulaznim vratima zbog spore aktivacije odbrambenih mehanizama, kao i sposobnosti virusa da raznolikim strategijama prevaziđe rane antivirusne mehanizme, virus se diseminuje distalno, u niže partije respiratornog trakta. U plućnom parenhimu, virus inficira alveolarne epitelne ćelije, primarno pneumocite tip II, i dovodi do njihove smrti apoptozom i piroptozom. Smrt alveolarnih epitelnih ćelija dalje uzrokuje oslobađanje DAMP molekula i aktivaciju alveolarnih makrofaga. Sinergistički,

pneumociti tip II i alveolarni makrofazi produkuju čitav spektar medijatora: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- λ , IFN- β , CXCL-10, MCP-1 i MIP-1 α koji privlače neutrofile, monocite, CD4+ i CD8+ T limfocite [39]. Pod dejstvom IL-1 β i TNF- α i infekcije SARS-CoV-2 virusom endotelne ćelije krvnih sudova se aktiviraju, a vaskularno korito pluća postaje veoma propustljivo. Pride, aktivirane endotelne ćelije, sa eksprimiranim selektinima, podstiču regrutaciju neutrofila iz cirkulacije i njihovu ekstravazaciju u plućni parenhim [40]. Uticaju proinflatarnog miljea podležu i trombociti koji se u plućnoj cirkulaciji aktiviraju, te i sami postaju izvor medijatora inflamacije. Pored toga, trombociti sa neutrofilima formiraju komplekse, podstiču formiranje ekstracelularnih klopki neutrofila (engl. *neutrophil extracellular traps*; NET), što sinergistički dovodi do povećane sekvestracije trombocita i neutrofila u malim krvnim sudovima pluća [40]. Prevažodno dejstvom imunskog odgovora, ali i manjim udelom citopatogenog efekta SARS-CoV-2 virusa, dolazi do odumiranja pneumocita tipa II, smanjene produkcije surfaktanta i kompromitovanja razmene gasova na nivou alveolarno-kapilarne membrane [41]. U 5% inficiranih pacijenata, respiratorna disfunkcija progredira do akutnog respiratornog distress sindroma (engl. *acute respiratory distress syndrome*; ARDS) [42]. Naime, u uslovima prolongirane imunske aktivacije bez inhibitorne povratne sprege, imunski odgovor ulazi u začarani krug oštećenja tkiva imunskim mehanizmima, konstantnog oslobađanja DAMP molekula koji stimulišu sintezu velikog broja različitih citokina, uključujući IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IL-2, IL-7, IL-10, GM-CSF, TGF- β , i hemokina CCL2, CXCL9, CXCL10, MCP-1 i MIP-1 α , i njihovo oslobađanje u sistemsku cirkulaciju [39]. Ova ekscesivna produkcija citokina predstavlja hiperinflamatorno stanje, poznatije kao citokinska oluja. Pomenuti citokinski milje dalje mobilise neutrofile, monocite, CD4+ i CD8+ T limfocita koji migriraju u plućni parenhim, čime se produbljuje njegovo oštećenje. Dodatno, povećava se propustljivost krvnih sudova pluća, što za rezultat ima pojavu edema. Iscrpljivanje fibrinolitičkog sistema uzrokuje nagomilavanje fibrina u krvnim sudovima pluća, zatim, ekstravazaciju fibrina u lumen alveola sa posledičnim formiranjem hijalinih membrana koje predstavljaju jednu od glavnih odlika ARDS-a [41]. Paralelno sa sistemskom hiperinflamacijom, pogoršava se disfunkcija endotela krvnih sudova koja uvodi u hiperaktivaciju koagulacione kaskade. Ovaj događaj u kombinaciji sa aktiviranim neutrofilima i trombocitima, i oslobođenim NET-ovima predisponira formiranje mikrotrombova na nivou pluća. Međutim, disfunkcija endotela i tromboza u teškom COVID-19 nije ograničena samo na plućnu vaskulaturu. Prokoagulantno stanje uzrokuje diseminovanu intravaskularnu koagulaciju koja pogađa sve sisteme organa i, u krajnjoj liniji, dovodi do disfunkcije multiplih organa (engl. *multiple organ dysfunction*; MODS) [40].

Imunopatološki događaji u teškom COVID-19 rezultat su disfunkcije imunskog odgovora na više nivoa. SARS-CoV-2 je vešt u izbegavanju prepoznavanja na nivou urođenog imunskog odgovora i supresiji indukcije interferona tip I i tip III, kroz ekspresiju brojnih virusnih proteina koji blokiraju ove puteve [43]. Shodno tome, niži nivoi interferona tip I i tip III se detektuju u plućima ili perifernoj krvi osoba zaraženih SARS-CoV-2 u poređenju sa drugim respiratornim virusima [44]. S druge strane, produženo lučenje IFN korelira sa lošijim ishodima bolesti [45]. COVID-19 je praćen značajnim padom broja imunskih ćelija, poput NK ćelija [46]. Pored toga, kod COVID-19 pacijenata sa teškom plućnom inflamacijom NKG2 marker na NK ćelijama i citotoksičnim T limfocitima je značajno povećan i korelira sa funkcionalnim oštećenjem, što ukazuje na progresiju bolesti [47]. Povećan broj neutrofila u kombinaciji sa limfopenijom i posledičnim povećanjem odnosa neutrofila i limfocita je prognostički faktor za teške slučajeve [48]. Istovremeno, deplecija dendritskih ćelija otežava indukciju adaptivnog imunskog odgovora. Posledično, kod teških slučajeva COVID-19 zabeleženo je povećanje broja naivnih i smanjenje memorijskih T limfocita [49]. Takođe, broj CD4+ i CD8+ T i B limfocita značajno je smanjen kod pacijenata sa teškom formom COVID-19 [48, 50, 51]. Iako su neutrofilija i oštećenje broja i funkcije limfocita kod pacijenata sa

COVID-19 dobro opisani, dostupno je manje podataka o dendritskim ćelijama i monocitima. Kada je reč o monocitima, opisane su promene u aktivacionom statusu i morfologiji monocita u teškim slučajevima, tj. identifikovane su dve populacije monocita koji luče IL-6, IL-10, TNF- α sa visokim FCS^{high} [52] i SSC^{high} [53] parametrima. Deplecija plazmocitoidnih dendritskih ćelija je takođe opisana među teškim slučajevima [54].

1.2.2. Kliničke manifestacije i tok bolesti

COVID-19 se kod odraslih, adolescenata i dece klasifikuje prema smernicama SZO u četiri kategorije težine bolesti: blaga, umereno teška, teška i kritično teška. Osnovni kriterijumi za klasifikaciju su zasnovani na statusu ventilacije i oksigenacije, radiološkim nalazima na plućima i prisustvu simptoma i znakova koji ukazuju na poremećaj opšteg stanja. Najveći broj pacijenta, oko 80%, iskusi blage i umereno teške simptome. Oko 15% zaraženih razvije tešku kliničku sliku praćenu dispnejom, hipoksijom i promenama u plućnom parenhimu, dok je udeo kritično bolesnih oko 5% [42].

Period od izlaganja virusu do pojave simptoma, tj. period inkubacije, varirao je tokom pandemije u zavisnosti od soja virusa. Na početku pandemije, srednje vreme inkubacije za divlji vuhanski soj procenjeno je na 5,2 dana, u rasponu od 1-14 dana [55]. U nedavno objavljenoj meta-analizi, srednje vreme inkubacije za repetroar sojeva koji su dominirali u određenim periodima pandemije iznosilo je za Alfa soj 5,0 dana, Beta soj 4,5 dana, Delta soj 4,41 dan i Omikron soj 3,5 dana. Pulovalo srednje vreme inkubacije za sve sojeve virusa bilo je 6,5 dana, a kretalo se u rasponu od 1,8 do 18,8 dana [56].

Frakcija populacije koja ostane asimptomatska nakon ovog perioda još uvek nije definitivno utvrđena. Na početku pandemije smatralo se da nedijagnostikovane asimptomatske osobe čine do 79% infekcija SARS-CoV-2 [57]. Prema sistematskom pregledu literature Jans-Lejn i saradnika [58], udeo pacijenata sa SARS-CoV-2 infekcijom koji su bili asimptomatski na početnom testiranju kretao se približno do 75%. Nakon najmanje 7 dana praćenja, većina pacijenata je prijavila simptome tokom prve nedelje. Samo 4,1% je ostalo asimptomatsko tokom cele bolesti [58]. Međutim, druga studija je objavila da je ukupna procena onih koji su ostali asimptomatski tokom čitave infekcije 20% [59].

Prema kliničkom toku, simptomatska infekcija se može podeliti u tri faze. Prvu, „viremijsku fazu“, karakteriše brza replikacija virusa, a simptomi su uzrokovani njegovim direktnim citopatogenim dejstvom [60]. Ova faza traje oko sedam dana i praćena je blagim i često nespecifičnim simptomima, kao što su malaksalost, mijalgija, anosmija i ageuzija. Navedeni simptomi praćeni su i febrilnošću kod 85-95% pacijenta. Što se tiče simptoma respiratornog trakta, najčešći simptom je suvi kašalj, dok su simptomi poput kongestije nosa i rinoreje retko prisutni, naročito u infekcijama sojevima na početku pandemije. Gastrointestinalni simptomi kao što su dijareja, mučnina i povraćanje su relativno često prisutni i javljaju se u oko 20% slučajeva. Mogu se javiti i u odsustvu respiratornih simptoma. Anosmija ili hiposmija i ageuzija zabeleženi su kod oko 40% zaraženih [61, 62]. Već početkom pandemije postalo je jasno da su ova dva simptoma patognomonična za COVID-19, te su korišćeni kao kriterijum za razlikovanje od drugih respiratornih infekcija i u svrhu indentifikacije zaraženih osoba koje ne ispoljavaju druge simptome bolesti. Druga faza ili „faza akutne pneumonije“ obično se javlja nakon osam do deset dana od pojave prvih simptoma i karakteriše je visoka temperatura, kašalj i dispneja, što zahteva pažljivo praćenje i lečenje [60]. U ovoj fazi pacijenti razvijaju virusnu pneumoniju, sa bilateralnim infiltratima u 75% slučajeva, a laboratorijske analize otkrivaju limfopeniju i povećanu koncentraciju laktat dehidrogenaze (engl. *lactate dehydrogenase*; LDH) i C-reaktivnog proteina (engl. *C-reactive protein*; CRP). Većina

pacijenata u ovoj fazi zahteva hospitalizaciju, kako bi se osiguralo da će rano lečenje biti dostupno u slučaju značajnog kliničkog pogoršanja. U ovom trenutku pravac daljeg kliničkog toka određuje izbalansiranost imunskog odgovora. U slučaju preterane aktivacije, manja frakcija pacijenata prelazi u „fazu komplikacija“ [60]. Ova treća faza bolesti je posledica ekstrapulmonalnog hiperinflamatornog sindroma, kog odlikava visoka koncentracija proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-2, IL-6, IL-7), D-dimera, CRP, fibrinogena i drugih markera sistemske inflamacije. Kritično teški oblik praćen je životno ugrožavajućim stanjima poput ARDS-a, sepse, septičnog šoka i multiorganske disfunkcije, ali i akutnom srčanom insuficijencijom, akutnom povredom bubrega, otkazivanjem jetre, koagulopatijama i diseminovanom intravaskularnom koagulacijom (engl. *disseminated intravascular coagulation*; DIC). Oko 20% pacijenata sa COVID-19, i skoro 100% kritičnih, razvije poremećaje koagulacije, naročito hiperkoagulabilno stanje koje uvodi u DIC. Zaista, mikro- i makro-trombi u plućima i drugim organima su opisani u nekoliko serija obdukcija, što sugerise da su tromboza i inflamacija dva procesa koji se međusobno pojačavaju u patogenezi komplikacija COVID-19 [63].

1.2.3. Faktori rizika

Sa milionima potvrđenih slučajeva širom sveta, sveobuhvatno razumevanje i identifikacija faktora rizika za teže oblike i smrtni ishod od COVID-19 bilo je neophodno radi adekvatne stratifikacije pacijenata prilikom donošenja kliničkih odluka. Od samog početka pandemije, mnoge kliničke i sociodemografske karakteristike pacijenata, kao i nezdrave životne navike, identifikovani su kao manje ili više značajni faktori rizika za tešku infekciju SARS-CoV-2 virusom i smrtni ishod COVID-19. U plejadi faktora, starost, pol i komorbiditeti prepoznati su kao najčešći faktori rizika.

Iako teži oblici bolesti pogađaju osobe bilo kod starosnog doba, starije osobe su ipak u značajno većem riziku od razvoja težih formi u odnosu na osobe mladog i srednjeg životnog doba. Procenat infekcija koje progrediraju u tešku i kritičnu bolest progresivno raste sa godinama, posebno među starijima od 50 godina [64]. Pored toga, i učestalost smrtnog ishoda od COVID-19 značajno raste sa godinama starosti. Preciznije, stopa mortaliteta među kineskim pacijentima sa više od 59 godina bila je oko pet puta veća nego kod pacijenata starosti 30–59 godina nakon razvoja simptoma [65], dok je u italijanskoj populaciji smrtni ishod zabeležen u 10,3% starijih od 70 godina u odnosu na 0,43% osoba mlađih od 70 godina [66]. Istovremeno, starije osobe se smatraju grupom visokog rizika za razvoj teških komplikacija. Veća je verovatnoća da će biti hospitalizovani ili primljeni u jedinicu intenzivne nege. Takođe, u poređenju sa mlađim osobama, oni su duže hospitalizovani, a trajanje bolesti je u pozitivnoj korelaciji sa godinama starosti [67]. U meta-analizi koja je uključivala 212 studija sprovedenih u 11 zemalja, otkriveno je da je među pacijentima sa teškim oblikom COVID-19 prosečna starost bila 60 godina, a više od polovine (61%) su bili muškarci [68]. Druga meta-analiza ustanovila je da su teži oblici bolesti i smrtni ishod učestaliji kod muškaraca u poređenju sa ženama, nezavisno od godina starosti [69]. S druge strane, izrazito povećanje rizika za razvoj kritičnog oblika bolesti uočeno je kod muškaraca starijih od 70 godina, dok ovaj trend nije primećen kod žena [70]. I uticaj komorbiditeta na težinu bolesti kod muškaraca je bio značajan [70]. Mnoge studije su pokazale da je prisustvo komorbiditeta češće kod pacijenata sa teškim COVID-19, uključujući kardiovaskularne bolesti [71, 72], hipertenziju [71, 72], dijabetes [71, 72], hroničnu opstruktivnu bolest pluća [71, 72], malignitete [72] i cerebrovaskularna oboljenja [71]. Gotovo četvrtina hospitalizovanih pacijenata ima najmanje jedan komorbiditet, dok 8,2% ima dve ili više propratne hronične bolesti [73]. Prisustvo više komorbiditeta je značajan prognostički faktor većeg mortaliteta i morbiditeta kod starijih osoba [74]. Generalno, stariji

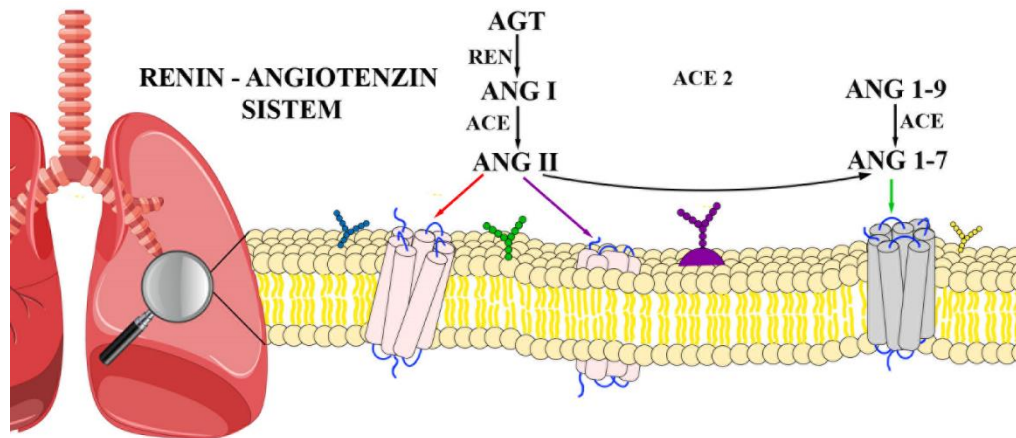
pacijenti sa COVID-19 imaju značajno veću prevalencu komorbiditeta [74]. S druge strane, iako je prevalenca komorbiditeta manja u mlađoj populaciji, rizik za tešku formu COVID-19 i fatalni ishod je neočekivano viši među osobama sa hipertenzijom, dijabetesom i kardiovaskularnim bolestima nego među starijim pacijentima [75]. Pored toga, kao veoma učestalo hronično stanje, i gojaznost je prepoznata kao faktor koji utiče na težinu COVID-19. Naime, među pacijentima u jedinici intenzivne nege 47,6% je bilo gojazno sa indeksom telesne mase (engl. *body mass index*; BMI) većim od 30kg/m^2 , a 28,2% je patilo od gojaznosti II stepena sa BMI većim od 35kg/m^2 . Udeo pacijenata kojima je neophodna mehanička ventilacija rastao je sa kategorijom gojaznosti [76].

1.3. ACE2: fiziološka funkcija i uloga u SARS-CoV-2 infekciji

Otkriće ACE2 je objavljeno u dva rada koja su se pojavila gotovo istovremeno 2000. godine [77, 78]. Tipnis i saradnici [77] identifikovali su ga kao ključni enzim u obradi angiotenzina II (engl. *angiotensin II*; Ang II), dok su Donohju i saradnici [78] prepoznali njegovu ulogu u metabolizmu nekoliko drugih supstrata, kao što su des – Arg – bradikinin, apelin i neurotensin. Inicijalno je identifikovan kao homolog angiotenzin konvertujućeg enzima (engl. *angiotensin-converting enzyme*; ACE), pa se u literaturi može sretati i pod nazivima ACE homolog (engl. *ACE homologue*; ACEH), karboksipeptidaza povezana sa ACE i metaloproteaza 15 (engl. *metalloprotease 15*; MPROT15).

ACE2 je transmembranski glikoprotein tip I koji broji 805 aminokiselina. Sastoji se od dva domena: S-terminalnog domena koji uključuje transmembranski deo enzima i N-terminalnog domena sa katalitičkom funkcijom. Katalitički domen sadrži jedno pepdidazno mesto za čiju je aktivnost, kao kod mnoštva metaloproteaza, neophodan molekul cinka. ACE2 u ovom domenu deli 42% homologije sa ACE. Njegov katalitički ektodomen može biti uklonjen sa površine ćelijske membrane posredstvom metaloenzima TNF- α konvertujući enzim (engl. *TNF- α converting enzyme*; TACE). Stoga, pored membranske forme, prisutan je u cirkulaciji u slobodnom, solubilnom obliku (engl. *solubile ACE2*; sACE2) [77-79].

Biološke funkcije ACE2 mogu se svrstati u dve kategorije: enzimsku i ne-enzimsku. Enzimska funkcija odnosi se na karbopeptidaznu aktivnost prema odgovarajućim supstratima iz renin-angiotenzin sistema (engl. *renin – angiotensin – system*; RAS) (slika 4). Renin-angiotenzin kaskada počinje hidrolizom angiotenzinogena reninom, čime se oslobađa angiotenzin I (engl. *angiotensin I*; Ang I). Ovaj biološki neaktivni dekaeptid se konvertuje putem ACE u vazoaktivni oktapeptid AngII (engl. *angiotensin II*), koji svoje biološke efekte ostvaruje kroz dva tipa receptora za angiotenzin, AT1 i AT2 (engl. *angiotensin receptor-1;-2*). Nadalje, ACE2 otkida samo jednu S-terminalnu aminokiselinu sa Ang II čime nastaje heptapeptid angiotenzin 1-7 (engl. *angiotensin 1-7*; Ang 1-7) koji se vezuje za MAS receptor (engl. *mitochondrial assembly*). Pored toga, ACE2 obrađuje i Ang I, doduše, uz 400 puta manju katalitičku aktivnost, pretvarajući ga u nonapeptid angiotenzin 1-9 (engl. *angiotensin 1-9*; Ang 1-9). Uprkos strukturnoj homologiji, ACE i ACE2 posreduju u dijametralno suprotnim fiziološkim funkcijama, kao jing i jang. ACE kroz AngII/AT1 put izaziva vazokonstrikciju, retenciju natrijuma i vode, inflamaciju, proliferaciju ćelija, trombozu, srčanu disfunkciju i fibrozu pluća. S druge strane, ACE2 pruža ravnotežu štetnim efektima ACE kroz Ang 1-7/MAS osovinu. Ang 1-7 u interakciji sa MAS receptorom indukuje vazodilataciju, natriurezu, kardiprotektivni, antiproliferativni, antiinflamatorni, antitrombotični i antifibrozni efekat [79].



Slika 4. Shematski prikaz RAS sistema.

Neenzimska funkcija ACE2 vezana je za transport aminokiselina u crevima. Njegov S-terminalni domen služi kao adapter koji održava transporter velikih aminokiselina B⁰AT1 na apikalnoj membrani epitelnih ćelija creva. Ova translokacija je neophodna za apsorpciju nekoliko neutralnih aminokiselina iz hrane, poput triptofana [80]. Kasnije, sa pojavom SARS-CoV-1 virusa, ustanovljena je i njegova uloga kao receptora u infekcijama koronavirusima.

Kao što je prethodno pominjano, ACE2 je receptor za koji se vezuje S glikoprotein SARS-CoV-2 virusa čime se pokreće kaskada događaja koji otvaraju put virusu ka citoplazmi ćelije domaćina. Biofizičkim metodama i strukturnim analiza utvrđeno je da se S glikoprotein SARS-CoV-2 virusa vezuje za humani ACE2 sa dvadeset puta većim afinitetom od S glikoproteina SARS-CoV-1 [81]. Upravo ovaj veliki afinitet prema humanom ACE2 je jedan od ključnih faktora koji doprinose olakšanoj interhumanoj transmisiji SARS-CoV-2. Distribucija ACE2 određuje tropizam virusa ka određenim tkivima. ACE2 je eksprimiran u velikom broju tkiva, ali u različitom stepenu. Stoga, moglo bi se očekivati da su tkiva sa većom ekspresijom najugroženija. Zou i saradnici [82] su kategorisali tkiva prema riziku za infekciju SARS-CoV-2 virusom, pri čemu su kao tkiva visokog rizika definisana ona sa više od 1% ćelija koje ekspimiraju ACE2. U ovu kategoriju svrstani su donji respiratorni trakt (2%), pluća (>1%), srce (>7,5%), ileum (30%), jednjak (>1%), bubregi (4%) i bešika (2,4%). Rezultati sekvenciranja RNK na nivou jedne ćelije (engl. *single-cell RNA sequencing*; scRNA-seq) ukazuju da je ekspresija ACE2 kod ljudi na nivou respiratornog trakta najviša u pneumocitima tip II [82]. Visoka ekspresija ACE2 karakteristična je, takođe, za endotel krvnih sudova, miokard, mozak, proksimalne tubule bubrega, enterocite tankog creva i ilieuma, a nešto niža u timusu, Lejdigovim i Sertolijevim ćelijama [82]. Sva pomenuta tkiva su manje ili više pogođena infekcijom, ali kliničke manifestacije i komplikacije su posledica loše kontrolisanog imunskog odgovora, pre nego direktnog citopatogenog efekta virusa.

Ipak, uloga ekspresije ACE2 u patologiji infekcije SARS-CoV-2 virusom i dalje nije razjašnjena. Stavovi naučne zajednice su podeljeni po tom pitanju. Jedni tvrde da bi manja ekspresija ACE2 rezultovala nižom sklonošću ka infekciji zbog smanjenja dostupnih mesta za vezivanje, a time lakšim oblikom bolesti [83]. Drugi, pak, tvrde da vezivanje virusa za ACE2 receptor smanjuje njegovu dostupnost na površini ćelije, kako internalizacijom prilikom procesa endocitoze, tako i formiranjem solubilne forme pod dejstvom TACE enzima, što dovodi do disbalansa na ACE/ACE2 klackalici, čime štetni efekti ACE/AngII/AT1 osovine postaju dominantni [84]. Pored toga, utvrđeno je da je visoka koncentracija solubilne forme ACE2 prisutna kod pacijenata sa težom kliničkom slikom COVID-19 [85], ali i da je porast koncentracije prolazan i da nije povezan sa težinom i ishodom COVID-19 [86]. Pretpostavlja

se da su visoki nivoi solubilnog ACE2 rezultat povećane ekspresije, što je preduslov za veću sklonost ka infekciji SARS-CoV-2 virusom. Solubilni ACE2 nema očiglednu direktnu ulogu u patogenezi bolesti, jer je membranski ACE2 neophodan za ulazak u ćeliju. Međutim, solubilna forma ima potencijalno protektivnu ulogu koja potiče od premise da bi se vezivanjem SARS-CoV-2 za solubilni ACE2 sprečilo vezivanje virusa za membranski ACE2 i time onemogućio ulazak virusa u ćeliju [87].

Do sada je već dobro poznato je da su komorbiditeti, uključujući hipertenziju, hiperlipidemiju, dijabetes, hronične plućne bolesti, kao i starost i pušenje, faktori rizika za COVID-19. Većinu pobrojnih faktora karakteriše izmenjena ekspresija ACE2 [88]. Razlike u nivoima ACE2 povezane sa godinama i polom su kontroverzne; starost je i u pozitivnoj [89] i u negativnoj [90] korelaciji sa ekspresijom ACE2, dok jedna studija nije pronašla značajan uticaj [91]. Muški pol je povezan sa većom ekspresijom ACE2 u nekim studijama [89], ali ne i u drugim [90]. Prvobitno se spekulisalo da antihipertenzivni lekovi kao što su ACE inhibitori i blokatori angiotenzinskih receptora mogu da povećaju ekspresiju ACE2 [92], što je upozorilo na to da bi upotreba ovih lekova mogla povećati rizik za teži oblik bolesti [93]. Nedavne multicentrične studije i meta-analize opovrgle su ovu hipotezu [94, 95].

1.4. Interferoni tip III: fiziološka funkcija i uloga u SARS-CoV-2 infekciji

S početka XXI veka, dve nezavisne istraživačke grupe otkrile su prve članove nove porodice interferona tip III – IFN-III ili poznatije kao lambda interferoni (engl. *interferon lambda*; IFN- λ) [96, 97]. Prvobitno su nazivani interleukinima: bili su uvršteni u porodicu IL-10 zbog interakcije sa podjedinicom 2 receptora za IL-10 (engl. *IL-10 receptor subunit 2* - IL-10R2). Međutim, daljim izučavanjem otkrivena je njihova funkcionalna sličnost sa interferonima tip I - IFN-I, zbog čega su smatrani „citokinima sličnim interferonima“ [98]. Kod ljudi, ova porodica interferona broji četiri člana: IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), IFN- λ 3 (IL-28B) i IFN- λ 4. Svi članovi IFN tip III dele visok stepen homologije; IFN- λ 3 sa IFN- λ 2 i IFN- λ 4 deli čak i do 96% homologije u sekvenci aminokiselina [99]. Iako se IFN tip III smatraju najsirodnijim IFN tipa I prema primarnoj strukturi, IFN- λ su po tercijernoj strukturi bliski članovima porodice citokina IL-10. Prostorna struktura IFN tip III organizovana je u pet heliksa (A, C, D, E i F), uz element V čija struktura nije jasno definisana. Heliks A i D, kao i AV petlja stupaju u interakciju sa receptorom za IFN- λ . Svi IFN- λ 1-4 se vezuju za heterodimerni receptor IFN- λ R (engl. *IFN- λ receptor*) na površini ćelije. Ovaj kompleks se sastoji od specifičnog IFN- λ receptorskog lanca 1 (engl. *IFN- λ receptor chain 1*; IFN- λ R1) i ubikvitarno eksprimiranog IL-10R2, koji je deo i drugih receptorskih kompleksa za citokine iz porodice IL-10 citokina. Aminokiseline iz AV petlje stupaju u interakciju sa IFN- λ R1 subjedinicom, dok je heliks D odgovoran za vezivanje za IL-10R2 subjedinicu. Inicijalno vezivanje IFN- λ za IFN- λ R1 izaziva brze konformacione promene, regrutuje drugi lanac IL-10R2, čime se formira kompleks i otpočinje intracelularna transdukcija signala [100].

Cisteinski obrasci i amfipatski profil su očuvani među IFN- λ 1-4 što ih čini gotovo funkcionalno identičnim po vezivanju za receptor [100]. Vezivanjem bilo kog od četiri liganda za IFN- λ R aktiviraju se tirozin-kinaze vezane za receptor, JAK1 (engl. *janus kinase 1*), i nevezane za receptor, Tyk1 (engl. *non-receptor tyrosine-protein kinase 2*), koje fosforilišu tirozinske rezidue intracelularnog domena receptora. Potom se regrutuju i fosforilišu STAT (engl. *signal transducer and activator of transcription 1*) molekule: najviše STAT1 i STAT2, a u manjoj meri i STAT3 - STAT5. Fosforilisani STAT molekuli interreaguju sa IRF-9 (engl. *interferon regulatory factor 9*), čime se formira transkripcioni kompleks ISGF3. Novonastali

kompleks se translocira u jedro, vezuje za specifične ISRE (engl. *IFN-stimulated response elements*) u promotorskom regionu i indukuje transkripciju velikog broja ISGs (engl. *IFN-stimulated genes*). Iako se vezuju za različite receptore, IFN tip III i tip I se funkcionalno preklapaju kroz formiranje ISGF3 (engl. *interferon stimulated gene factor 3*) i posledičnu ekspresiju sličnih ISGs [101].

Interferoni tip III su jedni od glavnih medijatora imunskog odgovora na virusne infekcije. Prepoznavanje virusa putem specifičnih PRRs indukuje ekspresiju IFN- λ s. Na primer, citoplazmatski senzori poput RIG-I i MDA-5 aktiviraju transkripcione faktore poput NF- κ B (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), IRF – 1, 3, 7 koji promovišu transkripciju *IFNL* gena [102]. Kao glavna ulazna vrata, epitelne ćelije respiratornog i digestivnog trakta su glavni produktori IFN- λ s, a pored njih i keratinociti, hepatociti i primarne neuronske ćelije [103]. Među ćelijama hematopoezne loze, plazmacitoidne i mijeloidne dendritske ćelije, dendritske ćelije poreklom od monocita [104] i makrofagi su osnovni izvor IFN- λ s [105]. Istovremeno i distribucija subjediničice IFN- λ R1 je ograničena na sve pomenute ćelije [103]. Pred toga, niski nivoi ekspresije IFN- λ R1 zabeleženi su na monocitima i B limfocitima, što ih čini slabo responzivnim ćelijama na IFN- λ s [106]. Shodno tome, sluzokože respiratornog i digestivnog trakta su glavni produktori, ali i mete dejstva IFN- λ s, što se ogleda i u antivirusnoj aktivnosti kod infekcija virusima koji imaju visok tropizam za ove epitelne ćelije [103].

IFN- λ s ispoljavaju antivirusnu aktivnost na širok spektar virusa, poput HCV (engl. *hepatitis C virus*) zbog kog su i dospeli u žižu naučnih interesovanja, HBV (engl. hepatitis B virus), HSV-1 i 2 (engl. *herpes simplex virus-1;-2*), HIV i drugih [107]. Generalno uzevši, IFN tip III glavni su koordinatori imunskog odgovora na nivou respiratornog trakta koji se luče u prvim satima infekcije, čak pre IFN tip I, kako bi ograničili infekciju u gornjim partijama respiratornog trakta uz suzbijanje preteranog inflamatornog odgovora u donjim partijama [99]. IFN- λ s značajno doprinosi kontroli virusnih infekcija respiratornog trakta, uključujući virus gripa A [108], humani metapneumovirus i SARS-CoV-1 virus [109]. Iako se proizvodi samo kod manjine pojedinaca, IFN- λ 4 ispoljava antivirusno dejstvo protiv HCV-a i 2 humana koronavirusa, HCoV-229E i MERS-CoV, uprkos relativno niskom nivou ekspresije [100].

Nedavne studije su pokazale da IFN- λ s poseduje antivirusnu aktivnost protiv SARS-CoV-2 *in vitro* i *in vivo*. Tretmanom IFN- λ ćelijskih linija sisara (ljudske Calu-3 i majmunske Vero E6) inficiranih SARS-CoV-2 inhibirana je njegova replikacija [110]. Takođe, dokazano je da pretreman pegilovanim IFN- λ 1 redukuje titar SARS-CoV-2 virusa u plućima Balb/c miševa drugog dana nakon infekcije i u profilaktičkim i u terapijskim uslovima [111]. Takođe, IFN- λ su ispitivani kao potencijalna terapijska opcija za COVID-19 [112]. Pored toga, literaturni podaci ukazuju da su sniženi nivoi ekspresije IFN tip III povezani sa lošijim ishodom COVID-19 pacijenata [113]. Nedavno publikovane studije upućuju da je smanjena ekspresija IFN- λ 1-4, IFN-I i ISGs smanjena kod pacijenta teškim oblikom COVID-19 [114, 115].

1.5. Humani genetički polimorfizmi u infektivnim bolestima i COVID-19

Oko 99,9% od oko 3 biliona baznih parova, koliko sadrži humani genom, je identično između dva ljudska bića. Dakle, prema opšteprihvaćenim dokazima, interindividualne razlike su smeštene u 0,1% ostatka genoma, što znači da se bilo koje dve osobe razlikuju u proseku za oko 1 na 1000 nukleotida [116]. Genetičke varijacije u kojima je jedan nukleotid zamenjen drugim nukleotidom nazivaju se varijantama jednog nukleotida (engl. *single nucleotid variant*; SNV). Ako je SNV nasledan i otkriven u dovoljno velikoj frakciji populacije (najmanje 1%)

naziva se jednonukleotidni polimorfizam (engl. *single nucleotide polymorphism*; SNP). Izmene koje nisu supstitucije pojedinačnih nukleotida dovode do drugih tipova genetičkih varijacija, npr. umetanja ili brisanja nukleotida (takođe poznatih kao indeli), duplikacija nukleotida, varijacije broja kopija, translokacije, itd [116]. SNP-ovi čine oko 90% svih polimorfizama u humanom genomu [117]. Polimorfizmi koji su funkcionalni, odnosno menjaju sintezu, funkciju ili strukturu kodiranih proteina, mogu imati značajan uticaj na individualnom nivou, utičući na predispoziciju za određene poremećaje, ili utičući na način na koji se reaguje na lekove. S druge strane, polimorfizmi koji su i funkcionalni i česti u populaciji, takođe, mogu imati značajan uticaj na nivou populacije, jer mogu uticati na rizik i ishod bolesti, uključujući one infektivne, poput COVID-19.

Još sredinom XX veka se pretpostavljalo da genetički faktori domaćina utiču na sklonost ka infekcijama i težinu infektivnih bolesti. Prva potvrda ove hipoteze bilo je otkriće Alisona 1954. godine da heterozigotni nosioci alela za anemiju srpastih ćelija imaju manji rizik za oboljevanje od malarije i lakši klinički oblik [118]. Nakon toga, studija sprovedena 1988. godine pokazala je da usvojena deca imaju približno pet puta veći rizik od umiranja od infektivne bolesti, ako je jedan biološki roditelj preminuo od infektivne bolesti u mladom životnom dobu [119]. Od tog trenutka, a naročito u prethodnoj deceniji, sproveden je veliki broj studija dizajniranih da identifikuju genetičke determinante domaćina koje specifično utiču na podložnost i ishod određenih infektivnih bolesti. Primenom različitih metodoloških pristupa, poput studija gena-kandidata, studija asocijacija na nivou celog genoma (engl. *Genome-Wide Association Studies*; GWAS) i *in vitro* skrininga genoma, danas imamo neoborive dokaze da genetički polimorfizmi značano menjaju osetljivost domaćina na različite patogene, kao i da značajno moduliraju tok i ishod infektivnih bolesti [120, 121]. Prepoznavanje i praćenje genetičkih polimorfizama je ključno za razumevanje patoloških procesa infektivnih bolesti, pronalaženje novih terapijskih strategija i razvoj novih terapija [116]. Najpoznatiji, ali i veoma značajni, primeri kliničke primene saznanja o uticaju humanih genetičkih determinanti na infektivne bolesti sustiču se na primerima virusa HIV i polimorfizma *CCR5* gena, i HCV i polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena [122, 123].

Već u ranim danima COVID-19 pandemije je primećeno da najistaknutiji faktori rizika, uključujući muški pol, starost i multiple komorbiditete [64-76], ne objašnjavaju u dovoljnoj meri interindividualni diverzitet kliničkih prezentacija i letalni ishod bolesti, naročito kod osoba mlađeg životnog doba bez evidentnih predisponirajućih faktora. Pored toga, neretko su klasteri teških slučajeva COVID-19 uočavani unutar porodica [124]. Početne studije sprovedne nad blizancima utvrdile su da se približno 30% varijabilnosti u kliničkoj prezentaciji COVID-19 može pripisati genetičkoj pozadini domaćina [125]. Stoga, genetika domaćina je došla u fokus istraživanja kao potencijalni izvor ovih uočenih razlika u odnosu domaćina i patogena [126]. Odgovor na pitanje da li humana genetika utiče ili ne na podložnost, težinu ili ishod infekcije SARS-CoV-2 treba sagledati u svetlu novijih alata i metoda genomike. Munjevitom brzinom pokrenut je ogroman broj istraživanja različitog dizajna, pri čemu su dominirale GWAS studije i studije bazirane na sekvenciranju celog egzoma (engl. *whole-exome sequencing* - WES), dok su studije gena-kandidata bile manje zastupljene. Potraga za učestalim genetičkim polimorfizmima koji doprinose patologiji COVID-19 pokrenula je veliki broj međunarodnih konzorcijuma, poput *COVID-19 Host Genetics Initiative* (COVID-19 HG) [127], *Genetics Of Mortality In Critical Care* (GenOMICC) [128], *COVID human genetic effort* [129], i nezavisne akademske grupe. Ovim putem identifikovano je nekoliko SNP-ova i gena povezanih sa osetljivošću na infekciju ili različitim aspektima težine bolesti, kao što su hospitalizacija, respiratorna insuficijencija ili smrt. Mnogi geni istaknuti u studijama o COVID-19 umešani su u ključne patofiziološke procese, uključujući ulazak virusa u ćelije, antivirusni odgovor i hiperinflamaciju. Među njima se mogu susresti kako polimorfizmi receptorskih gena, poput

ACE2 [127], tako i gena čiji su produkti medijatori imunskog odgovora, uključujući *IFNL3* i *IFNL4* [130].

1.5.1. Polimorfizmi *ACE2* gena

Humani *ACE2* gen (NCBI_Gene ID:59272), lokalizovan na kraćem kraku X hromozoma (Xp22.2), sadrži 20 introna i 18 egzona koji se transkribuju u šest različito prekrajanih varijanti, a samo dve kodiraju *ACE2* protein sa 805 aminokiselina [131]. Kao nosioci jednog X hromozoma, muškarci su hemizigoti, dok su žene „prirodni mozaik“ zahvaljujući nasumičnoj inaktivaciji jednog X hromozoma tokom ranog embrionalnog razvika [132].

ACE2 lokus je visoko polimorfan sa više od 18000 identifikovanih varijanti u bazi podataka Nacionalnog centra za biotehnoološke informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*; NCBI). Funkcionalnost je definisana za nekolicinu ovih polimorfizama, a potencijalni efekti polimorfizama *ACE2* gena uključuju promene u splajsovanju, mesta za vezivanje faktora transkripcije i/ili *ACE2* post-transkripcionu regulaciju [133]. Ovakva heterogenost *ACE2* gena neizbežno dovodi do pitanja u kojoj meri genetičke varijacije utiču na vezivanje SARS-CoV-2, težinu i ishod COVID-19.

Tokom izbijanja SARS-CoV-1 epidemije 2002.–2003. godine, pokazano je da neki *ACE2* polimorfizmi utiču na sposobnost *ACE2* da veže koronavirus [134, 135]. Na osnovu WES analize i molekularne simulacije strukturnih promena proteina izazvanih malim brojem odabranih missense varijanti u italijanskoj populaciji, Beneti i saradnici [136] su zaključili da je *ACE2* jedan od glavnih molekula čija genetička heterogenost može modulisati infekciju i progresiju bolesti. Širom sveta identifikovani su polimorfizmi *ACE2* gena koji potencijalno utiču na njegovu aminokiselinsku sekvencu [137], a od posebnog značaja su varijante koje menjaju aminokiseline na ključnim pozicijama za interakciju sa S glikoproteinom [138]. Primenom strukturnog modeliranja, Husein i saradnici [138] su ispitali kako bi vezivanje S glikoproteina sa produktima kodirajućih *ACE2* varijanti moglo doprineti podložnosti i/ili otpornosti na SARS-CoV-2 infekciju. Dva *ACE2* polimorfizma, rs73635825 (S19P) i rs143936283 (E329G), pokazala su relativno nizak afinitet vezivanja za S glikoprotein SARS-CoV-2, što bi moglo implicirati na manju verovatnoću vezivanja virusa i potencijalnu otpornost na infekciju. Druge studije su takođe identifikovale *ACE2* varijante koje utiču na afinitete vezivanja za S glikoproteina, uz pretpostavku da one mogu uticati na osetljivost na COVID-19 [139, 140].

Tokom poslednje decenije, veliki značaj je dat polimorfizmima *ACE2* gena zbog njihove umešanosti u nastanak i progresiju kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tip 2. Povezanost *ACE2* polimorfizama sa hipertenzijom utvrđena je u različitim populacijama: kineskoj populaciji za varijante rs4830542, rs4240157 i rs4646155 [141]; populaciji Kanađana za rs233575, rs2074192 i rs2158083 polimorfizme [142], među Indijcima sa rs2106809 varijantom [141]. Povezanost dijabetesa tip 2 sa polimorfizmima rs1978124, rs2074192, rs4646188, rs879922 nije utvrđena u populaciji Britanaca i Finaca [143, 144], međutim sva četiri polimorfizma su bila statistički značajno povezana sa bolešću u populaciji Kineza [145]. Pored toga, uočena je razlika među polovima u asocijaciji *ACE2* polimorfizama i bolesti. Naime, veći indeks mase leve komore zabeležen je samo kod muškaraca koji su nosioci varijantnih alela za rs879922, rs4240157 i rs233575 polimorfizme [146], dok je terapijski odgovor na ACE inhibitore u vidu sniženja dijastolnog krvnog pritiska zavisio od genotipa za rs2106809 samo među ženama [147]. Uzimajući u obzir da je veliki broj *ACE2* polimorfizama umešan u najznačajnije komorbiditete COVID-19, a njihov efekat polno distribuiran, nameće se

pretpostavka da su ovi polimorfizmi umešani i u težinu i ishod COVID-19. Najbolji primer za to je direktna povezanost polimorfizma rs2074192 sa teškom kliničkom slikom COVID-19 u populaciji hipertenzivnih muškaraca starijih od pedeset godina [148].

Pored toga, klinički efekti nekih od čestih i funkcionalnih *ACE2* polimorfizama, kao što su rs2106809 i rs2074192, povezani su sa nivoima solubilnog ACE2 samo kod žena [149]. Istovremeno, dokazana je i korelacija genotipova sa koncentracijom glavnog produkta ACE2, Ang1-7, takođe u cirkulaciji žena [149, 150]. Nedavno je eksperimentalno dokazano da rs2106809 polimorfizam menja transkripcionu aktivnost *ACE2* gena [151]. Hipoteza da razlike kako na nivou ekspresije ACE2 proteina na površini ćelije domaćina, tako i koncentracije slobodne forme u cirkulaciji koreliraju, pozitivno ili negativno, sa sklonošću za infekciju, generisala je izvestan broj publikacija koje su ispitivale ulogu funkcionalnih ACE2 polimorfizama u COVID-19 [151-156]. Većina studija pronašla je značajnu asocijaciju između rs2106809 i težine kliničke slike, ali uz oprečne rezultate. Naime, Sabater Molina i saradnici [152] tvrde da rs2106809 povećava rizik od hospitalizacije u populaciji žena, dok je GWAS studija na evropskoj populaciji ustanovila protektivni efekat ovog polimorfizma [151]. Karakaš Čelik i saradnici [153], pak, nisu prepoznali nikakvu povezanost između rs2106809 i kliničkog toka COVID-19 u kohorti od 155 pacijenata. Kada je reč o rs2074192 polimorfizmu, dostupni rezultati studija u pogledu rizika od infekcije i težine kliničke slike su uglavnom uniformni, odnosno ukazuju na negativnu asocijaciju SNP-a sa pomenutim ishodima [154-156]. Nasuprot tome, zabeležen je protektivni efekat ovog polimorfizma u jednoj studiji [152]. Povezanost rs2074192 sa ishodom bolesti nije dokazana u populaciji muškaraca [157].

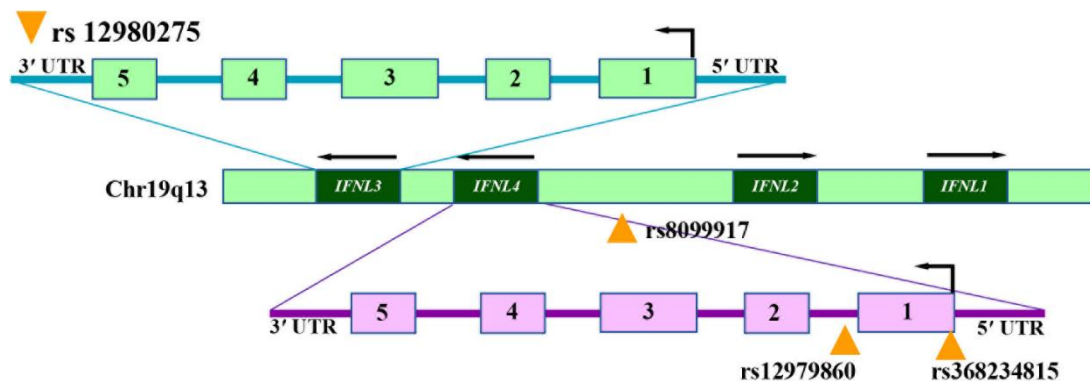
1.5.2. Polimorfizmi *IFNL3* i *IFNL4* gena

Geni *IFNL3* i *IFNL4* locirani su na kraćem kraku hromozoma 19 (19q13.13) i oba sadrže po pet egzona [158]. Oba lokusa su veoma polimorfna, a neki od otkrivenih SNP-ova značajno utiču na ulogu *IFNL3/IFNL4* gena i menjaju njihovu sposobnost da kontrolišu imuski odgovor. Shodno tome, ovi polimorfizmi se povezuju sa tokom i ishodom nekih infektivnih bolesti.

Polimorfizmi *IFNL3* i *IFNL4* gena su dospeli u žižu interesovanja zbog njihove uloge u infekciji HCV virusom. Zahvaljujući rezultatima GWAS ispitivanja sprovedenih 2009. i 2010. godine, identifikovani su ključni polimorfizmi rs12979860, rs12980275 i rs8099917 čije prisustvo ima neosporan uticaj na spontanu rezoluciju HCV infekcije, ali i terapijski ishod kombinovane primene ribavirina i IFN- α [122, 159-162]. Homozigotni genotipovi za varijantne alele (TT, CC, GG) ovih polimorfizama bili su nezavisni prediktori razvoja hronične infekcije, kao i izostanka odgovora na terapiju, te su zbog svoje loše reputacije prozvani „nepovoljnim genotipovima“. Ovi rezultati su nebrojeno puta replikovani u studijama različitog dizajna i u različitim populacijama [163, 164]. Nekoliko godina kasnije, opisan je dinukleotidni polimorfizam rs368234815 TT/ Δ G koji posreduje u kreiranju *IFNL4* gena. Prisustvo varijante Δ G formira otvoreni okvir čitanja koji za rezultat ima produkciju IFN- λ 4, dok insercija jednog timidina i supstitucija guanina timidinom (TT) u prvom egzonu *IFNL4* izaziva pomeranje okvira čitanja i rezultuje pseudogenizacijom *IFNL4*, tj. izostankom produkcije funkcionalnog IFN- λ 4 proteina [158]. Od samog pronalaska, varijanta TT je definisana kao „povoljni alel“ koji favorizuje spontanu eliminaciju HCV i poboljšavajući ishod nakon kombinovanog tretmana ribavirinom i IFN- α [158]. Pokazalo se da je ovaj polimorfizam superiorniji marker od prethodnih u predviđanju odgovora na standardnu terapiju hronične HCV infekcije i spontanog klirensa HCV [158]. Štaviše, rs368234815 je nezavisni prediktor brzog virusološkog odgovora kod svih HCV genotipova i stabilnog virusološkog odgovora kod genotipova 1 i 4 [165]. Zanimljivo je da je uloga rs368234815 u predviđanju odgovora na antivirusnu terapiju takođe

primećena kod pacijenata zaraženih HCV-om koji su primali proteazne inhibitore u režimima bez IFN- α . Konkretno, kod pacijenata lečenih sofosbuvikom i ribavirinom, *IFNL4* Δ G je povezan sa sporijom eliminacijom virusa i smanjenom efikasnošću terapije, što ukazuje na funkcionalnu relevantnost IFN- λ 4 u terapijskim režimima bez IFN- α [166].

Polimorfizmi rs12979860 i rs8099917 se nalaze 367bp nizvodno (intron 1) i 4kb uzvodno od rs368234815 (slika 5). Feng i saradnici skrenuli su pažnju da je pogrešno imenovati rs12979860 i rs8099917 varijantama *IFNL3* gena i da ta konfuzija može omesti istraživače u razumevanju funkcionalnih mehanizma koji leže u osnovi fenotipskih asocijacija polimorfizma u ovom regionu [167]. S druge strane, rs12979860 je u većini dostupne literature preimenovan u polimorfizam *IFNL4* gena [168] [169], dok je veći broj studija i baza podataka zadržao klasifikaciju rs8099917, intergenske varijante, kao *IFNL3* gena [170-174]. U ovoj disertaciji će se rs8099917 razmatrati kao polimorfizam *IFNL3* gena.



Slika 5. Shematski prikaz rasporeda polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* polimorfizama.

Značaj polimorfizma *IFNL3* i *IFNL4* gena prepoznat je i u drugim infektivnim bolestima, međutim ovi rezultati nisu jednoznačni kao u studijama o HCV infekciji. Kada je u pitanju infekcija virusima iz porodice Herpes virusa, ređe zastupljeni alel polimorfizma rs12979860 povezivan je sa ozbiljnijim i učestalijim recidivima labijalnog herpesa [175], dok je prisustvo varijante rs368234815 Δ G povećavalo verovatnoću razvoja citomegalovirusnog retinitisa kod pacijenata sa HIV-om [176]. S druge strane, neki autori nisu pronašli povezanost rs368234815 sa recidivima ni genitalnog, ni labijalnog herpesa [177], a među pacijentima sa transplantacijom organa koji su nosioci minornog alela rs8099917 polimorfizma zabeležena je niža stopa replikacije CMV [178]. Među publikacijama koje su ispitivale uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na HIV infekciju, pojedini autori su uočili jasnu asocijaciju rs12979860 i rs368234815 sa spontanom eliminacijom HIV-a [179, 180], dok u drugim studijama ova povezanost nije ustanovljena [181, 182]. Genetički polimorfizmi *IFNL* gena su, takođe, dovodeni u vezu sa dva onkogeno virusa, Humanim papiloma virusom [183] i Humanim T limfotropnim virusom tip I [184]. Pored toga, homozigotni nosioci varijantnog alela za polimorfizme rs12979860 i rs8099917 obolevali su od blažeg hantavirusnog kardio-pulmonalnog sindroma [185]. Uprkos tome što se IFN- λ dominantno produkuje u ćelijama disajnih puteva kao odgovor na infekciju, iznenađujuće malo se zna o efektu polimorfizama *IFNL* gena na respiratorne infektivne bolesti. Jedna od nekolicine studija sprovedenih sa ovim ciljem nije našla nikakvu povezanost između rs12979860 i rs8099917 sa tokom infekcije kod novorođenčadi hospitalizovanih sa bronhiolitisom izazvanim respiratornim sincicijalnim virusom (engl. *respiratory syncytial virus*; RSV) [186]. Pak, drugi autori otkrili su direktnu vezu između rs12979860 i rs8099917 i težine RSV bronhiolitisa, ali samo među ženskom decom [187].

Ribavirin koji se rutinski koristi za lečenje infekcije HCV virusom, i favipiravir, koji je jedna od terapijskih opcija za COVID-19, zapravo imaju veoma slične mehanizme delovanja [188]. Oni vezuju RdRp, koja je ključni enzim u životnom ciklusu mnogih RNK virusa, uključujući SARS-CoV-2. S obzirom na sličnosti terapijskih opcija između HCV-a i COVID-19, kao i to da IFN- λ igraju jednu od ključnih uloga u odbrani od respiratornih patogena, postavlja se pitanje koja je uloga i koliki je uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena u infekciji SARS-CoV-2 virusom. Neke od nedavnih studija pozabavile su se vezom polimorfizma *IFNL3* i *IFNL4* sa podložnošću na SARS-CoV-2, težinom COVID-19 i ishodom bolesti [173, 189-192]. U pogledu uticaja polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* na podložnost infekciji SARS-CoV-2 virusom, jedna grupa istraživača nije primetila razlike u učestalosti rs368234815 među populacijom COVID-19 i ne-COVID-19 [192]. Pored toga, dve druge studije izveštavaju o značajnoj povezanosti polimorfizma rs12979860, ali sa suprotstavljenim rezultatima: povećana podložnost infekciji je povezana sa rs12979860 CC genotipom u prvoj [191], a sa rs12979860 TT genotipom u drugoj [190]. Tri grupe autora nisu uočile značajnu povezanost polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* sa ozbiljnošću COVID-19 [189-191]. Što se tiče uticaja polimorfizma *IFNL3* i *IFNL4* na ishod COVID-19, istovremeno prisustvo rs368234815 TT/TT, rs12979860 C/C, rs8099917 T/T i rs12999917 T/T i rs12980275 A/A genotipova smanjivalo je rizik od smrtnog ishoda [173]. Druga studija je zabeležila povezanost rs12979860 T/C sa povećanom smrtnošću [191].

2. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Osnovni ciljevi planiranog istraživanja su:

1. Utvrditi da li postoji povezanost prisustva ispitivanih polimorfizama *ACE2* gena sa razvojem teške kliničke slike i smrtnog ishoda COVID-19.
2. Utvrditi da li postoji povezanost prisustva ispitivanih polimorfizama *IFNL3* gena sa razvojem teške kliničke slike i smrtnog ishoda COVID-19.
3. Utvrditi da li postoji povezanost prisustva ispitivanih polimorfizama *IFNL4* gena sa razvojem teške kliničke slike i smrtnog ishoda COVID-19.

Ostali ciljevi planiranog istraživanja su:

1. Utvrditi učestalost ispitivanih polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena u populaciji pacijenata obolelih od COVID-19.
2. Utvrditi da li postoji povezanost prisustva ispitivanih polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena, težine kliničke slike i smrtnog ishoda COVID-19 sa serumskom koncentracijom odgovarajućih proteina, tj. solubilnog ACE2, interferona IFN- λ 3 i IFN- λ 4.
3. Utvrditi da li su kliničke, biohemijske i imunske karakteristike pacijenata povezane sa težinom kliničke slike i smrtnim ishodom COVID-19.

Shodno dosadašnjim saznanjima i postavljenim ciljevima, **radne hipoteze** su sledeće:

1. Prisustvo ispitivanih polimorfizama *ACE2* gena povezano je sa razvojem teže kliničke slike i smrtnog ishoda COVID-19.
2. Prisustvo ispitivanih polimorfizama *IFNL3* gena povezano je sa razvojem teže kliničke slike i smrtnog ishoda COVID-19.
3. Prisustvo ispitivanih polimorfizama *IFNL4* gena povezano je sa razvojem teže kliničke slike i smrtnog ishoda COVID-19.
4. Ukupna učestalost ispitivanih polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena kod pacijenata obolelih od COVID-19 odgovara očekivanoj za belu populaciju.
5. Prisustvo ispitivanih polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena, težina kliničke slike i smrtni ishod COVID-19 povezani su sa serumskom koncentracijom odgovarajućih proteina, tj. solubilnog ACE2, interferona IFN- λ 3 i IFN- λ 4.
6. Kliničke, biohemijske i imunske karakteristike pacijenata povezane su sa težinom kliničke slike i smrtnim ishodom COVID-19.

3. Ispitanici i metodologija

3.1. Vrsta studije i etički aspekti

Istraživanje je dizajnirano kao prospektivna opservaciona klinička studija tipa slučaj/kontrola u kojoj su ispitivanu populaciju činili pacijenti oboleli od COVID-19 hospitalizovani u Univerzitetskom kliničkom centru Kragujevac (UKCKG). Shodno broju ishoda od interesa, sprovedene su dve studije slučaj/kontrola za procenu uticaja genetičkih i drugih relevantnih faktora na:

- I) razvoj težih oblika COVID-19, pri čemu su grupu slučajeva činili pacijenti sa težim formama bolesti, a kontrolnu grupu pacijenti sa blažom kliničkom slikom;
- II) smrtni ishod COVID-19, pri čemu su grupu slučajeva činili preminuli pacijenti, a kontrolnu grupu pacijenti otpušteni sa bolničkog lečenja kao oporavljeni.

U sprovođenju studije poštovani su principi Helsinške deklaracije o zaštiti prava subjekata istraživanja, usvojene od strane Svetske medicinske asocijacije i Dobre kliničke prakse, usvojene na Međunarodnoj konferenciji o harmonizaciji, kao i zakonski propisi Republike Srbije. Studijske aktivnosti su podrazumevale etička i bezbednosna pitanja, kao što su direktan kontakt sa pacijentima; pristup i obrada ličnih podataka i medicinske dokumentacije pacijenata; izvođenje, obrada i korišćenje laboratorijskih rezultata, uključujući genetičke podatke, te je njihovo sprovođenje odobreno odlukom nadležnog Etičkog odbora UKCKG (Odluka br. 01/20-405 od 03.04.2020.).

3.2. Studijska populacija

Studijska populacija obuhvatila je hospitalizovane pacijente oba pola, obolele od lakših i težih formi COVID-19, koji su praćeni do završetka hospitalizacije, tj. do otpusta pacijenta ili smrtnog ishoda. Podobnost pacijenata procenjena je na osnovu kriterijuma za uključivanje i neuključivanje: za učešće u studiji pacijent je trebao da zadovolji sve uključujuće kriterijume i nijedan kriterijum za neuključivanje.

Kriterijumi za uključivanje ispitanika bili su:

1. Starost 18 ili više godina,
2. Saglasnost za učešće u studiji i potpisan formular Informisanog pristanka,
3. SARS-CoV-2 infekcija potvrđena u referentnoj laboratoriji Real time-PCR metodom, kojom se detektuje prisustvo virusa u nazofaringealnom brisu.

Kriterijumi za neuključivanje ispitanika bili su:

1. Uzrast ispod 18 godina,
2. Trudnoća i dojenje.

Tokom istraživanja, ispitanik je bio isključen iz studije ukoliko:

1. Sam odluči da se povuče iz studije,
2. Bude otpušten sa bolničkog lečenja pre isteka 24 časa nakon hospitalizacije,
3. Dođe do smrtnog ishoda pre isteka 24 časa nakon hospitalizacije.

3.3. Uzorkovanje

Ispitanici su uključivani u studiju iz ukupne populacije pacijenata obolelih od COVID-19 koji su bili hospitalizovani na Infektivnoj klinici, Klinici za pulmologiju i u Korona centru

UKCKG. Uključivanje u studiju sprovedeno je sukcesivno, prema kriterijumima za uključivanje, od prvog dana studije do dana kada je dostignut ukupan broj ispitanika, shodno proračunu veličine studijskog uzorka.

Ispitanici su uključivani u studiju na dan prijema u UKCKG. Svi ispitanici su bili upoznati sa studijskim procedurama usmenim i pisanim putem, a nakon potpisivanja formulara za Informisani pristanak i procene podobnosti uključivani su u studiju. Pisani Informisani pristanak obezbedio je ordinirajući lekar koji je istovremeno bio i istraživač u studiji. Po obezbeđenom pristanku, prikupljeni su demografski, anamnestički i klinički podaci, laboratorijski parametri, a potom je ispitanicima uzet uzorak krvi za dalju analizu.

3.3.1. Uzorkovanje i obrada krvi

Na dan hospitalizacije, prikupljeno je 10mL krvi za rutinske laboratorijske analize u vakutajner bez antikoagulansa i 3mL krvi u vakutajner sa etilen-diamino-tetrasirćetnom kiselinom (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) kao antikoagulansom. Nakon adekvatnog obeležavanja uzoraka, krv bez antikoagulansa je centrifugirana na 3000 obrtaja/minuti po završenom procesu koagulacije, a odvojeni serum se delom koristio za neposredno određivanje biohemijskih parametara u Službi za biohemijsku dijagnostiku UKCKG, a 500 μ L je zamrznuto na -20°C za naknadno određivanje studijskih parametara (solubilnog ACE2, interferona IFN- λ 3 i IFN- λ 4). Uzorci krvi sa EDTA kao antikoagulansom su delom korišćeni, za fenotipizaciju mononuklearnih leukocita (najkasnije 6 sati posle uzorkovanja), a ostatak zamrznut na -20°C do izolacije dezoksironukleinske kiseline (DNK) i izvođenja genotipizacije. Uzorke su prikupljali kvalifikovani medicinski tehničari i sestre, a dalji postupak sa uzorcima bio je sproveden od strane istraživača uključenih u ovu studiju.

3.3.2. Prikupljanje demografskih, kliničkih podataka i laboratorijskih parametara

Svi demografski, anamnestički i klinički podaci, kao i laboratorijski parametri na dan hospitalizacije prikupljeni su iz istorija bolesti i elektronskih podataka o pacijentu čuvanih u Zdravstveno-informacionom sistemu UKCKG. Podaci su inicijalno prikupljeni u papirnoj formi kao Formular o izveštaju slučaja, a potom preneti u elektronsku verziju za dalju statističku obradu.

Od demografskih podataka prikupljeni su pol i starost, a od anamnestičkih simptomi bolesti poput: povišene temperature, kašlja, dispneje, bola u grudima, bola u mišićima, glavobolje, grebanja u grlu, anosmije i digestivnih tegoba; kao i vreme javljanja simptoma. Klinički podaci podrazumevali su fizikalni nalaz, nalaz radiografije pluća, primenu lekova i prisustvo komorbiditeta. Opterećenje komorbiditetima kvantifikovano je pomoću Čarlsonovog indeksa komorbiditeta (engl. *Charlson Comorbidity Index*, CCI).

Od laboratorijskih parametara rutinski analiziranih u okviru dijagnostike na prijemu, prikupljeni su:

- Parametri krvne slike sa diferencijalnom leukocitarnom formulom;
- Inflamatorni biomarkeri: CRP i prokalcitonin (engl. *procalcitonin*; PCT);
- Biohemijski parametri: glikemija, kreatinin, urea, ukupni bilirubin, direktni bilirubin, alanin-aminotrasferaza (engl. *alanine aminotransferase*; ALT), aspartat-aminotrasferaza (engl. *aspartate aminotransferase*; AST), albumini, LDH, kreatin-kinaza (engl. *creatine kinase*; CK)
- Hematološki parametri: D-dimer
- Gasne analize krvi: pO₂, pCO₂, pH

- Elektroliti: natrijum i kalijum.

Navedene laboratorijske analize određivane su standardnim metodama na hematološkim i biohemijskim analizatorima u Službi za biohemijsku dijagnostiku UKCKG.

3.4. Procena težine kliničke slike COVID-19

Težina kliničke slike definisana je kao blaga, umerena, teška i kritično teška bolest, shodno shodno kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije [42] za odrasle osobe, i to na:

- I Blagu bolest:** odsustvo simptoma ili simptomi nekomplikovane virusne infekcije gornjih disajnih puteva uz simptome kao što su groznica, umor, kašalj, anoreksija, nelagodnost, bol u mišićima, upaljeno grlo, dispneja, začepljenost nosa ili glavobolja; pacijenti takođe mogu imati dijareju, mučninu i povraćanje.
- II Umereno tešku bolest:** klinički (povišena telesna temperatura, kašalj, dispneja, tahipneja) i radiološki znaci pneumonije, ali bez znakova teške pneumonije i bez potrebe za dodatnim kiseonikom, odnosno da je $SpO_2 \geq 90\%$.
- III Tešku bolest:** prisustvo kliničkih znakova pneumonije poput povišene telesne temperature, kašlja, dispneje, tahipneje, uz jedan od navednih znakova: respiratorni ritam > 30 udisaja/min, teški respiratorni distres, ili $SpO_2 < 90\%$ bez asistirane respiracije.
- IV Kritično tešku bolest:** podrazumeva prisustvo ARDS-a, sepse ili septičnog šoka. Kriterijumi za njihovo utvrđivanje bili su sledeći:
 - a. **ARDS:** Početak: u roku od jedne nedelje od pojave kliničkih simptoma i znakova ili pojavljivanje novih ili pogoršanje postojećih respiratornih simptoma. Vizuelizacionim tehnikama pluća (radiografija ili kompjuterizovana tomografija) utvrđuje se prisustvo: bilateralnih opaciteta koji nisu u potpunosti objašnjeni prekomernim opterećenjem volumenom, lobarnog ili plućnog kolapsa ili nodula. Procenom porekla plućnih infiltrata nalazi se da respiratorna slabost nije potpuno objašnjena srčanom insuficijencijom ili preopterećenjem tečnošću. Potrebna je objektivna procena (npr. ehokardiografija) da se isključi hidrostatski uzrok infiltrata/edema, ako nema faktora rizika. Poremećaj oksigenacije kod odraslih se klasifikuje u tri kategorije prema sledećim kriterijumima:
 - Blagi ARDS: $200 \text{ mmHg} < PaO_2 / FiO_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ (sa PEEP ili CAPAP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$)
 - Umereni ARDS: $100 \text{ mmHg} < PaO_2 / FiO_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ (sa PEEP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$)
 - Teški ARDS: $PaO_2 / FiO_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ (sa PEEP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$)

Ukoliko PaO_2 nije dostupan, $SpO_2 / FiO_2 \leq 315$ ukazuje na ARDS i kod pacijenata bez ventilacije.

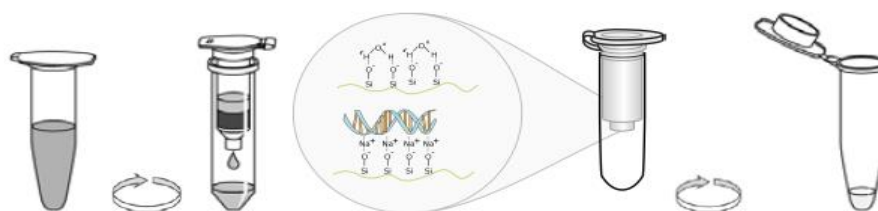
- b. **Sepsa:** akutna disfunkcija organa koja ugrožava život, a uzrokovana je neadekvatnim imunskim odgovorom na suspektnu ili dokazanu infekciju. Znaci disfunkcije organa su: izmenjen mentalni status, poteškoće u disanju ili tahipneja, niska saturacija kiseonikom, slabo izlučivanje urina, ubrzan srčani ritam, slab puls, hladni ekstremiteti ili snižen krvni pritisak, *livedo reticularis*, laboratorijski dokazana koagulopatija, trombocitopenija, acidoza, visoka koncentracija laktata ili hiperbilirubinemija.
- c. **Septični šok:** hipotenzija koja perzistira uprkos nadoknadi tečnosti i zahteva primenu vazopresornih lekova kako bi se održao srednji arterijski pritisak $\geq 65 \text{ mmHg}$ u kombinaciji sa koncentracijom laktata u serumu $> 2 \text{ mmol/L}$.

Težinu kliničke slike procenjivala su dva istraživača, u dve vremenske tačke: na početku i na kraju hospitalizacije. Za svakog pacijenta u obzir uziman je najteži stadijum bolesti kao krajnja procena. Ishod bolesti utvrđivan je po završetku hospitalizacije.

3.5. Izolacija molekula DNK

Molekul DNK izolovan je iz uzoraka pune krvi sa EDTA pomoću komercijalnog kompleta *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Ova metoda zasniva se na kolonama sa siliko-gel membranama koje imaju sposobnost selektivne adsorpcije molekula DNK u zavisnosti od koncentracije haotropnih soli. Izolacija je sprovedena u skladu sa uputstvom proizvođača.

Sat vremena pre početka izolacije uzorci krvi sa EDTA su odležani, promešani pokretima gore-dole i na vorteksu. Neposredno pre eksperimenta, u pufere za ispiranje (engl. *Washing buffer*) WB 1 i 2 je dodata propisana količina 100% etanola (Zorka, Šabac, Srbija). U sterilne mikroeprevete zapremine 2mL razliveno je po 20 μ L rastvora proteinaze K koncentracije 20mg/ml i 200 μ L uzoraka pune krvi sa EDTA uz blago mešanje na vorteksu. Potom, svaki uzorak je tretiran sa 20 μ L rastvora RNK-aze A (ribonukleaze A) koncentracije 20mg/ml, uz blago mešanje i inkubaciju na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minuta. U svaku mikroeprevetu dodato je po 200 μ L vezujućeg/lizirajućeg pufera, smeša je blago promešana na vorteksu kako bi se postigla homogenost, a zatim je inkubirana uz zagrevanje na vodenom kupatilu na 55°C radi ubrzanja digestije proteina. Nakon završetka desetominutne inkubacije, u lizate je dodato 200 μ L 100% etanola uz mešanje na vorteksu. Celokupni lizati, volumena oko 640 μ L, prebačeni su na sistem koji se sastoji od spin-kolone sa silika-gel membranom, prethodno smeštenim u kolekcione mikroeprevete od 2mL (slika 6) i centrifugirani na 10.000 x g 1 minut na sobnoj temperaturi. Spin-kolone za koje je adsorbovala genomska DNK su prebačene u novu kolekcionu mikroeprevetu, a profiltrirani lizat je odbačen. Naredni koraci predstavljaju proces uklanjanja nepoželjnih komponenti lizata koji su adsorbovali za silika-gel zajedno sa DNK, upotrebom pufera pH \leq 7. Prvo se dodaje 500 μ L WB 1 i centrifugira na 10.000 x g 1 minut na sobnoj temperaturi, zatim se spin-kolona se prebacuje na novu kolekcionu mikroeprevetu, a filtrat odbacuje. Isti postupak je ponovljen sa WB 2, ali uz centrifugiranje na 16.000 x g 3 minuta na sobnoj temperaturi. Poslednji korak predstavlja „ispiranje“ DNK sa spin-kolone u kolekcionu mikroeprevetu pomoću 100 μ L elucionog pufera pH \geq 7 uz inkubaciju od 1 minuta i centrifugiranje 16.000 x g 1 minut na sobnoj temperaturi. Eluat koji sadrži izolovanu DNK čuvan je na temperaturi od -20°C do izvođenja eksperimenta.



Slika 6. Ilustracija sistema koji se sastoji od spin-kolone sa silika-gel membranom smeštenom u kolekcione mikroeprevete i sumiran prikaz metode izolacije

3.6. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK

UV spektrofotometrija je najjednostavnija i najčešće korišćena tehnika za određivanje kvantiteta i kvaliteta DNK. DNK i većina uobičajenih kontaminanata koji se nalaze u izolatima DNK apsorbuju UV svetlost, s toga se merenja izvode u opsegu talasnih dužina od 230nm do 320nm. Merenjem na 260nm kvantifikuje se DNK; na 230nm haotropne soli i fenol kao indikatori kontaminacije poreklom od samog procesa izolacije; na 280nm tirozin i triptofan kao indikatori kontaminacije proteinima; i na 320nm određuje se zamućenost uzorka rastvora, koja

upućuje na druge izvore kontaminacije. Ova očitavanja apsorbance (A), omogućavaju merenje koncentracije DNK i pružaju informacije o nivoima kontaminanata ponaosob [193].

Optička gustina uzoraka izolovane DNK određivana je na talasnim dužinama od 230nm, 260nm, 280nm i 320nm na UV-Vis spektrofotometru sa dvostrukim snopom model Cary 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) sa kvarcnom kivetom debljine 1cm (prikazan na slici 7). Sva merenja sprovedena su u triplikatu, a za dalju obradu korišćene su srednje vrednosti. Uzorci izolovane DNK razblaživani su 100 puta, tačnije 30μL uzorka je pomešano sa 2970μL dejonizovane vode. Kao slepa proba korišćena je dejonizovana voda.

Koncentracija izolovane DNK u uzorcima računata je koristeći formulu koja proističe iz Lamber-Berovog zakona:

$$[DNK](\mu g/mL) = (A_{260}uzorka - A_{320}uzorka) \times 50(\mu g/mL) \times 100$$

pri čemu 50(μg/mL) potiče od poznate relacije da je apsorbance jedne optičke jedinice na talasnoj dužini od 260nm jednaka 50μg/mL dvolančane DNK, 100 je dilucioni faktor uzorka u dejonizovanoj vodi, a A_{260} i A_{320} su izmerene apsorbance datog uzorka na talasnim dužinama od 260nm i 320nm.



