

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Marija R. Vukčević

**Analiza seroloških markera imunskog
odgovora i parametara redoks statusa nakon
primene buster doze COVID-19 vakcina**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Marija R. Vukčević

**Analysis of serological markers of immune
response and redox status parameters
following the administration of a COVID-19
vaccine booster dose**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Komisija za odbranu doktorske disertacije

Mentori:

dr Milan Nikolić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet
Katedra za biohemiju

dr Aleksandra Nikolić Kokić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

dr Marija Gavrović Jankulović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet
Katedra za biohemiju

dr Marija Stojadinović, docent
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet
Katedra za biohemiju

dr Ana Banko, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
Institut za mikrobiologiju i imunologiju

Datum odbrane:

*Nije bitno koliko sporo ideš
sve dok ne staješ!*

Konfučije

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija nastala je kao rezultat saradnje više ustanova, a realizovana je na Odeljenju za laboratorijsku dijagnostiku Zavoda za biocide i medicinsku ekologiju u Beogradu, u saradnji sa Odeljenjem za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, i Katedrom za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

‡ Zahvaljujem se svom mentoru, *vanrednom profesoru dr Milanu Nikoliću*, sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na izuzetnoj stručnoj podršci, nesebičnom zalaganju i vrednim, uvek preciznim i konstruktivnim sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije. Njegovo znanje, iskustvo i posvećenost bili su od neprocenjivog značaja u svakoj fazi ovog dugog i zahtevnog istraživačkog puta.

‡ Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, naučnom savetniku *dr Aleksandri Nikolić Kokić*, sa Odeljenja za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, na nesebičnoj podršci, razumevanju i strpljenju tokom čitavog rada. Njena upornost, energija i stalno podsticanje da idem korak dalje bile su neizmerna motivacija i inspiracija. Rad sa njom bio je ne samo prilika za sticanje znanja, već i za lični i profesionalni rast.

‡ Duboku zahvalnost izražavam *prof. dr Tanji Jovanović*, iz Zavoda za biocide i medicinsku ekologiju, od koje sam imala privilegiju mnogo da naučim. Njena podrška, posvećenost i inspirativan odnos prema nauci pokazali su mi šta zaista znači ljubav prema istraživanju i akademskom radu. Svojim primerom, razumevanjem i prisustvom bila je oslonac i podstrek tokom čitavog procesa mog profesionalnog razvoja.

‡ Sa zahvalnošću ističem podršku *prim. dr Dragani Despot*, čije su razumevanje, podrška i poverenje imali veliku ulogu u mom profesionalnom i istraživačkom razvoju. Njena posvećenost, energija i istinska briga za zaposlene predstavljali su inspiraciju i podsticaj da se uvek teži napretku i izvrsnosti — kako u nauci, tako i u svakodnevnom radu.

‡ Zahvaljujem se članovima komisije, redovnom profesoru *dr Mariji Gavrović Jankulović* i docentu *dr Mariji Stojadinović*, sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na svakom komentaru, sugestiji i vremenu koje su posvetile ovom radu, kao i na tome što su pristale da budu deo komisije. Hvala im na znanju koje su tokom studija nesebično prenosile studentima i na posvećenosti kojom su uvek podsticale razvoj i radoznalost mladih istraživača.

‡ Zahvalnost dugujem i *dr Ani Banko*, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na dragocenim komentarima, sugestijama i neiscrpoj želji za unapređenjem i razvojem novih ideja. Njena stručnost, entuzijazam i otvorenost za saradnju bili su podstrek i oslonac u svakom koraku ovog i mnogih drugih zajedničkih istraživanja.

‡ Zahvaljujem se i *dr Vladimiru Beškoskom*, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji me je još 2016. godine prvi uveo u svet nauke. Njegova podrška, otvorenost i spremnost da prenese znanje bili su moj prvi korak ka istraživačkom radu i temelj ljubavi prema nauci koju i danas nosim — za šta mu dugujem iskrenu i neizmernu zahvalnost.

‡ Takođe se zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze, jer su učestvovali u razvijanju ideja, realizaciji eksperimenata, interpretaciji rezultata i izradi publikacija. Posebnu zahvalnost dugujem *dr Dušku Blagojeviću*, naučnom savetniku sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, čija su stručnost, posvećenost i timski duh značajno doprineli kvalitetu i uspehu ovog istraživanja.

‡ Posebno mesto u mom profesionalnom razvoju zauzima Laboratorija za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, gde sam provela nezaboravan period i načinila svoje prve korake u praktičnom svetu istraživanja. Od srca se zahvaljujem *dr Jeleni Samardžić, dr Miloradu Kojiću, dr Miri Milisavljević, dr Jeleni Malešević, dr Ivani Nikolić* i budućem doktoru nauka Sofiji Nešić, čija su podrška, toplina i spremnost da podele znanje imali veliki uticaj na moj dalji profesionalni put i razvoj istraživačkog duha.

‡ Zahvaljujem se svojim dragim kolegama iz Zavoda za biocide i medicinsku ekologiju, a posebno mojim kolegamicama iz Odseka za biohemijska ispitivanja, na podršci, razumevanju i svakodnevnoj saradnji. Zajedno smo delili i lepe i teške dane, smeh, stres i uspehe — i upravo to je ovaj put učinilo posebnim i nezaboravnim.

‡ Zahvalnost dugujem i Vladimiru Kešelju i Vasiliju Kešelju, koji su deo rezultata ovog doktorskog istraživanja koristili u okviru svojih završnih radova. Rad sa njima bio je istovremeno ozbiljan i zabavan – ispunjen radoznalošću, posvećenošću i dobrim raspoloženjem, što je čitav istraživački proces učinilo bogatijim i prijatnijim iskustvom.

‡ Zahvaljujem se i svim učesnicima istraživanja, kao i članovima njihovih porodica, na saglasnosti da učestvuju u studiji i na saradnji tokom njenog sprovođenja.

Posebnu zahvalnost dugujem:

‡ Svojoj sestri *Marini*, koja je, htela ili ne, zajedno sa mnom prošla sve trenutke ovog dugog puta, i one teške i one lepe. Njena podrška, razumevanje i bezrezervna vera u mene bili su snaga koja me pratila čak i u trenucima kada sam posustajala.

‡ Svojoj porodici — *mami, tati, nani i bratu Dušanu* — koji su, iako kilometrima daleko, bili uz mene u svakom trenutku. Delili su moje brige, sumnje i radosti, bodrili me i kad je bilo najteže, i činili da nijedna daljina ne može da umanji njihovu podršku i ljubav.

‡ Svojim *prijateljima* na podršci, razumevanju i prisustvu. Njihovo prijateljstvo i vera u mene značili su mnogo više nego što reči mogu da izraze.

‡ Svima koji su na bilo koji način doprineli ovom radu — hvala od srca!

‡ Na kraju, posebnu zahvalnost dugujem osobi koja više nije sa nama, a koja je jednako delila sve trenutke mog života i svakog mog postignuća — *svom dedi*.

P. S. Dodika, pisanije su konačno završene!

Marija Vukčević

Analiza seroloških markera imunskog odgovora i parametara redoks statusa nakon primene buster doze COVID-19 vakcina

Sažetak

Pandemija COVID-19 pokazala je da je vakcinacija jedna od najefikasnijih mera u prevenciji teških oblika bolesti i smrtnog ishoda. Razvoj različitih tipova vakcina – iRNK, vektorskih i inaktivisanih – omogućio je globalni odgovor na krizu, ali je otvorio pitanja o trajanju i kvalitetu stečenog imuniteta, posebno u kontekstu pojave novih varijanti SARS-CoV-2 virusa. U tom smislu, buster (treća) doza vakcine i heterologna vakcinacija pokazale su potencijal za snažniji i dugotrajniji imunski odgovor na virus. Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je da se ispita stanje humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora i redoks statusa nakon primene buster doze COVID-19 vakcina.

Studija je obuhvatila 513 ispitanika, podeljenih prema vrsti vakcine koju su primili (Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19, Pfizer-BioNTech, Sputnik V, heterogene kombinacije vakcina), COVID-19 statusu i prisustvu hroničnih bolesti. Praćeni su, standardizovanim biohemijskim metodama, nivoi anti-IgG, anti-IgM, neutrališuća antitela, IFN- γ , kao i redoks parametri (ukupni proteini, albumin, nitriti, tioli, DPPH, FRAP) u serumu ispitanika. Statistička obrada rezultata uključila je ANOVA, korelaciju i regresione analize.

Rezultati su pokazali da treća doza COVID-19 vakcina značajno pojačava humoralni imunski odgovor u svim analiziranim grupama, naročito kod heterolognih kombinacija vakcina i kod ispitanika sa prethodno preležanom infekcijom. Hibridni imunitet (COVID-19+ ispitanici) se izdvojio kao najefikasniji oblik zaštite od SARS-CoV-2 virusa, sa najvišim nivoima antitela i očuvanom aktivnošću IFN- γ šest meseci nakon vakcinacije. Suprotno tome, kod COVID-19- ispitanika zabeležen je pad nivoa antitela tokom vremena, što ukazuje na slabljenje imunske memorije u odsustvu prirodne infekcije. Analiza redoks statusa pokazala je da prethodna infekcija, starija životna dob i komorbiditeti doprinose smanjenju antioksidativnog kapaciteta u serumu, dok su viši nivo proteina i bolji nutritivni status bili pozitivno povezani sa serumskom koncentracijom antitela i vrednostima parametara redoks homeostaze.

Rezultati ove disertacije ukazuju da buster vakcinacija, naročito u kontekstu hibridnog imuniteta, omogućava postizanje snažnog i dugotrajnijeg imunskog odgovora, uz prateće promene u redoks homeostazi. Ovi nalazi doprinose dubljem razumevanju međusobne povezanosti vakcinacije, imunskog odgovora i redoks homeostaze, što može imati značajne implikacije za unapređenje strategija imunoprofilakse i kliničku procenu efikasnosti vakcina.

Ključne reči: COVID-19, vakcina, buster doza, humoralni imunitet, ćelijski imunitet, hibridni imunitet, redoks homeostaza, oksidativni stres

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

Analysis of serological markers of immune response and redox status parameters following the administration of a COVID-19 vaccine booster dose

Abstract

The COVID-19 pandemic has shown that vaccination is one of the most effective measures in preventing severe forms of the disease and death. The development of different types of vaccines – mRNA, vector-based and inactivated – has enabled a global response to the crisis, but has also raised questions about the duration and quality of acquired immunity, particularly in the context of the emergence of new variants of the SARS-CoV-2 virus. In this regard, the booster (third) dose of the vaccine and heterologous vaccination have shown the potential for a stronger and longer-lasting immune response against the virus. The aim of the research in this dissertation was to examine the state of humoral and cellular immune responses and redox status following the administration of a booster dose of COVID-19 vaccines.

The study included 513 subjects, divided by vaccine type (Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19, Pfizer-BioNTech, Sputnik V, heterogeneous vaccine combinations), COVID-19 status, and presence of chronic diseases. The levels of anti-IgG, anti-IgM, neutralizing antibodies, IFN- γ , as well as redox parameters (total proteins, albumin, nitrites, thiols, DPPH, FRAP) in the subjects serum were monitored using standardized biochemical methods. Statistical analysis of the results included ANOVA, correlation, and regression analyses.

The results showed that the third dose of COVID-19 vaccine significantly enhanced the humoral immune response in all analyzed groups, especially in heterologous vaccine combinations and in subjects with a previous infection. Hybrid immunity (COVID-19+ subjects) proved to be the most effective form of protection against the SARS-CoV-2 virus, with the highest antibody levels and preserved IFN- γ activity six months after vaccination. Conversely, in COVID-19–individuals, a decrease in antibody levels was observed over time, indicating a weakening of immune memory in the absence of natural infection. Analysis of redox status showed that previous infection, older age and comorbidities contribute to a decrease in serum antioxidant capacity, while higher protein levels and better nutritional status were positively associated with serum antibody concentrations and redox homeostasis parameter values.

The results of this dissertation highlight that booster vaccination, especially in the context of hybrid immunity, enables the achievement of a strong and long-lasting immune response, with accompanying changes in redox homeostasis. These findings contribute to a deeper understanding of the interrelationship between vaccination, immune response, and redox homeostasis, which could have significant implications for improving immunoprophylaxis strategies and clinical evaluation assessment of vaccine efficacy.

Keywords: COVID-19, vaccine, booster dose, humoral immunity, cellular immunity, hybrid immunity, redox status, oxidative stress

Scientific field: Chemical Sciences

Subfield: Biochemistry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. SARS-CoV-2 VIRUS	3
2.1.1. STRUKTURNI I GENOMSKI ORGANIZACIJA SARS-CoV-2 VIRUSA	3
2.1.2. MEHANIZAM INFEKCIJE I REPLIKACIJE	5
2.1.3. TRANSMISIJA SARS-CoV-2	6
2.1.4. PATOGENEZA COVID-19	6
2.1.5. COVID-19	7
2.1.6. IMUNSKI ODGOVOR U SARS-CoV-2 INFEKCIJI	8
2.1.6.1. <i>Urođeni imunski odgovor</i>	8
2.1.6.2. <i>Stečeni imunski odgovor</i>	9
2.1.7. VAKCINE PROTIV COVID-19	11
2.1.7.1. Inaktivisane vakcine	13
2.1.7.2. Vektorske vakcine	14
2.1.7.3. Vakcine bazirane na nukleinskim kiselinama	16
2.1.7.3.1. DNK vakcine	17
2.1.7.3.2. iRNK vakcine	17
2.1.7.4. Rekombinantne subjedinične vakcine	19
2.1.8. BUSTER DOZE I POTREBA ZA DODATNOM IMUNIZACIJOM	19
2.1.9. HIBRIDNI IMUNITET - SINERGIJA PRIRODNE INFEKCIJE I VAKINACIJE	21
2.2. OKSIDATIVNI STRES	22
2.2.1. REAKTIVNE KISEONIČNE VRSTE	22
2.2.2. REAKTIVNE AZOTNE VRSTE	25
2.2.3. OKSIDATIVNI STRES U PATOGENEZI COVID-19	26
2.2.4. OKSIDATIVNI STRES I IMUNSKI ODGOVOR	28
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	30
4. MATERIJAL I METODE	31
4.1. DIZAJN STUDIJE	31
4.2. SELEKCIJA ISPITANIK	31
4.3. PRAVNI I ETIČKI ASPEKTI	31
4.4. BIOLOŠKI MATERIJAL	32
4.4.1. KRV	32
4.5. METODE	32
4.5.1. ODREĐIVANJE MARKERA HUMORALNOG IMUNSKOG ODGOVORA	32
4.5.1.1. Određivanje ukupnih neutrališućih antitela	32
4.5.1.2. Određivanje specifičnih IgG antitela	33
4.5.1.2.1. Određivanje IgG antitela na S1 subjedinicu (uključujući RBD domen)	33
4.5.1.2.2. Određivanje IgG antitela na N protein	33
4.5.1.3. Određivanje specifičnih IgM antitela	34
4.5.1.3.1. Određivanje IgM antitela na S protein (RBD domen)	34
4.5.1.3.2. Određivanje IgM antitela na N protein	35

4.5.2.	ODREĐIVANJE MARKERA ČELIJSKOG IMUNSKOG ODGOVORA	35
4.5.2.1.	Određivanje koncentracije IFN γ	35
4.5.3.	ODREĐIVANJE PARAMETARA REDOKS STATUSA	36
4.5.3.1.	Određivanje koncentracije ukupnih proteina	36
4.5.3.2.	Određivanje koncentracije albumina.....	36
4.5.3.3.	Određivanje sadržaja ukupnih tiola	37
4.5.3.4.	Određivanje sadržaja nitrita.....	37
4.5.3.5.	Testovi ukupne antioksidativne aktivnosti.....	37
4.5.3.5.1.	DPPH test.....	38
4.5.3.5.2.	FRAP test.....	38
4.5.4.	STATISTIČKA ANALIZA DOBIJENIH PODATAKA	39
5.	REZULTATI	40
5.1.	OSNOVNE KARAKTERISTIKE I METODOLOŠKA PODELA UZORKA	40
5.2.	DINAMIKA HUMORALNOG IMUNSKOG ODGOVORA I REDOKS HOMEOSTAZE NAKON BUSTER DOZE VAKCINE	40
5.2.1.	DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	40
5.2.2.	ODREĐIVANJE DINAMIKE HUMORALNOG IMUNSKOG ODGOVORA	42
5.2.3.	UPOREDNA ANALIZA NIVOAA ANTI-S1 IGG ANTITELA PO VAKCINALNIM GRUPAMA	45
5.2.4.	ANALIZA REDOKS PARAMETARA PRE I POSLE TREĆE DOZE VAKCINE	47
5.2.5.	PROMENE REDOKS PARAMETARA PO VAKCINALNIM GRUPAMA	53
5.2.6.	KORELACIJA IZMEĐU NIVOAA ANTITELA I REDOKS PARAMETARA	54
5.2.7.	UTICAJ DEMOGRAFSKIH I KLINIČKIH FAKTORA NA IMUNSKI ODGOVOR I REDOKS PARAMETRE	55
5.3.	IMUNSKI I REDOKS ODGOVOR ŠEST MESECI NAKON BUSTER DOZE SINOPHARM [VERO CELL]-INACTIVATED COVID-19 VAKCINE	59
5.3.1.	DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	59
5.3.2.	PROCENA IMUNSKOG ODGOVORA	60
5.3.2.1.	Uticaj prethodne infekcije SARS-CoV-2 na imunski odgovor.....	60
5.3.2.2.	Uticaj demografskih karakteristika i komorbiditeta na imunski odgovor	62
5.3.3.	PROCENA REDOKS STATUSA	66
5.3.3.1.	Uticaj prethodne infekcije SARS-CoV-2 na redoks parametre	66
5.3.3.2.	Rezultati višestruke regresione analize.....	68
5.3.3.3.	Uticaj demografskih karakteristika i komorbiditeta na redoks parametre.....	69
5.3.4.	KORELACIONA ANALIZA REDOKS PARAMETARA I MARKERA IMUNSKOG ODGOVORA	70
6.	DISKUSIJA	72
6.1.	DINAMIKA HUMORALNOG IMUNSKOG ODGOVORA I REDOKS HOMEOSTAZE NAKON BUSTER DOZE VAKCINE	74
6.2.	IMUNSKI I REDOKS ODGOVOR ŠEST MESECI NAKON BUSTER DOZE SINOPHARM [VERO CELL]-INACTIVATED COVID-19 VAKCINE	79
7.	ZAKLJUČCI	83
8.	LITERATURA	84
9.	PRILOZI	110
10.	BIOGRAFIJA AUTORA	112

Lista skraćenica i akronima

•NO	azot-monoksid
•OH	hidroksilni radikal
8-NO ₂ -G	8-nitroguanozin
8-OHdG	8-hidroksiguanin
ACE2	engl. <i>Angiotensin 2 Converting Enzyme</i>
Ad26	humani adenovirus serotip 26
Ad5	humani adenovirus serotip 5
Anti-N IgG antitela	specifična IgG antitela za nukleokapsidni (N) protein SARS-CoV-2 virusa
Anti-N IgM antitela	specifična IgM antitela za nukleokapsidni (N) protein SARS-CoV-2 virusa
Anti-RBD IgM antitela	specifična IgM antitela za RBD domen spike (S) proteina SARS-CoV-2 virusa
Anti-S1 IgG antitela	specifična IgG antitela za S1 subjedinicu spike (S) proteina, uključujući <i>receptor binding domain</i> (RBD) SARS-CoV-2 virusa
AOC	ukupni antioksidativni kapacitet
APC	antigen-prezentujuće ćelije (engl. <i>Antigen-Presenting Cell</i>)
ARDS	akutni respiratorni distres sindrom
ATP	adenozin-trifosfat (engl. <i>Adenosine Triphosphate</i>)
BCR	engl. <i>B-cell receptor</i>
BMI	engl. <i>body mass index</i>
CAT	katalaza
CD4+	engl. <i>T helper cells</i>
CD8+	engl. <i>cytotoxic T cell</i>
ChAdOx1	nereplicirajući adenovirus šimpanze
COVID-19	engl. <i>Coronavirus disease 2019</i>
COVID-19-	ispitanici bez dokaza o prethodnoj SARS-CoV-2 infekciji
COVID-19+	ispitanici sa potvrđenom prethodnom infekcijom virusom SARS-CoV-2
CoVs	Koronavirusi
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH	2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)
E protein	engl. <i>Envelope protein</i>
EB	Endokrinološki poremećaji
ELISA	engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	engl. <i>European Medicines Agency</i>
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FRAP	engl. <i>Ferric ion reducing antioxidant power</i>

GPx	glutation-peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
GSH	glutation
GSNO	S-nitrozoglutation
GSSG	glutation-disulfid
H ₂ O ₂	vodonik-peroksid
HBsAg	engl. <i>Hepatitis B surface antigen</i>
HIV	engl. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IBD	inflamatorne bolesi creva
IgA	Imunoglobulin klase A
IgG	Imunoglobulin klase G
IgM	Imunoglobulin klase M
IGRA	engl. <i>Interferon Gamma Release Assay</i>
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
iRNK	Informaciona ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
KVB	Kardiovaskularne bolesi
LOO•	lipidni peroksilni radikal
M protein	engl. <i>Membrane protein</i>
MDA	malonildialdehid
MDA5	engl. <i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MERS	engl. <i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
MERS-CoV	engl. <i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
MHC klase I	engl. <i>Major Histocompatibility Complex class I</i>
MHC klase II	engl. <i>Major Histocompatibility Complex class II</i>
MOF	engl. <i>multiple organ failure, MOF</i>
mtROS	engl. <i>mitochondrial reactive oxygen species</i>
MVA	modifikovanom virusu Ankara
N protein	engl. <i>Nucleocapsid protein</i>
NADPH oksidaza	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza
NETs	engl. <i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
NIAID	Nacionalni institut za alergije i infektivne bolesi
NITAG	Nacionalni komitet za imunizaciju
NK ćelije	prirodne ćelije ubice
NLRP3	engl. <i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
NOS	NO-sintaza
NOX	NADPH oksidaza
nsp	engl. non-structural-proteins
NTD	N-terminalni domen

O ₂ •	superoksid anjon
ONOO ⁻	peroksinitrit
ORF	engl. <i>Open Reading Frame</i>
ORF3a	engl. <i>Open Reading Frame 3a</i>
ORF6	engl. <i>Open Reading Frame 6</i>
ORF7a	engl. <i>Open Reading Frame 7a</i>
ORF7b	engl. <i>Open Reading Frame 7b</i>
ORF8	engl. <i>Open Reading Frame 8</i>
PCR	lančana reakcija polimeraze
PPP	Ispitanici koji su primili sve tri doze Pfizer-BioNTech vakcine
PRR receptor	engl. <i>pattern recognition receptors</i>
RAAS	renin–angiotenzin–aldosteron sistem
RBD	engl. <i>Receptor Binding Domain</i> , RBD
RIG-I	Engl. <i>Retinoic acid-inducible gene</i>
RNK	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNS	engl. <i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	engl. <i>Reactive oxygen species</i>
RSC	engl. <i>Radical Scavenging Capacity</i>
RSNO	S-nitrozotoli
RSV	humani respiratorni sincicijumski virus
RTC	replikaciono-transkripcioni kompleks
S protein	engl. <i>Spike protein</i>
SARS	engl. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SARS-CoV	engl. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	engl. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
sHLH	engl. <i>secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis</i>
SOD	Superoksid-dismutaza
SpSpSP	Ispitanici koji su primili sve tri doze Sputnik V vakcine
SSP	Ispitanici koji su primili heterolognu kombinaciju – dve doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine i treću dozu Pfizer-BioNTech vakcine
SSS	Ispitanici koji su primili sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinu
SV40	engl. <i>Simian Virus 40</i>
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TBARS	engl. <i>Thiobarbituric Acid-Reactive Substances</i>
TCR	T-ćelijski receptor
Tfh	folikularne pomoćničke T ćelije
Th1	pomoćničke T ćelije tipa 1
Th17	pomoćničke T ćelije tipa 17
TLR	Engl. <i>Toll-like receptors</i>

TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TMPRSS2 proteaza	engl. <i>Transmembrane protease, serine 2</i>
TNB	5-tio-2-nitrobenzoat
TNF- α	engl. <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
Treg	regulatorne T ćelije
TRX	Tireodoksin
UV svetlo	ultraljubičasto (ultravioletno) svetlo
VITT	engl. <i>Vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia</i>
VOC	engl. <i>Variants of Concern</i>
VSV	virus vezikularnog stomatitisa
YFV	engl. <i>Yellow Fever Virus</i>

1. UVOD

Pandemija izazvana novim koronavirusom, SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), predstavlja jedan od najvećih izazova za javno zdravlje u savremenoj istoriji. Od prvih prijavljenih slučajeva u decembru 2019. godine u Vuhanu (Kina), infekcija se brzo proširila svetom, što je dovelo do toga da Svetska zdravstvena organizacija (SZO) u martu 2020. godine proglasi pandemiju. Do kraja 2024. godine, više od 770 miliona ljudi širom sveta bilo je inficirano, sa preko 7 miliona smrtnih ishoda pripisanih COVID-19 bolesti (engl. *Coronavirus disease 2019*) [1].