Slika 7. Originalna fotografija UV-Vis spektrofotometra model Cary 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Čistoća izolovane DNK u uzorcima određivana je po formulama:

$$n_1 = \frac{A_{260}uzorka - A_{320}uzorka}{A_{280}uzorka - A_{320}uzorka}$$

$$n_2 = \frac{A_{260}uzorka - A_{320}uzorka}{A_{230}uzorka - A_{320}uzorka}$$

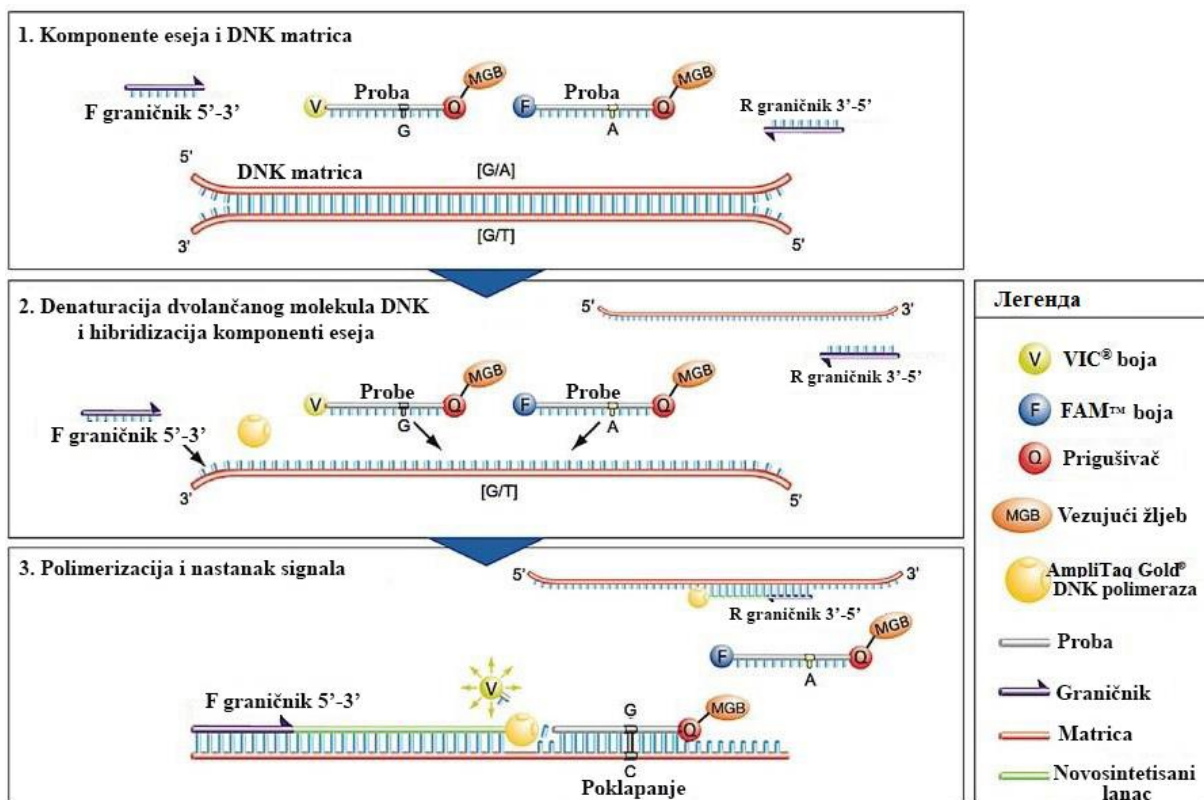
gde su A_{230} , A_{260} , A_{280} i A_{320} su izmerene apsorbance datog uzorka na talasnim dužinama od 230nm, 260nm, 280nm i 320nm. Ukoliko je vrednost stepena čistoće uzorka n_1 u opsegu od 1,5 do 2 i n_2 veći od 1,5 uzorci su smatrani zadovoljavajuće čistim. Vrednosti apsorbance na talasnoj dužini od 320nm veće od 0,02 ukazuju na visoku zamućenost rastvora i kontaminaciju. Uzorci koji nisu zadovoljavali navedene kriterijume čistoće su ponovo izolovani.

3.7. Genotipizacija

3.7.1. Detekcija jednonukleotidnih polimorfizama reakcijom lančane polimerizacije u realnom vremenu

Reakcija lančane polimerizacije (engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR) u realnom vremenu (engl. *Real Time PCR*) je *in vitro* kvantitativna metoda koja kombinuje konvencionalnu PCR amplifikaciju i fluorimetriju. U *Real Time PCR* reakciji količina DNK se neprekidno prati iz ciklusa u ciklus, dakle, u realnom vremenu, detekcijom fluorescentnog signala koji emituju fluorescentne boje. Ovaj fluorescentni signal je direktno proporcionalan broju generisanih amplikona i detektuje se u eksponencijalnoj fazi, kada je reakcija visoko specifična.

Genotipizacija jednonukleotidnih polimorfizama *Real Time PCR* reakcijom najčešće koristi hidrolizujuće probe, poznatije kao TaqMan probe. TaqMan probe su alel-specifični oligonukleotidi koje na svom 5' kraju nose fluorescentnu reportersku boju (engl. *Reporter*; R) i prigušivač (engl. *Quencher*; Q) na 3' kraju koji blokira emisiju fluorescentnog signala dok su u neposrednoj blizini (slika 8). Nakon hibridizacije para početnica za matricu DNK, dolazi i do vezivanja alel-specifične TaqMan probe za ciljnu sekvencu. U fazi elongacije, kada Taq polimeraza ugrađuje nukleotide po principu komplementarnosti, njenom 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću iseca se 5' kraj probe koji nosi reportersku boju. Kako ovo dovodi do udaljavanja reportera od prigušivača, reporterska boja počinje da emituje fluorescenciju koja se povećava svakim ciklusom proporcionalno stepenu degradacije probe.



Slika 8. Princip funkcionisanja TaqMan probe (dostupno na <https://www.thermofisher.com>)

Genotipizacija polimorfizama gena *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* sprovedena upotrebom predizajniranih, komercijalno dostupnih proba *TaqMan genotyping assay mix (40X)* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*) koje su prikazane u tabeli 1. Za amplifikaciju segmenata DNK od interesa neophodno je prisustvo Taq polimeraze i gradivnih elemenata – nukleotida, koji

ulaze u sastav *TaqMan Genotyping Master Mix (2X)* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*). Finalni volumen reakcione smeše koji je iznosio 20 μ L, sadržao je 10 μ L *TaqMan Genotyping Master Mix (2X)*, 0,5 μ L *TaqMan genotyping assay mix (40X)*, 0,5 μ L dejonizovane vode i 9 μ L genomske DNK koncentracije 1ng/ μ L ili dejonizovane vode kao „negativne kontrole“ (engl. *Non-Template Control*; NTC). Temperaturni profil reakcije amplifikacije činile su tri faze:

1. inicijalna aktivacija polimeraze na 95°C tokom 10 minuta – na ovoj temperaturi se denaturiše protein koji se nalazi u žljebu aktivnog mesta Taq polimeraze, čime enzim postaje aktivan;
2. denaturacija DNK na 95°C u periodu od 15 sekundi – pri čemu se vodonične veze u molekulu DNK raskidaju, DNK se raspliće i prelazi u dve jednolančane stukture;
3. hibridizacija/elongacija na 60°C tokom 60 sekundi – koja podrazumeva vezivanje para graničnika, alel-specifičnih *TaqMan* proba (hibridizacija) i nadograđivanje novog lanca DNK aktivnošću *Taq* polimeraze koja ugrađuje nukleotide komplementarne jednolančanoj matrici DNK (elongacija).

Faze denaturacije i hibridizacije/elongacije čine jedan ciklus PCR reakcije koji se ponavlja 40 puta. *Real Time PCR* reakcija je sprovedena na aparatu Mic qPCR 48-well thermal cycler (*BioMolecular Systems, Upper Coomera, Australia*, slika 9).

Tabela 1. Informacije o korišćenim *TaqMan*® probama

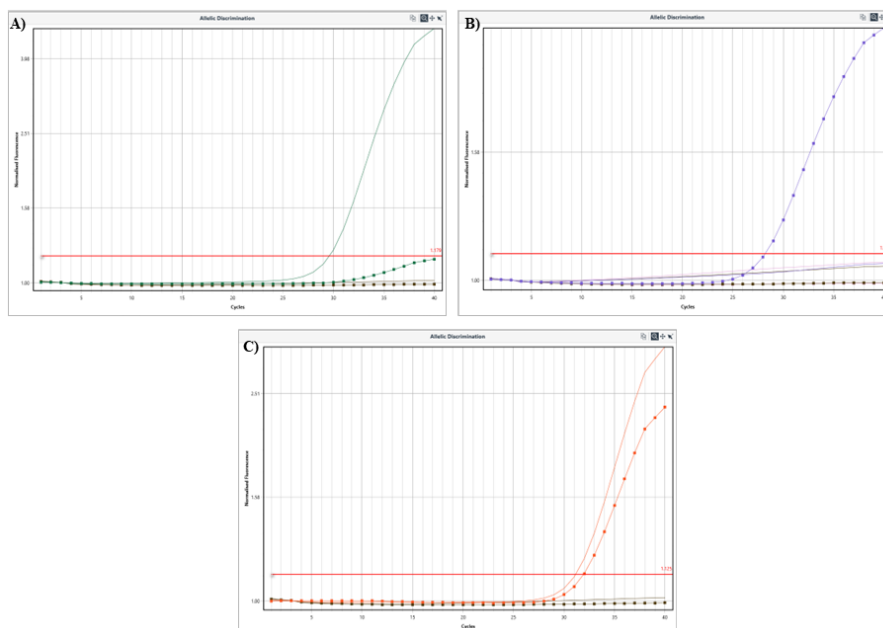
rs identifikacioni broj	Pozicija	Identifikacioni broj probe	Sekvenca [VIC/FAM]
<i>ACE2</i>			
rs2106809	NG_012575.2:g.7221T>C	C__16098179_20	TTTTTCCATATCTCTATCTGA TGG[A/G]CTTCTCCACACTTCT ACATCAGCAG AGTGTGGAAATGTATAAATGG
rs2074192	NG_012575.2:g.42492G>A	C__16163821_10	TTGG[C/T]ATTATTTCATTTGT GACTGCTGTGT
<i>IFNL3</i>			
rs8099917	NC_000019.10:g.39252525T>G	C__11710096_10	TTTTGTTTTCCTTTCTGTGAGC AAT[G/T]TCACCCAAATTGGA ACCATGCTGTA TGAGAGAAAGTCAAATTCCTAG
rs12980275	NC_000019.10:g.39241143A>G	C__31438519_10	AAAC[A/G]GACGTGTCTAAAT ATTTGCCGGGGT
<i>IFNL4</i>			
rs12979860	NC_000019.10:g.39248147C>T	C__7820464_10	TGAACCAGGGAGCTCCCCGAA GGCG[C/T]GAACCAGGGTTGA ATTGCACTCCGC GAGAGCAGGCAGCGCCGGGG
rs368234815	NC_000019.10:g.39248514_39248515delinsG	C_203097338_10	GGCC[T/T][A/G]CTGCGATCACC GTGCACAGGACCCA



Slika 9. Originalna fotografija Mic qPCR 48-well thermal cycler (BioMolecular Systems, Upper Coomera, Australia)

3.7.2. Alelska diskriminacija

Za alelsku diskriminaciju upotrebljen je softver Mic qPCR Software (BioMolecular Systems, Upper Coomera, Australia). Korišćeni TaqMan genotyping assay mix (20X) sadržali su dve oligonukleotidne probe čija se sekvenca razlikovala jedino na mestu zamene nukleotida od interesa, tj. jedna proba bila je komplementarna divljem alelu, a druga varijantnom alelu. Ove dve probe bile su obeležene različitim fluorescirajućim bojama, VIC i FAM. Prateći intezitet fluorescencije obe boje po završenoj amplifikaciji, za svaki uzorak ponaosob određivan je prag detekcije (engl. *threshold*). Ukoliko je fluorescencija jedne od navedenih boja prevazilazila prag detekcije, takav uzorak je definisan kao homozigotni nosilac divljeg (slika 10. A), odnosno varijantnog alela (slika 10. B). U slučaju kada su fluorescencije obe boje bile visokog inteziteta, tj. prelazile prag detekcije, uzorak je označavan kao heterozigot (slika 10. C). Dva istraživača su procenjivala prisustvo genotipova, nezavisno jedan od drugog. Među ponovljenim uzorcima nije bilo razlike u determinaciji genotipa.



Slika 10. Ilustracija alelske diskriminacije – A) divlji homozigot (VIC); B) varijantni homozigot (FAM); C) heterozigot (VIC + FAM)

3.8. Kvantifikacija solubilnog ACE2 i interferona IFN- λ 3 i IFN- λ 4 u serumu

„Sendvič“ enzimski imunosorbent test, poznatiji kao ELISA (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*), predstavlja jednu od najčešće korišćenih laboratorijskih metoda za detekciju i merenje antigena. Princip testa je zasnovan na imunološkoj reakciji antigen-antitelo koja nije vidljiva golim okom. Naime, primarno monoklonsko antitelo, imobilisano na površini bunara mikrotitar ploče, vezuje antigen iz uzorka, a zatim se detektuje dodatkom sekundarnog, najčešće poliklonskog antitela, koje na svom Fc fragmentu nosi enzim. Vizuelizacija ove reakcije se postiže dodatkom bezbojnog supstrata koji podleže enzimskoj reakciji, pri čemu se razvija okom vidljiva plava boja koja je direktno proporcionalna koncentraciji detektovanog antigena.

Za određivanje koncentracije sACE2 (*FineTest, Wuhan, China*), interferona IFN- λ 3 (*Elabscience, Wuhan, China*) i IFN- λ 4 (*MyBiosource, San Diego, USA*) u serumu COVID-19 pacijenata korišćeni su komercijalno dostupni ELISA kompleti. U izvođenju testova poštovane su procedure definisane uputstvom proizvođača.

Pre izvođenja eksperimenta, sproveden je set pred-eksperimenta sa ciljem da se utvrdi stepen razblaženja uzoraka koje treba koristiti u ELISA testovima. Shodno rezultatima, u ELISA testovima za merenje IFN- λ 3 i IFN- λ 4 korišćeni su nerazblaženi uzorci seruma, dok je za merenje koncentracije sACE2 bilo neophodno razblažiti serume u odnosu 1:50 u diluentu.

Uzorci seruma su odležani pola sata pre početka eksperimenta, a reagensi testa temperirani na sobnoj temperaturi. Uslovi inkubacija bili su isti za sve testove, te je korišćen termoblok temperiran na 37°C. Za sve testove pripremljeni su rastvori standarda odgovarajućih humanih rekombinovanih proteina u sedam koncentracija. Proces je podrazumevao niz koraka sa malim razlikama u zavisnosti od korišćenog testa:

- Dodavanje po 100 μ L standarda, uzoraka i slepe probe (čistog diluenta) u bunare koji su obloženi specifičnim antitelima za dati protein i inkubacija tokom 90 ili 120 minuta;
- Dodavanje 100 μ L radnog rastvora detekcionih antitela konjugovanih biotinom razblaženih u razmeri 1:100 u odgovarajućem diluentu, inkubacija tokom 60 minuta i dva ispiranja ploča puferom za ispiranje; u slučaju ELISA testa za detekciju ACE2, ovom koraku je prethodila su dva ispiranja ploče puferom za ispiranje;
- Dodavanje 100 μ L radnog rastvora konjugata streptavidina i peroksidaze izolovane iz korena rena - HRP (engl. *Horseradish peroxidase*) razblaženog u razmeri 1:100 u odgovarajućem diluentu, inkubacija tokom 30 ili 60 minuta i dva ili pet ispiranja ploča puferom za ispiranje;
- Dodavanje 90 μ L supstrata tetrametilbenzidin (TMB), inkubacija 10 do 20 minuta u zavisnosti od dinamike razvoja inteziteta plave boje;
- Dodavanje 50 μ L sumporne kiseline tj. „stop solucije“ koja zaustavlja enzimsku reakciju i uzrokuje promenu plavog bojenja u žuto.

Odmah po dodavanju „stop solucije“, intezitet boje se merio spektrofotometrijski pomoću čitača za mikrotitar ploče Rayto RT-6100 (*Shenzhen, China*), očitavanjem apsorbance na talasnoj dužini od 450nm. Očitana apsorbance, odnosno intezitet boje, direktno je proporcionalna koncentraciji prisutnih proteina u testiranim uzorcima. Koncentracija sACE2, IFN- λ 3 i IFN- λ 4 je automatski izračunata u softveru Rayto-1000 na osnovu očitane apsorbance uzoraka metodom interpolacije sa konstruisane standardne krive.

3.9. Varijable koje su merene u studiji

Kao nezavisne varijable utvrđivani su 1) polimorfizmi *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena i to rs2106809 i rs2074192 (*ACE2*), rs8099917 i rs12980275 (*IFNL3*), i rs12979860 i rs368234815 (*IFNL4*), i 2) serumske koncentracije solubilnog ACE2 i interferona IFN- λ 3 i IFN- λ 4.

Kao kovarijable praćene su starost, pol, prisustvo komorbiditeta, primena lekova, parametri krvne slike sa fenotipom mononuklearnih leukocita, i inflamatorni biomarkeri sa drugim biohemijskim parametrima.

Zavisne, tj. ishodišne varijable bile su: 1) **težina kliničke slike**, definisana kao a) blaga, b) umerena, c) teška i d) kritično klinička slika i 2) **ishod bolesti**, definisan kao a) otpust iz bolnice ili b) smrtni ishod u toku hospitalizacije. Takođe, praćeni su i vreme od pojave simptoma do hospitalizacije i dužina hospitalizacije.

3.10. Snaga studije i veličina uzorka

Veličina uzorka procenjena je na osnovu publikacije de Seixas i saradnika [194] u *G*Power* softveru. U ovoj studiji pokazana je povezanost prisustva funkcionalnog *IFNL4* rs368234815 polimorfizma sa uspehom lečenja HCV pegilovanim interferonom alfa i ribavirinom, pri čemu je učestalost varijantnog Δ G alela bila značajno manja u grupi pacijenata sa stabilnim virusološkim odgovorom u poređenju sa pacijentima koji nisu odreagovali na terapiju (28% naspram 61%, OR (95% CI): 14.84 (3,57-61,68), $p < 0,001$). Uz prihvaćene vrednosti verovatnoće greške prvog tipa $\alpha = 0,05$ i snage studije od 0,90, veličina uzorka procenjena je na najmanje 42 po grupi, odnosno ukupno najmanje 168 ispitanika.

3.11. Statistička obrada podataka

Rezultati genotipizacije prikazani su u vidu apsolutnih i relativnih učestalosti alela, genotipova, haplotipova i diplotipova. Podaci su dodatno transformisani u dve genotipske grupe: dominantni genetički model, koji grupiše genotipove u homozigotne nosioce divljeg alela i nosioce makar jednog varijantnog alela, i recesivni genetički model, čije su grupe definisane na nosioce makar jednog divljeg alela i homozigotne nosioce varijantnog alela. Polimorfizmi *ACE2* gena su statistički obrađivani ponaosob u populacijama žena i muškaraca, pri čemu su žene, shodno prisustvu dva X hromozoma, definisane kao nosioci homozigotnih ili heterozigotnih genotipova, dok su muškarci, kao nosioci jednog X hromozoma, definisani kao hemizigoti [132].

Odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže (engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium*; HWE), odnosno ispitivanje razlike u očekivanoj i opserviranoj učestalosti genotipova na autozomnim hromozomima (*IFNL3* i *IFNL4*) utvrđivana je Hi-kvadrat (χ^2) testom sa jednim stepenom slobode ($df=1$) za celu ispitivanu populaciju. HWE polimorfizama *ACE2* gena, koji je lociran na X hromozomu, analiziran je u celokupnoj ispitivanoj populaciji pomoću χ^2 testa sa dva stepena slobode ($df=2$), pri čemu se učestalost genotipova izračunavala ponaosob za žene i muškarce [195]. Haplotipizacija i izračunavanje učestalosti haplotipova urađeni su u softveru *Arlequin* verzija 3.5 [196]. Testiranje neravnoteže vezanosti (engl. *Linkage disequilibrium*; LD) između polimorfizama istog gena sprovedeno je u softveru *Haploview* verzija 4.2 (*Broad Institute, Cambridge, MA, USA*). S obzirom na to da su *IFNL3* i *IFNL4* geni smešteni u neposrednoj blizini na hromozomu 19, LD je utvrđivan za sve polimorfizme oba

gena u jednoj analizi, dok je *ACE2*, lokalizovani na X hromozomu, analiziran odvojeno. Kalkulisana su dva parametra jačine vezanosti, korigovani koeficijent neravnoteže vezanosti D' i koeficijent korelacije r^2 . Vrednosti pomenutih parametara skalirani su od 0 do 1, pri čemu 0 indikuje odsustvo vezanosti, veće vrednosti ukazuju na veću neravnotežu vezanosti, a 1 na apsolutnu vezanost ili „savršenu neravnotežu vezanosti“ [197]. Rezultati su prikazani topografskim automatski generisanim LD graficima polimorfizama gde narandžasto-crvene nijanse predstavljaju $0 < D' < 1$, uz to da tamnije nijanse indikuju veći D' , a crvena boja $D' = 1$, a sivo-crne nijanse ukazuju na $0 < r^2 < 1$, a intenzitet boje je proporcionalan porastu r^2 .

Podaci su analizirani korišćenjem statističkog programa SPSS verzija 26 (*IBM, Armonk, NY, USA*). Provera normalnosti raspodele kontinuiranih varijabli Kolmogorov-Smirnov testom pokazala je da nijedna od testiranih varijabli ne prati normalnu raspodelu. Kontinuirane varijable predstavljene su medijanom (Mdn) i interkvartilnim opsegom (engl. *Interquartile range*; IQR), a kategorijske varijable kao procenat i apsolutni broj ispitanika u odgovarajućoj grupi. Značajnost razlike među vrednostima kontinualnih varijabli između grupa dihotomih ishoda testirana je Man-Vitni testom, dok je za više grupa primenjivan Kruskal-Volis test, sa naknadnim poređenjem grupa uz Bonferonijevu korekciju p vrednosti. Kategorijske varijable poređene su χ^2 testom ili Fišerovim egzaktnim testom, ukoliko je učestalost manja od 5 u 20% ćelija. Spirmanova korelacija ranga je korišćena za testiranje povezanosti dve kontinualne varijable. Povezanost između nezavisnih varijabli i ishoda od interesa (tj. razvoj teške forme bolesti i smrtni ishod) testirana je binarnom ili ordinalnom logističkom regresijom i naknadnom multivarijabilnom logističkom regresionom analizom sa postepenim isključivanjem varijabli unazad. Da bi se odredila jačina posmatrane povezanosti, za svaku nezavisnu promenljivu izračunati su odnosi šanse (engl. *Odds Ratio*; OR) sa odgovarajućim intervalima poverenja (engl. *Confidence interval*; CI) od 95%. Hosmer - Lemešov je korišćen za ocenjivanje kvaliteta predikcije modela. Vrednost granične verovatnoće (p) za sve testove bila je manja od 0,05. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

4. *Rezultati*

U ovoj doktorskoj disertaciji, rezultati su organizovani u šest celina, i to:

1. U prvoj celini, predstavljene su osnovne **demografske, kliničke i laboratorijske** karakteristike ispitanika u celoj kohorti, prema težini kliničke slike i ishodu SARS-CoV-2 infekcije.
2. Druga celina se bavi analizom **polimorfizama ACE2 gena**, koji kodira ključni protein za ulazak virusa SARS-CoV-2 u ćelije domaćina. Analizirana je učestalost alela, genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova ispitivanih polimorfizama, kao i njihova povezanost sa težinom kliničke slike i ishodom SARS-CoV-2 infekcije, ponaosob među ženama i muškarcima. Takođe, kreiran je multivarijabilni model koji oslikava uticaj ispitivanih polimorfizama ACE2 gena u kombinaciji sa demografsko-kliničkim parametrima na razvoj težeg oblika COVID-19 i smrtnog ishoda.
3. U trećem delu obrađena je analiza **koncentracije sACE2**, enzima koji je produkt obrade ACE2 proteina, u serumu pacijenata u COVID-19 kohorti. Razlike u nivou sACE2 analizirane su u svetlu ispitivanih polimorfizama ACE2 gena, težine kliničke slike i ishoda COVID-19 u celoj kohorti i stratifikovano prema polu.
4. U četvrtoj celini predstavljena je analiza **polimorfizama IFNL3 i IFNL4 gena**, čiji su produkti primarni akteri u imunskom odgovoru domaćina u toku respiratornih infekcija. Utvđena je učestalost alela, genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova ispitivanih polimorfizama. Takođe, analizirana je prediktivna vrednost polimorfizama na progresiju težine COVID-19, razvoj pneumonije, sa posebnim osvrtom na razvoj pneumonije kod žena, i smrtni ishod, ponaosob i u kombinaciji sa demografskim i kliničkim parametrima.
5. Peti deo obuhvata analizu **koncentracije IFN – λ 3 i IFN – λ 4**, prvih interferona koji se produkuju tokom virusnih respiratornih infekcija, u serumu pacijenata sa COVID-19. Koncentracija ovih proteina analizirana je u odnosu na polimorfizme IFNL3 i IFNL4 gena, težinu kliničke slike, prisustvo pneumonije i ishod bolesti.
6. Šesti deo predstavlja **sveobuhvatne modele predikcije** težine kliničke slike i ishoda SARS-CoV-2 infekcije u koji su uključeni svi prethodno statistički značajni genetički polimorfizmi, serumski nivou sACE2 i IFN- λ 3, laboratorijski i klinički parametri.

4.1. Analiza demografskih, kliničkih podataka i laboratorijskih parametara

4.1.1. Demografske, kliničke i laboratorijske karakteristike ispitivane populacije

Iz populacije obolelih od COVID-19 i hospitalizovanih u UKCKG, 178 pacijenata je zadovoljilo sve kriterijume za uključivanje i nijedan za neuključivanje. U studiju je uključeno 106 muškaraca (59,6%) i 72 žene (40,4%). Medijana starosti ispitanika bila je 60 godina (IQR: 49-69), a starost se kretala u opsegu od 19 do 88 godina, uz mali broj ispitanika mlađih od 50 godina (26,4%). Medijana CCI skora, kao mere opterećenja komorbiditetima, iznosila je 2 (IQR:1,0; 3,3). Pacijenti su prve simptome infekcije iskusili u proseku $8,1 \pm 4,6$ dana pre hospitalizacije. Prosečno vreme provedeno u UKCKG bilo je $15,4 \pm 7,2$ dana, dok je ukupno trajanje bolesti bilo $23,5 \pm 8,4$ dana.

U tabeli 2 prikazani su simptomi, auskultatorni i radiološki nalaz COVID-19 pacijenata na prijemu. Najveći broj pacijenata imao je povišenu telesnu temperaturu i kašalj, dok su bol u grudima, glavobolja, slabost i anosmija bili zastupljeni kod manje od 10% pacijenata. Oslabljen disajni zvuk i pukoti su bili najčešći auskultatorni nalaz na prijemu. Nešto manje od polovine hospitalizovanih pacijenata imalo je pojedinačna pneumonična ognjišta kao radiološki nalaz, dok manje od 20% pacijenata nije imalo aktivnih promena. Nalaz mlečnog stakla je bio prisutan kod samo sedam pacijenata.

Tabela 2. Simptomi, auskultatorni i radiološki nalaz COVID-19 pacijenata na prijemu

	Nema %(n)	Ima %(n)
Simptomi		
Febrilnost	17,6 (30)	82,4 (140)
Kašalj	27,6 (47)	72,4 (123)
Dispneja	74,1 (126)	25,9 (44)
Bol u grudima	92,4 (157)	7,6 (13)
Mijalgija	89,4 (152)	10,6 (18)
Glavobolja	92,9 (158)	7,1 (12)
Slabost	54,7 (93)	45,3 (77)
Bol u grlu	90,6 (154)	9,4 (16)
Anosmija	92,4 (157)	7,6 (13)
Digestivne tegobe	85,3 (145)	14,7 (25)
Auskultatorni nalaz		
Abnormalni disajni zvuk	29,9 (52)	70,1 (122)
Oslabljen disajni zvuk	54,0 (94)	46,0 (80)
Pooštren disajni zvuk	93,1 (162)	6,9 (12)
Pukoti	59,2 (103)	40,8 (71)
Zvižduci	95,4 (166)	4,6 (8)
Radiološki nalaz		
Aktivne promene	19,1 (34)	80,9 (144)
Naglašena bronhovaskularna šara	92,7 (165)	7,3 (13)
Intersticijske promene	73,6 (131)	26,4 (47)
Pojedinačna pneumonična ognjišta	55,6 (99)	44,4 (79)
Difuzna konfluentna pneumonična ognjišta	74,7 (133)	25,3 (45)
Homogena zasenčenja	97,8 (170)	2,2 (4)
Mlečno staklo	96,1 (174)	3,9 (7)

Osnovni hematološki i biohemijski parametri izmereni na dan hospitalizacije, prikazani su u tabeli 3. Broj leukocita kod pacijenata bio je u granicama referentnih vrednosti, dok je zastupljenost neutrofila i monocita bio veći, a udeo limfocita manji od referentnog. Posledično, vrednosti N/L parametra bile su veće od referentnog opsega. Nivo glikemije, AST i ALT su klinički zanemarljivo odstupali od referentnog opsega, dok su koncentracije LDH, D-dimera, CRP-a, PCT-a i pH krvi bile iznad normalnih vrednosti. Vrednosti pO₂, saturacija i koncentracija albumina bili su niži među COVID-19 pacijentima u odnosu na referentne opsege.

Tabela 3. Hematološki i biohemijski parametri COVID-19 pacijenata

	Referentne vrednosti	Mdn (IQR)
Hematološki parametri		
Leukociti (x10 ⁹ /L)	3,70 - 10	6,2 (4,4 - 8,2)
Neutrofili (%)	44 - 72	73,3 (61,6 - 84,1)
Limfociti (%)	20 - 46	13,7 (8,0 - 24,0)
N/L	1 - 2	4,9 (2,5 - 9,8)
Monociti (%)	0,78 - 3,53	8,0 (5,0 - 11,0)
Eritrociti (x10 ¹² /L)	3,86 - 5,08	4,5 (4,0 - 4,9)
Trombociti (x10 ⁹ /L)	135 - 450	208,0 (168,0 - 286,5)
Hemoglobin (g/L)	110 - 157	132,0 (118,0 - 140,0)
Biohemijski parametri		
Glikemija (mmol/L)	3,8 - 6,1	6,0 (5,1 - 7,7)
Urea (mmol/L)	3,0 - 8,0	5,7 (4,2 - 8,0)
Kreatinin (μmol/L)	49 - 106	81,0 (68,0 - 101,0)
Ukupni bilirubin (mmol/L)	5 - 21	9,0 (7,0 - 11,0)
Direktni bilirubin (μmol/L)	0,1 - 3,4	2,0 (1,7 - 3,0)
AST (IU/L)	0 - 40	37,0 (24,0 - 55,0)
ALT (IU/L)	0 - 40	37,5 (23,0 - 56,0)
Albumini (g/l)	35 - 52	35,0 (31,0 - 40,0)
LDH (U/L)	220 - 450	544,0 (403,0 - 750,0)
CK (U/L)	<190	101,0 (59,5 - 179,0)
D-dimer (ng/mL)	<0,5	0,8 (0,4 - 1,6)
CRP (mg/L)	<5,0	60,0 (12,8 - 136,0)
PCT (ng/mL)	<0,1	0,08 (0,03 - 0,195)
pO ₂ (kPa)	8,8 - 13,3	8,4 (7,3 - 9,8)
pCO ₂ (kPa)	4,7 - 6	4,5 (4,1 - 5,2)
Saturacija(%)	95 - 97	94 (91 - 97)
pH krvi	7,36 - 7,44	7,5 (7,4 - 7,5)
K (mmol/L)	3,5 - 5,3	4,0 (3,5 - 4,3)
Na (mmol/L)	137 - 147	137,0 (134,0 - 140,0)

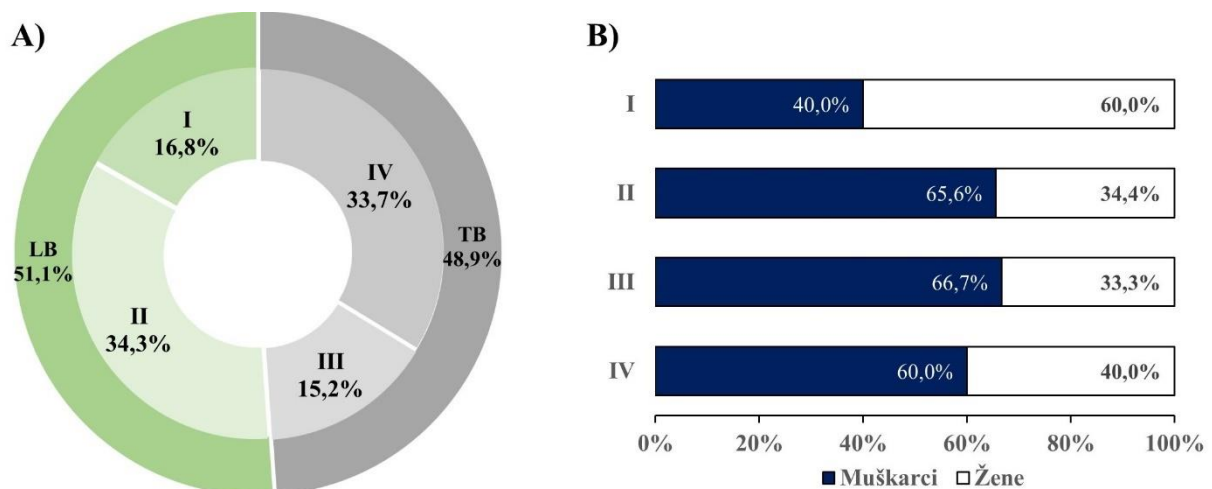
Mdn – medijana; IQR – interkvartilni opseg

U terapiji COVID-19 među hospitalizovanim pacijentima najčešće su primenjivani antibiotici. Tačnije, svi pacijenti su primali makar jedan antibiotik, a najčešće su aplikovani ceftriakson (55,6%) i azitromicin (67,4%) ponaosob ili u kombinaciji (44,9%). Hlorokin ili hidroksihlorokin primalo je 83,1% pacijenata, dok je kombinacijom antivirusa ritonavira i lopinavira lečeno 16,3% pacijenata. Nešto manje od polovine pacijenata (46,6%) tretirano je sistemskim kortikosteroidima, a 63,3% pacijenata je dobijalo antikoagulanse. ACE inhibitore kao grupu lekova od interesa, koristilo je 19,7% pacijenata u hroničnoj terapiji.

4.1.2. Analiza demografskih, kliničkih podataka i laboratorijskih parametara prema težini kliničke slike

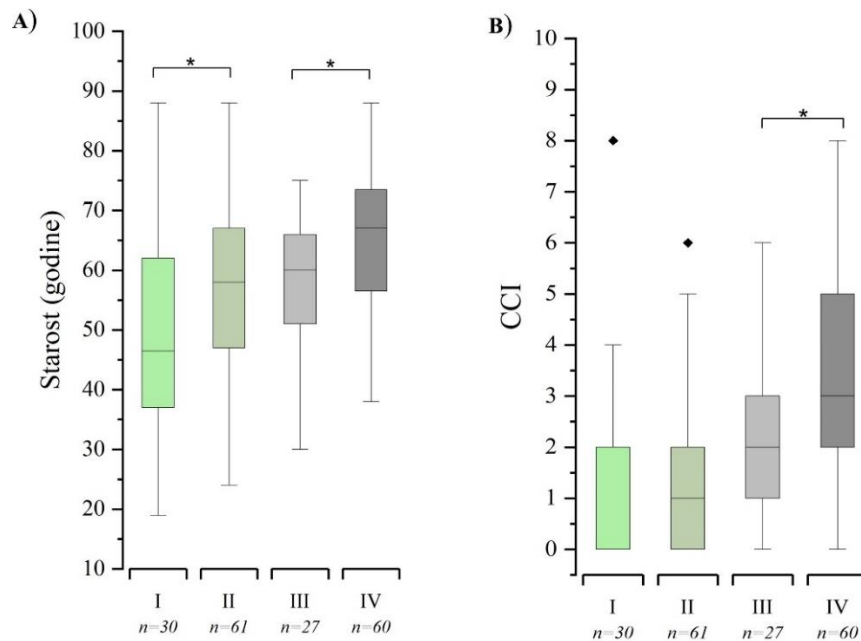
Raspodela učestalosti ispitanika prema težini kliničke slike u celjoj kohorti i stratifikovano prema polu prikazana je na grafikonu 1. Distribucija ispitanika sa lakšom i težom formom bolesti je bila približno jednaka. U lakšu formu (LB) COVID-19 ubrojano je 30 pacijenata sa lakom (I) i 61 pacijent sa umereno teškom (II) kliničkom slikom, dok je grupu sa težom formom bolesti (TB) činilo 27 teških (III) i 60 kritično teških (IV) pacijenata (grafikon 1A).

Polna distribucija prema kategorizaciji težine kliničke slike nije pokazala statistički značajne razlike ($\chi^2(3)=6,252, p=0,100$). Ipak, pacijenti muškog pola su činili više od polovine slučajeva u težim formama bolesti (II, III i IV), dok su žene dominirale u lakoj kategoriji (I). Ženski pol je nosio statistički značajno manje šanse za progresiju iz lake (I) u umerenu (II) formu COVID-19 (OR [95% CI] = 0,350 [0,142; 0,862], $p=0,022$), dok u napredovanju ka težim oblicima COVID-19 (II vs. III i III vs. IV) pol nije igrao značajnu ulogu ($p>0,05$).



Grafikon 1. Relativna učestalost pacijenata po kategorijama bolesti: I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška u A) celjoj kohorti i B) stratifikovano prema polu

Grafikon 2 pruža pregledan prikaz starosne strukture pacijenata i opterećenja komorbiditetima (CCI), rangiranih prema kategorijama kliničke slike. Starosna struktura ispitanika se statistički značajno razlikovala prema težini kliničke slike ($H(3)=26,357, p<0,001$). Starost ispitanika je progresivno rasla ka težim kategorijama kliničke slike, međutim, statistički značajna razlika među susednim kategorijama je bila prisutna između blage (I) i umerene (II) ($U=642, p=0,021$) i teške (III) i kritično teške (IV) forme ($U=545, p=0,015$). Stariji pacijenti su imali veću verovatnoću za progresiju iz blage (I) u umerenu (II) (OR[95%CI] = 1,036 [1,005; 1,067], $p=0,021$), teške (III) u kritično tešku (IV) formu (OR[95%CI] = 1,058 [1,016; 1,101], $p=0,006$). Statistički značajna razlika primećena je i u opterećenju komorbiditetima među pacijentima prema težini kliničke slike ($H(3)=42,310, p<0,001$). Viši CCI skor je bio pokazatelj predispozicije ka kritično teškoj bolesti (III vs. IV: $U=439, p=0,001$).



Grafikon 2. A) Starost i B) vrednosti CCI pacijenata klasifikovanih prema težini kliničke slike; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika; * - $p < 0,05$

Distribucija učestalosti simptoma, auskultatornog i radiološkog nalaza prema težini COVID-19 prikazana je u tabeli 4. U tabeli 5 prikazani su i rezultati univarijabilne logističke regresije za ove parametre.

Simptomi kao što su povišena temperatura i kašalj prijavljeni pri prijemu bili su povezani sa većom verovatnoćom napredovanja iz lake (I) u umerenu (II) formu bolesti. Dispneja, slabost, bol u grlu i anosmija su bili češći simptomi kod teške (III) forme u poređenju sa umerenom (II); dok su pacijenti koji su prijavili mialgiju imali manje šanse da napreduju iz teške (III) u kritičnu (IV) fazu bolesti.

Odsustvo normalnog auskultatornog nalaza nosilo je desetostuko veću verovatnoću za razvoj umerenog oblika (II) COVID-19. Oslabljen disajni zvuk i pukoti su bili značajno zastupljeniji među pacijentima sa težim oblicima (III i IV) u odnosu na one sa lakšim (I i II) oblikom bolesti. Ova dva patološka nalaza bila su skopčana sa statistički značajnim porastom verovatnoće za razvoj umerenog i teškog oblika COVID-19.

Nalaz aktivnih promena na prijemu bio je značajno učestaliji u grupi pacijenata sa umerenim oblikom (II), pri čemu je ovaj nalaz više od dvadeset puta povećavao verovatnoću za razvoj umerenog oblika (II) u toku hospitalizacije. Prisustvo aktivnih lezija na rendgenskom snimku grudnog koša, posebno pojedinačnih pneumoničnih ognjišta, bilo je povezano sa višestrukim povećanjem rizika za progresiju iz lake (I) u umerenu (II) kliničku sliku, dok su difuzna pneumonična ognjišta povećavala verovatnoću napredovanja ka kritično teškoj (IV) bolesti.

U tabelama 6 i 7 su prikazani nivoi hematoloških i biohemijskih parametara na prijemu, analizirani prema težini kliničke slike. Kada su upoređeni laki (I) i umereni (II), umereni (II) i teški (III), teški (III) i kritično teški (IV) slučajevi, viši odnos neutrofila prema limfocitima (N/L) i povišena vrednost LDH na prijemu su bili povezani sa ozbiljnijom formom bolesti. Pacijenti sa nižim koncentracijama albumina u krvi pri prijemu su imali veću verovatnoću da napreduju iz blage (I) u umerenu (II), i iz teške (III) u kritično tešku (IV) bolest.

Tabela 4. Relativna i apsolutna učestalost simptoma, auskultatornog i radiološkog nalaza na prijemu prema kategorijama težine COVID-19

	I n=30	II n=61	III n=27	IV n=60	$\chi^2^{a,b}$	<i>p</i>
Simptomi						
Febrilnost	60,0 (18)	91,8 (56)	80,8 (21)	84,9 (45)	14,345	0,002
Kašalj	36,7 (11)	83,6 (51)	84,6 (22)	73,6 (39)	24,956	<0,001
Dispneja	6,7 (2)	19,7 (12)	42,3 (11)	35,8 (19)	13,402	0,004
Bol u grudima	3,3 (1)	6,6 (4)	3,8 (1)	13,2 (7)	3,745	0,290
Mijalgija	13,3 (4)	9,8 (6)	23,1 (6)	3,8 (2)	7,158	0,067
Glavobolja	0,0 (0)	8,2 (5)	3,8 (1)	11,3 (6)	4,275	0,233
Slabost	30,0 (9)	32,8 (20)	65,4 (17)	58,5 (31)	14,643	0,002
Bol u grlu	16,7 (5)	4,9 (3)	19,2 (5)	5,7 (3)	7,112	0,068
Anosmija	3,3 (1)	3,3 (2)	23,1 (6)	7,5 (4)	11,204	0,011
Digestivne tegobe	10,0 (3)	14,8 (9)	19,2 (5)	15,1 (8)	0,961	0,811
Auskultatorni nalaz						
Abnormalni disajni zvuk	20,0 (6)	65,6 (40)	85,2 (23)	94,6 (53)	55,563	<0,001
Oslabljen disajni zvuk	10,0 (3)	37,7 (23)	55,6 (15)	69,6 (39)	30,393	<0,001
Pooštren disajni zvuk	3,3 (1)	8,2 (5)	11,1 (3)	5,4 (3)	1,707	0,635
Pukoti	6,7 (2)	32,8 (20)	55,6 (15)	60,7 (34)	27,720	<0,001
Zvižduci	0,0 (0)	3,3 (2)	3,7 (1)	8,9 (5)	4,132	0,248
Radiološki nalaz						
Aktivne promene	26,7 (8)	83,8 (51)	96,3 (26)	98,3 (59)	73,334	<0,001
Naglašena bronhovaskularna šara	6,7 (2)	8,2 (5)	11,1 (3)	5,0 (3)	1,138	0,768
Intersticijske promene	13,3 (4)	29,5 (18)	37,0 (10)	25,0 (15)	4,527	0,206
Pojedinačna pneumonična ognjišta	3,3 (1)	52,5 (32)	55,6 (15)	51,7 (31)	24,746	<0,001
Difuzna konfluentna ognjišta	0,0 (0)	11,5 (7)	22,2 (6)	53,3 (32)	41,435	<0,001
Homogna zasencenja	0,0 (0)	4,9 (3)	0,0 (0)	1,7 (1)	3,383	0,336
Mlečno staklo	0,0 (0)	0,0 (0)	3,7 (1)	10,0 (6)	9,576	0,023

Rezultati su predstavljeni kao % (n); ^a – Pirsonov hi-kvadrat; ^b – df=3; *p* – nivo značajnosti; NP- nije primenljivo; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

Tabela 5. Povezanost simptoma, auskultatornog i radiološkog nalaza na prijemu sa težinom COVID-19

Simptomi	I vs. II		II vs. III		III vs. IV	
	OR [95%CI]	<i>p</i>	OR [95%CI]	<i>p</i>	OR [95%CI]	<i>p</i>
Febrilnost	7,467 [2,316; 24,073]	0,001	0,375 [0,098; 1,428]	0,151	1,339 [0,391; 4,589]	0,624
Kašalj	8,809 [3,223; 24,076]	<0,001	1,078 [0,305; 3,812]	0,907	0,506 [0,148; 1,729]	0,278
Dispneja	3,429 [0,715; 16,536]	0,123	2,994 [1,099; 8,155]	0,032	0,762 [0,292; 1,989]	0,579
Bol u grudima	2,035 [0,217; 19,048]	0,533	0,570 [0,061; 5,361]	0,623	3,804 [0,443; 32,697]	0,223
Mijalgija	0,709 [0,184; 2,731]	0,617	2,750 [0,794; 9,521]	0,110	0,131 [0,024; 0,703]	0,018
Glavobolja	ND	ND	0,448 [0,050; 4,036]	0,474	3,191 [0,364; 28,005]	0,295
Slabost	1,1387 [0,442; 2,932]	0,789	3,872 [1,470; 10,202]	0,006	0,746 [0,281; 1,978]	0,556
Bol u grlu	0,259 [0,057; 1,166]	0,078	4,603 [1,011; 20,961]	0,048	0,252 [0,055; 1,151]	0,075
Anosmija	0,983 [0,086; 11,293]	0,989	8,850 [1,651; 47,425]	0,011	0,272 [0,069; 1,069]	0,062
Digestivne tegobe	1,558 [0,389; 6,234]	0,531	1,376 [0,412; 4,590]	0,604	0,747 [0,218; 1,559]	0,642
Auskultatorni nalaz						
Abnormalni disajni zvuk	7,634 [2,695; 21,739]	<0,001	3,021 [0,922; 9,900]	0,068	3,077 [0,636; 14,925]	0,162
Oslabljen disajni zvuk	5,447 [1,484; 19,995]	0,011	2,065 [0,824; 5,176]	0,122	1,835 [0,710; 4,741]	0,210
Pooštren disajni zvuk	2,589 [0,289; 23,214]	0,395	1,400 [0,310; 6,332]	0,662	0,453 [0,085; 2,409]	0,353
Pukoti	6,829 [1,477; 31,568]	0,014	2,562 [1,013; 6,485]	0,047	1,236 [0,488; 3,132]	0,655
Zvižduci	ND	ND	1,135 [0,098; 13,075]	0,919	2,549 [0,283; 22,967]	0,404
Radiološki nalaz						
Aktivne promene	14,286 [4,205; 40,00]	<0,001	5,102 [0,618; 41,667]	0,130	2,267 [0,136; 37,037]	0,568
Naglašena bronhovaskularna šara	1,250 [0,228; 6,852]	0,797	1,400 [0,310; 6,332]	0,662	0,421 [0,079; 2,236]	0,310
Intersticijske promene	2,721 [0,830; 8,924]	0,099	4,405 [0,541; 3,653]	0,485	0,567 [0,214; 1,503]	0,254
Pojedinačna pneumonična ognjišta	32,000 [4,096; 250,0]	0,001	1,133 [0,456; 2,815]	0,788	0,855 [0,343; 2,130]	0,737
Difuzna konfluentna ognjišta	ND	ND	2,204 [0,663; 7,327]	0,197	4,000 [1,415; 11,310]	0,009
Homogna zasencenja	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mlečno staklo	ND	ND	ND	ND	2,889 [0,330; 25,253]	0,338

OR [95%CI] – odnos šansi sa 95% intervalom poverenja; ND – nije determinisano; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

Tabela 6. Vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara na prijemu prema kategorijama težine COVID-19

	I n=30	II n=61	III n=27	IV n=60	Kruskal Volis H ^a
Hematološki parametri					
Leukociti (x10 ⁹ /L)	4,3 (3,46 - 5,97)	5,67 (4,29 - 7,47)	6,83 (5,7 - 10,32)	7,06 (5 - 10,48)	29,061[†]
Neutrofili (%)	57,76 (50,75 - 64,90)	71 (61,51 - 78,62)	79 (73 - 83)	84 (72,75 - 88,98)	48,477[†]
Limfociti (%)	30,83 (21,75 - 35,01)	19 (12 - 25,11)	12 (9 - 16,26)	7 (3,10 - 11)	74,435[†]
N/L	1,85 (1,47 - 2,92)	3,55 (2,42 - 6,75)	6,92 (4,33 - 9,89)	10,38 (6,26 - 21,86)	66,365[†]
Monociti (%)	10,74 (7,94 - 12,90)	9 (7 - 12,06)	7 (4,39 - 11,62)	5 (2,25 - 7)	51,408[†]
Eritrociti (x10 ¹² /L)	4,57 (3,99 - 4,91)	4,63 (4,09 - 4,94)	4,51 (4,25 - 4,91)	4,32 (3,81 - 4,7)	5,82
Trombociti (x10 ⁹ /L)	184 (155,25 - 220,5)	238 (182 - 331,5)	197 (170 - 284)	203 (159 - 255)	8,64*
Hemoglobin (g/L)	129 (120 - 143,5)	134 (118 - 142,5)	135 (121 - 141)	124 (114,5 - 136)	6,725
Biohemijski parametri					
Glikemija (mmol/L)	5,1 (4,7 - 6,23)	5,6 (4,9 - 6,55)	6 (5,3 - 7,8)	7,5 (5,88 - 9,93)	32,143[†]
Urea (mmol/L)	4,8 (3,35 - 6,38)	5,6 (4,05 - 6,99)	4,8 (3,4 - 9)	6,8 (4,8 - 10,2)	14,726*
Kreatinin (μmol/L)	75,5 (65 - 99,3)	81 (68,5 - 100)	83 (69 - 102)	88 (68, - 108)	1,215
Ukupni bilirubin (mmol/L)	9,2 (7 - 11,6)	8,1 (7 - 11)	10 (7,75 - 11,25)	9,1 (6,25 - 11)	1,865
Direktni bilirubin (μmol/L)	1,8 (1 - 2,2)	2 (1,35 - 3)	3 (2 - 4)	2,3 (1,73 - 3,75)	8,512*
AST (IU/L)	24 (19,5 - 33)	33 (23 - 47)	51 (34 - 70,5)	52 (37 - 81)	42,231[†]
ALT (IU/L)	20,5 (16 - 42,5)	37 (24 - 54,5)	44 (28 - 78)	43 (26 - 67)	16,379[†]
Albumini (g/l)	42 (38 - 44,75)	37 (33,75 - 40)	35 (30,5 - 40,5)	31 (27 - 34)	54,319[†]
LDH (U/L)	373 (317 - 464,25)	459 (379 - 597)	733 (578 - 855)	848 (670 - 1,051)	74,617[†]
KK (U/L)	87 (60,5 - 157)	88 (57,5 - 165,5)	90,5 (44 - 130,75)	158 (78,5 - 307)	8,634
D-dimer (ng/mL)	0,4 (0,24 - 0,61)	0,7 (0,4 - 1,59)	1,14 (0,67 - 3,3)	1,19 (0,74 - 2)	26,57[†]
CRP (mg/L)	5,2 (1,9 - 14,8)	39,7 (11,35 - 85,5)	105,6 (49 - 171)	135,3 (73,5 - 196,85)	73,709[†]
PCT (ng/mL)	0,03 (0,02 - 0,06)	0,05 (0,02 - 0,1)	0,13 (0,09 - 0,21)	0,22 (0,1 - 0,66)	55,152[†]
pO ₂ (kPa)	9,9 (9,7 - 11,1)	8,65 (7,98 - 9,93)	8,1 (7,4 - 9,6)	7,7 (6,4 - 8,9)	20,016[†]
pCO ₂ (kPa)	4,7 (4,1 - 4,9)	4,5 (4,18 - 5,03)	4,5 (4,2 - 4,9)	5,2 (4 - 6)	3,843
Saturacija(%)	97 (96 - 98)	95 (94 - 97)	93 (91 - 96)	91 (85 - 93)	55,396[†]
pH krvi	7,45 (7,44 - 7,47)	7,47 (7,43 - 7,5)	7,47 (7,41 - 7,5)	7,44 (7,4 - 7,5)	4,678
K (mmol/L)	4,1 (3,85 - 4,33)	4,2 (3,7 - 4,4)	3,8 (3,4 - 4,2)	3,8 (3,3 - 4,3)	5,699
Na (mmol/L)	139 (134,75 - 141)	136 (134, - 141)	136 (133 - 139)	137 (133,75 - 140,25)	3,728

Rezultati su predstavljeni kao medijana (Mdn) sa interkvartilnim opsegom (IQR); ^a – df=3; * – p<0,05; [†] – p<0,001; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

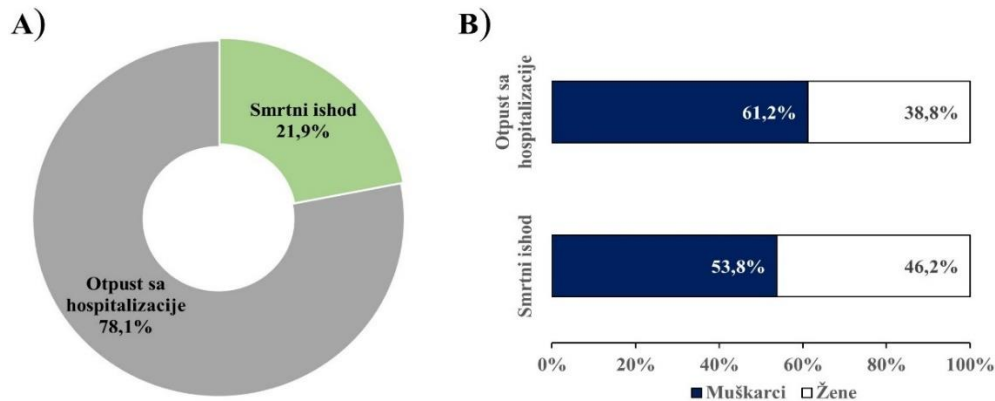
Tabela 7. Povezanost hematoloških i biohemijskih parametara na prijemu sa težinom COVID-19

	I vs. II		II vs. III		III vs. IV	
	OR [95%CI]	<i>p</i>	OR [95%CI]	<i>p</i>	OR [95%CI]	<i>p</i>
Hematološki parametri						
Leukociti (x10 ⁹ /L)	1,275 [1,011; 1,608]	0,040	1,162 [1,021; 1,323]	0,023	1,015 [0,916; 1,126]	0,772
Neutrofili (%)	1,095 [1,045; 1,148]	<0,001	1,075 [1,023; 1,130]	0,004	0,992 [0,972; 1,014]	0,487
Limfociti (%)	0,904 [0,857; 0,953]	<0,001	0,910 [0,852; 0,972]	0,005	0,913 [0,855; 0,975]	0,006
N/L	1,208 [1,011; 1,443]	0,037	1,153 [1,030; 1,290]	0,013	1,117 [1,023; 1,219]	0,014
Monociti (%)	0,919 [0,816; 1,033]	0,158	0,893 [0,790; 1,011]	0,073	1,002 [0,993; 1,012]	0,649
Eritrociti (x10 ¹² /L)	1,223 [0,759; 1,970]	0,408	0,913 [0,661; 1,262]	0,583	0,707 [0,365; 1,367]	0,302
Trombociti (x10 ⁹ /L)	1,007 [1,001; 1,013]	0,014	0,998 [0,993; 1,002]	0,293	0,998 [0,993; 1,003]	0,388
Hemoglobin (g/L)	0,994 [0,974; 1,015]	0,568	1,006 [0,978; 1,034]	0,697	0,971 [0,941; 1,002]	0,064
Biohemijski parametri						
Glikemija (mmol/L)	1,297 [0,893; 1,882]	0,172	1,286 [1,017; 1,626]	0,036	1,099 [0,962; 1,254]	0,164
Urea (mmol/L)	1,131 [0,937; 1,366]	0,201	1,004 [0,922; 1,094]	0,919	1,076 [0,967; 1,197]	0,179
Kreatinin (μmol/L)	1,004 [0,984; 1,024]	0,691	1,008 [0,991; 1,025]	0,376	1,003 [0,996; 1,011]	0,399
Ukupni bilirubin (mmol/L)	0,987 [0,898; 1,083]	0,777	1,019 [0,919; 1,130]	0,720	0,991 [0,884; 1,112]	0,883
Direktni bilirubin (μmol/L)	1,235 [0,889; 1,717]	0,209	1,157 [0,863; 1,551]	0,330	0,975 [0,692; 1,373]	0,884
AST (IU/L)	1,041 [1,006; 1,078]	0,021	1,029 [1,007; 1,051]	0,008	1,000 [0,991; 1,010]	0,963
ALT (IU/L)	1,022 [1,001; 1,044]	0,042	1,010 [0,999; 1,020]	0,065	0,998 [0,991; 1,005]	0,566
Albumini (g/l)	0,862 [0,780; 0,953]	0,004	0,931 [0,844; 1,026]	0,149	0,839 [0,751; 0,939]	0,002
LDH (U/L)	1,005 [1,001; 1,008]	0,012	1,008 [1,004; 1,011]	0,000	1,003 [1,000; 1,005]	0,028
KK (U/L)	0,999 [0,995; 1,002]	0,536	1,000 [0,996; 1,004]	0,886	1,004 [0,999; 1,008]	0,088
D-dimer (ng/mL)	1,016 [0,962; 1,073]	0,564	0,991 [0,940; 1,043]	0,720	0,946 [0,812; 1,101]	0,471
CRP (mg/L)	1,027 [1,009; 1,046]	0,004	1,013 [1,005; 1,021]	0,001	1,005 [0,999; 1,012]	0,095
PCT (ng/mL)	395,305 [0,173; 905,358]	0,130	379,307 [2,843; 50,608]	0,017	1,362 [0,670; 2,769]	0,393
pO ₂ (kPa)	0,668 [0,449; 0,994]	0,047	0,745 [0,529; 1,048]	0,091	0,901 [0,719; 1,129]	0,365
pCO ₂ (kPa)	0,977 [0,282; 3,387]	0,971	0,793 [0,311; 2,020]	0,626	1,745 [0,984; 3,093]	0,057
Saturacija(%)	1,038 [0,870; 1,240]	0,677	0,793 [0,311; 2,020]	0,626	0,884 [0,788; 0,992]	0,036
pH krvi	0,477 [0,033; 6,881]	0,587	2,218 [0,306; 16,073]	0,430	0,007 [0,000; 10,431]	0,184
K (mmol/L)	1,030 [0,927; 1,143]	0,585	0,656 [0,292; 1,477]	0,309	1,032 [0,504; 2,113]	0,932
Na (mmol/L)	0,956 [0,875; 1,046]	0,328	0,966 [0,881; 1,060]	0,470	1,031 [0,937; 1,134]	0,534

OR [95% CI] – odnos šansi sa 95% intervalom poverenja; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

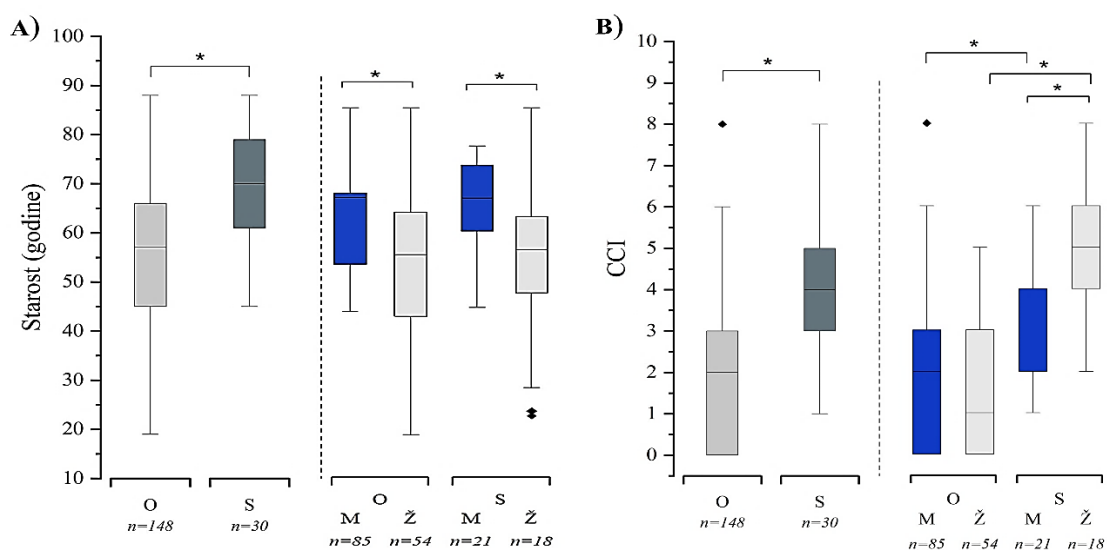
4.1.3. Analiza demografskih, kliničkih podataka i laboratorijskih parametara prema ishodu bolesti

Na grafikonu 3 prikazana je raspodjela pacijenata prema ishodu u celoj kohorti i stratifikovano prema polu. Petina hospitalizovanih pacijenata je preminula. Stopa smrtnosti kritično obolelih pacijenata koji su lečeni u jedinici intenzivne nege iznosila je 65%. Svi pacijenti sa fatalnim ishodom su imali sepsu; među njima 22(56,4%) je imalo septični šok i 7(17,9%) ARDS. Iako nije bilo statistički značajne razlike u polnoj distribuciji među otpuštenim i preminulim pacijentima ($\chi^2(1)=0,405$, $p=0,524$), veća stopa mortaliteta zabeležena je među ženama u odnosu na muškarce (25% (18/72) vs. 19,8% (21/106)).



Grafikon 3. Relativna učestalost pacijenata otpuštenih sa lečenja i sa smrtnim ishodom u toku hospitalizacije u A) celoj kohorti i B) stratifikovano prema polu

Starost pacijenata i opterećenje komorbiditetima otpuštenih i preminulih pacijenata prikazani su na grafikonu 4. Stariji pacijenti su imali statistički značajno veću verovatnoću za smrtni ishod OR[95%CI]=1,08[1,045; 1,116], $p<0,001$). Iako nije uočena statistički značajna razlika u starosnom profilu otpuštenih i preminulih žena ($U=2161,5$, $p=0,564$) ili muškaraca ($U=122$, $p=0,059$), starija dob je kod pacijenata oba pola bila značajno povezana sa smrtnim ishodom (žene: OR [95%CI]=1,114[1,049; 1,182], $p<0,001$; muškarci: OR[95%CI]=1,057 [1,015; 1,102], $p=0,008$).



Grafikon 4. A) Starost i B) vrednosti CCI pacijenata otpuštenih sa lečenja (O) i preminulih (S) u toku hospitalizacije u celoj kohorti i stratifikovano prema polu; * - $p<0,05$

Vrednost CCI skora su se statistički značajno razlikovale među otpuštenim i preminulim pacijentima ($U=969$, $p<0,001$). Pacijenti sa većim brojem komorbiditeta su imali 1,9 (95% CI: 1,553; 2,516, $p<0,001$) puta veću verovatnoću za smrtni ishod. Uticaj komorbiditeta (CCI) na smrtni ishod tokom hospitalizacije bio je izraženiji kod žena (OR [95%CI]=3,656[1,937; 6,900]) u odnosu na muškarce (OR[95% CI]=1,521[1,153; 2,006]). Među preminulim pacijentima, značajno viši CCI je zabeležen kod žena nego kod muškaraca ($U=101$, $p=0,012$).

Rezultati analize distribucije učestalosti simptoma, auskultatornog i radiološkog nalaza među otpuštenim pacijentima i pacijentima preminulim tokom hospitalizacije, kao i njihova uloga u smrtnom ishodu kao nezavisnih prediktora prikazana je u tabeli 8.

Tabela 8. Relativna i apsolutna učestalost simptoma, auskultatornog i radiološkog nalaza na prijemu i njihova povezanost sa ishodom COVID-19

	Otpušteni n=148	Preminuli n=39	χ^2 ^{a,b}	<i>p</i>	OR [95%CI]	<i>p</i>
Simptomi						
Febrilnost	81,8 (112)	84,8 (28)	0,175	0,675	0,614 [0,272 - 1,385]	0,240
Kašalj	70,1 (96)	81,8 (27)	11,294	0,255	1,922 [0,738 - 5,005]	0,181
Dispneja	22,6 (31)	39,4 (13)	3,072	0,080	2,223 [0,994 - 4,970]	0,052
Bol u grudima	7,3 (10)	9,1 (3)	NP ^v	0,719	1,270 [0,329 - 4,900]	0,729
Mijalgija	12,4 (17)	3,0 (1)	1,579	0,209	0,221 [0,028 - 1,721]	0,149
Glavobolja	5,8 (8)	12,1 (4)	NP ^c	0,251	2,224 [0,627 - 7,888]	0,216
Slabost	41,6 (57)	60,6 (20)	3,146	0,076	2,159 [0,993 - 4,694]	0,052
Bol u grlu	10,2 (14)	6,1 (2)	0,162	0,687	0,567 (0,122 - 2,626)	0,468
Anosmija	8,0 (11)	6,1 (2)	NP ^c	1,000	0,739 [0,156 - 3,506]	0,703
Digestivne tegobe	15,3 (21)	12,1 (4)	0,037	0,847	0,762 [0,243 - 2,392]	0,641
Auskultatorni nalaz						
Abnormalni disajni zvuk	63,8 (88)	94,4 (34)	12,823	<0,001	9,659 [2,226 - 41,914]	0,002
Oslabljen disajni zvuk	40,6 (56)	66,7 (21)	6,808	0,009	2,929 [1,354 - 6,336]	0,006
Pooštren disajni zvuk	8,0 (11)	2,8 (1)	NP ^c	0,460	0,330 [0,041 - 2,643]	0,296
Pukoti	33,3 (46)	69,4 (25)	13,955	<0,001	4,545 [2,058 - 10,041]	<0,001
Zvižduci	3,6 (5)	9,3 (3)	NP ^c	0,370	2,418 [0,550 - 10,636]	0,243
Radiološki nalaz						
Aktivne promene	76,3 (106)	97,4 (38)	7,521	0,006	11,830 [1,564 - 89,507]	0,017
Naglašena bronhovaskularna šara	7,9 (11)	5,1 (2)	NP ^c	0,736	0,629 [0,133 - 2,965]	0,558
Intersticijske promene	25,9 (36)	28,2 (11)	0,007	0,934	1,124 [0,508 - 2,487]	0,773
Pojedinačna pneumonična ognjišta	41 (57)	56,4 (22)	2,336	0,126	1,862 [0,908 - 3,815]	0,090
Difuzna konfluentna ognjišta	18,7 (23)	48,7 (19)	12,977	<0,001	4,129 [1,933 - 8,819]	<0,001
Homogna zasencenja	3,6 (5)	7,7 (3)	NP ^c	1,000	2,233 [0,509 - 9,79]	0,287
Mlečno staklo	2,2 (3)	2,6 (1)	NP ^c	0,179	1,193 [0,121 - 11,799]	0,880

^a – Jejtsova korekcija kontinuiteta; ^b – $df=1$; ^c – Fišerov egzakni test; *p* – nivo značajnosti; OR [95% CI] – odnos šansi sa 95% intervalom poverenja; NP – nije primenljivo

Učestalost simptoma prijavljenih na prijemu pacijenata u UKCKG se nije značajno razlikovala među poređenim grupama. Gotovo svi pacijenti bez normalnog disajnog zvuka na auskultatornom nalazu bili su u grupi pacijenata koji su preminuli, pri čemu je ovaj nalaz skoro desetostruko povećavao verovatnoću za letalni ishod. Nalazi oslabljenog disajnog zvuka i pukota bili su značajno frekventniji u grupi pacijenata koji nisu preživeli SARS-CoV-2 infekciju. Pacijenti sa ovim patološkim auskultatornim nalazima imali su dva do četiri puta veći odnos šansi za fatalni ishod. Prisustvo aktivnih promena u radiološkom nalazu na prijemu višestruko je povećavalo šansu za letalni ishod u odnosu na pacijente sa normalnim nalazom.

Pacijenti sa difuznim konfluentnim pneumoničnim ognjištima imali su značajno veći rizik za smrtni ishod bolesti.

Tabela 9 pruža pregled vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara na prijemu u UKCKG prema ishodu bolesti i njihove povezanosti sa smrtnim ishodom tokom hospitalizacije. Pacijenti sa višim brojem leukocita i N/L odnosom, kao i nižim procentom limfocita i monocita, imali su značajno povećan rizik od fatalnog ishoda. Takođe, viši nivoi glikemije, uree, kreatinina, LDH, CK, CRP i PCT, bili su značajni prediktori smrti tokom hospitalizacije. S druge strane, viši nivo albumina i viši pO₂ na prijemu bili su statistički značajni indikatori otpusta iz bolnice.

Tabela 9. Vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara na prijemu i njihova povezanost sa ishodom COVID-19

	Otpušteni n=139	Preminuli n=39	Man Vitni U	OR [95%CI]	<i>p</i>
Hematološki parametri					
Leukociti (x10 ⁹ /L)	5,9 (4,2-8,35)	7,2 (4,85-10,6)	2036,00*	1,108 [1,021; 1,203]	0,014
Neutrofili (%)	72 (61,14-83)	84 (71,75-89,75)	1769,50*	0,998 [0,98; 1,016]	0,799
Limfociti (%)	18 (10-26,04)	6,05 (2,5 - 10,15)	876,00†	0,834 [0,778; 0,894]	<0,001
N/L	3,97 (2,29 - 7,80)	12 (7,45 - 22,42)	3,656†	1,130 [1,070; 1,194]	<0,001
Monociti (%)	8,64(6,05- 11,75)	4 (1,80 - 7)	1097,00†	0,726 [0,642; 0,82]	<0,001
Eritrociti (x10 ¹² /L)	4,56 (4,08 - 4,87)	4,28 (3,8 - 4,68)	2078,00*	0,791 [0,503; 1,244]	0,311
Trombociti (x10 ⁹ /L)	210 (170 - 295,5)	191,5(156,5-231,5)	2183,50	0,996 [0,992; 1,001]	0,090
Hemoglobin (g/L)	134 (119,5 - 141)	123,5 (115 - 135,5)	1902,00*	0,978 [0,957; 1,000]	0,047
Biohemijski parametri					
Glikemija (mmol/L)	5,8 (5,05-7,5)	8 (7-10,4)	1737,50*	1,124 [1,023; 1,235]	0,015
Urea (mmol/L)	5,5 (4,15-7,4)	6 (5,3-91)	1530,50†	1,111 [1,034; 1,194]	0,004
Kreatinin (µmol/L)	85 (72-98)	93 (63,5-96)	2106,50	1,012 [1,002; 1,023]	0,023
Ukupni bilirubin (mmol/L)	9 (7-11)	9 (7-12,6)	884,00	1,023 [0,927; 1,129]	0,649
Direktni bilirubin (µmol/L)	2 (1,15-3)	2,9 (1,5-5,5)	979,50	1,171 [0,892; 1,539]	0,256
AST (IU/L)	38 (29-55,5)	52 (33-86)	1041,00*	1,003 [0,993; 1,012]	0,542
ALT (IU/L)	42 (24-64)	52 (27,5-64,5)	1974,00	0,995 [0,984; 1,006]	0,380
Albumini (g/l)	38 (34-41)	32 (29-34)	826,00†	0,819 [0,751; 0,894]	<0,001
LDH (U/L)	521(419,5-718,5)	753 (640,5-1026)	494,50†	1,004 [1,002; 1,006]	<0,001
CK (U/L)	105 (62-182)	162 (139,4-195)	1309,50*	1,002 [1,000; 1,003]	0,028
D-dimer (ng/mL)	0,67 (0,48-1,47)	0,7 (0,49-1,96)	1251,50*	0,987 [0,921; 1,058]	0,716
CRP (mg/L)	59 (24-115)	127 (83,5-2020)	1143,50†	1,011 [1,006; 1,016]	<0,001
PCT (ng/mL)	0,09 (0,05-0,17)	0,17 (0,13-0,64)	804,50†	8,227 [1,816; 37,26]	0,006
pO ₂ (kPa)	8,7 (8-9,85)	7,9 (7,3-8,4)	759,00*	0,737 [0,583; 0,933]	0,011
pCO ₂ (kPa)	4,5 (4,15-4,9)	4,8 (4,05-6,3)	1141,00	1,000 [1,000; 1,001]	0,636
Saturacija(%)	94 (91-96)	91 (90-92)	737,00†	0,242 [0,033; 1,787]	0,164
pH krvi	7,47 (7,44-7,50)	7,45 (7,40-7,51)	1000,50	1,302 [0,34; 4,988]	0,701
K (mmol/L)	3,9 (3,5-4,2)	4 (2,95-4,35)	2244,00	0,85 [0,468;1,543]	0,592
Na (mmol/L)	137 (134-140)	132,5 (136-137,5)	2498,00	1,007 [0,937;1,083]	0,844

Rezultati su predstavljani kao medijana (Mdn) sa interkvartilnim opsegom (IQR); * - p<0,05; † - p<0,001; p – nivo značajnosti; OR [95%CI] – odnos šansi sa 95% intervalom poverenja

4.2. Analiza polimorfizama ACE2 gena

4.2.1. Analiza polimorfizama ACE2 gena u celoj populaciji

4.2.1.1. Učestalost alela, genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova u ispitivanoj populaciji

Genotipizacija polimorfizma rs2106809 ACE2 gena, sprovedena je kod 178 pacijenata, dok je na prisustvo ACE2 rs2074192 polimorfizma testirano 169 pacijenata. Učestalosti alela, genotipova i genotipskih grupa za navedene polimorfizme stratifikovane prema polu predstavljeni su u tabeli 10.

Raspodela genotipova za polimorfizam rs2074192 u čitavoj ispitivanoj populaciji nije odstupala od Hardy-Vajnbergove ravnoteže ($\chi^2(2)=5,811$, $p=0,05$), za razliku od polimorfizma rs2106809, gde je prisutna statistički značajna razlika u očekivanoj i opserviranoj učestalosti genotipova ($\chi^2(2)=8,901$, $p=0,01$). Učestalost manje zastupljenog alela rs2106809 G bila je 17%, dok je zastupljenost rs2074192 T alela bila 42% u čitavoj kohorti. Nosioca varijantnog alela u muškoj populaciji, tj. varijantnog hemizigota, za rs2106809 je bilo gotovo dva puta više nego u populaciji žena, dok je raspodela alela rs2074192 bila slična među polovima. Varijantni homozigoti činili su manje od 5% populacije žena (tablela 10).

Tabela 10. Učestalosti alela, genotipova, genotipskih grupa polimorfizama ACE2 gena stratifikovane prema polu

		Učestalost	[95% CI]
Aleli			
Ž:	rs2106809 (A>G)	12,5 (18/144)	[8,0; 19,0]
	rs2074192 (C>T)	48,6 (70/144)	[40,6; 56,7]
M:	rs2106809 (A>G)	24,5 (26/106)	[19,6; 31,3]
	rs2074192 (C>T)	34,0 (33/97)	[28,0; 41,3]
Genotipovi*			
rs2106809	A/A	79,2 (57/72)	[68,3; 87]
	A/G	16,7 (12/72)	[9,7; 27,1]
	G/G	4,2 (3/72)	[1,0; 12,2]
rs2074192	C/C	27,8 (20/72)	[18,8; 39,1]
	C/T	47,2 (34/72)	[36,1; 58,6]
	T/T	25,0 (18/72)	[16,4; 36,2]
Genotipske grupe*			
Domiinantni model			
rs2106809	A/A	79,2 (57/72)	[68,3; 87,0]
	A/G + G/G	20,8 (15/72)	[13,0; 31,7]
rs2074192	C/C	27,8 (20/72)	[18,8; 39,1]
	C/T + T/T	72,2 (52/72)	[60,9; 81,2]
Recesivni model			
rs2106809	A/A + A/G	95,8 (69/72)	[87,8; 99,0]
	G/G	4,2 (3/72)	[1,0; 12,2]
rs2074192	C/C + C/T	75,0 (54/72)	[63,8; 83,6]
	T/T	25,0 (18/72)	[16,4; 36,2]

*žene; 95% CI – 95% interval poverenja

Haplotipskom analizom definisani su haplotipovi i diplotipovi *ACE2* gena prisutni u populaciji. Rezultati ove analize stratifikovani prema polu prikazani su u tabeli 11. Analizom kombinacija polimorfizama rs2106809 i rs2074192 *ACE2* gena zabeležena su četiri haplotipa u celoj kohorti i sedam diplotipova u populaciji žena, pri čemu homozigotni varijantni diplotipovi nisu bili prisutni. U celokupnoj populaciji učestalost varijantnog haplotipa G-T bila je 5,4%, uz nešto višu zastupljenost u populaciji žena i nižu među muškarcima. Najfrekventniji bio je diplotip sa jednim varijantnim alelom (A-C/A-T), praćen divljim diplotipom (A-C/A-C) i homozigotom za A-T kombinaciju u istim procijama. Tri diplotipa (A-C/G-C, A-T/G-T i G-C/G-C) bila su zastupljena u manje od 5% populacije ženskog pola.

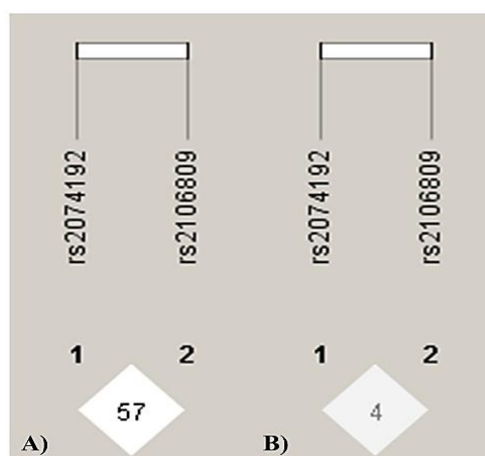
Tabela 11. Učestalosti haplotipova i diplotipova *ACE2* gena stratifikovane prema polu

Haplotipovi		Žene		Muškarci	
		Učestalost	[95% CI]	Učestalost	[95% CI]
rs2106809- rs2074192	A-C	46,5 (777/144)	[38,6; 54,7]	42,3 (41/97)	[32,9; 52,2]
	A-T	41,0 (59/144)	[33,3; 49,1]	32,0 (31/97)	[23,5; 41,8]
	G-C	4,9 (7/144)	[2,2; 9,9]	23,7 (23/97)	[16,3; 33,2]
	G-T	7,6 (11/144)	[4,2; 13,3]	2,1 (2/97)	[0,2; 7,8]
Diplotipovi					
rs2106809- rs2074192	A-C/A-C	22,2 (16/72)	[14,1; 33,2]	NP	NP
	A-C/A-T	34,7 (25/72)	[24,8; 46,3]	NP	NP
	A-T/A-T	22,2 (16/72)	[14,1; 33,2]	NP	NP
	A-C/G-C	1,4 (1/72)	[0,4; 8,3]	NP	NP
	A-C/G-T	12,5 (9/72)	[6,6; 22,4]	NP	NP
	A-T/G-T	2,8 (2/72)	[0,2; 10,3]	NP	NP
	G-C/G-C	4,2 (3/72)	[1,0; 12,2]	NP	NP

95% CI – 95% interval poverenja; NP – nije primenljivo

4.2.1.2. Analiza vezane neravnoteže polimorfizama *ACE2* gena

Rezultati testiranja neravnoteže vezanosti (LD) polimorfizama na nivou *ACE2* lokusa predstavljeni su na grafikonu 5. Vrednosti parametara D' i r^2 ukazuju na veoma nisku vezanost rs2106809 i rs2074192 polimorfizama *ACE2* gena.

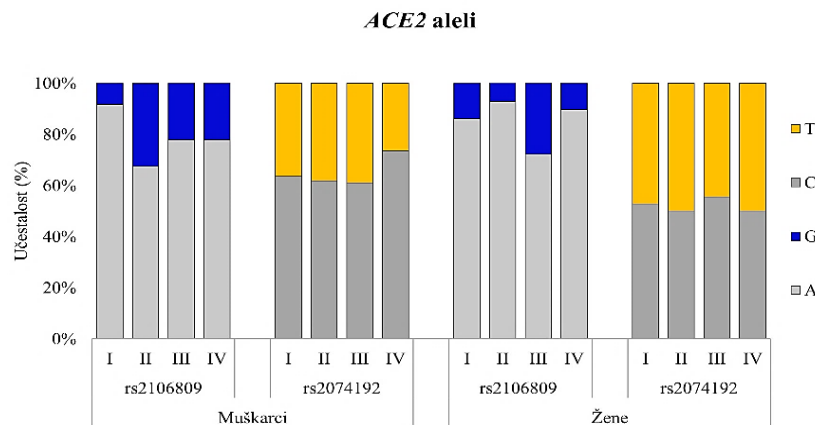


Grafikon 5. Shematski prikaz LD polimorfizama unutar *ACE2* lokusa u celoj populaciji predstavljen kroz: A) korigovani koeficijent neravnoteže vezanosti D' ; B) koeficijent korelacije r^2 . Vrednosti D' i r^2 izražene u procentima.

4.2.2. Analiza polimorfizama *ACE2* gena prema težini kliničke slike

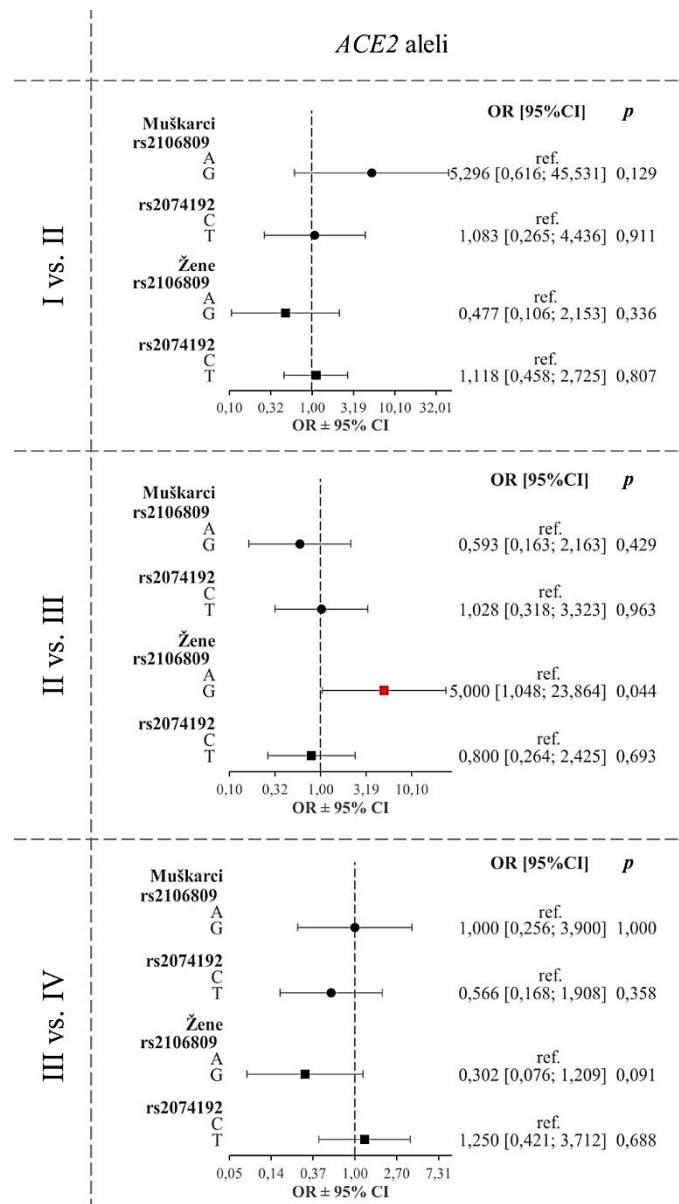
4.2.2.1. Učestalost alela i njihov uticaj na težinu kliničke slike

Raspodela učestalosti alela polimorfizama *ACE2* gena po kategorijama težine kliničke slike prikazana je na grafikonu 6. Raspodela alela rs2074192 među posmatranim kategorijama je bila ravnomerna kod pacijenata oba pola. Kod muškaraca sa umereno teškim oblikom bolesti učestalost varijantnog rs106809 bila je nešto veća u poređenju sa drugim kategorijama, dok je u populaciji žena ovaj alel bio zastupljeniji kod pacijentkinja teškom formom. Ipak, učestalost alela se nije statistički značajno razlikovala ni među ženama ni među muškarcima ($\chi^2(3) < 7,815$; $p > 0,05$).



Grafikon 6. Relativna učestalost alela polimorfizama *ACE2* gena prema težini kliničke slike stratifikovana prema polu. I – blaga (n=30; 12 muškaraca), II – umereno teška (n=61; 40 muškaraca), III – teška (n=27; 18 muškaraca), IV – kritično teška (n=60; 36 muškaraca) klinička slika

Ordinalnom regresionom analizom utvrđeno je da aleli nisu značajno povećavali šansu za progresiju bolesti ni kod žena ni kod muškaraca. Univarijabilna logistička regresija je pokazala da aleli rs2106809 i rs2074192 polimorfizama nisu nezavisni prediktori težine kliničke slike kod muškaraca (grafikon 7), dok je rizik za prelazak iz umerene u tešku kliničku formu bio pet puta veći kod žena koje su nosioci varijantnog rs2106809 G alela u poređenju sa nosiocima divljeg alela.

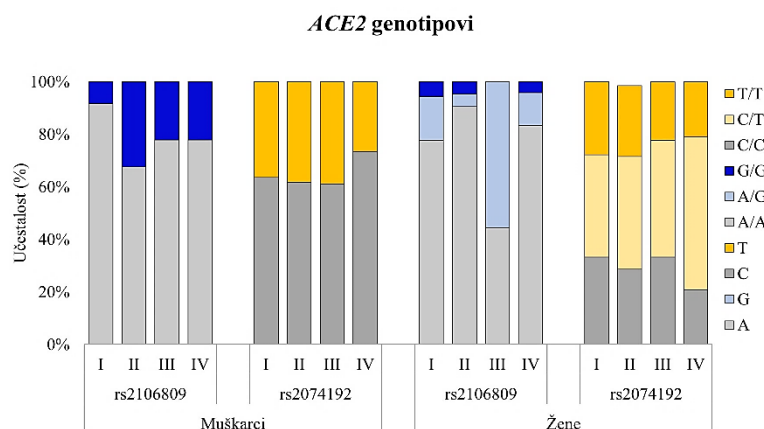


Grafikon 7. Uticaj alela polimorfizama *ACE2* gena na težinu kliničke slike kroz parove kategorija (označeno levo) stratifikovano prema polu. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, a crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

4.2.2.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na težinu kliničke slike

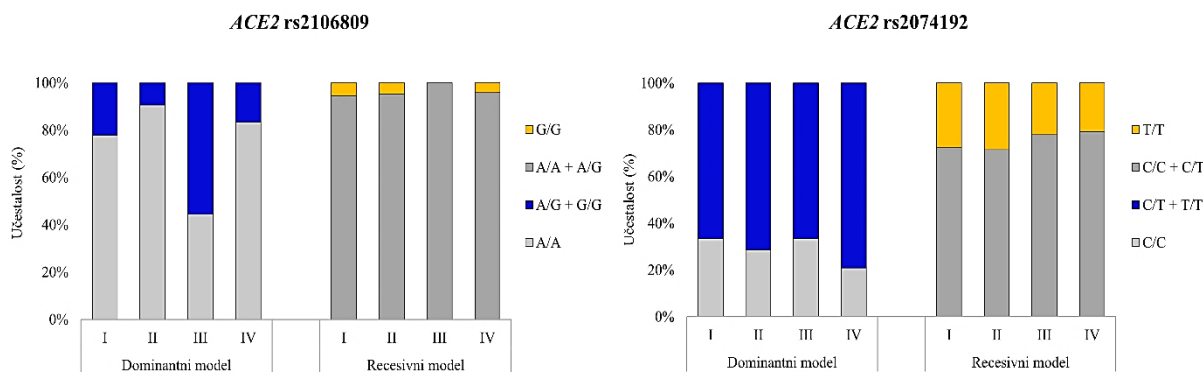
Budući da su muškarci nosioci samo jedne kopije analiziranih polimorfizama *ACE2* gena, učestalost njihovih genotipova je ista kao i učestalost alela koji su obrađeni u prethodnom segmentu analize. Prema tome, među muškarcima se nije statistički značajno razlikovala učestalost genotipova prema kategorijama težine bolesti ($\chi^2(3) < 7,815$; $p > 0,05$, grafikon 8). U grupi žena, distribucija genotipova kroz kategorije polimorfizma rs2074192 bila je homogena. Heterozigotni genotip rs2106809 A/G bio je višestruko zastupljeniji kod žena sa teškim oblikom bolesti u odnosu na druge kategorije, ali statistička značajnost nije dostignuta

($\chi^2(6) < 21,026$; $p > 0,05$, grafikon 8). Varijantni homozigoti G/G nisu bili prisutni u ovoj kategoriji.



Grafikon 8. Relativna učestalost genotipova polimorfizama *ACE2* gena prema težini kliničke slike stratifikovana prema polu. I – blaga ($n=30$; 12 muškaraca), II – umereno teška ($n=61$; 40 muškaraca), III – teška ($n=27$; 18 muškaraca), IV – kritično teška ($n=60$; 36 muškaraca) klinička slika

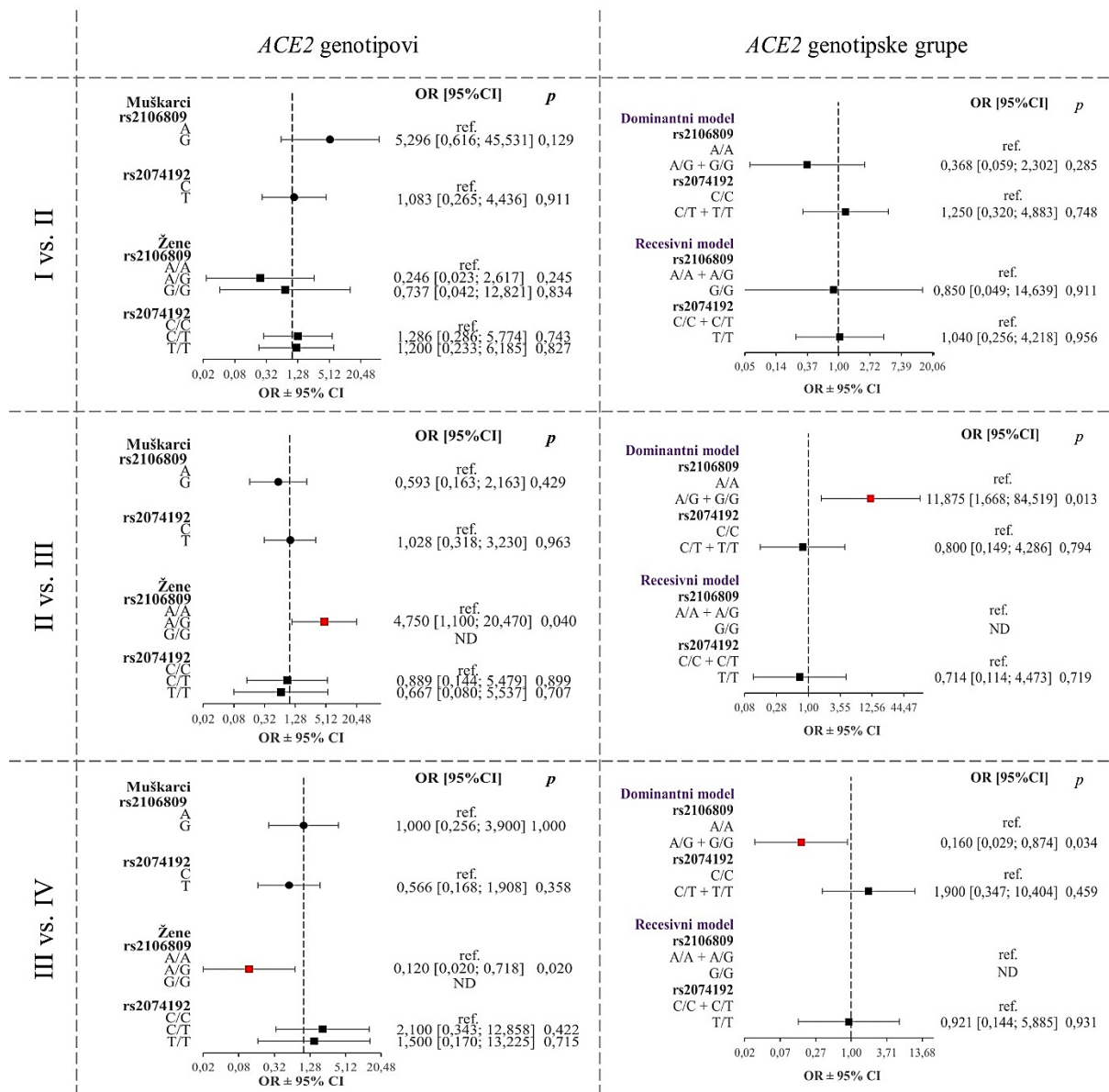
Ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom i recesivnom modelu, među ženama nije dostignuta statistički značajna razlika za oba polimorfizma ($\chi^2(3) < 7,815$; $p > 0,05$, grafikon 9). Međutim, opaža se da je prisustvo barem jednog varijantnog alela rs2106807 A/G+G/G češće kod pacijentkinja s težim oblikom bolesti u odnosu na ostale kategorije. Učestalost genotipske grupe rs2074192 C/T+T/T je bila preovlađujuća u odnosu na homozigote za divlji tip, a ravnomerno raspoređena među kategorijama. Varijantni homozigoti za oba polimorfizma su bili znatno ređe zastupljeni od nosioca barem jednog divljeg alela.



Grafikon 9. Relativna učestalost genotipskih grupa polimorfizama *ACE2* gena prema težini kliničke slike kod žena. I – blaga ($n=18$), II – umereno teška ($n=21$), III – teška ($n=9$), IV – kritično teška ($n=24$) klinička slika

Kroz primenu ordinalne regresione analize otkriveno je da ni genotipovi, ni genotipske grupe nisu značajno uticale na povećanje rizika za napredovanje bolesti, bez obzira na pol pacijenata. Binarna regresiona analiza ukazala je dvosmeran uticaj polimorfizma rs2106809 na težinu COVID-19 kod žena (grafikon 10): genotip A/G donosi gotovo petostruko veću verovatnoću za razvoj teškog oblika, ali u isto vreme skoro deset puta smanjuje šansu za razvoj kritično teške kliničke slike u odnosu na divlje homozigote. Slično, prisustvo barem jednog varijantnog alela povećava šansu za razvoj težeg oblika skoro dvanaest puta, dok smanjuje

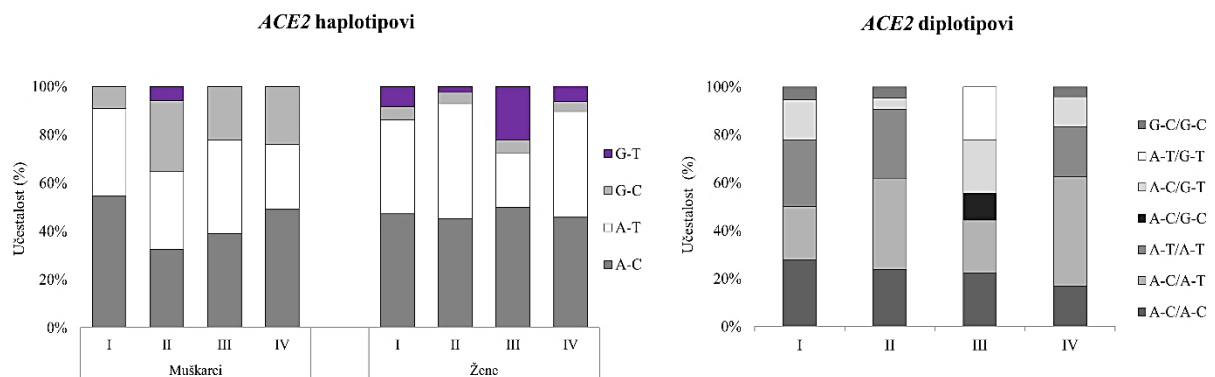
verovatnoću za razvoj kritično teškog oblika gotovo deset puta u poređenju sa divljim homozigotima. Kod muškaraca uticaj hemizigotnih genotipova nije bio statistički značajan.



Grafikon 10. Uticaj genotipova stratifikovanih prema polu i genotipskih grupa kod žena za polimorfizme ACE2 gena na težinu kliničke slike kroz parove kategorija (označeno levo). Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, a crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

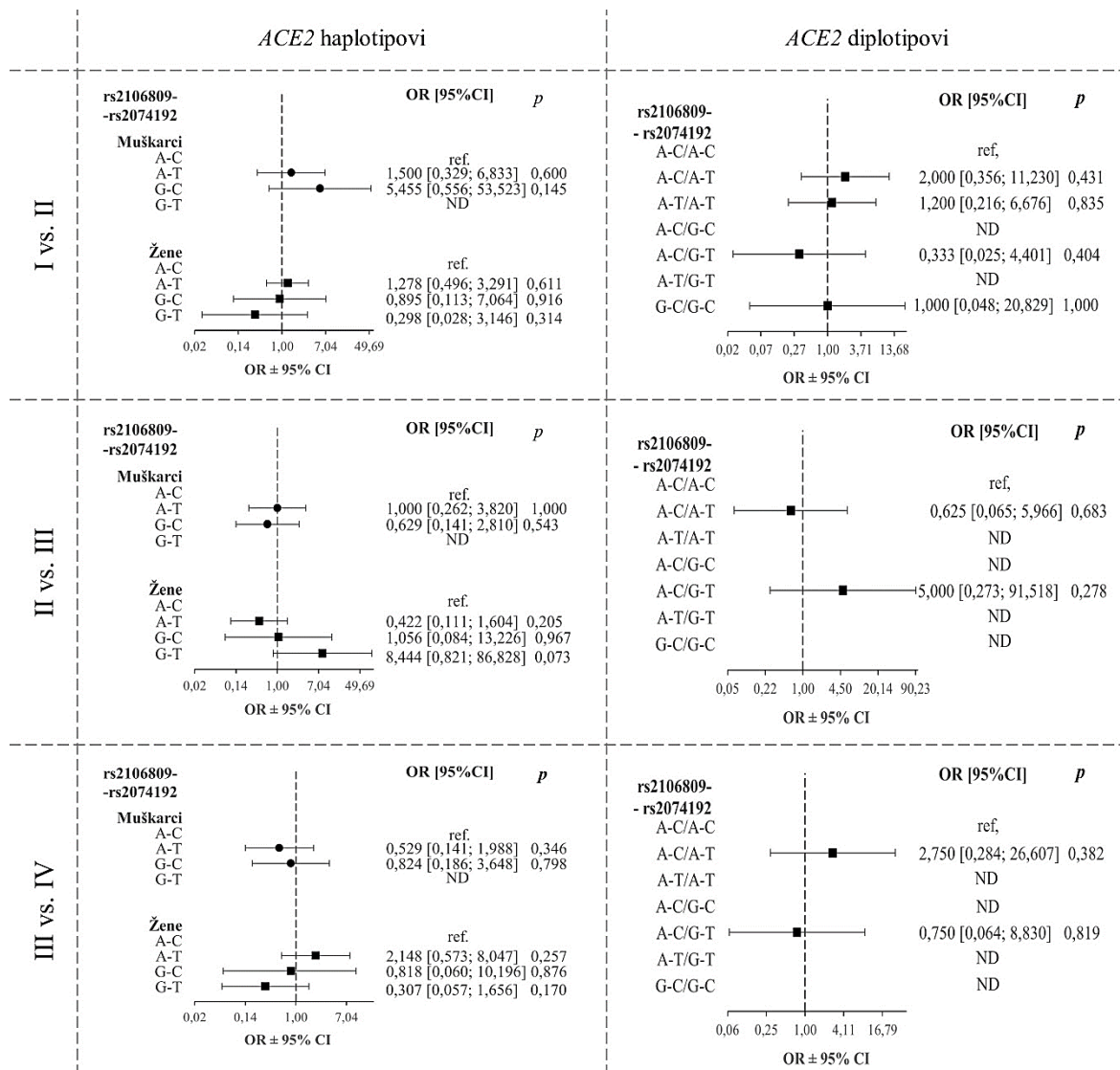
4.2.2.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na težinu kliničke slike

Analiza učestalosti haplotipova prema polu i diplotipova kod žena prikazana je grafikonom 11. Haplotip sa oba varijanta alela rs2106809-rs2074192 G-T zabeležen je samo kod muškaraca sa umerenim oblikom COVID-19, dok je kod žena ovaj haplotip bio prisutan u svim kategorijama, uz najveću frekvencu od oko 20% kod pacijentkinja koje su iskusile težu formu. Diplotipovi A-T/G-T i A-C/G-T bili su najzastupljeniji među ženama sa tešokom kliničkom slikom. Uočene razlike nisu dostigle prag statističke značajnosti (haplotipovi ($\chi^2(9)<16,919$; $p>0,05$; diplotipovi ($\chi^2(18)<8,869$; $p>0,05$).



Grafikon 11. Relativna učestalost haplotipova stratifikovana prema polu i diplotipova kod žena za polimorfizme ACE2 gena prema težini kliničke slike. I – blaga (n=30; 12 muškaraca), II – umereno teška (n=61; 40 muškaraca), III – teška (n=27; 18 muškaraca), IV – kritično teška (n=60; 36 muškaraca) klinička slika

Rezultati ordinalne regresione analize pokazali su da haplotipovi i diplotipovi nisu imali značajan uticaj na povećanje rizika za napredovanje bolesti ni kod muškaraca, ni kod žena. Analizom povezanosti haplotipova sa težinom kliničke slike koristeći binarnu logističku regresiju, nije zabeležena statistički značajna promena verovatnoće za razvoj težeg oblika u poredbenim parovima ni kod muškaraca, ni kod žena, kao ni u slučaju diplotipova kod žena (grafikon 12). Ipak, među ženama se održao prethodno uočeni obrazac da prisustvo varijantnog rs2106809 G alela u okviru haplotipova i diplotipova, istovremeno, povećava šanse za razvoj teškog oblika i smanjuje verovatnoću za razvoj kritično teškog oblika.



Grafikon 12. Uticaj haplotipova stratifikovanih prema polu i diplotipova kod žena za polimorfizme *ACE2* gena na težinu kliničke slike kroz parove kategorija (označeno levo). Crni markeri ukazuju na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

4.2.2.4. Uticaj polimorfizama *ACE2* gena na težinu COVID-19: multivarijabilna logistička regresija

Ordinalnom logističkom regresijom procenjuvan je efekat genetičkih polimorfizama *ACE2*, kao i laboratorijskih i kliničkih parametara na prijemu, na verovatnoću progresije COVID-19 kod žena i muškaraca (tabela 12). Modeli predikcije ni u muškoj, ni u ženskoj populaciji nisu ukazali na ispitivane polimorfizme kao značajne faktore koji utiču na progresiju COVID-19. Prema finalnim modelima najvećeg prediktivnog kvaliteta, ponaosob kod muškaraca i kod žena, viši nivo LDH na prijemu bio je povezan sa većom verovatnoćom razvoja teže forme COVID-19. Istovremeno, žene sa višim CCI skorom i N/R vrednostima na prijemu imale su veće šanse za progresiju u teže oblike tokom hospitalizacije.

Tabela 12. Modeli ordinalne logističke regresije koji najbolje opisuju uticaj polimorfizama *ACE2* gena na težinu COVID-19 stratifikovani prema polu

Varijable	B	S.E.	Wald	<i>p</i>	OR	[95%CI]
Muškarci¹						
Blaga	2,033	0,917	4,919	0,027	NP	[0,236; 3,830]
Umereno teška	5,456	1,065	26,261	<0,001	NP	[3,370; 7,543]
Teška	7,414	1,256	34,854	<0,001	NP	[4,952; 9,875]
Kritično teška (ref)						
Genotip <i>ACE2</i> rs2106809 ^a	0,087	0,532	0,027	0,870	1,091	[0,384; 3,096]
LDH	0,007	0,001	25,022	<0,001	1,007	[1,004; 1,010]
CCI	-0,034	0,136	0,063	0,801	0,967	[0,741; 1,261]
N/R	0,082	0,044	3,399	0,065	1,085	[0,995; 1,184]
Žene²						
Blaga	3,671	1,200	9,358	0,002	NP	[1,319; 6,024]
Umereno teška	6,774	1,474	21,114	<0,001	NP	[3,885; 9,664]
Teška	7,916	1,561	25,718	<0,001	NP	[4,856; 10,975]
Kritično teška (ref)						
Dominantni model <i>ACE2</i> rs2106809 ^a	0,006	0,002	15,179	0,883	1,006	[1,003; 1,009]
LDH	0,599	0,188	10,102	<0,001	1,820	[1,259; 2,633]
CCI	0,175	0,086	4,176	0,001	1,191	[1,007; 1,409]
N/R	0,006	0,002	15,179	0,041	1,006	[1,003; 1,009]

^a – A za muškarce, A/A za žene kao referentni genotip; B – koeficijent regresije; S.E. – standardna greška za β; Wald χ^2 – Valdova test statistika za jedan stepen slobode (df=1); *p* – nivo značajnosti; OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja za OR; NP – nije primenljivo; LDH – laktat dehidrogenaza; CCI – Čarlsonov indeks komorbiditeta; N/R – odnos neutrofila i limfocita;

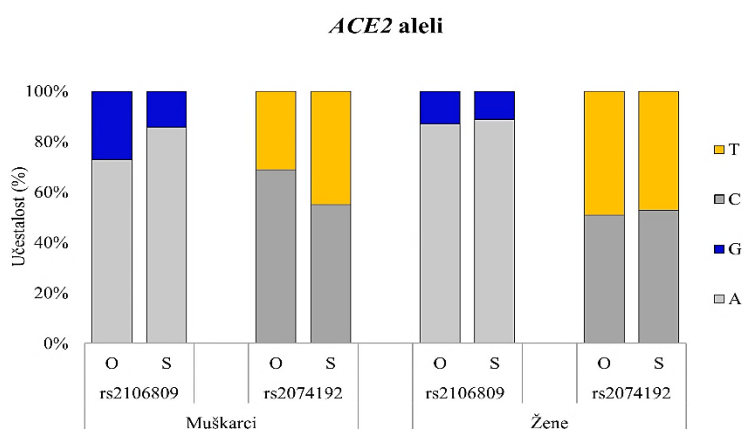
¹ - $\chi^2(4)=71,871$, $p<0,001$; Test kvaliteta prilagođenosti: $\chi^2(254)=239,959$, $p=0,727$, Nagelkerke $R^2=61\%$

² - $\chi^2(4)=55,620$, $p<0,001$; Test kvaliteta prilagođenosti: $\chi^2(173)=239,959$, $p=1,000$, Nagelkerke $R^2=65,1\%$

4.2.3. Analiza polimorfizama *ACE2* prema ishodu bolesti

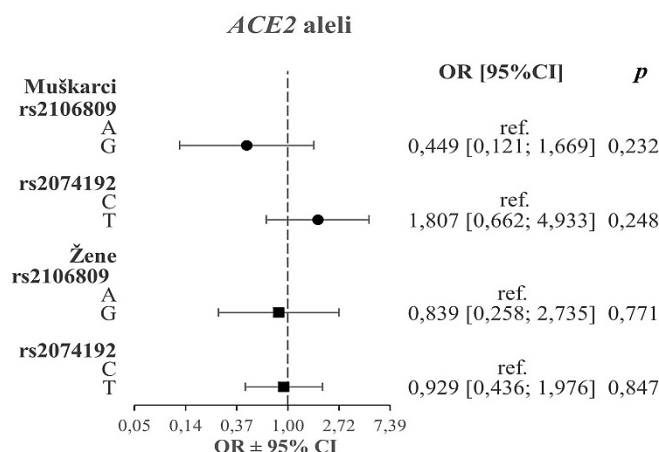
4.2.3.1. Učestalost alela i njihov uticaj na ishod bolesti

Distribucija alela genetičkih polimorfizama *ACE2* u grupama otpuštenih i preminulih pacijenata oba pola se nije statistički značajno razlikovala ($\chi^2(1)<3,841$, $p>0,05$; grafikon 13). Ipak, otpušteni pacijenti muškog pola su češće bili nosioci varijantnog alela za rs2106809, dok je alel rs2074192 T bio zastupljeniji među preminulim muškarcima. Učestalost alela se među pacientkinjama nije značajno razlikovala.



Grafikon 13. Relativna učestalost alela polimorfizama *ACE2* gena prema ishodu bolesti stratifikovana po polu. O – otpust iz bolnice (n=139; 85 muškaraca), S – smrtni ishod tokom hospitalizacije (n=39; 21 muškarac)

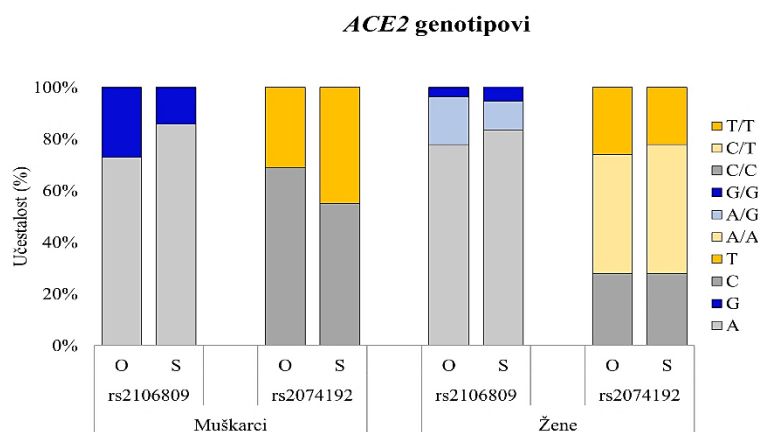
Binarnom logističkom regresijom nije utvrđen značajni nezavisni uticaj alela polimorfizama *ACE2* gena na ishod bolesti (grafikon 14).



Grafikon 14. Uticaj alela polimorfizama *ACE2* gena na ishod COVID-19 stratifikovan prema polu. Crni markeri ukazuju na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija

4.2.3.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na ishod bolesti

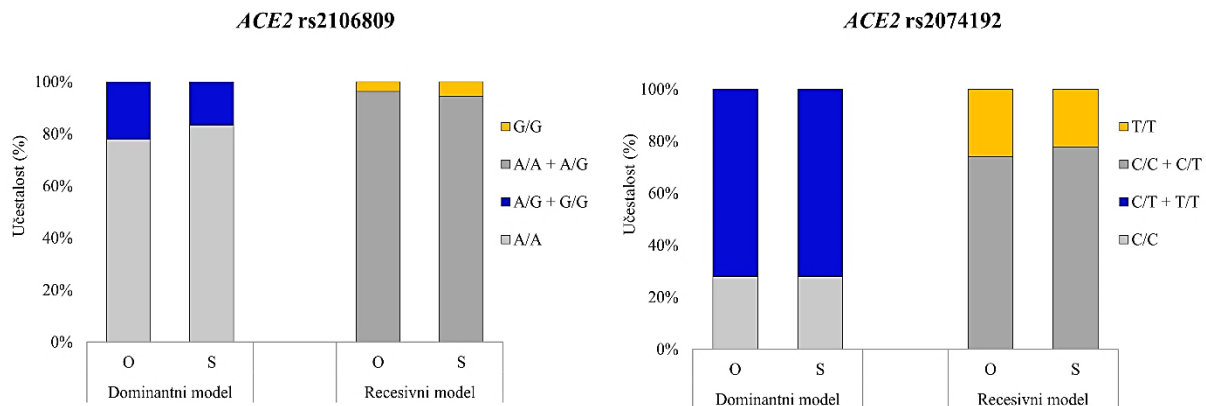
Relativne učestalosti genotipova i genotipskih grupa za polimorfizme *ACE2* gena u populaciji otpuštenih pacijenata i pacijenata preminulih tokom hospitalizacije, stratifikovanih prema polu, prikazane su grafikonom 15. Statistički značajna razlika u zastupljenosti hemizigota prema kategorijama ishoda bolesti u muškoj populaciji, kao i homo- ili heterozigota u populaciji žena za *ACE2* polimorfizme nije detektovana (muškarci: $\chi^2(1) < 3,841$, $p > 0,05$; žene: $\chi^2(2) < 5,991$, $p > 0,05$; grafikom 15).



Grafikon 15. Relativna učestalost genotipova polimorfizama *ACE2* gena prema ishodu bolesti stratifikovana prema polu. O – otpust iz bolnice (n=139; 85 muškaraca), S – smrtni ishod tokom hospitalizacije (n=39; 21 muškarac)

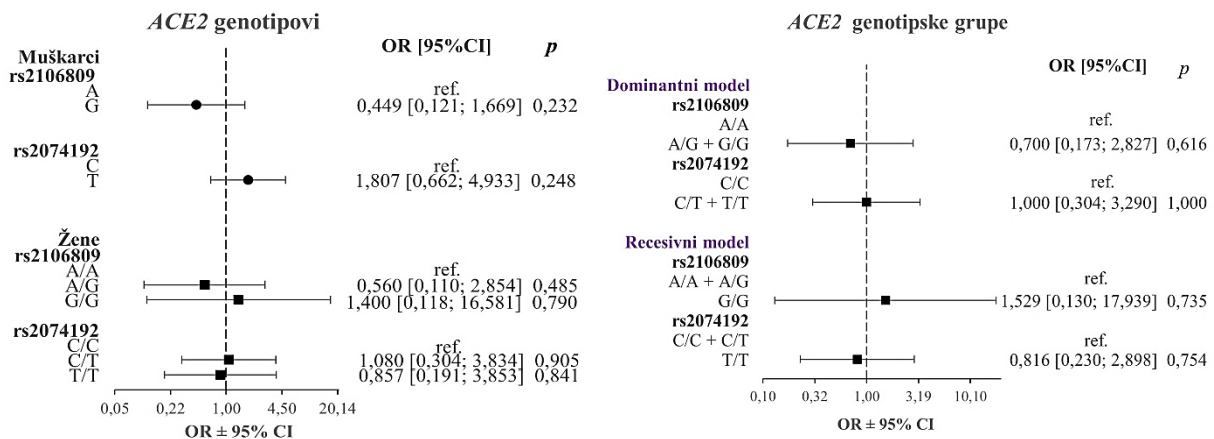
Ni nakon reklasifikacije u dominantne i recesivne modele, razlika u distribuciji učestalosti genotipova među otpuštenim i preminulim pacijentima ženskog pola nije postala statistički značajna ($\chi^2(1) < 3,841$, $p > 0,05$; grafikom 16). Međutim, primetno je da su žene

nosioci barem jednog varijantnog alela za rs2106809 bile zastupljenije među otpuštenima sa lečenja u poređenju sa onima koje su preminule.



Grafikon 16. Relativna učestalost genotipskih grupa polimorfizama gena *ACE2* i prema ishodu bolesti kod žena. O – otpust iz bolnice (n=54), S – smrtni ishod tokom hospitalizacije (n=18)

Regresionom analizom, takođe, nije pronađena značajna asocijacija genotipova i genotipskih grupa za polimorfizme *ACE2* gena sa preživljavanjem SARS-CoV-2 infekcije ni u populaciji muškaraca, ni žena (grafikonu 17).



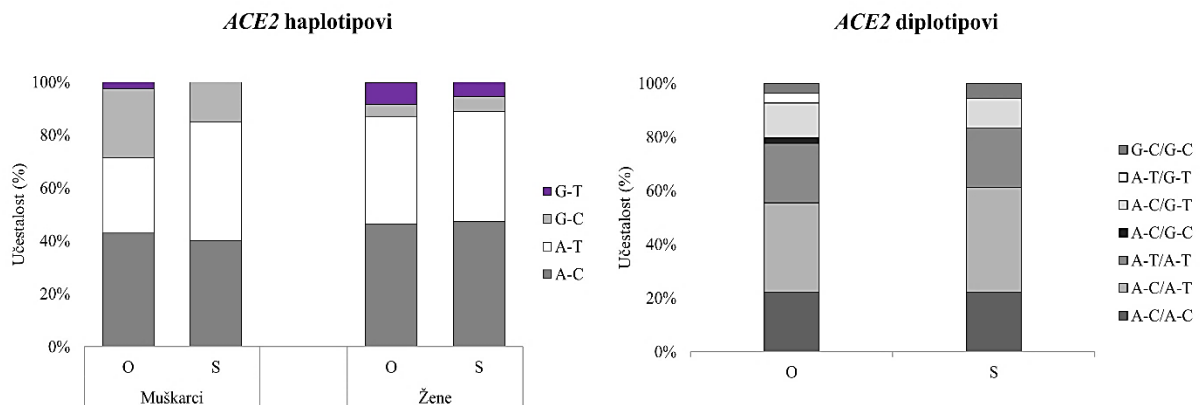
Grafikon 17. Uticaj genotipova stratifikovan prema polu i genotipskih grupa kod žena polimorfizama *ACE2* gena na ishod COVID-19. Crni markeri ukazuju na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija

4.2.3.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na ishod bolesti

Učestalosti haplotipova i diplotipova *ACE2* rs2106809-2074192 u populacijama pacijenata otpuštenih sa bolničkog lečenja kao oporavljenih i grupi preminulih tokom hospitalizacije, stratifikovanih prema polu, prikazane su na grafikonu 18.

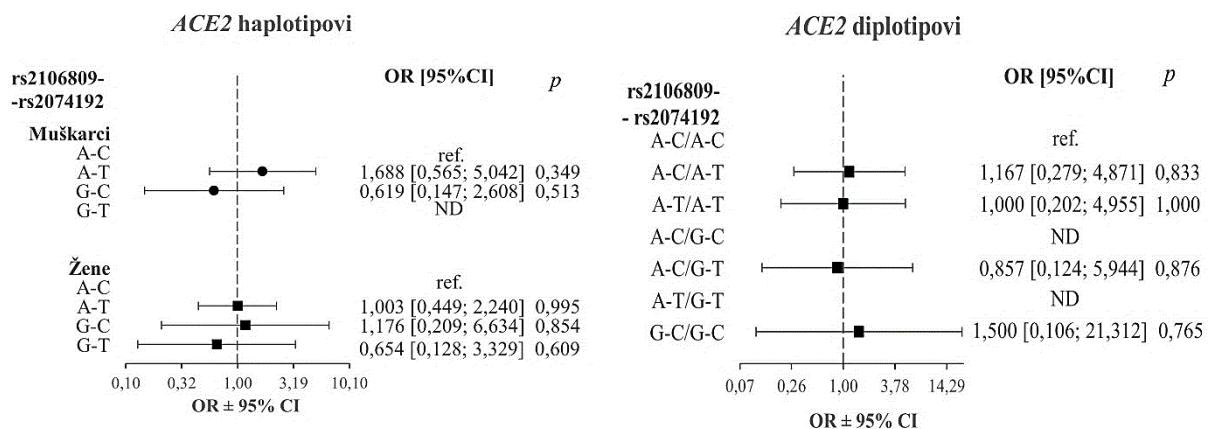
Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike u učestalosti haplotipova u populaciji muškaraca i žena, a ni diplotipova među ženama na *ACE2* lokusu prema kategorijama ishoda bolesti (haplotipovi: $\chi^2(3) < 7,815$, $p > 0,05$; diplotipovi: $\chi^2(6) < 12,592$,

$p>0,05$). Ipak, varijantni haplotip G-T nije detektovan u populaciji preminulih muškaraca, kao ni diplotipovi A-C/G-C i A-T/G-T među preminulim pacijentkinjama.



Grafikon 18. Relativna učestalost haplotipova stratifikovana prema polu i diplotipova kod žena polimorfizama *ACE2* gena prema ishodu bolesti među polovima. O – otpust iz bolnice (n=139; 85 muškaraca), S – smrtni ishod tokom hospitalizacije (n=39; 21 muškarac)

Univarijabilna logistička regresija pokazala je da *ACE2* haplotipovi i diplotipovi ne predstavljaju značajne nezavisne prediktore preživljavanja SARS-CoV-2 infekcije bez obzira na pol pacijenata (grafikoni 19).



Grafikon 19. Uticaj haplotipova stratifikovan prema polu i diplotipova kod žena za polimorfizme *ACE2* gena na ishod bolesti. Crni markeri ukazuju na $p>0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano

4.2.3.4. Uticaj polimorfizama *ACE2* gena na ishod COVID-19: multivarijabilna logistička regresija

U cilju procenjivanja povezanosti genetičkih polimorfizama *ACE2* gena, laboratorijskih i kliničkih parametara na prijemu sa ishodom COVID-19 kod pacijenata muškog i ženskog pola, ponaosob, kreirani su multivarijabilni logistički modeli primenom postepene eliminacije varijabli unazad (tabela 13).

Prediktivni model za populaciju pacijenata muškog pola nije sadržao ispitivane polimorfizme. U najbolji model (Hosmer-Lemešov test: $\chi^2(8)=5,159$, $p=0,740$; Nagelkerke $R^2=64,1\%$; tačno klasifikovanih 92,4% slučajeva) predikcije smrtnog ishoda kod pacijenata muškog pola uključeni su parametri LDH i N/L. Više vrednosti LDH i odnos neutrofila i limfocita bili su povezani sa povećanom verovatnoćom smrtnog ishoda kod pacijenata muškog pola sa COVID-19, dok ostali ispitivani faktori nisu značajno uticali na posmatrani ishod.

Model sa najboljim prediktivnim karakteristikama (Hosmer-Lemešov test: $\chi^2(7)=0,341$, $p=1,000$) ishoda bolesti kod žena objasnio je 77,2% (Nagelkerke R^2) varijanse mortaliteta i adekvatno klasifikovao 92,4% slučajeva. Povećani CCI i N/L bili su povezani sa povećanom verovatnoćom smrtnog ishoda kod pacijentkinja sa COVID-19. S druge strane, verovatnoća za preživljavanje SARS-CoV-2 infekcije bila je za 99% veća među ženama koje su nosioci makar jednog varijantnog alela *ACE2* rs2106809 u odnosu na nosioce oba divlja alela u svom genotipu.

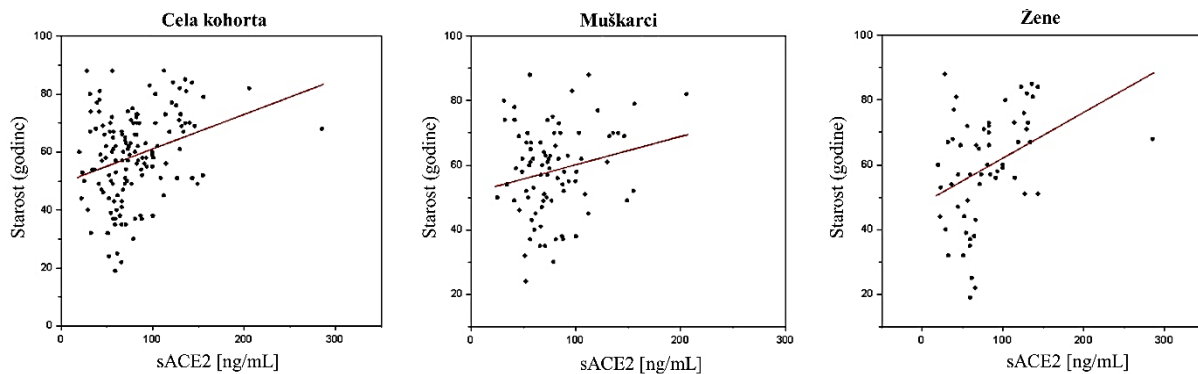
Tabela 13. Modeli multivariabilne logističke regresije koji najbolje opisuju uticaj polimorfizama *ACE2* gena na ishod COVID-19 stratifikovani prema polu

Variable	B	S.E.	Wald	<i>p</i>	OR	[95%CI]
Muškarci						
Genotip <i>ACE2</i> rs2106809 ^a	-1,362	1,225	1,235	0,266	0,256	[0,023; 2829]
N/L	0,163	0,065	6,294	0,012	1,177	[1,036; 1,337]
LDH	0,004	0,002	5,668	0,017	1,004	[1,001; 1,008]
Konstanta	-6,722	1,724	15,206	0,000	0,001	
Žene						
Dominantni model <i>ACE2</i> rs2106809 ^a	-5,502	2,797	3,868	0,049	0,004	[0,000; 0,981]
N/L	0,442	0,214	4,268	0,039	1,556	[1,023; 2,365]
CCI	1,863	0,719	6,714	0,010	6,445	[1,575; 26,385]
ACE inhibitori ^b	2,952	1,710	2,979	0,084	19,149	[0,670; 547,169]
Konstanta	-11,122	3,963	7,877	0,005	0,000	

^a – A za muškarce, A/A za žene kao referentni genotip; ^b - pacijenti koji nisu lečeni ACE inhibitorima kao kao referentna kategorija; B – koeficijent regresije; S.E. – standardna greška za β ; Wald χ^2 – Valdova test statistika za jedan stepen slobode (df=1); *p* – nivo značajnosti; OR – odnos šansi; 95%CI – 95% interval poverenja za OR; CCI – Čarlsonov indeks komorbiditeta, N/L – odnos neutrofila i limfocita; LDH – laktat dehidrogenaza

4.3. Koncentracija solubilnog sACE2 u COVID-19 kohorti

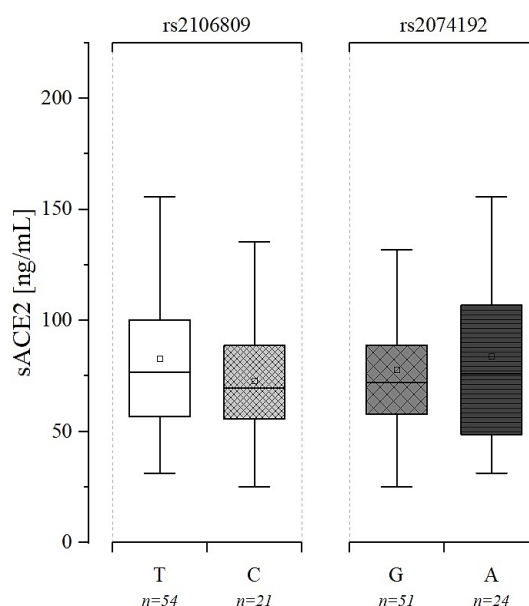
Koncentracija sACE2 je određena za 141 pacijenta u uzorcima seruma prikupljenim na dan prijema na stacionarno lečenje. Medijana koncentracije sACE2 u celoj kohorti COVID-19 pacijenata iznosila je 72ng/mL (IQR: 55,58 – 99,41). Prisutni nivoi sACE2 su bili u slaboj pozitivnoj korelaciji, ali statistički značajnoj, sa starošću pacijenta ($r(139)=0,275$, $p=0,001$, grafikon 20). Stratifikacijom prema polu, uočeno je da koncentracija sACE2 pozitivno korelira sa godinama kod žena, kao i da su ove dve varijable srednje jako povezane ($r(56)=0,414$, $p=0,001$), dok korelacijom kod pacijenata muškog pola nije ustanovljena značajna povezanost ($r(81)=0,133$, $p=0,229$). Nivoi sACE2 se nisu značajno razlikovali među muškarcima i ženama ($U=2325$, $p=0,731$).



Grafikon 20. Korelacija koncentracije sACE2 i starosti u celoj kohorti i stratifikovano prema polu.

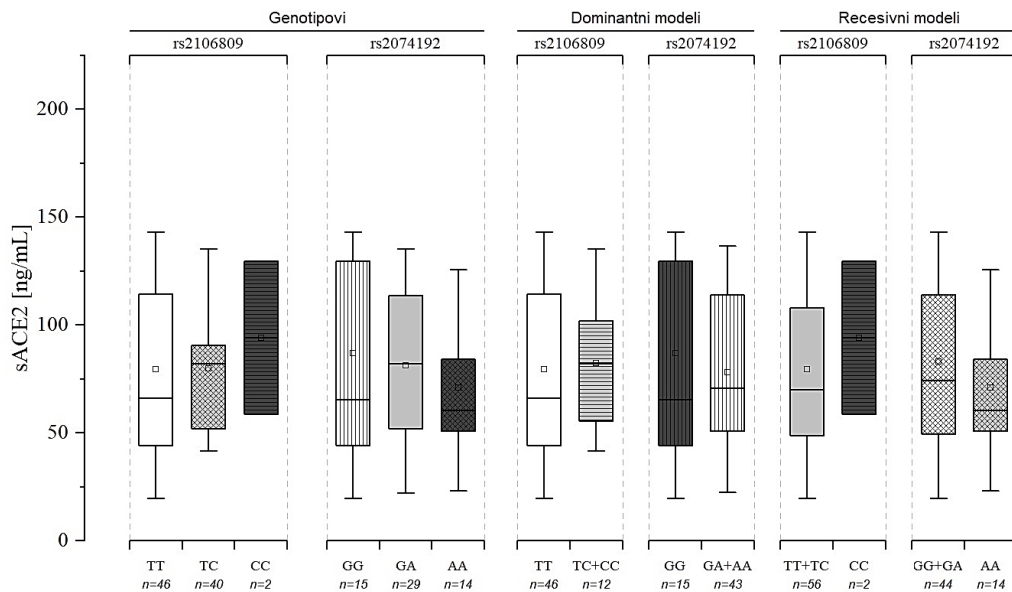
4.3.1. Koncentracija sACE2 u odnosu na polimorfizme ACE2 gena

Analizom koncentracije slobodnog sACE2 u serumu pacijenata muškog pola sa genotipovima za polimorfizme ACE2 gena (grafikon 21), utvrđeno je da hemizigotni nosioci varijantnih genotipova rs2106809 G i rs2074192 A nemaju statistički značajno različite nivoe sACE2 u serumu u odnosu na divlje hemizigote ($U=715$, $p=0,577$; $U=663$, $p=0,562$).



Grafikon 21. Koncentracije sACE2 prema polimorfizmima ACE2 gena kod pacijenata muškog pola.

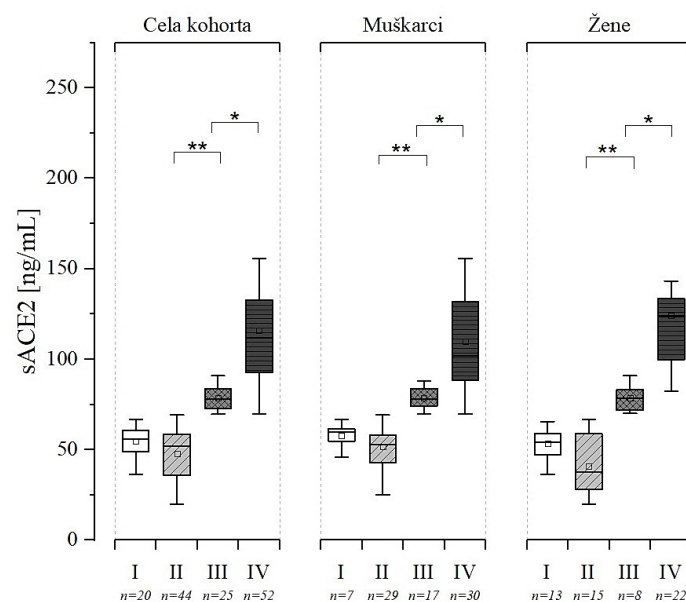
Koncentracije sACE2 se nisu statistički značajno razlikovale među genotipovima i genotipskim grupama polimorfizama ACE2 gena rs2106809 i rs2074192 u populaciji pacijenata ženskog pola ($p > 0,05$, grafikon 22).



Grafikon 22. Koncentracije sACE2 prema polimorfizmima ACE2 gena kod pacijenata ženskog pola.

4.3.2. Koncentracija sACE2 u odnosu na težinu kliničke slike

Rezultati analize koncentracije sACE2 spram težine kliničke slike COVID-19 u celoj kohorti i nakon stratifikacije prema polu, predstavljeni su na grafikonu 23 kao medijana sa interkvartilnim opsegom.

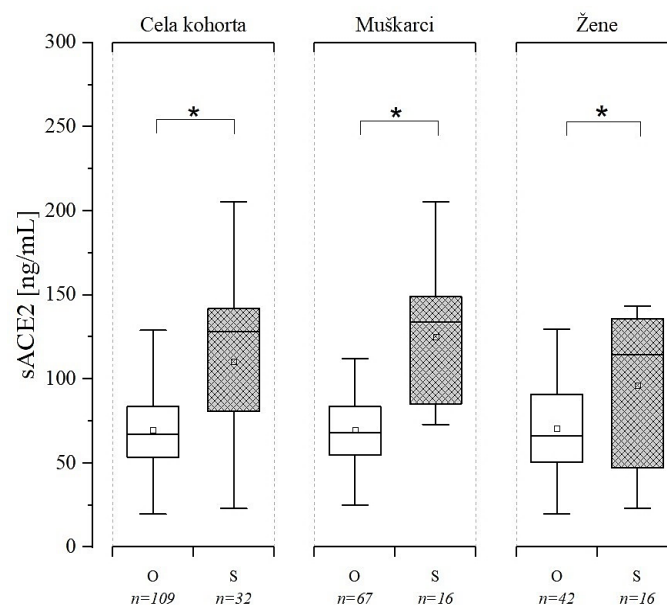


Grafikon 23. Koncentracije sACE2 prema težini kliničke slike u celoj kohorti i stratifikovano prema polu. I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Serumski nivo sACE2 se statistički značajno razlikovalo spram kategorija težine kliničke slike ($H(3)=113,889$, $p<0,001$). Nakon stratifikacije po polu, takođe je uočena statistički značajna razlika na nivou oba pola (muškarci: $H(3)=65,671$, $p<0,001$; žene: $H(3)=47,510$, $p<0,001$). Na nivou cele kohorte, ali i ponaosob među ženama i muškarcima, uočeno je da serumski nivo sACE2 na prijemu raste kroz kategorije težine kliničke slike, pri čemu se nivo sACE2 nije statistički značajno razlikovao između kategorija blage i umerene bolesti. Ordinalnom logističkom regresijom utvrđeno je da je serumska koncentracija sACE2 nezavisni prediktor progresije težine kliničke slike. Pacijenti sa višom serumskom koncentracijom sACE2 na prijemu imali su veću verovatnoću za napredovanje težine COVID-19 (OR[95%CI] = 1,096 [1,076; 1,128], $p<0,001$).

4.3.3. Koncentracija sACE2 u odnosu na ishod COVID-19

Razlika u koncentracijama sACE2 među otpuštenim pacijentima i pacijentima sa smrtnim ishodom u toku hospitalizacije prikazana je na grafikonu 24. U serumu pacijenata preminulih u toku hospitalizacije izmerena je značajno veća koncentracija sACE2 u odnosu na otpuštene pacijente ($U=3488$, $p=0,001$). Podelom prema polu, značajna razlika među poređenim kategorijama ishoda je utvrđena i kod muškaraca ($U=1072$, $p=0,001$) i kod žena ($U=672$, $p=0,001$). Nivo sACE2 nije bio nezavisni prediktor ni ishoda bolesti ($p>0,005$).



Grafikon 24. Koncentracije sACE2 prema ishodu COVID-19 u celoj kohorti i stratifikovano prema polu. O – otpust iz bolnice, S – smrtni ishod u toku hospitalizacije; * $p<0,05$

4.3.4. Uticaj sACE2 na težinu kliničke slike i ishod COVID-19: multivarijabilna logistička regresija

Za potrebe procene moguće povezanosti nivoa sACE2 u serumu u kombinaciji sa relevantnim zbunjujućim faktorima, uključujući ispitivane polimorfizme na ACE2 lokusu, komorbiditete i laboratorijske parametre, sa razvojem teških oblika COVID-19 i smrtnog ishoda tokom hospitalizacije, sprovedena je multivarijabilna logistička regresija. Modeli najvišeg prediktivnog kvaliteta, ponaosob za žene i muškarce, prikazani su u tabeli 14. Nakon

prilagođavanja za zbunjujuće faktore, utvrđeno je da svaki porast za jedinicu sACE2 u serumu, iz uzoraka prikupljenih na prijemu, povećava šansu za progresiju težine COVID-19 tokom hospitalizacije za 13,2% kod muškaraca, dok je taj rizik gotovo duplo manji kod žena. Asocijacija sACE2 u serumu sa smrtnim ishodom nije bila statistički značajna.

Tabela 14. Modeli logističke regresije koji najbolje opisuju uticaj sACE2 na težinu i ishod COVID-19 stratifikovani prema polu

	Varijable	B	S.E.	Wald	<i>p</i>	OR	[95% CI]		
Težina kliničke slike	Muškarci¹								
		Blaga	8,076	1,968	16,843	<0,001	NP	[4,219; 11,933]	
		Umereno teška	13,210	2,572	26,386	<0,001	NP	[8,170; 18,250]	
		Teška	16,624	2,978	31,160	<0,001	NP	[10,787; 22,46]	
		Kritično teška (ref)							
		Genotip ACE2 rs2106809 ^a	0,521	0,692	0,567	0,451	1,684	[0,434; 6,540]	
		sACE2	0,124	0,026	22,388	<0,001	1,132	[1,076; 1,192]	
		LDH	0,004	0,002	6,678	0,010	1,004	[1,001; 1,007]	
		CCI	0,175	0,213	0,681	0,409	1,191	[0,786; 1,808]	
		N/R	0,145	0,071	4,232	0,040	1,156	[1,007; 1,328]	
		Žene²							
		Blaga	6,463	1,752	13,611	<0,001	NP	[3,029; 9,896]	
		Umereno teška	10,319	2,372	18,923	<0,001	NP	[5,670; 14,968]	
		Teška	12,898	2,809	21,076	<0,001	NP	[7,391; 18,404]	
	Kritično teška (ref)								
	Dominantni model ACE2 rs2106809 ^a	-0,484	0,842	0,331	0,001	0,616	[0,118; 3,206]		
	sACE2	0,063	0,019	10,758	0,001	1,065	[1,025; 1,105]		
	LDH	0,007	0,002	11,448	0,017	1,007	[1,003; 1,011]		
	CCI	0,543	0,227	5,724	0,198	1,721	[1,103; 2,683]		
	N/R	0,138	0,108	1,653	0,001	1,148	[0,931; 1,418]		
Ishod	Muškarci³								
		Genotip ACE2 rs2106809 ^a	-24,982	9024,293	0,000	0,998	0,000	ND	
		sACE2	1,976	194,827	0,000	0,992	7,213	ND	
		LDH	0,041	8,304	0,000	0,996	1,042	ND	
		CCI	1,149	486,874	0,000	0,998	3,154	ND	
		N/R	3,331	3570,964	0,000	0,999	27,956	ND	
		Konstanta	-237,806	21253,895	0,000	0,991	0,000	ND	
		Žene⁴							
		Dominantni model ACE2 rs2106809 ^a	-33,463	9040,182	0,000	0,997	0,000	ND	
		sACE2	1,529	280,579	0,000	0,996	4,612	ND	
		LDH	-0,103	24,484	0,000	0,997	0,902	ND	
		CCI	2,757	842,026	0,000	0,997	15,755	ND	
		N/R	1,352	3002,872	0,000	1,000	3,866	ND	
		Konstanta	-97,664	16052,064	0,000	0,995	0,000	ND	

^a – A za muškarce, A/A za žene kao referentni genotip; B – koeficijent regresije; S.E. – standardna greška za β; Wald χ^2 – Valdova test statistika za jedan stepen slobode (df=1); *p* – nivo značajnosti; OR – odnos šansi; 95%CI – 95% interval poverenja za OR; NP – nije primenljivo; LDH – laktat dehidrogenaza; CCI – Čarlsonov indeks komorbiditeta; N/R – odnos neutrofila i limfocita;

¹ - $\chi^2(5)=86,742$, $p<0,001$; Test kvaliteta prilagođenosti: $\chi^2(190)=181,570$, $p=0,657$, Nagelkerke $R^2=79,4\%$

² - $\chi^2(5)=63,339$, $p<0,001$; Test kvaliteta prilagođenosti: $\chi^2(133)=81,866$, $p=1,000$, Nagelkerke $R^2=79,3\%$

³ - $\chi^2(5)=48,752$, $p<0,001$; Hosmer and Lemešov test: $\chi^2(7)=0,000$, $p=1,000$, Nagelkerke $R^2=52,2\%$, adekvatno klasifikovano 10%

⁴ - $\chi^2(5)=39,561$, $p<0,001$; Hosmer and Lemešov test: $\chi^2(7)=0,000$, $p=1,000$, Nagelkerke $R^2=56,9\%$, adekvatno klasifikovano 10%

4.4. Analiza polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4*

4.4.1. Analiza polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* u celoj populaciji

4.4.1.1. Učestalost alela, genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova u ispitivanoj populaciji

Prisustvo polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* utvrđeno je kod 178 COVID-19 pacijenata iz uzoraka krvi sa antikoagulansom. Na osnovu podataka alelske diskriminacije izračunate su učestalosti alela, genotipova i genotipskih grupa za polimorfizme rs8099917 (T>G) i rs12980275 (A>G) gena *IFNL3*, i rs12979860 (C>T) i rs368234815 (TT> Δ G) gena *IFNL4*, u celoj ispitivanoj populaciji koje su prikazane u tabelama 15 i 16.

U celoj COVID-19 kohorti učestalost genotipova nije odstupala od Hardi-Vajnbergove ravnoteže (rs8099917: $\chi^2(1)=0,985$, $p=0,321$; rs12980275: $\chi^2(1)=0,909$, $p=0,340$; rs12979860: $\chi^2(1)=0,374$, $p=0,541$; rs368234815: $\chi^2(1)=0,033$, $p=0,857$). Varijantni aleli ispitivanih polimorfizama bili su prisutni kod oko 30% pacijenata, osim G alela rs8099917 čija je učestalost bila nešto niža. Zastupljenost homozigota za varijantne alele svih ispitivanih polimorfizama je bila manja od 10%. Dihotimizacijom genotipova u genotipske grupe utvrđeno je da više od 50% populacije čine nosioci makar jednog varijantnog alela (AG + GG; CT + TT; TT/ Δ G + Δ G/ Δ G), izuzev rs8099917 TG + GG koji je zastupljen kod trećine pacijenata.

Tabela 15. Učestalost alela, genotipova, genotipskih grupa *IFNL3*

		Učestalost	95% CI
Aleli			
rs8099917 (T>G)		21,9 (78/356)	[18,1; 26,7]
rs12980275 (A>G)		32,3 (115/356)	[27,8; 37,4]
Genotipovi			
rs8099917	T/T	62,4 (111/178)	[54,7; 68,8]
	T/G	31,5 (56/178)	[25,5; 39,0]
	G/G	6,2 (11/178)	[3,4; 10,8]
rs12980275	A/A	44,4 (79/178)	[37,1; 51,5]
	A/G	46,6 (83/178)	[39,8; 54,2]
	G/G	8,9 (16/178)	[5,5; 14,2]
Genotipske grupe			
Dominantni model			
rs8099917	T/T	62,4 (111/178)	[54,7; 68,8]
	T/G + G/G	37,6 (67/178)	[31,2; 45,3]
rs12980275	A/A	43,8 (79/178)	[37,1; 51,5]
	A/G + G/G	55,6 (99/178)	[48,5; 62,9]
Recesivni model			
rs8099917	T/T + T/G	93,8 (167/178)	[89,2; 96,6]
	G/G	6,2 (11/178)	[3,4; 10,8]
rs12980275	A/A + A/G	91,0 (162/178)	[85,8; 94,5]
	G/G	8,9 (16/178)	[5,5; 14,2]

95% CI – 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*)

Tabela 16. Učestalost alela, genotipova, genotipskih grupa *IFNL4*

		Učestalost	[95% CI]
Aleli			
rs12979860 (C>T)		32,3 (115/356)	[27,8; 37,4]
rs368234815 (TT>ΔG)		31,2 (111/356)	[26,7; 36,3]
Genotipovi			
rs12979860	C/C	44,9 (80/178)	[37,6; 52,0]
	C/T	46,1 (82/178)	[38,7; 53,1]
	T/T	9,6 (17/178)	[6,0; 14,8]
rs368234815	TT/TT	47,2 (84/178)	[39,8; 54,2]
	T/ΔG	43,3 (77/178)	[36,5; 50,9]
	ΔG/ΔG	9,6 (17/178)	[6,0; 14,8]
Genotipske grupe			
Dominantni model			
rs12979860	C/C	44,9 (80/178)	[37,6; 52,0]
	C/T + T/T	55,3 (98/178)	[48,0; 62,4]
rs368234815	TT/TT	47,1 (84/178)	[39,8; 54,2]
	TT/ΔG + ΔG/ΔG	52,8 (94/178)	[45,8; 60,2]
Recesivni model			
rs12979860	C/C+C/T	91,0 (162/178)	[85,2; 94,0]
	T/T	9,6 (17/178)	[6,0; 14,8]
rs368234815	TT/TT+ TT/ΔG	91,0 (162/178)	[85,2; 94,0]
	ΔG/ΔG	9,6 (17/178)	[6,0; 14,8]

95% CI – 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*)

Dodatnom analizom, definisani su haplotipovi i diplotipovi lokusa za *IFNL3* i *IFNL4* gene, kao i njihova učestalost, prikazana u tabelama 17 i 18.

Za *IFNL3* lokus, kombinacija rs8099917 i rs12980275 polimorfizma dala je sva četiri moguća haplotipa i sedam diplotipova. Najučestaliji haplotipovi predstavljali su kombinaciju divljih alela (T-A) i kombinaciju varijantnih alela (G-G) datih polimorfizama, dok je G-A haplotip identifikovan samo kod jednog pacijenta. S druge strane, tri identifikovana diplotipa (G-G/T-G; T-G/T-G; G-A/G-G) bila su zastupljena kod manje od 5% pacijentata. Kombinacija homozigota divljih alela tj. diplotip T-A/T-A, bio je najzastupljeniji, dok je G-G/G-G kao kombinacija homozigota varijantnih alela pronađen kod više od 5% ispitivane populacije.

Tabela 17. Učestalost haplotipova i diplotipova *IFNL3* gena

		Učestalost	95% CI
Haplotipovi			
rs8099917 - rs12980275	T-A	67,4 (240/356)	[62,3; 72,0]
	G-G	21,6 (77/356)	[17,8; 26,4]
	T-G	10,7 (38/356)	[7,8; 14,3]
	G-A	0,3 (1/356)	[0,0; 17,6]
Diplotipovi			
rs8099917 - rs12980275	T-A/T-A	44,4 (79/178)	[37,1; 51,5]
	G-G/T-A	29,2 (52/178)	[23,4; 36,7]
	T-A/T-G	16,9 (30/178)	[12,0; 23,0]
	G-G/G-G	5,6 (10/178)	[3,0; 10,1]
	G-G/T-G	2,2 (4/178)	[0,7; 5,9]
	T-G/T-G	1,1 (2/178)	[0,7; 5,9]
	G-A/G-G	0,6 (1/178)	[0,3; 3,0]

95% CI – 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*)

Haplotipizacijom *IFNL4* gena za polimorfizme rs12979860 i rs368234815, registrovana su tri od četiri potencijalna haplotipa i četiri diplotipa. Najprevalentniji među haplotipovima bio je C-TT kao kombinacija divljih alela, dok je gotovo upola manje bio prisutan T-ΔG haplotip kao kombinacija varijantnih alela. Među diplotipovima, homozigotna kombinacija divljih alela C-TT/C-TT i heterozigotna kombinacija C-TT/T-ΔG delili su sličan procenat zastupljenosti. S druge strane, manje od 10% pacijenata su bili nosioci T-ΔG/T-ΔG diplotipa.

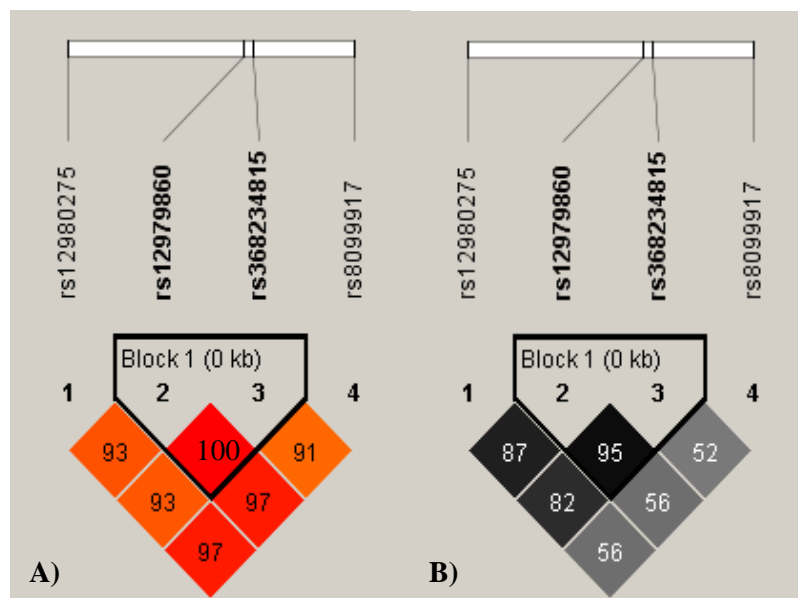
Tabela 18. Učestalost haplotipova i diplotipova *IFNL4* gena

		Učestalost	95% CI
Haplotipovi			
rs12979860 - rs368234815	C-TT	67,7 (241/356)	[62,6; 72,2]
	T-ΔG	31,2 (111/356)	[26,7; 36,3]
	T-TT	1,1 (4/356)	[0,3; 3,0]
Diplotipovi			
rs12979860 - rs368234815	C-TT/C-TT	44,9 (80/178)	[37,6; 52,0]
	C-TT/T-ΔG	43,3 (77/178)	[36,5; 50,9]
	T-ΔG/T-ΔG	9,6 (17/178)	[6,0; 14,8]
	C-TT/T-TT	2,2 (4/178)	[0,7; 5,9]

95% CI – 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*)

4.4.1.2. Analiza vezane neravnoteže polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena

Neravnoteža vezanosti (LD) za ispitivane polimorfizme *IFNL3* i *IFNL4* prikazana je grafikonom 25. Najizraženiji LD uočen je između rs368234815 i rs12979860 ($D'=1,00$ i $r^2=0,95$), a najslabije izražen među rs8099917 i rs368234815 ($D'=0,91$ i $r^2=0,52$).