U odgovoru na krizu, naučna zajednica je u rekordnom roku razvila više tipova vakcina, uključujući iRNK vakcine (engl. *messenger RNA vaccines*) (Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine (BNT162b2), Moderna (mRNA-1273)), vektorske vakcine (Oxford–AstraZeneca COVID-19 vaccine, Gam-COVID-Vac (Sputnik V)) i inaktivisane vakcine (Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated, COVID-19 vaccine i Sinovac-CoronaVac COVID-19 vaccine) radi suzbijanja širenja virusa i prevencije teških formi bolesti [2–4]. Vakcinacija se pokazala kao najefikasnija strategija u smanjenju hospitalizacija i stope smrtnosti. Građani Republike Srbije najčešće su za primarnu vakcinaciju koristili inaktivisanu Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinu, dok su vakcine zasnovane na iRNK tehnologiji (Pfizer-BioNTech) i adenovirusnim vektorima (Sputnik V) bile drugi, odnosno treći izbor za vakcinaciju [5].

Nakon primarne imunizacije sa dve doze vakcine, imunski odgovor na SARS-CoV-2 vremenom je opadao ispod zaštitnog nivoa, zbog čega je preporučena treća, tzv. buster doza vakcine. Pojava i širenje novih varijanti od značaja (engl. *Variants of Concern*, VOC), koje su zahtevale viši titar neutrališućih antitela za efikasnu neutralizaciju, u kombinaciji sa slabljenjem humoralnog imunskog odgovora nakon početne vakcinacije, predstavljali su ključne razloge zbog kojih je SZO preporučila primenu treće (buster) doze [6], posebno kod osoba sa oslabljenim imunitetom i hroničnim bolestima. Izbor strategije buster vakcinacije – homologna (ista vakcina za sve doze) naspram heterologne (kombinacije različitih vakcina) – mnogo je proučavan, kako bi se utvrdio njen uticaj na imunski odgovor organizma. Homologna vakcinacija može ojačati ili smanjiti postojeće imunске odgovore tokom vremena, posebno kod inaktivisanih virusnih vakcina. Kombinovanje različitih vrsta vakcina, na primer iRNK ili virusna vektorska vakcina nakon inaktivisane vakcine, može da poboljša ukupni imunski odgovor organizma, stimulisanjem šireg i jačeg humoralnog i ćelijskog imuniteta.

Infekcija SARS-CoV-2 izaziva snažnu aktivaciju imunskog sistema, često praćenu nekontrolisanim lučenjem proinflatornih citokina tzv. citokinskom olujom, što dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i narušavanjem redoks ravnoteže. Imunizacija takođe može uticati na redoks ravnotežu organizma, kroz aktivaciju imunskog sistema i indukciju stresa. U oba slučaja, ishod zavisi od balansa između prooksidativnih i antioksidativnih mehanizama, pri čemu blagi oksidativni stres može imati stimulativni efekat na imunitet, a izražen i dugotrajan stres doprinosi imunskoj disfunkciji. Zbog toga se sve veći broj istraživanja usmerava na razumevanje uloge oksidativnog stresa tokom virusnih infekcija i njegovog uticaja na efikasnost imunskog odgovora, uključujući i odgovor nakon vakcinacije.

Redoks status predstavlja dinamičku ravnotežu između oksidativnih i antioksidativnih procesa u organizmu. Ključni element ove ravnoteže čine ROS i reaktivne azotne vrste (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS), koje se fiziološki stvaraju tokom ćelijskog metabolizma, ali i, u većim količinama, kao odgovor na infekcije, inflamaciju i stres. U normalnim uslovima, ROS/RNS učestvuju u signalizaciji unutar ćelija, fagocitozi, razgradnji patogena i kontroli ćelijskog ciklusa. Međutim, kada dođe do prekomernog nastajanja slobodnih radikala, a antioksidativni sistemi nisu u stanju da ih neutrališu, razvija se stanje oksidativnog stresa.

Ovakav disbalans može dovesti do oksidativnih oštećenja makromolekula (proteina, lipida i DNK), ali i do aktivacije inflamatornih puteva i ćelijske smrti, što ima direktne posledice na tok infekcije i jačinu imunskog odgovora organizma.

Redoks status je direktno povezan sa imunskim odgovorom. Blagi oksidativni stres stimuliše imunitet i funkciju leukocita, dok izražen i hroničan oksidativni stres inhibira proliferaciju T i B limfocita, smanjuje ekspresiju citokina i doprinosi disfunkciji ćelijskog odgovora. Takođe, oksidativni stres utiče na glikozilaciju i stabilnost antitela, što može umanjiti efikasnost humoralnog imuniteta. U kontekstu vakcinacije, redoks status može biti važan prediktivni marker imunogenosti, posebno kod starijih osoba i osoba sa komorbiditetima.

S obzirom na genetičku varijabilnost SARS-CoV-2 virusa, različite tipove vakcina i činjenicu da imunski odgovor može značajno varirati od osobe do osobe, razvija se potreba za detaljnijom analizom ne samo imunskog odgovora, već i parametara koji odražavaju stanje oksidativnog stresa i ukupne biološke odbrane organizma. Razumevanje odnosa između imunskog odgovora i redoks homeostaze nakon buster vakcinacije predstavlja ključni korak u unapređenju strategija imunizacije i identifikaciji faktora koji utiču na dugoročnu zaštitu od SARS-CoV-2 i sličnih virusa.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. SARS-CoV-2 virus

Koronavirusi (CoVs) predstavljaju grupu RNK (engl. *ribonucleic acid*) virusa koja pripada redu *Nidovirales* porodici *Coronaviridae*, koja se deli na četiri roda: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus*. Ime su dobili po svom karakterističnom izgledu pod mikroskopom – imaju izbočine nalik kruni (lat. *corona*), koje potiču od spike (S) glikoproteina na površini virusne čestice. To su jednolančani RNK virusi sa genomom dužine od 27 do 32 kb koji se ubrajaju u RNK viruse sa najdužim genomom [7,8].

Koronavirusi imaju sposobnost da inficiraju širok spektar domaćina, uključujući ljude, ptice i različite sisare. Kod ljudi, većina poznatih koronavirusa izaziva blage respiratorne ili gastrointestinalne infekcije, često sa simptomima sličnim običnoj prehladi [9]. Međutim, tokom poslednjih nekoliko decenija pojavili su se zoonotski koronavirusi koji su izazvali ozbiljne epidemije i pandemije sa visokom stopom mortaliteta, kao što su:

- **SARS-CoV** (engl. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) – otkriven 2002. godine u Kini, uzrokovao je epidemiju teškog akutnog respiratornog sindroma (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS*) sa stopom smrtnosti oko 10%;
- **MERS-CoV** (engl. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) – otkriven 2012. godine u Saudijskoj Arabiji, izazivač epidemije bliskoističnog respiratornog sindroma (eng. *Middle East Respiratory Syndrome, MERS*) sa stopom smrtnosti oko 34%;
- **SARS-CoV-2** (engl. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) – uzročnik COVID-19 pandemije, identifikovan krajem 2019. godine u Vuhanu (Kina) sa stopom smrtnosti oko 3%.

Zoonotski potencijal koronavirusa posebno je izražen zbog njihove sposobnosti rekombinacije genoma, visokog stepena genetske varijabilnosti i adaptacije na različite domaćine. Ove karakteristike omogućavaju virusima da relativno lako pređu sa životinjskih rezervoara na ljude, često preko posrednih domaćina, kao što su pangolini, jednogrbe kamile, cibetke. Slepí miševi, koji se smatraju prirodnim rezervoarima brojnih koronavirusa, igraju ključnu ulogu u njihovoj evoluciji i potencijalnom prenošenju na druge vrste domaćina. Zbog ovih svojstava, koronavirusi predstavljaju stalnu pretnju za pojavu novih epidemijskih talasa i potencijalni razvoj pandemija [9].

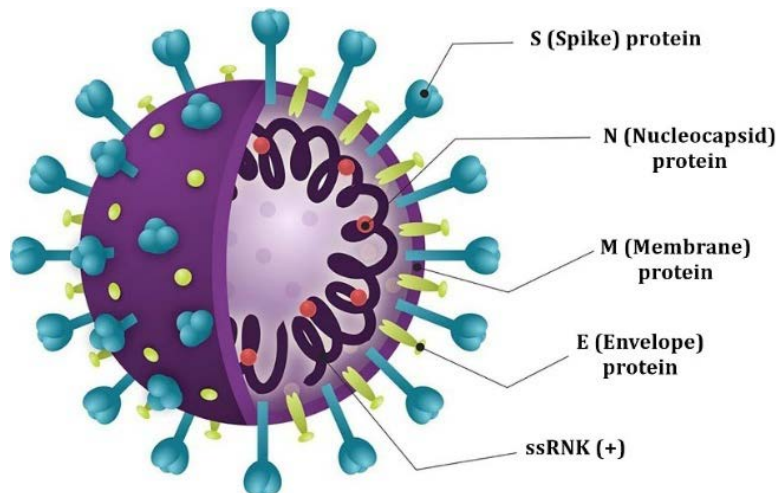
SARS-CoV-2 je jednolančani RNK virus, koji pripada rodu *Betacoronavirus*, familiji *Coronaviridae*, redu *Nidovirales*. Ovaj virus je uzročnik bolesti COVID-19 i pokazuje visok stepen genetske sličnosti sa drugim zoonotskim koronavirusima, posebno SARS-CoV (oko 79%) i određenim sojevima koronavirusa izolovanim kod slepih miševa (do 96%) [10]. Evolucione promene u genomu virusa dovele su do pojave različitih varijanti, koje se odlikuju promenama u transmisibilnosti, sposobnošću izbegavanja imunskog odgovora i različitim kliničkim manifestacijama bolesti.

2.1.1. Strukturna i genomska organizacija SARS-CoV-2 virusa

Virusna čestica SARS-CoV-2 (Slika 1) ima sferični oblik, prečnika od 60 do 140 nm, obavijena je omotačem i sastoji se od četiri glavna strukturna proteina:

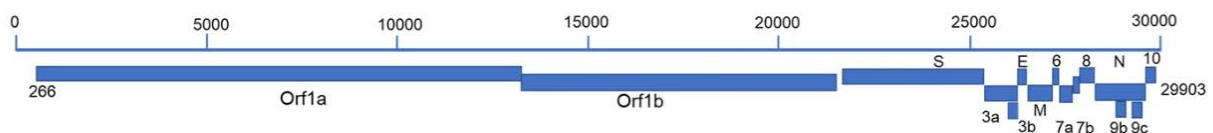
- **S (Spike) protein** – odgovoran za vezivanje za ACE2 receptore (engl. *Angiotensin 2 Converting Enzyme*) na ćelijama domaćina i ulazak virusa. Sastoji se iz dve subjedinice: S1, koja služi za vezivanje, i S2 za fuziju membrana;
- **E (Envelope) protein** – najmanji strukturni protein, koji ima ulogu u morfogenezi virusa;

- **M (Membrane) protein** – najzastupljeniji protein, zadužen za oblik virusne čestice;
- **N (Nucleocapsid) protein** – vezuje se za virusnu RNK, formira ribonukleoproteinski kompleks i učestvuje u replikaciji i transkripciji.



Slika 1. Struktura SARS-CoV-2 virusa; Površinu SARS-CoV-2 virusa čine četiri strukturna proteini: S (spike) za vezivanje za ćeliju domaćina, E (envelope) i M (membrane) važni za stabilnost i sazrevanje virusa, kao i N (nukleokapsid) koji vezuje virusnu RNK [11].

Genom SARS-CoV-2 (Slika 2) predstavlja jednolančanu RNK pozitivne polarizacije, dužine oko 29,9 kb [12]. Ima strukturu sličnu ostalim članovima porodice *Coronaviridae* i sadrži nekoliko otvorenih okvira čitanja (engl. *Open Reading Frame*, ORF) koji kodiraju niz nestrukturnih proteina (engl. *non-structural-proteins*, nsps), četiri glavna strukturna proteina (S, M, N i E) i dodatne (engl. accessory) proteine. SARS-CoV-2 genom ima 5' metil-kapu i 3' poli-A rep, što omogućava direktno prevođenje genoma u ćeliji domaćina.



Slika 2. Šematski prikaz genoma SARS-CoV-2 virusa; Najveći deo genoma zauzimaju Orf1a i Orf1b regioni koji kodiraju nestrukturne proteine, dok se u 3'-terminalnom delu nalaze geni za strukturne (S, E, M, N) i dodatne proteine važne za infektivnost i replikaciju [13].

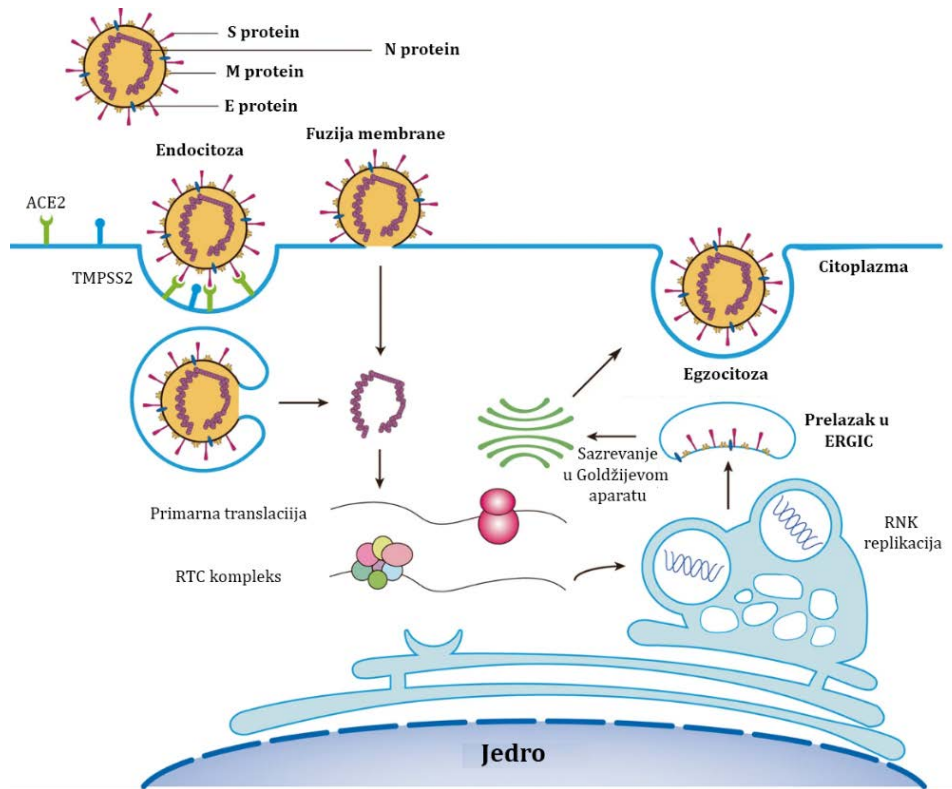
Replikaciono-transkripcioni region (ORF1a/ORF1b) čini oko $\frac{2}{3}$ genoma i nalazi se na 5' kraju. On kodira dva velika poliproteina pp1a (ORF1a) i pp1ab (ORF1b), koji se proteolitički razlažu na najmanje 16 nestrukturnih proteina (nsp1–nsp16), koji čine replikaciono-transkripcioni kompleks (RTC). Ostatak genoma sadrži gene za četiri glavna strukturna proteina, koji su esencijalni za formiranje virusne čestice, odnosno gore navedene S, E, M i N proteine.

Dodatni (accessory) proteini nisu nužni za *in vitro* replikaciju, ali mogu doprineti virulentnosti virusa i modulaciji imunskog odgovora kao što su:

- ORF3a – funkcioniše kao jonski kanal i učestvuje u apoptozi i inflamaciji;
- ORF6 – inhibira nuklearni transport interferonom-stimulisanih faktora transkripcije;
- ORF7a, ORF7b, ORF8 – učestvuju u modulaciji imunskog odgovora [14,15].

2.1.2. Mehanizam infekcije i replikacije

SARS-CoV-2 virus koristi kompleksne i efikasne mehanizme za ulazak u ćeliju domaćina, replikaciju genetičkog materijala i produkciju novih virusnih čestica. Životni ciklus (Slika 3) započinje vezivanjem S proteina virusa za ACE2 receptore. Ovi receptori se nalaze na površini različitih ćelija, naročito alveolarnih epitelih ćelija u plućima, ali i ćelijama srčanog mišića, bubrega, crevnog epitela i endotelih ćelija krvnih sudova [16].

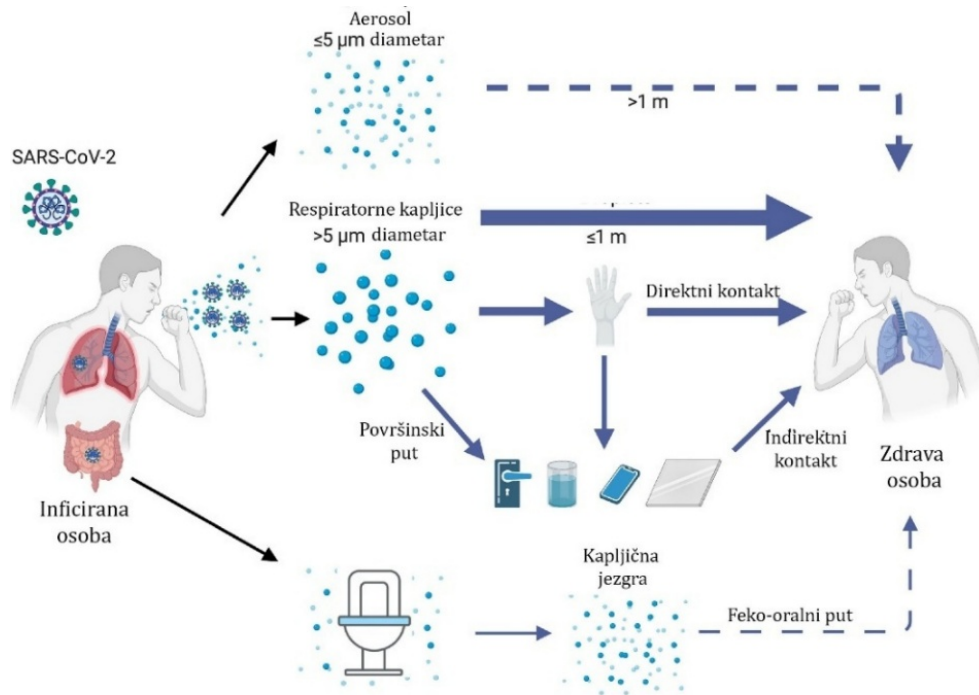


Slika 3. Mehanizam infekcije i replikacije SARS-CoV-2 virusa. Virus se vezuje za ACE2 receptor i ulazi u ćeliju putem endocitoze, nakon čega dolazi do fuzije membrane i oslobađanja genetskog materijala. Virusna RNK se koristi za primarnu translaciju i formiranje replikaciono-transkripcionog kompleksa (RTC), što omogućava replikaciju RNK. Novoformirane virusne čestice sazrevavaju u Goldžijevom aparatu i u intermedijarnom kompartmentu između endoplazmatskog retikuluma i Goldžijevog aparata (ERGIC), a zatim one se izlučuju iz ćelije putem egzocitoze [17].

Nakon vezivanja, S protein biva proteolitički aktiviran putem TMPRSS2 proteaze (engl. *Transmembrane protease, serine 2*) na površini ćelije domaćina. Ova aktivacija omogućava fuziju virusne i ćelijske membrane, pri čemu virusni genom dospeva u citoplazmu ćelije. U alternativnim uslovima, virus može ući u ćeliju i putem endocitoze, uz naknadnu aktivaciju S proteina u endolizozomalnom sistemu [18]. Jednom u citoplazmi, virusna RNK direktno funkcioniše kao iRNK i vezuje se za ribosome, omogućavajući sintezu velikih poliproteina (pp1a i pp1ab). Proteolitičkom razgradnjom poliproteina nastaje niz nestrukturnih proteina (nsp1–nsp16), koji formiraju RTC – centralni kompleks odgovoran za sintezu komplementarne, negativne RNK kopije, koja potom služi kao šablon za replikaciju virusnog genoma i transkripciju podgenomskih transkripata. Nakon toga sledi sinteza strukturnih proteina (S, E, M, N), kao i dodatnih proteina (npr. ORF3a, ORF6, ORF8), koji učestvuju u patogenezi i izbegavanju imunskog odgovora domaćina. Sklapanje virusnih čestica odvija se u endoplazmatskom retikulumu i Goldžijevom aparatu, dok se nove virusne čestice oslobađaju egzocitozom, spremne da inficiraju nove ćelije [19].

2.1.3. Transmisija SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 se prvenstveno prenosi respiratornim putem, odnosno, putem kapljica koje nastaju pri kašljanju, kihanju, govoru ili disanju osoba zaraženih virusom. Kapljice veće veličine ($\geq 5 \mu\text{m}$) brzo padaju na površine u neposrednoj blizini, obično unutar prečnika od jednog do dva metra. Osim kapljičnog prenosa, u određenim uslovima može doći i do prenosa aerosolima – manjim česticama ($\leq 5 \mu\text{m}$) koje mogu ostati suspendovane u vazduhu duže vreme, naročito u zatvorenim i nedovoljno provetrenim prostorima (Slika 4) [20].



Slika 4. Transmisija SARS-CoV-2 virusa. Virus se prenosi putem aerosola (čestice $\leq 5 \mu\text{m}$ koje ostaju duže u vazduhu), respiratornih kapljica ($> 5 \mu\text{m}$ koje se prenose na udaljenosti $\leq 1 \text{ m}$), kao i direktnim kontaktom i indirektno preko kontaminiranih površina [20].

Pored respiratornog puta, SARS-CoV-2 se može preneti i indirektno, kontaktom sa kontaminiranim površinama odnosno fomitima. Iako moguć, učestalost ovog oblika prenosa virusa značajno je manja u poređenju sa respiratornim putem. Virusna RNK može biti detektovana na različitim površinama, ali sposobnost virusa za infekciju opada vremenom, pod uticajem spoljašnjih faktora kao što su temperatura, vlažnost i izloženost UV svetlu [21–23].

Transmisija SARS-CoV-2 može se desiti i u pre-simptomatskoj i asimptomatskoj fazi infekcije, što značajno otežava kontrolu širenja virusa. Inficirane osobe mogu preneti virus na druge i pre nego što razviju simptome infekcije, odnosno bez da ikada postanu simptomatske [24]. Najveća infektivnost obično se javlja u periodu od jednog do dva dana pre pojave simptoma i tokom prvih pet dana bolesti.

Brojna istraživanja pokazala su da se virusna RNK može detektovati i u fecesu zaraženih osoba [25–28]. Takođe, istraživanja su pokazala i postojanje vertikalnog prenosa SARS-CoV-2, odnosno sa majke na plod [29,30].

2.1.4. Patogeneza COVID-19

Od početka pandemije, COVID-19 je izazvao značajne zdravstvene, socijalne i ekonomske posledice širom sveta, čime je postao jedno od najvećih izazova za javno zdravlje u savremenoj istoriji. Progresija bolesti COVID-19 je rezultat složene interakcije više

patofizioloških mehanizama koji deluju istovremeno i međusobno se dopunjuju, a najvažniji identifikovani mehanizmi uključuju:

- **Direktno citocidno dejstvo SARS-CoV-2:** Virus inficira ćelije domaćina vezivanjem za ACE2 receptore, što dovodi do direktnog oštećenja inficiranih ćelija, naročito epitela respiratornog trakta, pneumocita tipa II i vaskularnog endotela;
- **Smanjena ekspresija ACE2 i disbalans renin-angiotenzin-aldosteron sistema (RAAS):** Vezivanje SARS-CoV-2 za ACE2 receptor dovodi do njegove internalizacije i degradacije, čime se narušava regulacija RAAS. Posledično dolazi do povećane koncentracije angiotenzina II, koji ima proinflamatorna i profibrotična svojstva, kao i do smanjene inaktivacije des-Arg9-bradikina, što dodatno doprinosi povećanoj vaskularnoj permeabilnosti i razvoju edema [31,32];
- **Disregulisani imunski odgovor i citokinska oluja:** U težim oblicima COVID-19 dolazi do prekomerne aktivacije imunostistema, praćene masovnim oslobađanjem proinflamatornih citokina kao što su interleukini (IL-1, IL-6, IL-2, IL-17, IL-18) i TNF- α (engl. *Tumor Necrosis Factor- α*) [33]. Ova hiperinflamatorna reakcija izaziva sistemsku upalu, oštećenje više organa i razvoj akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS);
- **Koagulopatija i imunotromboza:** Infekcija SARS-CoV-2 virusom dovodi do oštećenja endotela, aktivacije sistema komplementa i povećanog oslobađanja proinflamatornih citokina, što zajedno stimuliše sekreciju prokoagulantnih faktora i razvoj trombotičke mikroangiopatije. Kao rezultat, dolazi do stvaranja mikrotromba u malim krvnim sudovima, što dodatno otežava protok krvi i smanjenje oksigenacije tkiva. Mikrotromboza u plućima predstavlja specifično patofiziološko obeležje pneumonije izazvane SARS-CoV-2 virusom i značajno je doprinela kliničkoj težini bolesti, razvoju respiratorne insuficijencije i povećanoj smrtnosti [34–36];
- **Autoimunost:** U pojedinim slučajevima, infekcija SARS-CoV-2 može pokrenuti autoimunske mehanizme, dodatno komplikujući tok bolesti. Neke od autoimunih bolesti koje su povezane sa COVID-19 su: sekundarna hemofagocitna limfocitocitoza (engl. *secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis*, sHLH), autoimunske bolesti štitaste žlezde, Kavasakijeva bolest, Miller Fisher sindrom, itd. [37–39].

2.1.5. COVID-19

COVID-19 karakteriše izuzetno širok spektar kliničkih manifestacija, a tok bolesti može varirati od potpuno asimptomatskih slučajeva do teških, životno ugrožavajućih oblika, sa višestrukim oštećenjem organa i smrtnim ishodom. Klinička prezentacija bolesti zavisi od interakcije između virusnih faktora, imunskog odgovora domaćina i individualnih predispozicija, uključujući starost i prisustvo hroničnih oboljenja.

Period inkubacije varira od 2 do 14 dana, sa prosečnim trajanjem od 5 do 6 dana [40]. Tokom ovog perioda, osoba može biti infektivna, što je značajan epidemiološki izazov u suzbijanju širenja infekcije. Kliničke manifestacije COVID-19 klasifikuju se na sledeći način [41]:

- **Asimptomatska infekcija:** Kod značajnog broja zaraženih osoba, naročito mlađe populacije, infekcija SARS-CoV-2 može proći bez vidljivih simptoma. Iako bez kliničke prezentacije, ovakvi slučajevi su značajni za širenje infekcije zbog mogućnosti transmisije virusa na druge osobe;
- **Blaga forma bolesti:** Najčešće se manifestuje povišenom telesnom temperaturom, suvoparnim kašljem, umorom, bolovima u mišićima, glavoboljom, kao i gubitkom čula mirisa (anosmija) i ukusa (ageuzija). Takođe, mogu se javiti blagi gastrointestinalni simptomi, kao što su mučnina, povraćanje i dijareja;
- **Umerena forma bolesti:** Obuhvata prisustvo znakova virusne pneumonije, kao što su

uporan kašalj, dispneja (otežano disanje) i promene u plućima vidljive na radiološkim snimcima, ali bez znakova teške hipoksemije. Većina pacijenata sa umerenom bolešću zahteva kliničko praćenje i primenu kiseoničke terapije u bolničkim uslovima;

- **Teška forma bolesti:** Definiše se razvojem teške pneumonije sa izraženom hipoksemijom (saturacija kiseonika u krvi < 94%), ubrzanim disanjem (više od 30 udisaja u minuti), i uz kliničke manifestacije ARDS-a. Ovi pacijenti zahtevaju hospitalizaciju, a često i intenzivnu terapiju kiseonikom;
- **Kritična forma bolesti:** Obuhvata ARDS, septički šok, višestruko otkazivanje organa (engl. *multiple organ failure, MOF*) i potrebu za mehaničkom ventilacijom.

Pored primarnih respiratornih simptoma, COVID-19 se sve više prepoznaje kao multisistemska bolest, sa potencijalnim komplikacijama koje zahvataju kardiovaskularni sistem (miokarditis, aritmije, tromboze, infarkt miokarda), nervni sistem (encefalitis, moždani udar, neuropatije), urinarni sistem (akutno oštećenje bubrega) i gastrointestinalni trakt (hepatitis, pankreatitis).

Faktori rizika za razvoj težih oblika bolesti uključuju starost (preko 65 godina), prisustvo hroničnih oboljenja (hipertenzija, *diabetes melitus*, koronarna bolest, hronična opstruktivna bolest pluća), gojaznost (indeks telesne mase (engl. *body mass index, BMI*) > 30 kg/m²), stanja imunokompromitovanosti (maligne bolesti, transplantacija), trudnoću i postporođajni period [42–45].

Pored akutne faze bolesti, značajan broj pacijenata razvija postakutni sindrom COVID-19 ili tzv. "long COVID", koji uključuje dugotrajne simptome koji traju nedeljama ili mesecima nakon inicijalne infekcije [46,47], kao što su: hronični umor, dispneja, palpitacije, kognitivne teškoće ("moždana magla"), depresija, anksioznost i mišićno-skeletni bolovi.

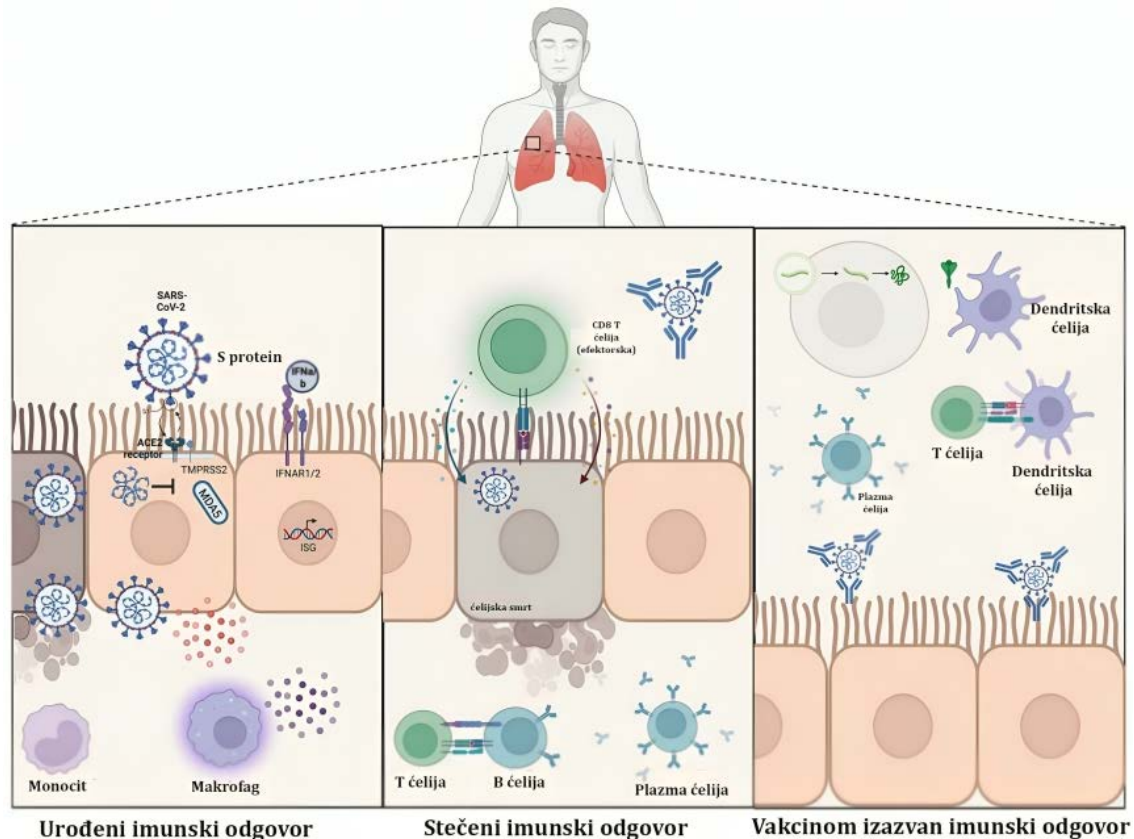
2.1.6. Imunski odgovor u SARS-CoV-2 infekciji

2.1.6.1. Urođeni imunski odgovor

Urođeni imunski odgovor (Slika 5) predstavlja prvu liniju odbrane organizma protiv infekcija i njegova aktivacija je ključna za ograničavanje inicijalne replikacije virusa i aktivaciju stečenog imunskog odgovora. Nakon ulaska SARS-CoV-2 virusa u organizam i vezivanja za ACE2 receptore, virus putem endocitoze ulazi u ćeliju, gde virusna RNK biva prepoznata od strane PRR receptora (engl. *pattern recognition receptors*), među kojima su najvažniji Toll-like receptori (TLR3, TLR7), RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*) i MDA5 (engl. *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*). Aktivacijom ovih receptora inicira se signalna kaskada koja dovodi do sinteze interferona tipa I (IFN- α , IFN- β), interferona tipa III (IFN- λ) i produkcije proinflamatornih citokina, poput IL-1 β , IL-6 i TNF- α [48–50].

Interferoni igraju ključnu ulogu u inhibiciji virusne replikacije, jer aktiviraju ekspresiju antivirusnih gena u zaraženim i susednim ćelijama. Istovremeno, produkcija hemokina omogućava regrutaciju imunoloških ćelija, uključujući neutrofile, monocite i prirodne ćelije ubice (engl. *Natural killer cells*, NK ćelije), na mesto infekcije. Međutim, SARS-CoV-2 virus je tokom evolucije razvio strategije kojima potiskuje ranu produkciju interferona. Virusni nestrukturani proteini (nsp1, nsp6, ORF6) inhibiraju ključne signalne puteve odgovorne za aktivaciju interferonskih odgovora [51–53]. Istovremeno, oslobođeni proinflamatorni citokini, naročito IL-6, IL-1 β i TNF- α , pokreću hiperinflamatornu reakciju koja, umesto zaštitnog efekta, doprinosi oštećenju tkiva, posebno u plućima. Prekomerna aktivacija makrofaga i neutrofila dovodi do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta, oslobađanja proteaza i oštećenja alveokapilarne barijere, što može rezultirati razvojem ARDS-a. Pored toga, aktivacija sistema komplementa i stvaranje neutrofilnih ekstracelularnih zamki (engl. *Neutrophil Extracellular Traps, NETs*) doprinosi razvoju imunotromboze, karakteristične za teške oblike COVID-19, sa

pojavom mikrotromboze u plućima i drugim organima [34–36]. U blagim i umerenim oblicima bolesti, urođeni imunitet uspešno ograničava širenje virusa, omogućavajući pravovremenu aktivaciju stečenog imunskog odgovora i razvoj specifične imunološke memorije. S druge strane, u teškim oblicima bolesti, neadekvatna ili disregulisana aktivacija urođenog imuniteta vodi ka razvoju citokinske oluje, koagulopatije i multiorganske disfunkcije, što značajno povećava smrtnost.



Slika 5. Imunski odgovor na SARS-COV-2 virus. **Urođeni imunski odgovor** (levo) – virus ulazi u epitelne ćelije vezivanjem za ACE2 receptor putem S-proteina, što aktivira imunski sistem uključivanjem interferona (IFN), monocita i makrofaga. **Stečeni imunski odgovor** (sredina) – prezentacija virusnih antigena dovodi do aktivacije T-limfocita (CD8⁺) koji ubijaju inficirane ćelije i B-limfocita koji proizvode specifična antitela. **Imunski odgovor izazvan vakcinom** (desno) – vakcina aktivira dendritske ćelije, T i B limfocite, što dovodi do formiranja plazma ćelija koje proizvode zaštitna antitela i memorijskih ćelija koje omogućavaju bržu reakciju pri ponovnoj izloženosti virusu [49].

2.1.6.2. Stečeni imunski odgovor

Stečeni (adaptivni) imunski odgovor predstavlja ključnu komponentu u eliminaciji virusa i u uspostavljanju dugotrajne imunološke memorije nakon infekcije ili vakcinacije. Razvija se nakon aktivacije urođenog imuniteta i obuhvata visoko specifične mehanizme usmerene ka virusnim antigenima. Stečeni imunski odgovor obuhvata dve glavne grane:

- **Humoralni imunski odgovor** – posredovan aktivacijom B limfocita i produkcijom specifičnih antitela;
- **Ćelijski imunski odgovor** – posredovan aktivacijom T limfocita, uključujući pomoćničke (CD4⁺) i citotoksične (CD8⁺) T ćelije.

Nakon aktivacije B limfocita u limfnim čvorovima i slezini, dolazi do njihove diferencijacije u plazma ćelije koje sekretuju antitela (Slika 5). Tokom infekcije SARS-CoV-2 virusom, simptomi se najčešće javljaju oko 5. dana, dok sinteza specifičnih IgM antitela počinje oko 7–8 dana nakon infekcije [54]. IgA antitela se proizvode odmah nakon IgM, sa nivoima u

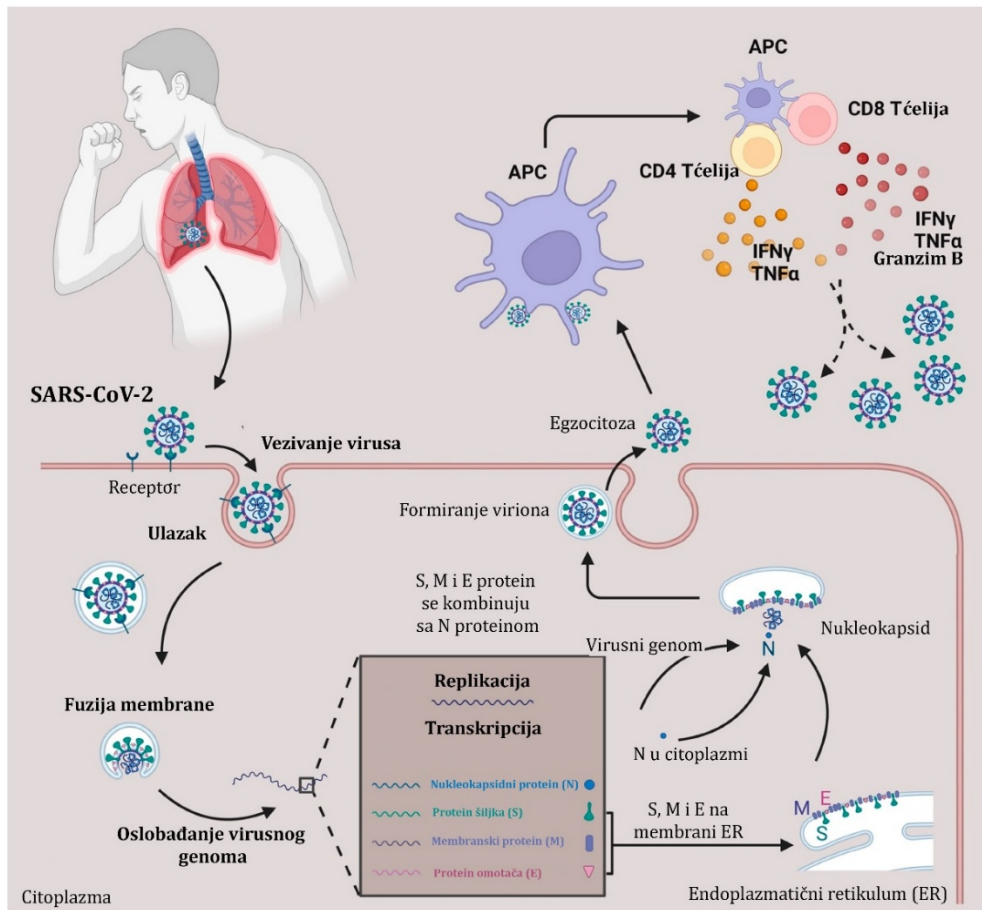
serumu višim od IgM, i predstavljaju glavnu klasu antitela na površinama sluzokože i sekretima. Zanimljivo je da se SARS-CoV-2-specifična IgA antitela mogu detektovati čak i pre specifičnih IgM antitela i da dominiraju u ranim fazama neutralizacionog imunskog odgovora [55].

U narednih 1–2 nedelje, kroz proces afinitetnog sazrevanja i promene klasa antitela (engl. *class switching*), dolazi do produkcije specifičnih IgG antitela koja imaju ključnu ulogu u sistemskoj zaštiti. Većina simptomatskih pacijenata sa COVID-19 razvija izražen, specifičan humoralni odgovor u roku od 28 dana. Specifična IgM antitela se prva detektuju, dok IgG antitela dostižu maksimalne koncentracije između treće i sedme nedelje [56]. Nakon toga, koncentracije IgG antitela ulaze u fazu blagog opadanja i stabilizacije, pri čemu se u većini slučajeva održavaju najmanje dva meseca [57].

Neutrališuća antitela predstavljaju specifičnu kategoriju antitela koja onemogućavaju virusnu infekciju blokiranjem vezivanja virusa za receptore ćelija domaćina. U kontekstu SARS-CoV-2 infekcije, neutrališuća antitela su specifična za receptor-vezujući domen (engl. *Receptor Binding Domain*, RBD) i N-terminalni domen (engl. *N-terminal domain*, NTD) S proteina [58,59]. Ova antitela detektuju se u serumu ubrzo nakon početka infekcije [56], često istovremeno sa pojavom IgG i IgA antitela na druge virusne antigene, a u nekim slučajevima i pre IgM odgovora. U ranim fazama bolesti, neutrališuću aktivnost pokazuju IgA i IgM antitela, dok su u kasnijim fazama dominantna IgG neutrališuća antitela koja doprinose sistemskoj zaštiti [60]. Njihov nivo često korelira sa težinom kliničke slike – viši titri se uglavnom beleže kod pacijenata sa težim oblicima bolesti [61–64], dok je kod osoba sa blagim simptomima ili asimptomatskim tokom infekcije titar često niži i brže opada [65,66]. Vremenom, koncentracija neutrališućih antitela opada, što postaje naročito izraženo u prisustvu novih varijanti virusa koje nose mutacije u S-proteinu, a koje mogu umanjiti efikasnost prethodno stečenog imuniteta [59,67].

T ćelijski imunski odgovor (Slika 6) ima ključnu ulogu u eliminaciji infekcije virusom SARS-CoV-2 i u uspostavljanju dugoročne zaštite. Nakon ulaska virusa u organizam, antigen-prezentujuće ćelije (engl. *Antigen-Presenting Cell*, APC), kao što su dendritske ćelije, prezentuju peptide virusnih antigena na molekulima MHC klase II (engl. *Major Histocompatibility Complex class II*), što dovodi do aktivacije CD4⁺ T pomoćničkih ćelija (engl. *CD4⁺ T-helper lymphocytes*). Različite subpopulacije CD4⁺ T ćelija mogu biti aktivirane antigenima SARS-CoV-2, uključujući pomoćničke T ćelije tipa 1 (Th1), Th17 ćelije, folikularne pomoćničke T ćelije (Tfh), regulatorne T ćelije (Treg) i citotoksične CD4⁺ T ćelije (*CD4⁺ Cytotoxic T Lymphocytes*, CD4 CTL) [69]. Tokom infekcije SARS-CoV-2, T limfociti pretežno prepoznaju virusne antigene koji uključuju strukturne (S, M, N) i nestrukturne proteine (nsp3, nsp4), kao i pomoćni ORF3a protein, koji zajedno doprinose razvoju efikasnog ćelijskog imunskog odgovora. Grifoni i saradnici su analizirali specifičnost T ćelijskog odgovora na SARS-CoV-2 kod obolelih osoba i pojedinaca koji nisu prethodno bili izloženi virusu. Utvrđeno je da CD4⁺ i CD8⁺ T ćelije ciljaju različite virusne antigene, uključujući i strukturne i nestrukturne proteine SARS-CoV-2 [70].