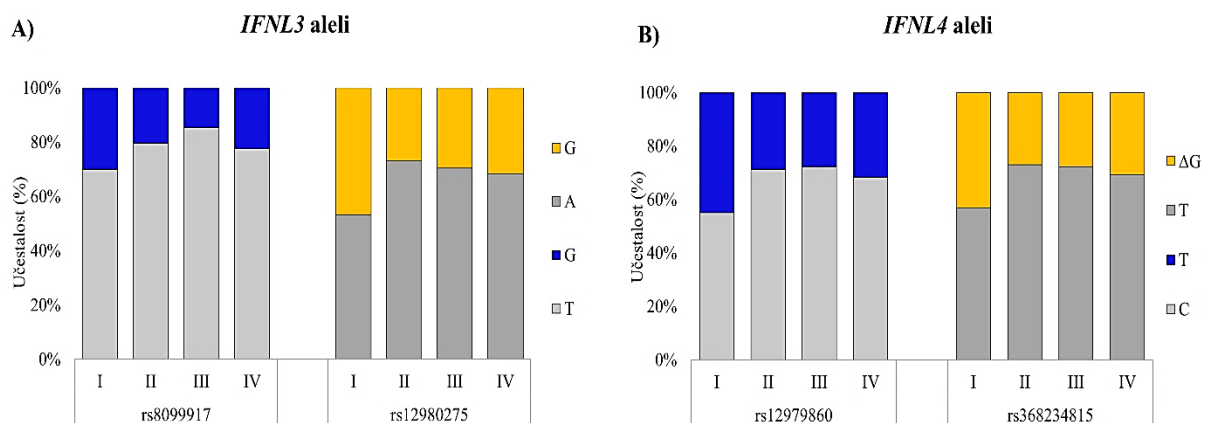


Grafikon 25. Shematski prikaz LD polimorfizama unutar *IFNL3* i *IFNL4* lokusa u celoj populaciji predstavljen kroz: A) korigovani koeficijent neravnoteže vezanosti D' ; B) koeficijent korelacije r^2 . Vrednosti D' i r^2 su izražene u procentima.

4.4.2. Analiza polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* prema težini kliničke slike

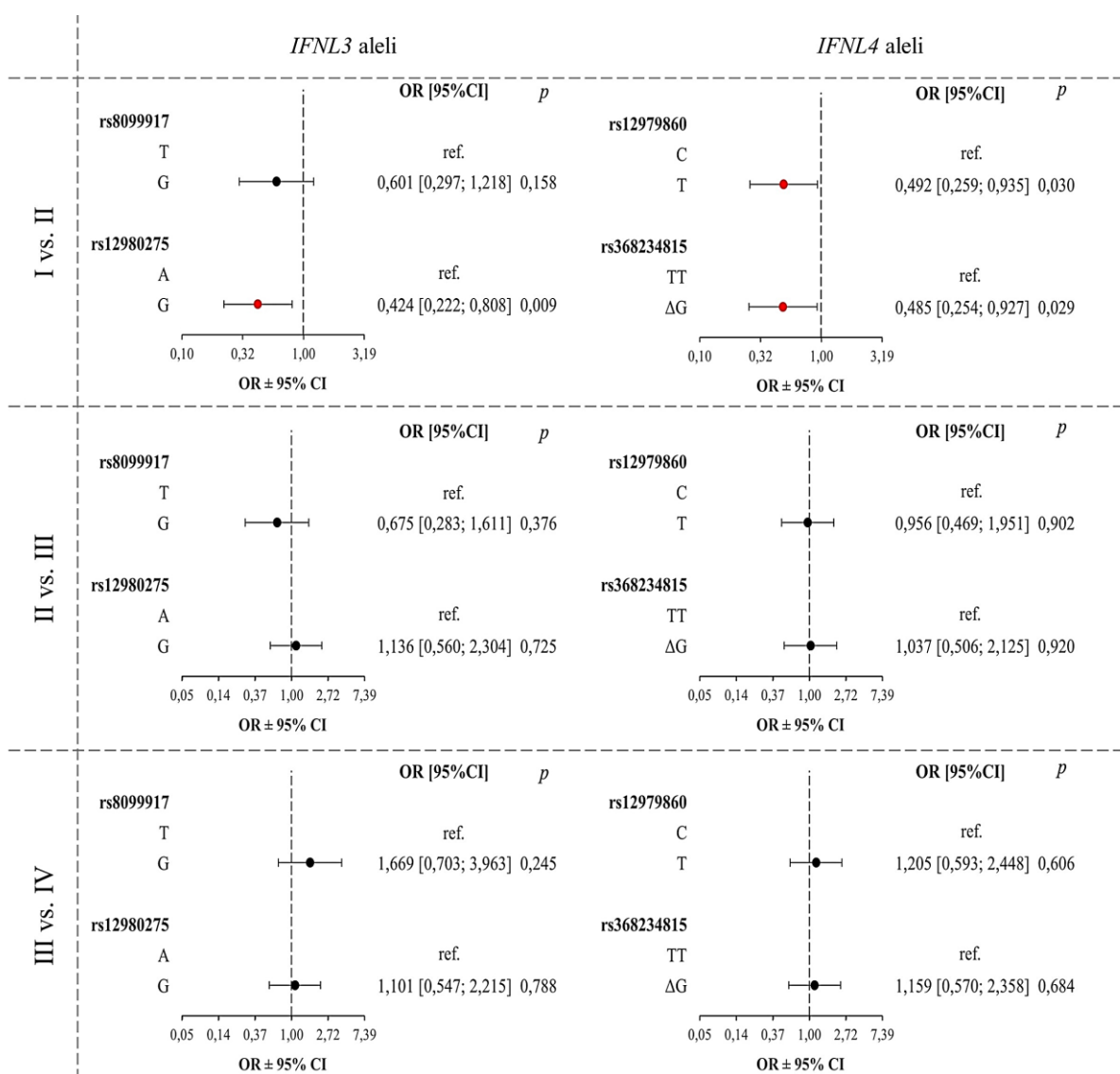
4.4.2.1. Učestalost alela i njihov uticaj na težinu kliničke slike

Frekvencija alela polimorfizama gena *IFNL3* i *IFNL4* prema kategorijama težine kliničke slike COVID-19 prikazana je na grafikonu 26. Raspon učestalosti divljih alela po kategorijama bio je od 55% do 85%, a varijantnih od 14% do 46%. Učestalost varijantnih alela ispitivanih polimorfizama oba gena pratila je sličan obrazac raspodele kroz posmatrane kategorije. Tačnije, varijantni aleli bili su najzastupljeniji kod pacijenata sa lakom kliničkom slikom (I), dok je njihova učestalost bila niža kod težih pacijenata (II, III i IV). Odstupanje od ovog obrasca se može uočiti kod rs8099917, gde je razlika u učestalosti varijantnog alela G između grupe sa lakom kliničkom slikom i ostalih kategorija bila zanemarljiva. Ipak, uočene razlike među grupama nisu bile statistički značajne ($\chi^2(3) < 7,81$; $p > 0,05$).



Grafikon 26. Relativna učestalost alela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema težini kliničke slike. I – blaga (n=30), II – umereno teška (n=61), III – teška (n=27), IV – kritično teška (n=60) klinička slika

Rezultati ordinalne regresione analize su pokazali da aleli nisu imali značajnu asocijaciju s povećanim rizikom za napredovanje bolesti. Uticaj alela analiziranih polimorfizama na razvoj težine kliničke slike COVID-19 ispitivan je univarijabilnom logističkom regresijom. Rezultati su ilustrovani grafikonom 27. Analiza je pokazala da prisustvo varijantnih alela rs12980275 G, rs12979860 T i rs368234815 ΔG statistički značajno smanjuje verovatnoću za razvoj umereno teške kliničke slike za oko 50%. Polimorfizam rs8099917 nije značajno uticao na težinu COVID-19 ni u jednoj poredbenoj grupi.

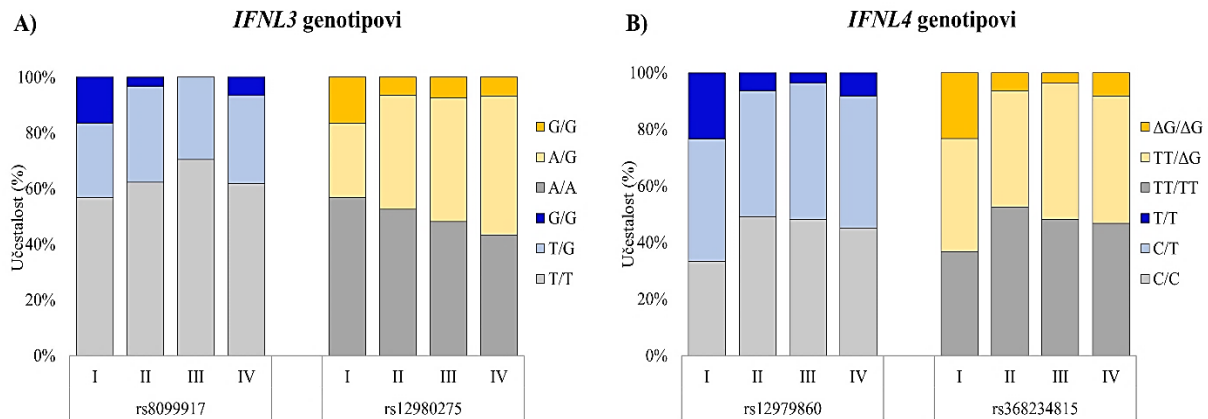


Grafikon 27. Uticaj alela polimorfizama gena *IFNL3* i *IFNL4* na težinu kliničke slike kroz parove kategorija (označeno levo). Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

4.4.2.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na težinu kliničke slike

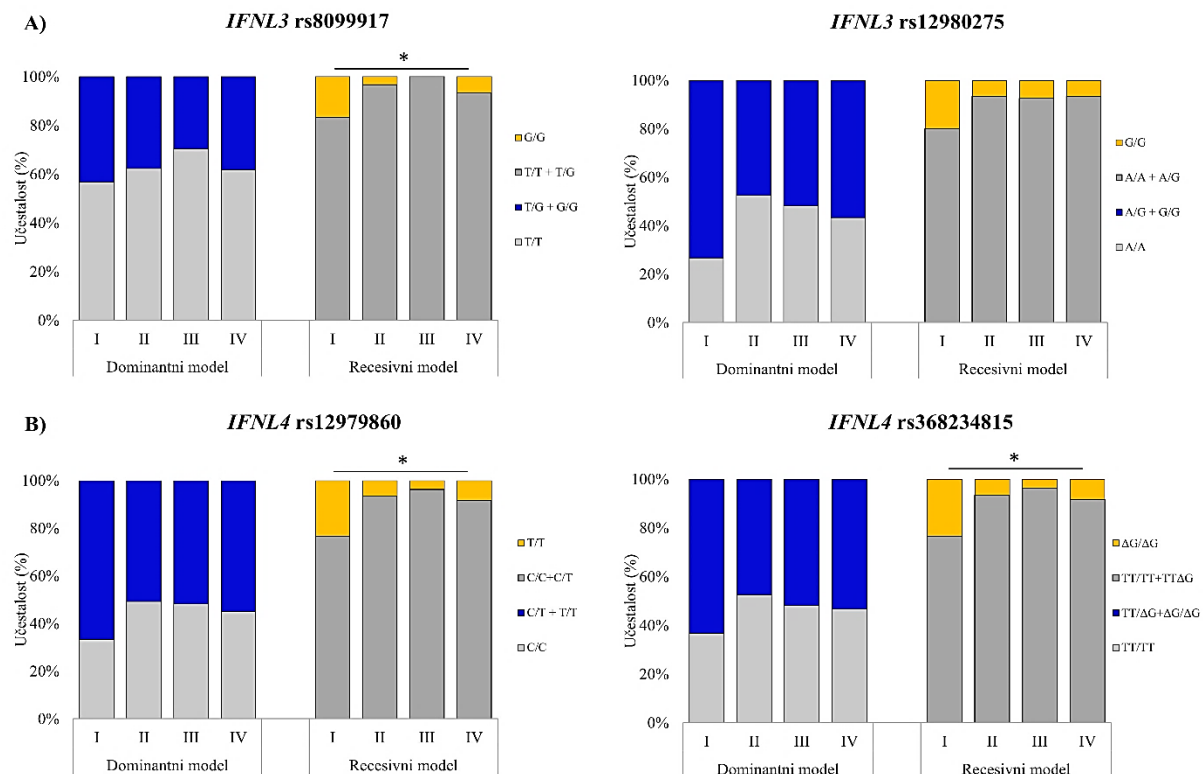
Distribucija genotipova i genotipskih grupa polimorfizama gena *IFNL3* i *IFNL4* u odnosu na težinu bolesti COVID-19 pacijenata prikazna je na graficima 28 i 29.

Analiziranjem učestalosti genotipova nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova među kategorijama težine kliničke slike COVID-19 ni za jedan od ispitivanih polimorfizama gena *IFNL3* i *IFNL4* ($\chi^2(6) < 12,59$; $p > 0,05$). Uprkos tome, uočava se da je zastupljenost homozigota za varijantne alele bila najveća među pacijentima sa lakom kliničkom slikom (I), dok je njihova učestalost bila ujednačena u težina kategorijama bolesti (II, III i IV), uz izuzetak rs8099917 GG koji nije detektovan među pacijentima sa teškom (III) kliničkom slikom. Raspodela heterozigota i divljih homozigota bila je slična među posmatranim kategorijama težine bolesti.



Grafikon 28. Relativna učestalost genotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema težini kliničke slike. I – blaga (n=30), II – umereno teška (n=61), III – teška (n=27), IV – kritično teška (n=60) klinička slika

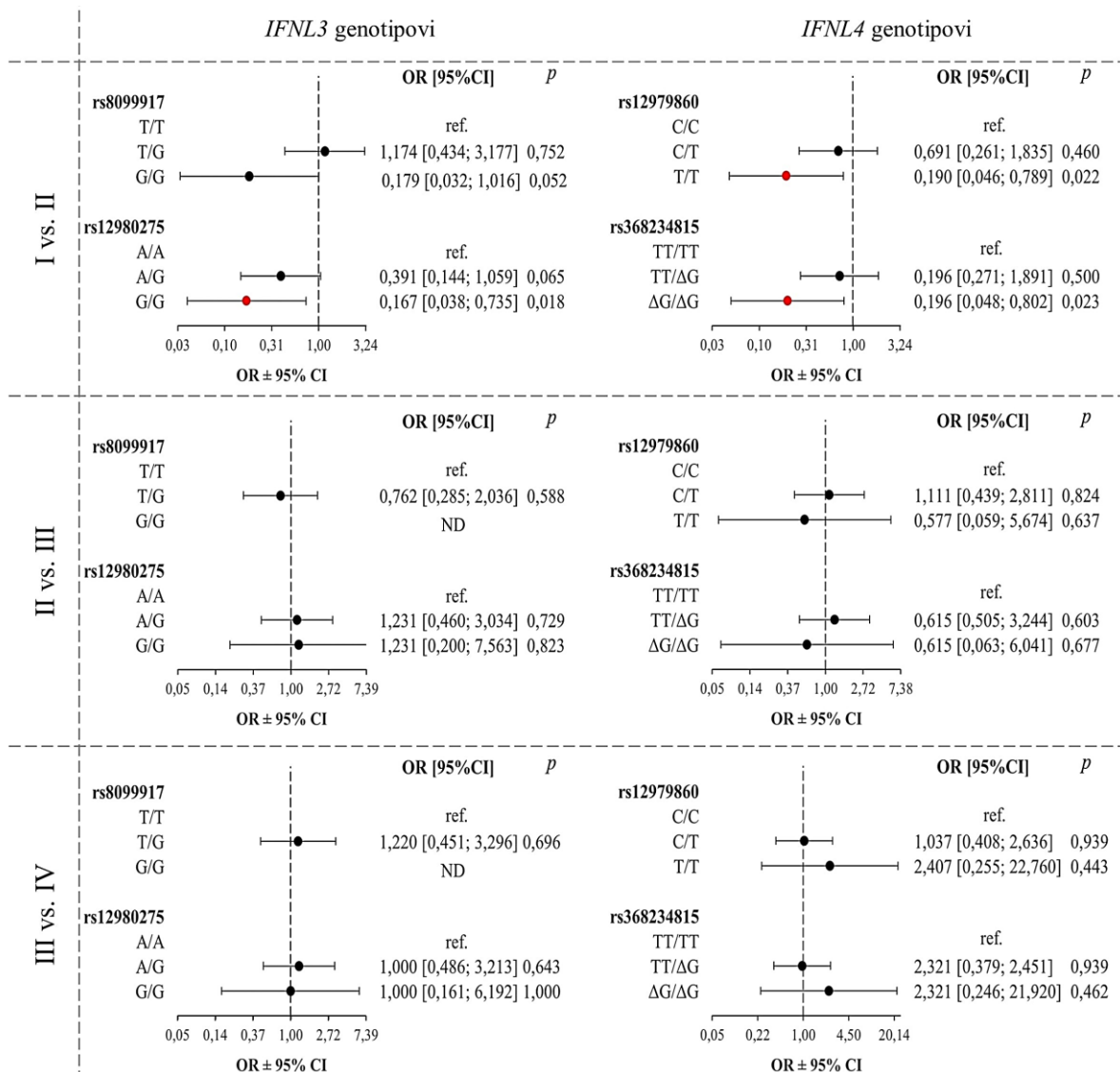
S druge strane, nakon grupisanja po recesivnom modelu uočava se da nosioci oba varijantna alela češće razvijaju laku kliničku sliku u odnosu na nosioce makar jednog divljeg alela za polimorfizme *IFNL3* rs8099917 ($\chi^2(3)=8,38$; $p=0,039$), *IFNL4* rs12979860 ($\chi^2(3)=8,40$; $p=0,038$) i *IFNL4* rs368234815 ($\chi^2(3)=8,40$; $p=0,038$). Za polimorfizam *IFNL3* rs12980275, ni nakon grupisanja u genotipske grupe nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji među posmatranim kategorijama težine bolesti ($\chi^2(3)<7,81$; $p>0,05$).



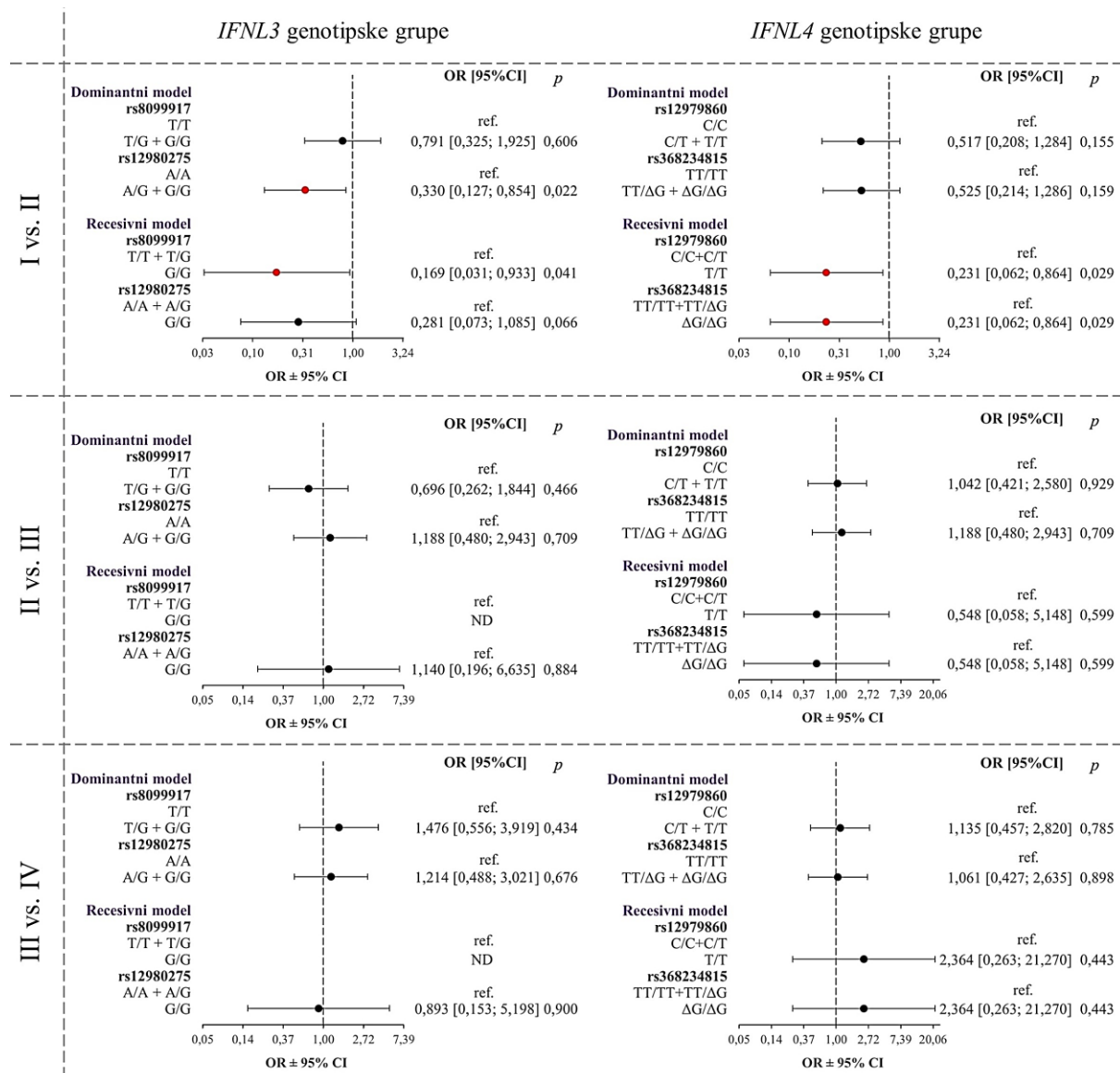
Grafikon 29. Relativna učestalost genotipskih grupa polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema težini kliničke slike. I – blaga (n=30), II – umereno teška (n=61), III – teška (n=27), IV – kritično teška (n=60) klinička slika; * $p<0,05$

Ordinalnom logističkom regresijom utvrđeno je da prisustvo oba varijantna alela polimorfizma na *IFNL4* lokusu značajno redukuje šansu za napredovanjem bolesti

(OR[95%CI] = 0,39 [0,16; 0,99], $p=0,048$). Univarijabilna logistička regresija pokazala je da i genotipovi i genotipske grupe imaju statistički značajan uticaj na razvoj umerene kliničke slike, ali ne i na teže oblike COVID-19. Rezultati ove analize prikazani su na grafikonima 30 i 31. Kada je reč o *IFNL3*, nosioci barem jednog varijantnog alela rs12980275 (A/G+G/G) imali su tri puta manju verovatnoću za prelazak iz blage u umerenu formu COVID-19, dok se ovaj rizik kod homozigotnih nosioca ovog alela (G/G) gotovo petostruko smanjio u poređenju sa divljim homozigotima (A/A). Takođe, šansa za razvoj umereno teške kliničke slike bila je gotovo šest puta manja kod homozigota za varijantni alel polimorfizma *IFNL3* rs8099917 (G/G) u odnosu na nosioce genotipa sa makar jednim divljim alelom (T/T+T/G). Četvorostruko smanjenje rizika za razvoj umerene kliničke slike uočeno je kod homozigota za varijantne alele *IFNL4* rs12979860 T/T i rs368234815 $\Delta G/\Delta G$ u poređenju sa homozigotima za divlje alele (rs12979860 C/C i rs368234815 TT/TT), a petostruko u odnosu na nosioce makar jednog divljeg alela u svom genotipu (rs12979860 C/C+C/T i rs368234815 TT/TT+TT/ ΔG).



Grafikon 30. Uticaj genotipova polimorfizama gena *IFNL3* i *IFNL4* na težinu kliničke slike kroz parove kategorija (označeno levo). Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

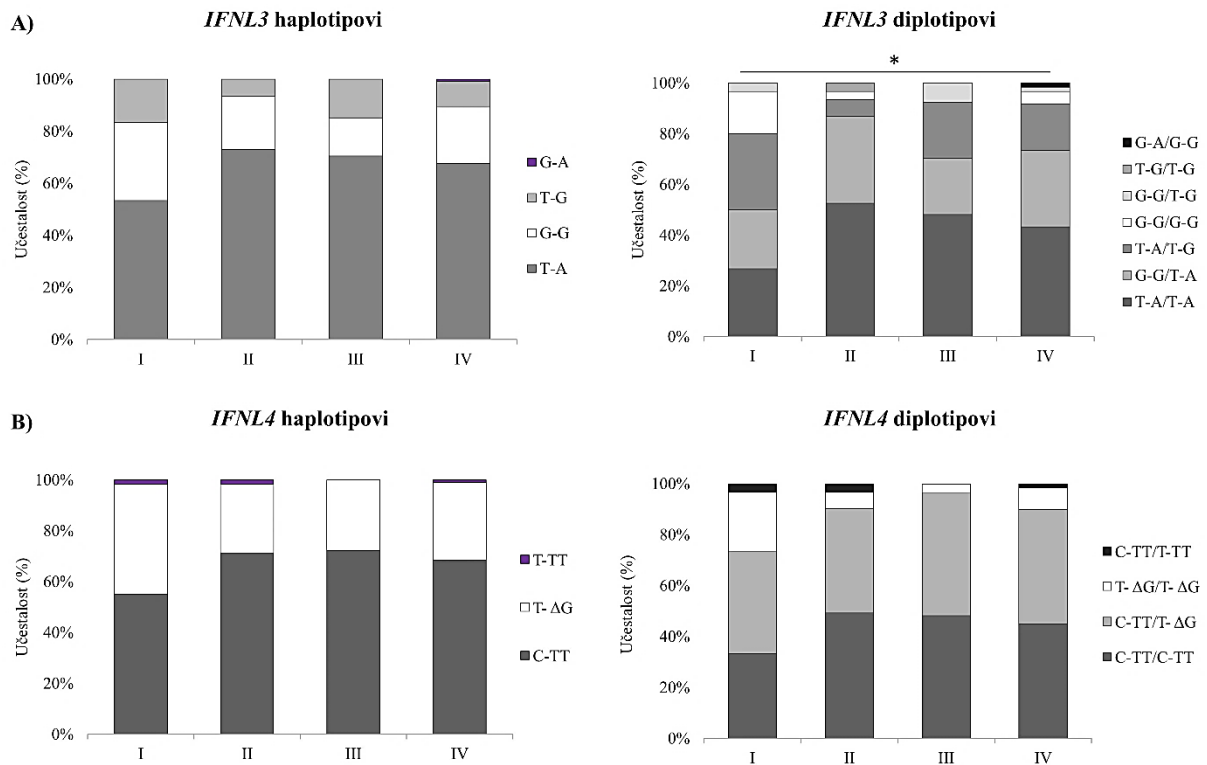


Grafikon 31. Uticaj genotipskih grupa polimorfizama gena *IFNL3* i *IFNL4* na težinu kliničke slike kroz parove kategorija (označeno levo). Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

4.4.2.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na težinu kliničke slike

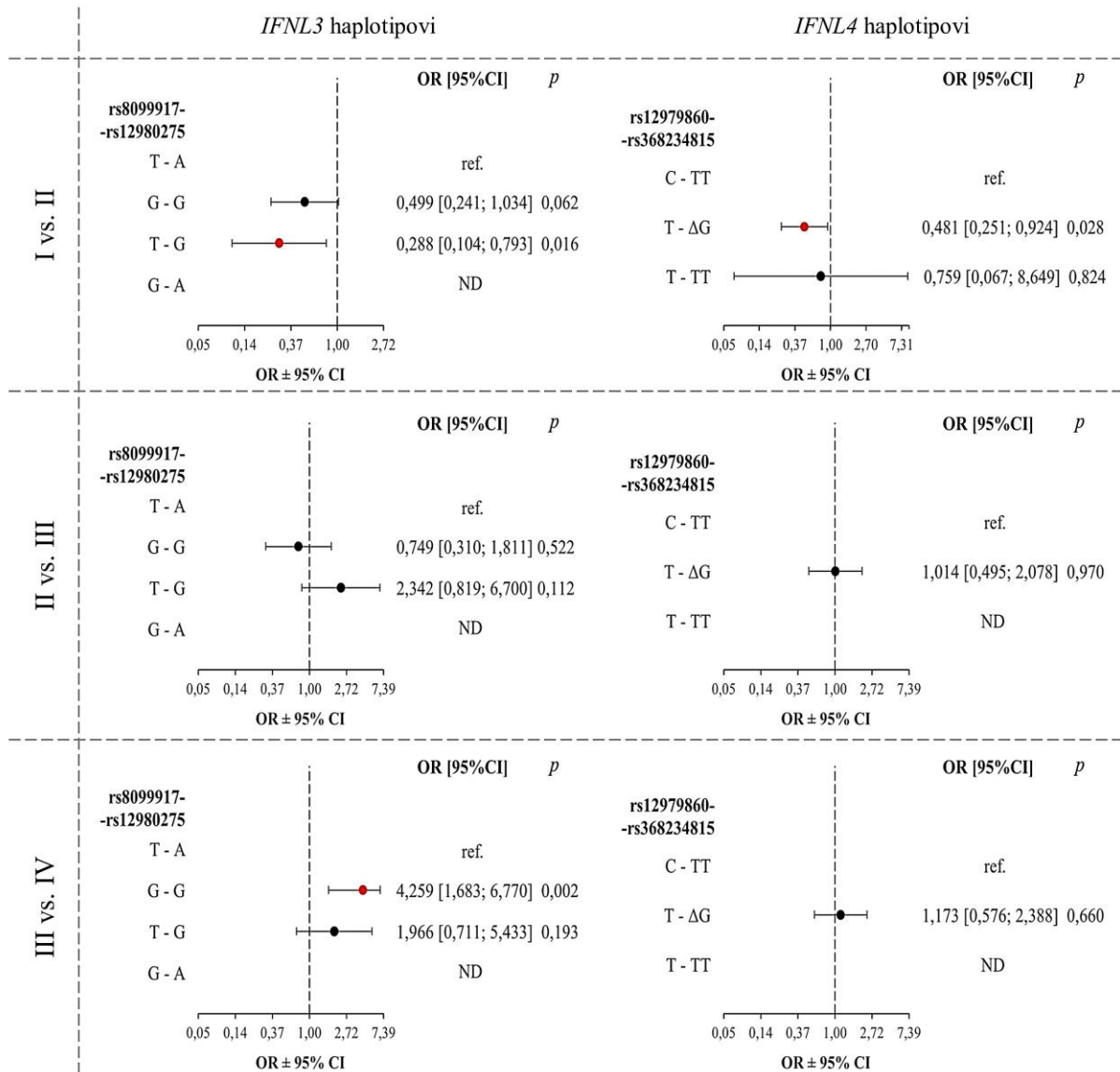
Analiza raspodele haplotipova i diplotipova *IFNL3* rs8099917-rs12980275 i *IFNL4* 12979860-rs368234815 prema kategorijama težine COVID-19 pokazala je da je obrazac raspodele alela uočen u prethodnim analizama bio prisutan i među haplotipovima (grafikon 32). Učestalost haplotipova i diplotipova sa oba varijantna alela i za *IFNL3* i *IFNL4* bila je najveća u grupi pacijenata sa lakom kliničkom slikom, uz nižu, ali ujednačenu frekvenciju među težim kategorijama bolesti. Haplotipovi i diplotipovi sa oba divlja alela dominirali su u svim kategorijama bolesti, dok je učestalost heterozigotnih kombinacija bila niža. Statistički

značajna razlika u distribuciji diplotipova bila je prisutna jedino za *IFNL3* rs8099917-rs12980275 ($\chi^2(18)=31,25$; $p=0,027$).

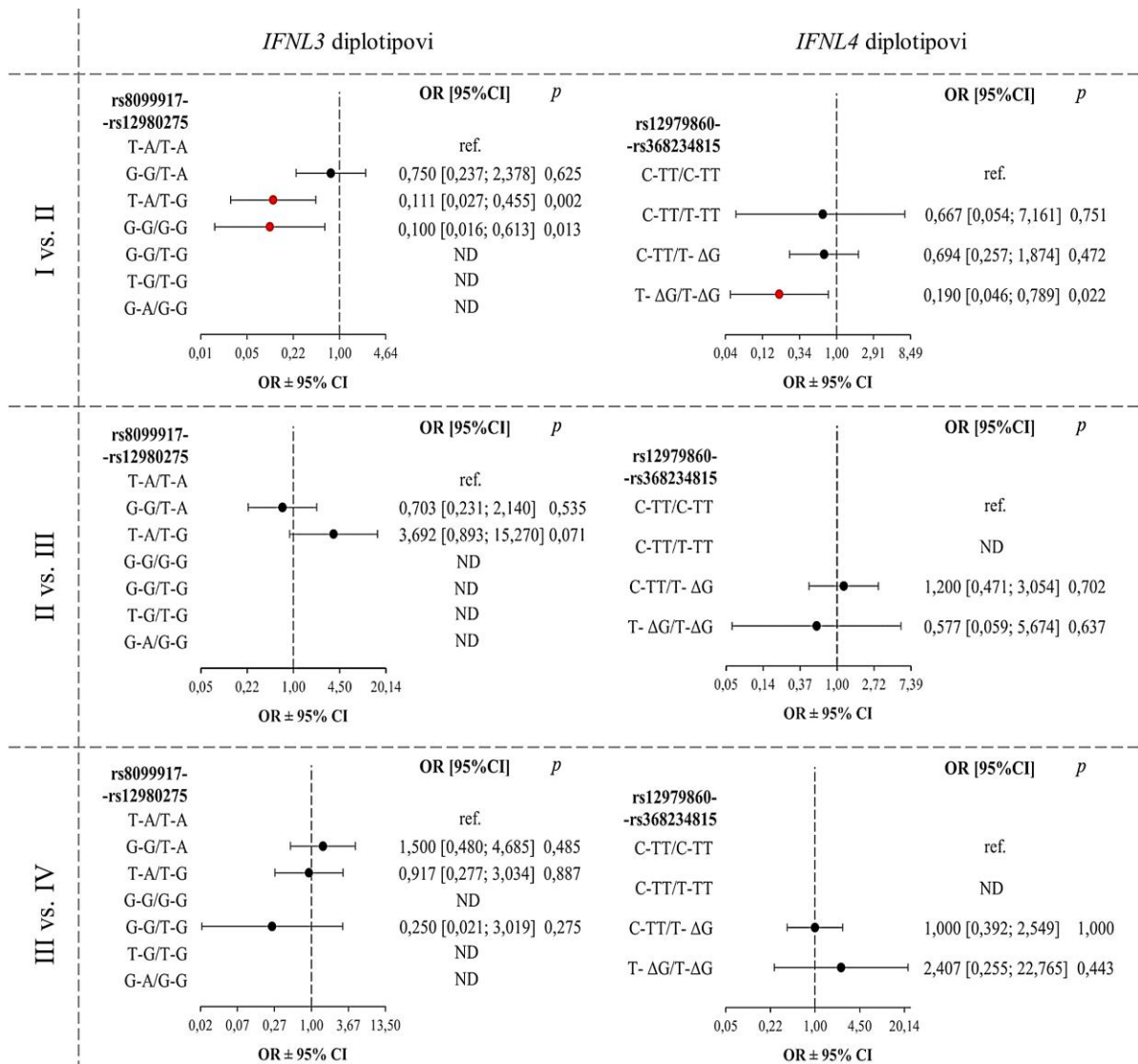


Grafikon 32. Relativna učestalost haplotipova i diplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema težini kliničke slike. I – blaga (n=30), II – umereno teška (n=61), III – teška (n=27), IV – kritično teška (n=60) klinička slika; * $p<0,05$

Ordinalnom logističkom regresijom utvrđeno je da *IFNL3* diplotip G-G/G-G statistički značajno redukuje verovatnoću progresije težine kliničke slike (OR[95%CI] = 0,26[0,08; 0,89], $p=0,032$). Analiza uticaja haplotipova i diplotipova *IFNL3* i *IFNL4* gena na progresiju COVID-19 univarijabilnom logističkom regresijom prikazana je na grafikonima 33 i 34. Nosioци haplotipa T-G za *IFNL3* rs8099917-rs12980275 imali su statistički značajno niži rizik za oboljevanje od umereno teškog COVID-19. Ovaj protektivni efekat bio je još veći za T-A/T-G i G-G/G-G diplotipove, čiji su nosioци imali desetostruko sniženje šansi za razvoj umereno teškog oblika u odnosu na homozigotni diplotip za divlji alel. Haplotip sa oba varijantna alela za *IFNL4* T-ΔG smanjivao je verovatnoću za umereno težak oblik bolesti za oko 50% u odnosu na divlji C-TT haplotip, dok je opservirani protektivni efekat kod homozigotnih nosioца ovog haplotipa bio 80%.



Grafikon 33. Uticaj haplotipova polimorfizama gena *IFNL3* i *IFNL4* na težinu kliničke slike kroz parove kategorija (označeno levo). Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano; I – blaga, II – umereno teška, III – teška, IV – kritično teška klinička slika



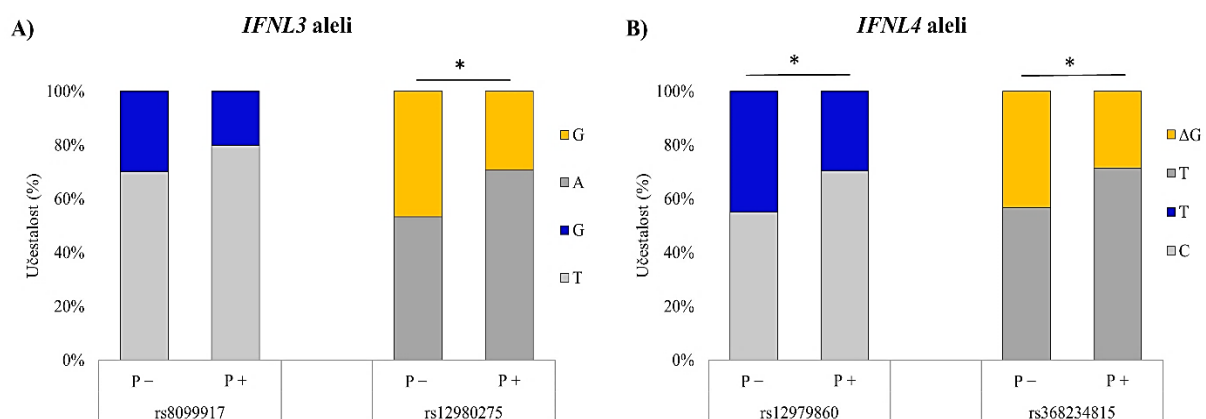
Grafikon 34. Uticaj diplotipova ipolimorfizama gena *IFNL3* i *IFNL4* na težinu kliničke slike kroz parove kategorija (označeno levo). Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95%CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano

4.4.3. Analiza polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* prema prisustvu pneumonije

U prethodnom delu analize uočena je jasna izrazita povezanost polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na razvoj blage u umerenu kliničku sliku COVID-19, dok veza sa daljom progresijom bolesti nije zabeležena. Shodno tome, uz poštovanje preporuka smernica SZO o radiološki potvrđenoj pneumoniji kao primarnom dijagnostičkom kriterijumu za specifično razlikovanje lake forme od svih ostalih ozbiljnijih stadijuma bolesti, restratifikovali smo našu studijsku kohortu u dve nove grupe: bez pneumonije (laki slučajevi) i sa pneumonijom (umereni, teški i kritično teški slučajevi), sa ciljem da se utvrdi povezanost polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena sa razvojem pneumonije.

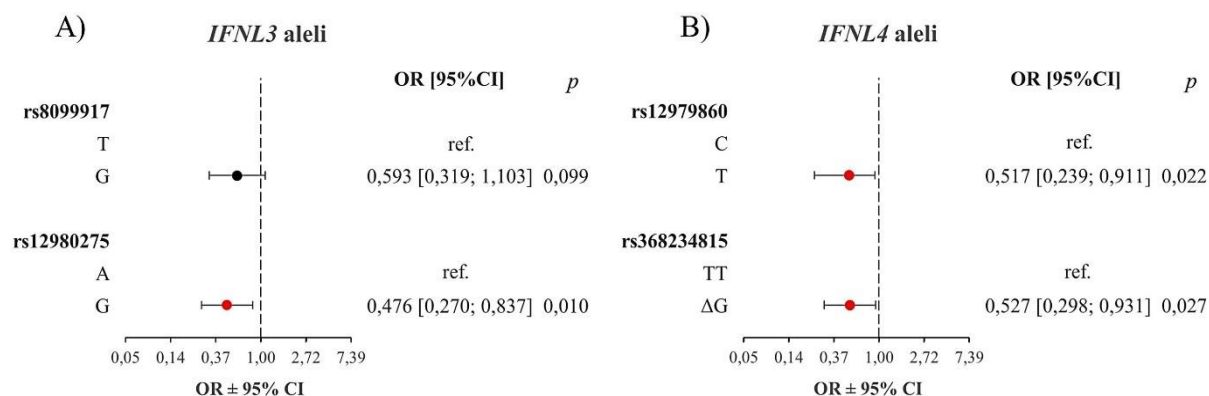
4.4.3.1. Učestalost alela i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije

Raspodela alela polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena prema prisustvu COVID-19 pneumonije prikazana je na grafikonu 35. Analizom rezultata utvrđeno je da je učestalost varijantnih alela bila statistički značajno različita među pacijentima sa i bez pneumonije za polimorfizam *IFNL3* gena rs12980275 G ($\chi^2(1)=6,041$; $p=0,014$), kao i polimorfizme *IFNL4* gena rs12979860 T ($\chi^2(1)=4,644$; $p=0,031$) i rs368234815 Δ G ($\chi^2(1)=4,310$; $p=0,038$). Učestalost ovih alela je bila oko jedan i po puta veća u grupi pacijenata bez pneumonije u poređenju sa grupom pacijenata sa pneumonijom. Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji alela za polimorfizam *IFNL3* gena rs8099917 ($\chi^2(1)=2,221$; $p=0,136$).



Grafikon 35. Relativna učestalost alela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema prisustvu pneumonije. P- – bez pneumonije (n=30), P+ – sa pneumonijom (n=148); * $p < 0,05$

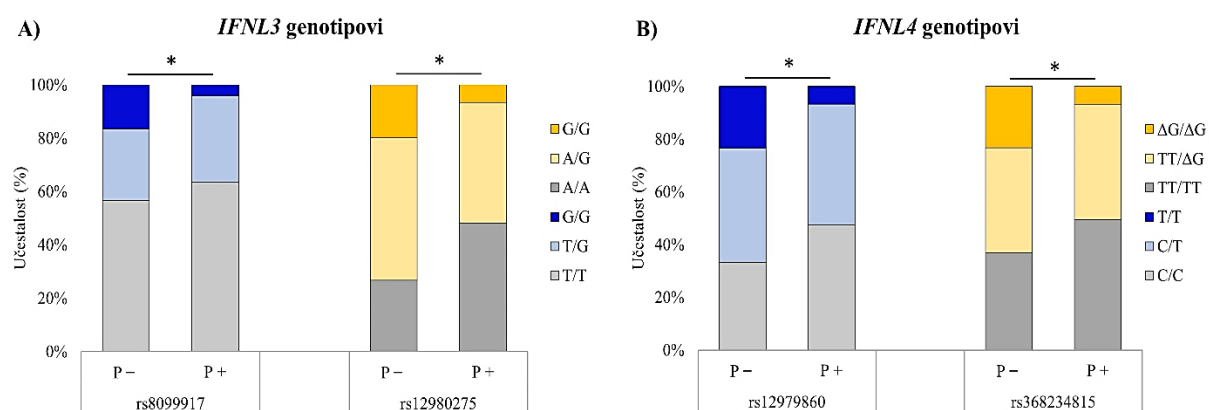
Univarijabilnom regresionom analizom dokazan je statistički značajan protektivni uticaj ispitivanih polimorfizama na razvoj pneumonije. Prisustvo alela rs12980275 G, rs12979860 T i rs368234815 Δ G redukovalo je verovatnoću za razvoj pneumonije za oko 50% u poređenju sa odgovarajućim divljim alelom (grafikon 36). Polimorfizam rs8099917 nije statistički značajno uticao na nastanak COVID-19 pneumonije, ali je i G alel imao konotaciju protektivnog alela.



Grafikon 36. Uticaj alela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije. Crveni krugovi ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*); ref. – referentna kategorija

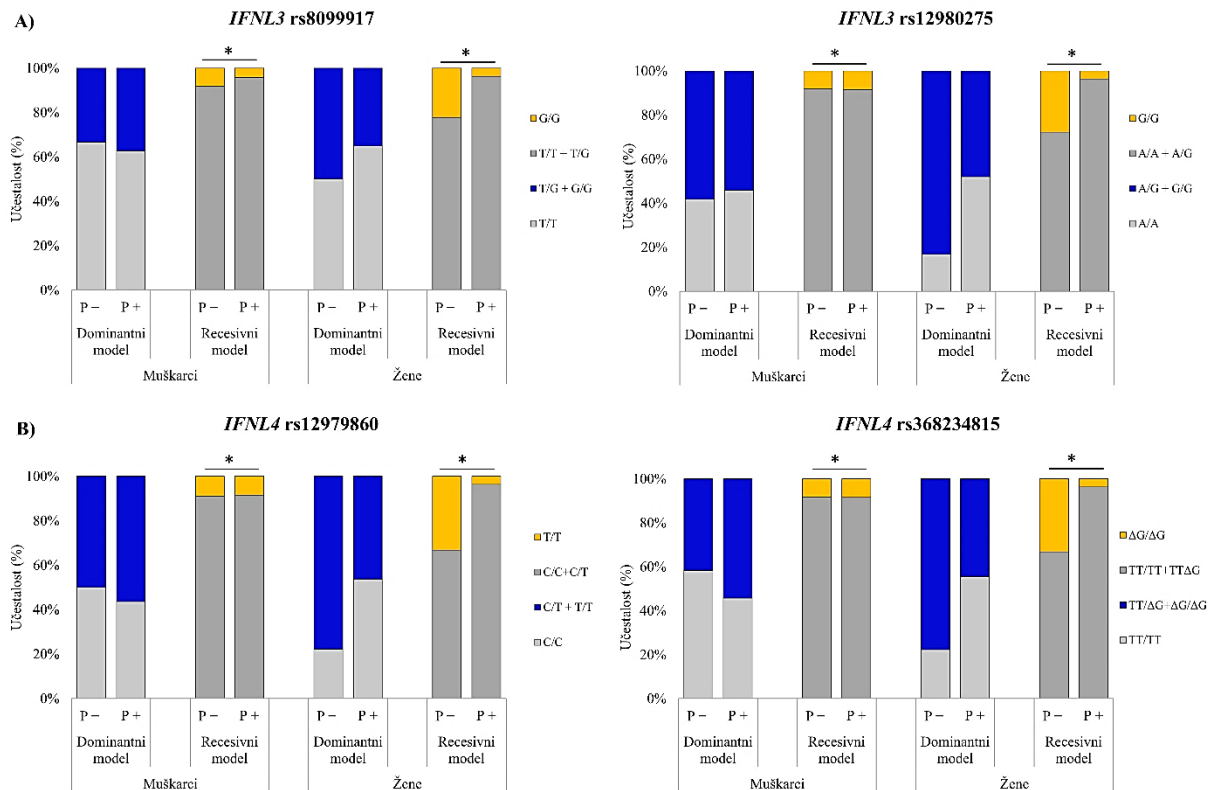
4.4.3.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije

Trend distribucije genotipova polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena među grupama sa i bez COVID-19 pneumonije prikazan je na grafikonu 37. Raspodela heterozigota i homozigota za divlje alele pratila je isti trend među poređenim grupama, s tim da su divlji homozigotni genotipovi bili zastupljeniji u grupi pacijenata sa pneumonijom. Frekvencija homozigota za varijantne alele bila je tri do četiri puta veća među pacijentima bez pneumonije u odnosu na grupu sa pneumonijom. Uočene razlike bile su statistički značajne i za genotipove *IFNL3* gena rs8099917 ($\chi^2(2)=6,872$; $p=0,032$) i rs12980275 ($\chi^2(2)=7,766$; $p=0,021$) i za genotipove *IFNL4* gena rs12979860 ($\chi^2(2)=8,296$; $p=0,016$) i rs368234815 ($\chi^2(2)=8,112$; $p=0,017$).



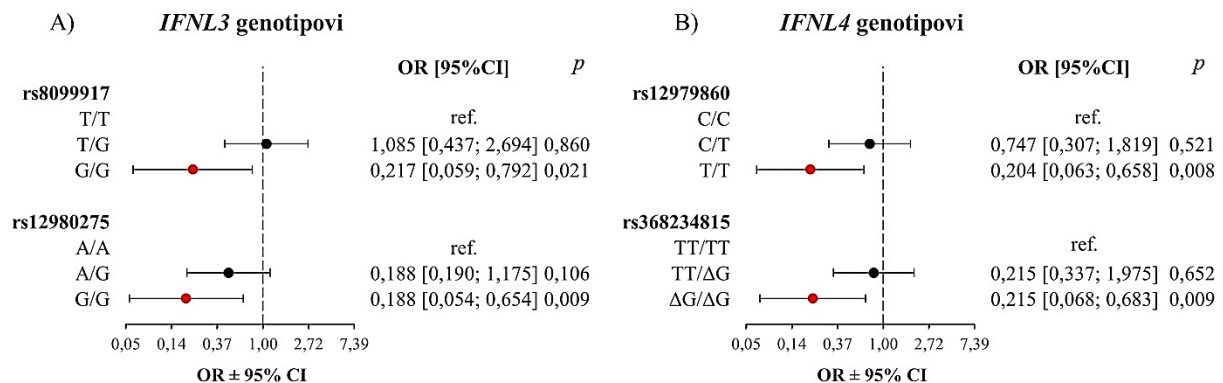
Grafikon 37. Relativna učestalost genotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema prisustvu pneumonije. P- – bez pneumonije (n=30), P+ – sa pneumonijom (n=148); * $p < 0,05$

Dihotomizacijom genotipova u genotipske grupe potvrđeni su rezultati dobijeni analizom genotipova. Rezultati su prikazani na grafikonu 38. Naime, grupisanjem po recesivnom modelu utvrđeno je da su homozigoti za varijantne alele statistički značajno zastupljeniji u grupi bez pneumonije u poređenju sa pacijentima koji su razvili pneumoniju (*IFNL3* rs8099917 T/T+T/G vs. G/G, $p=0,022$; *IFNL3* rs12980275 A/A+A/G vs. G/G, $p=0,032$; *IFNL4* rs12979860 C/C+C/T vs T/T, $p=0,011$ i *IFNL4* rs368234815 TT/TT+TTΔG vs ΔG/ΔG, $p=0,011$).

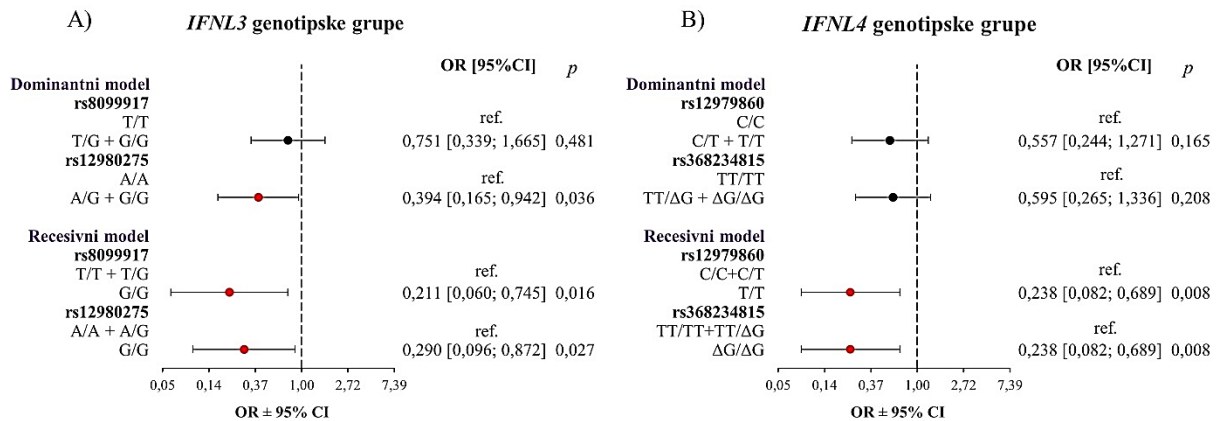


Grafikon 38. Relativna učestalost genotipskih grupa polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema prisustvu pneumonije. P- – bez pneumonije (n=30), P+ – sa pneumonijom (n=148); * $p < 0,05$

Asocijacija genotipova i genotipskih grupa polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* sa verovatnoćom za oboljevanje od COVID-19 pneumonije bila je statistički značajna. Prisustvo oba varijantna alela svih ispitivanih polimorfizama nosilo je skoro petostruko smanjenje verovatnoće za nastanak pneumonije u odnosu na divlje homozigote (grafikon 39). Magnituda protektivnog uticaja na razvoj pneumonije replikovana je u recesivnom modelu, gde su nosioci oba varijantna alela imali značajno niži rizik u odnosu na nosioce makar jednog varijantnog alela (grafikon 40).



Grafikon 39. Uticaj genotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija

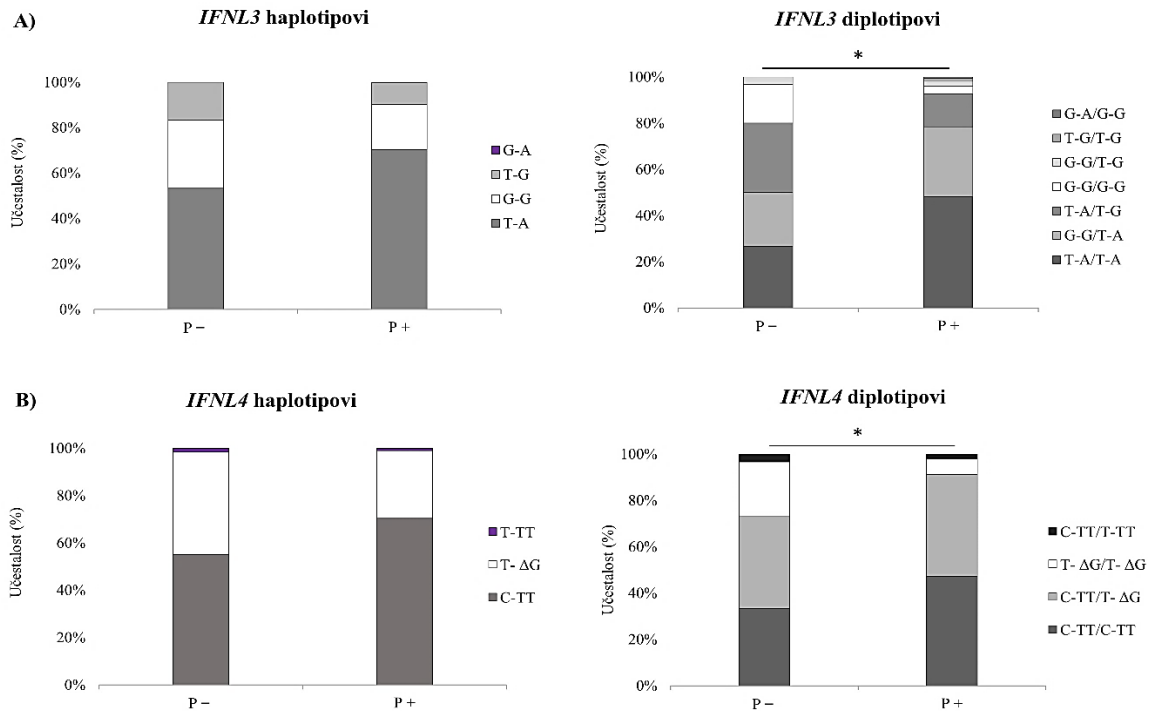


Grafikon 40. Uticaj genetičkih modela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja

4.4.3.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije

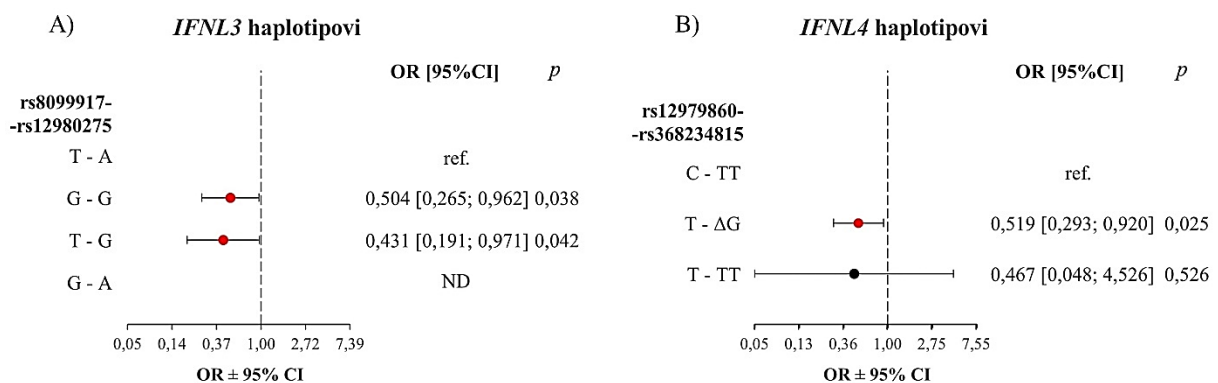
Rezultati analize učestalosti haplotipova i diplotipova među pacijentima sa i bez pneumonije prikazani su grafikonom 41. U obe grupe dominirali su haplotipovi sa divljim alelima, s tim da je haplotip *IFNL3* G-A bio prisutan samo u grupi pacijenata sa pneumonijom. Neophodno je istaći da su haplotipovi sa oba varijantna alela *IFNL3* G-G i *IFNL4* T-ΔG bili učestaliji kod pacijenata bez pneumonije. Ipak, opservirane razlike u distribuciji haplotipova za *IFNL3* i *IFNL4* gene nisu bile statistički značajne (*IFNL3* rs8099917-rs12980275: $\chi^2(3) < 7,815$; $p > 0,05$; *IFNL4* 12979860-rs36823481: $\chi^2(2) < 5,991$; $p > 0,05$).

S druge strane, razlike u zastupljenosti *IFNL3* i *IFNL4* diplotipova među poređenim grupama su dosegle statističku značajnost (*IFNL3* rs8099917-rs12980275: $\chi^2(6) = 15,316$; $p = 0,018$; *IFNL4* 12979860-rs36823481: $\chi^2(3) = 8,537$; $p = 0,032$). Diplotip *IFNL3* sa jednim varijantnim alelom T-A/T-G, kao i diplotip sačinjen od homozigota za varijantne alele G-G/G-G bili su češći kod pacijenata bez pneumonije u odnosu na obolele sa pneumonijom. Istovremeno, pacijenti bez pneumonije češće su bili nosioci homozigotne kombinacije minornih alela *IFNL4* T-ΔG/T-ΔG nego pacijenti koji su razvili pneumoniju. Diplotipovi *IFNL3* T-G/T-G i G-A/G-G zabeleženi su kod malog broja pacijenata sa pneumonijom.

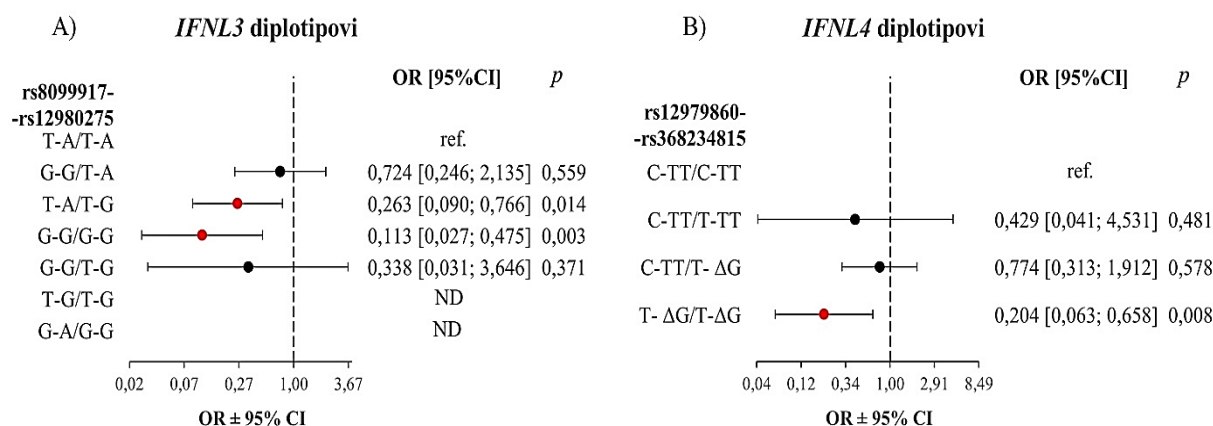


Grafikon 41. Relativna učestalost haplotipova i diplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema prisustvu pneumonije. P- – bez pneumonije (n=30), P+ – sa pneumonijom (n=148); * $p < 0,05$

Analizom asocijacije univarijabilnom logističkom regresijom potvrđeno je da uočene razlike u distribuciji haplotipova i diplotipova *IFNL3* i *IFNL4* gena statistički značajno umanjuju sklonost ka razvoju COVID-19 pneumonije. Haplotipovi sa oba varijantna alela *IFNL3* G-G i *IFNL4* T-ΔG redukuju rizik od razvoja pneumonije za 50% u odnosu na haplotipove *IFNL3* T-A i *IFNL4* C-TT (grafikon 42). Veličina protektivnog efekta kod homozigota za navedene haplotipove kretala se u opsegu od 80% - 90% redukcije verovatnoće za nastanak pneumonije u poređenju sa divljim diplotipovima *IFNL3* T-A/T-A i *IFNL4* C-TT/C-TT (grafikon 43). Isti trend pratili su i haplotip *IFNL3* T-G i diplotip *IFNL3* T-A/T-G. Odnos šansi nije računat za haplotip *IFNL3* G-A i diplotipove *IFNL3* T-G/T-G i G-A/G-G jer navedeni nisu bili prisutni među pacijentima bez pneumonije.



Grafikon 42. Uticaj haplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano



Grafikon 43. Uticaj diplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*); ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano

4.4.3.4. Uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na razvoj COVID-19 pneumonije: multivarijabilna logistička regresija

Da bi se dalje procenio potencijalni efekat genetičkih polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* na verovatnoću razvoja pneumonije kod pacijenata sa COVID-19, uzimajući u obzir moguće zbunjujuće faktore, kao što su starost, pol, pridružene bolesti i laboratorijski parametri, sprovedena je multivarijabilna logistička regresija sa sa postepenim isključivanjem varijabli unazad (tabela 19). Najbolji model (Hosmer-Lemešov $\chi^2(7)=8,989$, $p=0,253$) je bio statistički značajan ($\chi^2(3)=24,593$, $p < 0,001$). Objasnio je 21,6% (Nagelkerke R^2) varijanse razvoja pneumonije i tačno klasifikovao 85,4% slučajeva. Rezultati su potvrdili pozitivnu asocijaciju između CCI i verovatnoće razvoja COVID-19 pneumonije, pri čemu su žene i nosioci oba varijantna alela za *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815 imali manju verovatnoću za razvoj pneumonije.

Tabela 19. Model multivarijabilne logističke regresije koji najbolje opisuje uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na razvoj COVID-19 pneumonije

Varijable	B	S.E.	Wald χ^2	p	OR	[95% CI]
CCI	0,461	0,145	10,084	0,001	1,586	[1,193; 2,109]
Pol ^a	-1,019	0,437	5,434	0,020	0,361	[0,153; 0,850]
Recesivni model <i>IFNL4</i> ^{b,c}	-1,456	0,604	5,821	0,016	0,233	[0,071; 0,761]

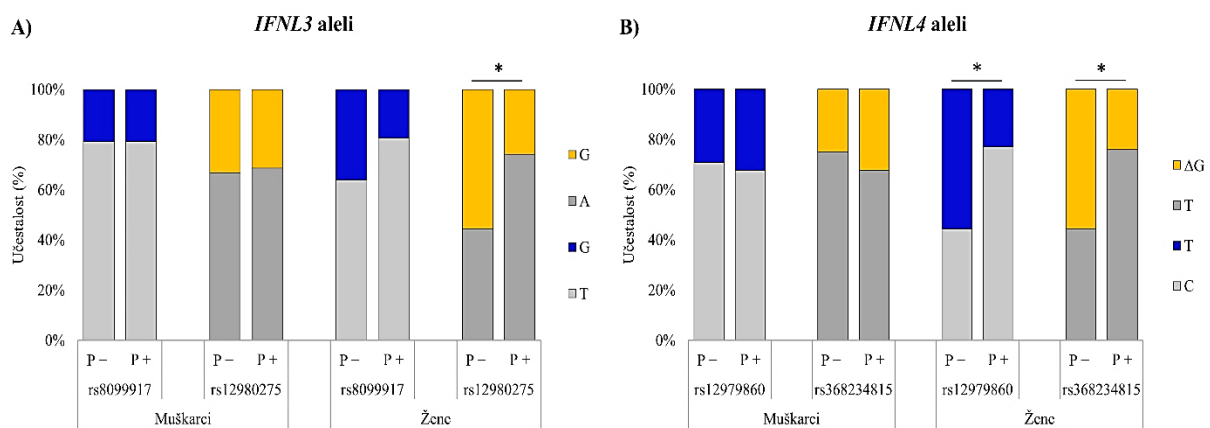
^a – muškarci kao referentna kategorija; ^b – rs12979860 ili rs368234815; ^c – C/C+C/T ili TT/TT+TT/ΔG kao referentna grupa; B – koeficijent regresije; S.E. – standardna greška za β; Wald χ^2 – Valdova test statistika za jedan stepen slobode (df=1); p – nivo značajnosti; OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja za OR; CCI – Čarlsonov indeks komorbiditeta

4.4.4. Analiza polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* prema prisustvu pneumonije i polu

Shodno rezultatima multivariabilne logističke regresije da uticaj ispitivanih polimorfizama statistički značajno zavisi od pola, populaciju smo stratifikovali prema polu sa ciljem da se sagleda stepen uticaja polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena kao protektivnih faktora na razvoj COVID-19 pneumonije kod muškaraca i žena.

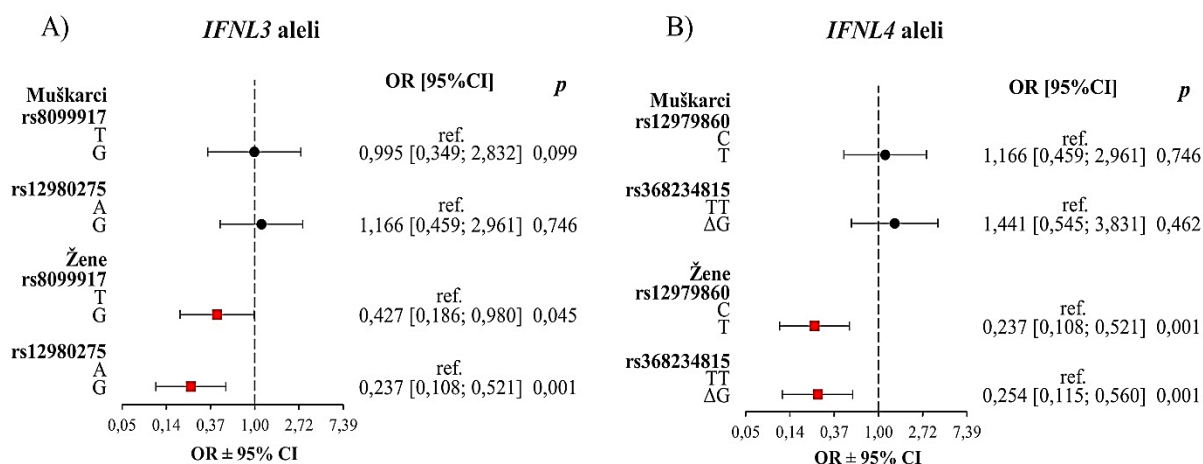
4.4.4.1. Učestalost alela i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije među polovima

Kao što je prikazano na grafikonu 44, relativna učestalost divljih i varijantnih alela polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena je bila je gotovo identična među pacijentima muškog pola sa i bez COVID-19 pneumonije ($\chi^2(1)<3,841$; $p>0,05$). Nasuprot tome, distribucija alela *IFNL3* gena rs12980275 ($\chi^2(1)=9,375$; $p=0,002$), kao i alela *IFNL4* gena rs12979860 ($\chi^2(1)=12,390$; $p<0,001$) i rs368234815 ($\chi^2(1)=10,903$; $p=0,001$) se statistički značajno razlikovala među ženama. Frekvencija varijantnih alela za navedne polimorfizme je bila oko dva puta veća u grupi žena bez pneumonije u poređenju sa ženama koje su razvile pneumoniju, dok su češći aleli dominirali među pacijentkinjama sa pneumonijom. Razlika u raspodeli alela *IFNL3* rs8099917 prema prisustvu pneumonije kod žena nije dosegla statističku značajnost ($\chi^2(1)=3,286$; $p=0,070$).



Grafikon 44. Relativna učestalost alela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema prisustvu pneumonije stratifikovana prema polu. P- – bez pneumonije (n=30; 12 muškarci), P+ – sa pneumonijom (n=148; 94 muškarci); * $p<0,05$

Regresionom analizom je potvrđeno da aleli ispitivanih polimorfizama nemaju statistički značajan uticaj na razvoj pneumonije kod muškaraca. S druge strane, verifikovano je da prisutne razlike u distribuciji alela među ženama sa i bez pneumonije statistički značajno menjaju verovatnoću za nastanak COVID-19 pneumonije. Preciznije, žene koje su nosioci varijantnih alela *IFNL3* rs12980275 G, *IFNL4* rs12979860 T ili *IFNL4* rs368234815 ΔG imale su oko četiri puta manju verovatnoću za razvoj pneumonije u odnosu na nosioce divljih alela, dok je alel *IFNL3* rs8099917 G smanjivao ovaj rizik za 57% (grafikon 45).

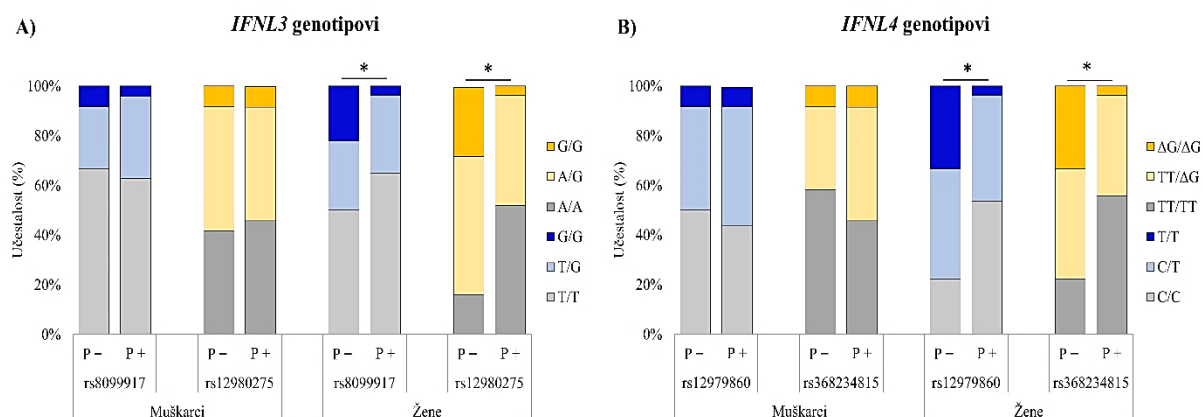


Grafikon 45. Uticaj alela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije stratifikovano prema polu. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, a crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija

4.4.4.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije među polovima

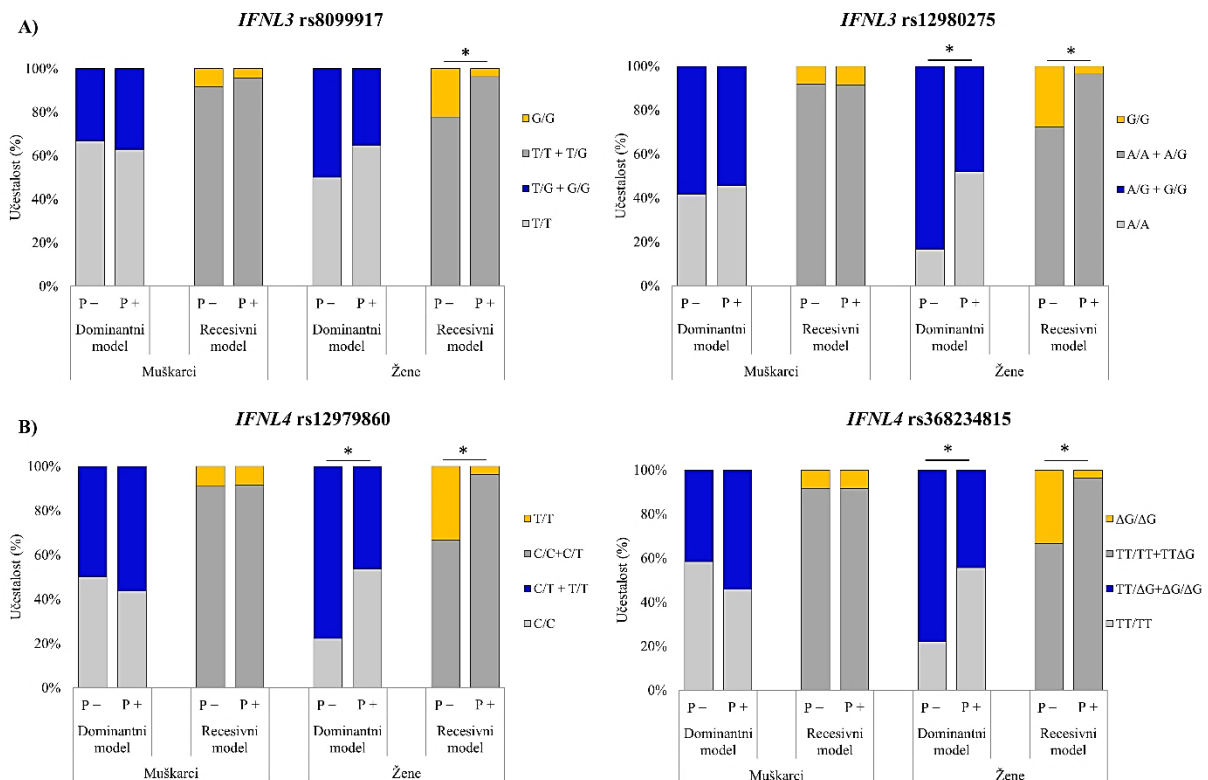
Obrazac zastupljenosti genotipova i genotipskih grupa za polimorfizme *IFNL3* i *IFNL4* gena prema prisustvu pneumonije kod muškaraca i žena prikazani su na grafikonima 46 i 47.