Istovremeno, peptide virusnih antigena prezentovane na molekulima MHC klase I (engl. *Major Histocompatibility Complex class I*), na površini inficiranih ćelija prepoznaju CD8⁺ citotoksični T limfociti (engl. *CD8⁺ Cytotoxic T Lymphocytes*, CD8⁺ CTL), koji se aktiviraju i ciljano uništavaju inficirane ćelije. Citotoksičan efekat se ostvaruje oslobađanjem perforina, koji stvara pore u membrani ciljnih ćelija, i granzima, koji indukuju apoptozu, čime se sprečava dalje širenje virusa unutar organizma. Efikasan CD8⁺ T ćelijski odgovor povezan je sa bržom eliminacijom virusa, lakšom kliničkom slikom bolesti i nižim rizikom od komplikacija [71]. U teškim oblicima COVID-19, imunološki sistem pokazuje značajne promene koje uključuju smanjenje broja T limfocita odnosno limfopeniju [50,72]. Analize akutne infekcije SARS-CoV-2 pokazale su da je blagi tok COVID-19 bolesti karakterisan ranom indukcijom specifičnih T ćelija unutar prvih sedam dana od pojave simptoma [73].



Slika 6. SARS-CoV-2 infekcija i T-ćelijski odgovor. Nakon što SARS-CoV-2 uđe u ćeliju domaćina i započne replikaciju, antigen-prezentujuće ćelije (APC) prezentuju virusne proteine CD4⁺ T-pomoćničkim ćelijama. Ove ćelije potom stimulišu aktivaciju CD8⁺ citotoksičnih T-ćelija, koje prepoznaju i uništavaju zaražene ćelije. Aktivirane T-ćelije luče citokine, kao što su interferon gama (IFN-γ) i tumor nekroznog faktora alfa (TNF-α), kao i proteinazu granzim B, čime doprinose eliminaciji virusa i ograničavanju širenja infekcije [68].

2.1.7. Vakcine protiv COVID-19

Razvoj vakcina protiv SARS-CoV-2 predstavljao je jedan od najznačajnijih naučnih i medicinskih poduhvata u novijoj istoriji. U rekordno kratkom vremenskom periodu, razvijene su i odobrene različite platforme za proizvodnju vakcina sa ciljem zaustavljanja širenja infekcije, ublažavanja težine bolesti i smanjenja smrtnosti izazvane COVID-19. Za razliku od prethodnih pandemija, odgovor na COVID-19 karakterisala je primena naprednih tehnologija, poput iRNK i vektorskih platformi. Istovremeno, korišćene su i inaktivisane vakcine, zasnovane na tradicionalnoj i dugogodišnje primenivanoj tehnologiji, poznatoj po bezbednosti i stabilnosti u imunizaciji protiv različitih infektivnih bolesti.

Do marta 2023. godine, prema podacima SZO, u upotrebi je bilo više od 30 različitih vakcina razvijenih na različitim platformama, dok je još veći broj bio u fazi kliničkih ispitivanja [74]. Tabela 1 prikazuje pregled vakcina protiv SARS-CoV-2 koje su bile dostupne na globalnom nivou u pomenutom periodu. U Republici Srbiji, za sprovođenje imunizacije u periodu sprovođenja ovog istraživanja (avgust 2021 – jun 2022) bile su dostupne sledeće vakcine: Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine, Gam-COVID-Vac (Sputnik V), Spikevax, Sinopharm (Vero Cell) Inactivated i ChAdOx1 (AstraZeneca) [75].

Tabela 1. SARS-CoV-2 vakcine

Komercijalni naziv	Alternativni naziv	Proizvođač	Vrsta vakcine	Antigen	Režim i način doziranja	Uslovi čuvanja	Referenca
CoronaVac	COVID-19 Vaccine (Vero Cell), Inactivated	Sinovac Life Sciences., LTD. China	Inaktivisani virus	Inaktivisani SARS-CoV-2 soj (CZ02), propagiran u kulturi Vero ćelija	2 doze, razmak 14 dana; i.m.	2–8°C	[76,77]
Sinopharm/BI BP COVID-19 vaccine	Covilo; BBIBP-CorV;	Beijing Institute of Biotechnology / China National Pharmaceutical Group Co. (Sinopharm)	Inaktivisani virus	Inaktivisani SARS-CoV-2 soj (HB02), propagiran u kulturi Vero ćelija	2 doze, razmak 21 dan i.m.	2–8°C	[76,78]
Sinopharm/W IBP COVID-19 vaccine	WIBP-CorV;	Wuhan Institute of Biological Products Co. Ltd.	Inaktivisani virus	Inaktivisani SARS-CoV-2 soj (WIV04), propagiran u kulturi Vero ćelija	2 doze, razmak 3 – 4 nedelje; i.m.	2–8°C	[79]
Covaxin	COVID-19 Vaccine (Whole Virion Inactivated Corona Virus vaccine), BBV152	Bharat Biotech International Limited	Inaktivisani virus	Inaktivisani SARS-CoV-2 (NIV-2020-770 soj), propagiran u kulturi Vero ćelija	2 doze, razmak 28 dana	2–8°C	[80]
Valneva COVID-19 vaccine	VLA2001	Valneva Austria GmbH	Inaktivisani virus	Inaktivirani SARS-CoV-2 (soj hCoV-19/Italy/INMI 1-isl/2020)	2 doze, razmak 4 nedelje; i.m.	2–8°C	[81]
Vaxzevria u Evropi (pre AZD1222 i ChAdOx1); Covishield u Indiji; ChAdOx1-S [recombinant]	AstraZeneca/ Oxford	AstraZeneca AB, Sweden	Virusni vektor ChAdOx1-S	Replikaciono-deficijentni adenovirus šimpanze sa SARS-CoV-2 S proteinom	2 doze, razmak 28 dana (interval >12 nedelja); i.m.	2–8°C do 6 meseci	[76]
Janssen Jcovden® COVID-19 Vaccine	Jcovden; JNJ-78436735; Ad26.COV2-S	Janssen – Cilag International NV, Belgium	Virusni vektor adenovirus -26 (Ad26)	Rekombinantni, nereplikacioni humani adenovirus tipa 26 sa stabilizovanim S proteinom	2 doze; razmak 2 – 6 meseci; i.m.	-20°C; 2–8°C do 3 meseca	[76]

Convidecia; PakVac; Ad5-nCoV	CanSino Biologics Ad5-nCoV-S [recombinant] COVID-19 vaccine	CanSino Biologics Inc., China	Virusni vektor adenovirus -5 (Ad5)	Ceo S protein SARS-CoV-2 nošen adenovirusnim vektorom (Ad5)	1 doza; i.m.	2–8°C	[76]
Gam-COVID-Vac	Sputnik V; Adeno-based (rAd26-S+rAd5-S) / Sputnik light	Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia.	Virusni vektor Ad26 (I doza) Ad5 (II doza)	Ceo S protein SARS-CoV-2 nošen adenovirusnim vektorima	2 doze (razmak 21 dan); i.m.	-18°C (tečni oblik); 2–8°C (zamrznuto) do 6 meseci	[76]
Spikevax	mRNA-1273;	Moderna TX Inc., USA.	iRNK	Ceo S protein sa prolinskim zamenama	2 doze, razmak 28 dana; i.m.	-25 do -15°C; 2–8°C do 30 dana; sobna temperatura ≤12 h	[76,82]
Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine	BNT162b2;	BioNTech Manufacturing GmbH, Mainz, Germany. Pfizer Manufacturing Belgium NV, Belgium.	iRNK	Ceo S protein sa prolinskim zamenama	2 doze, razmak 21 dan; i.m.	-80 do -60°C; 2–8°C do 5 dana; sobna temperatura ≤2 h	[76,83]
CVnCoV	CVnCoV	CureVac / GlaxoSmithKline (Nemačka)	iRNK	Prefuziono stabilizovani S protein SARS-CoV-2	2 doze, razmak 28 dana	2–8°C do 3 meseca; sobna temperatura 24 h	[76]
Nuvaxovid	NVX-CoV2373	Novavax, Inc (SAD)	Proteinska podjedinica	Rekombinantni prefuzioni S protein i Matrix-M adjuvans	2 doze	2–8°C do 6 meseci	[84]

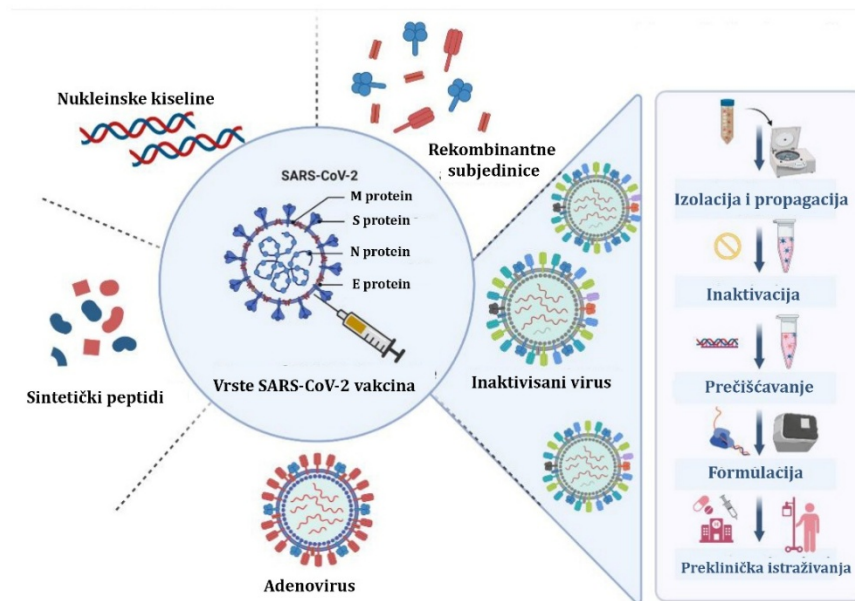
i.m. - intramuskularno

2.1.7.1. Inaktivisane vakcine

Inaktivisane vakcine se koriste decenijama unazad za sprečavanje mnogih bolesti, poput onih protiv poliovirusa, hepatitisa A i influence [85–87]. Ove vakcine sadrže celokupan virus koji je prethodno hemijski ili fizički inaktivisan, najčešće primenom β -propiolaktona, formaldehida, ili UV zračenjem, čime se eliminiše njegova sposobnost replikacije i izazivanja bolesti [88]. Njihove glavne prednosti uključuju dokazanu bezbednost, jednostavnu logistiku skladištenja (na temperaturi od 2–8°C) i mogućnost primene kod širokog spektra populacija, uključujući imunokompromitovane osobe. Ipak, zbog relativno slabije imunogenosti, posebno u smislu indukcije kvalitetnog ćelijskog imuniteta, inaktivisane vakcine često zahtevaju dodatak adjuvansa, kao što je aluminijum-hidroksid, i višestruke doze radi postizanja optimalne zaštite [89–91].

Proces proizvodnje inaktivisane vakcine obuhvata više ključnih faza, uključujući izolovanje i replikaciju virusa, njegovo inaktiviranje, prečišćavanje i formulaciju vakcine, nakon

čega slede predklinička ispitivanja, kliničke studije, dobijanje regulatornih odobrenja i, na kraju, masovna proizvodnja i distribucija (Slika 7).



Slika 7. Najčešće korišćene vrste vakcina protiv SARS-CoV-2 i prikaz procesa razvoja inaktivisane vakcine [88]

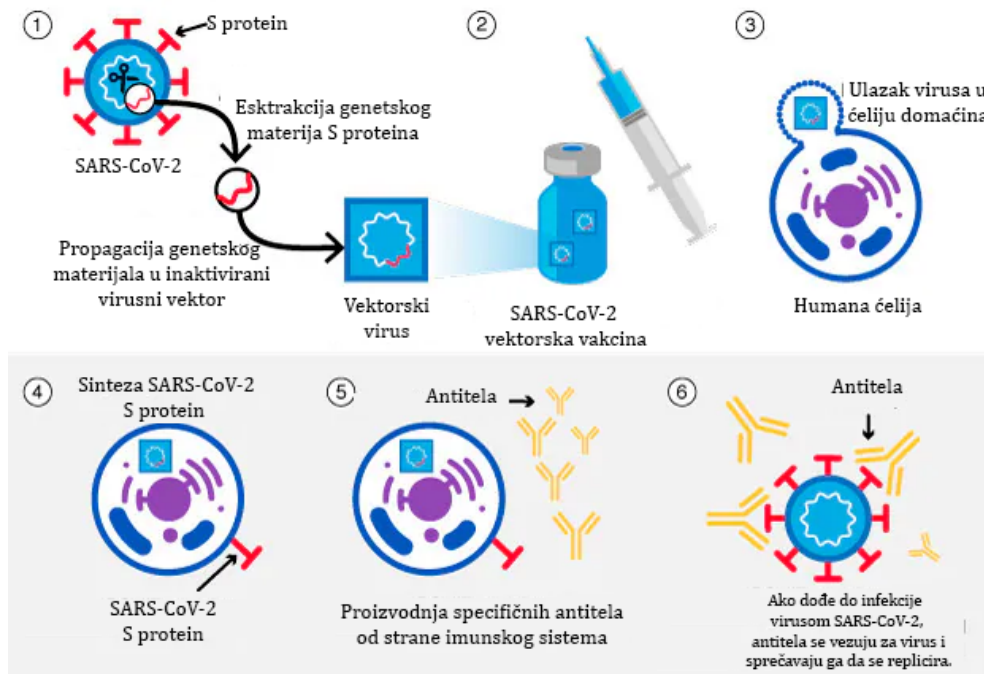
Inaktivisane vakcine indukuju imunski odgovor koji uključuje produkciju antitela na sve strukturne proteine SARS-CoV-2 virusa, budući da sadrže kompletnu virusnu česticu sa očuvanim antigenskim strukturama. Ova svojstva omogućavaju razvoj antitela ne samo na S proteine (uključujući RBD i NTD domene), već i na ostale strukturne proteine odnosno N, M i E protein. Iako ovaj oblik imunosti može biti efikasan u sprečavanju infekcije i razvoja težih oblika bolesti, ćelijski imunski odgovor je kod inaktivisanih vakcina slabije izražen u poređenju sa iRNK i vektorskim platformama [92,93]. Jedan od razloga zbog kojih inaktivisane vakcine indukuju slabije izražen ćelijski imunski odgovor jeste to što se virusni antigeni ne sintetišu unutar ćelija organizma, već se unose spolja kao gotove, inaktivisane virusne čestice. Zbog toga antigeni uglavnom bivaju prezentovani putem MHC klase II molekula, što prvenstveno aktivira CD4⁺ T limfocite i podstiče produkciju antitela. Nasuprot tome, prezentacija antigena putem MHC klase I, koja je ključna za aktivaciju citotoksičnih CD8⁺ T ćelija, u ovom slučaju je ograničena. Kao rezultat toga, imunski odgovor je pretežno humoralnog tipa, sa manje izraženom ćelijskom komponentom. Pored toga, izazov ovih vakcina predstavlja potencijalno smanjena efikasnost protiv novih varijanti virusa, budući da su zasnovane na originalnom vuhanskom (Wuhan) soju SARS-CoV-2 [94–96].

Uprkos tim ograničenjima, inaktivisane vakcine (Tabela 1.) su odigrale ključnu ulogu u globalnoj imunizaciji, naročito u zemljama sa ograničenim pristupom naprednijim tehnologijama, zahvaljujući mogućnosti skladištenja na standardnim temperaturama (2–8°C), nižoj ceni i višedecenijskoj upotrebi ove tehnologije. Njihova masovna primena u Aziji, Latinskoj Americi, Africi i na Bliskom istoku omogućila je brzo sprovođenje nacionalnih vakcinacionih kampanja, naročito u ranom stadijumu pandemije.

2.1.7.2. Vektorske vakcine

Tehnologija vakcina zasnovanih na virusnim vektorima razvijana je još od kraja 20. veka, sa ciljem da se stvore bezbedne i efikasne platforme za indukciju jakog imunskog odgovora. Prvi pokušaji korišćenja virusa kao vektora vezuju se za istraživanja u oblasti genske terapije i razvoja vakcina protiv HIV-a (engl. *Human Immunodeficiency Virus*), malarije, ebole, MERS-a i drugih infektivnih bolesti.

Vektorske vakcine koriste modifikovane viruse kao nosače za unos genetskog materijala, koji kodira virusni antigen, u ćelije domaćina. Vektori su genetski izmenjeni tako da ne mogu da se replikuju u ljudskim ćelijama, čime se obezbeđuje visok stepen bezbednosti, uz zadržavanje njihove sposobnosti da snažno aktiviraju imunski odgovor. Nakon unosa genetskog materijala, ćelije domaćina počinju da sintetišu strani antigen, čime se pokreće kaskada imunskog odgovor (Slika 8).



Slika 8. Mehanizam delovanja vektorske vakcine protiv SARS-CoV-2 [97]

Prvi virusni vektor koji je ekspresirao strani gen konstruisan je korišćenjem SV40 virusa (engl. *Simian Virus 40*) još 1972. godine. Od tada je razvijen čitav niz vektorskih sistema zasnovanih na različitim virusnim platformama, uključujući adenoviruse, poksviruse, herpesviruse, virus vesikularnog stomatitisa i lentiviruse [98]. Najčešće korišćeni virusni vektori su:

- **ChAdOx1** – nereklicirajući adenovirus šimpanze, prvobitno razvijen na Univerzitetu Oksford za vakcinu protiv MERS-a [99];
- **Ad5** – humani adenovirus, korišćen kao prvi vektor u razvoju vakcina protiv ebole [100];
- **Ad26** – manje prevalentan humani adenovirus serotip 26, za koji je pokazano da indukuje efikasan humoralni i ćelijski imunski odgovor protiv različitih infektivnih bolesti [101–103];
- **virus vezikularnog stomatitisa (VSV)** – virus iz porodice Rhabdoviridae, čija je najpoznatija primena u vakcini protiv ebole (rVSV-ZEBOV), u kojoj je glikoprotein omotača VSV-a zamenjen glikoproteinom Zairskog soja virusa ebole (ZEBOV)[104]. Trenutno se ispituje za razvoj vakcina protiv drugih filovirusa, uključujući virus Sudana (SUDV) i virus Bundibugyo (BDBV), kao i protiv Zika virusa i virusa krimsko-kongoanske hemoragijske groznice [98];
- **poksvirusnim vektorima** – vakcine zasnovane na modifikovanom virusu Ankara (MVA), koji je odobren od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*) kao vakcina protiv majmunskih boginja i velikih boginja[105], a koristi se i kao vektorska platforma za razvoj vakcina protiv brojnih drugih značajnih infektivnih bolesti [106–108];

- **flavivirusi** – koriste virus žute groznice (engl. *Yellow Fever Virus*, YFV) kao osnovu za konstrukciju hibridnih virusa, primenjeno u razvoju vakcine ChimerVax-JE protiv japanskog encefalitisa [109] i tetravalentne vakcine protiv denga groznice, Dengvaxia [110].

U kontekstu pandemije COVID-19, vektorske vakcine, uključujući ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca/Oxford) i Ad26.COV2.S (Janssen Jcovden), bile su među prvim dostupnim rešenjima za globalnu imunizaciju. Za razliku od inaktivisanih vakcina koje sadrže ceo virus i potencijalno indukuju imunski odgovor na više virusnih antigena, vektorske vakcine protiv SARS-CoV-2 dizajnirane su tako da indukuju odgovor isključivo na S protein. Ovaj protein je nosilac neutrališućih epitopa a ključan je za vezivanje virusa za ACE2 receptore ćelija domaćina. Nakon unošenja genetskog materijala u ćelije domaćina, vektori omogućavaju endogenu ekspresiju virusnih antigena, čime se aktivira prezentacija antigena putem MHC klase I i II molekula. Ovaj mehanizam dovodi do aktivacije CD8⁺ citotoksičnih T limfocita, koji direktno uništavaju inficirane ćelije, ali i do aktivacije CD4⁺ pomoćničkih T ćelija, koje aktiviraju sazrevanje B ćelija i produkciju specifičnih antitela. Vakcine poput ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca/Oxford) i Ad26.COV2.S (Janssen Jcovden) pokazale su sposobnost da indukuju dominantan Th1 tip imunskog odgovora, koji se odlikuje pojačanom produkcijom citokina kao što su IFN- γ , TNF- α i IL-2 [111,112]. Istovremeno, zabeležen je nizak nivo aktivacije Th2 odgovora, što je važno jer smanjuje rizik od pojave imunopatoloških reakcija povezanih sa vakcinacijom.

Međutim, vektorske vakcine imaju i određena ograničenja. Jedan od izazova je preegzistirajući imunitet na humani adenovirus, naročito serotip 5 (Ad5), što može smanjiti efikasnost vakcine, naročito u regijama sa visokom seroprevalencijom [113]. Kao odgovor na taj izazov, razvijeni su alternativni vektori, poput adenovirusa šimpanze (ChAd), ili se primenjuju heterologna prime-boost strategija sa različitim vektorima kako bi se izbegla neutralizacija vektora [114]. Takođe, tokom upotrebe vektorskih vakcina u masovnoj imunizaciji zabeleženi su retki neželjeni efekti, kao što je sindrom tromboze sa trombocitopenijom (engl. *Vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia*, VITT). Ova komplikacija, pre svega prijavljena kod mlađih žena nakon primene ChAdOx1 nCoV-19 [115], dovela je do izmena u smernicama upotrebe u pojedinim zemljama.

Uprkos tim izazovima, vektorske vakcine ostaju jedan od ključnih alata savremene imunizacije. Njihova sposobnost da efikasno aktiviraju i humoralni i ćelijski imunitet, kao i njihova fleksibilnost u dizajnu, čine ih pogodnim za brzo reagovanje na nove pretnje u oblasti zaraznih bolesti.