Među muškarcima sa i bez pneumonije nije zabeležena značajna razlika u raspodeli genotipova za bilo koji od ispitivanih polimorfizama ($\chi^2(2) < 5,991$; $p > 0,05$), naspram pacijentkinja kod kojih je zapažena značajna razlika u alokaciji genotipova svih polimorfizama među poređenim grupama (*IFNL3*: rs8099917 $\chi^2(2) = 6,101$; $p = 0,047$ i rs12980275 $\chi^2(2) = 12,282$; $p = 0,002$; *IFNL4*: rs12979860 $\chi^2(2) = 13,597$; $p = 0,001$ i rs368234815 $\chi^2(2) = 13,888$; $p = 0,001$). Naime, pacijentkinje bez pneumonije su češće bile nosioci homozigotnih genotipova za varijantne alele *IFNL3* i *IFNL4* gena u poređenju sa pacijentkinjama koje su razvile pneumoniju. Istovremeno, učestalost divljih homozigota svih polimorfizama, osim za *IFNL3* rs8099917, bila je oko 20% u grupi pacijentkinja koje su imale pneumoniju (grafikon 46).



Grafikon 46. Relativna učestalost genotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema prisustvu pneumonije stratifikovana prema polu. P- – bez pneumonije (n=30; 12 muškarci), P+ – sa pneumonijom (n=148; 94 muškarci); * $p < 0,05$

Analiza distribucije genotipskih grupa potvrdila je rezultate ustanovljene na nivou genotipa (grafikon 47). Frekvencija oba varijantna homozigota, u okviru recesivnog modela, bila je značajno veća kod pacijentkinja bez pneumonije u odnosu na grupu sa dijagnostikovanom COVID-19 pneumonijom (*IFNL3*: rs8099917 $p=0,031$; rs12980275 $p=0,009$; *IFNL4*: rs12979860 $p=0,002$ i *IFNL4*: rs368234815 $p=0,002$). Pored toga, statistički značajna razlika zabeležena je i na nivou dominantnih modela, osim za *IFNL3* rs8099917 polimorfizam. Ovo ukazuje da su pacijentkinje sa makar jednim varijantnim alelom češće bile u grupi bez pneumonije u odnosu na grupu sa pneumonijom (*IFNL3*: rs12980275 $\chi^2(1)=5,457$; $p=0,019$, *IFNL4* rs12979860: $\chi^2(1)=4,196$; $p=0,041$ i rs368234815 $\chi^2(1)=4,755$; $p=0,029$). Nije uočena statistički značajna razlika u raspodeli prema prisustvu pneumonije ni na nivou recesivnih ni dominantnih modela u grupi muškaraca ($\chi^2(1)<3,841$; $p>0,05$).

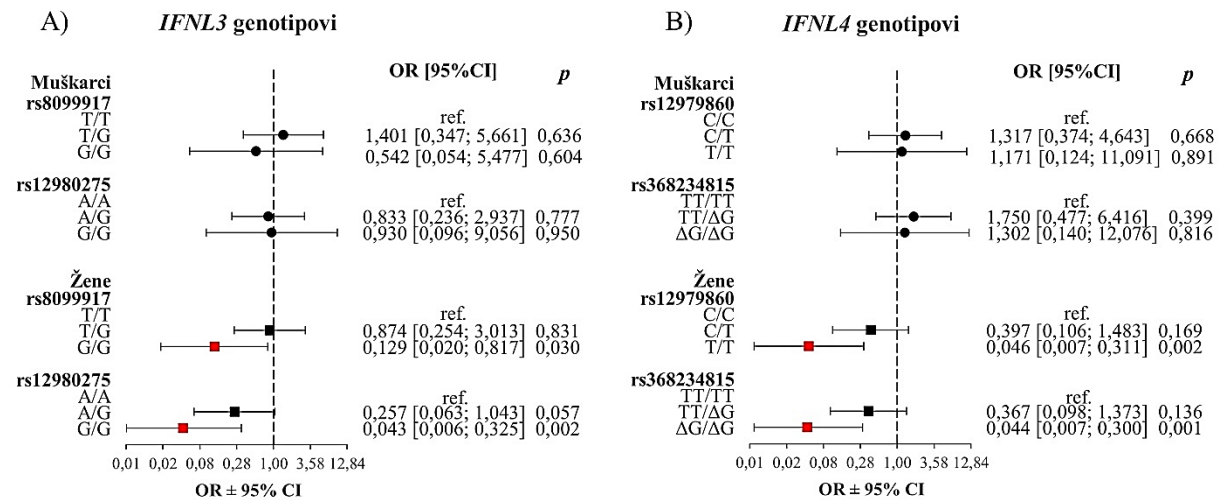


Grafikon 47. Relativna učestalost genotipskih grupa polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema prisustvu pneumonije stratifikovana prema polu. P- – bez pneumonije (n=30; 12 muškarci), P+ – sa pneumonijom (n=148; 94 muškarci); * $p<0,05$

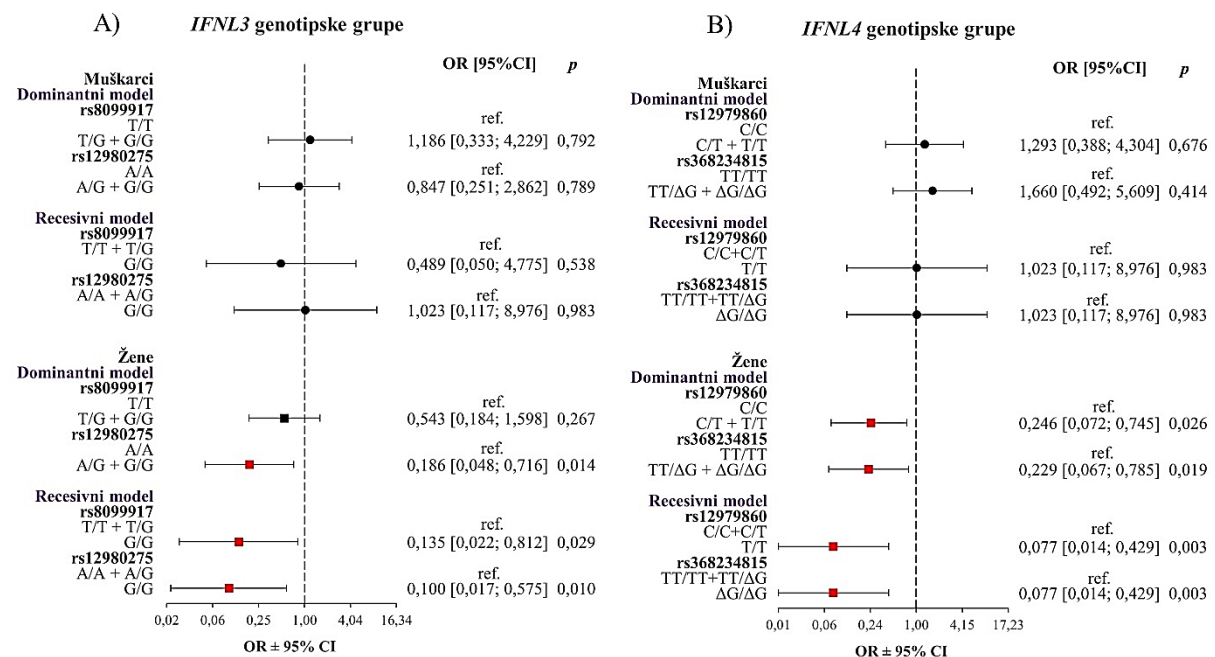
Protektivni uticaj genotipova i genotipskih grupa polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na nastanak COVID-19 pneumonije bio je statistički značajan u grupi žena, ali ne i među muškarcima. Rezultati su prikazani na grafikonima 48 i 49.

Protektivni efekat prisustva varijantnih alela za polimorfizam *IFNL3* gena rs12980275, kao i oba polimorfizma *IFNL4* gena, rs12979860 i rs368234815 bio je prisutan u grupi pacijentkinja. Naime, vrednosti verovatnoće za razvoj pneumonije opadale su kroz povećanje broja varijantnih alela. Pacijentkinje kao nosioci makar jednog varijantnog alela *IFNL3* rs12980275 A/G+G/G, *IFNL4* rs12979860 C/T+T/T i *IFNL4* rs368234815 TT/ΔG+ΔG/ΔG imale su četiri do pet puta manju šansu za razvoj pneumonije u poređenju sa nosiocima divljih homozigota, kao referentnom grupom (*IFNL3* rs12980275 A/A, *IFNL4* rs12979860 C/C i *IFNL4* rs368234815 TT/TT; grafikon 49). Sniženje verovatnoće bilo je izraženije za varijantne homozigote *IFNL3* rs12980275 G/G, *IFNL4* rs12979860 T/T i *IFNL4* rs368234815 ΔG/ΔG: i

kretalo se u opsegu od 10-13 puta u poređenju sa nosiocima genotipova sa divljim alelom (*IFNL3* rs12980275 A/A+A/G, *IFNL4* rs12979860 C/C+C/T i *IFNL4* rs368234815 TT/TT+TT/ΔG; grafikon 49), dok je protektivni efekat bio udvostručen, sa sniženjem rizika oko 20 puta, prilikom komparacije sa divljim homozigotima (*IFNL3* rs12980275 A/A, *IFNL4* rs12979860 C/C i *IFNL4* rs368234815 TT/TT; grafikon 48). Takođe, šansa za razvoj pneumonije bila je približno sedam puta manja kod homozigota za varijantni alel polimorfizma *IFNL3* rs8099917 G/G u odnosu na divlje homozigote (T/T; grafikon 48) i nosioce genotipa sa makar jednim divljim alelom (T/T+T/G; grafikon 49).



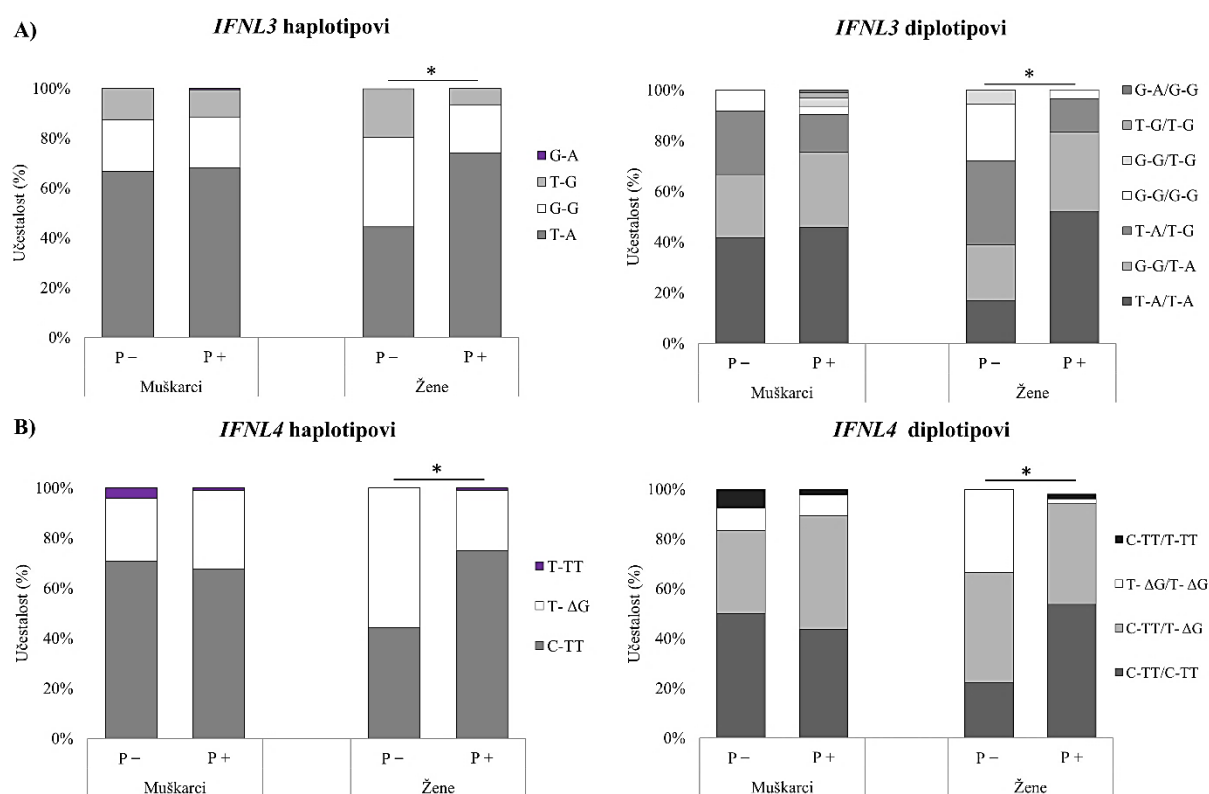
Grafikon 48. Uticaj genotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije stratifikovan prema polu. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, a crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija



Grafikon 49. Uticaj genetičkih modela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije stratifikovan prema polu. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, a crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja

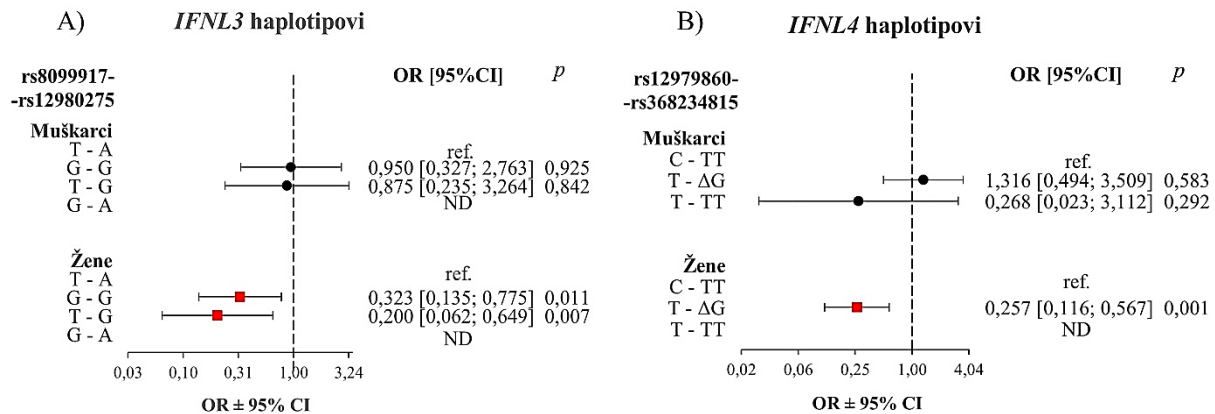
4.4.4.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na razvoj COVID-19 pneumonije među polovima

Kao u prethodnim etapama analize, disproporcija u raspodeli haplotipova i diplotipova *IFNL3* rs8099917-rs12980275 i *IFNL4* 12979860-rs36823481 prema statusu pneumonije je bila statistički značajna samo među pacijentima ženskog pola (grafikon 50). Haplotipovi *IFNL3* lokusa sa jednim i oba varijantna alela su bili dominantniji u grupi pacijentkinja bez pneumonije (T-G i G-G: $\chi^2(2)=11,399$; $p=0,003$), kao i njihovi diplotipovi (T-A/T-G i G-G/G-G: $\chi^2(4)=15,937$; $p=0,003$), u poređenju sa grupom koja je imala pneumoniju. Nosioci haplotipa *IFNL4* T- Δ G i njegove homozigotne kombinacije u okviru diplotipa su ređe imali pneumoniju ($\chi^2(2)=12,452$; $p=0,002$ i $\chi^2(3)=13,964$; $p=0,003$). Haplotipovi *IFNL3* G-A i *IFNL4* T-TT i diplotipovi *IFNL3* G-G/T-G, T-G/T-G, G-A/G-G i *IFNL4* C-TT/T-TT bili su zastupljeni samo u populaciji muškaraca.

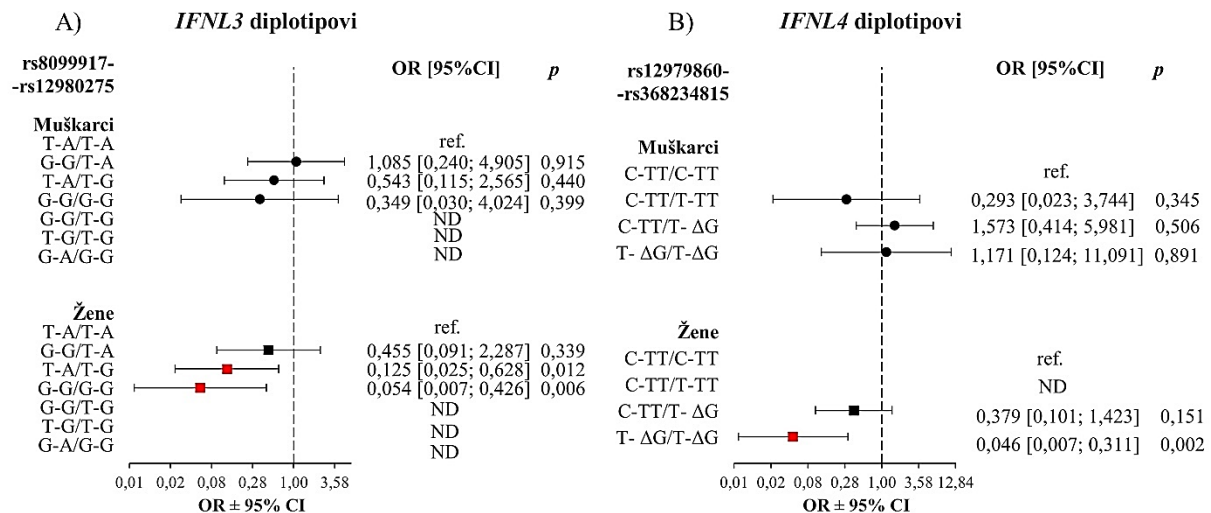


Grafikon 50. Relativna učestalost haplotipova i diplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema prisustvu pneumonije stratifikovana prema polu. P- – bez pneumonije (n=30; 12 muškarci), P+ – sa pneumonijom (n=148; 94 muškarci); * $p<0,05$

Regresionom analizom dokazano je da prisustvo haplotipova T-G i G-G na *IFNL3* lokusu, kao i T- Δ G na *IFNL4* lokusu redukuje verovatnoću za nastanak COVID-19 pneumonije kod pacijentkinja za približno 70% - 80% u odnosu na divlje haplotipove (*IFNL3* T-A i *IFNL4* C-TT; grafikon 51). Ovaj procenat je prominentno porastao na gotovo 95% kod homozigotnih varijantnih diplotipova *IFNL3* G-G/G-G i *IFNL4* T- Δ G/T- Δ G, ali i *IFNL3* T-A/T-G diplotipa u komparaciji sa divljim diplotipovima (*IFNL3* T-A/T-A i *IFNL4* C-TT/C-TT; grafikon 52).



Grafikon 51. Uticaj haplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije stratifikovan prema polu. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, a crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95%CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano



Grafikon 52. Uticaj diplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na razvoj pneumonije stratifikovan prema polu. Crveni markeri ukazuju na $p < 0,05$, a crni na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija

4.4.4.4. Uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na razvoj COVID-19 pneumonije kod žena: multivarijabilna logistička regresija

Shodno rezultatima univarijabilne regresije, koji nedvosmisleno ukazuju na značajan protektivni uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na razvoj COVID-19 pneumonije kod žena, kreiran je multivarijabilni regresioni model sa postepenom eliminacijom varijabli unazad. U najprikladniji regresioni model za predviđanje razvoja pneumonije kod žena (Hosmer-Lemešov test: $\chi^2(6)=6,823$, $p=0,338$; tabela 20) uključeni su CCI i recesivni model za *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815. Prikazani model opisao je 51,1% (Nagelkerke R^2) varijanse razvoja pneumonije i adekvatno klasifikovao 83,3% slučajeva. Žene koje su homozigotni nosioci varijantnih alela *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815 imaju gotovo 29 puta manju

verovatnoću za razvoj pneumonije tokom infekcije SARS-CoV-2 virusom, nakon prilagođavanja za CCI. Međutim, ni multivarijabilna analiza nije pokazala takvu povezanost kod muškaraca (Hosmer-Lemešov test: $\chi^2(5)=2,900$, $p=0,715$; Nagelkerke $R^2=6\%$; tačno klasifikovanih 88,7% slučajeva).

Tabela 20. Modeli multivarijabilne logističke regresije koji najbolje opisuju uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na razvoj COVID-19 pneumonije stratifikovani prema polu

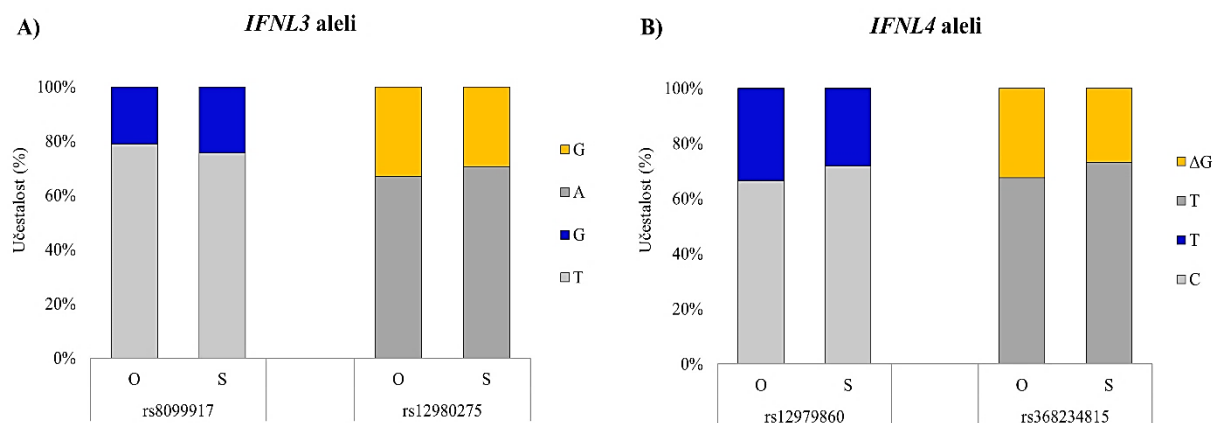
	B	S.E.	Wald χ^2	<i>p</i>	OR	[95% CI]
Muškarci						
CCI	0,098	0,181	0,291	0,589	1,103	[0,773; 1,573]
Recesivni model <i>IFNL4</i> ^{a,b}	0,000	1,111	0,000	1,000	1,000	[0,113; 8,817]
Žene						
CCI	1,033	0,327	9,996	0,002	2,810	[1,481; 5,332]
Recesivni model <i>IFNL4</i> ^{a,b}	-3,360	1,257	7,145	0,008	0,035	[0,003; 0,408]

^a - rs12979860 ili rs368234815; ^b - C/C+C/T ili TT/TT+TT/ΔG kao referentna grupa; B – koeficijent regresije; S.E. – standardna greška za β; Wald χ^2 – Valdova test statistika za jedan stepen slobode (df=1); *p* – nivo značajnosti; OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja za OR; CCI – Čarlsonov indeks komorbiditeta

4.4.5. Analiza polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* prema ishodu bolesti

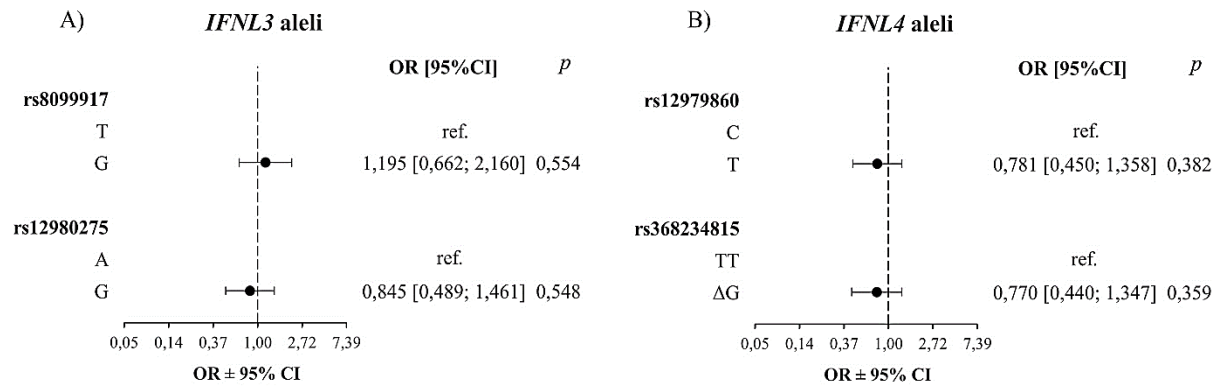
4.4.5.1. Učestalost alela i njihov uticaj na ishod bolesti

Učestalost alela polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena prema kategorijama ishoda bolesti prikazana je na grafikonu 53. Raspodela alela svih ispitivanih polimorfizama bila je homogena među pacijentima otpuštenim iz bolnice i pacijentima preminulim tokom hospitalizacije ($\chi^2(1)<3,841$; $p>0,05$).



Grafikon 53. Relativna učestalost alela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema ishodu bolesti. O – otpust iz bolnice (n=139), S – smrtni ishod tokom hospitalizacije (n=39)

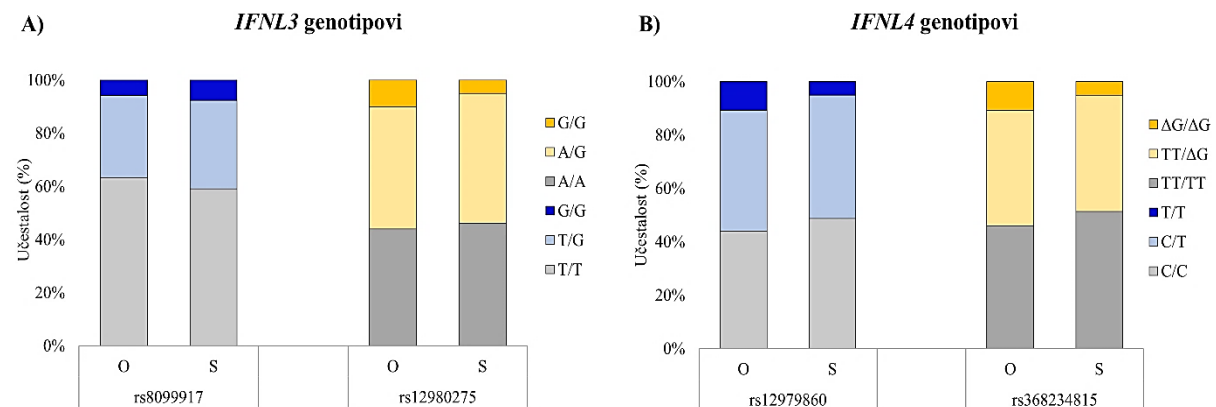
Univarijabilnom logističkom regresijom nije detektovana statistički značajana povezanost alela ni za jedan od polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena, prikazanih na grafikonu 54, sa ishodom COVID-19. U svakom slučaju, varijantni aleli polimorfizama *IFNL3* rs12980275, *IFNL4* rs12979860 i *IFNL4* rs368234815 pozicionirani su kao protektivni aleli, dok je minorni alel za *IFNL3* rs8099917 povećavao šanse za fatalni ishod.



Grafikon 54. Uticaj alela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na ishod bolesti. Crni markeri ukazuju na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija

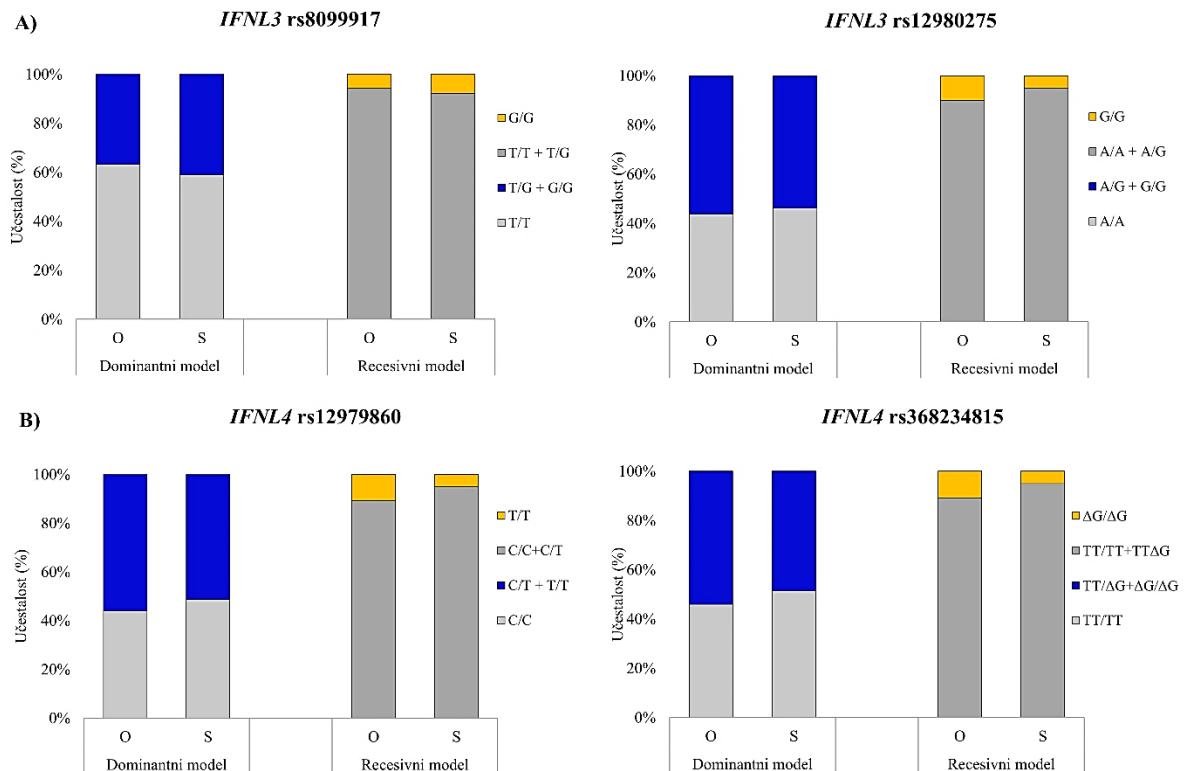
4.4.5.2. Učestalost genotipova i genotipskih grupa i njihov uticaj na ishod bolesti

Upoređivanjem učestalosti genotipova za polimorfizme *IFNL3* i *IFNL4* gena u grupi otpuštenih sa bolničkog lečenja kao oporavljenih i grupi preminulih tokom hospitalizacije zbog COVID-19 nije ustanovljena statistički značajna razlika ni za jedan od analiziranih polimorfizama ($\chi^2(2) < 5,991$; $p > 0,05$; grafikon 55).



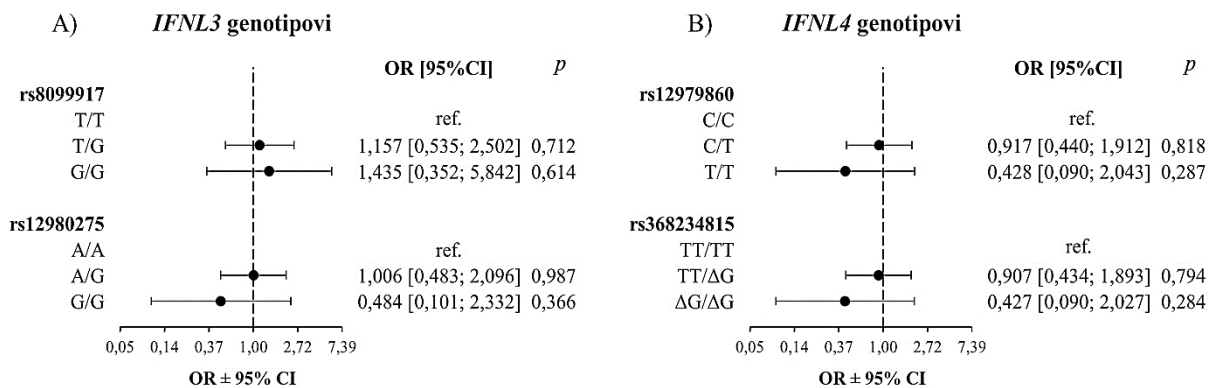
Grafikon 55. Relativna učestalost genotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema ishodu bolesti. O – otpust iz bolnice (n=139), S – smrtni ishod tokom hospitalizacije (n=39)

Istovremeno, nakon grupisanja genotipova u genotipske grupe, ni na nivou dominantnog, a ni recesivnog modela nije zabeležena statistički značajna razlika u distribuciji spram poređenih kategorija pacijenata ($\chi^2(1) < 3,841$; $p > 0,05$; grafikon 56).

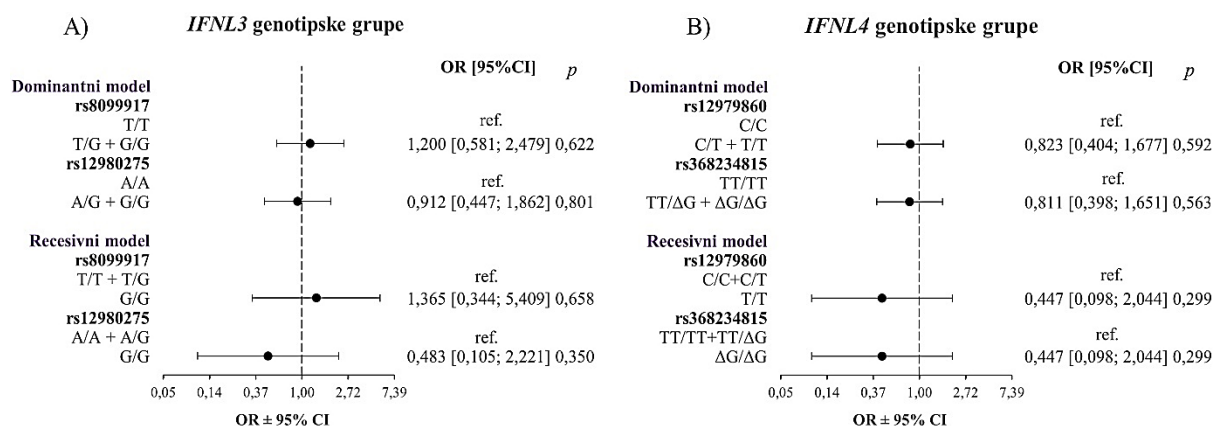


Grafikon 56. Relativna učestalost genotipskih grupa polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema ishodu bolesti. O – otpust iz bolnice (n=139), S – smrtni ishod tokom hospitalizacije (n=39)

Ispitivanjem pojedinačnog uticaja genotipova i genotipskih grupa za polimorfizme *IFNL3* i *IFNL4* gena na ishod bolesti kod COVID-19 pacijenata univarijabilnom logističkom regresijom, potvrđeno je da nema statistički značajne razlike među poređenim grupama (grafikon 57 i 58). Ipak, vrednosti verovatnoće za smrtni ishod su opadale kroz povećanje broja varijantnih alela za polimorfizame *IFNL3* rs12980275, *IFNL4* rs12979860 i *IFNL4* rs368234815: od heterozigota i prisustva makar jednog varijantnog alela u odnosu na homozigote za divlji alel prema varijantnim homozigotima i prisustvu oba varijantna alela u poređenju sa divljim homozigotima i nosiocima makar jednog divljeg alela. S druge strane, varijantni genotipovi i genetički modeli *IFNL3* rs8099917 su nedvosmisleno povećavali verovatnoću za smrtni ishod.



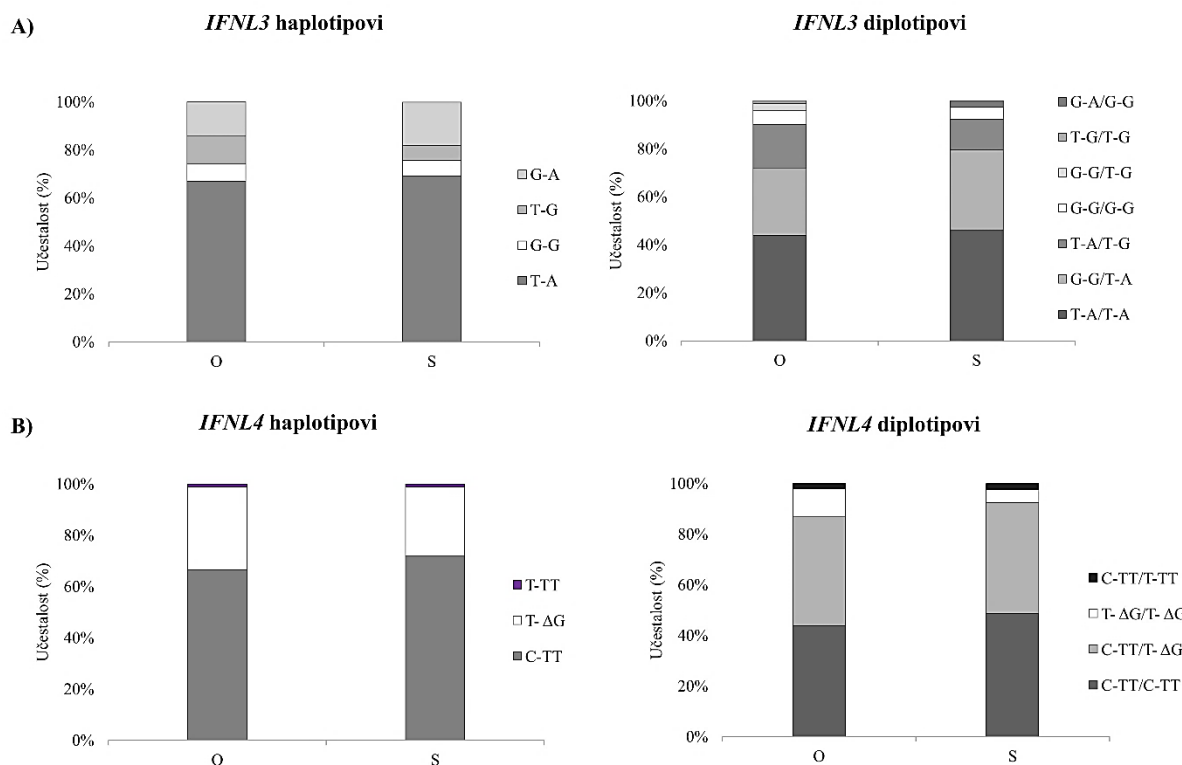
Grafikon 57. Uticaj genotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na ishod bolesti. Crni markeri ukazuju na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija



Grafikon 58. Uticaj genetičkih modela polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na ishod bolesti. Crni markeri ukazuju na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja

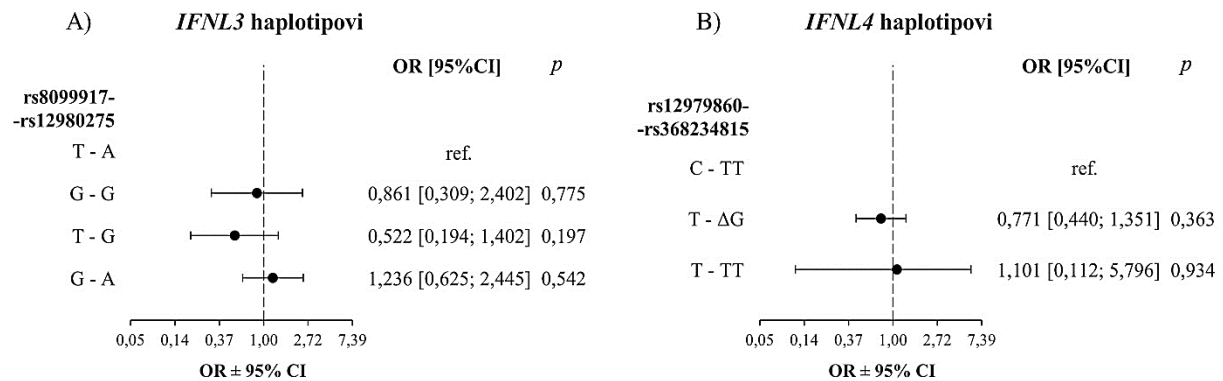
4.4.5.3. Učestalost haplotipova i diplotipova i njihov uticaj na ishod bolesti

Detektovani haplotipovi *IFNL3* rs8099917-rs12980275 i *IFNL4* 12979860-rs36823481 i njihovi diplotipovi su bili ujednačeno distribuirani u posmatranim grupama (grafikon 59). Nosioci diplotipova G-G/T-G i T-G/T-G za *IFNL3* gen bili su deo grupe otpuštenih pacijenata. Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodeli ni haplotipova ni diplotipova između otpuštenih i preminulih pacijenata (haplotipovi: *IFNL3* rs8099917-rs12980275: $\chi^2(3) < 7,815$; $p > 0,05$; *IFNL4* 12979860-rs36823481: $\chi^2(2) < 5,991$; $p > 0,05$; diplotipovi: *IFNL3* rs8099917-rs12980275: $\chi^2(6) < 12,592$; $p > 0,05$; *IFNL4* 12979860-rs36823481: $\chi^2(3) < 7,815$; $p > 0,05$).

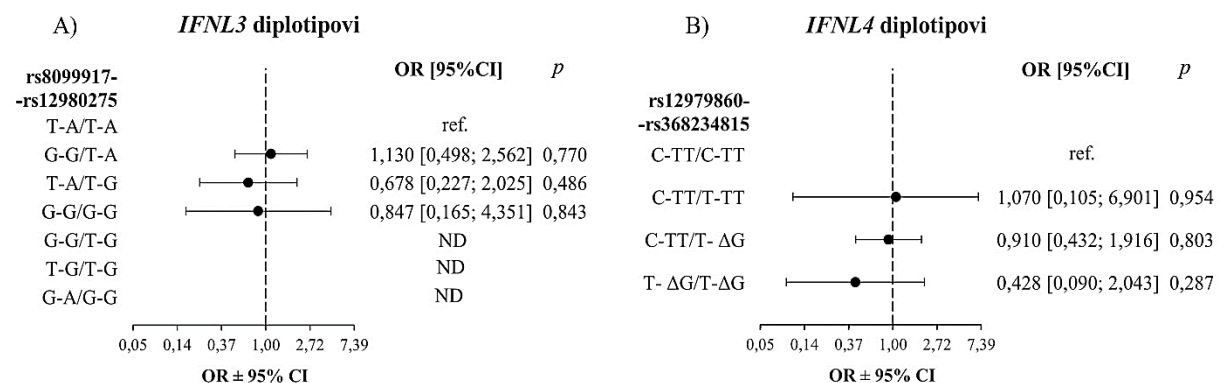


Grafikon 59. Relativna učestalost haplotipova i diplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* prema ishodu bolesti. O – otpust iz bolnice (n=139), S – smrtni ishod tokom hospitalizacije (n=39)

Evaluacija uticaja univarijabilnom regresijom potvrdila je da haplotipovi i diplotipovi ne menjaju statistički značajno verovatnoću za smrtni ishod pacijenata sa COVID-19. Rezultati logističke regresione analize prikazani su na grafikonima 60 i 61. U svakom slučaju, prethodno uočeni trend da su varijantni aleli skupčani sa potencijalno nižom verovatnoćom od smrtnog ishoda je bio prisutan na nivou i haplotipova i diplotipova.



Grafikon 60. Uticaj haplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na ishod bolesti. Crni markeri ukazuju na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija



Grafikon 61. Uticaj diplotipova polimorfizama gena A) *IFNL3* i B) *IFNL4* na ishod bolesti. Crni markeri ukazuju na $p > 0,05$. Vrednosti x-ose su prikazane na logaritamskoj skali. OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja; ref. – referentna kategorija; ND – nije determinisano

4.4.6. Uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na ishod COVID-19: multivarijabilna logistička regresija

Uticaj genetičkih polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4*, kao i laboratorijskih i kliničkih parametara pri prijemu, na verovatnoću smrtnog ishoda kod pacijenata sa COVID-19 procenjen je multivarijabilnom logističkom regresionom analizom sa postepenom eliminacijom varijabli unazad. Najprikladniji regresioni model (tabela 21; Hosmer-Lemešov test: $\chi^2(8)=4,237$, $p=0,835$) objasnio je 69,6% (Nagelkerke R^2) varijanse ishoda bolesti i adekvatno klasifikovao 94,6% slučajeva. Povećani nivoi CCI, N/L i LDH bili su povezani sa povećanom verovatnoćom smrtnog ishoda kod pacijenata sa COVID-19. Pored toga, veća je verovatnoća da žene i nosioci

najmanje jednog varijantnog alela *IFNL3* rs8099917 neće preživeti infekciju SARS-CoV-2 virusom. Sa druge strane, prisustvo najmanje jednog varijantnog alela *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815 smanjilo je više od 15 puta verovatnoću fatalnog ishoda od COVID-19.

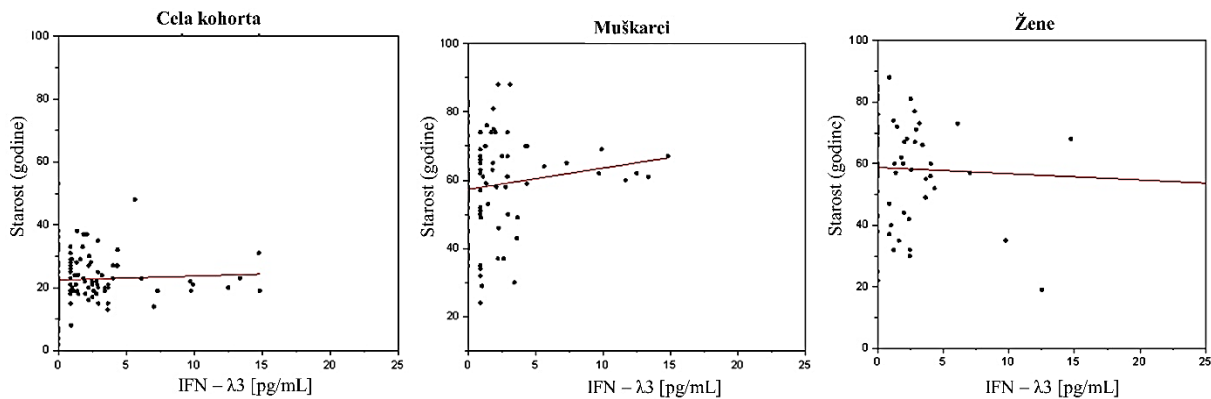
Tabela 21. Model multivarijabilne logističke regresije koji najbolje opisuju uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena na ishod obolelih od COVID-19

Varijable	B	S.E.	Wald	<i>p</i>	OR	[95%CI]
Dominantni model <i>IFNL4</i> ^{a,b}	-2,75	1,327	4,297	0,038	0,064	[0,005; 0,861]
Dominantni model <i>IFNL3</i> rs8099917 ^c	3,579	1,46	6,011	0,014	35,842	[2,050; 626,644]
Pol ^d	2,029	0,892	5,171	0,023	7,604	[1,323; 43,689]
LDH	0,005	0,002	9,991	0,002	1,005	[1,002; 1,009]
N/L	0,246	0,079	9,765	0,002	1,279	[1,096; 1,493]
CCI	0,89	0,275	10,497	0,001	2,436	[1,422; 4,175]
Konstanta	-12,154	2,809	18,725			

^a - rs12979860 ili rs368234815; ^b - C/C ili TT/TT kao referentna grupa; ^c - T/T kao referentna grupa; ^d - muški pol kao referentna grupa; B - koeficijent regresije; S.E. - standardna greška za B; Wald χ^2 - Valdova test statistika za jedan stepen slobode (df=1); *p* - nivo značajnosti; OR - odnos šansi; 95%CI - 95% interval poverenja za OR; LDH - laktat dehidrogenaza; N/L - odnos neutrofila i limfocita; CCI - Čarlsonov indeks komorbiditeta

4.5. Koncentracije IFN – λ 3 i IFN – λ 4 u COVID-19 kohorti

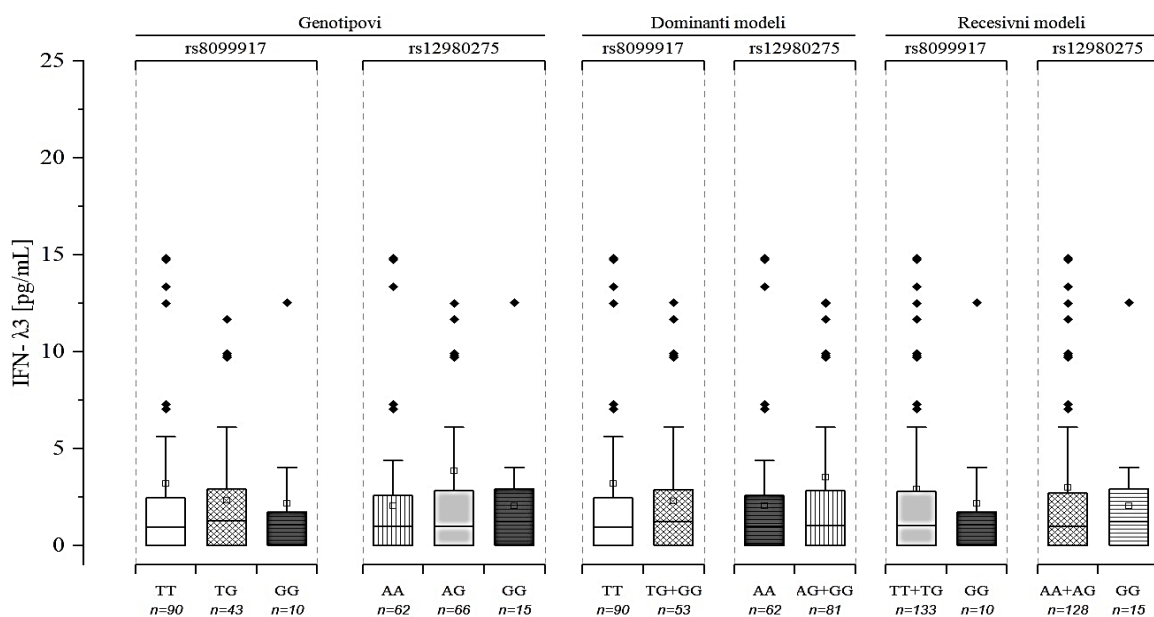
U serumima 143 pacijenta, prikupljenih na dan hospitalizacije, izmerene su koncentracije IFN- λ 3 i IFN- λ 4. Medijana produkovanog IFN- λ 3 iznosila je 1,02pg/mL (IQR: 0 – 2,71), dok je IFN- λ 4 bio detektovan samo kod šest pacijenata (Mdn (IQR) = 92.33pg/mL (62,04-215,29)), s toga se u daljoj analizi ovaj interferon nije obrađivao. Produkcija IFN- λ 3 nije korelirala sa godinama starosti u celoj kohorti ($r(141)=0,006$, $p=0,943$), kao ni ponaosob po polovima (muškarci: $r(83)=0,154$, $p=0,158$; žene: $r(56)=0,170$, $p=0,202$). Polna distribucija u sekreciji IFN- λ 3, takođe, nije zabeležena ($U=2597,5$, $p=0,576$), kao što je prikazano na grafikonu 62.



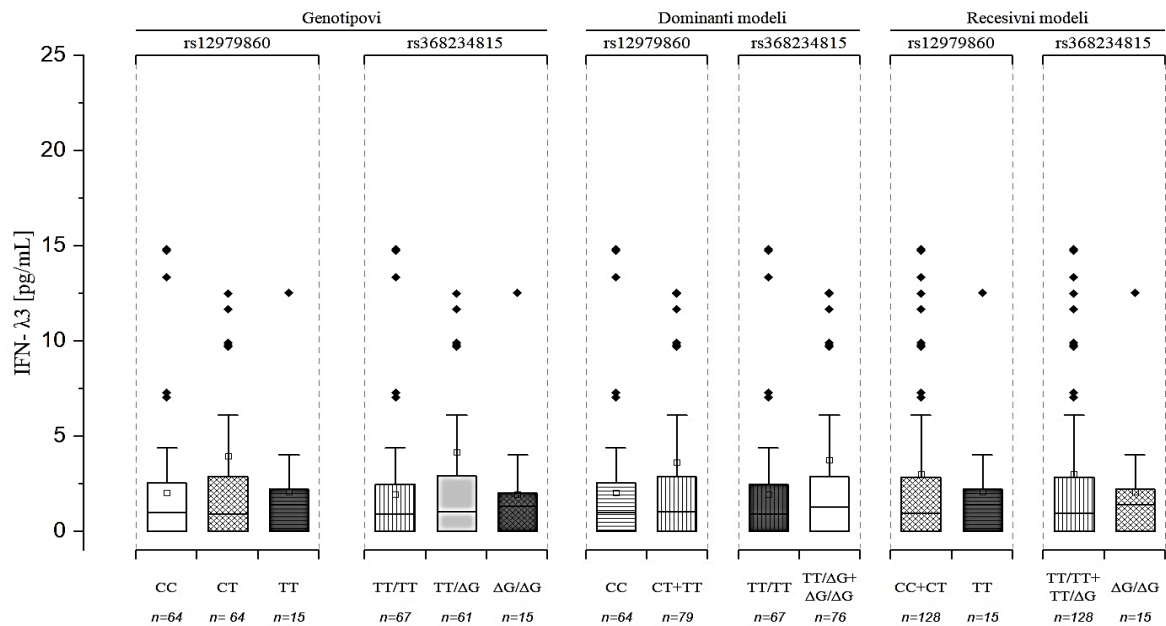
Grafikon 62. Korelacija koncentracije IFN- λ 3 i starosti u celoj kohorti i stratifikovano prema polu

4.5.1. Koncentracije IFN – λ 3 u odnosu na polimorfizme IFNL3 i IFNL4 gena

Imajući u vidu da polimorfizmi na *IFNL4* lokusu mogu modulirati količinu produkovanog IFN- λ 3 [198], koncentracija IFN- λ 3 analizirana je spram ispitivanim genotipovima i genotipskim grupama ispitivanih genetičkih polimorfizama i *IFNL3* i *IFNL4* gena. Rezultati ove analize prikazani su na grafikonima 63 i 64. Produkcija IFN- λ 3 se nije statistički značajno razlikovala među analiziranim polimorfizmima ($p>0,05$).



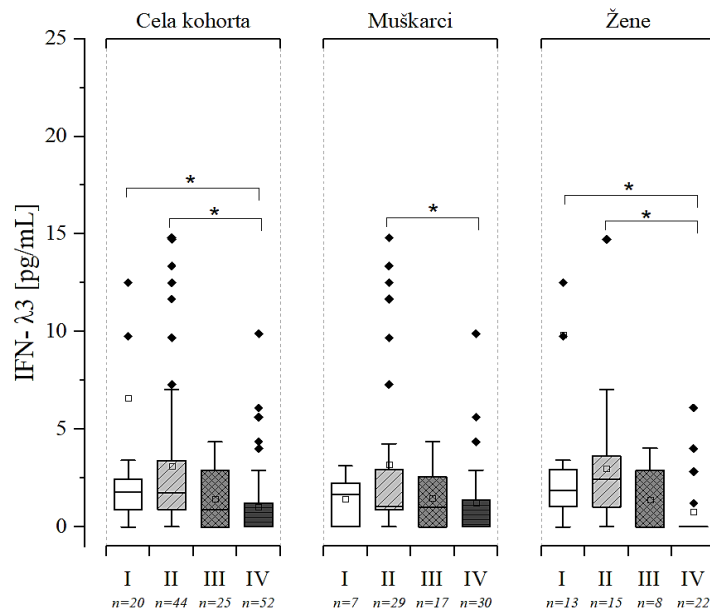
Grafikon 63. Koncentracije IFN- λ 3 prema polimorfizmima *IFNL3* gena



Grafikon 64. Koncentracije IFN- λ 3 prema polimorfizmima *IFNL4* gena

4.5.2. Koncentracije IFN – λ 3 u odnosu na težinu kliničke slike

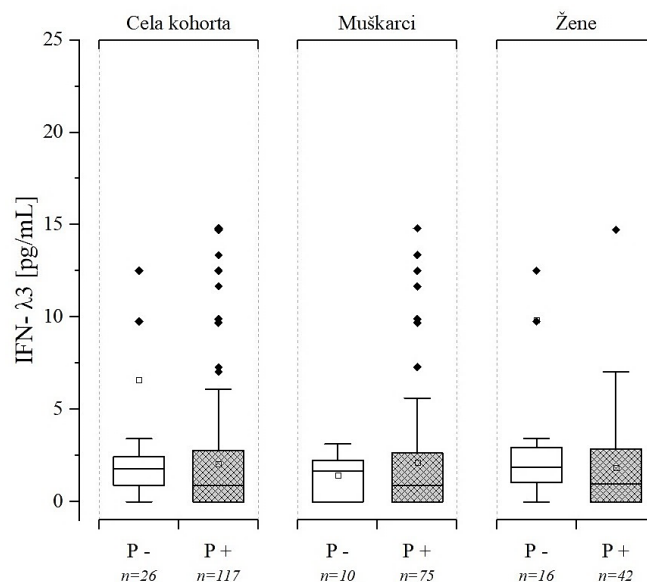
Rezultati analize serumskog nivoa IFN- λ 3 prema kategorijama težine kliničke slike, prikazane su na grafikonu 65. Produkcija IFN- λ 3 se statistički značajno razlikovala spram kategorija težine kliničke slike ($H(3)=21,893$, $p<0,001$). Na nivou cele kohorte, uočeno je da pacijenti sa kritično teškom kliničkom slikom (IV) imaju niže koncentracije IFN- λ 3 u odnosu na pacijente sa umereno teškim oblikom (II: $U=551,5$, $p<0,001$), kao i lakim COVID-19 (I: $U=319$, $p=0,001$). Nakon stratifikacije po polu, takođe je uočena statistički značajna razlika na nivou oba pola (muškarci: $H(3)=8,755$, $p=0,033$; žene: $H(3)=13,068$, $p=0,004$). Isti obrazac bio je prisutan i kod žena (I i IV: $U=65$, $p=0,001$; II i IV: $U=64$, $p=0,003$) i kod muškaraca (II i IV: $U=240,5$, $p=0,003$). Ordinalnom logističkom regresijom utvrđeno je da je serumska koncentracija IFN- λ 3 nezavisni prediktor progresije težine kliničke slike. Pacijenti sa većom serumskom koncentracijom IFN- λ 3 na prijemu imali su manju verovatnoću za napredovanje težine COVID-19 (OR[95%CI] = 0,886 [0,801; 0,980], $p=0,019$).



Grafikon 65. Koncentracija IFN- λ 3 prema težini kliničke slike COVID-19. I – blaga, II – umereno, III – teška, IV – kritično teška klinička slika

4.5.3. Koncentracije IFN – λ 3 u odnosu na prisustvo pneumonije

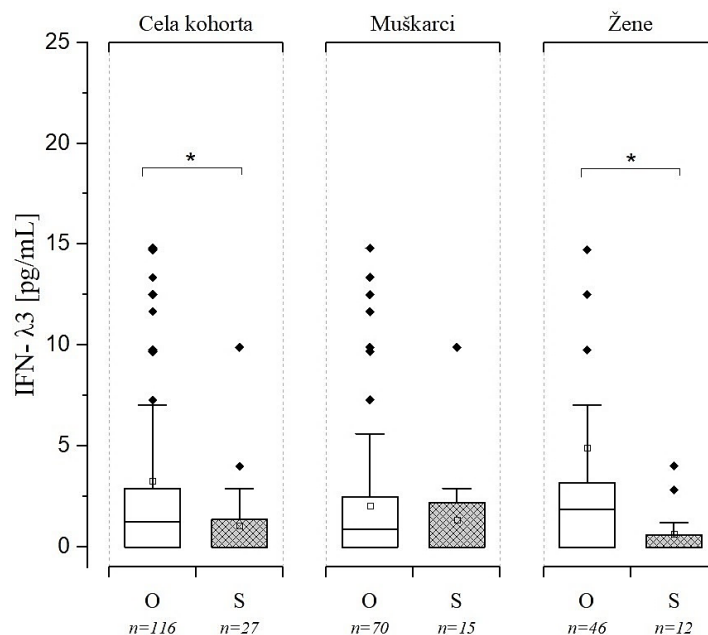
Nivo IFN- λ 3 se nije značajno razlikovao među pacijentima bez i sa COVID-19 pneumonijom analiziranjem na nivou cele kohorte ($U=1256$, $p=0,155$), kao ni nakon stratifikacije prema polu (muškarci: $U=348,5$, $p=0,711$; žene: $U=263,5$, $p=0,195$). Rezultati su prikazani na grafikonu 66. Istovremeno, koncentracija IFN- λ 3 nije bila ni značajni prediktor razvoja pneumonije ($p>0,059$).



Grafikon 66. Koncentracije IFN- λ 3 prema prisustvu pneumonije. P- – bez pneumonije, P+ - sa pneumonijom

4.5.4. Koncentracije IFN – λ 3 u odnosu na ishod COVID-19

Rezultati poređenja nivoa IFN- λ 3 među kategorijama ishoda COVID-19 prikazani su grafikonom 67. Poređenjem nivoa produkcije IFN- λ 3 pacijenata otpuštenih i preminulih tokom hospitalizacije, opservirana je statistički značajna razlika na nivou cele kohorte ($U=1019$, $p=0,004$). Naime, pacijenti koji nisu preživeli SARS-CoV-2 infekciju imali su značajno niže koncentracije IFN- λ 3. Ova statistički značajna razlika bila je prisutna kod žena ($U=147,5$, $p=0,011$), ali ne i kod muškaraca ($U=395,5$, $p=0,126$). Nivo IFN- λ 3 nije značajno menjao verovatnoću za letalni ishod bolesti ($p>0,05$).



Grafikon 67. Koncentracije IFN- λ 3 prema ishodu COVID-19. O – otpust iz bolnice, S – smrtni ishod tokom hospitalizacije

4.5.5. Uticaj IFN – λ 3 na težinu kliničke slike, razvoj pneumonije i ishod COVID-19: multivarijabilna logistička regresija

U svrhu procene potencijalnog uticaja serumske koncentracije IFN – λ 3 na rizik za razvoj težih oblika COVID-19, pneumonije, kao i smrtni ishod tokom hospitalizacije, sprovedena je multivarijabilna ordinalna i binarna logistička regresija, uzimajući u obzir zbujujuće faktore poput polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4*, pola, komorbiditeta i laboratorijskih parametara. Detaljni rezultati ove analize prikazani su u zbirnoj tabeli 22, koja sadrži informacije o svim relevantnim varijablama i njihovom uticaju na ishode. Nakon prilagođavanja za odgovarajuće zbujujuće varijable, serumska koncentracija IFN - λ 3 je bila značajan prediktor progresije bolesti, dok asocijacija sa COVID-19 pneumonijom i smrtnim ishodom nije bila statistički značajna. Porast koncentracije IFN - λ 3 i prisustvo oba varijantna alela *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815 smanjivali su verovatnoću za razvoj težih oblika.

Tabela 22. Regresioni modeli koji najbolje opisuju uticaj IFN – $\lambda 3$ težinu kliničke slike, razvoj pneumonije i ishod obolelih od COVID-19

	B	S.E.	Wald χ^2	p	OR	[95% CI]
Progresija težine COVID-19¹						
Kritično teška	-2,096	0,400	27,532	0,000	NP	[-2,879; -1,313]
Teška	-1,283	0,374	11,787	0,001	NP	[-2,015; -0,550]
Umereno teška	0,810	0,370	4,782	0,029	NP	[0,084; 1,536]
Blaga (ref)						
CCI	-0,513	0,097	27,958	<0,001	0,598	[0,495; 0,724]
Pol ^a	0,558	0,329	2,884	0,089	1,747	[1,089; 3,326]
Recesivni model <i>IFNL4</i> ^{b,c}	1,141	0,531	4,611	0,032	3,129	[1,105; 8,872]
IFN – $\lambda 3$	0,117	0,054	4,813	0,028	1,125	[1,013; 1,249]
COVID-19 pneumonija²						
CCI	0,384	0,150	6,538	0,011	1,468	[1,094; 1,969]
Pol ^a	-1,005	0,476	4,457	0,035	0,366	[0,144; 0,931]
Recesivni model <i>IFNL4</i> ^{b,c}	-1,324	0,634	4,366	0,037	0,266	[0,077; 0,321]
IFN – $\lambda 3$	-0,036	0,034	1,102	0,294	0,965	[0,902; 1,032]
Konstanta	1,578	0,432	13,330	0,000	4,845	
Ishod COVID-19³						
LDH	0,005	0,002	8,671	0,003	1,005	[1,002; 1,008]
N/L	0,236	0,083	8,087	0,004	1,266	[1,076; 1,489]
CCI	0,895	0,331	7,316	0,007	2,447	[1,279; 4,680]
Pol ^a	1,845	0,980	3,546	0,060	6,329	[0,927; 43,191]
Dominantni model <i>IFNL4</i> ^{b,d}	-3,009	1,551	3,764	0,052	0,049	[0,002; 1,031]
Dominantni model <i>IFNL3</i> rs8099917 ^e	3,285	1,612	4,154	0,042	26,714	[1,134; 629,066]
IFN – $\lambda 3$	-0,129	0,252	0,259	0,610	0,879	[0,536; 1,442]
Konstanta	-11,350	2,997	14,347	0,000	0,000	

^a – muški pol kao referentna grupa; ^b – rs12979860 ili rs368234815; ^c – C/C+C/T ili TT/TT+TT/ Δ G kao referentna grupa; ^d – C/C ili TT/TT kao referentna grupa; ^e – T/T kao referentna grupa; B – koeficijent regresije; S.E. – standardna greška za B; Wald χ^2 – Valdova test statistika za jedan stepen slobode (df=1); p – nivo značajnosti; OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja za OR; LDH – laktat dehidrogenaza; N/L – odnos neutrofila i limfocita; CCI – Čarlsonov indeks komorbiditeta; NP – nije primenljivo

¹ - $\chi^2(4)=46,527$, $p<0,001$; Test kvaliteta prilagođenosti: $\chi^2(290)=258,381$, $p=0,909$, Nagelkerke $R^2=29,9\%$

² - $\chi^2(4)=20,634$, $p<0,001$; Hosmer and Lemešov test: $\chi^2(8)=14,987$, $p=0,059$, Nagelkerke $R^2=21,9\%$, adekvatno klasifikovano 84,6%

³ - $\chi^2(7)=61,742$, $p<0,001$; Hosmer and Lemešov test: $\chi^2(8)=8,689$, $p=0,369$, Nagelkerke $R^2=71,1\%$, adekvatno klasifikovano 95,2%

4.6. Uticaj polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena, serumskog nivoa sACE2 i IFN – λ 3 na težinu kliničke slike i ishod obolelih od COVID-19: multivarijabilna logistička regresija

Na osnovu rezultata univarijabilne i multivarijabilne logističke regresije, koji su pokazali da polimorfizmi *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena, kao i serumski nivoi sACE2 i IFN- λ 3, samostalno ili u kombinaciji s laboratorijskim i kliničkim parametrima, predstavljaju nezavisne prediktore težine i ishoda SARS-CoV-2 infekcije, kreirani su sveobuhvatni multivarijabilni modeli za ova dva ishoda. Uključeni su svi prethodno statistički značajni genetički polimorfizmi, serumski nivoi sACE2 i IFN- λ 3, te laboratorijski i klinički parametri.

Varijable koje su uključene u finalne modele s najvećom prediktivnom moći za progresiju težine kliničke slike i smrtni ishod SARS-CoV-2 infekcije tokom hospitalizacije prikazane su u tabeli 23. Ovim modelima je potvrđeno da nosioci oba varijantna alela za *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815 imaju statistički značajno nižu verovatnoću za razvoj težih oblika i smrtni ishod. Prisustvo barem jednog alela *ACE2* rs2106809 nije imalo statistički značajan uticaj na težinu COVID-19, ali je bilo povezano s nižom verovatnoćom za smrtni ishod. Nosioci makar jednog varijantnog alela *IFNL3* rs8099917 imali su višestruko veće šanse za smrtni ishod tokom hospitalizacije. Pol pacijenata nije bio statistički značajna determinanta težine kliničke slike, za razliku od smrtnog ishoda, gde su žene imale sedam puta veće šanse za fatalni ishod. Pacijenti s višim nivoima sACE2, LDH i N/R pri prijemu, kao i većim CCI, imali su povećane šanse za razvoj težih oblika i smrtni ishod COVID-19 tokom hospitalizacije.

Tabela 23. Modeli multivarijabilne logističke regresije koji najbolje opisuju uticaj polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena, serumskog nivoa sACE2 i IFN – λ 3 na težinu kliničke slike i ishod obolelih od COVID-19

Varijable	B	S.E.	Wald	p	OR	[95%CI]
Težina kliničke slike¹						
Blaga	9,315	2,382	15,299	<0,001	NP	[4,648; 13,983]
Umerena	13,815	2,740	25,429	<0,001	NP	[8,446; 19,185]
Teška	16,611	2,929	32,169	<0,001	NP	[10,871; 22,352]
Kritično teška (ref)						
Recesivni model <i>IFNL4</i> ^{a,b}	-1,712	0,812	4,439	0,035	0,181	[0,048; 0,888]
Dominantni model <i>ACE2</i> rs2106809 ^c	-0,107	0,535	0,040	0,842	1,113	[0,315; 2,565]
Pol ^d	-0,428	0,499	0,736	0,391	0,652	[0,577; 4,084]
Koncentracija sACE2	0,093	0,017	30,031	<0,001	1,097	[1,062; 1,134]
Koncentracija IFN – λ 3	-0,048	0,039	1,546	0,214	0,953	[0,883; 1,028]
LDH	0,004	0,001	11,983	0,001	1,004	[1,002; 1,007]
N/R	0,131	0,061	4,548	0,033	1,140	[1,011; 1,285]
CCI	0,392	0,160	6,012	0,014	1,480	[1,082; 2,024]
Ishod bolesti²						
Dominantni model <i>IFNL4</i> ^{a,e}	-3,124	1,490	4,398	0,036	0,044	[0,002; 0,815]
Dominantni model <i>IFNL3</i> rs8099917 ^f	3,824	1,595	5,745	0,017	45,798	[2,008; 1044,534]
Dominantni model <i>ACE2</i> rs2106809 ^c	-3,089	1,421	4,724	0,030	0,046	[0,003; 0,738]
Pol ^b	1,997	0,955	4,376	0,036	7,368	[1,134; 47,863]
LDH	0,008	0,003	8,359	0,004	1,008	[1,003; 1,013]
N/R	0,313	0,101	9,681	0,002	1,367	[1,123; 1,665]
CCI	1,241	,387	10,304	0,001	3,459	[1,621; 7,378]
ACE inhibitori	2,697	1,101	5,998	0,014	14,832	[1,713; 128,383]
Konstanta	-18,159	4,795	14,342	0,000	0,000	

^a - rs12979860 ili rs368234815; ^b - C/C+T ili TT/TT+TT/ Δ G kao referentna grupa; ^c - A/A kao referentna grupa; ^d - muški pol kao referentna grupa; ^e - C/C ili TT/TT kao referentna grupa; ^f - T/T kao referentna grupa; B – koeficijent regresije; S.E. – standardna greška za B; Wald χ^2 – Valdova test statistika za jedan stepen slobode (df=1); p – nivo značajnosti; OR – odnos šansi; 95% CI – 95% interval poverenja za OR; NP – nije primeljivo; LDH – laktat dehidrogenaza; N/L – odnos neutrofila i limfocita; CCI – Čarlsonov indeks komorbiditeta

¹ - $\chi^2(8)=133,508, p<0,001$; Test kvaliteta prilagođenosti: $\chi^2(286)=239,248, p=0,980$, Nagelkerke $R^2=78,9\%$

² - $\chi^2(8)=82,432, p<0,001$; Hosmer and Lemešev test: $\chi^2(8)=1,761, p=0,987$, Nagelkerke $R^2=76,7\%$, adekvatno klasifikovano 95,2%

5. Diskusija

Pandemija COVID-19 je iz temelja promenila svetsku dinamiku, prisiljavajući nas da se prilagodimo novim obrascima življenja, rada i društvenih interakcija. Od prvog slučaja koji je zabeležen u kineskom gradu Vuhanu, SARS-CoV-2 virus koji uzrokuje COVID-19 je prošao kroz mnoge faze i evoluirao u različite varijante. Danas se zna da ovaj virus ne izaziva samo respiratorne simptome.

Najčešće se manifestuje asimptomatski ili blagom kliničkom slikom, koje po zastupljenosti prati COVID-19 pneumonija. Međutim, SARS-CoV-2 može da provocira preterani i nekontrolisani imunski odgovor, što dovodi do različitih komplikacija kako pulmonalnih, tako i ekstrapulmonalnih, uključujući trombozu, oštećenje tkiva, ARDS i multiorganski disfunkcioni sindrom (MODS) [199]. Tako je COVID-19 postao široko prihvaćena kompleksna multisistemska bolest, karakterisana relativno visokom incidencijom smrtnih ishoda, lakoćom prenošenja, značajnom patogenošću i stalnim pojavljivanjem novih sojeva. Stoga, ključno je razumeti COVID-19 ne samo kao akutnu respiratornu infekciju, već kao letalni i kompleksni multisistemski nozološki entitet.

Sve navedno je stvorilo potrebu za pravovremenim predviđanjem težine i smrtnog ishoda SARS-CoV-2 infekcije. Zbog složenosti faktora koji utiču na SARS-CoV-2 infekciju, pravovremeno predviđanje težine i ishoda infekcije SARS-CoV-2 je od vitalnog značaja u borbi protiv pandemije COVID-19. Ovo može pomoći u identifikaciji osoba koje su u najvećem riziku za razvoj teških formi i komplikacija, što bi omogućilo ranu intervenciju i adekvatnu terapiju. Stoga, razvijanje strategija za predviđanje težine i ishoda COVID-19 na osnovu faktora rizika, kao što su godine, pol, komorbiditeti, klinički parametri, nivoi određenih biohemijskih markera, ali i genetički polimorfizmi može biti ključno za efikasno upravljanje tekućom i budućim pandemijama. Razvoj efikasnih prediktivnih modela zasnovanih na genetičkim i kliničkim faktorima može pomoći u borbi protiv pandemije COVID-19 i smanjenju njenog uticaja na zdravlje ljudi i društvo u celini.

Cilj ove disertacije bio je istražiti ulogu i prediktorni potencijal polimorfizama u *ACE2* genu, odgovornog za proizvodnju proteina koji su ključni za ulazak SARS-CoV-2 virusa u ćelije domaćina, kao i *IFNL3* i *IFNL4* gena, čiji su proteini primarni akteri u imunskom odgovoru domaćina tokom virusnih respiratornih infekcija. Takođe, istraživali smo ulogu njihovih produkata, sACE2, IFN – λ 3 i IFN – λ 4, u kombinaciji sa ključnim faktorima rizika kao što su starost, pol, komorbiditeti, kliničke i laboratorijske karakteristike..

5.1. Povezanost laboratorijskih parametara i kliničkih karakteristika sa težinom i ishodom COVID-19

Kategorizacija težine COVID-19 ima značajnu ulogu u pravilnom upravljanju bolešću i pružanju odgovarajuće nege pacijentima. Različite regulatorne agencije i tela širom sveta su izdale smernice i preporuke za klasifikaciju težine bolesti u cilju harmonizacije pristupa lečenju i praćenju pacijenata. Ove smernice daju jasne kriterijume za svaku kategoriju na osnovu simptoma, vitalnih znakova, radiografskih nalaza i potrebe za kiseoničkom terapijom. SZO prepoznaje četiri glavne kategorije težine bolesti [42]: blaga, umereno teška, teška i kritično teška, koje su i korišćene za klasifikaciju pacijenata zaraženih SARS-CoV-2 virusom u ovom istraživanju.

Distribucija pacijenata prema težini kliničke slike u našoj studiji nije pratila uobičajeni obrazac raspodele pacijenata prema težini oblika COVID-19 [42]. Primarno, polovina uključenih pacijenata manifestuje blage i umerene simptome, što predstavlja značajno nižu učestalost u poređenju s aproksimativno pretpostavljenih 80% [42]. S druge strane, pacijenti sa

kritično teškim oblikom bolesti, koji su zahtevali intenzivnu negu, činili su trećinu naše kohorte, što je višestruko više od očekivane učestalosti od 5% [42]. Nadalje, preko polovine pacijenata sa kritično teškim oblikom bolesti je preminulo, što je usaglašeno s nalazima drugih istraživanja koja su takođe izvestila o visokoj stopi smrtnosti među pacijentima na intenzivnoj nezi [200, 201]. Alarmantno povećanje učestalosti teških oblika bolesti i visoka stopa smrtnosti u jedinici intenzivne nege mogu se delimično pripisati nizu faktora, pri čemu se odlaganje traženja zdravstvene nege može istaći kao potencijalno najznačajnije. O tome svedoči i činjenica da je prosečno vreme od pojave prvih simptoma do hospitalizacije bilo osam dana u okviru naše kohorte.

Pored toga, značajni faktori rizika koji doprinose ovoj razlici jesu starosna i polna struktura naše kohorte, kao i opterećenje komorbiditetima. U skladu sa rezultatima brojnih studija [64-68], starost igra neospornu ulogu u razvoju težih oblika COVID-19, kao i smrtnog ishoda i u našoj kohorti. Rizik od teške bolesti i smrtnosti od COVID-19 raste sa godinama. Starije odrasle osobe, posebno oni stariji od 65 godina, imaju veću verovatnoću da razviju teške simptome, zahtevaju hospitalizaciju i dožive fatalni ishod [64-68]. U skladu sa istraživanjem koje su sprovedli Veng i saradnici [202], pacijenti koji su bili smešteni u jedinici intenzivne nege bili su stariji i imali su više pridruženih bolesti u poređenju sa pacijentima koji nisu bili smešteni u jedinici intenzivne nege. Opterećenje komorbiditetima, izraženo kroz CCI, bio je značajan faktor rizika za razvoj težih oblika COVID-19 i smrtni ishod u našoj kohorti. Druge studije potvrdile su relevantnost CCI kao faktora rizika za ove ishode [203, 204]. Neočekivano, ustanovili smo da je opterećenje komorbiditetima bilo veće među preminulim ženama u odnosu na muškarce, dok su druge studije beležile prisustvo multiplih komorbiditeta kod teže obolelih i preminulih muškaraca [70]. Ipak, pol pacijenata se nije pokazao kao faktor koji determiniše smrtni ishod, za razliku od težine kliničke slike. Brojne studije dosledno pokazuju da muškarci imaju veći rizik od razvijanja teških simptoma COVID-19 [205, 206], što je slučaj i u našem istraživanju.

Simptomi i znaci bolesti predstavljaju dragocen skup zdravstvenih podataka koji mogu biti korisni u prvom koraku kliničke dijagnostike infekcije SARS-CoV-2 virusom. Najčešći simptomi koji se javljaju kod COVID-19 pacijenata, uključujući i našu kohortu, su povišena temperatura, kašalj, slabost, glavobolja, i drugi, pri čemu su svi navedeni nespecifični i susreću se i kod drugih respiratornih infekcija [60]. Međutim, visoka temperatura i kašalj na prijemu se pokazala kao pouzdan pokazatelj progresije u umereni oblik, što je u skladu sa drugim istraživanjima [207]. Slično našim nalazima, meta-analizom Mudatsir i saradnika utvrđeno je da su dispneja i slabost nezavisni prediktori razvoja teže forme bolesti [208]. Takođe, rutinske hematološke i biohemijske analize krvi su često primenjivane na svim nivoima zdravstvene zaštite i predstavljaju dobar izbor za brzu procenu rizika, iako ovi laboratorijski biomarkeri nisu specifični za COVID-19. Oslanjanje na parametre krvne slike, biohemijske parametre i markere inflamacije bilo je uobičajeno u ranoj fazi pandemije, kada je kapacitet testiranja na prisustvo SARS-CoV-2 virusa bio izuzetno ograničen [209]. Kao i druga istraživanja [48, 50, 210], naše je takođe pokazalo da su visok broj leukocita i neutrofila, uz posledični nizak broj limfocita i visok odnos neutrofila i limfocita rani pokazatelji ozbiljnijih formi COVID-19 i smrtnog ishoda. Tipični nalaz biohemijskih parametara među pacijentima sa COVID-19 sačinjavaju povišeni nivoi LDH, D-dimera i povišeni inflamatorni markeri poput feritina, CRP-a, fibrinogena, sedimentacija eritrocita. Visoki nivoi glikemije, kreatinina, LDH, D-dimera, CRP-a, PCT-a i nizak nivo albumina na prijemu bili su povezani sa teškim formama bolesti i smrtnim ishodom COVID-19 pacijenata, kako u našem, tako i u drugim istraživanjima [48, 50, 210].

Tehnike vizuelizacije su od kliničke koristi u otkrivanju promena u plućnom parenhimu koji su povezani sa razvojem ozbiljnog oblika bolesti, kao i smrtnog ishoda. Preporuke u vezi sa upotrebom najčešće primenjenih tehnika, rendgenskog snimanja grudnog koša (RTG) i

komputerizovane tomografije (engl. *computed tomography*; CT), kod pacijenata sa COVID-19 su uspostavljene od strane multidisciplinarnog panela pulmologa i radiologa iz deset zemalja na samom početku pandemije [211]. Panel je preporučio da se da se CT primenjuje kao dijagnostički alat u ranim fazama bolesti, dok RTG može biti koristan u otkrivanju napredovanja bolesti. RTG, kao metoda niske senzitivnosti i specifičnosti, naročito u identifikaciji ranih promena u plućnom parenhimu, može dati normalne nalaze u početnim stadijumima bolesti [212]. U kasnijim stadijumima infekcije, obično se mogu uočiti bilateralni multifokalni alveolarni opaciteti, koji imaju tendenciju da se stapaju do potpunog zamućenja [212]. Najfrekventnije promene na RTG nalazu na prijemu u UKCKG u našoj kohorti COVID-19 pacijenata bile su pojedinačna i difuzna pneumonična ognjišta. Istovremeno, oba nalaza bila su nezavisni prediktori težih oblika COVID-19, dok je nalaz difuznih pneumoničnih ognjišta bio prediktor smrtnog ishoda. Komparacija sa rezultatima drugih studija koje su procenjivale povezanost RTG snimaka sa kliničkim pogoršanjem COVID-19 i fatalnim ishodom je otežana zbog upotrebe različitih sistema ocenjivanja, koji, pored RTG nalaza, uključujuju i druge kliničke i demografske parametre [213]. U svakom slučaju, prisustvo abnormalnih RTG nalaza povećavalo je rizik za razvoj teže kliničke slike [214] i smrtni ishod [213], što je u skladu sa našim rezultatima.

5.2. Učestalost polimorfizama *ACE2* gena u ispitivanoj populaciji

S početka pandemije COVID-19 virusa, ACE2 se pojavio kao jedan od ključnih proteina u patogenezi ove infektivne bolesti. Ovaj transmembranski protein, svestran u svojoj ekspresiji u brojnim tkivima humanog organizma, preuzima ulogu receptora za S protein SARS-CoV-2 virusa, omogućavajući mu ulazak u humane ćelije. No, ta uloga nosi značajne posledice: vezivanje virusa za ACE2 dovodi do smanjenja njegove ekspresije, kroz internalizaciju ili oslobađanje solubilne forme, i disbalansa u renin-angiotenzin sistemu, posledično uzrokujući oštećenje pluća [84]. Istovremeno razvijaju se i brojni patološki procesi na nivou imunskog odgovora koji mogu dovesti do teškog respiratornog zastoja i višestrukog otkazivanja organa. Složena međuigra između virusa i imunog sistema domaćina naglašava važnost razumevanja uloge genetičke varijabilnosti u ekspresiji i funkciji *ACE2* gena, kao prve kapije za ulazak virusa. U skladu sa tim, genotipizacija za dva najčešće proučavana SNP-a na *ACE2* lokusu sprovedena je sa ciljem da se utvrdi uticaj ovih polimorfizama na težinu i ishod SARS-CoV-2 infekcije.

ACE2 gen je visoko polimorfan sa velikim brojem polimorfizama koji mogu izmeniti ekspresiju i/ili funkciju ACE2. Ipak, u ovom istraživanju, genotipizacija u kohorti COVID-19 pacijenata je sprovedena za dva frekventna i funkcionalna SNP-a, rs2106809 i rs2074192. Oba su lokalizovana unutar nekodirajućih regiona: rs2106809 u intronu 2, a rs2074192 unutar introna 16 [152]. Istraživanja su pokazala da oba polimorfizma modifikuju mesta vezivanja regulatornih faktora koji igraju ulogu u post-transkripcionim događajima, poput alternativnog splajsovanja [148], dok se za rs2074192 vezuje i značajna promena u sekundarnoj strukturi iRNK [215]. Alel G polimorfizma rs2106809 povezan je višom ekspresijom ACE2 enzima [149]. S druge strane, uticaj rs2074192 T alela na ekspresiju *ACE2* gena nije u potpunosti rasvetljen [216].

Frekvencija *ACE2* polimorfizama rs2106809 i rs2074192 varira među populacijama različitih etničkih i rasnih grupa. Na primer, u istočnoazijskoj populaciji, frekvencija alela G za rs2106809 je veća (61%) u poređenju sa evropskom (19,3%) i afričkom populacijom (12,9%) [217]. Nasuprot tome, učestalost alela T za rs2074192 je slična u istočnoazijskoj (42,5%),

evropskoj (44,6%) i afričkoj populaciji (31,6%) [218]. Zabeležene frekvencije u našoj populaciji su bliske učestalostima u evropskoj populaciji.

Hardi-Vajnbergova ravnoteža je osnovna genetička zakonitost koja opisuje očekivanu distribuciju alela i genotipova u populaciji koja nije izložena evolucionim procesima. Otkrivanje odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže je ključni prvi korak u svim genetičkim studijama jer otkriva važne probleme poput selekcionu pristrasnosti i grešaka u genotipizaciji, što dovodi u pitanje pouzdanost rezultata istraživanja [219]. Prema ovoj zakonitosti, frekvencije alela i genotipova na autozomalnim hromozomima ostaju konstantne kroz generacije, što omogućava predviđanje očekivanih frekvencija genotipova u populaciji. Za razliku od autozomalnih gena, geni locirani na X hromozomu ne dostižu ekvilibrijum u jednoj generaciji. Muškarci, kao hemizogoti, nasleđuju svoj X hromozom od majke, dok žene nasleđuju po jedan X hromozom od oba roditelja. To znači da je učestalost alela sa X hromozoma kod muškaraca jednaka frekvenciji alela kod žena iz prethodne generacije, dok kod žena zavisi od učestalosti gena koji se nalaze na hromozomima oba roditelja. Analizirani polimorfizmi *ACE2* gena, lokalizovanog na X hromozomu, testirani su na ovu zakonitost prema smernicama Grafelmana i saradnika [195], međutim, opservirana učestalost alela i genotipova za rs2106809 je odstupala od očekivane, u smislu neočekivano manjeg broja heterozigota u ženskoj populaciji, kao i većeg broja C hemizigota u muškoj populaciji. Potrebno je istaći da su u našu kohortu uključivani bliski srodnici, uključujući roditelje i decu, zbog činjenice da se hospitalizacija sprovodila u klasterima infekcije. Prema proračunima pojedinih autora, potrebno je više od 8 generacija za dostizanje Hardi-Vajnbergove ravnoteže [195] alela i genotipova gena lociranih na X hromozomu, što u velikoj meri objašnjava zabeleženo odstupanje.

5.3. Ambivalentan uticaj polimorfizma rs2106809 *ACE2* gena na težinu kliničke slike COVID-19 uz smanjenje rizika od smrtnog ishoda

Rezultati naše studije pokazali su da postoji statistički značajna povezanost polimorfizma rs2106809 *ACE2* gena i težine kliničke slike COVID-19, uz složenu ulogu ovog polimorfizma u napredovanju bolesti. Pored toga, ovaj polimorfizam igrao je protektivnu ulogu u smrtnom ishodu tokom SARS-CoV-2 infekcije. Važno je istaći da je povezanost i sa težinom i sa smrtnim ishodom bila prisutna samo među ženskom populacijom, što naglašava polnu specifičnost ove asocijacije.

ACE2 ima brojne zadatke u organizmu koji se sustiču u dve ključne funkcije: negativna regulacija RAS sistema i olakšani transport aminokiselina. Pored toga, *ACE2* predstavlja ključnu kapiju za ulazak koronavirusa koji izazivaju prehlade, poput hCoV-NL63, ali i koronavirusa koji izazivaju teški akutni respiratorni sindrom, SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 [79, 80]. Zajednički globalni naponi u suzbijanju SARS-CoV-2 pandemije su doveli do toga da je *ACE2* postao jedan od najistraživanijih humanih proteina [220]. I pored tako velikog broja generisanih podataka na ovu temu prisutne su izvesne nejasnoće o povezanosti gustine eksprimiranih *ACE2* na površini ćelija i sudbini SARS-CoV-2 infekcije. Tačnije, u literaturi se mogu sresti dve teorije vezane za ovo pitanje koje su suprotstavljene, ali ne isključuju jedna drugu.

Zagovornici prve teorije zastupaju stanovište da veća ekspresija *ACE2*, tj. veća gustina receptora dostupna na površini ciljnih ćelija, povećava šansu za razvoj teškog oblika COVID-19. Prema ovoj teoriji, veća dostupnost receptora olakšava ulazak SARS-CoV-2 u ćelije tokom infekcije [221]. U skladu sa tim, pacijenti sa COVID-19 koji su klasifikovani kao teški slučajevi, u poređenju sa pacijentima sa blažim simptomima, imali su veće virusno opterećenje u uzorcima nazofaringealnih briseva prikupljenim tokom početnih stadijuma bolesti [222].

Povećano virusno opterećenje takođe je povezano sa visokim nivoom ACE2 transkripta [223]. Nakon inicijalnog umnožavanja u epitelnim ćelijama nazofaringsa, koje imaju najveću ekspresiju ACE2 receptora na nivou respiratornog trakta, veliki broj virusnih partikula stiže do alveola pluća, gde virus penetrira u pneumocite tip II koji dominantno eksprimiraju ACE2 molekule u donjim partijama respiratornog trakta, što dovodi do razvoja COVID-19 pneumonije. Nadalje, u teškim slučajevima, infekcija se generalizuje, zahvatajući i druge organe u kojima je, takođe, eksprimiran ACE2. ACE2 je distribuiran u različitim tkivima u organizmu, uključujući enterocite, kardiomiocite, proksimalne tubule bubrega, endotelne ćelije, fibroblaste i glatke mišićne ćelije krvnih sudova, kao i ćelije horoidnog plexusa koje čine deo krvno-moždane barijere, čineći ih lakim metama SARS-CoV-2 virusa [82]. Koekspresija ACE2 i virusnih antigena primećena je u ćelijama bubrega, pankreasa, endotela i srca, ukazujući na multiorgansku invaziju [224].

Druga teorija, pak, ističe da je visoka ekspresija ACE2 receptora na površini ćelija povoljna za pacijente sa SARS-CoV-2 infekcijom. Prilikom prodora SARS-CoV-2 virusa u ciljne ćelije putem fuzije ili endocitoze, ACE2 molekuli koji su stupili u interakciju sa S proteinom virusa se internalizuju u ćeliju zajedno sa virusnom partikulom. Kao posledica ovog procesa, broj dostupnih ACE2 molekula na površini ćelije se smanjuje [84]. Ovim događajem se pokreće pomeranje ravnoteže na precizno izbalansiranoj klackalici između ACE i ACE2 u RAS sistemu u korist ACE enzimom predvođenih događaja. Usled smanjenja gustine ACE2 na površini ćelije, redukuje se konverzija Ang-II u Ang 1-7. Istovremeno, smanjuje se i pretvaranje Ang-I u Ang 1-9, čime Ang-I ostaje dostupan ACE enzimu za konverziju u Ang-II. Kao rezultat, nivo Ang II se povećava i vezuje za AT1R. Ovaj kompleks generiše pozitivnu povratnu spregu putem povećavanja ekspresije ACE i ADAM17 gena, metaloproteinaze koja dalje doprinosi uklanjanju ACE2 sa površine ćelija, i smanjenja ekspresije ACE2, što rezultuje smanjenjem gustine ACE2 na ćelijskim membranama i lokalnom proizvodnjom Ang-II [225]. Pored toga pokreće se i proinflamatorni odgovor. Naime, sistem Ang-II/AT1R aktivira ADAM-17, koji indukuje proizvodnju liganada za receptore epidermalnog faktora rasta i TNF α , što nadalje stimuliše transkripcioni faktor NF-kB koji je ključan u stimulaciji produkcije proinflamatornih citokina [226]. Aktivacija ADAM-17, takođe, katališe proizvodnju solubilne forme IL-6R α , koja pojačava signalizaciju NF-kB kroz IL-6 – STAT3 signalni put. Ova konvergencija prekomerne aktivacije NF-kB čini se ključnom u indukovanju citokinske oluje. Mehanizam je samopodržavajući jer NF-kB indukuje ekspresiju gena za angiotenzinogen, pojačavajući proinflamatorni odgovor Ang-II [226]. Brojni animalni *Ace2 knock-out* modeli pokazali su da nedostatak ACE2 kod miševa izaziva najteži oblik akutne povrede pluća, ARDS, praćen oštećenjem vaskularnog korita sa povećanom propustljivošću krvnih sudova i hipekoagulacijom, popuštanjem srčane funkcije, edemom i fibrozom pluća, akumulacijom neutrofila što uzrokuje apsolutnu deterioraciju respiratorne funkcije, ali i fizioloških funkcija drugih organa [227-230]. Gašenje ekspresije ACE gena ili tretman blokatorima AT1R receptora *Ace2 knock-out* miševe štiti od razvoja ARDS-a, što ukazuje na krucijalnu ulogu ACE2 u održavanju ravnoteže između zaštitnih i proinflamatornih i fibrotičnih mehanizama RAS sistema [227, 228]. Pored toga, dokazi ukazuju da humani rekombinantni ACE2 ima povoljan efekat na protok krvi i oksigenaciju pluća u eksperimentalnom modelu ARDS-a kod svinja [231]. S obzirom da manjak ACE2 može pojačati sve nepogodne efekte RAS sistema, nekoliko autora pripisuje oštećenje organa koje prati teški oblik COVID-19 povećanom nivou Ang-II [232, 233]. U kohorti COVID-19 pacijenata zabeležen je višestruko veći nivo Ang-II u poređenju sa kontrolnom grupom bez SARS-CoV-2 infekcije [234], što pruža direktnu vezu između smanjenja ACE2 u tkivima, sistemske neravnoteže RAS i oštećenja više organa usled infekcije SARS-CoV-2.

Uzimajući obe teorije u obzir, ostaje otvoreno pitanje koja je realna pozicija ACE2 u patologiji COVID-19, kao i kako genetički polimorfizmi ACE2 lokusa, kao jedna od glavnih determinanti nivoa ekspresije ACE2 gena, utiču na tok i ishod SARS-CoV-2 infekcije. U našem istraživanju, prisustvo makar jednog alela rs2106809 G, kog karakteriše viša ekspresija ACE2 na površini ćelija [149], povećavalo je šansu za prelazak iz umerene u tešku formu bolesti kod žena, dok je efekat ovog alela bio protektivan za progresiju iz teške u kritično tešku bolest, koja zahteva prijem u jedinicu intenzivne nege. Nekolicina dostupnih studija ispitivala je asocijaciju polimorfizma rs2106809 sa težinom SARS-CoV-2 infekcije [152]. U skladu sa našim rezultatima, nalazi u španskoj populaciji potvrđuju da prisustvo ovog alela povećava verovatnoću hospitalizacije COVID-19 pacijenata [152]. Ipak, u ovoj studiji, alel rs2106809 G okarakterisan je kao faktor rizika za prijem u jedinicu intenzivne nege [152], što je kontradiktorno našim nalazima. Objašnjenje ove kontradikcije potencijalno leži u različitoj klasifikaciji pacijenata i poređenim grupama po posmatranim ishodima. Konkretnije, Sabater Molina i saradnici [152] su u pomenutoj studiji poredili pacijente sa lakim oblikom COVID-19 koji nisu kandidati za hospitalizaciju sa pacijentima koji su primljeni u jedinicu intenzivne nege i preminuli, nasuprot našem poređenju koje je podrazumevalo sučeljavanje pacijenata koji imaju težu formu SARS-CoV-2 infekcije nasuprot pacijentima koji su bili u jedinici intenzivne nege i, u krajnjem slučaju, preminuli. Takođe, u literaturi su prisutni i podaci koji polimorfizam rs2106809 stavljaju u položaj protektivnog faktora za hospitalizaciju [151], dok drugi nisu ustanovili prisustvo asocijacije između kliničkog toka i ovog polimorfizma [153]. Na kraju, nedavno objavljena meta-analiza, koja je uključivala prethodno pomenute studije, utvrdila je da rs2106809 povećava rizik od razvoja težih oblika COVID-19 [235]. U skladu sa našim rezultatima, nijedna od navedenih studija nije ustanovila povezanost rs2106809 sa težinom COVID-19 u populaciji muškaraca [151-153, 235]. Važno je napomenuti da je ovo prva studija koja je ispitivala povezanost polimorfizma rs2106809 sa ishodom SARS-CoV-2 infekcije. Prema našim rezultatima, prisustvo makar jednog alela rs2106809 G redukovalo je verovatnoću smrtnog ishoda kod žena. Kada je u pitanju veza između rs2074192 polimorfizma i težine ili ishoda SARS-CoV-2 infekcije, u našem istraživanju nije pronađena statistički značajna asocijacija, dok su rezultati drugih istraživanja protivrečni [154-157].

Ambivalentni uticaj rs2106809 polimorfizma u različitim stadijumima COVID-19 pokazan u našoj studiji podržava oba prethodno navedena koncepta i određuje tačke gde visoka ekspresija ACE2 receptora u kontekstu COVID-19 patologije može biti zaštitni faktor ili faktor rizika. Pretpostavljamo da inicijalno visoka ekspresija ACE2 receptora uslovljena prisustvom alela rs2106809 G u ženskoj populaciji, omogućava vezivanje većeg broja SARS-CoV-2 viriona na ulaznim vratima, u nazofaringealnoj regiji. Nakon inicijalne replikacije znatno uvećan broj virusnih partikula spušta se u nishodne delove respiratornog trakta, gde masovno zaražava pneumocite tip II. Od ovog trenutka nastupa plućna faza bolesti sa blažom ili težom pneumonjom. Virus se potom diseminuje do drugih tkiva i organa zahvaljujući velikoj gustini ACE2 receptora, što je odlika teške kliničke forme COVID-19. Shodno tome, visoka ekspresija ACE2 uzrokovana prisustvom rs2106809 G alela predstavlja faktor rizika za diseminaciju virusa širom organizma. U finalnoj fazi, kritično teškom obliku COVID-19, nastupaju komplikacije, kako pulmonalne, tako i ekstrapulmonalne, uključujući i najteže oblike, ARDS i MODS, koje u visokom procentu slučajeva završavaju letalno. S toga, pretpostavljamo da inicijalno visoki nivoi ACE2 kod žena koje su nosioci rs2106809 G alela, u ovoj fazi bolesti smanjuju sve nepogodne efekte RAS sistema i igraju protektivnu ulogu u razvoju kritično teškog oblika i smrtnog ishoda SARS-CoV-2 infekcije.

Povezanost polimorfizma rs2106809 sa težinom i ishodom COVID-19 koju smo uočili bila je prisutna samo u ženskoj populaciji. Još s početka pandemije primećena je nedvosmislena razlika u težini i ishodu SARS-CoV-2 infekcije među polovima [70, 236-238]. Širom sveta,

muškarci čine veći procenat hospitalizovanih pacijenata (55%), prijema u jedinice intenzivne nege (63%) i smrtnih slučajeva (57%) [239]. Ove polno specifične razlike i dalje nisu u potpunosti razjašnjene. Razlika u polno specifičnoj težini i ishodu bolesti uzrokovana je različitim mehanizmima, pri čemu su genetički i hormonski među glavnima. Težina i ishod SARS-CoV-2 infekcije je pod uticajem gena na X hromozomu i polnih hormona, ali specifična varijabla koja utiče na SARS-CoV-2 infekciju je ekspresija ACE2 i njegovi genetički polimorfizmi koji, takođe, imaju polno specifične efekte [146, 147, 149, 150]. Za većinu gena na X hromozomu, razlika u doziranju između žena XX i muškaraca XY uravnotežena je isključivanjem jednog od dva X hromozoma kod žena u ranom razvoju. Međutim, ACE2 gen se nalazi na Xp22.2, području gde geni mogu izbeći ovu inaktivaciju X hromozoma, što rezultuje fenotipskim razlikama među polovima. Posledično, žene imaju bazalno veću produkciju ACE2 molekula [240]. U ranijim studijama dokazano je da alel G polimorfizma rs2106809 povećava nivo ACE2 molekula samo kod žena [149, 150]. Pored toga, neizbežno je pomenuti da estrogen podstiče ekspresiju ACE2 gena [241]. Kada je reč o našim saznanjima, verujemo da je ustanovljeni polno specifični efekat polimorfizma ACE2 rs2106809 posledica svega prethodno navedenog. Dodatna činjenica koja potkrepljuje naše nalaze je da su i druge studije koje su istraživale povezanost rs2106809 sa težinom COVID-19 otkrile vezu isključivo kod žena [151, 152].

5.4. Niži nivoi sACE2 prate teži oblik i smrtni shod COVID-19

ACE2 je u ljudskom organizmu prisutan u dve forme: dužoj, potpunoj formi, koja je vezana za membranu i kraćoj, slobodnoj, solubilnoj formi, koja se oslobađa u telesne tečnosti i cirkuliše u krvi u minimalnim količinama. Oba oblika sadrže istu sekvencu u katalitičkom domenu, ali rastvorljivi ACE2 nedostaje transmembranski domen koji je neophodan za vezivanje za ćelijsku membranu i ulazak SARS-CoV-2 virusa u ćeliju. Nekoliko studija je pokazalo da virusne infekcije, kao i kardiovaskularne i pulmološke bolesti, povećavaju nivo cirkulišućeg sACE2 [242].

Oslobađanje sACE2 sa epitelnih ćelija respiratornih puteva je konstitutivni proces, ali može biti indukovano [86]. Ovo je kompleksan proces, regulisan putem više faktora, uključujući virusne infekcije i različite stimuluse. Tokom virusnih infekcija, kao što su SARS-CoV i SARS-CoV-2, smatra se da se oslobađanje sACE2 indukuje usled mehanizama koje pokreće sam virus. Međutim, postoje i drugi stimulusi, kao što su citokini, hipoksija i visoki nivoi Ang II, koji mogu dodatno uticati na ovaj proces. Prisustvo ovih stimulusa u inficiranim tkivima može pojačati oslobađanje sACE2. Kao rezultat toga, sACE2 može ući u cirkulaciju usled povećane vaskularne propustljivosti [86]. Iako je verovatno da plućne endotelne i/ili alveolarne ćelije glavni izvor, kontinuirano povećanje nivoa sACE2 u kasnim stadijumima bolesti sugerise na mogućnost doprinosa drugih ćelija i vaskularnog korita.

Glavni enzim zadužen za proteolitičku obradu membranskog ACE2 i formiranje sACE2 je ADAM-17. Ovaj enzim pripada grupi transmembranskih proteaza koje su uključene u mnoge signalne puteve. Takođe, poznat je kao enzim koji konvertuje TNF- α , budući da je prvobitno identifikovan kao proteaza koja odvaja i aktivira TNF- α vezan za membranu [243]. ADAM-17 katališe otkidanje ektodomena ACE2 u jukstamembranskom regionu, čime se formira cirkulišuća sACE2 forma [244]. Nedavne studije sugerisu da SARS-CoV-2 podstiče odvajanje ektodomene ACE2 putem povećane aktivacije enzima ADAM-17 [245]. Mehanistički posmatrano, nakon početne internalizacije ACE2 i smanjenja njegove prisutnosti na površini ćelijske membrane, što je posledica same infekcije, aktivacija AT1R posredovana Ang II pokreće niz signalnih reakcija koje dovode do aktivacije p38 MAPK i fosforilacije ADAM-17,

podstaknutih stvaranjem reaktivnih kiseonikovih vrsta putem NADPH oksidaze 2. Ova fosforilacija pojačava katalitičku aktivnost ADAM-17, što rezultuje pojačanim odvajanjem ACE2 i gubitkom ACE2 sa membrane, što dalje utiče na smanjenje konverzije Ang II u Ang 1–7 i dovodi do negativnih efekata u RAS-u pozitivnom povratnom spregom [246]. Pored ovog enzima, proteaze poput TMPRSS2, TMPRSS11D, HNP/TMPRSS1 i ADAM10, takođe, ali manjim udelom, učestvuju u uklanjanju ACE2 sa membrane [247].

Očekivalo se da će nivo sACE2 biti direktno povezan sa polimorfizmima ACE2 gena, koji utiču na ekspresiju ovog gena, kao što su ispitivani u ovom istraživanju. Međutim, naši rezultati ukazuju da koncentracije sACE2 ne zavise od rs2106809 i rs2074192 polimorfizama, bez obzira na pol ispitanika. Ovo se podudara sa prethodnim istraživanjima koja su se bavila pacijentima sa kardiovaskularnim bolestima, koja takođe nisu pronašla značajnu povezanost [149, 150] Mogući razlog za ovo leži u prisustvu različitih faktora koji regulišu uklanjanje ACE2 sa membrane, kao i varijacija u ekspresiji i aktivnosti ADAM-17 u različitim infektivnim i somatskim bolestima [248].

Pored navedenog, analizirali smo i potencijalne faktore rizika koji bi mogli da utiču na nivo sACE2, kao što su pol i starost pacijenata. Primećeno je da pacijenti muškog pola sa COVID-19 imaju više početne nivoe sACE2 u poređenju sa ženama [249-251], mada u našoj studiji nije bilo razlike između polova. Što se tiče starosti, koncentracija sACE2 značajno raste sa godinama kod pacijenata obolelih od COVID-19, što je u saglasnosti sa prethodnim saznanjima [252]. Međutim, nakon stratifikacije prema polu, ova korelacija je bila prisutna samo kod pacijenata ženskog pola. Jedno od mogućih objašnjenja ovog nalaza može biti veće opterećenje komorbiditetima kod ženskih pacijenata koji su preminuli tokom hospitalizacije, s obzirom na to da se zna da pacijenti sa kardiovaskularnim i metaboličkim oboljenjima imaju povišene nivoe sACE2 [141-145].

Jedan od značajnih rezultata ove studije je nalaz da je cirkulišući nivo sACE2 u trenutku hospitalizacije značajan prediktor razvoja težeg oblika COVID-19. Naime, viši nivoi sACE2 zabeleženi su kod pacijenata sa teškim i kritično teškim oblikom SARS-CoV-2 infekcije. Ovi naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih studija koje su ispitivale nivoe sACE2 u cirkulaciji [249, 251, 253-256] pacijenata inficiranih SARS-CoV-2 virusom. Studija sličnog dizajna našoj ustanovila je da su viši nivoi sACE2 bili prisutni kod COVID-19 pacijenata sa umerenim oblikom u odnosu na zdrave ispitanike u trenutku hospitalizacije [253]. Pored toga, zabeležen je značajan porast u koncentraciji sACE2 kod teških pacijenata sedam dana nakon hospitalizacije [253]. Još jedna studija potvrdila je nalaze da se nivo sACE2 povećava tokom bolesti kod teških pacijenata [249]. Fagijas i saradnici ustanovili su da je nivo sACE2 u cirkulaciji bio statistički značajno veći kod kritično teških pacijenata u odnosu na teške [251], kao i u našem istraživanju. Visok nivo ACE2 u plazmi na prijemu kod pacijenata sa COVID-19 bio je povezan sa povećanim rizikom od razvoja najtežeg oblika bolesti u roku od 28 dana [252]. Za razliku od drugih cirkulišućih proteina koji se vraćaju na bazalne nivoe tokom faze oporavka od akutne virusne infekcije, nivo ACE2 ostaje povišen čak i nakon mesec dana od preležanog COVID-19, naročito kod pacijenta sa najtežim oblicima bolesti [254]. Ipak, i pored ovih podataka koji potkrepljuju naše rezultate, važno je napomenuti da u literaturi postoje i podaci koji ukazuju na nepromenjene [255] ili čak niske nivoe [256] sACE2 kod COVID-19 pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima.

Dodatno, ispitivali smo povezanost između početnih koncentracija sACE2 na dan prijema i ishoda infekcije SARS-CoV-2. Ustanovljeno je da pacijenti koji su izgubili bitku sa COVID-19 imaju značajno više nivoe sACE2 u odnosu na one koji su otpušteni sa lečenja. Međutim, ovaj parametar nije samostalni prediktivni faktor ishoda bolesti. Na temelju studija koje su sprovedli Fagijas i saradnici [251] i Kragstrup i saradnici [252], utvrđeno je da su preminuli

pacijenti imali visoke vrednosti sACE2 pri prijemu u odnosu na preživjele. U ovim istraživanjima, nivoi sACE2 su statistički značajno asocirani sa smrtnim ishodom tokom hospitalizacije. Takođe, primećen je značajan porast sACE2 kod pacijenata neposredno pre smrti. Pacijenti koji su na početku imali vrednosti sACE2 $\geq 45,4$ mU/L imali su veći rizik za fatalni ishod u periodu od 30 dana u odnosu na one sa nižim nivoima aktivnosti sACE2 [251]. Nasuprot ovome, u literaturi su dostupni i rezultati studija koje nisu pronašle značajnu razliku u nivoima ili aktivnosti sACE2 kod preminulih pacijenata [86].

Iako su razmatrani različiti aspekti uticaja sACE2 na patologiju COVID-19, precizan mehanizam još uvek nije potpuno razjašnjen. Neki autori sugerišu da sACE2 može delovati kao cirkulišući receptor za SARS-CoV-2, hvatajući slobodne virusne partikule i sprečavajući dalje širenje infekcije [257], što se čini suprotno od nalaza visokih nivoa sACE2 kod najtežih COVID-19 pacijenata. Drugi, pak, spekulišu da bi kompleksi sACE2-SARS-CoV-2 mogli da doprinesu širenju infekcije na udaljena tkiva [258], što je manje verovatno jer za uspešnu infekciju virusom neophodan je ACE2 sa transmembranskim i intracelularnim domenom. Na osnovu naših istraživanja i nalaza drugih studija, pretpostavljamo da sACE2 ne igra direktnu ulogu u patogenezi SARS-CoV-2 infekcije, već je posledica gubitka membranskog ACE2 i potencijalno pouzdan marker za prognozu težine bolesti. Detrimentalni efekti narušavanja ravnoteže u RAS-u tokom infekcije SARS-CoV-2 detaljno su opisani u prethodnom odeljku.

5.5. Učestalost polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena u ispitivanoj populaciji

Imajući u vidu važnost genetičkog kontrolisanja produkcije i aktivnosti IFN- λ , ulogu IFN- λ u virusnim infekcijama, kao i nedostatak znanja o faktorima koji predviđaju nepovoljan ishod COVID-19, u ovom istraživanju smo imali za cilj da utvrdimo da li prisustvo najčešćih funkcionalnih genetičkih polimorfizama dva najvažnija IFN- λ , tj. IFN- λ 3 i IFN- λ 4, na neki način utiče na verovatnoću da pacijenti zaraženi SARS-CoV-2 razviju teži oblik bolesti ili da infekcija dovede do letalnog ishoda.

Stoga, u ovoj studiji su *IFNL* SNP-ovi odabrani na osnovu njihove poznate funkcionalnosti, tj. na sposobnosti da menjaju produkciju odgovarajućih interferona. Na primer, *IFNL4* rs368234815 je polimorfizam koji reguliše ekspresiju: sinteza IFN- λ 4 pune dužine zahteva prisustvo varijantnog Δ G alela, dok TT predstavlja nonsens varijantu koja dovodi do preuranjenog prekida sinteze proteina, pri čemu se stvara nekoliko polipeptida koji nemaju poznatu biološku funkciju [158]. Takođe, smešten u intronu 1 *IFNL4* i u visokoj vezanoj neravnoteži sa rs368234815, leži rs12979860, čiji je varijantni T alel povezan sa produkcijom IFN- λ 4, a alel C sa inaktivacijom gena [158]. U skladu sa njihovom značajnom ulogom u ekspresiji IFN- λ 4, opisani su krucijani uticaji na ishod virusnih bolesti [122, 162]. S druge strane, konkretni efekti ostala dva SNP-a koja su ovde proučavana, uprkos tome što se smatraju funkcionalnim, nisu dovoljno jasno i jednoznačno definisani u literaturi. Intergenski *IFNL3* rs8099917 polimorfizam smešten je uzvodno od gena *IFNL4* [259], te se u literaturi može sresti kao varijanta *IFNL4* [167]. Poznato je da *IFNL3* rs8099917 polimorfizam modifikuje vezivanje faktora transkripcije, ali njegova definitivna funkcija još uvek nije rasvetljena: varijanta G alela je povezana i sa povećanim [260] i sa smanjenim [261] nivoima IFN- λ 3. Slično tome, polimorfizam rs12980275, lokalizovan nishodno od *IFNL3*, utiče na stanje hromatina [262], ali ne postoji dokaz o njegovoj ulozi u ekspresiji proteina [263]. Ipak, potvrđeno je da i ovi kontroverzni *IFNL3* polimorfizmi utiču na antivirusni imunski odgovor [264].

Potreba za analizom učestalosti genskih polimorfizama u različitim populacijama proizlazi iz činjenice da postoji značajna varijabilnost u njihovoj zastupljenosti među različitim etničkim grupama, geografskim regijama i populacijama. Distribucija alela i genotipova

ispitivanih *IFNL4* polimorfizama u COVID-19 populaciji u našoj studiji bila je slična učestalostima referisanim u studijama sprovedenim u italijanskoj [265] [192], španskoj [190] i egipatskoj [191] populaciji COVID-19 pacijenata. S druge strane, učestalost varijantnih homozigota za ispitivane *IFNL3* i *IFNL4* polimorfizme bila je više nego dvostruko niža od zabeležene u iranskoj populaciji [173] COVID-19 pacijenata. Ipak, odstupanja u zastupljenosti polimorfizama zabeležena su čak i među pripadnicima iste populacije. Naime, dve studije koje su ispitivale uticaj polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* na virusološki odgovor na terapiju i ishod hronične HCV infekcije u srpskoj populaciji ukazuju na značajnu varijaciju učestalosti genotipova u odnosu na zabeleženu u našem uzorku, i to: za polimorfizam rs12979860 učestalost CC genotipa je bila uočljivo veća gotovo 70%, u jednoj studiji [266], dok je u drugoj dominantni genotip bio CT [267]; na nivou rs8099917 polimorfizma dominiralo je TG genotip[266]; dok je na nivou rs12980275 zabeležena potpuna inverzija učestalosti genotipova, sa najzastupljenijim GG genotipom u jednoj[266] i AG u drugoj [267] studiji kod oko polovine ispitanika. Potencijalno objašnjenje uočene diskrepance leži u veličini uzorka u ovim studijama, koji je bio značajno manji od našeg, kao i specifičnosti odlika pacijenata uključivanih u studiju spram posmatranih ishoda i specifičnosti drugog infektivnog oboljenja.

Istaknuta odlika polimorfizama koji se nalaze unutar *IFNL* lokusa je značajna vezana neravnoteža (LD), odnosno nasleđivanje više pojedinačnih varijacija. Konkretno, LD između *IFNL4* rs368234815 Δ G i rs12979860 T alela je najslabiji u afričkoj populaciji ($r^2 \sim 0,7$), dok je u evropskoj populaciji visok ($r^2 > 0,9$), te najviši, tj. apsolutan, u azijskoj populaciji ($r^2 = 1,0$) [158]. U našoj kohorti, utvrđeno je da je vezana neravnoteža između ova dva polimorfizma veoma visoka ($r^2 = 0,95$), što je slično nalazima u evropskoj populaciji. Preciznije, u našoj populaciji, svi nosioci *IFNL4* rs368234815 Δ G, takođe, bili su i nosioci rs12979860 T alela ($D' = 1,0$). Kada je reč o neravnoteži vezanosti ostalih ispitivanih polimorfizama, vrednosti koeficijenta korelacije za sve moguće kombinacije polimorfizama ukazuju na umerenu (rs12980275 i rs12979860, rs368234815 i rs12980275, $r^2 \sim 0,8$) i nisku vezanost (rs12979860 i rs8099917, rs12980275 i rs8099917, rs368234815 i rs8099917, $r^2 \sim 0,4$) u evropskoj populaciji [268], što je u skladu sa našim rezultatima. Druga studija sprovedena na srpskoj populaciji utvrdila je prisustvo umerene vezanosti među polimorfizmima rs8099917, rs12979860 i rs12980275 [267].

5.6. Protektivna uloga *IFNL4* na razvoj COVID-19 pneumonije kod žena

Naše istraživanje je otkrilo da postoji povezanost između ispitivanih *IFNL3* i *IFNL4* polimorfizama, i da je ona zavisna od pola: ženski homozigotni nosioci varijantnih alela *IFNL4* rs12979860 i rs368234815 imaju manje šansi da progrediraju iz lake u umerenu kliničku sliku COVID-19, odnosno da razviju COVID-19 pneumoniju. Koliko nam je poznato, ovo je prvi dokaz o zaštitnoj ulozi varijantnih alela *IFNL4* u nastanku COVID-19 pneumonije kod žena.

Većina prethodnih studija o ulozi genetičkih polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* u imunskom odgovoru na virusnu infekciju odnosile su se na virusne infekcije druge etiologije, a ne na COVID-19 [122, 162, 264]. Kada je reč o COVID-19, opisan je uticaj genotipa *IFNL3/4* na smrtni ishod [173], ali studije koje su se bavile težinom infekcije SARS-CoV-2 gotovo redovno nisu bile uspešne u dokazivanju značajne povezanosti [173, 190, 191]. Za razliku od ranijih saznanja, rezultati ovog istraživanja ukazuju na protektivnu ulogu oba istraživana *IFNL4* polimorfizma u odnosu na progresiju COVID-19. Međutim, uočena povezanost je ograničena na napredovanje od lake do umerene forme COVID-19, dok uticaj na dalje pogoršanje bolesti nije bio zabeležen. Imajući u vidu da je glavni klinički znak ozbiljnijih stadijuma COVID-19 u odnosu na blagu bolest razvoj pneumonije, ponovo smo stratifikovali našu kohortu i ponovo

analizirali podatke u skladu s tim, otkrivajući da se zapravo posmatrani uticaj polimorfizama *IFNL4* gena odnosi na sklonost pacijenata ka razvoju pneumonije, a ne na druge aspekte progresije bolesti. Koliko nam je poznato, ovo je prva studija koja se bavila ovim pitanjem kod pacijenata sa COVID-19.

Važno je napomenuti da su slično istraživanje nedavno sprovedli od Nikolaeva i saradnici [269], koji su analizirali potencijalnu ulogu genetičkih polimorfizama *IFNL* u razvoju pneumonije nastale nakon respiratornih infekcija različitog porekla. Autori su zaključili da rs12979860 T/T genotip, u njihovom istraživanju naznačen kao „nepovoljan“, može povećati rizik od istih komplikacija kod COVID-19 pacijenata. Međutim, njihova populacija pacijenata se uglavnom sastojala od pacijenata zaraženih gripom, adenovirusima i rinovirusima (nijedan nije bio zaražen SARS-CoV-2), dok je umereno pozitivna korelacija između procenjenih frekvencija alela rs12979860 T u pojedinim zemljama i dostupnih podataka o morbiditetu i mortalitetu COVID-19 širom sveta služila kao jedini dokaz predložene asocijacije. Nasuprot tome, naša populacija pacijenata se sastojala od laboratorijski potvrđenih COVID-19 pacijenata, pa verujemo da neposrednost naših podataka čini naše istraživanje validnijim i zaključke pouzdanijim.

Naša glavna saznanja odnose se na protektivnu ulogu varijantnih alela *IFNL4* rs12979860 i rs368234815 (T i ΔG), iako njihov visok stepen vezane neravnoteže otežava nedvosmislen zaključak o tome koji od ova dva polimorfizma eventualno predvodi u generisanju protektivnog efekta. Ova posmatranja se dobro uklapaju u opšte znanje o uticaju ovih polimorfizama na ekspresiju IFN-λ4 i njegovu ulogu u COVID-19: kako je već pomenuto, oba varijantna alela *IFNL4* omogućavaju sintezu funkcionalnog IFN-λ4 pune dužine, što ujedno pruža bolju antivirusnu aktivnost protiv SARS-CoV-2 [113, 115]. Međutim, prethodne studije koje su istraživale ulogu *IFNL4* polimorfizma u kontekstu infekcije virusom hepatitisa C (HCV), gotovo jednoglasno su pokazale suprotno: klirens HCV, kako spontani [162, 261], tako i nakon antivirusne terapije [122, 264], bio je otežan kod nosilaca varijantnih alela rs12979860 i rs368234815 - onih koji su u ovom slučaju identifikovani kao protektivni.

Ovaj očigledni paradoks otvara važno pitanje: kako potpuno funkcionalni IFN-λ4, poznat po svojoj antivirusnoj aktivnosti, može zaštititi u jednoj, a ugroziti u drugoj virusnoj infekciji? Iako složenost IFN-posredovane signalne kaskade dozvoljava razne hipoteze, verujemo da se osnovni mehanizam ovog problema može objasniti neravnotežom IFN-a povezanih sa bolestima i specifičnošću virus-IFN interakcije. Naime, postoje dva tipa IFN-a ključna za urođeni imuni odgovor tokom virusnih infekcija: tip I i tip III [270, 271]. Oba se proizvode nakon ulaska virusa u ciljne ćelije i, iako uključuju različite komplekse receptora, u osnovi pokreću vrlo sličnu signalnu kaskadu koja generiše antivirusni odgovor i posreduje u eliminaciji virusa [100, 158]. Ipak, postoje značajne razlike među njima: IFN tip III (uključujući IFN-λ4) se proizvode brže i konzistentnije, dominiraju u epitelnim ćelijama, deluju manje snažno i manje pro-inflamatorno i smanjuju signalizaciju IFN tipa I [270, 272-275]. Pod uslovom da je domaćin nosilac *IFNL4* rs12979860 T i/ili rs368234815 ΔG alela, i HCV i SARS-CoV-2 infekcije će pokrenuti sintezu IFN-λ4 [271]. U HCV infekciji, gde su i mehanizmi eliminacije virusa i mehanizmi bega virusa od imunskih mehanizama uglavnom zasnovani na IFN tip I [276], ekspresija potpuno funkcionalnog IFN-λ4, zbog njegovog suprimirajućeg uticaja na aktivnost IFN tip I, ide u korist virusu i pogoršava prognozu [271]. S druge strane, u SARS-CoV-2 infekciji virus jednako izbegava i odgovor tipa I i tipa III IFN-a. S obzirom na to da proinflamatorna priroda IFN tip I povećava rizik od nekontrolisane imunopatologije u mnogim organima, uključujući pluća [277], balans koji pruža IFN-λ4 treba da zaštiti respiratorni epitel od COVID-19 komplikacija, kao što je pneumonija. Ovo se dobro uklapa u rezultate našeg istraživanja.

Ipak, veza koju smo uočili između prisustva polimorfizama koji proizvode IFN- λ 4 i manjeg rizika od razvoja pneumonije, pokazala se ograničenom na ženski pol. Očigledni seksualni dimorfizam u imunskom odgovoru već je prepoznat [278]: i urođeni i stečeni imunski odgovor je u većini infektivnih bolesti, uključujući COVID-19, čini se, jači kod žena [238, 279]. Ova razlika može biti posledica različitih mehanizama, uključujući one genetičkog porekla. Naime, mnogi geni koji kodiraju proteine uključene u imunске reakcije nalaze se na X hromozomu [280]. Iako je kod ženskih osoba jedan X hromozom obično inaktiviran, neki geni mogu izbeći transkripciono utišavanje [281], što rezultuje povećanim nivoom ekspresije i posledičnim polno uslovljenim razlikama u odgovoru na infektivne agense. Jedan od imunoregulatornih gena koji izbegava inaktivaciju X hromozoma kodira TLR7 [280]. TLR7 predstavlja endozomalni senzor urođene imunosti ključan za prepoznavanje brojnih patogena, uključujući viruse, koji aktivira imunski odgovor učestvovanjem u signalnoj kaskadi koja indukuje proizvodnju i tipa I i tipa III IFN [282, 283]. Povećana ekspresija TLR7 kod ženskih osoba dovodi do višeg nivoa TLR7 u mnogim tkivima, uključujući plazmocitoidne dendritične ćelije [284], što dovodi do veće ekspresije oba tipa IFN kod žena u poređenju sa muškarcima [285]. U vezi sa našim saznanjima, prepostavljamo da bi viša ekspresija TLR7 kod žena zaraženih SARS-CoV-2 mogla modulirati interakciju između tipa I i tipa III IFN u pravcu izraženijeg zaštitnog efekta IFN- λ 4 protiv razvoja upale pluća. Imajući u vidu da se razlike u polno-specifičnoj ekspresiji gena javljaju u ranoj embriogenezi i ne menjaju se kasnije u životu [286], prethodna saznanja o blažem bronhialitisu u prisustvu *IFNL4* rs12979860 T/T i rs368234815 Δ G/ Δ G kod devojčica, ali ne i kod dečaka [187], u skladu su sa našim sa našim saznanjima i predloženom logikom.

5.7. Polimorfizmi *IFNL3* i *IFNL4* gena kao mač sa dve oštrice: povezanost sa ishodom COVID-19

U našoj studiji, verovatnoća fatalnog ishoda bila je niža kod nosioca najmanje jednog varijantnog alela *IFNL4* rs368234815, a viša u prisustvu najmanje jednog varijantnog alela *IFNL3* rs8099917. Pored toga, ženski pol bio je prediktor smrtnog ishoda tokom hospitalizacije.

Osnovno načelo imunosti je da se antivirusni odgovor, posredovan IFN-ima, pokreće pre proinflatornog odgovora, sa ciljem da se maksimizuje zaštita domaćina i ograniči kolateralna šteta. Međutim, nedavna studija na kritično obolelim pacijentima od COVID-19 [44] je otkrila da je proizvodnja tip I i III IFN smanjena i odložena sve dok se ne proizvedu proinflatorni citokini. U istoj studiji, povećane koncentracije IFN- λ i viši IFN- λ /tip-I IFN odnos su bili povezani sa nižim nivoom virusnog opterećenja u bronhijalnim aspiratima i boljim ishodom, sugerišući da su IFN- λ bitniji za modulaciju urođenog imunskog odgovora kod kritično teških pacijenata sa COVID-19 [44].

Pored toga, jedan od najznačajnijih pokazatelja imunopatologije COVID-19 je promena u broju i funkciji neutrofila. Nekoliko studija je dokumentovalo povišen broj neutrofila i njihov snažan aktivacioni fenotip, uključujući povećanu produkciju ROS - a i formiranje NET - a, u prisustvu teškog oblika COVID-19, komplikacija poput ARDS-a i smrtnog ishoda bolesti [287]. IFN- λ imaju jedinstvenu sposobnost da kontrolišu oštećenja tkiva putem regulisanja proizvodnje ROS od strane neutrofila [288], njihovog kretanja ka inflamiranom tkivu, kao i stvaranja NET-a [289].

Konačno, u pokušaju da savladaju infektivne agense, poput SARS-CoV-2, naivni Th limfociti fenotipski polarizuju, zavisno od citokinskog miljea, u efektorske ćelije Th 1 tipa (Th1) ili Th 2 tipa (Th2). Čini se da je tokom ovih procesa IFN- λ delegirana još jedna vitalna uloga u virusnim infekcijama: da posreduju u uspostavljanju veze između urođenog i stečenog

imunskog odgovora kroz M1/M2 polarizaciju makrofaga [290] i naknadno usmeravanje Th limfocita. Signalizacija posredovana IFN- λ povezana je sa povećanom produkcijom Th1 citokina i smanjenom produkcijom Th2 citokina [99, 290]. Nakon uspostavljanja infekcije SARS-CoV-2 virusom, adekvatan Th1 imunski odgovor može eliminirati virus iz domaćina na bezopasan način. Međutim, ukoliko imunski odgovor nije adekvatno koordinisan, Th2 odgovor postaje dominantan, što prethodi citokinskoj oluji [291]. Kod većine teško obolelih i preminulih COVID-19 pacijenata često se uočavao dominantan Th2 odgovor [291]. U delu našeg istraživanja (prikazanom u prilogu 1) identifikovan je veliki broj monocita sa mešovitim M1/M2 fenotipom u perifernoj krvi teških slučajeva, što potvrđuje ranije studije o mešanom Th1/Th2 odgovoru kod kritično obolelih COVID-19 pacijenata [291].

Kao što je prethodno objašnjeno, IFN- λ 4 predstavlja slabo eksprimiran, ali visoko potentan i brzo delujući citokin, poznat po svojoj paradoksalnoj ulozi u različitim virusnim infekcijama: generalno, poseduje vrsnu antivirusnu aktivnost [292], uključujući i protiv HCV-a [293], ali istovremeno značajno ometa eliminaciju HCV-a, kako spontano tako i u odgovoru na terapiju. Predloženo je da se jedinstveni kontradiktorni efekat IFN- λ 4 može objasniti povećanom negativnom regulacijom interferenskog odgovora nakon indukcije supresorskih citokina zavisnih od IFN- λ 4, što dalje ograničava oštećenje tkiva koje se obično viđa kod lošije prognoze COVID-19 i kod preminulih pacijenata [293].

Prema tome, pretpostavljamo da se povezanost alela *IFNL4* rs368234815 Δ G sa manjom verovatnoćom smrtnog ishoda tokom hospitalizacije koju smo uočili u našoj studiji izvodi iz direktnog efekta potpuno funkcionalnog IFN- λ 4, koji suprimira mehanizme neutrofilskog arsenala [288, 289, 294] i promovira proizvodnju Th1 kroz M1 polarizaciju monocita/makrofaga [99], a samim tim smanjuje oštećenja tkiva kod kritično teških pacijenata sa COVID-19. Takođe smo primetili znatno veći broj leukocita sa povećanjem neutrofila kod pacijenata preminulih tokom hospitalizacije, a koji su bili pretežno TT nosioci. Dalja analiza je potvrdila da su svi TT nosioci imali značajno veći broj leukocita sa povećanim (iako nesignifikantnim) procentom neutrofila (prilog 2), što je u skladu sa prethodnom studijom koja je referisala dominantnost homozigotnih nosilaca Δ G kod COVID-19 pacijenata sa nižim brojem leukocita i nižim brojem neutrofila [192]. S druge strane, N/L odnos, kao jedan od najčešće analiziranih faktora rizika u COVID-19, nije bio povezan sa varijantom rs368234815. Takođe, prisutne su i suprotne tvrdnje, kao što su da se rs368234815 TT/TT, kao povoljni genotip, češće sreće među preživelim COVID-19 pacijentima u poređenju sa onima koji nisu preživeli infekciju [173], a da su nosioci Δ G/ Δ G genotipa manje efikasni u eliminisanju SARS-CoV-2, iako ovaj genotip nije uticao na klinički ishod bolesti [265]. Međutim, treba napomenuti da ove studije imaju značajna ograničenja koja mogu biti ključna za asocijaciju između *IFNL4* rs368234815 i COVID-19, uključujući nedostatak podataka o pridruženim bolestima koje mogu značajno uticati na smrtnost od COVID-19.

Naši rezultati su pokazali da je varijantni alel G polimorfizma *IFNL3* rs8099917 značajan faktor rizika za smrtnost od COVID-19 tokom hospitalizacije. U skladu sa našim rezultatima, neki od autora su izvestili da je *IFNL3* rs8099917 G/G najčešći u grupi preminulih COVID-19 pacijenata, dok je homozigotni divlji T/T percipiran kao „povoljan“ genotip [173]. Takođe je primećeno da se, u odgovoru na visoko virusno opterećenje, u gornjim disajnim putevima pacijenata sa lakim oblikom COVID-19 produkuju viši nivoi IFN- λ 3 u poređenju sa teškim slučajevima [115]. Nedavna istraživanja su pokazala da IFN- λ 3 indukuje ekspresiju M1 proinflamatornog fenotipa makrofaga [295], delujući kao primarni medijator upale [296]. Imajući u vidu kako prethodna istraživanja, tako i rezultate našeg istraživanja, pretpostavljamo da nedostatak IFN- λ 3 kod nosilaca alela rs8099917 G u inflamatornom okruženju tokom COVID-19 povećava rizik od smrti tokom hospitalizacije favorizovanjem M2 polarizacije monocita/makrofaga i naknadnim Th2 usmeravanjem [99], što doprinosi razvoju citokinske

oluje i sledstvenom oštećenju tkiva. Međutim, treba napomenuti da opaženi efekat rs8099917, kao i rs368234815, može biti posledica mnogo složenije interakcije citokina, budući da bi mogli uticati i na ekspresiju drugih IFN- λ ili biti u vezanoj neravnoteži sa drugim *IFNL* SNP-ovima ili polimorfizmima drugih citokina za koje nismo genotipizovali.

Iako je globalna prevalencija COVID-19 naizgled slična kod muškaraca i žena, mnogi izveštaji ukazuju na muški pol kao značajan prediktor smrtnog ishoda [297-299]. U stvari, koliko nam je poznato, postoji samo jedan prethodni izveštaj suprotnog karaktera, što je u skladu sa našim nalazom - da žene nose veći rizik od smrti tokom hospitalizacije zbog COVID-19 [300]. Budući da su u našoj studiji razmatrani i starost i komorbiditeti kada je procenjivana razlika u stopi smrtnosti između muškaraca i žena, pretpostavljamo da drugi faktori mogu biti odgovorni za opaženi nalaz. Jedan od tih faktora mogao bi biti rodna ambivalentnost društva u Srbiji, što bi moglo objasniti potencijalno oklevanje žena da prijave simptome dok ne postanu neizdrživi, što dovodi do odlaganja testiranja i prijema na stacionarno lečenje u mnogo lošijem stanju, pa su stoga u većem riziku od lošijeg ishoda u poređenju sa muškarcima. Dodatna objašnjenja mogu uključivati razlike između polova u osnovnoj stopi smrtnosti ili zanimanja koja su segregirana prema polu [301]. Vredi napomenuti da, ukoliko bilo koji od predloženih faktora značajno doprinosi opaženoj rodnoj razlici u verovatnoći umiranja tokom hospitalizacije zbog COVID-19, jednostavno poređenje između žena i muškaraca u smislu stopa smrtnosti može biti zavaravajuće zbog systemske pristrasnosti [302]. Za identifikaciju koje od mogućih opcija su tačne, potrebna su dodatna istraživanja.

5.8. Povezanost koncentracije IFN- λ 3 sa težinom i ishodom COVID-19, nezavisno od *IFNL3* i *IFNL4* polimorfizama

Interferoni, kao deo široke lepeze medijatora koji se proizvode u odbrani od SARS-CoV-2 infekcije, privukli su mnogo pažnje od samog početka pandemije. Najveće nerazjašnjeno pitanje je da li interferoni, posebno IFN- λ , imaju protektivnu ili pogubnu ulogu u COVID-19, s obzirom na oprečne rezultate koji su prisutni u literaturi [113, 114, 303]. Rezultati našeg ispitivanja, govore u prilog protektivnoj ulozi IFN- λ tokom SARS-CoV-2 infekcije, nezavisno od polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena. Neočekivano, merljive koncentracije IFN- λ 4 zabeležene su kod malog broja pacijenata, uprkos tome što smo prethodno dokazali fundamentalni uticaj polimorfizma koji determiniše njegovu sintezu na težinu i ishod SARS-CoV-2 infekcije.

Urođeni imunski odgovor poseduje raznovrsna oružja i isplanirane strategije protiv svih "napadača", kroz sistem receptora koji prepoznaju mikroorganizme, kako na nivou membrane, tako i unutar ćelije. U slučaju infekcije epitelnih ćelija SARS-CoV-2 virusom, virus biva prepoznat od strane intracelularnih senzora RIG-1 i MDA-5 ili TLR7 što pokreće kaskadu signalnih događaja za sintezu glavnih antivirusnih medijatora, poput IFN tip III [36-38, 103]. Kao ključna ulazna vrata za respiratorne viruse, epitelne ćelije sluzokože respiratornog trakta predstavljaju primarni izvor IFN- λ , ali su istovremeno i glavna meta njegovog dejstva, budući da je IFNLR visoko ekspimiran upravo na ovim ćelijama [103]. Pored mnogobrojnih virusnih infekcija koje pogađaju respiratorni trakt, IFN- λ poseduju visok antivirusni efekat i na SARS-CoV-2.

Nedavna istraživanja pokazala su da ekspresija IFN- λ varira u različitim partijama respiratornog trakta kod COVID-19 pacijenata. Visoka ekspresija IFN- λ 3 i protektivnih ISG prisutna je kod pacijenata sa blažom kliničkom formom COVID-19 i visokim virusnim opterećenjem u gornjim partijama respiratornog trakta. Istovremeno, niska ekspresija IFN- λ uz visoku ekspresiju IFN tip I nosila je desetostruko veću šansu za razvoj teških oblika u poređenju

sa lakim slučajevima [115]. Na nivou pluća, u uzorcima bronhoalveolarnog lavata, kod teških i kritično teških pacijenata, ekspresija IFN- λ 2 i 3, ali i IFN tip I, bila je veća u donjim partijama u odnosu na gornje partije respiratornog trakta, uz nižu ekspresiju protektivnih ISG u poređenju sa transkriptomom na nivou gornjih partija respiratornog trakta kod pacijenta sa istom i lakšom formom bolesti [115].

Zanimljivo je to da koncentracije IFN- λ proteina u bronhoalveolarnom lavatu i krvi nisu korelirale među teškim slučajevima [115]. U prilog tome govore i naši rezultati koji su pokazali da je koncentracija IFN- λ 3 u serumu značajno niža kod pacijenata težim oblikom, kao i kod preminulih. Takođe, Fukuda i saradnici utvrdili su da je koncentracija IFN- λ 2 bila viša kod pacijenta sa lakšim oblikom COVID-19. Rezultati nedavne studije pokazuju da je nivo ekspresije IFN tipa III, naročito IFN- λ 3, bio manji u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa kritično teškom bolešću i kod preminulih, u poređenju sa pacijentima koji su imali blagu do umerenu formu bolesti i preživelih [304].

Na temelju prethodno iznetih informacija i sopstvenog istraživanja, možemo pretpostaviti da povećana produkcija različitih tipova IFN- λ , posebno IFN- λ 3, u krvi tokom početne faze SARS-CoV-2 infekcije odražava visoku ekspresiju i produkciju ovih interferona u gornjim delovima respiratornog sistema. Ova povišena produkcija aktivira brz i efikasan antivirusni odgovor koji ograničava širenje virusa i dovodi do eliminacije patogena u blažim slučajevima COVID-19, istovremeno povećavajući šanse za preživljavanje zaraženih osoba. Međutim, u slučajevima težih oblika bolesti i smrtnih ishoda, produkcija IFN- λ 3 i njegova ekspresija u donjim delovima respiratornog trakta su suprotni u odnosu na nalaze kod pacijenata sa lakšim oblikom COVID-19. Pretpostavljamo da niska proizvodnja IFN- λ u krvi kod pacijenata sa teškim oblikom bolesti i onih koji su preminuli može biti rezultat promena u broju plazmacitoidnih dendritskih ćelija (pDCs). Naime, pDCs predstavljaju ključni izvor IFN- λ u krvi, a prethodna istraživanja su pokazala da se njihov broj smanjuje kod pacijenata sa teškim kliničkim oblikom COVID-19 [305], što je u skladu sa našim rezultatima (prilog 1). Ova pretpostavka dobija podršku i u činjenici da kod pacijenata sa teškim oblikom bolesti primećujemo smanjen broj pDCs, zajedno sa nižim nivoima IFN- λ 3 u plazmi u poređenju sa pacijentima sa blagim oblikom bolesti [305]. S druge strane, iako se transkripcija IFN- λ u donjim delovima respiratornog trakta odvija neometano, postavlja se pitanje da li dolazi do adekvatne translacije ovih interferona, posebno zbog nedostatka aktivacije karakterističnih zaštitnih antivirusnih mehanizama koji su ključni za sigurno uklanjanje patogena iz organizma domaćina. Pretpostavljamo da u ovoj fazi bolesti, glavnu ulogu preuzimaju nekontrolisani proinflamatorni mehanizmi imunskog odgovora, predvođeni interferonom tipa I.

Kao što je prethodno objašnjeno (odjeljak 5.3), u ovoj studiji su odabrani polimorfizmi *IFNL3* i *IFNL4* gena na temelju njihove poznate funkcionalnosti, odnosno poznatom uticaju na produkciju odgovarajućih interferona. S druge strane, prisustvo nekih polimorfizama ima plejotropni efekat na produkciju interferona. Preciznije, prisustvo ispitivanih varijanti rs368234815 i rs12979860 koje generišu sintezu IFN- λ 4 utiču na produkciju IFN- λ 3. Ovaj efekat je posledica ili direktnog delovanja IFN- λ 4 [306] ili prisustvo polimorfizama koji nisu analizirani u ovom istraživanju, a u visokoj su vezanoj neravnoteži sa polimorfizmima *IFNL4* gena [198]. Jedan od takvih kandidata je polimorfizam rs4803217, smešten u 3'UTR regionu *IFNL3* gena, čiji T alel povećava razgradnju mRNK [198]. Uzimajući ovo u obzir ispitivali smo uticaj polimorfizama i *IFNL3* i *IFNL4* gena na nivo cirkulišućeg IFN- λ 3.

U dostupnoj literaturi, veza između fenotipa i polimorfizama *IFNL3* i *IFNL4* gena uglavnom se zasniva na merenju ekspresije *IFNL3* gena, kao i na efektima koji proizvode ovi interferoni kroz ekspresiju ISG, što služi kao surogat nivoa produkcije IFN- λ 3. Manji broj studija je utvrđivao koncentracije cirkulišućih IFN- λ 3. Bez obzira na to koja strategija

određivanja nivoa IFN- λ 3 u svetlu prisutnih polimorfizama primenjivana, rezultati studija su bili oprečni. Koncentracija IFN- λ 3 u serumu nije zavisila od prisustva polimorfizma rs12979860 [307], ali su zabeležene varijacije u ekspresiji ISG među neinficiranim i inficiranim hepatocitima HCV virusom: u neinficiranim hepatocitima TT alel je nosio najnižu ekspresiju ISG, dok je u zaraženim hepatocitima isti genotip bio spregnut sa najvišim nivoom ISG. Varijantni alel polimorfizma rs8099917 povezan je i sa višim [307] i nižim [308] nivoom serumskog IFN- λ 3, ali i nižom relativnom ekspresijom u mononuklearnim ćelijama [159] i ćelijama jetre [309]. Međutim, neke studije nisu pronašle povezanost između ovog polimorfizma i nivoa IFN- λ 3 u serumu [310, 311]. Za razliku od prethodna dva polimorfizma, za rs12980275 nije potvrđena povezanost sa koncentracijom IFN- λ 3 [307], niti ekspresijom *IFNL3* gena [309]. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja koja ukazuju da nema razlike u koncentracijama IFN- λ 3 u plazmi među alelima i genotipovima ispitivanih polimorfizama. Oprečnost dostupnih podataka, uključujući i naše rezultate, ukazuje da polimorfizmi unutar gena nisu jedina determinanta koja utiče na koncentraciju IFN- λ 3, već da je u pitanju kompleksniji sistem sa mnogobrojnim faktorima.

Biohemijski gledano, IFN- λ 4 deluje na sličan način kao ostali članovi porodice IFN tip III: signalizira preko IFN- λ receptorskog kompleksa i indukuje skup gena koji su veoma slični onima koje indukuju ostali članovi IFN- λ porodice. Antivirusna aktivnost je *in vitro* nedvosmisleno dokazana, uz tvrdnje nekih autora da poseduje istu [312] ili čak 28 puta veću aktivnost od IFN- λ 3 [313]. Ipak, jedini među IFN tip III, nije prisutan u čitavoj humanoj populaciji, već samo kod pojedinaca koji su nosioci rs368234815 Δ G alela, koja u slučaju evropske populacije iznosi 50% [158]. Druga glavna karakteristika koja ga izdvaja od ostalih IFN- λ je slaba sekrecija iz ćelije i autokrino delovanje. Inicijalno, Prokunina-Olson i saradnici su smatrali da je IFN- λ 4 intracelularni interferon koji se ne sekretuje zbog slabog signalnog peptida [158]. Međutim, usledio je niz *in vitro* studija u kojima je potvrđeno da se IFN- λ 4 akumulira intracelularno, dok se veoma mala količina sekretuje iz ćelije [100, 312-314]. Ove studije ustanovile su i niz mehanizama na različitim nivoima sinteze jednog proteina koji doprinose smanjenoj produkciji IFN- λ 4, uključujući alternativno splajsovanje primarnog transkripta čime se proizvode značajne količine nefunkcionalnih proteina, ekspresija nestabilnih varijanti iRNK koje sadrže introne, nizak nivo translacije usled slabog “kačenja” na poliribosome i slab poliA signal koji dodatno destabilizuje iRNK i redukuje mogućnost efikasne translacije iRNK koja nosi informaciju za sintezu funkcionalnog IFN- λ 4 [312], zatim neadekvatna post-translaciona N-glikozilacija [100], kao i akumulacija u endoplazmatskom retikulumu [313]. Ovaj značajan broj prepreka u produkciji IFN- λ 4 objašnjava naš rezultat merenja IFN- λ 4 u plazmi COVID-19 pacijenta. Iako je više od polovine genotipiziranih pacijenata imala makar jedan Δ G alel u svom genotipu, IFN- λ 4 je dosegao detektabilni nivo kod samo šest pacijenata. Svi ovi pacijenti bili su nosioci homozigotnog Δ G genotipa. Lu i saradnici su ustanovili da manje od 2% transkripta sa *IFNL4* lokusa kod rs368234815 heterozigota produkuje funkcionalni IFN- λ 4 protein, što u velikoj meri objašnjava naš rezultat [314]. Ipak ostaje nerešeno pitanje zašto IFN- λ 4 nije detektovan kod ostalih 11 Δ G/ Δ G homozigota. Jedan od mogućih odgovora na ovo pitanje je prag detekcije samog testa. Generalno, kada se bavimo temom IFN- λ , imperativ je konstantno imati na umu da ovi molekuli pretežno ostvaruju autokrini i parakrini efekat, te da nivoi u krvi nužno ne reflektuju nivoe IFN- λ u inficiranom tkivu.

5.9. Metodološki aspekti i ograničenja istraživanja

Ova studija ima nekoliko ograničenja koja je potrebno uzeti u obzir prilikom tumačenja njenih rezultata. Prvo, studija je jednocentrična i obuhvata samo jednu populaciju COVID-19

pacijenata na nivou Republike Srbije. S obzirom na to da su ispitanici uključeni u studiju iste etničke pripadnosti, njeni rezultati se ne mogu generalizovati na druge populacije bez daljih validacija i verifikacija.

Načelno, broj ispitanika u genetičkim studijama zavisi od mnogih faktora, kao što su učestalost odabranih polimorfizama gena, heterogenost populacije, željena statistička snaga, itd. Smatra se da veći uzorak ispitanika obezbeđuje veću snagu i pouzdanost, te manju sklonost ka slučajnim varijacijama. Stoga, mnogi autori naglašavaju važnost veličine uzorka u genetičkim studijama, a neki od njih sugerišu da bi studije koje ispituju povezanost genetičkih polimorfizama sa različitim fenotipovima trebale uključiti veći broj ispitanika kako bi se dobili pouzdaniji i relevantniji rezultati. Uprkos tome što je veličina studijskog uzorka propračunata prema učestalosti jednog od ispitivanih polimorfizama, posmatrajući pretpostavljene uslove prema Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži, prevalenca genotipova za polimorfizam *ACE2* rs2106809 nije u skladu sa pretpostavljenom, što je elaborirano u odeljku diskusije 5.2. Takođe, mali uzorak testiran za više SNP-ova, koji prikazuju relativno nisku učestalost varijantnih alela u evropskoj populaciji, smanjuje statističku snagu naše studije i povećava verovatnoću lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Takođe, nismo izvodili genotipizaciju za dodatne funkcionalne polimorfizme koji su potencijalno u visokoj vezanoj neravnoteži sa ispitivanim polimorfizmima ili utiču na funkcionalnost produkata koji nastaju ekspresijom ispitivanih gena.

Istovremeno, u studiji nisu analizirani podaci o mogućim zbunjujućim faktorima, kao što su stepen izloženosti SARS-CoV-2 virusa, inicijalno virusno opterećenje, zdravstveno ponašanje i navike pacijenata, telesna težina i lekovi koje su hronično upotrebljavali, što može značajno uticati na posmatranu vezu između faktora rizika i verovatnoće razvoja težeg oblika COVID-19 ili smrtnog ishoda.