2.1.7.3. Vakcine bazirane na nukleinskim kiselinama

Vakcine koje se zasnivaju na nukleinskim kiselinama, uključujući i DNK i RNK vakcine, predstavljaju savremeni pristup imunizaciji koji omogućava organizmu da sam proizvede virusni antigen i time pokrene sopstveni imunski odgovor. Kod ovih vakcina ne unosi se direktno patogen ili gotov protein, već genetska informacija koja se, nakon ulaska u ćelije, koristi za sintezu specifičnih antigena. Iako su DNK vakcine istraživane još od 1990-ih godina, njihova klinička primena kod ljudi bila je ograničena, dok su u veterinarskoj medicini našle širu upotrebu [116–118]. Suprotno tome, iRNK vakcine su doživele globalni razvoj tokom pandemije COVID-19, prvenstveno kroz uspešnu primenu vakcina kompanija Pfizer–BioNTech i Moderna. Pre pandemije, obe platforme su bile predmet intenzivnog istraživanja u borbi protiv raznih virusa poput HIV-a, virusa zika, citomegalovirusa i gripa, kao i u okviru terapijskih vakcina za određene tumore [119–121].

2.1.7.3.1. DNK vakcine

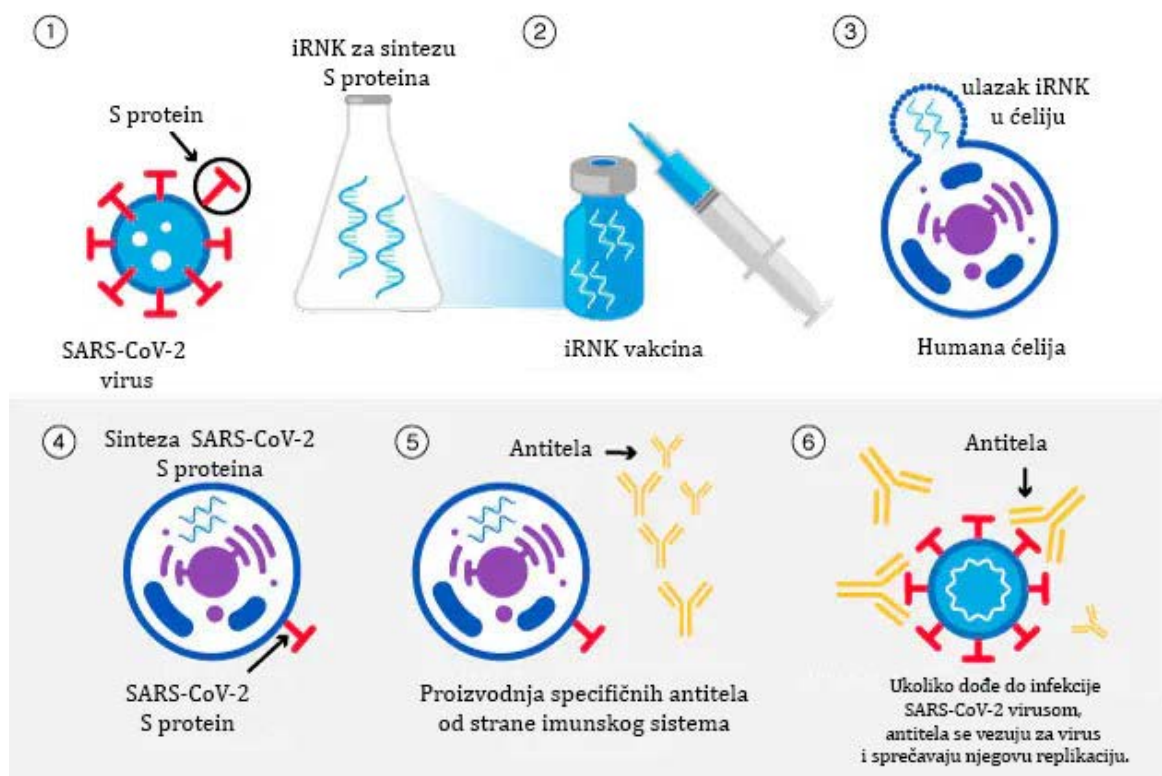
Uopšteno govoreći, DNK vakcine unose gene koji kodiraju ciljane antigene u ćelije domaćina, a posebno u APC, koristeći DNK plazmid. Prednosti ovih vakcina uključuju to što su neinfektivne, mogu se brzo i jednostavno proizvesti, ekonomične su i stabilne. Dodatna pogodnost ove platforme jeste veća termostabilnost u poređenju sa iRNK vakcinama, što znači da zahtevaju manje stroge uslove hlađenja tokom skladištenja i distribucije [122].

Iako su iRNK vakcine dominirale globalnom imunizacijom tokom pandemije COVID-19, nekoliko DNK vakcina je takođe razvijeno i primenjeno, posebno u azijskim zemljama. Najpoznatiji primer je ZyCoV-D, DNK vakcina koju je razvila indijska kompanija Zydus Cadila. To je prva DNK vakcina protiv COVID-19 odobrena za upotrebu kod ljudi, a primenjuje se intradermalno pomoću posebne beziglene injekcione tehnologije [123,124]. Pored nje, u različitim fazama kliničkih ispitivanja su i INO-4800, AG0302-COVID19, GX-19N vakcine [125].

2.1.7.3.2. iRNK vakcine

Iako su iRNK vakcine godinama unazad proučavane u borbi protiv različitih infektivnih bolesti, kao što su grip, HIV, zika i krpeljski encefalitis [126–130], kao i u okviru imunoterapije određenih karcinoma, poput melanoma, njihovu pravu afirmaciju i globalnu primenu omogućila je tek pandemija COVID-19.

Za razliku od tradicionalnih vakcina koje sadrže gotov antigen ili oslabljeni virus, iRNK vakcine sadrže samo genetsku poruku – informaciju na osnovu koje ćelije same proizvode virusni protein. Nakon što se iRNK unese u organizam, ona ulazi u citoplazmu ćelija domaćina, gde se prevodi u virusni antigen, koji se zatim prezentuje imunskom sistemu i pokreće imunski odgovor (Slika 9). Nakon ulaska u ćeliju, iRNK ostaje isključivo u citoplazmi i služi kao matrica za sintezu proteina na ribozomima. Ne ulazi u jedro, ne utiče na DNK domaćina i ne integriše se u genom [121]. Po završetku procesa translacije, molekul iRNK se prirodno razgrađuje delovanjem endogenih enzima, prvenstveno ribonukleazama.



Slika 9. Mehanizam delovanja iRNK vakcina [97]

Za razliku od inaktivisanih vakcina koje sadrže ceo virus i time mogu indukovati imunski odgovor na više virusnih antigena, iRNK vakcine, kao i vektorske vakcine, kod SARS-CoV-2 su dizajnirane da sadrže isključivo genetsku informaciju za S protein. Zbog toga, imunski odgovor koji ove vakcine indukuju, uključujući produkciju antitela i aktivaciju T-ćelija, usmeren je isključivo ka S proteinu, dok ostali virusni antigeni ostaju van domašaja imunskog sistema. Ova specifičnost doprinosi efikasnosti, ali istovremeno može ograničiti zaštitu u slučaju mutacija koje menjaju strukturu S proteina [131].

Kao i druge vrste vakcina, i ove vakcine imaju svoje prednosti i nedostatke. U odnosu na druge vrste vakcina, prednosti iRNK vakcina su:

- **Brzi razvoj i proizvodnja** – za razliku od inaktivisanih vakcina, iRNK vakcine ne zahtevaju kultivaciju virusa ili bakterija, te se mogu sintetisati brzo i u velikim količinama, korišćenjem ćelijsko-nezavisnih (engl. *cell-free*) proizvodnih procesa [132];
- **Bezbednost** – tokom procesa proizvodnje, ne postoji rizik od infekcije, jer vakcina ne sadrži živi virus;
- **Bez rizika od genske integracije** – pošto iRNK ne ulazi u jedro ćelije, nema opasnosti od insercionih mutacija niti integracije u genom domaćina [121,133].

S druge strane, glavni problem iRNK vakcina je njihova nestabilnost. Zbog svoje prirodne osetljivosti na razgradnju ribonukleazama (RNAzama) i nestabilnosti pri višim temperaturama, iRNK vakcine zahtevaju posebne strategije stabilizacije kako bi očuvale strukturnu i biološku funkciju. Danas postoji više strategija za optimizaciju stabilnosti iRNK vakcina, među kojima se izdvajaju modifikacija nukleozida, kodonska optimizacija i enkapsulacija u lipidne nanočestice [133–135].

Prve farmaceutske kompanije čije su iRNK vakcine odobrene za upotrebu tokom pandemije COVID-19 bile su Pfizer-BioNTech i Moderna. iRNK vakcina kompanije Pfizer-BioNTech, označena kao BNT162b, bila je prva vakcina odobrena od strane FDA za primenu protiv COVID-19 [136]. Ova vakcina predstavlja iRNK molekul enkapsuliran u lipidne nanočestice, a razvijena je u dve varijante: BNT162b1, koja kodira RBD domen S proteina, i BNT162b2, koja kodira ceo S protein virusa SARS-CoV-2 [122]. Za razliku od nje, mRNA-1273 Moderna vakcina kodira S2 subjedinicu S proteina [122]. U tabeli 1. su prikazane glavne karakteristike ovih vakcina.

Brojne studije sprovedene tokom pandemije COVID-19 su pokazale i potvrdile visoku efikasnost iRNK vakcina u sprečavanju teških ishoda COVID-19 bolesti, uključujući hospitalizaciju i smrt, u različitim populacijama i protiv različitih varijanti SARS-CoV-2 virusa [137–141]. Studija Dagana i saradnika [140], sprovedena u Izraelu na populaciji od gotovo 600.000 vakcinisanih i isto toliko nevakcinisanih ispitanika, pokazala je da iRNK vakcina BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) postiže visoku efikasnost u prevenciji različitih kliničkih ishoda. Već nakon prve doze zabeležena je značajna zaštita od infekcije (46%), simptomatske bolesti (57%), hospitalizacije (74%), teških formi bolesti (62%) i smrti (72%), dok je nakon primene druge doze efikasnost bila još izraženija i dostizala 92% za potvrđenu infekciju, 94% za simptomatski COVID-19, 87% za hospitalizaciju i 92% za tešku bolest. S druge strane, Luring i saradnici [142] pokazali su da iRNK vakcine (Pfizer-BioNTech i Moderna) obezbeđuju visoku efikasnost i u prevenciji hospitalizacija izazvanih različitim varijantama SARS-CoV-2. Efikasnost u sprečavanju hospitalizacije iznosila je 85% za dve doze protiv alfa varijante, 85% za dve doze protiv delta varijante i 94% za tri doze protiv delta varijante. Kod omikron varijante zabeležena je značajno niža zaštita nakon dve doze (65%), dok je primenom treće doze efikasnost porasla na 86%. Ovi rezultati jasno ukazuju da su iRNK vakcine zadržale visok stepen zaštite protiv težih kliničkih ishoda i u uslovima cirkulacije novih varijanti, pri čemu je dodatna (buster) doza bila od presudnog značaja za očuvanje adekvatne zaštite od omikron varijante. Posebno je značajno istaći da je visoka efikasnost potvrđena i u trudnoći: u kohortnoj studiji

sprovedenoj u Izraelu, efikasnost vakcine BNT162b2 kod trudnica iznosila je 96% za prevenciju laboratorijski potvrđene infekcije, 97% za simptomatsku infekciju i 89% za hospitalizaciju povezanu sa COVID-19, što ukazuje da je zaštita u ovoj osjetljivoj populaciji bila uporediva sa onom u opštoj populaciji [138].

2.1.7.4. Rekombinantne subjedinične vakcine

Rekombinantne vakcine zasnivaju se na tehnologiji rekombinantne DNK, kojom se u laboratorijskim uslovima proizvode specifični virusni proteini, koji se zatim koriste kao antigeni za podsticanje imunskog odgovora. Kada je reč o SARS-CoV-2, ove vakcine sadrže prečišćen S protein ili njegove funkcionalne domene, najčešće RBD domen, koji se proizvode u različitim ekspresionim sistemima, uključujući kvasce (npr. *Pichia pastoris*) i sisarske ćelije [143,144]. Ove vakcine karakteriše povoljan bezbednosni profil, ali se njihova imunogenost u velikoj meri oslanja na primenu adjuvansa koji poboljšavaju unos antigena u APC i omogućavaju razvoj dugotrajnog imunskog odgovora [101].

Prva rekombinantna vakcina za humanu primenu bila je vakcina protiv hepatitisa B, odobrena 1986. godine, koja se zasnivala na rekombinantno proizvedenom površinskom antigenu (engl. Hepatitis B surface antigen, HBsAg) u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* [145]. Tehnološki napredak ostvaren u ovom domenu postavio je temelje za savremene rekombinantne subjedinične vakcine, uključujući one razvijene tokom pandemije COVID-19. Jedan od najznačajnijih primera je NVX-CoV2373 (Novavax), vakcina koja sadrži nanopartikulisani rekombinantni S protein SARS-CoV-2 proizveden u ćelijama *Spodoptera frugiperda*, u kombinaciji sa adjuvansom Matrix-M [145,146].

Kliničke studije su pokazale da Novavax vakcina pruža visoku efikasnost u zaštiti od simptomatskog COVID-19 tokom ranih faza pandemije. Tokom faze III kliničkog ispitivanja u Ujedinjenom Kraljevstvu, ova vakcina pokazala je ukupnu efikasnost od 89,7% u prevenciji infekcije, uključujući 86% efikasnosti protiv alfa varijante SARS-CoV-2 virusa [147]. Dodatne podatke pružila je i PREVENT-19 studija, u kojoj je vakcina pokazala izuzetnu zaštitu od hospitalizacije: tokom analize sprovedene u periodu kada je alfa soj bio dominantan, nijedan vakcinisani ispitanik nije bio hospitalizovan, dok je u placebo grupi registrovano više hospitalizacija [148].

Uprkos visokoj efikasnosti Novavax vakcine protiv ranijih sojeva SARS-CoV-2, uključujući alfa varijantu, brojna istraživanja pokazala su da imunski odgovor izazvan ovom vakcinom značajno opada u prisustvu Omikron varijante i njenih podvarijanti. Nakon primene dve doze originalne formulacije vakcine, neutralizacija nije bila detektovana u 72% uzoraka za BA.1 i u 59% uzoraka za BA.5 podvarijantu [149]. Međutim, u studiji koju su sprovedli Raiser i saradnici, Novavax vakcina je pokazala snažan i širok imunski odgovor kada se koristi kao buster (treća) doza, bez obzira na vrstu vakcine primenjene u primarnoj vakcinaciji (iRNK vakcine poput BNT162b2 i mRNA-1273, vektorska Ad26.COV2.S ili rekombinantna NVX-CoV2373) [150]. Ovi rezultati ukazuju na značajan potencijal ove vakcine kao univerzalne buster opcije u kombinaciji sa različitim tipovima primarne vakcinacije.

2.1.8. Buster doze i potreba za dodatnom imunizacijom

Tokom pandemije COVID-19, praćenje nivoa antitela protiv SARS-CoV-2 imalo je ključnu ulogu u razumevanju dinamike imunskog odgovora nakon prirodne infekcije i vakcinacije. Kako su se virusne varijante vremenom menjale – neke postajale zaraznije, druge izbegavale prethodno stečen vakcinalni imunitet – postalo je još važnije pratiti nivoe antitela u populaciji. U tom kontekstu, naučna zajednica je sprovedla veliki broj istraživanja posvećenih praćenju dinamike antitela, njihovoj povezanosti sa kliničkom zaštitom i sposobnosti da neutrališu različite varijante virusa.

U početnoj fazi COVID-19 pandemije dominirala je tzv. izvorna (Wuhan) varijanta virusa. Međutim, zbog visokog stepena transmisije i mutacija u virusnom genomu, tokom narednih meseci počele su da se pojavljuju VOC kao što su Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (B.1.617.2) i Omikron (B.1.1.529). Delta (B.1.617.2) varijanta virusa prvi put identifikovana je u Indiji tokom 2021. godine, a ubrzo je postala i dominantna varijanta širom sveta [151]. Ubrzo nakon nje, detektovana je Omikron (B.1.1.529) varijanta, koju je karakterisao visok stepen mutacije (preko 60 mutacija od čega su 37 mutacija u regionu S proteina [152,153]), koje su dovele do povećane transmisije i virulentnosti ovog soja [154]. Upravo zbog ovih mutacija, karakteristika Omikron (B.1.1.529) varijante je bio visok stepen izbegavanja prethodno stečenog ili vakcinom indukovnog imunskog odgovora. Važno je naglasiti da su vakcine prve generacije, bilo da su zasnovane na celom inaktivisanom virusu (npr. Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcina) ili na genetskoj informaciji za S protein (iRNK i vektorske vakcine), razvijene prema izvornoj (Wuhan) varijanti SARS-CoV-2. Usled prisustva brojnih mutacija u imunski relevantnim regijama kod novijih varijanti, njihova zaštitna efikasnost bila je delimično smanjena.

Nakon primarne imunizacije sa dve doze vakcine, imunski odgovor na SARS-CoV-2 je vremenom opadao ispod zaštitnog nivoa, zbog čega je preporučena treća, odnosno buster doza vakcine. Pojava i širenje novih VOC SARS-CoV-2 virusa, koje su zahtevale viši titar neutrališućih antitela za efikasnu neutralizaciju [155–158], u kombinaciji sa slabljenjem humoralnog imunskog odgovora nakon početne vakcinacije, predstavljali su ključne razloge zbog kojih je SZO preporučila primenu buster doze [6], posebno kod osoba sa oslabljenim imunitetom i hroničnim bolestima.

Na osnovu preporuke SZO, te odluke Nacionalnog komiteta za imunizaciju (NITAG), a prema Stručno-metodološkom uputstvu za sprovođenje preporučene imunizacije u Republici Srbiji [75], buster doza vakcine protiv COVID-19 primenjivala se prema sledećim kriterijumima:

- Nakon najmanje pet meseci od davanja druge doze, kod osoba koje su prethodno primile dve doze iRNK (Pfizer-BioNTech) ili vektorske (Gam-KOVID-Vak, Astra Zeneka) vakcine;
- Nakon najmanje četiri meseca od davanja druge doze, kod osoba koje su prethodno primile dve doze inaktivisane SARS-CoV-2 (Vero Cell)-Inactivated Sinopharm vakcine;
- Nakon najmanje pet meseci od davanja dodatne, treće doze, kod osoba sa primarnim i sekundarnim imunodeficijencijama (osobe koje su nakon najmanje 28 dana od druge doze primile iRNK vakcinu, kao dodatnu, treću dozu).

Pored nacionalnih smernica, značajan uticaj na definisanje buster strategija imale su i preporuke regulatornih tela, kao što su FDA i EMA (engl. European Medicines Agency). Na osnovu kliničkih podataka Nacionalnog instituta za alergije i infektivne bolesti (NIAID), FDA je odobrila primenu heterologne buster vakcinacije, poznate i kao „mix and match“ pristup. Ovim je omogućeno da osobe koje su primarno vakcinisane jednom vrstom vakcine (npr. Janssen, Moderna ili Pfizer-BioNTech) dobiju buster dozu drugog proizvođača, uz poštovanje propisanih vremenskih intervala i kriterijuma za ciljnu populaciju. Ovakav pristup primenjivan je i u Srbiji, naročito kod osoba koje su inicijalno primile inaktivisane vakcine (npr. Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine), a kasnije kao buster dozu iRNK vakcinu.

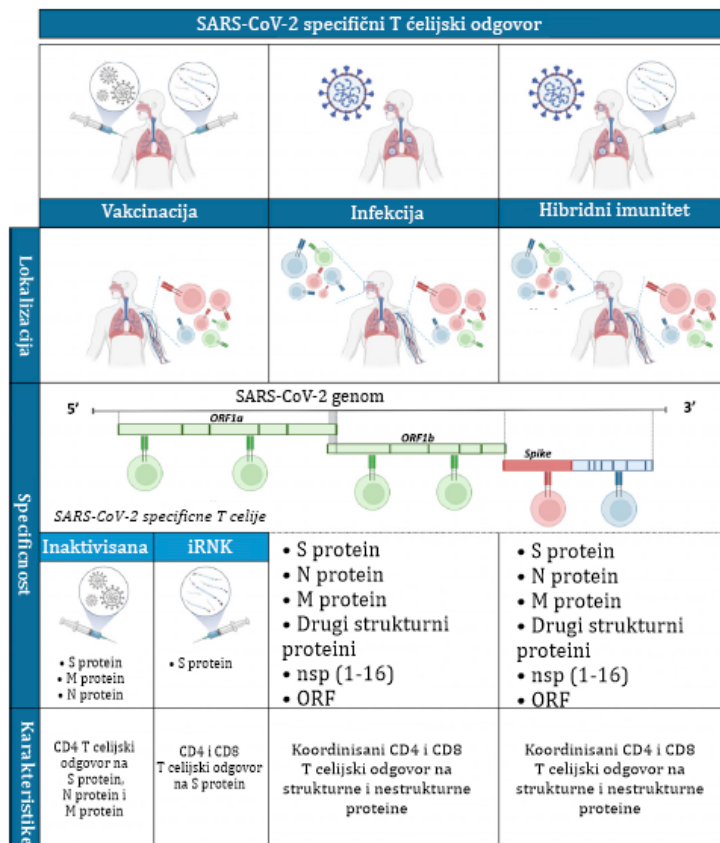
Buster vakcinacija protiv COVID-19, bilo homolognog ili heterolognog tipa, uopšteno pojačava imunski odgovor. Ipak, trajnost i efikasnost imunskog odgovora zavise od mnogih faktora, uključujući vrstu vakcine, prethodni status infekcije i trenutne cirkulišuće varijante virusa. Brojne studije potvrdile su da treća doza značajno povećava nivo neutrališućih antitela, poboljšava efikasnost vakcine protiv novih varijanti i doprinosi smanjenju rizika od teških oblika bolesti i hospitalizacije [159–164].

2.1.9. Hibridni imunitet - sinergija prirodne infekcije i vakcinacije

Hibridni imunitet predstavlja sinergiju prirodnog imuniteta, stečenog nakon preležane infekcije, i imuniteta indukovano vakcinacijom (engl. *vaccine-induced immunity*). Prirodna infekcija često dovodi do razvoja snažne i dugotrajnije imunološke memorije, dok imunitet stečen vakcinacijom, iako inicijalno efikasan, vremenom pokazuje tendenciju opadanja. Zbog toga se hibridni imunitet smatra posebno značajnim, jer kombinuje prednosti oba mehanizma i obezbeđuje širu i dugotrajniju zaštitu od infekcije i njenih komplikacija (Slika 10). Tokom pandemije COVID-19, brojne studije su pokazale da osobe sa hibridnim imunitetom:

- razvijaju viši titar neutrališućih antitela [165,166];
- imaju širi spektar antitela sa sposobnošću neutralizacije različitih varijanti virusa [167–170];
- imaju jači i funkcionalno aktivniji T-ćelijski odgovor (Slika 10) [171–173].

Studija objavljena u časopisu *The Lancet Infectious Diseases* pokazala je da prirodni imunitet pruža visoku i dugotrajnu zaštitu od reinfekcije (95%) i hospitalizacije (87%) i do 20 meseci nakon infekcije, dok hibridni imunitet dodatno smanjuje rizik reinfekcije i obezbeđuje oko 90% manji rizik hospitalizacije u poređenju sa samim prirodnim imunitetom [174]. Slično tome, Feldstein i saradnici [175] potvrdili su da hibridni imunitet pruža najviši nivo zaštite, naročito protiv simptomatskog COVID-19. Kod osoba sa prethodnom infekcijom koje su primile bivalentnu vakcinu, efikasnost u periodu 7–179 dana nakon vakcinacije iznosila je 62,2% za laboratorijski potvrđenu infekciju i 73,0% za simptomatski COVID-19, dok je nakon ≥ 180 dana zaštita opadala (39,4% i 56,7%). Slično tome, kombinacija infekcije i monovalentne vakcine (<180 dana) obezbeđivala je 59,5% zaštite od infekcije i 80,6% zaštite od simptomatskog COVID-19. Ovi nalazi nedvosmisleno potvrđuju da kombinacija prirodne infekcije i vakcinacije pruža najefikasniju i najtrajniju zaštitu protiv SARS-CoV-2.



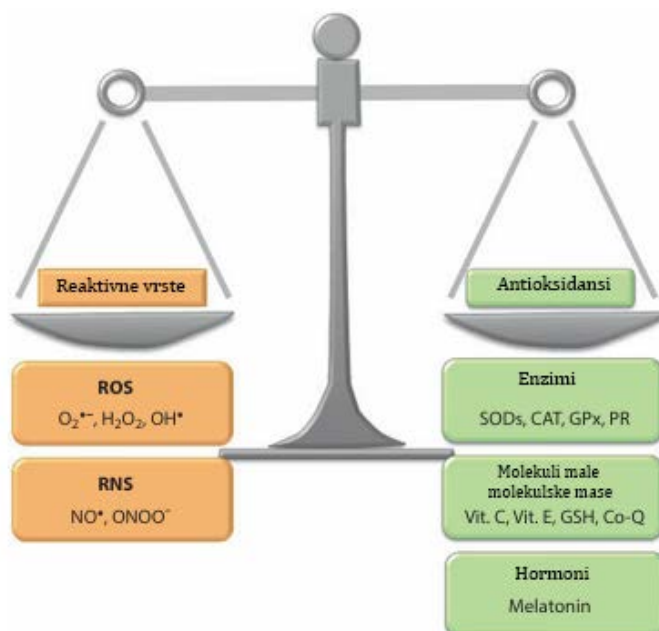
Slika 10. T-ćelijski odgovor na SARS-CoV-2: vakcinacija, infekcija i hibridni imunitet [172]

2.2.Oksidativni stres

Oksidativni stres je stanje organizma kada količina reaktivnih vrsta (pre svega poreklom od molekulskog kiseonika i azota) premašuje kapacitet zaštitnog sistema antioksidativne zaštite da ih efikasno neutrališe, što dovodi do povećanog oštećenja molekula i, posledično, do poremećaja ćelijskih funkcija.

Reaktivne vrste obuhvataju ROS i RNS, koje se mogu generisati kako endogenim, tako i egzogenim putem. Endogena produkcija ROS/RNS-a uključuje procese kao što su: mitohondrijska respiracija, inflamatorni odgovor, fagocitna aktivnost i autooksidacija molekula putem enzima poput NADPH oksidaze, lipoksigenaze, ciklooksigenaze i ksantin oksidaze. S druge strane, egzogeni faktori koji doprinose nastanku reaktivnih vrsta uključuju jonizujuće i UV zračenje, pušenje, alkohol, određene lekove i psihofizički stres [176].

U fiziološkim uslovima, organizam održava ravnotežu između prooksidativnih i antioksidativnih mehanizama (Slika 11) putem antioksidativnog sistema koji uključuje enzime (superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GPx)), neenzimske molekule male molekulske mase (glutation, tioli, vitamin E, vitamin C) i hormonske regulatore. Kada je ravnoteža narušena u korist oksidansa – usled pojačane produkcije ili oslabljenog delovanja antioksidativne odbrane – dolazi do razvoja oksidativnog stresa.



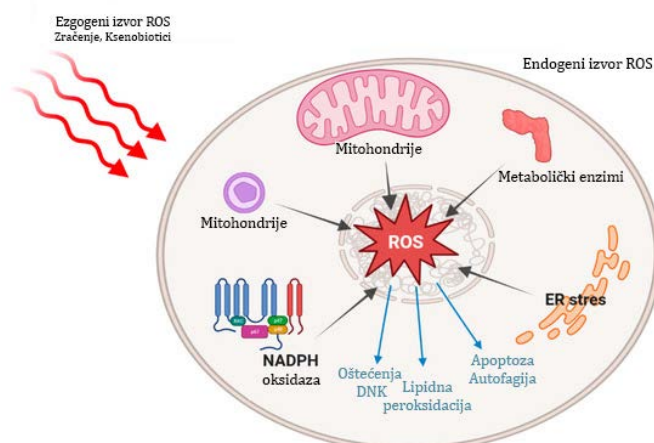
Slika 11. Oksidativni stres – narušena homeostaza između pro- i antioksidativnih molekula [177]

2.2.1. Reaktivne kiseonične vrste

Redukcijom molekulskog kiseonika (O_2) u živim sistemima nastaju različite reaktivne vrste kiseonika, kao što su superoksid anjon ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($\bullet OH$), vodonik-peroksid (H_2O_2) i singletni kiseonik (1O_2). Među njima, $O_2^{\bullet-}$ se smatra primarnim oblikom ROS, jer predstavlja polaznu tačku za formiranje drugih reaktivnih vrsta, uključujući H_2O_2 i $\bullet OH$.

Kao što je prethodno navedeno, ROS mogu nastati iz različitih endogenih i egzogenih izvora. Endogeni izvori uključuju elektron-transportni lanac mitohondrija, aktivnost različitih metaboličkih enzima poput NADPH oksidaze i lipooksigenaze, dok egzogeni izvori obuhvataju jonizujuće i UV zračenje, izloženost ksenobiotičima, toksinima i drugim faktorima iz spoljašnje sredine. Prekomerna produkcija i akumulacija ROS-a može dovesti do oksidativnih oštećenja makromolekula, uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline. Posledično, ROS mogu

aktivirati različite signalne puteve koji dovode do ćelijske disfunkcije, uključujući procese apoptoze i autofagije (Slika 12)



Slika 12. Nastanak i dejstvo reaktivnih kiseoničnih vrsta [178]

Superoksid anjon se uglavnom stvara u respiratornom lancu mitohondrija, naročito u kompleksima I i III. Njegova redukcija odvija se pomoću SOD koja katalizuje konverziju $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 . Vodonik-peroksid, iako sam po sebi relativno slab oksidans, u prisustvu Fe^{2+} (ili Cu^+) može učestvovati u Fentonovoj reakciji pri čemu nastaje izuzetno reaktivni $\bullet OH$ koji ima sposobnost da direktno ošteti lipide, proteine i DNK [179]. Pored toga, $O_2^{\bullet-}$ može inicirati lipidnu peroksidaciju putem reakcije sa polinezasićenim masnim kiselinama, čime se formiraju hidroperoksilni radikali, a krajnji produkt reakcije je formiranje malonildialdehida (MDA).

Usled povećane produkcije ROS-a, i stanja oksidativnog stresa, dolazi do oštećenja makromolekula poput nukleinskih kiselina, lipida i proteina. Na nivou DNK, delovanje ROS može izazvati niz strukturnih promena: modifikacije purinskih i pirimidinskih baza, oštećenja dezoksiriboze, pojavu jedno- i dvolančanih prekida, delecije, translokacije, kao i ukrštene veze unutar istog ili između različitih DNK lanaca [179]. Kao biomarker oksidativnog oštećenja DNK koristi se 8-hidroksiguanin (8-OHdG), oksidovani derivat guanina, čiji se nivoi povećavaju proporcionalno intenzitetu oksidativnog stresa [180].

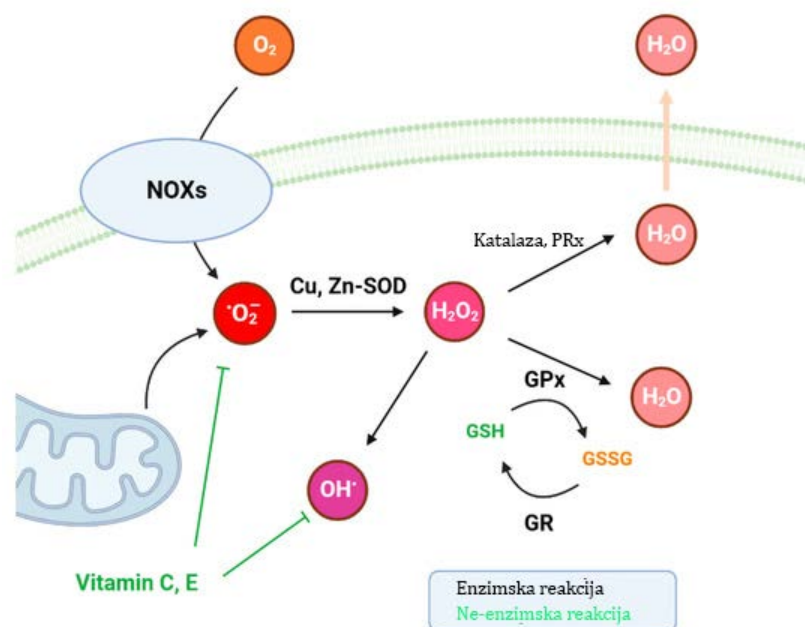
Oksidativna oštećenja proteina takođe predstavljaju važnu posledicu dejstva ROS. Ona mogu biti **nespecifična**, pri čemu dolazi do degradacije proteina i modifikacije različitih aminokiselinskih ostataka, i **specifična**, koja podrazumevaju formiranje karbonilnih grupa na pojedinim aminokiselinama. Aminokiseline koje su naročito osetljive na ovakva oštećenja uključuju lizin, prolin, histidin, arginin i treonin [181]. Jedan od značajnih mehanizama toksičnosti $O_2^{\bullet-}$ jeste direktna oksidacija i inaktivacija Fe-S proteina, poput akonitaze. Ovaj enzim ima ključnu ulogu u Krebsovom ciklusu, jer katalizuje pretvaranje citrata u izocitrat, a njegova inhibicija može značajno ugroziti proizvodnju energije i ćelijsku održivost. Kao pouzdan pokazatelj oksidativne modifikacije proteina, koristi se određivanje karbonilnih grupa. Povećana akumulacija karbonilnih grupa može ukazivati na prisustvo ili progresiju različitih bolesti, uključujući Alchajmerovu bolest, *dijabetes melitus*, inflamatorne bolesti creva (IBD) i reumatoidni artritis [182,183].

Polinezasićene masne kiseline, koje se nalaze u sastavu membranskih fosfolipida, posebno su podložne oksidaciji i zbog toga predstavljaju primarne ciljne molekule za reaktivne kiseonične vrste. Proces njihove oksidacije poznat je kao lipidna peroksidacija i odvija se u tri osnovne faze: inicijacija, propagacija i terminacija. U inicijalnoj fazi, ROS (najčešće $\bullet OH$) "uzima" atom vodonika sa polinezasićene masne kiseline, čime se formira lipidni radikal ($L\bullet$). Ovaj radikal zatim reaguje sa molekulskim kiseonikom (O_2) i formira lipidni peroksilni radikal

($\text{LOO}^\bullet$). Tokom faze propagacije, $\text{LOO}^\bullet$ reaguje sa drugim nezasićenim masnim kiselinama u membrani, "uzima" atom vodonika i stvara nove lipidne radikale, čime se lančana reakcija održava i dovodi do progresivnog oštećenja membranskih lipida. U završnoj, terminalnoj fazi, dolazi do međusobne reakcije dva slobodna radikala, čime se formiraju stabilniji produkti i lančana reakcija se zaustavlja. Međutim, do tog trenutka, veliki broj molekula lipida može biti oksidativno izmenjen. Lipidna peroksidacija ne samo da menja strukturu i fluidnost ćelijske membrane, već dovodi i do stvaranja sekundarnih produkata kao što je MDA. Malonildialdehid je toksičan molekul, koji pokazuje mutagena i citotoksična svojstva, i često se koristi kao biomarker oksidativnog oštećenja lipida [184].

Kako bi se zaštitio od štetnih efekata oksidativnog stresa, organizam je razvio antioksidativni zaštitni sistem, koji obuhvata enzimske i neenzimske komponente (Slika 13). U enzimske antioksidanse ubrajaju se:

- SOD – katalizuje konverziju $\text{O}_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 ;
- CAT – razlaže H_2O_2 na vodu i kiseonik;
- GPx – redukuje H_2O_2 i lipidne perokside koristeći glutation (GSH);
- glutation-reduktaza (GR) – obnavlja regenerisani glutation iz njegovog oksidovanog oblika (GSSG).



Slika 13. Šematski prikaz antioksidativnih sistema u ćeliji. Aktivnost NADPH oksidaza (NOX) doprinosi stvaranju superoksidnog anjona ($\text{O}_2^{\bullet-}$), koji se dalje razlaže pomoću superoksid-dismutaze (SOD) u vodonik-peroksid (H_2O_2). H_2O_2 se potom redukuje u vodu, pomoću glutation-peroksidaze (GPx) ili peroksiredoksina (Prx), pri čemu se troši glutation (GSH). Regeneracija glutationa iz njegovog oksidovanog oblika (glutation-disulfid, GSSG) sprovodi se uz pomoć glutation-reduktaze (GR) [178].

S druge strane, neenzimski antioksidansi uključuju niz molekula male molekulske mase koji deluju kao "hvatači" (engl. *scavengers*) slobodnih radikala kao što su:

- **vitamin C** (askorbinska kiselina) – snažan hidrofilni antioksidans, koji direktno neutrališe ROS;
- **vitamin E** (α -tokoferol) – lipofilni antioksidans, koji štiti ćelijske membrane od lipidne peroksidacije;
- GSH, mokraćna kiselina, bilirubin, flavonoidi i karotenoidi, koji zajedno doprinose očuvanju redoks homeostaze.

2.2.2. Reaktivne azotne vrste

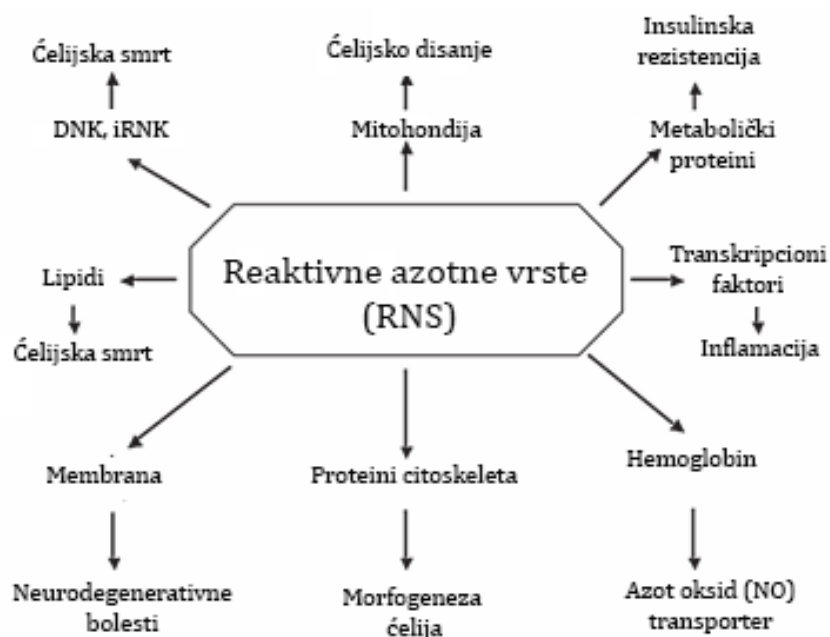
Reaktivne azotne vrste predstavljaju grupu reaktivnih molekula koji nastaju iz azot-monoksida ($\bullet\text{NO}$) i njegovih derivata. Ova grupa obuhvata različita azotna jedinjenja, među kojima su: nitroksil-anjon (HNO), nitrozonijum-kation (NO^+), viši oksidi azota (npr. NO_2 , N_2O_3) i S-nitrozotoli (RSNO). Važno je napomenuti da se nitrati (NO_3^-), kao krajnji proizvodi metabolizma azotnih jedinjenja, ne ubrajaju u reaktivne azotne vrste zbog njihove hemijske inertnosti. Usled prekomerne produkcije RNS-a dolazi do nastanka nitroznog stresa.

Azot-monoksid i njegovi derivati čine osnovu različitih biohemijskih mehanizama nastanka RNS-a, pri čemu $\bullet\text{NO}$ ima centralnu ulogu. Azot-monoksid se sintetise iz L-arginina i molekulskog kiseonika, dejstvom enzima NO-sintaza (NOS). U ljudskom organizmu identifikovane su tri glavne izoforme ovog enzima: neuronska (nNOS ili NOS1), inducibilna (iNOS ili NOS2) i endotelna (eNOS ili NOS3), od kojih svaka ima specifičnu funkciju i tkivnu ekspresiju [185].

Jedan od najreaktivnijih i najcitotoksičnijih RNS jeste peroksinitrit (ONOO^-), koji nastaje veoma brzom reakcijom između $\bullet\text{NO}$ i $\text{O}_2^{\bullet-}$. ONOO^- se dalje može razgraditi do azot-dioksida (NO_2), dok nitrit (NO_2^-) nastaje oksidacijom $\bullet\text{NO}$ pod dejstvom ROS, kao i njegovom razgradnjom iz peroksinitrita. U hipoksičnim uslovima, NO_2^- može biti redukovano nazad u $\bullet\text{NO}$, putem enzima kao što je ksantin oksidaza [186].

Takođe, dinitrogen-trioksid (N_2O_3) nastaje autooksidacijom $\bullet\text{NO}$ u prisustvu molekulskog kiseonika, dok S-nitrozotoli (RSNO) predstavljaju stabilne produkte koji nastaju kovalentnim vezivanjem NO-grupe za tiolne ($-\text{SH}$) grupe cisteinskih ostataka u proteinima. RSNO jedinjenja imaju važnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji, ali i u oštećenju proteina putem S-nitrozilacije [187].

Kao što je slučaj sa ROS, i prekomerna produkcija RNS-a dovodi do značajnog oštećenja makromolekula (Slika 14) i poremećaja ćelijske homeostaze. Jedan od važnih mehanizama kojim RNS modifikuju proteine jeste S-nitrozilacija, specifična post-translaciona modifikacija gde dolazi do kovalentnog vezivanja $\bullet\text{NO}$ za $-\text{SH}$ grupu cisteinskih ostataka u proteinima, čime nastaje RSNO. Ova modifikacija se povezuje sa patofiziologijom brojnih bolesti, uključujući *dijabetes melitus* [188], cističnu fibrozu [189] i neurodegenerativne bolesti [190].



Slika 14. Pregled bioloških efekata reaktivnih azotnih vrsta (RNS) na ključne ćelijske strukture i procese [187]

Drugi značajan mehanizam je glutacionacija, koja podrazumeva vezivanje GSH za -SH grupe proteina, čime se regulišu njihova struktura i funkcija. Kada GSH podleže S-nitrozilaciji, nastaje S-nitrozoglutation (GSNO), koji se smatra ključnim fiziološkim prenosiocem efekata azot-monoksida [187]. Njegov metabolizam kontroliše GSNO-reduktaza, enzim koji katalizuje razgradnju GSNO uz formiranje glutation disulfida (GSSG) i amonijaka, čime se regulišu intracelularni nivoi S-nitrozotiola [187]. Ova enzimaska aktivnost predstavlja glavni mehanizam kontrole biološki aktivnog •NO unutar ćelije.

Treći važan mehanizam dejstva RNS je nitracija tirozinskih ostataka, proces koji se odvija u dve faze. U prvoj fazi, ONOO⁻ oksiduje tirozinske ostatke u proteinima, stvarajući tirozil radikal. U drugoj fazi, tirozil radikal reaguje sa NO₂, formirajući 3-nitrotirozin (3-NO₂-Tyr) [191]. Ova modifikacija se koristi kao specifičan biomarker nitrozativnog stresa, posebno u stanjima kao što su inflamatorne bolesti i neurodegenerativni poremećaji [192–194].

RNS mogu direktno ili indirektno reagovati sa ćelijskim lipidima, stvarajući proizvode koji modifikuju proteine i spadaju u kategorije kao što su lipidni peroksidi, reaktivni lipidi sa elektrofilnim svojstvima i agonisti receptora [187]. Nitrolinoleinska kiselina (LNO₂), proizvod NO-zavisne nitracije linolne kiseline, deluje kao signalni medijator i štiti ćelije od upale [154].

Kao i ROS, RNS na nivou DNK dovode do modifikacija nukleotidnih baza, jedno- i dvolančanih prekida, mutacija, delecija i translokacija. RNS, naročito ONOO⁻, deluju kroz nitraciju i nitrozilaciju nukleinskih kiselina, pre svega sa guaninskim bazama, usled čega nastaje 8-nitroguanozin (8-NO₂-G), koji dovodi do transverzije guanina (G) u timin (T) [187].

Slično kao kod oksidativnog stresa, organizam poseduje efikasne mehanizme zaštite i od nitrozativnog stresa, čiji je cilj neutralizacija RNS-a i očuvanje ćelijske homeostaze. Ovi zaštitni mehanizmi obuhvataju enzimске i neenzimске komponente antioksidativnog sistema. Među enzimskim antioksidansima najznačajniju ulogu imaju SOD, GPx i γ-glutamyl transpeptidaza [187].

Neenzimski antioksidansi uključuju niz molekula male molekulske mase koji deluju kao "hvatači" slobodnih radikala i stabilizatori redoks ravnoteže. U ovu grupu ubrajaju se [187]:

- GSH – centralni intracelularni tiolni antioksidans;
- tioredoksin (Trx) - učestvuje u detoksikaciji ONOO⁻ i reverziji S-nitrozilacije, čime doprinosi očuvanju ćelijske funkcionalnosti i redoks ravnoteže [195];
- peroksiredoksini (Prx), posebno izoforme Prx2 i Prx3, efikasno redukuju ONOO⁻, čime sprečavaju nitraciju tirozina i oksidaciju proteina [196,197];
- albumin – najzastupljeniji protein plazme sa antioksidativnim svojstvima;
- metaloporfirini – kompleksni molekuli koji učestvuju u deaktivaciji reaktivnih vrsta;
- jedinjenja na bazi selena (Se) – kofaktori za aktivnost selenoenzima poput GPx, kao i mokraćna kiselina i β-karoten, koji doprinose neutralizaciji slobodnih radikala u cirkulaciji i tkivima.

Zajedničkim dejstvom svih ovih komponenti, organizam uspeva da efikasno kontroliše štetne efekte nitrozativnog stresa i očuva funkcionalnost ćelijskih struktura.