U sklopu studije, ispitivane su samo serumske koncentracije proteina sACE2, IFN- λ 3 i IFN- λ 4. Iako su ovi proteini važni za ulazak virusa u ćelije domaćina (ACE2) i za inicijalnu odbranu od virusa (IFN- λ 3 i IFN- λ 4), nije merena njihova koncentracija u drugim tkivima i tečnostima, kao što su nazofaringealni bris, bronhoalveolarni lavat. Osim toga, u ovoj studiji nije merena ekspresija gena koji kodiraju ove proteine, niti ispitivan uticaj polimorfizama kodirajućih gena na ekspresiju tokom SARS-Cov-2 infekcije.

Takođe, treba napomenuti da postoji nekoliko prethodno objavljenih GWAS studija koje nisu uspele da ustanove vezu između *IFNL3/4* lokusa i COVID-19 [127, 315], sugerišući da polimorfizmi na ovim lokusima imaju malo ili nimalo uticaja na ishod infekcije SARS-CoV-2. Ipak, jedna GWAS studija pronašla je vezu između polimorfizma za *IL10Rb*, koji čini receptor za IFN- λ zajedno sa podjedicom IFN- λ R1, i COVID-19 [316], što ukazuje na moguću ulogu povezanih interferona i njihovih polimorfizama u SARS-CoV-2 infekciji, iako njihova precizna priroda još nije otkrivena.

6. Zaključak

Na temelju rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji, koja se bavila ispitivanjem uticaja polimorfizama *ACE2*, *IFNL3* i *IFNL4* gena na težinu i ishod SARS-CoV-2 infekcije, možemo izvesti sledeće **osnovne** zaključke:

1. Prisustvo bar jednog varijantnog alela *ACE2* rs2106809 kod žena ima ambivalentni uticaj na razvoj težih oblika COVID-19: s jedne strane, povećava šansu za prelazak iz umerene u tešku formu bolesti, dok s druge strane, pruža protektivni efekat protiv progresije iz teške u kritično tešku bolest. Polimorfizam *ACE2* rs2074192 nije bio u statistički značajnoj asocijaciji sa težinom bolesti ni kod žena, ni kod muškaraca.
2. Prisustvo varijantnog alela *ACE2* rs2106809 kod žena smanjuje verovatnoću smrtnog ishoda u odnosu na nosioce oba divlja alela u svom genotipu. Polimorfizam *ACE2* rs2074192 nije u statistički značajnoj asocijaciji sa ishodom ni kod žena, ni kod muškaraca.
3. Prisustvo varijantnih alela polimorfizama *IFNL3* rs8099917 i rs12980275 i *IFNL4* rs12979860 i rs368234815 u okviru genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova višestruko redukuje verovatnoću za razvoj umereno teške infekcije, dok uticaj ovih polimorfizama na dalju progresiju COVID-19 nije dokazan.
4. Varijantni aleli polimorfizama *IFNL3* rs8099917 i rs12980275 i *IFNL4* rs12979860 i rs368234815 u okviru genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova nose značajno smanjenje rizika za razvoj pneumonije kod SARS-CoV-2 inficiranih pacijenata.
5. Prisustvo oba varijantna alela polimorfizama *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815 četverostruko smanjuje verovatnoću za razvoj pneumonije uzrokovane SARS-CoV-2 infekcijom.
6. Kod žena, varijantni aleli polimorfizama *IFNL3* rs8099917 i rs12980275, kao i *IFNL4* rs12979860 i rs368234815, unutar genotipova, genotipskih grupa, haplotipova i diplotipova, značajno smanjuju verovatnoću za razvoj pneumonije, dok kod muškaraca ova asocijacija nije dokazana.
7. Žene nosioci oba varijantna alela polimorfizama *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815 imaju gotovo trideset puta nižu verovatnoću za razvoj COVID-19 pneumonije. Ovaj efekat nije zabeležen kod muškaraca.
8. Prisustvo makar jednog varijantnog alela *IFNL4* rs12979860 ili rs368234815 smanjuje verovatnoću za smrtni ishod COVID-19, dok makar jedan varijantni alel *IFNL3* rs8099917 povećava šansu za fatalni ishod.

Ostali zaključci koji se mogu izvući na osnovu prikazanih rezultata su sledeći:

1. Stariji pacijenti sa većim brojem komorbiditeta imaju veći rizik za razvoj težih oblika i smrtni ishod COVID-19. Pacijenti muškog pola imaju veći rizik za progresiju teže forme bolesti, dok pol nije predstavljao značajan faktor rizika za smrtni ishod.
2. Simptomi poput povišene temperature i kašlja pri prijemu povezani su sa većim rizikom od napredovanja bolesti iz lakše u umerenu formu. Dispneja, slabost, bol u grlu i anosmija češće se javljaju kod teške forme u poređenju sa umerenom, dok pacijenti s mialgijom imaju manje šanse za napredovanje iz teške u kritičnu fazu bolesti. Ipak, simptomi na prijemu nisu značajni prediktori smrtnog ishoda.

3. Abnormalni disajni nalaz, poput oslabljenog disajnog šuma, pukota ili zvižduka, češće se javljaju kod umerene forme bolesti u odnosu na lakšu formu. Pukoti su posebno bili prisutni kod teških slučajeva. Pacijenti sa ovim abnormalnim auskultatornim nalazima imaju dva do četiri puta veći rizik od fatalnog ishoda.
4. Prisustvo aktivnih lezija na rendgenskom snimku grudnog koša, posebno pojedinačnih pneumoničnih ognjišta, povezano je s višestrukim povećanjem rizika za napredovanje bolesti iz lakše u umerenu kliničku sliku. Difuzna pneumonična ognjišta povećavaju verovatnoću napredovanja prema kritično teškoj bolesti i smrtnom ishodu COVID-19.
5. Pacijenti sa težim oblikom bolesti imaju visok odnos neutrofila i limfocita (N/L), niske nivoe albumina i povišene vrednosti glikemije, LDH, D-dimera, CRP-a i PCT-a. Ovi faktori su povezani s većim rizikom od napredovanja bolesti i smrtnog ishoda. S druge strane, pacijenti s blažim oblikom bolesti imaju veći broj limfocita, više nivoe albumina, višu vrednost pO₂ i bolju saturaciju na prijemu, što se povezuje s boljim ishodom i otpustom iz bolnice.
6. Koncentracija sACE2 je veća kod starijih žena, ali ne zavisi od prisustva polimorfizama ACE2 rs2106809 i rs2074192. Nivo sACE2 je veći kod pacijenata sa težim kliničkim simptomima i smrtnim ishodom SARS-CoV-2 infekcije. Viši serumski sACE2 nivoi na prijemu povećavaju verovatnoću za razvoj težih oblika SARS-CoV-2 infekcije.
7. Koncentracija IFN-λ3 ne zavisi od pola, starosti i prisustva IFNL3/4 polimorfizama. Nivo IFN-λ3 je niži kod pacijenata sa težom kliničkom slikom i smrtnim ishodom SARS-CoV-2 infekcije, ali samo kod žena. Serumski IFN-λ3 je nezavisni indikator težine kliničke slike, dok veza s ishodom infekcije nije pokazana.

7. Literatura

1. World Health Organization. The world health report 2007: a safer future: global public health security in the 21st century. Posećeno 01.12.2022. god. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43713>
2. Centers for Disease Control and Prevention. International Conference on Emerging Infectious Diseases. 2018. Posećeno 01.12.2022. god. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/iceid/index.html>
3. World Health Organization. A brief guide to emerging infectious diseases and zoonoses. 2014. Posećeno 01.12. 2022. god. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204722>
4. Lindahl JF, Grace D. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infect Ecol Epidemiology*. 2015;5(1):30048.
5. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000;287(5452):443-9.
6. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1411):983-9.
7. Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(12):1842.
8. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-3.
9. van Doorn HR. The epidemiology of emerging infectious diseases and pandemics. *Medicine*. 2021;49(10):659-62.
10. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Posećeno 01.08.2023. god. Dostupno na: <https://covid19.who.int>
11. Centers for Disease Control and Prevention. CDC Museum COVID-19 Timeline. Posećeno 01.12. 2022. god. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html>
12. Kung Y-A, Lee K-M, Chiang H-J, Huang S-Y, Wu C-J, Shih S-R. Molecular Virology of SARS-CoV-2 and Related Coronaviruses. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2022:e00026-21.
13. Viruses CSGotlCoTo. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*. 2020;5(4):536-44.
14. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.
15. Lam TT-Y, Jia N, Zhang Y-W, Shum MH-H, Jiang J-F, Zhu H-C, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020;583(7815):282-5.
16. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou J-J, et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*. 2020;583(7815):286-9.
17. World Health Organization. WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2: China Part. 2021. Posećeno 01.12.2022. god. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>
18. Zhang J, Xiao T, Cai Y, Chen B. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol*. 2021;50:173-82.
19. Zawilska J, Lagodzinski A, Berezinska M. COVID-19: from the structure and replication cycle of SARS-CoV-2 to its disease symptoms and treatment. *J Physiol Pharmacol*. 2021;72(4): 479-501.

20. 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;581(7807):215-20.
21. Finkelstein MT, Mermelstein AG, Parker Miller E, Seth PC, Stancovski E-SD, Fera D. Structural analysis of neutralizing epitopes of the SARS-CoV-2 spike to guide therapy and vaccine design strategies. *Viruses*. 2021;13(1):134.
22. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, Pilgram O, Moulton H, Stein DA, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life sci alliance*. 2020;3(9): e202000786.
23. Hossain MG, Tang Yd, Akter S, Zheng C. Roles of the polybasic furin cleavage site of spike protein in SARS-CoV-2 replication, pathogenesis, and host immune responses and vaccination. *J Med Virol*. 2022;94(5):1815-20.
24. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(10):753-66.
25. Johnson BA, Xie X, Bailey AL, Kalveram B, Lokugamage KG, Muruato A, et al. Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature*. 2021;591(7849):293-9.
26. Cai Y, Zhang J, Xiao T, Peng H, Sterling SM, Walsh Jr RM, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*. 2020;369(6511):1586-92.
27. Benton DJ, Wrobel AG, Xu P, Roustan C, Martin SR, Rosenthal PB, et al. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*. 2020;588(7837):327-30.
28. Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng Z-M. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci*. 2021;11(1):1-17.
29. Lan TC, Allan MF, Malsick LE, Woo JZ, Zhu C, Zhang F, et al. Secondary structural ensembles of the SARS-CoV-2 RNA genome in infected cells. *Nature commu*. 2022;13(1):1-14.
30. Haniff HS, Tong Y, Liu X, Chen JL, Suresh BM, Andrews RJ, et al. Targeting the SARS-CoV-2 RNA genome with small molecule binders and ribonuclease targeting chimera (RIBOTAC) degraders. *ACS Central Science*. 2020;6(10):1713-21.
31. Sun Y, Abriola L, Niederer RO, Pedersen SF, Alfajaro MM, Silva Monteiro V, et al. Restriction of SARS-CoV-2 replication by targeting programmed-1 ribosomal frameshifting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118(26):e2023051118.
32. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis BBA-MOL BASIS DIS*. 2020;1866(10):165878.
33. Koch J, Uckeley ZM, Doldan P, Stanifer M, Boulant S, Lozach PY. TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *EMBO journal*. 2021;40(16):e107821.
34. Kreutzberger AJ, Sanyal A, Saminathan A, Bloyet L-M, Stumpf S, Liu Z, et al. SARS-CoV-2 requires acidic pH to infect cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022;119(38):e2209514119.
35. Ciotti M, Ciccozzi M, Terrinoni A, Jiang W-C, Wang C-B, Bernardini S. The COVID-19 pandemic. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57(6):365-88.
36. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. 2022;375(6585):1122-7.

37. McGill AR, Kahlil R, Dutta R, Green R, Howell M, Mohapatra S, et al. SARS–CoV-2 immuno-pathogenesis and potential for diverse vaccines and therapies: opportunities and challenges. *Infect Dis Rep.* 2021;13(1):102-25.
38. Ramasamy R. Perspective of the relationship between the susceptibility to initial SARS-CoV-2 infectivity and optimal nasal conditioning of inhaled air. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):7919.
39. Zhang S, Wang L, Cheng G. The battle between host and SARS-CoV-2: Innate immunity and viral evasion strategies. *Mol Ther.* 2022.
40. Mohammed RN, Tamjidifar R, Rahman HS, Adili A, Ghoreishizadeh S, Saeedi H, et al. A comprehensive review about immune responses and exhaustion during coronavirus disease (COVID-19). *J Cell Commun Signal.* 2022;20(1):1-10.
41. Bolevich SB, Litvitsky PF, Grachev SV, Vorobyev SI, Orlova AS, Fokina MA, et al. Fundamental basis of COVID-19 pathogenesis. *Serb J Exp Clin.* 2020;21(2):93-111.
42. World Health Organization 2020. Clinical management of COVID-19: interim guidance, 27 May 2020. Posećeno 01.12. 2022. god. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196>
43. Kasuga Y, Zhu B, Jang K-J, Yoo J-S. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. *Exp Mol Med.* 2021;53(5):723-36.
44. Galani I-E, Rovina N, Lampropoulou V, Triantafyllia V, Manioudaki M, Pavlos E, et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat Immunol.* 2021;22(1):32-40.
45. Israelow B, Song E, Mao T, Lu P, Meir A, Liu F, et al. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J Exp Med.* 2020;217(12).
46. Witkowski M, Tizian C, Ferreira-Gomes M, Niemeyer D, Jones TC, Heinrich F, et al. Untimely TGF β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. *Nature.* 2021;600(7888):295-301.
47. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(5):533-5.
48. Qin C, Ziwei MPLZM, Tao SYMY, Ke PCXMP, Shang MMPK. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China; clinical infectious diseases; Oxford academic. *Clin Infect Dis.* 2020.
49. Lin L, Lu L, Cao W, Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerging microbes & infections.* 2020;9(1):727-32.
50. Wan S, Yi Q, Fan S, Lv J, Zhang X, Guo L, et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). *MedRxiv.* 2020.
51. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis.* 2020;221(11):1762-9.
52. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, et al. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes, the severity of which correlate with patient outcome. *MedRxiv.* 2020.

53. Lombardi A, Trombetta E, Cattaneo A, Castelli V, Palomba E, Tirone M, et al. Early phases of COVID-19 are characterized by a reduction in lymphocyte populations and the presence of atypical monocytes. *Front Immunol.* 2020;11:560330.
54. Laing AG, Lorenc A, Del Barrio IDM, Das A, Fish M, Monin L, et al. A consensus Covid-19 immune signature combines immuno-protection with discrete sepsis-like traits associated with poor prognosis. *MedRxiv.* 2020.
55. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann Intern Med.* 2020;172(9):577-82.
56. Wu Y, Kang L, Guo Z, Liu J, Liu M, Liang W. Incubation period of COVID-19 caused by unique SARS-CoV-2 strains: a systematic review and meta-analysis. *JAMA network open.* 2022;5(8):e2228008-e.
57. Asadi S, Bouvier N, Wexler AS, Ristenpart WD. The coronavirus pandemic and aerosols: Does COVID-19 transmit via expiratory particles? Taylor & Francis; 2020. p. 635-8.
58. Yanes-Lane M, Winters N, Fregonese F, Bastos M, Perlman-Arrow S, Campbell JR, et al. Proportion of asymptomatic infection among COVID-19 positive persons and their transmission potential: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2020;15(11):e0241536.
59. Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, Hossmann S, Imeri H, Ipekci AM, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2020;17(9):e1003346.
60. Landete P, Loaiza CAQ, Aldave-Orzaiz B, Muñiz SH, Maldonado A, Zamora E, et al. Clinical features and radiological manifestations of COVID-19 disease. *World Journal of Radiology.* 2020;12(11):247.
61. Al-Rawi NH, Sammouda AR, AlRahin EA, Al Ali FA, Al Arayedh GS, Daryanavard HA, et al. Prevalence of anosmia or ageusia in patients with COVID-19 among United Arab Emirates population. *Int Dent J.* 2022;72(2):249-56.
62. Chary E, Carsuzaa F, Trijolet J-P, Capitaine A-L, Roncato-Saberan M, Fouet K, et al. Prevalence and recovery from olfactory and gustatory dysfunctions in Covid-19 infection: a prospective multicenter study. *American Journal of Rhinology & Allergy.* 2020;34(5):686-93.
63. 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;18(4):844-7.
64. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(6):669-77.
65. Wu JT, Leung K, Bushman M, Kishore N, Niehus R, de Salazar PM, et al. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat Med.* 2020;26(4):506-10.
66. Poletti P, Tirani M, Cereda D, Trentini F, Guzzetta G, Marziano V, et al. Age-specific SARS-CoV-2 infection fatality ratio and associated risk factors, Italy, February to April 2020. *Eurosurveillance.* 2020;25(31):2001383.
67. Mori H, Obinata H, Murakami W, Tatsuya K, Sasaki H, Miyake Y, et al. Comparison of COVID-19 disease between young and elderly patients: Hidden viral shedding of COVID-19. *J Infect Chemother.* 2021;27(1):70-5.

68. Li J, Huang DQ, Zou B, Yang H, Hui WZ, Rui F, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol.* 2021;93(3):1449-58.
69. Pijls BG, Jolani S, Atherley A, Derckx RT, Dijkstra JI, Franssen GH, et al. Demographic risk factors for COVID-19 infection, severity, ICU admission and death: a meta-analysis of 59 studies. *BMJ open.* 2021;11(1):e044640.
70. Meng Y, Wu P, Lu W, Liu K, Ma K, Huang L, et al. Sex-specific clinical characteristics and prognosis of coronavirus disease-19 infection in Wuhan, China: A retrospective study of 168 severe patients. *PLoS Pathog.* 2020;16(4):e1008520.
71. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061-9.
72. Wan S, Xiang Y, Fang W, Zheng Y, Li B, Hu Y, et al. Clinical features and treatment of COVID-19 patients in northeast Chongqing. *J Med Virol.* 2020;92(7):797-806.
73. Guan W-j, Liang W-h, Zhao Y, Liang H-r, Chen Z-s, Li Y-m, et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J.* 2020;55(5).
74. Dadras O, SeyedAlinaghi S, Karimi A, Shamsabadi A, Qaderi K, Ramezani M, et al. COVID-19 mortality and its predictors in the elderly: A systematic review. *Health science reports.* 2022;5(3):e657.
75. Bae S, Kim SR, Kim M-N, Shim WJ, Park S-M. Impact of cardiovascular disease and risk factors on fatal outcomes in patients with COVID-19 according to age: a systematic review and meta-analysis. *Heart.* 2021;107(5):373-80.
76. Simonnet A, Chetboun M, Poissy J, Raverdy V, Noulette J, Duhamel A, et al. High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. *Obesity.* 2020;28(7):1195-9.
77. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33238-43.
78. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87(5):e1-e9.
79. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin–converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(4):177-83.
80. Kowalczyk S, Bröer A, Tietze N, Vanslambrouck JM, Rasko JE, Bröer S. A protein complex in the brush-border membrane explains a Hartnup disorder allele. *The FASEB Journal.* 2008;22(8):2880-7.
81. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260-3.
82. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med.* 2020;14(2):185-92.
83. Zheng M. ACE2 and COVID-19 Susceptibility and Severity. *Aging Dis.* 2022;13(2):360.
84. Sriram K, Insel PA. A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance. *Br J Pharmacol.* 2020;177(21):4825-44.

85. Swärd P, Edsfieldt A, Reepalu A, Jehpsson L, Rosengren BE, Karlsson MK. Age and sex differences in soluble ACE2 may give insights for COVID-19. *Critical care*. 2020;24(1):1-3.
86. Lundström A, Ziegler L, Havervall S, Rudberg AS, Von Meijenfeldt F, Lisman T, et al. Soluble angiotensin-converting enzyme 2 is transiently elevated in COVID-19 and correlates with specific inflammatory and endothelial markers. *J Med Virol*. 2021;93(10):5908-16.
87. Leow MKS. Clarifying the controversial risk-benefit profile of soluble ACE2 in COVID-19. *Critical Care*. 2020;24(1):1-2.
88. Mourad J-J, Levy BI. Interaction between RAAS inhibitors and ACE2 in the context of COVID-19. *Nature Reviews Cardiology*. 2020;17(5):313-.
89. Muus C, Luecken MD, Eraslan G, Sikkema L, Waghray A, Heimberg G, et al. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med*. 2021;27(3):546-59.
90. Chen J, Jiang Q, Xia X, Liu K, Yu Z, Tao W, et al. Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation. *Aging Cell*. 2020;19(7).
91. Smith JC, Sausville EL, Girish V, Yuan ML, Vasudevan A, John KM, et al. Cigarette smoke exposure and inflammatory signaling increase the expression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 in the respiratory tract. *Dev Cell*. 2020;53(5):514-29. e3.
92. Furuhashi M, Moniwa N, Mita T, Fuseya T, Ishimura S, Ohno K, et al. Urinary angiotensin-converting enzyme 2 in hypertensive patients may be increased by olmesartan, an angiotensin II receptor blocker. *Am J Hypertens*. 2015;28(1):15-21.
93. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *The lancet respiratory medicine*. 2020;8(4):e21.
94. Kumar S, Nikravesh M, Chukwuemeka U, Randazzo M, Flores P, Choday P, et al. Safety of ACEi and ARB in COVID-19 management: A retrospective analysis. *Clin Cardiol*. 2022.
95. Ma Z, Wang M-P, Liu L, Yu S, Wu T-R, Zhao L, et al. Does taking an angiotensin inhibitor increase the risk for COVID-19?—a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany N Y)*. 2021;13(8):10853.
96. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*. 2003;4(1):69-77.
97. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*. 2003;4(1):63-8.
98. Hemann EA, Gale Jr M, Savan R. Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control. *Front Immunol*. 2017;8:1707.
99. Egli A, Santer DM, O'Shea D, Tyrrell DL, Houghton M. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerging microbes & infections*. 2014;3(1):1-12.
100. Hamming OJ, Terczyńska-Dyla E, Vieyres G, Dijkman R, Jørgensen SE, Akhtar H, et al. Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *The EMBO journal*. 2013;32(23):3055-65.
101. Li M, Liu X, Zhou Y, Su SB. Interferon- λ s: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol*. 2009;86(1):23-32.

102. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, et al. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7576-81.
103. Hermant P, Michiels T. Interferon- λ in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *J Innate Immun.* 2014;6(5):563-74.
104. Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and λ interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):796-805.
105. Sirén J, Pirhonen J, Julkunen I, Matikainen S. IFN- α regulates TLR-dependent gene expression of IFN- α , IFN- β , IL-28, and IL-29. *J Immunol.* 2005;174(4):1932-7.
106. Mennechet FJ, Uzé G. Interferon- λ -treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. *Blood.* 2006;107(11):4417-23.
107. Griffiths SJ, Dunningan CM, Russell CD, Haas JG. The role of interferon- λ locus polymorphisms in hepatitis C and other infectious diseases. *J Innate Immun.* 2015;7(3):231-42.
108. Jewell NA, Cline T, Mertz SE, Smirnov SV, Flaño E, Schindler C, et al. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J Virol.* 2010;84(21):11515-22.
109. Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, Falcone V, et al. Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *J Virol.* 2010;84(11):5670-7.
110. Felgenhauer U, Schoen A, Gad HH, Hartmann R, Schaubmar AR, Failing K, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 by type I and type III interferons. *J Biol Chem.* 2020;295(41):13958-64.
111. Dinnon KH, Leist SR, Schäfer A, Edwards CE, Martinez DR, Montgomery SA, et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature.* 2020;586(7830):560-6.
112. Jhuti D, Rawat A, Guo CM, Wilson LA, Mills EJ, Forrest JI. Interferon Treatments for SARS-CoV-2: Challenges and Opportunities. *Infectious Diseases and Therapy.* 2022:1-20.
113. Fukuda Y, Homma T, Inoue H, Onitsuka C, Ikeda H, Goto Y, et al. Downregulation of type III interferons in patients with severe COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93(7):4559-63.
114. Scagnolari C, Pierangeli A, Frasca F, Bitossi C, Viscido A, Oliveto G, et al. Differential induction of type I and III interferon genes in the upper respiratory tract of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Virus Res.* 2021;295:198283.
115. Sposito B, Broggi A, Pandolfi L, Crotta S, Clementi N, Ferrarese R, et al. The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19. *Cell.* 2021;184(19):4953-68. e16.
116. Ozturk M, Egamberdieva D, Pešić M. *Biodiversity and Biomedicine: Our Future: Academic Press; 2020.*
117. The International HapMap Consortium. The international HapMap project: The international HapMap consortium. *Nature.* 2003;426:789-96.
118. Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J.* 1954;1(4857):290.
119. Sørensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med.* 1988;318(12):727-32.

120. Loeb M. Host genomics in infectious diseases. *Infection & chemotherapy*. 2013;45(3):253-9.
121. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(3):175-88.
122. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461(7262):399-401.
123. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5 Δ 32/ Δ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019;568(7751):244-8.
124. Yousefzadegan S, Rezaei N. Case report: death due to COVID-19 in three brothers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2020;102(6):1203.
125. Williams FM, Freidin MB, Mangino M, Couvreur S, Visconti A, Bowyer RC, et al. Self-reported symptoms of COVID-19, including symptoms most predictive of SARS-CoV-2 infection, are heritable. *Twin research and human genetics*. 2020;23(6):316-21.
126. Murray MF, Kenny EE, Ritchie MD, Rader DJ, Bale AE, Giovanni MA, et al. COVID-19 outcomes and the human genome. *Genet Med*. 2020;22(7):1175-7.
127. The COVID-19 Host Genetics Initiative. A global initiative to elucidate the role of host genetic factors in susceptibility and severity of the SARS-CoV-2 virus pandemic. *Eur J Hum Genet*. 2020;28(6):715-8.
128. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature*. 2021;591(7848):92-8.
129. Zhang Q, Bastard P, Cobat A, Casanova JL. Human genetic and immunological determinants of critical COVID-19 pneumonia. *Nature*. 2022;603(7902):587-98.
130. Dieter C, Brondani Lda, Leitão CB, Gerchman F, Lemos NE, Crispim D. Genetic polymorphisms associated with susceptibility to COVID-19 disease and severity: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2022;17(7):e0270627.
131. Rehman SU, Tabish M. Alternative splicing of ACE2 possibly generates variants that may limit the entry of SARS-CoV-2: a potential therapeutic approach using SSOs. *Clin Sci*. 2020;134(10):1143-50.
132. Spolarics Z, Peña G, Qin Y, Donnelly RJ, Livingston DH. Inherent X-linked genetic variability and cellular mosaicism unique to females contribute to sex-related differences in the innate immune response. *Front Immunol*. 2017;8:1455.
133. Ragia G, Manolopoulos VG. Assessing COVID-19 susceptibility through analysis of the genetic and epigenetic diversity of ACE2-mediated SARS-CoV-2 entry. *Pharmacogenomics*. 2020;21(18):1311-29.
134. Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *The EMBO journal*. 2005;24(8):1634-43.
135. Chen Y, Liu L, Wei Q, Zhu H, Jiang H, Tu X, et al. Rhesus angiotensin converting enzyme 2 supports entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus in Chinese macaques. *Virology*. 2008;381(1):89-97.
136. Benetti E, Tita R, Spiga O, Ciolfi A, Birolo G, Bruselles A, et al. ACE2 gene variants may underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in the Italian population. *Eur J Hum Genet*. 2020;28(11):1602-14.

137. Cao Y, Li L, Feng Z, Wan S, Huang P, Sun X, et al. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell discovery*. 2020;6(1):1-4.
138. Hussain M, Jabeen N, Raza F, Shabbir S, Baig AA, Amanullah A, et al. Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. *J Med Virol*. 2020;92(9):1580-6.
139. Li Q, Cao Z, Rahman P. Genetic variability of human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) among various ethnic populations. *Mol Genet Genomic Med*. 2020;8(8):e1344.
140. Suryamohan K, Diwanji D, Stawiski EW, Gupta R, Miersch S, Liu J, et al. Human ACE2 receptor polymorphisms and altered susceptibility to SARS-CoV-2. *Commun Biol*. 2021;4(1):1-11.
141. Luo Y, Liu C, Guan T, Li Y, Lai Y, Li F, et al. Association of ACE2 genetic polymorphisms with hypertension-related target organ damages in south Xinjiang. *Hypertens Res*. 2019;42(5):681-9.
142. Malard L, Kakinami L, O'Loughlin J, Roy-Gagnon M-H, Labbe A, Pilote L, et al. The association between the angiotensin-converting enzyme-2 gene and blood pressure in a cohort study of adolescents. *BMC Med Genet*. 2013;14(1):1-7.
143. Fröjdö S, Sjölin L, Parkkonen M, Mäkinen V-P, Kilpikari R, Pettersson-Fernholm K, et al. Polymorphisms in the gene encoding angiotensin I converting enzyme 2 and diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2005;48(11):2278-81.
144. Currie D, McKnight A, Patterson C, Sadlier D, Maxwell A, Group UWGS. Investigation of ACE, ACE2 and AGTR1 genes for association with nephropathy in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2010;27(10):1188-94.
145. Liu C, Li Y, Guan T, Lai Y, Shen Y, Zeyaweiding A, et al. ACE2 polymorphisms associated with cardiovascular risk in Uyghurs with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):1-11.
146. Lieb W, Graf J, Götz A, König IR, Mayer B, Fischer M, et al. Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. *J Mol Med*. 2006;84(1):88-96.
147. Chen Y, Liu D, Zhang P, Zhong J, Zhang C, Wu S, et al. Impact of ACE2 gene polymorphism on antihypertensive efficacy of ACE inhibitors. *J Hum Hypertens*. 2016;30(12):766-71.
148. Hamet P, Pausova Z, Attaoua R, Hishmih C, Haloui M, Shin J, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Gene Is Associated with Hypertension and Severity of COVID 19: Interaction with Sex, Obesity, and Smoking. *Am J Hypertens*. 2021;34(4):367-76.
149. Chen Y, Zhang P, Zhou X, Liu D, Zhong J, Zhang C, et al. Relationship between genetic variants of ACE 2 gene and circulating levels of ACE 2 and its metabolites. *J Clin Pharm Ther*. 2018;43(2):189-95.
150. Liu D, Chen Y, Zhang P, Zhong J, Jin L, Zhang C, et al. Association between circulating levels of ACE2-Ang-(1-7)-MAS axis and ACE2 gene polymorphisms in hypertensive patients. *Medicine*. 2016;95(24): e3876.
151. Luo Y-S, Luo L, Li W, Chen Y, Wu G-F, Chen F, et al. Evaluation of a functional single nucleotide polymorphism of SARS-CoV-2 receptor ACE2 that is potentially involved in long COVID. *Front Genet*. 2022;18(13):931562.
152. Sabater Molina M, Nicolás Rocamora E, Bendicho AI, Vázquez EG, Zorio E, Rodriguez FD, et al. Polymorphisms in ACE, ACE2, AGTR1 genes and severity of COVID-19 disease. *PLoS One*. 2022;17(2):e0263140.

153. Karakaş Çelik S, Çakmak Genç G, Pişkin N, Açıkgöz B, Altınsoy B, Kurucu İşsiz B, et al. Polymorphisms of ACE (I/D) and ACE2 receptor gene (Rs2106809, Rs2285666) are not related to the clinical course of COVID-19: a case study. *J Med Virol.* 2021;93(10):5947-52.
154. Ma Y, Li Q, Chen J, Liu S, Liu S, He X, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 SNPs as Common Genetic Loci and Optimal Early Identification Genetic Markers for COVID-19. *Pathogens.* 2022;11(8):947.
155. Cafiero C, Rosapepe F, Palmirotta R, Re A, Ottaiano MP, Benincasa G, et al. Angiotensin system polymorphisms' in SARS-CoV-2 positive patients: assessment between symptomatic and asymptomatic patients: a pilot study. *Pharmgenomics Pers Med.* 2021;14:621.
156. Sienko J, Marczak I, Kotowski M, Bogacz A, Tejchman K, Sienko M, Kotfis K. Association of ACE2 Gene Variants with the Severity of COVID-19 Disease-A Prospective Observational Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(19):12622.
157. Martínez-Gómez LE, Herrera-López B, Martínez-Armenta C, Ortega-Peña S, Camacho-Rea MdC, Suarez-Ahedo C, et al. ACE and ACE2 Gene Variants Are Associated With Severe Outcomes of COVID-19 in Men. *Front Immunol.* 2022;13:812940.
158. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet.* 2013;45(2):164-71.
159. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet.* 2009;41(10):1105-9.
160. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet.* 2009;41(10):1100-4.
161. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology.* 2010;138(4):1338-45. e7.
162. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'hUigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009;461(7265):798-801.
163. Gauthiez E, Habfast-Robertson I, Rüeger S, Kutalik Z, Aubert V, Berg T, et al. A systematic review and meta-analysis of HCV clearance. *Liver international.* 2017;37(10):1431-45.
164. Sharafi H, Alavian SM, Behnava B, Pouryasın A, Keshvari M. The impact of IFNL4 rs12979860 polymorphism on spontaneous clearance of hepatitis C; a case-control study. *Hepat Mon.* 2014; 14(10):e22649.
165. Stättermayer A, Strassl R, Maieron A, Rutter K, Stauber R, Strasser M, et al. Polymorphisms of interferon- λ 4 and IL28B—effects on treatment response to interferon/ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(1):104-11.
166. Meissner EG, Bon D, Prokunina-Olsson L, Tang W, Masur H, O'Brien TR, et al. IFNL4- Δ G genotype is associated with slower viral clearance in hepatitis C, genotype-1 patients treated with sofosbuvir and ribavirin. *J Infect Dis.* 2014;209(11):1700-4.
167. Fang MZ, Jackson SS, O'Brien TR. IFNL4: notable variants and associated phenotypes. *Gene.* 2020;730:144289.

168. Chihab H, Badre W, Tahiri M, Jadid F-Z, Zaidane I, Elfihry R, et al. IFNL4 rs12979860 polymorphism influences HBV DNA viral loads but not the outcome of HBV infection in Moroccan patients. *Microb Infect.* 2021;23(4-5):104802.
169. NCBI. dbSNP: rs1297860. Posećeno 01. 12. 2022. god. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12979860>
170. NCBI. dbSNP: rs8099917. Posećeno 01. 12. 2022. god. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs8099917>
171. Ensembl. rs8099917. Posećeno 01. 12. 2022. god. Dostupno na: <https://www.ensembl.org/>
172. Pharmgkb. rs8099917. Posećeno 01. 12. 2022. god. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/variant/PA166155435>
173. Rahimi P, Tarharoudi R, Rahimpour A, Mosayebi Amroabadi J, Ahmadi I, Anvari E, et al. The association between interferon lambda 3 and 4 gene single-nucleotide polymorphisms and the recovery of COVID-19 patients. *Virol J.* 2021;18(1):1-7.
174. Silva AMVd, Alvarado-Arnez LE, Azamor T, Batista-Silva LR, Leal-Calvo T, Bezerra OCdL, et al. Interferon-lambda 3 and 4 Polymorphisms Increase Sustained Virological Responses and Regulate Innate Immunity in Antiviral Therapy With Pegylated Interferon-Alpha. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2021;11:656393.
175. Griffiths SJ, Koegl M, Boutell C, Zenner HL, Crump CM, Pica F, et al. A systematic analysis of host factors reveals a Med23-interferon- λ regulatory axis against herpes simplex virus type 1 replication. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003514.
176. Bibert S, Wojtowicz A, Taffé P, Manuel O, Bernasconi E, Furrer H, et al. The IFNL3/4 Δ G variant increases susceptibility to cytomegalovirus retinitis among HIV-infected patients. *AIDS.* 2014;28(13):1885-9.
177. Lang Kuhs KA, Kuniholm MH, Pfeiffer RM, Chen S, Desai S, Edlin BR, et al. Interferon lambda 4 genotype is not associated with recurrence of oral or genital herpes. *PLoS One.* 2015;10(10):e0138827.
178. Egli A, Levin A, Santer DM, Joyce M, O'Shea D, Thomas BS, et al. Immunomodulatory function of interleukin 28B during primary infection with cytomegalovirus. *J Infect Dis.* 2014;210(5):717-27.
179. Real LM, Herrero R, Rivero-Juárez A, Camacho Á, Macías J, Vic S, et al. IFNL4 rs368234815 polymorphism is associated with innate resistance to HIV-1 infection. *AIDS.* 2015;29(14):1895-7.
180. Machmach K, Abad-Molina C, Romero-Sánchez MC, Abad MA, Ferrando-Martínez S, Genebat M, et al. IL28B single-nucleotide polymorphism rs12979860 is associated with spontaneous HIV control in white subjects. *J Infect Dis.* 2013;207(4):651-5.
181. Sajadi MM, Shakeri N, Talwani R, Howell CD, Pakyz R, Redfield RR, et al. IL28B genotype does not correlate with HIV control in African Americans. *Clin Transl Sci.* 2011;4(4):282-4.
182. Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, Hussain SK, Kirk GD, Keith Hoots W, et al. IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. *J Infect Dis.* 2010;202(11):1749-53.
183. Safaeian M, Hildesheim A, Gonzalez P, Yu K, Porras C, Li Q, et al. Single nucleotide polymorphisms in the PRDX3 and RPS19 and risk of HPV persistence and cervical precancer/cancer. *PLoS One.* 2012;7(4):e33619.
184. Assone T, Souza FVd, Gaester KO, Fonseca LAM, Luiz OdC, Malta F, et al. IL28B gene polymorphism SNP rs8099917 genotype GG is associated with HTLV-1-associated

- myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 carriers. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9):e3199.
185. Angulo J, Pino K, Echeverría-Chagas N, Marco C, Martínez-Valdebenito C, Galeno H, et al. Association of Single-Nucleotide polymorphisms in IL28B, but not TNF- α , with severity of disease caused by andes virus. *Clin Infect Dis.* 2015;61(12):e62-e9.
186. Scagnolari C, Midulla F, Riva E, Monteleone K, Solimini A, Bonci E, et al. Evaluation of interleukin 28B single nucleotide polymorphisms in infants suffering from bronchiolitis. *Virus Res.* 2012;165(2):236-40.
187. Astudillo P, Angulo J, Pino K, de Carvalho JB, de Moraes GL, Perez S, et al. Correlation between female sex, IL28B genotype, and the clinical severity of bronchiolitis in pediatric patients. *Pediatr Res.* 2020;87(4):785-95.
188. Vafaei S, Razmi M, Mansoori M, Asadi-Lari M, Madjd Z. Spotlight of Remdesivir in comparison with ribavirin, Favipiravir, Oseltamivir and Umifenovir in coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3569866>
189. Grimaudo S, Amodio E, Pipitone RM, Maida CM, Pizzo S, Prestileo T, et al. PNPLA3 and TLL-1 polymorphisms as potential predictors of disease severity in patients with COVID-19. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:627914.
190. Saponi-Cortes JMR, Rivas MD, Calle-Alonso F, Sanchez JF, Costo A, Martin C, et al. IFNL4 genetic variant can predispose to COVID-19. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-4.
191. Agwa SH, Kamel MM, Elghazaly H, Abd Elsamee AM, Hafez H, Girgis SA, et al. Association between interferon-lambda-3 rs12979860, tll1 rs17047200 and ddr1 rs4618569 variant polymorphisms with the course and outcome of SARS-CoV-2 patients. *Genes.* 2021;12(6):830.
192. Sorrentino L, Silvestri V, Oliveto G, Scordio M, Frasca F, Fracella M, et al. Distribution of Interferon Lambda 4 Single Nucleotide Polymorphism rs11322783 Genotypes in Patients with COVID-19. *Microorganisms.* 2022;10(2):363.
193. Vitošević K, Todorović M, Varljen T, Slović Ž, Matić S, Todorović D. Effect of formalin fixation on pcr amplification of DNA isolated from healthy autopsy tissues. *Acta Histochem.* 2018;120(8):780-788.
194. de Seixas Santos NASTRI AC, de Mello Malta F, Diniz MA, Yoshino A, Abe-Sandes K, Dos Santos SEB, et al. Association of IFNL3 and IFNL4 polymorphisms with hepatitis C virus infection in a population from southeastern Brazil. *Arch Virol.* 2016;161(6):1477-84.
195. Graffelman J, Weir B. Testing for Hardy–Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome. *Heredity (Edinb).* 2016;116(6):558-68.
196. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10(3):564-7.
197. Bush WS, Chen G, Torstenson ES, Ritchie MD. LD-spline: mapping SNPs on genotyping platforms to genomic regions using patterns of linkage disequilibrium. *BioData Min.* 2009;2(1):1-14.
198. McFarland AP, Horner SM, Jarret A, Joslyn RC, Bindewald E, Shapiro BA, et al. The favorable IFNL3 genotype escapes mRNA decay mediated by AU-rich elements and hepatitis C virus-induced microRNAs. *Nat Immunol.* 2014;15(1):72-9.
199. Zheng KI, Feng G, Liu WY, Targher G, Byrne CD, Zheng MH. Extrapulmonary complications of COVID-19: A multisystem disease? *J Med Virol.* 2021;93(1):323-35.

200. Bastug A, Bodur H, Erdogan S, Gokcinar D, Kazancioglu S, Kosovali BD, et al. Clinical and laboratory features of COVID-19: Predictors of severe prognosis. *Int Immunopharmacol.* 2020;88:106950.
201. Lei F, Liu YM, Zhou F, Qin JJ, Zhang P, Zhu L, et al. Longitudinal association between markers of liver injury and mortality in COVID-19 in China. *Hepatology.* 2020;72(2):389-98.
202. Wang D, Yin Y, Hu C, Liu X, Zhang X, Zhou S, et al. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China. *Critical care.* 2020;24(1):1-9.
203. Ahmed J, Avendaño Capriles CA, Avendaño Capriles NM, Mehta SM, Khan N, Tariq S, et al. The Impact of Charlson Comorbidity Index on Mortality From SARS-CoV-2 Virus Infection. *Cureus.* 2021;13(11):e19937.
204. Salaffi F, Carotti M, Di Carlo M, Ceccarelli L, Galli M, Sarzi-Puttini P, et al. Predicting severe/critical outcomes in patients with SARS-CoV2 pneumonia: Development of the prediction severe/critical outcome in COVID-19 (CRITIC) model. *Front Med.* 2021;8:695195.
205. 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.
206. Statsenko Y, Al Zahmi F, Habuza T, Almansoori TM, Smetanina D, Simiyu GL, et al. Impact of age and sex on COVID-19 severity assessed from radiologic and clinical findings. *Front cell infect microbiol.* 2022; 11:777070.
207. Fang L, Xie H, Liu L, Lu S, Lv F, Zhou J, et al. Early predictors and screening tool developing for severe patients with COVID-19. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):1-8.
208. Mudatsir M, Fajar JK, Wulandari L, Soegiarto G, Ilmawan M, Purnamasari Y, et al. Predictors of COVID-19 severity: a systematic review and meta-analysis. *F1000Research.* 2020;9:1107.
209. Guan W-j, Ni Z-y, Hu Y, Liang W-h, Ou C-q, He J-x, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708-20.
210. Jin Y-H, Cai L, Cheng Z-S, Cheng H, Deng T, Fan Y-P, et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Mil Med Res.* 2020;7(1):1-23.
211. Rubin GD, Ryerson CJ, Haramati LB, Sverzellati N, Kanne JP, Raof S, et al. The role of chest imaging in patient management during the COVID-19 pandemic: a multinational consensus statement from the Fleischner Society. *Radiology.* 2020;296(1):172-80.
212. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). 2020.
213. Balbi M, Caroli A, Corsi A, Milanese G, Surace A, Di Marco F, et al. Chest X-ray for predicting mortality and the need for ventilatory support in COVID-19 patients presenting to the emergency department. *Eur Radiol.* 2021;31:1999-2012.
214. Felipe DP, Campos MR, Espinosa JSM, Rubio YM, Quan JF, Revilla MC. Initial findings in chest X-rays as predictors of worsening lung infection in patients with COVID-19: correlation in 265 patients. *Radiología.* 2021;63(4):324-33.
215. Pouladi N, Abdolahi S. Investigating the ACE2 polymorphisms in COVID-19 susceptibility: An in silico analysis. *Mol Genet Genomic Med.* 2021;9(6):e1672.

216. Huang G, Liang Q, Wang Y, Qin L, Yang H, Lin L, et al. Association of ACE2 gene functional variants with gestational diabetes mellitus risk in a southern Chinese population. *Front Endocrinol.* 2022;13:1052906.
217. NCBI. dbSNP: rs2106809. Posećeno 06. 06. 2023. god. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2106809>
218. NCBI. dbSNP: rs2074192 Posećeno 06. 06. 2023. god. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2074192>
219. Namipashaki A, Razaghi-Moghadam Z, Ansari-Pour N. The essentiality of reporting Hardy-Weinberg equilibrium calculations in population-based genetic association studies. *Cell Journal.* 2015;17(2):187.
220. Oudit GY, Wang K, Viveiros A, Kellner MJ, Penninger JM. Angiotensin Converting Enzyme 2-at the Heart of the COVID-19 pandemic. *Cell.* 2023;186(5):906-922.
221. Pinto BG, Oliveira AE, Singh Y, Jimenez L, Gonçalves AN, Ogava RL, et al. ACE2 expression is increased in the lungs of patients with comorbidities associated with severe COVID-19. *J Infect Dis.* 2020;222(4):556-63.
222. Liu Y, Yan L-M, Wan L, Xiang T-X, Le A, Liu J-M, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet infectious diseases.* 2020;20(6):656-7.
223. Nikiforuk AM, Kuchinski KS, Twa DD, Lukac CD, Sbihi H, Basham CA, et al. The contrasting role of nasopharyngeal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) transcription in SARS-CoV-2 infection: A cross-sectional study of people tested for COVID-19 in British Columbia, Canada. *EBioMedicine.* 2021;66.
224. Liu J, Li Y, Liu Q, Yao Q, Wang X, Zhang H, et al. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. *Cell discovery.* 2021;7(1):17.
225. Koka V, Huang XR, Chung AC, Wang W, Truong LD, Lan HY. Angiotensin II up-regulates angiotensin I-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAP kinase pathway. *Am . Pathol.* 2008;172(5):1174-83.
226. Hirano T, Murakami M. COVID-19: a new virus, but a familiar receptor and cytokine release syndrome. *Immunity.* 2020;52(5):731-3.
227. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* 2005;436(7047):112-6.
228. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* 2005;11(8):875-9.
229. Rey-Parra G, Vadivel A, Coltan L, Hall A, Eaton F, Schuster M, et al. Angiotensin converting enzyme 2 abrogates bleomycin-induced lung injury. *J Mol Med.* 2012;90:637-47.
230. Kuba K, Imai Y, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Trilogy of ACE2: A peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol Ther.* 2010;128(1):119-28.
231. Trembl B, Neu N, Kleinsasser A, Gritsch C, Finsterwalder T, Geiger R, et al. Recombinant angiotensin-converting enzyme 2 improves pulmonary blood flow and oxygenation in lipopolysaccharide-induced lung injury in piglets. *Crit Care Med.* 2010;38(2):596-601.
232. Miesbach W. Pathological role of angiotensin II in severe COVID-19. *TH open.* 2020;4(02):e138-e44.
233. Augustine R, Abhilash S, Nayeem A, Salam SA, Augustine P, Dan P, et al. Increased complications of COVID-19 in people with cardiovascular disease: Role of the renin-

- angiotensin-aldosterone system (RAAS) dysregulation. *Chem Biol Interact.* 2022;351:109738.
234. Osman IO, Melenotte C, Brouqui P, Million M, Lagier J-C, Parola P, et al. Expression of ACE2, soluble ACE2, angiotensin I, angiotensin II and angiotensin-(1-7) is modulated in COVID-19 patients. *Front Immunol.* 2021;12:625732.
235. Gupta K, Kaur G, Pathak T, Banerjee I. Systematic review and meta-analysis of human genetic variants contributing to COVID-19 susceptibility and severity. *Gene.* 2022:146790.
236. Jin J-M, Bai P, He W, Wu F, Liu X-F, Han D-M, et al. Gender differences in patients with COVID-19: focus on severity and mortality. *Frontiers in public health.* 2020:152.
237. Alkhouli M, Nanjundappa A, Annie F, Bates MC, Bhatt DL, editors. Sex differences in case fatality rate of COVID-19: insights from a multinational registry. *Mayo Clin Proc;* 2020; 95(8):1613-1620.
238. Vahidy FS, Pan AP, Ahnstedt H, Munshi Y, Choi HA, Tiruneh Y, et al. Sex differences in susceptibility, severity, and outcomes of coronavirus disease 2019: Cross-sectional analysis from a diverse US metropolitan area. *PLoS One.* 2021;16(1):e0245556.
239. Global health 5050. COVID-19 sex-disaggregated data tracker 2022. Posećeno 06. 06. 2023. god. Dostupno na: <https://globalhealth5050.org/the-sex-gender-and-covid-19-project/dataset/>
240. Bechmann N, Barthel A, Schedl A, Herzig S, Varga Z, Gebhard C, et al. Sexual dimorphism in COVID-19: potential clinical and public health implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2022;10(3):221-30.
241. Bukowska A, Spiller L, Wolke C, Lendeckel U, Weinert S, Hoffmann J, et al. Protective regulation of the ACE2/ACE gene expression by estrogen in human atrial tissue from elderly men. *Exp Biol Med.* 2017;242(14):1412-23.
242. Yang P, Gu H, Zhao Z, Wang W, Cao B, Lai C, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) mediates influenza H7N9 virus-induced acute lung injury. *Sci Rep.* 2014;4(1):7027.
243. Lorenzen I, Lokau J, Korpys Y, Oldefest M, Flynn CM, Künzel U, et al. Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Sci Rep.* 2016;6(1):35067.
244. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, et al. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem.* 2005;280(34):30113-9.
245. Palau V, Riera M, Soler MJ. ADAM17 inhibition may exert a protective effect on COVID-19. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2020;35(6):1071-2.
246. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong J-C, Turner AJ, et al. Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. *Circ Res.* 2020;126(10):1456-74.
247. Jia HP, Look DC, Tan P, Shi L, Hickey M, Gakhar L, et al. Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2009;297(1):L84-L96.
248. Zlacka J, Stebelova K, Zeman M, Herichova I. Interactions of renin-angiotensin system and COVID-19: the importance of daily rhythms in ACE2, ADAM17 and TMPRSS2 expression. *Physiol Res.* 2021;70:S177.

249. Reindl-Schwaighofer R, Hödlmoser S, Eskandary F, Poglitsch M, Bonderman D, Strassl R, et al. ACE2 elevation in severe COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021;203(9):1191-6.
250. Kaur G, Yogeswaran S, Muthumalage T, Rahman I. Persistently increased systemic ACE2 activity is associated with an increased inflammatory response in smokers with COVID-19. *Front Physiol.* 2021;12:653045.
251. Fagyas M, Fejes Z, Sütő R, Nagy Z, Székely B, Pócsi M, et al. Circulating ACE2 activity predicts mortality and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *Int J Infect Dis.* 2022;115:8-16.
252. Kragstrup TW, Singh HS, Grundberg I, Nielsen AL-L, Rivellesse F, Mehta A, et al. Plasma ACE2 predicts outcome of COVID-19 in hospitalized patients. *PLoS One.* 2021;16(6):e0252799.
253. Mariappan V, Ranganadin P, Shanmugam L, Rao S, Pillai AB. Early shedding of membrane-bounded ACE2 could be an indicator for disease severity in SARS-CoV-2. *Biochimie.* 2022;201:139-47.
254. Patel SK, Juno JA, Lee WS, Wragg KM, Hogarth PM, Kent SJ, et al. Plasma ACE2 activity is persistently elevated following SARS-CoV-2 infection: implications for COVID-19 pathogenesis and consequences. *Eur Respir J.* 2021;57(5).
255. Rieder M, Wirth L, Pollmeier L, Jeserich M, Goller I, Baldus N, et al. Serum ACE2, angiotensin II, and aldosterone levels are unchanged in patients with COVID-19. *Am J Hypertens.* 2021;34(3):278-81.
256. Rojas M, Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Ramírez-Santana C, Anaya J-M. How important is the assessment of soluble ACE-2 in COVID-19? *Am J Hypertens.* 2021;34(3):296-7.
257. Monteil V, Kwon H, Prado P, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. *Cell.* 2020;181(4):905-13. e7.
258. Yeung ML, Teng JLL, Jia L, Zhang C, Huang C, Cai J-P, et al. Soluble ACE2-mediated cell entry of SARS-CoV-2 via interaction with proteins related to the renin-angiotensin system. *Cell.* 2021;184(8):2212-28. e12.
259. Key FM, Peter B, Dennis MY, Huerta-Sánchez E, Tang W, Prokunina-Olsson L, et al. Selection on a variant associated with improved viral clearance drives local, adaptive pseudogenization of interferon lambda 4 (IFNL4). *PLoS Genet.* 2014;10(10):e1004681.
260. Fischer J, Böhm S, Scholz M, Müller T, Witt H, George J, et al. Combined effects of different interleukin-28B gene variants on the outcome of dual combination therapy in chronic hepatitis C virus type 1 infection. *Hepatology.* 2012;55(6):1700-10.
261. Shi X, Pan Y, Wang M, Wang D, Li W, Jiang T, et al. IL28B genetic variation is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus, treatment response, serum IL-28B levels in Chinese population. *PLoS One.* 2012;7(5):e37054.
262. Pérez-García F, Jiménez-Sousa MÁ, Soria S, Jorge-Monjas P, Fernández-Rodríguez A, Gómez-Sánchez E, et al. IFNL3 rs12980275 Polymorphism Predicts Septic Shock-Related Death in Patients Undergoing Major Surgery: A Retrospective Study. *Frontiers in Medicine.* 2020;7:186.
263. Grzegorzewska A, Marcinkowski W, Warchoń W, Mostowska A, Jagodziński PP. Interferon- λ 3 Gene Polymorphic Variants, rs4803217 and rs12980275, Responsiveness to HBV Vaccine and Outcome of HBV and HCV Exposure in Hemodialyzed Patients. *Hepat Mon.* 2021;21(3).

264. Ying S-Y, Hu Y-R, Gao G-S, Lou K-H, Huang Z. Interleukin-28B polymorphisms predict the efficacy of peginterferon alpha in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Frontiers in Medicine*. 2021;8:691365.
265. Amodio E, Pipitone RM, Grimaudo S, Immordino P, Maida CM, Prestileo T, et al. SARS-CoV-2 viral load, IFN λ polymorphisms and the course of COVID-19: an observational study. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(10):3315.
266. Jordović J, Simonović-Babić J, Gašić V, Kotur N, Zukić B, Pavlović S, et al. IL-28B genotypes as predictors of long-term outcome in patients with hepatitis C-related severe liver injury. *J Infect Dev Ctries*. 2019;13(6):526-35.
267. Lazarevic I, Djordjevic J, Cupic M, Karalic D, Delic D, Svirtlih N, et al. The influence of single and combined IL28B polymorphisms on response to treatment of chronic hepatitis C. *J Clin Virol*. 2013;58(1):254-7.
268. National Institut of Health. LD link: LDpop Tool. Posećeno 06. 06. 2023. god. Dostupno na: <https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=ldpop>
269. Nikolaeva LI, Saprnov GV, Dyachenko VV, Glagoleva NM, Shevchenko NG, Samokhvalova EG, et al. Interferon-lambda 3 is involved in the permission of pneumonia development after infection with respiratory viruses including SARS-CoV-2. *International Medicine*. 2021:4-9.
270. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*. 2019;50(4):907-23.
271. Stanifer ML, Guo C, Doldan P, Boulant S. Importance of type I and III interferons at respiratory and intestinal barrier surfaces. *Front Immunol*. 2020;11:608645.
272. Andreakos E, Zanoni I, Galani IE. Lambda interferons come to light: dual function cytokines mediating antiviral immunity and damage control. *Curr Opin Immunol*. 2019;56:67-75.
273. Fan W, Xie S, Zhao X, Li N, Chang C, Yu G, et al. IFN- λ 4 desensitizes the response to IFN- α treatment in chronic hepatitis C through long-term induction of USP18. *J Gen Virol*. 2016;97.
274. Obajemu AA, Rao N, Dilley KA, Vargas JM, Sheikh F, Donnelly RP, et al. IFN- λ 4 attenuates antiviral responses by enhancing negative regulation of IFN signaling. *The Journal of Immunology*. 2017;199(11):3808-20.
275. Yu D, Zhao M, Dong L, Zhao L, Zou M, Sun H, et al. Design and evaluation of novel interferon lambda analogs with enhanced antiviral activity and improved drug attributes. *Drug Des Devel Ther*. 2016:163-82.
276. Weber F. Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2007;13(36):4818.
277. Kim Y-M, Shin E-C. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp Mol Med*. 2021;53(5):750-60.
278. World Health Organisation. Global tuberculosis report 2017. Geneva. Posećeno 06. 06. 2023. god. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259366>
279. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):626-38.
280. Schurz H, Salie M, Tromp G, Hoal EG, Kinnear CJ, Möller M. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. *Human genomics*. 2019;13(1):1-12.

281. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005;434(7031):400-4.
282. El Aggan H, Farahat N, El Deeb N, Zeid A, El-Shendidi A. Peripheral blood and hepatic Toll-like receptor 7 expression and interferon lambda 1 levels in chronic hepatitis C: Relation to virus replication and liver injury. *Microb Pathog*. 2019;131:65-74.
283. Petes C, Odoardi N, Gee K. The toll for trafficking: toll-like receptor 7 delivery to the endosome. *Front Immunol*. 2017;8:1075.
284. Souyris M, Cenac C, Azar P, Daviaud D, Canivet A, Grunenwald S, et al. TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. *Science immunology*. 2018;3(19):eaap8855.
285. Pujantell M, Altfeld M. Consequences of sex differences in Type I IFN responses for the regulation of antiviral immunity. *Front Immunol*. 2022;13.
286. Deegan DF, Karbalaei R, Madzo J, Kulathinal RJ, Engel N. The developmental origins of sex-biased expression in cardiac development. *Biol Sex Differ*. 2019;10:1-20.
287. Masso-Silva JA, Moshensky A, Lam MT, Odish MF, Patel A, Xu L, et al. Increased peripheral blood neutrophil activation phenotypes and neutrophil extracellular trap formation in critically ill coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: A case series and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2022;74(3):479-89.
288. Broggi A, Tan Y, Granucci F, Zanoni I. IFN- λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nat Immunol*. 2017;18(10):1084-93.
289. Chrysanthopoulou A, Kambas K, Stakos D, Mitroulis I, Mitsios A, Vidali V, et al. Interferon lambda1/IL-29 and inorganic polyphosphate are novel regulators of neutrophil-driven thromboinflammation. *The Journal of pathology*. 2017;243(1):111-22.
290. De M, Bhushan A, Chinnaswamy S. Monocytes differentiated into macrophages and dendritic cells in the presence of human IFN- λ 3 or IFN- λ 4 show distinct phenotypes. *J Leukoc Biol*. 2021;110(2):357-74.
291. Supriya R, Gao Y, Gu Y, Baker JS. Role of exercise intensity on Th1/Th2 immune modulations during the covid-19 pandemic. *Front Immunol*. 2021;12:5578.
292. O'Brien TR, Prokunina-Olsson L, Donnelly RP. IFN- λ 4: the paradoxical new member of the interferon lambda family. *J Interferon Cytokine Res*. 2014;34(11):829-38.
293. Onabajo OO, Muchmore B, Prokunina-Olsson L. The IFN- λ 4 conundrum: when a good interferon goes bad. *J Interferon Cytokine Res*. 2019;39(10):636-41.
294. Blazek K, Eames HL, Weiss M, Byrne AJ, Perocheau D, Pease JE, et al. IFN- λ resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1 β production. *J Exp Med*. 2015;212(6):845-53.
295. Read SA, Wijaya R, Ramezani-Moghadam M, Tay E, Schibeci S, Liddle C, et al. Macrophage Coordination of the Interferon Lambda Immune Response. *Front Immunol*. 2019;10:2674.
296. Eslam M, McLeod D, Kelaeng KS, Mangia A, Berg T, Thabet K, et al. IFN- λ 3, not IFN- λ 4, likely mediates IFNL3-IFNL4 haplotype-dependent hepatic inflammation and fibrosis. *Nat Genet*. 2017;49(5):795-800.
297. Dalal J, Triulzi I, James A, Nguimbis B, Dri GG, Venkatasubramanian A, et al. COVID-19 mortality in women and men in sub-Saharan Africa: a cross-sectional study. *BMJ global health*. 2021;6(11):e007225.
298. Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn LR, et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nature communications*. 2020;11(1):1-10.

299. Raimondi F, Novelli L, Ghirardi A, Russo FM, Pellegrini D, Biza R, et al. Covid-19 and gender: lower rate but same mortality of severe disease in women—an observational study. *BMC Pulm Med.* 2021;21(1):1-11.
300. Joe W, Kumar A, Rajpal S, Mishra U, Subramanian S. Equal risk, unequal burden? Gender differentials in COVID-19 mortality in India. *J Glob Health Sci.* 2020;2(1):e17.
301. Čikić J, Bilinović Rajačić A. Work-Family Conflict During the Pandemic— Induced State of Emergency in Serbia: The Female Perspective. *Pol Sociol Rev.* 2021;216(4):553-70.
302. Gompers A, Bruch JD, Richardson SS. Are COVID-19 case fatality rates a reliable measure of sex disparities? *Womens Health Issues.* 2022;32(2):87-9.
303. Broggi A, Ghosh S, Sposito B, Spreafico R, Balzarini F, Lo Cascio A, et al. Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition. *Science.* 2020;369(6504):706-12.
304. Sorrentino L, Fracella M, Frasca F, D'Auria A, Santinelli L, Maddaloni L, et al. Alterations in the Expression of IFN Lambda, IFN Gamma and Toll-like Receptors in Severe COVID-19 Patients. *Microorganisms.* 2023;11(3):689.
305. Bénard A, Jacobsen A, Brunner M, Krautz C, Klösch B, Swierzy I, et al. Interleukin-3 is a predictive marker for severity and outcome during SARS-CoV-2 infections. *Nature Communications.* 2021;12(1):1112.
306. Bibert S, Roger T, Calandra T, Bochud M, Cerny A, Semmo N, et al. IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism which improves HCV clearance prediction. *J Exp Med.* 2013;210(6):1109-16.
307. Al-Qahtani A, Al-Anazi M, Abdo AA, Sanai FM, Al-Hamoudi W, Alswat KA, et al. Correlation between genetic variations and serum level of interleukin 28B with virus genotypes and disease progression in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol Res.* 2015;2015.
308. Grzegorzewska AE, Świdorska MK, Mostowska A, Warchoń W, Jagodziński PP. Antibodies to HBV surface antigen in relation to interferon- λ 3 in hemodialysis patients. *Vaccine.* 2016;34(41):4866-74.
309. Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, et al. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology.* 2010;139(5):1577-85.
310. Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Yoshio S, Kurosaki M, Hashimoto S, et al. Association of serum IFN- λ 3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol.* 2015;50:894-902.
311. Grzegorzewska AE, Świdorska MK, Mostowska A, Jagodziński PP. Circulating interferon- λ 3, responsiveness to HBV vaccination, and HBV/HCV infections in haemodialysis patients. *BioMed Research International.* 2017;2017.
312. Hong M, Schwerk J, Lim C, Kell A, Jarret A, Pangallo J, et al. Interferon lambda 4 expression is suppressed by the host during viral infection. *J Exp Med.* 2016;213(12):2539-52.
313. Chen Q, Coto-Llerena M, Suslov A, Teixeira RD, Fofana I, Nuciforo S, et al. Interferon lambda 4 impairs hepatitis C viral antigen presentation and attenuates T cell responses. *Nature Communications.* 2021;12(1):4882.
314. Lu Y-F, Goldstein DB, Urban TJ, Bradrick SS. Interferon- λ 4 is a cell-autonomous type III interferon associated with pre-treatment hepatitis C virus burden. *Virology.* 2015;476:334-40.

315. Covid S. GWAS Group Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P et al 2020 Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med.*383(16):1522-34.
316. Kousathanas A, Pairo-Castineira E, Rawlik K, Stuckey A, Odhams CA, Walker S, et al. Whole-genome sequencing reveals host factors underlying critical COVID-19. *Nature.* 2022;607(7917):97-103.

LISTA SKRAĆENICA

Skraćenice	Objašnjenja
ACE	Angiotenzin konvertujući enzim (engl. <i>angiotensin-converting enzyme</i>)
ACE2	Angiotentin-konvertujući enzim (engl. <i>angiotensin-converting enzyme</i>)
ACEH	ACE homolog (engl. <i>ACE homologue</i>)
ALT	Alanin aminotrasferaza (engl. <i>alanine aminotrasferase</i>)
Ang 1-7	Angiotenzin 1-7 (engl. <i>angiotensin 1-7</i>)
Ang 1-9	Angiotezin 1-9 (engl. <i>angiotensin 1-9</i>)
Ang I	Angiotenzin I (engl. <i>angiotensin I</i>)
Ang II	Angiotenzin II (engl. <i>angiotensin II</i>)
Ang II	Angiotenzin II (engl. <i>angiotensin II</i>)
ARDS	Akutni respiratorni distres sindromi (engl. <i>acute respiratory distress syndrome</i>)
ARE	Sekvenca responsivna na androgen (engl. <i>androgen response element</i>)
AST	Aspartat aminotrasferaza (engl. <i>aspartate aminotrasferase</i>)
AT1 i AT2	Receptor za angiotenzin 1 i 2 (engl. <i>angiotensin receptor-1; -2: AT-1;-2</i>)
BMI	Indeks telesne mase (engl. <i>body mass index</i>)
CCI	Čarlsonovog indeksa komorbiditeta (engl. <i>Charlson Comorbidity Index</i>)
CH	Region centralnog heliksa (engl. <i>central helix</i>)
CI	Interval poverenja (engl. <i>Confidence interval</i>)
CK	Kreatin kinaza (engl. <i>creatin kinase</i>)
COVID-19 HGI	Inicijativa za genetiku COVID-19 domaćina (engl. <i>COVID-19 Host Genetics Initiative</i>)
CRP	C-reaktivni protein (engl. <i>C-reactive protein</i>)
CT	Citoplazmatski rep (engl. <i>cytoplasmic tail</i>)
CTD1 i CTD2	S-terminalni domen -1 i -2 (engl. <i>C-terminal domain -1;2</i>)
CTL	Citotoksični T limfociti (engl. <i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
CTSL	Katepsin L (engl. <i>Cathepsin L</i>)
DAMP	Molekulski obrasci oštećenja (engl. <i>damage-associated molecular patterns</i>)
DIC	Diseminovana intravaskularna koagulacija (engl. <i>disseminated intravascular coagulation</i>)
DMVs	Vezikule sa dvostrukom membranom (engl. <i>double membrane vesicles</i>)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
E	Protein omotača (engl. <i>envelope</i>)
EDTA	Etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ERGIC	Intermedijerni kompartaman endoplazmatskog retikuluma i Goldžijevog aparata (engl. <i>endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment</i>)
FP	Fuzion peptid (engl. <i>fusion peptide</i>)
GenOMICC	Genetika mortaliteta u intenzivnoj nezi (engl. <i>Genetics Of Mortality in Critical Care</i>)
GWAS	Studija asocijacija na nivou celog genoma (engl. <i>genome-wide association studies</i>)
HBV	Hepatitis B virus (engl. <i>hepatitis B virus</i>)
hCoV	Koronavirusi sposobni da inficiraju čoveka (engl. <i>human coronaviruses</i>)
HCV	Hepatitis C virus (engl. <i>hepatitis C virus</i>)
HCV	Hepatitis C virus (engl. <i>hepatitis C virus</i>)

HIV	Virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HR1 i HR2	Heptapeptidni domeni -1 i -2 (engl. <i>heptad repeat -1; -2</i>)
HSV-1 i 2	Herpes simpleks virus (engl. <i>herpes simplex virus -1; -2</i>)
IFN	Interferon (engl. <i>interferon</i>)
IFN-λ	Interferon lambda (engl. <i>interferon lambda</i>)
IFN-λR	Receptor za interferon lambda (engl. <i>IFN-λ receptor</i>)
IFN-λR1	IFN-λ receptorski lanac 1 (engl. <i>IFN-λ receptor chain 1</i>)
IL	Interleukin (engl. <i>interleukin</i>)
IL-10R2	Podjedinica 2 receptora za IL-10 (engl. <i>IL-10 receptor subunit 2</i>)
IQR	Interkvartilni opseg (engl. <i>interquartile range</i>)
IRF-9	Interferon regulatorni faktor (engl. <i>interferon regulatory factor 9</i>)
iRNK	Informaciona ribonukleinska kiselina
ISGF3	Interferonom stimuliisani gen za faktor 3(engl. <i>interferon stimulated gene factor 3</i>)
ISGs	Interferonom stimuliisani geni (engl. <i>IFN-stimulated genes</i>)
ISRE	Interferonom stimuliisani responzivni elementi (engl. <i>IFN-stimulated response elements</i>)
JAK1	(engl. Janus Kinase 1)
LDH	Laktat dehidrogenaza (engl. <i>lactate dehydrogenase</i>)
LDLRA	LDL receptor klase A (engl. <i>LDL receptor class A</i>)
M	Membranski glikoprotein (engl. <i>membrane</i>)
MAS	engl. <i>mitochondrial assembly</i>
MDA5	Protein 5 asociran sa diferencijacijom melanoma (engl. <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>)
Mdn	Medijana (engl. <i>median</i>)
MERS-CoV	Koronavirus bliskoistočnog respiratornog sindroma (engl. <i>middle east respriratory syndrome coronavirus</i>)
MHC	Molekul glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MODS	Disfunkcija multiplih organa (engl. <i>multiple organ disfunction</i>)
MPROT15	Metaloproteaza 15 (engl. <i>metalloprotease 15</i>)
N	nukleokapsidni protein (engl. <i>nucleocapsid</i>)
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
nCov	novi koronavirus (engl. <i>novel coronavirus</i>)
NET	Ekstracelularne klopke neutrofila (engl. <i>neutrophil extracellular traps</i>)
NF-κB	Nuklearni faktor kapa B (engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NK	Ćelije-ubice (engl. <i>natural killer</i>)
nsp	Nestrukturani proteini (engl. <i>non-structural protein</i>)
NTD	N-terminalni domen (engl. <i>N-terminal domain</i>)
OR	Odnos šansi (engl. <i>odds ratio</i>)
ORFs	Otvoreni okviri čitanja (engl. <i>open reading frames</i>)
PAMP	Molekulski obrasci patogena (engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PAR-2	Proteazom akvirirani receptor 2 (engl. <i>protease-activated receptor-2</i>)
PCT	Prokalcitonin (engl. <i>procalcitonin</i>)
pp1a	Poliprotein 1a (engl. <i>polyprotein 1a</i>)
pp1ab	Poliprotein 1ab (engl. <i>polyprotein 1ab</i>)

PRF	Programirano pomeranje okvira čitanja ribozoma (engl. <i>programmed ribosomal frameshift</i>)
PRR	Receptor za prepoznavanje obrazaca (engl. <i>pattern recognition receptor</i>)
Q	Prigušivač (engl. <i>quencher</i>)
R	Reporterska boja (engl. <i>reporter</i>)
R	Reporterska boja (engl. <i>reporter</i>)
RAS	Renin-angiotenzin sistem (engl. <i>renin – angiotensin – system</i>)
RBD	Domen koji se vezuje za receptor (engl. <i>receptor binding domain</i>)
RBM	Motiv vezivanja receptora (engl. <i>receptor-binding motif</i>)
RdRp	RNK-zavisna RNK polimeraza (engl. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RIG-I	Gen I indukovani retinoičnom kiselinom (engl. <i>retinoic acid-inducible gene I</i>)
RNK	Ribonukleinska kiselina
RSV	Respiratorni sincicijalni virus (engl. <i>respiratory syncytial virus</i>)
RTC	Replikaciono-transkripcijski kompleks (engl. <i>replication-transcription complex</i>)
RT-PCR	Reakcija lančane polimerizacije sa reverznom transkripcijom (engl. <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>)
S	Protein "šiljak" (engl. <i>spike</i>)
sACE2	Solubilni ACE2 (engl. <i>soluble ACE2</i>)
SARS-CoV-1	Teški akutni respiratorni sindrom izazvan koronavirusom (engl. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 1</i>)
scRNA-seq	Sekvenciranje RNK na nivou ćelije (engl. <i>Single-cell RNA sequencing</i>)
SNP	Jednonukleotidni polimorfizam (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNV	Varijanta jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide variant</i>)
SRCR	Skevendžer receptor bogat cisteinom (engl. <i>scavenger receptor cysteine-rich</i>)
STAT	transduktor signala i aktivator transkripcije 1 (engl. <i>signal transducer and activator of transcription 1</i>)
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TACE	TNF- α konvertujući enzim (engl. <i>TNF-α converting enzyme</i>)
Th	Pomoćnički T limfociti (engl. <i>T helper</i>)
TLR	Receptor sličan Tolu (engl. <i>Toll-like receptor</i>)
TM	Transmembranski domen (engl. <i>transmembrane domain</i>)
TMPRSS2	Transmembranska serinska proteaza 2 (engl. <i>transmembrane protease serine 2</i>)
TNF-α	Faktor nekroze tumora alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TRS	Sekvence za regulaciju transkripcije (engl. <i>transcription regulatory sequence</i>)
TTSPs	Transmembranske serinske proteaze tipa II (engl. <i>Type II transmembrane serine proteases</i>)
Tyk1	Ne-receptorska tirozin kinaza 2 (engl. <i>non-receptor tyrosine-protein kinase 2</i>)
UTR	Netranslacijski region (engl. <i>untranslated region</i>)
WB	Pufer za ispiranje (engl. <i>washing buffer</i>)
WES	Sekvenciranje celog egzoma (engl. <i>whole-exome sequencing</i>)

PRILOG 1

MATERIJAL I METODOLOGIJA

Imunofenotipizacija mononuklearnih leukocita

Protočna citofluorimetrija je sofisticirana metoda koja omogućava brzu, multiparametarsku analizu pojedinačnih ćelija u suspenziji. Ova metoda pruža mogućnost istovremnog ispitivanja više ćelijskih karakteristika, uključujući veličinu i granulaciju citoplazme ćelije u kombinaciji sa ekspresijom više membranskih ili intracelularnih markera čije se prisustvo detektuje emisijom fluorescentnih signala poreklom od specifičnih monoklonskih antitela za dati marker koja su konjugovana sa različitim fluorohromima. Jedna od najvažnijih primena protočne citofluorimetrije je identifikacija subpopulacija humanih mononuklearnih leukocita, tj. imunofenotipizacija.