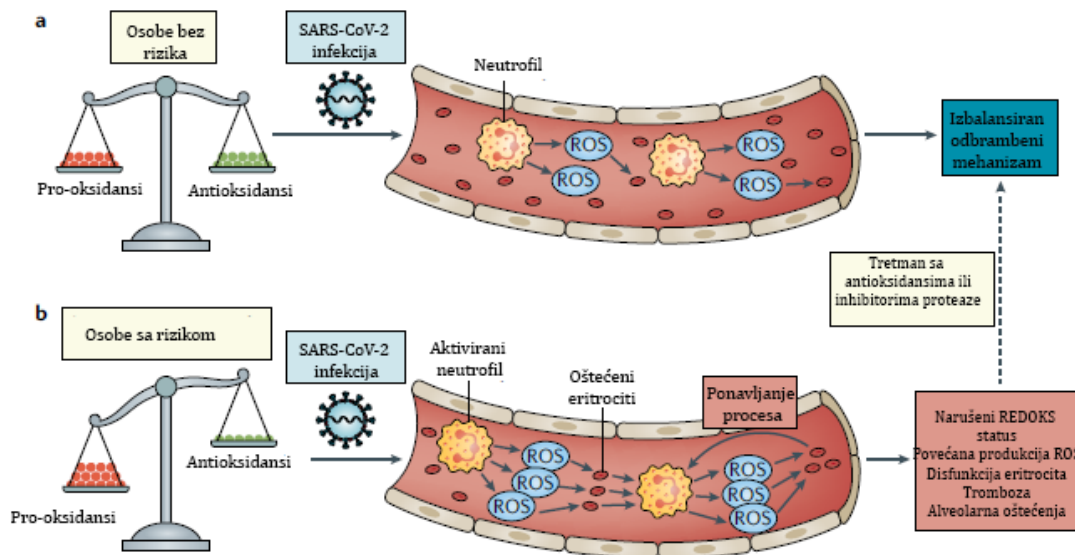
2.2.3. Oksidativni stres u patogenezi COVID-19

Veza između virusnih infekcija i oksidativnog stresa prvi put je potvrđena još 1979. godine, na modelu infekcije Sendai virusom [198]. Od tada pa do danas, oksidativni stres se povezuje sa brojnim virusnim infekcijama, uključujući infekcije izazvane humanim respiratornim sincicijumskim virusom (RSV), rinovirusom, virusom influence i drugim patogenima [199–201]. Tokom virusne infekcije, ROS ne moraju imati isključivo štetan efekat – one učestvuju u eradikaciji virusa i deluju kao signalni molekuli u komunikaciji između ćelija imunskog sistema. Ipak, kada dođe do prekomerne aktivacije imunskog odgovora, pojačana

produkcija ROS može dovesti do razvoja oksidativnog stresa, što za posledicu ima oštećenje ćelijskih struktura i tkiva.

Tačan mehanizam kojim se povezuje SARS-CoV-2 infekcija sa oksidativnim stresom još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Ipak, poznato je da patogenezu bolesti karakteriše hiperaktivacija imunskog sistema i oštećenje ćelija koje nisu direktno inficirane virusom. Do toga dolazi usled delovanja ROS, koje u velikim količinama oslobađaju aktivirane ćelije imunskog sistema, prvenstveno neutrofili i makrofagi, dok migriraju i nakupljaju se u inficiranim organima, poput pluća [202].

Kada infekcija SARS-CoV-2 virusom pokrene prekomernu aktivaciju neutrofila, posebno kod osetljivih osoba poput starijih osoba ili onih sa postojećim zdravstvenim problemima, to dovodi do prekomerne proizvodnje ROS koju telo ne može pravilno da reguliše. Ovaj višak ROS narušava sposobnost eritrocita da transportuju kiseonik, oštećuje zidove krvnih sudova, podstiče stvaranje krvnih ugrušaka i pokreće veću aktivaciju neutrofila, što zauzvrat proizvodi više ROS (Slika 15) [203]. Krajnji rezultat je široko rasprostranjeno oštećenje tkiva i potencijalno otkazivanje organa. Pored toga, SARS-CoV-2 može indukovati različite mehanizme ćelijske smrti, uključujući ferroptozu, nekrozu, apoptozu, autofagiju i piroptozu [204].



Slika 15. Oslobađanja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) usled neutrofilije tokom SARS-COV-2 infekcije. a /Kod osoba koje nisu pod povećanim rizikom, višak ROS se uravnotežuje povećanom aktivnošću antioksidativne odbrane. b / Kod osoba sa narušenom ravnotežom redoks sistema, produkcija ROS nije adekvatno kontrolisana, što dovodi do povećane produkcije ROS-a, disfunkcije eritrocita, tromboze i alveolarnih oštećenja [203].

Mitohondrije predstavljaju ključne ćelijske organele odgovorne za proizvodnju energije u obliku ATP-a (engl. *Adenosine Triphosphate*) putem oksidativne fosforilacije. Tokom ćelijskog disanja, u mitohondrijama dolazi do stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika specifičnih za ove organele – mitohondrijskih ROS (engl. *mitochondrial reactive oxygen species*, mtROS). Iako neutrofili i makrofagi poseduju relativno mali broj mitohondrija, formiranje mtROS u ovim ćelijama igra ključnu ulogu u unutarćelijskoj signalizaciji povezanoj sa inflamatornim odgovorom. U makrofagima, mtROS učestvuju u aktivaciji NLRP3 inflamazoma [205], što predstavlja centralni mehanizam za indukciju produkcije proinflamatornih citokina, kao što je interleukin-1 β (IL-1 β) [206].

S druge strane, proinflamatorni citokini, kao što su TNF- α i IL-6, mogu dodatno stimulisati proizvodnju mtROS u endotelnim ćelijama, čime se pogoršava oksidativni stres i indukuje endotelna disfunkcija – jedan od ključnih patofizioloških mehanizama teškog oblika

COVID-19 [207]. Ova disfunkcija često prethodi razvoju ozbiljnih komplikacija, uključujući trombozu i akutni respiratorni distress sindrom (ARDS).

Značajan broj studija ukazuje na ključnu ulogu oksidativnog stresa u patofiziologiji COVID-19, pri čemu su korišćeni različiti biohemijski pokazatelji za procenu stepena oksidativnog oštećenja. U istraživanju koje su sprovedi Pavlova i saradnici [202], analizirani su parametri oksidativnog statusa uključujući TBARS (engl. Thiobarbituric Acid-Reactive Substances), SOD, CAT, GR i ukupni antioksidativni kapacitet (AOC). Vrednosti TBARS-a bile su gotovo tri puta više u odnosu na kontrolnu grupu (zdravi ispitanici), što ukazuje na izraženo lipidno oksidativno oštećenje. Istovremeno, AOC je bio smanjen više od četiri puta, odražavajući značajno narušenu antioksidativnu zaštitu organizma. Aktivnost SOD-a bila je skoro petostruko povećana, što sugeriše kompenzatorni odgovor na povećanu koncentraciju ROS. Aktivnost CAT bila je umereno povišena, dok je aktivnost GR bila značajno smanjena, što dodatno potvrđuje postojanje redoks-disbalansa.

Slične nalaze izneli su i Yahaya Muhammad i saradnici [208], koji su pokazali smanjenje plazmatskih koncentracija vitamina A, C i E, kao i aktivnosti antioksidativnih enzima/kofaktora (GSH, GPx, SOD, CAT). Zabeležen je i pad koncentracija esencijalnih mikronutrijenata – selen (Se), cinka (Zn), magnezijuma (Mg) i bakra (Cu) – koji su važni kofaktori za optimalno funkcionisanje antioksidativnih sistema. Uz to, uočeno je i povećanje nivoa 8-izoprostaglandina F_{2α}, specifičnog biomarkera lipidne peroksidacije, što dodatno potvrđuje prisustvo oksidativnog oštećenja kod pacijenata sa COVID-19.

Studija koju su sprovedi Joël Pincemail i saradnici fokusirala se na ispitivanje markera oksidativnog stresa kod pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege. Kod ovih bolesnika zabeležene su značajno smanjenje koncentracija vitamina C, proteinskih tiola, redukovano glutationa, γ-tokoferola, β-karotena i PAOT^{®1} skora u poređenju sa referentnim vrednostima [209]. Selen je bio na granici donje referentne vrednosti. Nasuprot tome, odnos bakra i cinka (Cu/Zn), markera oksidativnog stresa, bio je povišen kod 55% pacijenata. Uz to, koncentracija Cu je bila značajno pozitivno korelisana sa nivoom lipidnih peroksida ($r = 0,95$; $p < 0,001$), što ukazuje na direktnu povezanost između ovog mikroelementa i oksidativnog oštećenja (makro)molekula.

Takođe, sve veći broj istraživanja bavi se povezanošću između oksidativnog stresa i težine kliničke slike COVID-19. Rezultati jedne takve studije pokazali su da su koncentracije ukupnog tiola i disulfida bile značajno snižene kod pacijenata sa teškom ili kritičnom formom bolesti, u poređenju sa onima sa blagom kliničkom slikom ($p < 0,05$). Ovi nalazi ukazuju na izraženiji oksidativni stres kod težih oblika bolesti, što je u skladu sa povišenim nivoima inflamatornih markera i citokina [210].

2.2.4. Oksidativni stres i imunski odgovor

Imunski odgovor na vakcine i infekcije predstavlja koordinisanu aktivaciju različitih komponenata urođenog i stečenog imuniteta, uključujući antigen-prezentujuće ćelije, T limfocite i B limfocite. Tokom ovog procesa dolazi i do aktivacije redoks sistema, pri čemu reaktivne vrste kiseonika imaju dvostruku ulogu – s jedne strane, kao signalni molekuli koji utiču na aktivaciju i proliferaciju T i B limfocita, a s druge strane, kao potencijalni uzročnici oksidativnog oštećenja makromolekula kada se proizvode u višku. Efekti ROS na T i B limfocite prikazani su u Tabeli 2.

¹ PAOT[®] (engl. Pouvoir AntiQxydant Total) predstavlja metodu za merenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u biološkim i prehrambenim uzorcima, razvijenu od strane Institut Européen des Antioxydants (IEA), Francuska.

Tabela 2. Efekti reaktivnih kiseoničnih vrsta na T i B limfocite [211]

	T limfociti	B limfociti
Reaktivne kiseonične vrste	• Podstiču diferencijaciju Th ćelija ka Th2 fenotipu • U hroničnim uslovima izazivaju hiperreaktivnost, iscrpljenost i anergiju T ćelija • Narušavaju T-ćelijsku homeostazu	
Glutation	• Inhibira diferencijaciju Th-17 ćelija • Povećava broj Treg ćelija	Povećava nastajanje IgM antitela
Tireodoksin	• Povećava broj Treg ćelija • Suzbija aktivaciju T ćelija	Povećava nastajanje IgM antitela
Mitohondrijalne reaktivne kiseonične vrste		• Inhibiraju aktivaciju i diferencijaciju B ćelija u plazma ćelije • Smanjuju ekspresiju CD19 i nastajanje antitela • Povećavaju potrošnju IgM antitela

Visoke koncentracije H_2O_2 neophodne su za pokretanje i održavanje BCR (engl. *B-cell receptor*) signalizacije. U početku, H_2O_2 nastaje pod dejstvom NADPH oksidaze 2 (NOX-2), dok u kasnijim fazama glavni izvor H_2O_2 predstavlja mtROS [212,213]. Redoks status ćelije i mtROS igraju značajnu ulogu u aktivaciji, proliferaciji i diferencijaciji B ćelija [214]. Preterana proizvodnja mtROS može imati suprotan efekat, inhibirajući aktivaciju B ćelija, diferencijaciju u plazma ćelije i smanjenje proizvodnje antitela [211].

Slično tome, prekomerno nastajanje ROS može imati negativan uticaj na ključne funkcije T limfocita, uključujući njihovu aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju. Visok nivo ROS može dovesti i do narušene polarizacije mitohondrijske membrane, što može uticati na funkcionalnost T ćelija nakon aktivacije T-ćelijskog receptora (TCR) [211]. Pored toga, povišene koncentracije ROS mogu poremetiti homeostazu T limfocita, budući da su efektorske T ćelije osetljivije na ROS-indukovanu ćelijsku smrt u poređenju sa Treg ćelijama [215,216].

Nakon aktivacije TCR-a, dolazi do povećane sinteze GSH, koji deluje kao ključni redoks regulator. Povišeni nivoi GSH suprimiraju diferencijaciju Th17 ćelija, dok istovremeno favorizuju razvoj Treg, čime doprinose očuvanju imunološke tolerancije i kontrole inflamatornog odgovora [211].

Paralelno Trx, posebno u formi Trx1, ima važnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji T ćelija. Pored toga, povišena ekspresija Trx1 je neophodna za efikasnu aktivaciju B limfocita putem Th ćelija [217], čime se naglašava značaj redoks sistema i u humoralnom imunskom odgovoru.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opšti cilj ove doktorske disertacije je istraživanje seroloških markera imunskog odgovora i parametara redoks statusa nakon primene buster (treće) doze različitih vakcina protiv COVID-19. Istraživanje je bilo usmereno na razumevanje međusobne povezanosti vakcinacije, prethodne infekcije SARS-CoV-2 i antioksidativnog odgovora organizma, sa posebnim fokusom na efekat homolognih i heterogenih buster doza COVID-19 vakcina.

Konkretno, za ostvarenje cilja, disertacija je imala za zadatke da:

1. Uporedi redoks parametre u serumu (ukupni proteini, tioli, nitriti, albumini, DPPH i FRAP antioksidativni test), pre i mesec dana nakon primene buster doze, u cilju procene antioksidativnog odgovora organizma nakon imunizacije;
2. Analizira razlike u titru antivirusnih antitela i redoks statusu među ispitanicima koji su primili različite vakcine (Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19, Pfizer-BioNTech, Sputnik V, heterogene kombinacije vakcina);
3. Proceni uticaj prethodne COVID-19 infekcije (COVID-pozitivni vs. COVID-negativni ljudi) i prisustva komorbiditeta (npr. kardiovaskularne bolesti, dijabetes, oboljenja štitaste žlezde) na postvakcinalni humoralni i redoks odgovor;
4. Analizira razlike u imunskom i redoks odgovoru u zavisnosti od tipa buster vakcinacije (homologne ili heterologne) nakon primene treće doze COVID-19 vakcine;
5. Ispita dugoročni efekat homologne vakcinacije Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, šest meseci nakon treće doze, na redoks homeostazu, humoralni imunski odgovor (nivo IgG) i ćelijski odgovor (nivo IFN- γ).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Dizajn studije

Klinička, longitudinalna kohortna studija sprovedena je u Odeljenju za laboratorijsku dijagnostiku Zavoda za biocide i medicinsku ekologiju u Beogradu, u saradnji sa Odeljenjem za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, kao i Katedrom za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

4.2. Selekcija ispitanika

Studija je sprovedena u periodu od avgusta 2021. do juna 2022. godine. U istraživanju je učestvovalo ukupno **513 ispitanika** (203 muškarca i 307 žena), koji su primili tri doze vakcine protiv SARS-CoV-2, u skladu sa Stručno-metodološkim uputstvom za sprovođenje preporučene imunizacije u Republici Srbiji [75].

Kriterijumi za uključivanje u studiju bili su:

- starost iznad 18 godina;
- prethodno primljene dve doze vakcine protiv SARS-CoV-2;
- primljena buster (treća) doza vakcine protiv SARS-CoV-2;
- potpisan informisani pristanak za učešće u studiji.

U studiju **nisu bili uključeni** ispitanici mlađi od 18 godina, kao ni osobe koje nisu bile vakcinisane protiv SARS-CoV-2. Prethodna infekcija virusom SARS-CoV-2 **nije predstavljala osnov za isključenje** iz studije.

Svi ispitanici su prilikom uključivanja popunili standardizovani upitnik (Prilog I) koji je sadržao podatke o imunizaciji (datum i vrsta primljenih doza vakcine), istoriji preležane COVID-19 infekcije (uključujući datum poslednjeg pozitivnog nalaza dobijenog metodom lančane reakcije polimeraze – PCR, ukoliko je bio poznat), kao i podatke o prisustvu hroničnih bolesti i drugih komorbiditeta (npr. kardiovaskularna oboljenja, dijabetes melitus, bolesti štitaste žlezde i drugo).

Na osnovu dobijenih podataka, ispitanici su podeljeni prema:

- prethodnom infektivnom statusu (COVID-19 pozitivni/negativni);
- vrsti primenjene vakcine (iRNK, vektorska, inaktivisana);
- tipu buster vakcinacije – **homologna** (ista vrsta vakcine u sve tri doze) ili **heterologna** (različite vakcine u primarnoj vakcinaciji i buster dozi)
- i prisustvu komorbiditeta.

Ova podela omogućila je dodatnu analizu uticaja navedenih faktora na imunski i redoks odgovor organizma.

4.3. Pravni i etički aspekti

Studija je sprovedena u skladu sa odobrenjem Etičkog odbora Zavoda za biocide i medicinsku ekologiju (delovodni broj 05-01 193/2 od 18. februara 2025. godine). Sva etička načela primenjena su u skladu sa Helsinškom deklaracijom iz 2013. godine.

Pre prikupljanja biološkog materijala, svi ispitanici su dali pisani informisani pristanak za učešće u studiji. Takođe, oni su bili detaljno obavešteni o ciljevima istraživanja, načinu sprovođenja, kao i mogućim ishodima i značaju studije.

4.4. Biološki materijal

4.4.1. Krv

Uzorkovanje krvi obavljeno je u prostorijama Odeljenja za laboratorijsku dijagnostiku Zavoda za biocide i medicinsku ekologiju, u skladu sa važećim nacionalnim i međunarodnim vodičima za prikupljanje uzoraka [218]. Venepukcija je izvršena iz vene sa unutrašnje strane lakta, korišćenjem vakuumskog sistema, pri čemu je uzimano 4–6 mL venske krvi u epruvetu bez dodatka antikoagulansa (VACUETTE®, GreinerBio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija).

Nakon venepukcije, uzorci su ostavljeni da spontano koagulišu na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 do 30 minuta, a zatim su centrifugirani pri 3000 obrtaja u minuti, u trajanju od 10 minuta, radi odvajanja seruma od krvnih ćelija i koaguluma (Gyrozen 416 centrifuga, Južna Koreja). Dobijeni serum su alikvotirani i čuvani na -20°C do trenutka analiza.

Uzorci krvi prikupljeni su u različitim vremenskim tačkama, u zavisnosti od cilja analize:

- Za **procenu imunskog odgovora** nakon homologne ili heterologne vakcinacije, uzorkovanje je vršeno **pre treće doze** vakcine, a zatim **1, 3 i 6 meseci nakon buster doze**;
- Za **određivanje serumskih parametara redoks sistema**, uzorci su prikupljeni **pre i mesec dana nakon treće doze** vakcine;
- **Kod ispitanika koji su primili tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine**, uzorkovanje za analizu redoks parametara, kao i humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora, obavljeno je **šest meseci nakon treće doze**.

4.5. Metode

4.5.1. Određivanje markera humoralnog imunskog odgovora

Humoralni imunski odgovor ispitanika procenjen je primenom komercijalno dostupnih testova zasnovanih na ELISA metodi (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Analize su obuhvatale određivanje ukupnih neutrališućih antitela, kao i specifičnih IgG i IgM antitela usmerenih na različite strukturne proteine SARS-CoV-2 virusa.

U nastavku su detaljno opisani svi korišćeni testovi, uključujući njihove ciljne antigene, princip rada i način interpretacije dobijenih rezultata. Analize su sprovedene na automatskim ELISA platformama koje koristi Odeljenje za laboratorijsku dijagnostiku Zavoda za biocide i medicinsku ekologiju, i to na uređajima EuroImmun I Analyzer (EUROIMMUN AG, Lübeck, Nemačka) i DYNEX DS2® (Dynex Technologies, SAD).

4.5.1.1. Određivanje ukupnih neutrališućih antitela

Ukupna neutrališuća antitela kvantitativno su određivana primenom komercijalno dostupnog testa *Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Detection Kit (ELISA)*, proizvođača Shanghai GeneDx Biotech Co., Ltd. Test se zasniva na principu kompetitivne ELISA metode, kojom se *in vitro* oponaša interakcija između RBD jedinice S proteina virusa i humanog ACE2 receptora.

U prvoj fazi, 20 µL seruma je inkubirano sa 100 µL komercijalnog RBD rastvora, kako bi neutrališuća antitela iz uzorka formirala komplekse sa RBD. Zatim je 100 µL dobijene smeše preneto u bunariće mikrotitracione ploče obložene ACE2 proteinom i sve inkubirano 60 minuta na 37°C. Tokom inkubacije, nevezani RBD, kao i RBD vezan za neneutrališuća antitela, vezuju se za ACE2 na ploči, dok kompleksi RBD–neutrališuće antitelo ostaju u supernatantu i uklanjaju se tokom faze ispiranja.

Nakon ispiranja uzoraka, dodato je 100 µL antitela konjugovanog sa enzimom, a reakcija se razvija dodatkom 100 µL TMB supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin). Intenzitet razvijene

boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji neutrališućih antitela u uzorku. Apsorbancija uzoraka i standarda izmerena je na talasnoj dužini od 450 nm, korišćenjem automatskog ELISA sistema DYNEX DS2® (Dynex Technologies, SAD).

Za kvantitativnu interpretaciju rezultata korišćena je standardna kriva formirana sa šest kalibracionih rastvora koncentracija: 0 IU/mL², 6,25 IU/mL, 12,5 IU/mL, 25 IU/mL, 50 IU/mL i 100 IU/mL. Za interpretaciju rezultata korišćene su vrednosti prikazane u Tabeli 3.

Tabela 3. Interpretacija rezultata za određivanje ukupnih neutrališućih antitela

Vrednost	Rezultat
<6.5 IU/mL	Negativan
≥6.5 IU/mL	Pozitivan

4.5.1.2. Određivanje specifičnih IgG antitela

4.5.1.2.1. Određivanje IgG antitela na S1 subjedinicu (uključujući RBD domen)

Za detaljniju karakterizaciju humoralnog imunskog odgovora, određena su specifična IgG antitela na S1 subjedinicu S proteina, uključujući RBD domen, primenom komercijalno dostupnog testa *Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG)*, proizvođača EUROIMMUN AG, Lübeck, Nemačka.

Test se zasniva na principu indirektne ELISA metode i koristi mikrotitracione stripove obložene rekombinantnim S1 domenom S proteina SARS-CoV-2 virusa. U prvoj fazi, u svaki bunarić se dodaje 100 µL razblaženog seruma (odnos 1:101, uzorak:pufer za razblaživanje), a zatim se ploča inkubira 60 minuta na 37°C. Tokom inkubacije, prisutna specifična IgG antitela vezuju se za imobilisani antigen.