Imunofenotipizacija mononuklearnih leukocita izvedena je obeležavanjem uzoraka pune krvi komercijalnim monoklonskim antitelima kompanije Beckman Coulter (Brea, California, SAD) koja su obeležena fluorohromima: fluorescein – izotiocijanat (FITC), fikoeritrin (PE), Electron Coupled Dye (ECD), peridinin hlorofil protein (PerCP), fikoeritrin – Cy7 (PE - Cy7) i fikoeritrin – Cy5 (PE – Cy5). Panel korišćen anti-humanih antitela uključivao je: anti-HLA-DR PE i ECD, anti-CD3 ECD, anti-CD4 PE, anti-CD8 FITC, anti-CD19 PE-Cy7, anti-CD14 FITC, anti-CD16 PE-Cy5, anti-CD15 PE, anti-CD57 FITC, anti-CD56 PE, anti-CD11c, PerCP, anti-CD123 PE, anti-CD83 PE, anti-CD38 PE, anti-CD23 ECD, kao i izotipske kontrole. Kombinacijom navedenih antitela detektovane su sledeće populacije/subpopulacije leukocita:

- **anti - CD15 PE** – neutrofilni (CD15+);
- **anti - CD3 ECD, anti - CD8 FITC, anti - CD4 PE** – T limfociti (CD3+): citotoksični T limfociti (CD3+CD8+), pomoćnički T limfociti (CD3+CD4+) i odnos CD4+/CD8+;
- **anti - CD14 FITC sa anti-HLA-DR PE / anti - CD16 PE-Cy5, anti - CD38 PE, anti - CD23 ECD** – monociti (CD14+): antigen-prezentujući (CD14+HLADR+), klasični (CD14+CD16-), intermedijerni (CD14+CD16+), neklasični (CD14-CD16+), M1 monociti (CD38+), M2 monociti (CD23+);
- **anti - CD19 PE-Cy7, anti-HLA-DR PE** – B limfociti (CD19+): antigen-prezentujući (CD19+HLADR+);
- **anti - CD3 ECD, anti - CD56 PE, anti - CD57 FITC** – NK ćelije (CD3-CD56+): neaktivirane (CD3-CD56+CD57-), aktivirane (CD3-CD56+CD57+);
- **anti - Lyn FITC sa anti - HLADR PE / anti - CD11c PerCP / anti - CD123 PE / anti - CD83 PE** – dendritske ćelije (Lyn-): ukupne: Lyn-HLA-DR+, mijeloidne (CD11c+), plazmocitoidne (CD123+), aktivirane (CD83+).

U polistirenske epruvete za protočnu citofluorimetriju, dimenzija 12x75mm, obeležene šifrom pacijenta i kombinacijom antitela, sipano je na dno epruvete po 100µL periferne krvi sa EDTA kao antikoagulansom. Potom je u svaku epruvetu dodato po 10µL odgovarajućih antitela za određenu kombinaciju. Obeleženi uzorci su izmešani na vorteksu i inkubirani 20 minuta na temperaturi od +4°C u mraku. Po završenoj inkubaciji, uzorci su podvrgnuti automatizovanoj lizi eritrocita na aparatu TQ-Prep (*Beckman Coulter, Brea, California, USA*) koristeći kombinaciju reagenasa *Immunoprep* (*Beckman Coulter, Brea, California, USA*). Ovu kombinaciju činili su *Immunoprep 1* zadužen za lizu eritrocita, *Immunoprep 2* kao stabilizator leukocita, a *Immunoprep 3* koji ima ulogu fiksatora ćelijske membrane. Pripremljeni uzorci čuvali su se u frižideru na 4°C do analize na protočnom citometru, najkasnije 24 časa od obeležavanja antitelima.

Analiza obeleženih uzoraka sprovedena je na protočnom citofluorimetru FC500 Benchtop Cytometer (*Beckman Coulter, Brea, California, USA*) prikazanom na slici 11. Za svaku kombinaciju antitela prikupljane su informacije od minimalno 10 000 mononuklearnih leukocita, koje su analizirane softverom FlowJo verzija 10 (*BD Bioscience, San Jose, California, USA*). Program raspoložuje automatskom obradom fluorescencije „ograničene“ grupe ćelija koja se iskazuje brojem i procentom pozitivnih ćelija, kao i ostalim parametrima fluorescencije. Kako bi se odredile apsolutne vrednosti pojedinačnih subpopulacija mononuklearnih leukocita, korišćeni su podaci parametara krvne slike sa diferencijalnom leukocitarnom formulom. Rezultati su grafički predstavljeni u vidu tačkastih dijagrama (engl. *dot-plot*) i histograma fluorescencije.



Slika 11. Originalne fotografije protočnog citofluorimetra FC500 Benchtop Cytometer i aparata TQ-Prep (*Beckman Coulter, Brea, California, USA*)

REZULTATI

Analiza fenotipa mononuklearnih leukocita periferne krvi prema težini kliničke slike COVID-9

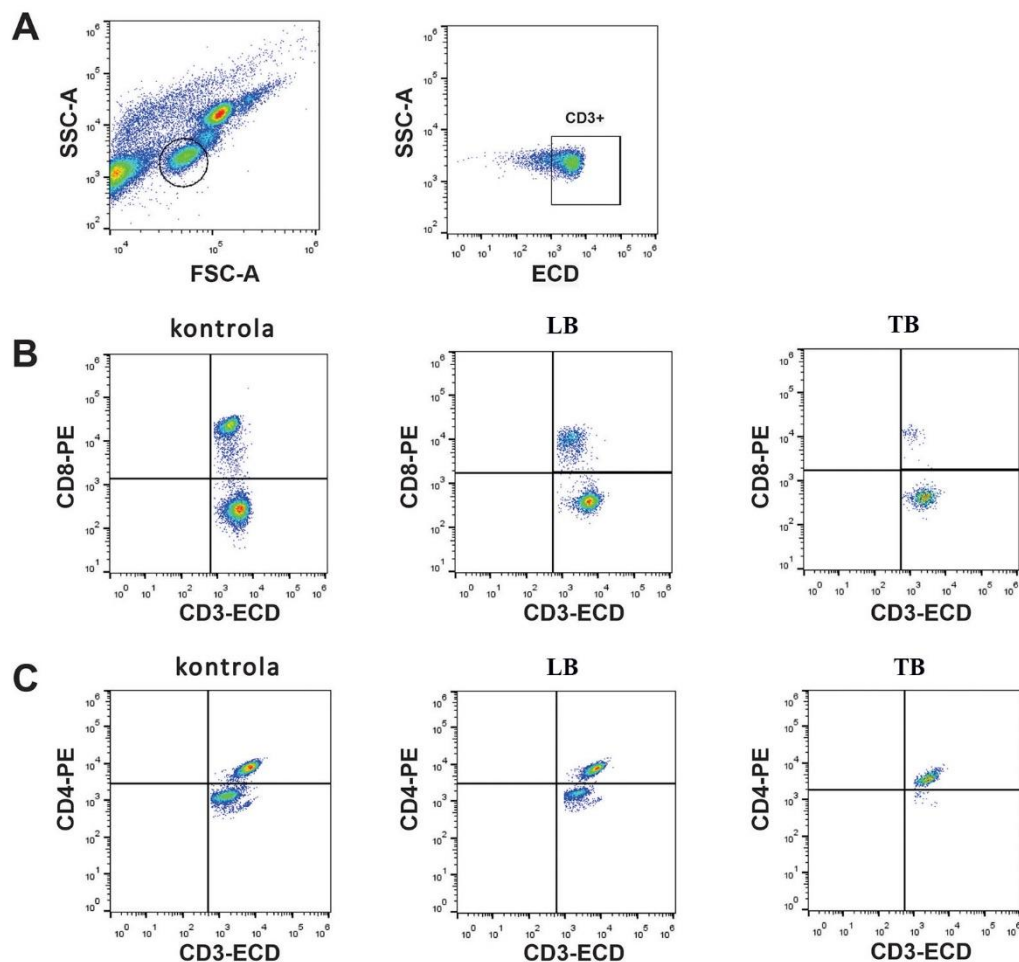
Protočnom citofluorimetrijom određivan je fenotip mononuklearnih leukocita periferne krvi kod pacijenata sa lakšim i težim oblikom COVID-19. Značajno veći procenat polimorfonukleara u kombinaciji sa nižim procentom mononuklearnih ćelija bio je prisutan i kod lako i kod teško obolelih slučajeva u poređenju sa zdravim osobama, s tim da je uočena razlika bila izraženija među težim slučajevima. Iako su kod lakih pacijenata svi parametri bili blizu ili u opsegu normalnih vrednosti, procenat CD15+ ćelija (neutrofili) bio je viši nego u kontroli, a zastupljenost B limfocita (CD19+), monocita (CD14+), kao i pomoćničkih (CD3+CD4+) i citotoksičnih (CD3+CD8+) T limfocita bila je niža. Veoma visoka vrednost odnosa neutrofila i limfocita (17,4) kod pacijenata sa teškim oblikom bolesti odslikava porast broja neutrofila (90,1%), smanjenje broja B limfocita (2,1%) i NK ćelija (1,8%), a ujedno i značajan pad T limfocita (1,2%). I pomoćnički (0,8%) i citotoksični (0,1%) T limfociti bili su zastupljeni u veoma niskom procentu u perifernoj krvi, daleko ispod donje granice referentnog opsega (tabela 24).

Odnos CD4/CD8 limfocita bio je tri puta viši kod težih slučajeva u odnosu na kontrolu, bez statističke značajnosti (tabela 24 i grafikon 68). Procenat monocita kretao se u opsegu

referentnih vrednosti kod obe grupe COVID-19 pacijenata, ali je bio niži nego u grupi zdravih ispitanika.

Tabela 24. Relativni i apsolutni broj leukocita u perifernoj krvi kod zdravih ispitanika, pacijenata sa blagom bolešću i pacijenata sa teškim oboljenjem dobijenih analizom protočne citometrije

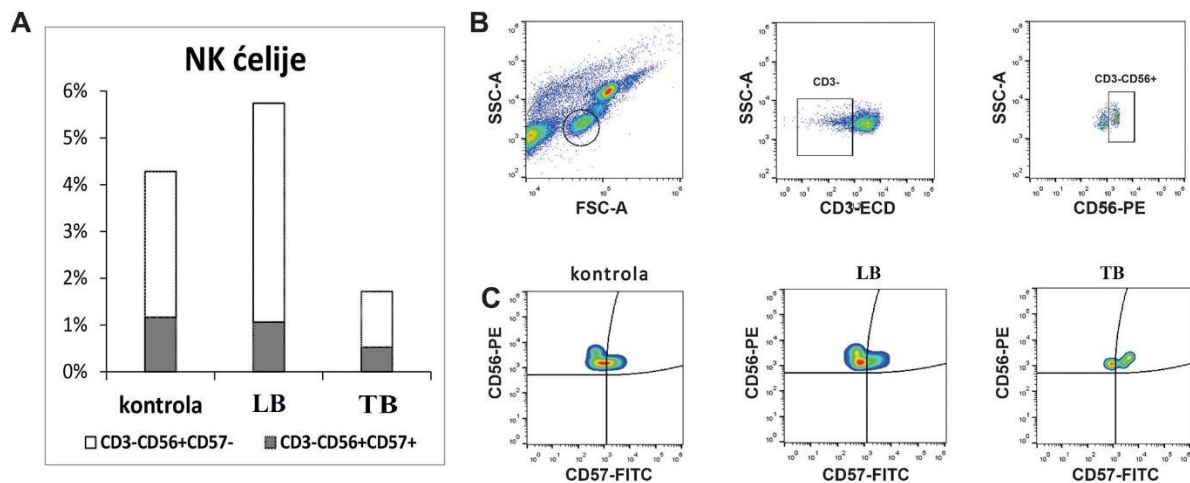
PBL	Kontrola				Lakši oblik				Teži oblik				P
	Md (%)	Opseg (%)	Md (x10 ⁶ /mL)	Opseg (x10 ⁶ /mL)	Md (%)	Opseg (%)	Md (x10 ⁶ /mL)	Opseg (x10 ⁶ /mL)	Md (%)	Opseg (%)	Md (x10 ⁶ /mL)	Opseg (x10 ⁶ /mL)	
Ne/Ly	1,2	1,0-3,2	1,9	1,4-2,6	1,7	1,5-2,9	3,5	1,9-5,2	17,4	9,0-23,1	75,2	21,3-155,7	<0,0001
CD15+	49,4	37,9-57,4	2,6	2,0-3,2	58,2	42,1-64,3	2,7	1,7-6,2	90,1	83,1-93,4	6,3	3,7-18,7	<0,0001
CD3+	24,4	4,4-30,0	1,1	0,3-1,6	15,6	8,3-32,3	0,8	0,4-1,5	1,2	0,6-3,9	0,7	0-0,4	<0,0001
CD3+CD4+	14,1	11,7-19,2	0,9	0,6-1,1	9,1	4,9-11,1	0,4	0,2-0,9	0,8	0,0-2,4	0,1	0-0,3	<0,0001
CD3+CD8+	5,8	4,9-9,7	0,3	0,2-0,6	2,5	0,7-3,1	0,1	0-0,2	0,1	0,1-1,4	0	0-0,1	<0,0001
CD4+/CD8+	2,0	1,5-3,9	2,0	1,5-3,9	4,2	1,9-13,1	4,2	1,9-13,3	6,5	0,1-19,6	6	0-17	0,54
CD19+	8,2	3,4-12,4	0,5	0,2-0,7	5,2	2,2-17,0	0,3	0,1-1,7	2,1	1,6-3,7	0,2	0,1-0,4	0,0032
CD3-CD56+	4,2	4,1-10,3	0,3	0,2-0,6	6,3	3,1-8,5	0,3	0,2-0,6	1,8	1,1-2,5	0,1	0,1-0,4	0,016
CD14+	8,7	4,9-11,4	0,5	0,3-0,8	7,7	5,8-11,0	0,4	0,-0,8	5,3	2,3-11,5	0,5	0,2-1,1	0,042



Grafikon 68. Protočna citofluorimetrijska analiza T ćelija iz leukocita periferne krvi kontrolne grupe i COVID-19 pacijenata sa lakom (LB) i teškom (TB) kliničkom slikom. Strategija ograničavanja: limfociti su selektovani na osnovu FS/SS karakteristika; T limfociti su identifikovani na osnovu ekspresije CD3 markera. (B) Pseudokolorni dijagram CD3 vs. CD8 predstavlja CD3+CD8+ ćelije;

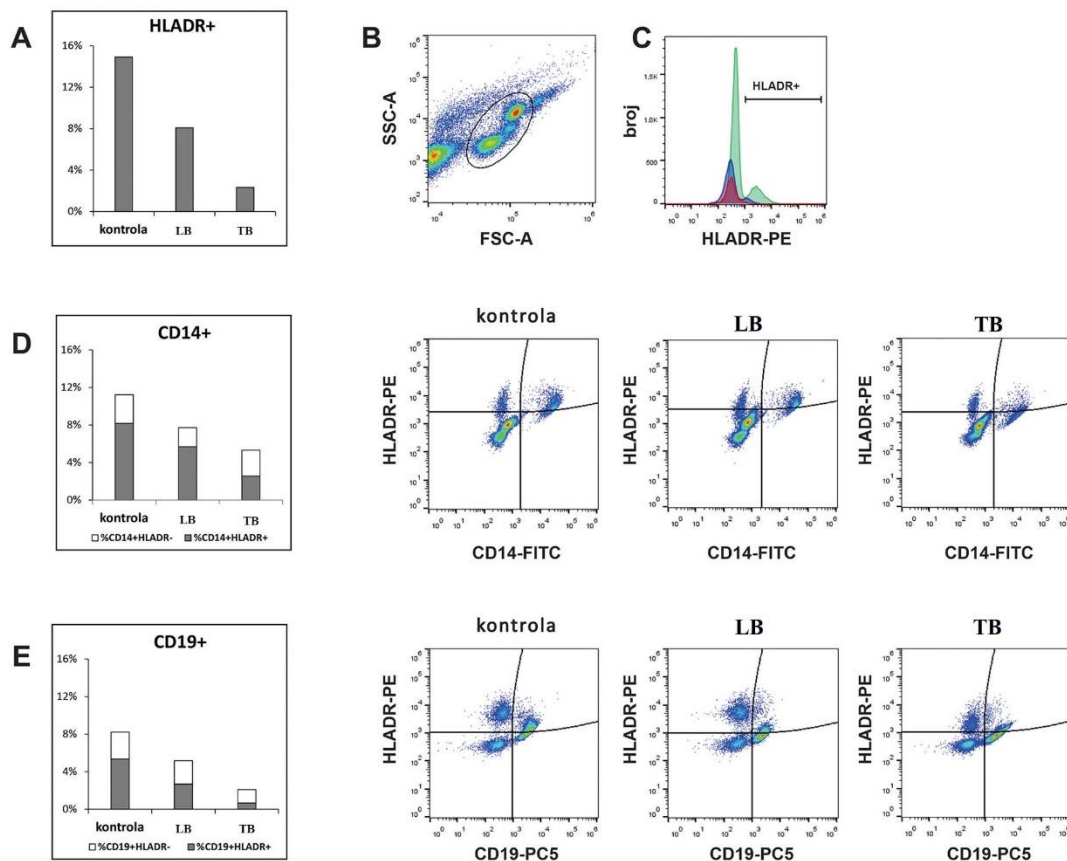
(C) Pseudokolorni dijagram CD3 vs. CD4 predstavlja CD3+CD4+ ćelije u populaciji T limfocita u kontroli i grupi pacijenata.

U populaciji NK ćelija (CD3-CD56+) određivana je ekspresija CD57 molekula, kao markera sazrevanja i aktivacije NK ćelija. Promena broja NK ćelija bila je statistički značajna među grupama ($p=0,016$). U odnosu na kontrolu, lakši slučajevi su imali veći broj NK ćelija (6,3% naspram 4,2% u kontroli), ali približno isti procenat CD57+ ćelija (1,1% u blagim slučajevima; 1,2% u kontroli), dok su među težim slučajevima i ukupan broj NK ćelija i procenat aktiviranih ćelija bili niži (1,8% i 0,5%) (grafikon 69), iako nije postignuta statistička značajnost.



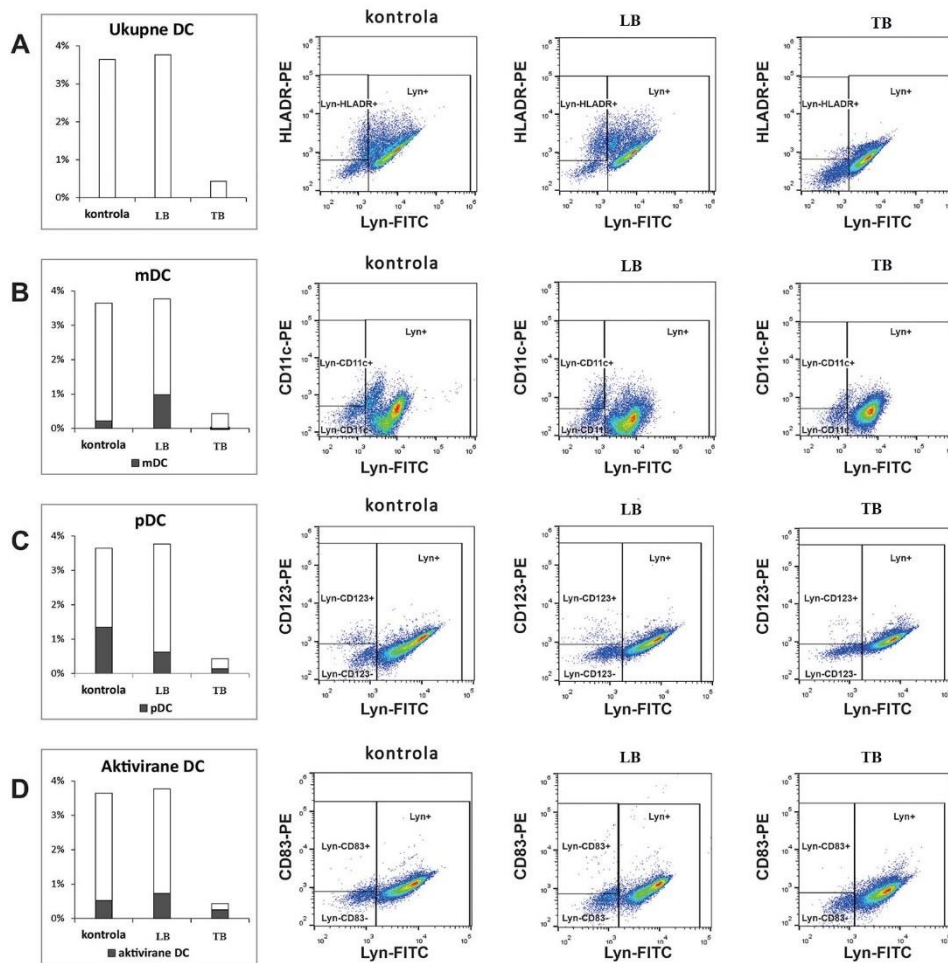
Grafikon 69. Razlike u populacijama NK ćelija u zavisnosti od težine bolesti. A) na stubičastom grafikonu predstavljen je procenat NK ćelija među leukocitima periferne krvi i odnos CD57- CD57+ ćelija unutar populacije NK ćelija. B) Strategija ograničavanja: limfociti su selektovani na osnovu FS/SS karakteristika; NK ćelije su ograničene kao CD3 i CD19 negativne ćelije; C) NK ćelije su definisane kao aktivirane na osnovu koeskpesije CD57 markera.

Dalja analiza je pokazala da je procenat ćelija koje eksprimiraju HLA-DR bio skoro dva puta manji među lakim slučajevima nego u kontroli (8,1% naspram 14,9%) i 6,5 puta manji u teškim slučajevima (2,3%), sa statističkom značajnošću $p<0,0001$. Smanjenje ekspresije HLA-DR utvrđeno je i kod monocita (8,2%—kontrola; 5,7%—laki slučajevi; 2,5%—teški slučajevi, $p<0,0001$) i B limfocita (5,3%—kontrola; 2,6%—laki slučajevi; 0,7%—teški slučajevi, $p=0,014$), uz izraženiji pad u grupi teških slučajeva (grafikon 70).



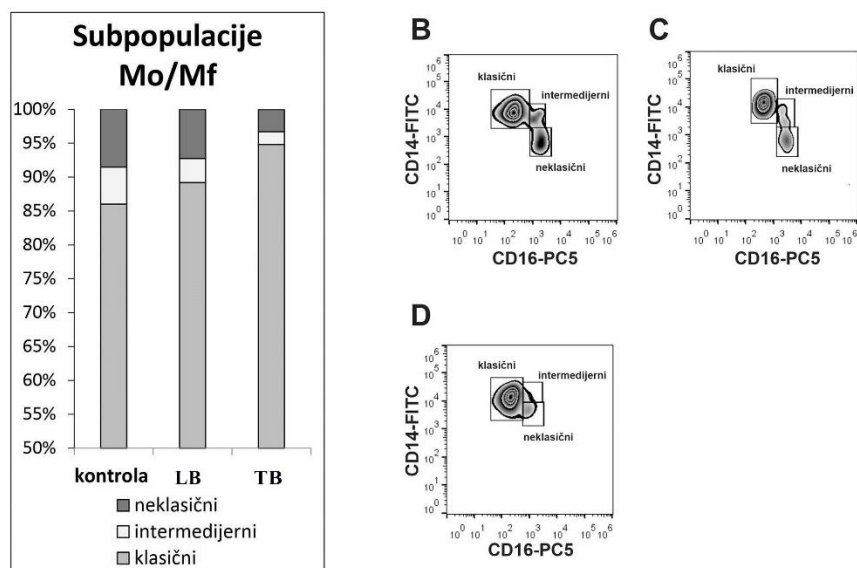
Grafikon 70. Pad ekspresije HLA-DR je drastičniji među teškim pacijentima. A) Na stubičastom dijagramu prikazan je procenat HLA-DR⁺ ćelija među leukocitima periferne krvi; B) Na FSC/SSC tačkastom dijagramu (engl. *dot plot*) obeleženi su leukociti i isključen ćelijski debris; C) Preklapljeni histogrami predstavljaju ekspresiju HLA-DR u populaciji leukocita u kontroli (zeleno), LB (plavo) i TB (crveno). D) Stubičasti dijagram i reprezentativni pseudokolorni dijagrami na kojima je prikazan procenat HLA-DR⁺ i HLA-DR⁻ ćelija u populaciji monocita; E) Stubičasti dijagram i reprezentativni pseudokolorni dijagrami na kojima je prikazan procenat HLA-DR⁺ i HLA-DR⁻ ćelija u populaciji B limfocita.

Procentualni odnos dendritskih ćelija (Lyn-HLADR⁺) se nije mnogo razlikovao između kontrolne grupe i lakih slučajeva. Međutim, u grupi lakih slučajeva izmeren je manji broj plazmacitoidnih (CD123⁺) DCs (0,6% prema 1,4% u kontroli, $p=0,0017$), veći broj mijeloidnih (CD11s⁺) DCs (1,0% naspram 0,2% u kontroli, $p=0,0047$) i DCs koje eksprimiraju molekul CD83, kao marker aktivacije antigen-prezetujućih ćelija (0,7% naspram 0,5% u kontroli) (grafikon 71). Nasuprot tome, broj CD11⁺ DCs bio je praktično zanemarljiv kod teških pacijenata, a procenat aktiviranih i plazmacitoidnih DCs bio je niži nego u grupama lakih slučajeva i kontroli.



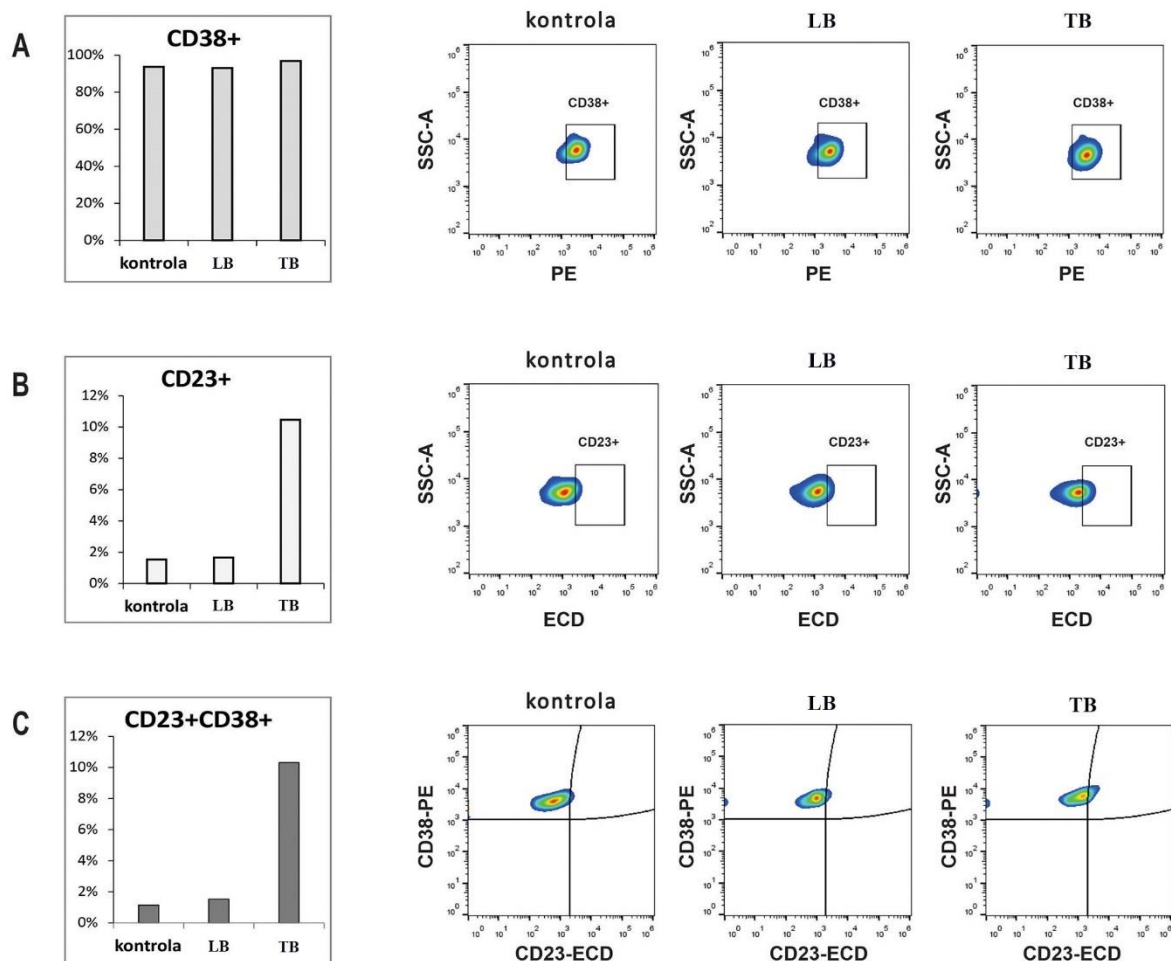
Grafikon 71. Razlike u subpopulacijama dendritskih ćelija među lakim (LB) i teškim (TB) pacijentima. Na stubičastim dijagramima (levi panel) i reprezentativnim pseudokolornim dijagramima (desni panel) predstavljeni su procenti: A) dendritskih ćelija ukupno; B) mijeloidnih DCs (mDCs); plazmacitoidnih DCs (pDCs) i aktiviranih DCs u populaciji dendritskih ćelija u kontroli i grupi pacijenata.

Praćenjem relativnog nivoa ekspresije površinskih molekula CD14 i CD16, ispitan je odnos subpopulacija monocita: klasičnih, intermedijernih i ne-klasičnih (grafikon 72). U odnosu na kontrolu, procenat klasičnih monocita ($CD14^{high}CD16^{-}$) bio je veći kod lakših slučajeva, a još veći među teškim slučajevima sa statističkom značajnošću (86,0% - kontrola, 89,2% - laki i 94,8% - teški, $p=0,033$), dok je procenat intermedijernih ($CD14^{high}CD16^{+}$) i ne-klasičnih monocita ($CD14^{low}CD16^{+}$) opadao sa težinom bolesti (intermedijerni: 5,5% - kontrola, 3,6% - laki i 1,9% - teški, $p=0,14$; ne-klasični: 8,6% - kontrola, 7,2% - laki i 3,3% - teških, $p=0,0057$).



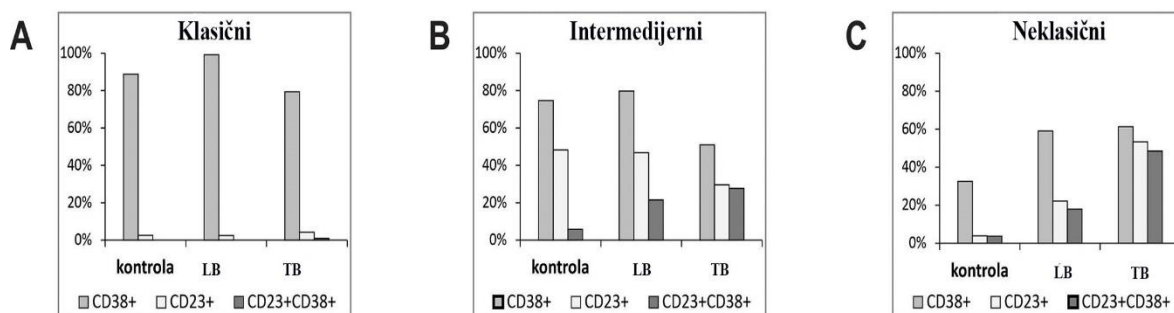
Grafikon 72. Procentualni odnos subpopulacija monocita je izmenjen kod COVID-19 pacijenata. A) Na stubičastom dijagramu predstavljen je procenat klasičnih, intermedijernih i ne-klasičnih subpopulacija monocita u kontroli i grupi pacijenata. Reprezentativni zebra plotovi prikazuju subpopulacije monocita u B) kontroli; C) grupi pacijenata sa lakom (LB); i D) teškom (TB) kliničkom slikom.

Zatim, ispitana je polarizacija monocita u M1 i M2 fenotip, targetiranjem CD38 kao markera M1 monocita i CD23 tipičnog za M2 monocite. U populaciji monocita kod teških slučajeva, bio je prisutan veći procenat CD38+ monocita (98,3% prema 94,1% u kontroli i 93,3% kod lakih slučajeva, $p=0,039$), ali i drastično veći procenat CD23+ ćelija (10,1% prema 1,5% u kontroli i 1,6% kod lakih slučajeva, $p=0,0032$). Treba napomenuti da su svi monociti pozitivni na CD23 istovremeno bili pozitivni i na CD38 marker (grafikon 73).



Grafikon 73. Ekspresije CD38 i CD23 markera u populaciji monocita zdravih kontrola, pacijenata sa lakom i teškom kliničkom slikom. Stubičasti grafikoni (levi panel) i reprezentativni pseudokolorni dijagrami (desni panel) prikazuju procenat (A) CD38+, (B) CD23+ i (C) dvostruko pozitivnih CD23 + CD38 + ćelija u populaciji monocita u kontroli, grupi pacijenata sa lakom (LB) i teškom (TB) kliničkom slikom.

Ćelije koje su koeksprimirale CD23 i CD38 bile su odsutne u subpopulaciji klasičnih monocita i u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata, ali su bile prisutne u intermedijernim i ne-klasičnim subpopulacijama kod pacijenata, posebno kod teških pacijenata (intermedijerni: 5,9%—kontrola, 21,5%—blagi, 27,7%—teški slučajevi, $p=0,17$; ne-klasični: 3,6%—kontrola, 17,1%—blagi, 48,5%—teški slučajevi, $p=0,0021$; grafikon 74).



Grafikon 74. Mešoviti M1/M2 fenotip dominira u subpopulaciji intermedijernih i ne-klasičnih monocita kod teških (TB) pacijenata. Na stubičastim dijagramima je predstavljen procenat CD38+, CD23+ i duplo pozitivnih CD23+CD38+ ćelija među A) klasičnim; B) intermedijernim i C) ne-klasičnim monocitima u kontroli, LB i TB pacijentima.

DISKUSIJA

COVID-19 je treća po redu novonastala zarazna bolest izazvana koronavirusom u 21. veku. Virus je prenesen sa životinjskog rezervoara i naišao je na imunološki nespremlno ljudsko stanovništvo. Mnoga istraživanja su opisala promene u prirodnom i stečenom imunološkom odgovoru kod pacijenata zaraženih SARS-CoV-2 virusom, ali još uvek ima mnogo nepoznatih. U našoj studiji smo analizirali osnovne karakteristike pacijenata obolelih od COVID-19 i analizirali promene u populacijama perifernih krvnih ćelija u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike.

Limfopenija je jedan od najuočljivijih markera COVID-19, a javlja se kao rezultat smanjenja broja svih populacija limfocita, uključujući CD4+ i CD8+ T ćelije, B ćelije i NK ćelije. U skladu sa našim rezultatima, Zhou i saradnici [317] su opisali značajno smanjenje broja CD4+ T limfocita kod pacijenata sa blagim i teškim oblikom, dok je smanjenje broja CD8+ ćelija bilo izraženije kod pacijenata sa teškim oblikom. Međutim, u literaturi je opisano i da je smanjenje broja CD4+ T ćelija mnogo veće kod teških slučajeva [318]. Mi smo pronašli veći pad u CD8+ populaciji u odnosu na CD4+ podpopulaciju, kao i smanjenje u procentu B ćelija, što je bilo izraženije kod pacijenata sa težim oblikom. Važno je napomenuti da je smanjenje frekvencije svih populacija limfocita izraženije kod pacijenata sa COVID-19 u poređenju sa pacijentima sa pneumonijom druge virusne etiologije [319]. Jedan od mogućih uzroka limfopenije je zadržavanje limfocita u plućnom parenhimu, na mestu infekcije. Autopsije COVID-19 pacijenata pokazale su da su infiltrirajuće ćelije uglavnom bile monociti i makrofagi, sa multinuklearnim gigantskim ćelijama uz limfocite, uglavnom CD4+ T ćelije, u manjem broju [320]. Druga ispitivanja su, takođe, pokazala da je broj zajeničkih mijeloidnih progenitora u koštanoj srži i limfocita u slezini i limfnim čvorovima značajno smanjen. Ovi podaci ukazuju na to da se limfopenija ne može pripisati samo redistribuciji limfocita u tkivima i naglašavaju mogući direktan uticaj virusa na imunske ćelije. Poznato je da MERS-CoV direktno inficira ljudske T limfocite i aktivira spoljašnji ili unutrašnji put apoptoze, ali se ne replikuje. Iako se ACE2, kao glavno mesto vezivanja SARS-CoV-2, nisko ili ne eksprimira ekspimira na limfocitima, nedavna istraživanja su dokumentovala novi način na koji SARS-CoV-2 invadira ćelije. Naime, primećeno je da SARS-CoV-2 može inficirati limfocite putem interakcije S proteina sa CD147 markerom limfocita, koji je visoko ekspimiran na aktiviranim

T i B ćelijama, ali i na dendritskim ćelijama, monocitima i makrofagima [321-322]. Ipak, još uvek nije razjašnjeno da li virus izaziva direktne citopatološke efekte.

NK ćelije, kao deo urođenog imuniteta, pružaju ključnu ranu zaštitu protiv virusnih infekcija. Za razliku od drugih istraživanja [323-325], naši rezultati su pokazali da je kod pacijenata sa blagom COVID-19 infekcijom procenat ukupnih NK ćelija bio veći u poređenju sa kontrolnom grupom, a procenat aktiviranih ćelija je bio jednak, ali su u slučajevima teške bolesti ukupne i aktivirane NK ćelije bile značajno desetkovane. U literaturi je opisano da je, između ostalog, za aktivaciju NK ćelija potreban IFN tip I [326]. Nizak procenat dendritskih ćelija kod teških pacijenata, kako je opisano u našim rezultatima, može doprineti smanjenoj sekreciji IFN tipa I, što dovodi do smanjenja aktivacije NK ćelija. Osim toga, prekomerna produkcija IL-6 igra ulogu u smanjenoj aktivnosti NK ćelija u modelima imitirane virusne infekcije *in vivo* [327]. Danas je već dobro poznato da je nivo IL-6 visok kod pacijenata sa teškom COVID-19 infekcijom [328], a pored toga i negativno korelira sa brojem i aktivnošću NK ćelija [323]. Štaviše, neki autori su primetili povišenu ekspresiju inhibicijskog receptora NKG2A na NK ćelijama u ranim stadijumima COVID-19 infekcije [324].

Promene na nivou ćelija koje povezuju urođeni i stečeni imunski odgovor, ali i regulišu stečeni imunski odgovor, mogu biti odgovorne za smanjenje broja i funkcije limfocita. Ključnu ulogu u regulisanju imunskog odgovora i prezentaciji antigena imaju DCs. Opisano je nekoliko načina na koje virusi utiču na adekvatan odgovor DCs [329]. U našoj studiji, utvrdili smo da je procenat ukupnih DCs, kao i procenat mijeloidnih i aktiviranih DCs, bio viši u blagim slučajevima u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na očuvanu funkciju prezentovanja antigena. Takođe, Cao i saradnici [330] su pokazali da u eksperimentima diferencijacije monocita u mDCs pod uticajem virusa influence, ove ćelije, za razliku od klasičnih mDCs, luče hemokine za monocite i IFN tip I. S druge strane, među teškim slučajevima, procenat ukupnih DCs i analiziranih subpopulacija bio je niži. Funkcionalna analiza aktivacije DCs u SARS-CoV infekciji je bila neodređena, prikazujući i aktivaciju [331] i odsustvo aktivacije [332]. Posledica niske aktivacije dendritskih ćelija je nedostatak kostimulatornih molekula koji su neophodni za preživljavanje tokom TCR angažmana, što delimično objašnjava smanjenje T limfocita koji umiru apoptozom u odsustvu adekvatnih signala. Smanjen procenat plazmacitoidnih dendritskih ćelija koje smo pronašli kod oba tipa pacijenata, blagih i teških, sugerise da je adekvatan odgovor na virusnu infekciju duboko narušen, s obzirom da plazmocitoidne DC predstavljaju glavni izvor IFN tipa I. Sličan efekat primećen je i kod SARS-CoV infekcije, gde DCs nisu uspele da pokrenu snažan odgovor IFN tipa I, implicirajući da virus zaobilazi aktivaciju urođenog imunog sistema [333]. SARS-CoV je takođe izazvao umereno povećanje produkcije IL-6 u DCs [334].

Ekspimiranje HLA-DR molekula je ograničeno na ćelije koje se ponašaju kao antigenprezentujuće ćelije. Stoga, stepen ekspresije HLA-DR molekula na monocitima i B-ćelijama ukazuje na njihovu sposobnost za prezentovanje antigena. U našoj studiji, ukupna ekspresija HLA-DR molekula na perifernim mononuklearnim ćelijama bila je izuzetno smanjena u obe grupe COVID-19 pacijenata - blagih i teških. Smanjenje ekspresije HLA-DR molekula na monocitima u infekciji SARS-CoV-2 opisano je i u drugim studijama [335, 336]. Treba istaći da smo takođe utvrdili smanjenje ekspresije HLA-DR molekula na B limfocitima. U našoj kohorti, ekspresija HLA-DR molekula bila je čak 6,5 puta manja kod teških pacijenata. Supresija ekspresije HLA-DR molekula na monocitima ispod granične vrednosti (<30% HLA-DR+ monocita) prihvaćena je kao definicija imunoparalize koja se javlja u smrtonosnim stanjima poput sepse i predstavlja predispoziciju za superinfekciju različitim patogenima [337]. Giamarelos-Burbulis i saradnici [336] su predložili da je jedan od okidača smanjenja ekspresije HLA-DR molekula koncentracija IL-6, zasnovano na pronalasku da je koncentracija IL-6 recipročna ekspresiji HLA-DR molekula.

Procenat monocita kod pacijenata sa COVID-19 bio je u normalnom rasponu, ali analiza protočnom citofluorimetrijom pokazala je da se razlikuju od zdravih osoba. Iako nismo pronašli populaciju monocita FSC^{high} i SSC^{high} koju opisuju neki autori [335, 338], otkrili smo da je odnos između određenih subpopulacija monocita izmenjen kod pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom. Među slučajevima teške bolesti otkrili smo smanjenje intermedijernih (CD14^{high}CD16+) i ne-klasičnih (CD14^{low}CD16+) monocita, zajedno sa povećanjem udela klasičnih (CD14^{high}CD16-) monocita. Slična redistribucija subpopulacija monocita bila je prisutna i kod blagih slučajeva, ali u manje izraženoj meri. U perifernoj krvi zdravih ljudi, klasični monociti su glavna populacija monocita (80-95%) [339]. Glavna funkcija ovih takozvanih "inflamatornih" monocita je fagocitoza i lučenje proinflamatornih citokina. Osim toga, oni su primarni izvor monocita koji se diferenciraju u dendritske ćelije i tkivne makrofage. Intermedijerni monociti (2-8%), koji takođe imaju inflamatorna svojstva, su glavni proizvođači ROS-a i imaju najveću ekspresiju MHC II klase molekula (HLA-DR), što ih čini ćelijama specijalizovanim za prezentovanje antigena. Ne-klasični monociti (2-11%) su "patrolni" monociti koji putuju kroz krvne sudove kako bi skupljali mrtve ćelije i patogene. U kontaktu sa infektivnim agensima, oni proizvode proinflamatorne citokine i hemokine koji regrutuju neutrofile i zatim čiste nastali debris i promoviraju zarastanje i popravku tkiva. Tokom inflamacije, ne-klasični monociti mogu da izlaze iz krvnih sudova i diferenciraju se u makrofage u tkivu zahvaćenom inflamacijom. Tri subpopulacije monocita imaju različite uloge u odgovoru na različite stimulse, tj. tokom homeostaze, inflamacije i popravke tkiva. Trenutni rezultati su delimično suprotni, ali ipak naši zaključci se podudaraju sa mnogim prethodno objavljenim nalazima [340-342]. Značajan pad intermedijernih i ne-klasičnih monocita u krvi, posebno kod teških pacijenata, može biti rezultat migracije monocita u pluća, kako je opisano od strane Sanchez-Cerilo i saradnika [342]. Ova hipoteza se potkrepljuje činjenicom da je 70% LB pacijenata i 10% TB pacijenata koje smo analizirali imali difuzna pneumonična žarišta. Za razliku od naših rezultata, Zhang i Zhou [317,338] su pronašli povećanje broja CD16+ monocita kod COVID-19 pacijenata. Divergencija imunološkog odgovora može biti posledica virusnih mutacija. Naime, nekoliko izveštaja ukazuju na to da se zbog brzog širenja SARS-CoV-2 virusa diljem zemalja, pojavljuju nove mutacije u različitim delovima genoma, što ukazuje na prisutnost različitih sojeva virusa u Evropi i Aziji, pri čemu su evropski sojevi virulentniji [343-346]. Takođe, opisane su i razlike u redistribuciji mononuklearnih ćelija između polova [347].

CD38 je multifunkcionalni protein koji se eksprimira na ćelijama urođenog i stečenog imuniteta. Konstitutivna ekspresija CD38 na monocitima u perifernoj krvi se povećava u inflamatornim uslovima, a povećanje gustine ovog proteina na površini ćelije doprinosi proinflamatornom fenotipu monocita [348]. Ekspresija CD23, nisko afinitetnog receptora za IgE, kod ljudskih monocita se povećava pod dejstvom IL-4 i predstavlja antiinflamatorni fenotip [349]. Stoga, kako bi se dalje definisale funkcionalne promene u subpopulacijama monocita tokom infekcije, posmatrali smo ekspimiranje površinskih molekula CD38 i CD23. Naši rezultati ukazuju na visoku ekspresiju kako CD38, tako i CD23 na monocitima kod pacijenata sa teškom bolešću. Dok su u kontrolnoj grupi dvostruko pozitivne ćelije bile odsutne ili prisutne u vrlo niskom procentu, kod pacijenata sa COVID-19 pronađen je veliki broj monocita koji koekspimiraju CD23 i CD38 u intermedijernoj i ne-klasičnoj subpopulaciji. Važno je napomenuti da su kod TB pacijenata u obe subpopulacije gotovo sve CD23+ ćelije bile pozitivne i za CD38. Koncept M1 i M2, pro- i anti- inflamatornih monocita, koji odražava polarizaciju makrofaga u M1/M2, predstavili su Fukui i saradnici [350]. Od tada, ovaj koncept je prihvaćen od drugih istraživača [351-353]. Mešani M1/M2 fenotip je opisan u hroničnim infekcijama, autoimunim bolestima, kanceru i poremećajima koji su povezani sa fibrozom [354]. Pretpostavlja se da ovi monociti imaju i proinflamatorne i reparatorne funkcije. Redistribucija subpopulacija monocita, s M1/M2 neklasičnim monocitima koji preferencijalno migriraju u pluća [334], moglo bi da promovise i inflamaciju i fibrozu kao mehanizam za

popravku tkiva. U skladu s tim, fibroza pluća kao komplikacija teškog COVID-19, takođe, može biti značajan uzrok smrti kod pacijenata sa COVID-19 [355]. Imajući u vidu centralnu ulogu koju monociti igraju u patogenezi citokinske oluje u oštećenju pluća kod COVID-19, ovde predstavljamo potvrdu nekih već dostupnih dokaza i dodajemo neke novine o značajnim fenotipskim promenama monocita kod pacijenata sa COVID-19.

S obzirom na prethodna saznanja i na osnovu naših rezultata, možemo pretpostaviti da virus SARS-CoV-2 uzrokuje razaranje imunološkog odgovora, ali su nastale promene različite kod blagih i teških pacijenata. Kod pacijenata koji nisu razvili teške simptome, smanjenje broja limfocita je manje, a urođeni imunitet je očuvan. Uprkos smanjenju procenta B ćelija i monocita koji eksprimiraju HLA-DR, broj ukupnih DCs ćelija, mDCs ćelija i aktiviranih DCs ćelija je veći nego u kontrolnoj grupi, što upućuje na očuvanost funkcija ovih ćelija. NK ćelije, koje igraju ključnu ulogu u odbrani organizma od virusnih infekcija, takođe su prisutne u većem broju, a aktivirane NK ćelije su prisutne u istom broju kao i kod zdravih osoba. U populaciji monocita, ekspresija M2 markera CD23 je niska, kao kod zdravih kontrola. S druge strane, kod teških slučajeva, pogođena su oba ogranka imunske odbrane, i urođeni i stečeni. Broj T i B limfocita dramatično se smanjuje, kao i broj NK i DCs ćelija (ukupnih i aktiviranih). Broj ćelija koje eksprimiraju HLA-DR je drastično manji kod teških slučajeva, što odslikava nesposobnost antigen-prezentujućih ćelija da aktiviraju T-limfocite. Virus, takođe, utiče i na populaciju monocita. Zastupljenost intermedijernih i neklasičnih monocita je smanjena, što upućuje na narušeno funkcionalno sazrevanje. Povećanje procenta ćelija koje su koeksprimirale markere M1 i M2 monocita ukazuje na prolongiranu inflamaciju i razvoj fibroze kao mehanizma reparacije, što oštećuje plućni parenhim i potencijalno povećava rizik od lošijih kliničkih ishoda. Sveukupno, naši rezultati ukazuju na deterioraciju odbrane domaćina kod teških pacijenata i promenjen, ali efikasniji imunski odgovor kod pacijenata s lakim/umerenim simptomima.

LITERATURA

317. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev.* 2020;7(6):998-1002.
318. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020 Jul 28;71(15):762-768.
319. Zheng Y, Huang Z, Ying G, Zhang X, Ye W, Hu Z, et al. Study of the lymphocyte change between COVID-19 and non-COVID-19 pneumonia cases suggesting other factors besides uncontrolled inflammation contributed to multi-organ injury. *medRxiv* 2020. doi: 10.1101/2020.02.19.20024885
320. Yao XH, Li TY, He ZC, Ping YF, Liu HW, Yu SC, et al. A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. *Chinese journal of pathology.* 2020; 49(5): 411-7.
321. Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian JQ, Du P, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;4;5(1):283.

322. Koch C, Staffler G, Hüttinger R, Hilgert I, Prager E, Černý J, et al. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *Int Immunol.* 1999; 11(5): 777-86.
323. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis.* 2020; 221(11): 1762-69.
324. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020; 17(5): 533-35.
325. Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K, et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology.* 2020; 160(3):261-8.
326. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity.* 2007; 26(4): 503-517.
327. Cifaldi L, Prencipe G, Caiello I, Bracaglia C, Locatelli F, De Benedetti F, et al. Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67(11): 3037-46.
328. Wan S, Yi Q, Fan S, Lv J, Zhang X, Guo L, et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). *medRxiv* 2020. doi: 10.1101/2020.02.10.20021832
329. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol.* 2020; 92(4): 424-432.
330. Cao W, Taylor AK, Biber RE, Davis WG, Kim JH, Reber AJ, et al. Rapid differentiation of monocytes into type I IFN-producing myeloid dendritic cells as an antiviral strategy against influenza virus infection. *J Immunol.* 2012; 189(5): 2257-65.
331. Spiegel M, Schneider K, Weber F, Weidmann M, Hufert FT. Interaction of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus with dendritic cells. *J Gen Virol.* 2006; 87(7): 1953-60.
332. Ziegler T, Matikainen S, Rönkkö E, Österlund P, Sillanpää M, Sirén J, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus fails to activate cytokine-mediated innate immune responses in cultured human monocyte-derived dendritic cells. *J Virol.* 2005; 79(21): 13800-5.
333. Law HK, Cheung CY, Ng HY, Sia SF, Chan YO, Luk W, et al. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood.* 2005; 106(7): 2366-74.
334. Lau YL, Peiris JS, Law HK. Role of dendritic cells in SARS coronavirus infection. *Hong Kong Med J.* 2012; 18: 28-30.
335. Lombardi A, Trombetta E, Cattaneo A, Castelli V, Palomba E, Tirone M, et al. Early phases of COVID-19 are characterized by a reduction of lymphocyte populations 3 and the presence of atypical monocytes. *Front Immunol.* 2020; 11:560330.
336. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(6): 992-1000.e3.
337. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. *Pediatr Clin North Am.* 2008; 55(3): 647-68.

338. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, et al. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 2020; 1– 10.
339. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011; 118(5): e16-e31.
340. Gatti A, Radrizzani D, Viganò P, Mazzone A, Brando B. Decrease of non-classical and intermediate monocyte subsets in severe acute SARS-CoV-2 infection. *Cytometry Part A.* 2020; 97:887-90.
341. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L, Almire C, Hénon C, Kosmider O, Droin N, Rameau P. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. *Cell.* 2020; 182:1401-18.
342. Sánchez-Cerrillo I, Landete P, Aldave B, Sánchez-Alonso S, Sánchez-Azofra A, Marcos-Jiménez A, et al. COVID-19 severity associates with pulmonary redistribution of CD1c+ DCs and inflammatory transitional and nonclassical monocytes. *J Clin Invest.* 2020;130(12):6290-300.
343. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, Masciovecchio C, Angeletti S, Ciccozzi M, Gallo RC, Zella D, Ippodrino R. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med.* 2020; 18:179.
344. Bartolini B, Rueca M, Gruber CEM, Messina F, Carletti F, Giombini E, Lalle E, Bordi L, Matusali G, Colavita F, Castilletti C, Vairo F, Ippolito G, Capobianchi MR, Di Caro A. SARS-CoV-2 Phylogenetic Analysis, Lazio Region, Italy, February-March 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26:1842-45.
345. Weber S, Ramirez C, Doerfler W. Signal hotspot mutations in SARS-CoV-2 genomes evolve as the virus spreads and actively replicates in different parts of the world. *Virus research.* 2020; 289:198170.
346. Yamamoto N, Bauer G. Apparent difference in fatalities between Central Europe and East Asia due to SARS-COV-2 and COVID-19: Four hypotheses for possible explanation. *Medical hypotheses.* 2020; 144:110160.
347. Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, Klein J, Silva J, Mao T, Oh JE, Tokuyama M, Lu P. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature.* 2020; 588:315-20.
348. Amici SA, Young NA, Narvaez-Miranda J, Jablonski KA, Arcos J, Rosas L, et al. CD38 Is Robustly Induced in Human Macrophages and Monocytes in Inflammatory Conditions. *Front Immunol.* 2018; 10:1593.
349. Vercelli D, Jabara TH, Lee BW, Woodland N, Geha RS, Leung DYM. Human recombinant interleukin 4 induces FcR2/CD23 on normal human monocytes. *J Exp. Med* 1988; 167: 1406-16.
350. Fukui S, Iwamoto N, Masuyama R, Kosai K, Yanagihara K, Kawakami A. FRI0017 A novel concept of M1 and M2 monocytes in rheumatoid arthritis: pro-inflammatory monocyte polarization imbalance, anti-citrullinated protein antibody and osteoclastogenesis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2017; 76:486.

351. Trombetta AC, Soldano S, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Paolino S, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir Res* 2018; 19:186.
352. Hou J, Zhang M, Ding Y, Wang X, Li T, Gao P, et al. Circulating CD14+CD163+CD206+ M2 Monocytes Are Increased in Patients with Early Stage of Idiopathic Membranous Nephropathy. *Mediators Inflamm.* 2018; 2018:5270657.
353. Fukui S, Iwamoto N, Takatani A, Igawa T, Shimizu T, Umeda M, et al. M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis. *Front Immunol.* 2018; 8:1958.
354. Taroni JN, Greene CS, Martyanov V, Wood TA, Christmann RB, Farber HW, et al. A novel multi-network approach reveals tissue-specific cellular modulators of fibrosis in systemic sclerosis. *Genome Med.* 2017; 9(1): 27.
355. Spagnolo P, Balestro E, Aliberti S, Cocconcelli E, Biondini D, Della Casa G, et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a call to arms? *Lancet Respir Med.* 2020; 8(8):750-2.

PRILOG 2

U tabelama 25 i 26 je predstavljena distribucija ćelija bele krvne loze prema alelima, genotipovima i genotipskim grupama ispitivanih polimorfizama na *IFNL3* i *IFNL4* lokusu. Među ispitivanim parametrima, ukupni broj leukocita se značajno razlikovao među alelima *IFNL4*. Preciznije, prisustvo divljeg alela povezano je sa većim brojem leukocita.

Tabela 25. Distribucija ćelija bele krvne loze prema polimorfizmima na *IFNL3* lokusu

		WBC (x10 ⁹)		Neutrofili (%)		Limfociti (%)		N/L		Monociti (%)	
		Md (IQR)	<i>p</i>	Md (IQR)	<i>p</i>	Md (IQR)	<i>p</i>	Md (IQR)	<i>p</i>	Md (IQR)	<i>p</i>
<i>IFNL3</i>											
Aleli											
rs8099917	T	6,21(4,60-8,00)	0,097	75,00(63,52-85,00)	0,402	15,00(8,58-23,60)	0,390	5,33(2,64-9,90)	0,462	8,00(5,10-11,48)	0,207
	G	5,00(4,08-7,65)		71,00(62,00-84,00)		16,00(8,65-26,67)		4,19(2,36-9,88)		8,30(6,24-11,33)	
rs12980275	A	6,23(4,69-8,00)	0,660	76,40(64,00-85,00)	0,440	15,00(8,50-23,00)	0,170	5,40(2,68-10,00)	0,355	8,00(5,20-11,00)	0,060
	G	5,78(4,19-7,90)		72,00(61,80-84,24)		16,15(8,79-26,67)		4,35(2,38-9,88)		8,47(6,00-11,87)	
Genotipovi											
rs8099917	T/T	6,52(4,99-8,35)	0,175	75,00(61,80-84,72)	0,504	13,00(7,50-23,00)	0,710	5,03(2,65-9,95)	0,697	7,00(4,00-11,00)	0,331
	T/G	5,01(4,20-7,65)		73,30(62,00-84,00)		13,70(8,65-23,63)		5,33(2,59-9,76)		8,37(6,05-11,00)	
	G/G	6,7(3,51-8,32)		65,00(58,95-74,00)		18,91(6,80-28,23)		3,15(1,99-9,88)		7,50(5,64-11,50)	
rs12980275	A/A	6,60(5,20-9,35)	0,086	75,00(63,77-84,00)	0,670	13,00(7,25-22,01)	0,370	5,47(3,06-10,00)	0,607	7,00(4,00-11,00)	0,099
	A/G	5,88(4,20-7,71)		73,00(61,25-84,72)		13,40(8,15-25,23)		5,13(2,38-9,89)		8,00(5,10-11,00)	
	G/G	5,80(3,63-9,65)		67,01(61,15-76,30)		18,46(10,00-28,23)		3,52(2,21-7,98)		9,90(7,00-13,50)	
Genotipske grupe											
Dominantni genetički model											
rs8099917	T/T	6,52(4,99-8,35)	0,066	75,00(61,80-84,72)	0,668	13,00(7,50-23,00)	0,440	5,03(2,65-9,95)	0,622	7,00(4,00-11,00)	0,148
	T/G + G/G	5,02(4,18-7,92)		72,00(61,71-84,00)		15,00(8,15-24,51)		4,93(2,42-9,88)		8,10(6,05-11,00)	
rs12980275	A/A	6,00(5,20-9,34)	0,072	75,00(63,76-84,00)	0,585	13,00(7,25-22,01)	0,230	5,47(3,06-10,00)	0,463	7,00(4,00-11,00)	0,172
	A/G + G/G	5,88(4,20-7,90)		72,00(61,25-84,24)		15,00(8,15-25,54)		4,63(2,38-9,89)		8,00(5,80-11,28)	
Recesivni genetički model											
rs8099917	T/T + T/G	6,20(4,45-8,05)	0,751	74,00(62,00-84,24)	0,242	13,00(8,00-23,00)	0,610	5,33(2,64-9,89)	0,416	8,00(5,00-11,00)	0,880
	G/G	5,8(3,63-9,65)		65,00(58,94-74,00)		18,91(6,80-28,23)		3,15(1,99-9,88)		7,50(5,64-11,50)	
rs12980275	A/A + A/G	6,21(4,44-8,05)	0,679	74,00(61,60-84,48)	0,404	13,00(8,00-23,00)	0,207	5,33(2,62-9,90)	0,390	7,75(4,90-11,00)	0,058
	G/G	5,80(3,63-9,65)		67,01(61,15-76,30)		18,46(10,00-28,23)		3,52(2,21-7,98)		9,90(7,00-13,50)	

Tabela 26. Distribucija ćelija bele krvne loze prema polimorfizmima na *IFNL4* lokusu

		WBC (x10 ⁹)		Neutrofili (%)		Limfociti (%)		N/L		Monociti (%)	
		Md (IQR)	<i>p</i>	Md (IQR)	<i>p</i>	Md (IQR)	<i>p</i>	Md (IQR)	<i>p</i>	Md (IQR)	<i>p</i>
<i>IFNL4</i>											
Aleli											
rs12979860	C	6,25(4,69-8,00)	0,037	75,80(64,00-85,00)	0,450	15,00(8,50-23,00)	0,140	5,40(2,79-10,00)	0,314	8,00(5,66-11,00)	0,137
	T	5,56(4,14-7,59)		74,50(61,51-884,24)		16,14(8,79-26,67)		4,35(2,38-9,88)		8,10(6,00-77,87)	
rs368234815	TT	6,25(4,60-8,00)	0,043	75,80(64,00-85,00)	0,491	15,00(8,58-23,00)	0,170	5,40(2,80-9,90)	0,376	8,00(5,66-11,00)	0,178
	ΔG	5,56(4,15-7,59)		71,50(61,51-84,72)		16,15(8,44-26,67)		4,35(2,38-9,89)		8,10(6,00-11,87)	
Genotipovi											
rs12979860	C/C	6,60(5,17-9,45)	0,073	75,00(63,77-84,50)	0,683	13,00(7,00-22,01)	0,290	5,40(3,06-10,04)	0,536	7,45(4,00-10,92)	0,286
	C/T	5,88(4,20-7,56)		73,00(61,42-84,00)		13,00(8,58-24,95)		5,47(2,43-9,89)		8,00(5,20-11,00)	
	T/T	5,40(3,56-8,60)		65,02(59,00-79,00)		21,20(8,30-29,60)		3,28(1,99-9,88)		8,30(7,00-12,00)	
rs368234815	TT/TT	6,60(5,09-9,35)	0,094	75,00(63,52-84,00)	0,701	13,00(7,25-22,01)	0,330	5,40(3,06-10,00)	0,574	7,90(4,00-10,92)	0,335
	TT/ΔG	5,88(4,24-7,56)		73,00(61,42-84,48)		13,00(8,00-24,95)		5,47(2,43-9,89)		7,70(5,20-11,00)	
	ΔG/ΔG	5,40(3,56-8,60)		65,02(59,00-79,00)		21,20(8,30-29,60)		3,28(1,99-9,88)		8,30(7,00-12,00)	
Genotipske grupe											
Dominantni genetički model											
rs12979860	C/C	6,60(5,17-9,45)	0,023	75,00(63,77-84,50)	0,606	13,00(7,00-22,01)	0,240	5,40(3,06-10,04)	0,467	7,45(4,00-10,92)	0,244
	C/T + T/T	5,78(4,20-7,62)		72,21(61,08-84,00)		15,00(8,30-25,50)		4,74(2,42-9,88)		8,00(5,66-11,65)	
rs368234815	TT/TT	6,60(5,09-9,35)	0,030	75,00(63,52-84,00)	0,676	13,00(7,25-22,01)	0,320	5,40(3,06-10,00)	0,582	7,90(4,00-10,92)	0,336
	TT/ΔG + ΔG/ΔG	5,78(4,20-7,62)		72,21(61,08-84,48)		15,00(8,00-25,50)		4,74(2,42-9,89)		8,00(5,66-11,65)	
Recesivni genetički model											
rs12979860	C/C+C/T	6,21(4,46-8,05)	0,414	74,00(62,00-84,00)	0,410	13,00(8,00-23,00)	0,180	5,40(2,64-9,89)	0,306	7,80(5,00-11,00)	0,172
	T/T	5,40(3,56-8,60)		65,02(59,00-79,00)		21,20(8,30-29,60)		3,28(1,99-9,88)		8,30(7,00-12,00)	
rs368234815	TT/TT+TT/ΔG	6,21(4,46-8,05)	0,414	74,00(62,00-84,00)	0,410	13,00(8,00-23,00)	0,180	5,40(2,64-9,89)	0,306	7,80(5,00-11,00)	0,172
	ΔG/ΔG	5,40(3,56-8,60)		65,02(59,00-79,00)		21,20(8,30-29,60)		3,28(1,99-9,88)		8,30(7,00-12,00)	

BIOGRAFIJA AUTORA

Mr farm. Sanja Matić rođena je 02.05.1992. god. u Kosovskoj Mitrovici. Završila je osnovnu školu „Sveti Sava“ i gimanziju “Kosovska Mitrovica”, prirodno-matematički smer, kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Integrisane akademske studije farmacije na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu upisala je 2011. god., a diplomirala je 2016. god. sa prosečnom ocenom 9,48. Položila je stručni ispit pred komisijom Ministarstva zdravlja 2017. god.

Od 2015. god. započinje sa naučno-istraživačkim radom pod mentorstvom prof. dr Dejana Baskića. U oktobru 2016. god. upisuje Doktorske akademske studije na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu na izbornom području Istraživanja u farmaciji. Od decembra 2018. god. zapošljava se kao istraživač pripravnik na projektu „Preklinička ispitivanja bioaktivnih supstanci – PIBAS“ po pozivu mladim istraživačima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Angažuje se i kao facilitator na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za naučnu oblast Farmaceutska tehnologija, potom Farmakokinetika, a od septembra 2020. god. za užu naučnu oblast Farmaceutska mikrobiologija. Od februara 2021. god. radila je u svojstvu saradnika u nastavi na predmetu Farmaceutska mikrobiologija. Iste godine postaje član tima projekta pod rukovodstvom prof. dr Dejana Baskića pod nazivom „Humane genetičke i epigenetičke determinante podložnosti, težine i ishoda SARS-CoV-2 infekcije – SVETOVID-19“. Od februara 2022. god. dobija zvanje asistenta za užu naučnu oblast Farmaceutska mikrobiologija.

Objavila je 20 radova u časopisima od međunarodnog i nacionalnog značaja i učestvovala na više nacionalnih i internacionalnih kongresa. Član je Saveza farmaceutskih udruženja Srbije i Društva imunologa Srbije

BIBLIOGRAFIJA AUTORA

Radovi štampani u časopisima od međunarodnog značaja:

1. **Matic S**, Milovanovic D, Mijailovic Z, Djurdjevic P, Sazdanovic P, Stefanovic S, Todorovic D, Popovic S, Vukicevic V, Vukic M, Vukovic N, Milivojevic N, Zivanovic M, Jakovljevic V, Filipovic N, Baskic D, Djordjevic N. It's all about IFN- λ 4: Protective role of *IFNL4* polymorphism against COVID-19-related pneumonia in females. *J Med Virol*. 2023. doi: 10.1002/jmv.29152. *M21a*; *IF*=20,693
2. **Matic S**, Milovanovic D, Mijailovic Z, Djurdjevic P, Sazdanovic P, Stefanovic S, Todorovic D, Popovic S, Vukicevic V, Vukic M, Vukovic N, Milivojevic N, Zivanovic M, Jakovljevic V, Filipovic N, Baskic D, Djordjevic N. *IFNL3/4* polymorphisms as a two-edged sword: an association with COVID-19 outcome. *J Med Virol*. 2023; 95(2):e28506. doi: 10.1002/jmv.28506. *M21a*; *IF*=20,693
3. Cicaric N, Canovic V, Stojkovic M, Matic S, Stefanovic S, Popovic S, Todorovic D, Djordjevic N, Radenkovic B, Radenkovic M, Antic V and Baskic D. Silent SARS-CoV-2 infection: seroprevalence study of SARS-CoV-2 anti- nucleocapsid IgG antibodies in Kragujevac, Serbia. *Acta Virol*. 2023 67:11996. doi: 10.3389/av.2023.11996 *M23*; *IF*=1,7
4. Đorđević N, **Matić S**, Milovanović D, Stefanović S, Popović S, Todorović D, Đurđević P, Sazdanović P, Antić V, Lončar S, Bukumira S. Effectiveness of a third dose of COVID-19 vaccines against delta variant of SARS-COV-2: A Serbian cohort study. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2023. doi:10.2298/SARH221217082D. *M23*; *IF*=0,2
5. Međedović M, Rilak A, Cocic D, Senft L, **Matić S**, Todorović D, Popovic S, Baskic D, Petrovic B. New ruthenium (II) complexes with quinone diimine and substituted bipyridine as inert ligands: Synthesis, characterization, mechanism of action, DNA/HSA binding affinity and cytotoxic activity. *Dalton Transactions*. 2023;52(5):1323-44. *M21*; *IF*=4,569
6. Mihajlovic K, Joksimovic N, Petronijevic J, Filipovic I, Jankovic N, Milovic E, Popovic S, **Matic S**, Baskic D. Anticancer potential of some β -diketonates: DNA interactions, protein binding properties, and molecular docking study. *Nat. Prod. Res*. 2022. DOI: 10.1080/14786419.2022.2148245. *M22*; *IF*=2,488
7. Kocovic A, Jeremic J, Bradic J, Sovrlc M, Tomovic J, Vasiljevic P, Andjic M, Dragicin N, Grujovic M, Mladenovic K, **Matic S**, Baskic D. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Activity of Different Extracts of *Xanthoparmelia stenophylla* Lichen from Stara Planina, Serbia. *Plants*. 2022; 11(13): p.1624. *M21*; *IF*=4,685
8. Mihajlović K, Joksimović N, Radisavljević S, Petronijević J, Filipović I, Janković N, Milović E, Popović S, **Matić S**, Baskić D. Examination of antitumor potential of some acylpyruvates, interaction with DNA and binding properties with transport protein. *Journal of Molecular Structure*. 2022;1270:133943. *M22*; *IF*=3,841
9. Joksimović N, Petronijević J, Milović E, Janković N, Baskić D, Popović S, Todorović D, **Matić S**, Vraneš M, Tot A. Synthesis, characterization, antitumor potential, BSA and DNA binding properties, and molecular docking study of some novel 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones. *Medicinal Chemistry*. 2022;18(3):337-52. *M23*; *IF*=2,329
10. Popovic A, Deljanin M, Popovic S, Todorovic D, Djurdjevic P, **Matic S**, Stankovic M, Avramovic D, Baskic D. Chelidonium majus crude extract induces activation of peripheral blood mononuclear cells and enhances their cytotoxic effect toward HeLa cells. *International Journal of Environmental Health Research*. 2021:1-3. *M21*; *IF*=4,477
11. Mićović T, Topalović D, Živković L, Spremo-Potparević B, Jakovljević V, **Matić S**, Popović S, Baskić D, Stešević D, Samardžić S, Stojanović D. Antioxidant, antigenotoxic and cytotoxic activity of essential oils and methanol extracts of *hyssopus officinalis* L. *Subsp. aristatus* (godr.) nyman (lamiaceae). *Plants*. 2021;10(4):711. *M21*; *IF*=4,685

12. **Matic S**, Popovic S, Djurdjevic P et al. SARS-CoV-2 infection induces mixed M1/M2 phenotype in circulating monocytes and alterations in both dendritic cell and monocyte subsets. *PloS one*. 2020;15(12):e0241097. *M22; IF= 3,752*
13. Djukić MB, Jeremić MS, Filipović IP, Klisurić OR, Jelić RM, Popović S, **Matić S**, Onnis V, Matović ZD. Ruthenium (II) Complexes of Isothiazole Ligands: Crystal Structure, HSA/DNA Interactions, Cytotoxic Activity and Molecular Docking Simulations. *ChemistrySelect*. 2020 ;5(37):11489-502. *M23; IF=2,307*
14. **Matic S**, Radosavljevic I, Jankovic S, Natasa D. IL-10-1082G> A polymorphism, use of opioids and age affect the course of acute pancreatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2020;32(2):178-85. *M23; IF=2,586*
15. Čočić D, Jovanović-Stević S, Jelić R, **Matić S**, Popović S, Djurdjević P, Baskić D, Petrović B. Homo- and hetero-dinuclear Pt (II)/Pd (II) complexes: studies of hydrolysis, nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions, DFT calculations, molecular docking and cytotoxic activity. *Dalton Transactions*. 2020;49(41):14411-31. *M21; IF= 4,569*
16. Čočić D, Jovanović S, Radisavljević S, Korzekwa J, Scheurer A, Puchta R, Baskić D, Todorović D, Popović S, **Matić S**, Petrović B. New monofunctional platinum (II) and palladium (II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interaction, and cytotoxic activity. *Journal of inorganic biochemistry*. 2018;189:91-102. *M21; IF= 4,336*
17. Vukic MD, Vukovic NL, Popovic SL, Todorovic DV, Djurdjevic PM, **Matic SD**, Mitrovic MM, Popovic AM, Kacaniova MM, Baskic DD. Effect of β -cyclodextrin encapsulation on cytotoxic activity of acetylshikonin against HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;28(1):136-46. *M22; IF=4,562*
18. Joksimović N, Petronijević J, Janković N, Baskić D, Popović S, Todorović D, **Matić S**, Bogdanović GA, Vraneš M, Tot A, Bugarčić Z. Synthesis, characterization, anticancer evaluation and mechanisms of cytotoxic activity of novel 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones bearing thenoyl fragment: DNA, BSA interactions and molecular docking study. *Bioorganic chemistry*. 2019;88:102954. *M21; IF=5,307*
19. Mišić M, Čukić J, Vidanović D, Šekler M, **Matić S**, Vukašinović M, Baskić D. Prevalence of genotypes that determine resistance of staphylococci to macrolides and lincosamides in Serbia. *Frontiers in public health*. 2017;5:200. *M21; IF=6,461*

Radovi štampani u časopisima od nacionalnog značaja:

20. **Matic S**, Popovic S, Baskic D, Todorovic D, Vukovic N, Stankovic M, Djurdjevic P, Zdravkovic N, Mijailovic Z. Methanolic Extract of Teucrium Polium Exerts Immunomodulatory Properties in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2020. DOI: 10.2478/sjecr-2020-0018

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:


„Утицај полиморфизма *ACE2*, *IFNL3* и *IFNL4* гена на тежину клиничке слике и исход COVID-19“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 24.11.2023. године



потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
„Утицај полиморфизма *ACE2*, *IFNL3* и *IFNL4* гена на тежину клиничке слике и исход
COVID-19“
истоветне.

У Крагујевцу, 24.11.2023. године



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРНИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Сања Матић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Утицај полиморфизма *ACE2*, *IFNL3* и *IFNL4* гена на тежину клиничке слике и исход COVID-19“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам


не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следћих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 24.11.2023. године



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>