Nakon ispiranja, dodaje se 100 µL sekundarnog antitela, odnosno peroksidazom obeleženog anti-humanog IgG antitela, potom i 100 µL supstrata, koji u prisustvu aktivnog enzima razvija plavu boju. Reakcija se zaustavlja dodatkom 100 µL reagensa za zaustavljanje reakcije, pri čemu boja prelazi iz plave u žutu. Intenzitet razvijene boje meri se spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od 450 nm, uz referentnu talasnu dužinu između 620 nm i 650 nm. Dobijene vrednosti su direktno proporcionalne koncentraciji specifičnih IgG antitela u uzorku. Ovo testiranje je izvedeno korišćenjem EuroImmun I Analyzer sistema (EUROIMMUN AG, Lübeck, Nemačka).

Za kvantitativnu interpretaciju iskorišćena je standardna kriva, formirana sa šest kalibracionih rastvora koncentracija: 120 RU/mL³, 80 RU/mL, 40 RU/mL, 20 RU/mL, 10 RU/mL i 1 RU/mL. Vrednosti za interpretaciju rezultata prikazane su u Tabeli 4.

Tabela 4. Interpretacija rezultata za određivanje specifičnih IgG antitela na S1 protein

Vrednost	Rezultat
<8 RU/mL	Negativan
≥8 do <11 RU/mL	Graničan
≥11 RU/mL	Pozitivan

4.5.1.2.2. Određivanje IgG antitela na N protein

Pored antitela usmerenih na S protein, analizirana su i IgG antitela na N protein, primenom komercijalno dostupnog testa *EIA COVID-19 NP IgG*, proizvođača TestLine Clinical

² IU/mL – međunarodne jedinice po mililitru (engl. International Units per milliliter)

³ RU/mL – relativne jedinice po mililitru (engl. Relative Units per milliliter)

Diagnostics s.r.o. Brno, Republika Češka.

Test se zasniva na principu sendvič ELISA metode i koristi mikrotitracione stripove obložene nukleokapsidnim rekombinantnim antigenom. U prvoj fazi, u bunarić se dodaje 100 µL razblaženog seruma (odnos 1:101, uzorak:pufer za razblaživanje), a zatim se ploča inkubira 30 minuta na 37°C. Tokom inkubacije, prisutna specifična IgG antitela vezuju se za imobilisani antigen.

Nakon ispiranja, dodaje se 100 µL sekundarnog antitela, odnosno, peroksidazom obeleženog anti-humanog IgG antitela (enzim-konjugat), potom i 100 µL supstrata, koji u prisustvu aktivnog enzima razvija plavu boju. Reakcija se zaustavlja dodatkom 100 µL reagensa za zaustavljanje reakcije, pri čemu boja prelazi iz plave u žutu. Intenzitet razvijene boje meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm, a vrednosti su proporcionalne koncentraciji specifičnih IgG antitela u uzorku. Testiranje je izvedeno korišćenjem automatskog ELISA sistema DYNEX DS2® (Dynex Technologies, SAD).

Za kvantitativnu interpretaciju iskorišćena je standardna kriva formirana sa četiri kalibraciona rastvora koncentracija: 5 U/mL⁴, 20 U/mL, 80 U/mL i 320 U/mL. Vrednosti za interpretaciju rezultata prikazane su u Tabeli 5.

Tabela 5. Interpretacija rezultata za određivanje specifičnih IgG antitela na N protein

Vrednost	Rezultat
<18 U/mL	Negativan
≥18 do <22 U/mL	Graničan
≥22 U/mL	Pozitivan

4.5.1.3. Određivanje specifičnih IgM antitela

4.5.1.3.1. Određivanje IgM antitela na S protein (RBD domen)

Za procenu ranog imunskog odgovora i moguće nedavne izloženosti virusu, analizirana su IgM antitela specifična za RBD domen S proteina SARS-CoV-2 virusa. Specifična IgM antitela na S protein SARS-CoV-2 virusa, uključujući i RBD domen, određena su primenom komercijalno dostupnog testa *EIA COVID-19 RBD IgM*, proizvođača TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. Brno, Republika Češka.

Test se zasniva na principu sendvič ELISA metode i koristi mikrotitracione stripove obložene antigenom – RBD domenom S1 subjedinice. U prvoj fazi, u bunarić se dodaje 100 µL razblaženog seruma (odnos 1:101, uzorak:pufer za razblaživanje), a zatim se ploča inkubira 30 minuta na 37°C. Tokom inkubacije, prisutna specifična IgM antitela vezuju se za imobilisani antigen.

Nakon ispiranja, dodaje se 100 µL sekundarnog antitela (peroksidazom obeleženo anti-humano IgM antitelemo), potom i 100 µL supstrata, koji u prisustvu aktivnog enzima razvija plavu boju. Reakcija se zaustavlja dodatkom 100 µL reagensa za zaustavljanje reakcije, pri čemu boja prelazi iz plave u žutu. Intenzitet razvijene boje meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm, a vrednosti su proporcionalne koncentraciji specifičnih IgM antitela u uzorku. Testiranje je urađeno na automatskom ELISA sistemu DYNEX DS2® (Dynex Technologies, SAD).

Za kvantitativnu interpretaciju iskorišćena je standardna kriva formirana sa četiri kalibraciona rastvora koncentracija: 5 U/mL, 20 U/mL, 80 U/mL i 320 U/mL. Vrednosti za interpretaciju rezultata prikazane su u Tabeli 6.

⁴ U/mL – jedinice po mililitru (engl. Units per milliliter)

Tabela 6. Interpretacija rezultata za određivanje specifičnih IgM antitela na S protein

Vrednost	Rezultat
<18 U/mL	Negativan
≥18 do <22 U/mL	Graničan
≥22 U/mL	Pozitivan

4.5.1.3.2. Određivanje IgM antitela na N protein

Paralelno sa određivanjem specifičnih IgM antitela na S protein, određena su i IgM antitela na N protein SARS-CoV-2, koji je prisutan tokom prirodne infekcije, ali ne i u sastavu većine vakcina. Stoga je ova analiza korišćena kao dodatni marker za diferencijaciju infekcije u odnosu na post-vakcinalni imunski odgovor. Specifična IgM antitela na N protein SARS-CoV-2 određena su primenom komercijalno dostupnog testa Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgM), proizvođača EUROIMMUN AG, Lübeck, Nemačka.

Test se zasniva na principu indirektne ELISA metode i koristi mikrotitracione stripove obloženih nukleokapsidnim proteinom SARS-CoV-2 virusa. U prvoj fazi, u svaki bunarić se dodaje 100 µL razblaženog seruma (odnos 1:101, uzorak:pufer za razblaživanje), a zatim se ploča inkubira 60 minuta na 37°C. Tokom inkubacije, prisutna specifična IgM antitela vezuju se za imobilisani antigen.

Nakon ispiranja, dodaje se 100 µL sekundarnog antitela (peroksidazom obeležena anti-humana IgM antitelesa), potom i 100 µL supstrata, koji u prisustvu aktivnog enzima razvija plavu boju. Reakcija se zaustavlja dodatkom 100 µL stop reagensa (0,5 M sumporna kiselina), pri čemu boja prelazi iz plave u žutu. Intenzitet razvijene boje meri se spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od 450 nm, uz referentnu talasnu dužinu između 620 nm i 650 nm. Za testiranje je iskorišćen EuroImmun I Analyzer sistem (EUROIMMUN AG, Lübeck, Nemačka).

Test omogućava semi-kvantitativnu evaluaciju rezultata, na osnovu izračunatog odnosa između optičke gustine uzorka i cut-off kalibratora. Vrednosti za interpretaciju rezultata prikazane su u Tabeli 7.

Tabela 7. Semikvantitativno određivanje IgM antitela na N protein

Vrednost	Rezultat
Odnos <0.8	Negativan
Odnos ≥0.8 do <1.1	Graničan
Odnos ≥1.1	Pozitivan

4.5.2. Određivanje markera ćelijskog imunskog odgovora

4.5.2.1. Određivanje koncentracije IFN γ

Procena SARS-CoV-2 specifičnog ćelijskog imunskog odgovora sprovedena je primenom *EUROIMMUN Quan-T-Cell SARS-CoV-2 sistema* (EUROIMMUN AG, Lübeck, Nemačka), koji se zasniva na principu IGRA testa (engl. Interferon γ Release Assay). Ovaj test omogućava kvantitativno merenje oslobađanja IFN- γ iz aktiviranih T-limfocita, nakon njihove stimulacije virusnim antigenima *in vitro*, a merenje je izvršeno korišćenjem EuroImmun I Analyzer sistema (EUROIMMUN AG, Lübeck, Nemačka).

Po 500 µL pune venske krvi sa heparinom dodato je u svaku od tri epruvete: negativnu kontrolu (bez stimulansa), stimulus epruvetu (sa peptidima S1 domena S proteina SARS-CoV-2) i pozitivnu kontrolu (sa mitogenom). Potom je krv inkubirana 20–24 sata u termostatskom inkubatoru DHP-9052 (Zhengzhou Nanbei Instrument Equipment Co., Ltd., Zhengzhou, Kina),

pri temperaturi od 37°C, tokom čega dolazi do specifične aktivacije T-limfocita (uglavnom CD4⁺ T ćelija) i sekrecije IFN-γ u supernatant. Nakon inkubacije, epruvete su centrifugirane 10 minuta na 12 000 x g korišćenjem Hettich Mikro 200 centrifuge (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Nemačka). Dobijeni supernatant (plazma bogata IFN-γ) iskorišćen je za kvantitativnu analizu.

Količina IFN-γ određena je primenom Quan-T-Cell ELISA testa, koji se zasniva na principu sendvič ELISA metode. Nakon centrifugiranja, supernatant dobijen iz stimuliranih uzoraka pune krvi razblažuje se u odnosu 1:5 (uzorak:pufer za uzorke), a zatim se 100 μL razblaženog uzorka, zajedno sa kalibratorima i kontrolama, nanosi u bunariće mikrotitracione ploče obložene specifičnim antitelima za IFN-γ. Nakon inkubacije od 120 minuta na sobnoj temperaturi, izvršeno je ispiranje puferom za ispiranje, a potom je dodato biotinom obeleženo anti-interferon gama antitelo i streptavidin-HRP⁵ konjugat. Reakcija se razvija dodatkom TMB supstrata, pri čemu nastaje obojeni produkt, čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm, uz referentnu talasnu dužinu između 620 nm i 650 nm.

Dobijeni rezultati izraženi su u mIU/mL i interpretirani prema preporukama proizvođača kao:

- Pozitivan odgovor: IFN-γ ≥ 200 mIU/mL;
- Granični: IFN-γ 100 - 200 mIU/mL;
- Negativan odgovor: IFN-γ < 100 mIU/mL.

4.5.3. Određivanje parametara redoks statusa

4.5.3.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Kvantitativno određivanje ukupnih proteina u serumu sprovedeno je na biohemijskom analizatoru BA200 (BioSystems S.A., Španija), primenom biuretske metode. Ova kolorimetrijska metoda zasniva se na vezivanju jona bakra (Cu²⁺) u baznoj sredini sa peptidnim vezama u proteinu, pri čemu nastaje ljubičasti kompleks čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji ukupnih proteina. Kompleks ima apsorpcioni maksimum na 545 nm, a intenzitet boje je direktno proporcionalan koncentraciji ukupnih proteina. Merenje apsorbancije radi se spektrofotometrijski, a koncentracije ukupnih proteina u analiziranim uzorcima se određuju na osnovu kalibracione krive.

Referentne vrednosti za ukupne proteine u serumu odraslih osoba iznose (približno) 60–80 g/L, u skladu sa preporukama proizvođača reagensa i važećim biohemijskim standardima.

4.5.3.2. Određivanje koncentracije albumina

Kvantitativno određivanje albumina u serumu sprovedeno je na automatskom biohemijskom analizatoru BA200 (BioSystems S.A., Španija), primenom kolorimetrijske metode sa bromkrezol-zelenim. Ova metoda se zasniva na specifičnom vezivanju albumina i bromkrezol-zelenog u kiselj sredini (pH 4,2), pri čemu nastaje obojeni kompleks plavo-zelene boje. Intenzitet razvijene boje proporcionalan je koncentraciji albumina u uzorku i meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 630 nm, dok se koncentracija albumina u analiziranim uzorcima određuje na osnovu kalibracione krive.

Referentne vrednosti albumina u serumu za odrasle osobe iznose 35–52 g/L, dok je kod osoba starijih od 60 godina prihvaćen referentni opseg 32–46 g/L, u skladu sa preporukama proizvođača reagensa.

⁵ HRP – hrenova peroksidaza (engl. Horseradish peroxidase)

4.5.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih tiola

Određivanje ukupnih (proteinskih i neproteinskih) tiolnih grupa u serumu ispitanika sprovedeno je primenom spektrofotometrijske Ellmanove metode, korišćenjem DTNB reagensa (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)) [219]. Ova metoda se zasniva na reakciji slobodnih sulfhidrilnih grupa sa DTNB, pri čemu nastaje žuti proizvod, 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB), čija se apsorbanција meri na talasnoj dužini od 412 nm.

Ukratko, u mikrotube, zapremine 2 mL, pomešano je 50 μ L seruma, 50 μ L 1 M Tris pufera (pH 8,0), 350 μ L destilovane vode i 50 μ L DTNB reagensa. Nakon inkubacije 30 minuta na sobnoj temperaturi, 300 μ L smeše preneto je u mikrotitarske ploče (Thermo Scientific™ Nunc MicroWell 96-Well Microplates), a apsorbanција uzoraka je izmerena na 412 nm na Multiskan SkyHigh Microplate spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Finland).

Svi uzorci su analizirani u duplikatu, dok je slepa proba reagensa pripremana i izmerena u triplicatu, radi osiguravanja preciznosti i pouzdanosti rezultata. Slepa proba reagensa sadržala je 50 μ L 1 M Tris pufera, 400 μ L dH₂O i 50 μ L DTNB. Za korekciju apsorbancije svakog seruma (korektivna proba) iskorišćeno je 50 μ L seruma, 50 μ L Tris pufera i 400 μ L dH₂O. Od apsorbancije svakog uzorka oduzete su vrednosti slepe probe i korektivne probe.

Konačne vrednosti A₄₁₂ su iskorišćene za izračunavanje sadržaja ukupnih tiola u serumu (izraženo u mM), prema standardnoj krivi dobijenoj sa rastvorima cisteina (0,001–1 mM).

4.5.3.4. Određivanje sadržaja nitrita

Određivanje koncentracije nitrita u serumu, kao posrednog pokazatelja prisustva azot-monoksida (•NO), sprovedeno je spektrofotometrijskom Griess-ovom metodom [220]. Ova metoda se zasniva na formiranju obojenog azo-jedinjenja u reakciji između sulfanilne kiseline i naftiletilendiamina u kiseloj sredini, u prisustvu nitrita. Reakcioni proizvod ima maksimum apsorbancije na talasnoj dužini od 548 nm.

Griess-ov reagens je pripremljen mešanjem jednakih zapremina 0,1% rastvora naftiletilendiamin-dihidrohlorida i 1% rastvora sulfanilne kiseline u 5% H₃PO₄. Reagens je bezbojan, ili blago ružičast, i stabilan nekoliko nedelja kada se čuva na suvom i hladnom mestu (4 °C). Za pripremu standardne krive, napravljen je 0,1 M osnovni rastvor natrijum-nitrita u MilliQ vodi, koji je dalje serijski razblažen do koncentracija od 2, 5, 10, 25, 50, 100 i 200 μ M.

Postupak analize podrazumeva mešanje 60 μ L seruma, ili standardnog rastvora nitrita, 20 μ L Griess-ovog reagensa i 520 μ L MilliQ vode u mikrotubi. Nakon vortexiranja i centrifugiranja na 3000 $\times$ g, tokom 5 minuta (Centrifuge 5420, Eppendorf, Nemačka), smeša je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Slepa proba sadržala je 20 μ L Griess-ovog reagensa i 580 μ L MilliQ vode.

Nakon inkubacije, po 250 μ L svakog uzorka preneto je u bunariće mikrotitarske ploče, a apsorbanција je izmerena na talasnoj dužini od 548 nm pomoću Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Finland). Svi uzorci su analizirani u duplikatu, dok su standardni rastvori pripremani i izmereni u triplicatu, radi osiguravanja preciznosti i pouzdanosti dobijenih rezultata.

Vrednosti apsorbancije analiziranih uzoraka su iskorigovane za slepu probu, a koncentracije nitrita u uzorcima izračunate su pomoću jednačine standardne krive konstruisane na osnovu serije poznatih koncentracija natrijum-nitrita.

4.5.3.5. Testovi ukupne antioksidativne aktivnosti

Nivo ukupne (direktne) antioksidativne aktivnosti u serumu ispitanika procenjen je primenom dva jednostavna spektrofotometrijska testa: DPPH testa, koji se zasniva na neutralizaciji slobodnih (veštačkih) radikala, i FRAP eseja, kojim se meri redukujuća moć antioksidansa u uzorku [221].

Priprema uzoraka:

U 350 μL seruma dodato je 350 μL metanola, uz mešanje na Vortex-u i inkubaciju 5 minuta na sobnoj temperaturi. Smeša je zatim izcentrifugirana 10 minuta na $21.000 \times g$ (Eppendorf 5420 centrifuguga, Eppendorf, Nemačka). Dobijeni supernatant (deproteinizovani serum) pažljivo je prenet u čistu mikrotubu i korišćen za sprovođenje DPPH testa i FRAP eseja.

4.5.3.5.1. DPPH test

Za procenu nivoa direktne antioksidativne aktivnosti u serumu, iskorišćen je spektrofotometrijski DPPH test koji se zasniva na sposobnosti antioksidanasa da neutrališu stabilne slobodne radikale. Konkretno, korišćen je 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil ($\text{DPPH}^\bullet$), azot-centrični slobodni radikal ljubičaste boje, koji u kontaktu sa redukujućim supstancama prelazi u svoju žutu formu (DPPH-H), što se prati/merti promenom apsorbanije na 515 nm.

Priprema reagensa:

Osnovni rastvor DPPH pripremljen je rastvaranjem 15,7 mg DPPH u 100 mL 96% metanola (koncentracija 0,4 mM). Radni rastvor pripremljen je razblaživanjem 20 mL osnovnog rastvora sa 100 mL metanola, tako da apsorbanca radnog rastvora na 515 nm iznosi približno 0,9.

Postupak analize:

Za svaku analizu (urađena u duplikatu) pomešano je 200 μL radnog rastvora DPPH sa 40 μL deproteinizovanog seruma. Korektivni uzorci (u monoplakatu) sadržali su 40 μL istog seruma i 200 μL čistog metanola. Kontrola (u triplikatu) sadržala je 200 μL DPPH rastvora i 40 μL metanola. Nakon homogenizacije (Vortex, 10 sekundi), svi uzorci su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Ukoliko su nakon inkubacije uzorci bili zamućeni, kratko su izcentrifugirani (30 s, 15,000 obrtaja/minut; Eppendorf 5420 centrifuga, Eppendorf, Nemačka). Zatim je po 180–200 μL svakog uzorka preneto u bunariće mikrotitarske ploče, a apsorbancija je izmerena na 515 nm, na Multiskan SkyHigh Microplate spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Finland).

Kapacitet neutralizacije DPPH radikala izražen je kao procenat inhibicije radikala (% RSC, engl. Radical Scavenging Capacity), prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ RSC} = 100 - \frac{(A_{\text{radne probe}} - A_{\text{korekcije}})}{A_{\text{kontrola}}} \times 100$$

Svi uzorci analizirani su u duplikatu, dok su kontrole pripremane u triplikatu, a korekcije u monoplakatu, radi povećanja tačnosti i pouzdanosti rezultata.

4.5.3.5.2. FRAP test

Za procenu redukujuće moći antioksidativnih komponenti seruma primenjen je FRAP test (engl. Ferric ion reducing antioxidant power), spektrofotometrijska metoda koja se zasniva na redukciji trovalentnog gvožđa (Fe^{3+}) u divalentni oblik (Fe^{2+}), pri niskom pH. Ovaj proces vodi ka formiranju intenzivno plavo obojenog kompleksa Fe^{2+} -TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin), čija se apsorbancija meri na talasnoj dužini od 593 nm.

Reagensi i njihova priprema:

1. **FRAP radni reagens:** smeša acetatnog pufera, TPTZ rastvora i FeCl_3 (odnos 10:1:1, v/v/v);
2. **Acetatni pufer** (pH 3,6): rastvoriti 0,31 g CH_3COONa i 1,6 mL koncentrovane sirćetne kiseline u 100 mL destilovane vode;
3. **$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$** (20 mM): rastvoriti 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u 10 mL destilovane vode;
4. **TPTZ** (10 mM): rastvoriti 0,0312 g TPTZ u 10 mL 40 mM HCl;
5. **40 mM HCl:** dodati 86 μL koncentrovane HCl u 25 mL destilovane vode;
6. **Standard** (100 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 0,2879 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u 100 mL destilovane vode.

Postupak:

U bunarić mikrotitracione ploče dodato je:

- Radna proba (deproteinizovani serum, u duplikatu): 270 μL FRAP reagensa + 30 μL uzorka;
- Slepa proba (u triplikatu): 270 μL FRAP reagensa + 30 μL metanola;
- Standard (u triplikatu): 270 μL FRAP reagensa + 30 μL rastvora FeSO_4 (100 μM).

Nakon inkubacije uzoraka od 15 minuta na sobnoj temperaturi, izmerena je njihova apsorbanacija na 593 nm, na Multiskan SkyHigh Microplate spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Finland).

Redukcioni kapacitet izražen je u FRAP jedinicama, gde jedna FRAP jedinica odgovara sposobnosti uzorka da redukuje 100 μM Fe^{3+} , a izračunavanje je urađeno na osnovu formule:

$$n \text{ (FRAP jedinica)} = \frac{A_{\text{radne probe}}}{A_{\text{standarda}}} \times 100,$$

gde je:

$A_{\text{standarda}}$ (100 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),

R - faktor razblaženja.

4.5.4. Statistička analiza dobijenih podataka

Statistička obrada podataka sprovedena je korišćenjem softverskog paketa GraphPad Prism (verzija 8.0.2; GraphPad Software, San Diego, SAD) i Microsoft Excel-a, u skladu sa protokolima opisanim od strane Hinkle i saradnika [222]. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ standardna greška aritmetičke sredine (SEM), osim kada je drugačije navedeno.

Pre izbora odgovarajućih statističkih testova, procenjena je distribucija podataka. Za podatke sa normalnom distribucijom korišćeni su parametarski testovi, dok su za podatke sa neravnomernom distribucijom korišćeni neparametarski testovi.

Za poređenje više nezavisnih grupa korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (engl. one-way ANOVA), a *post hoc* poređenja izvršena su Tukey-evim HSD testom. Poređenje dve nezavisne grupe urađeno je Studentovim t-testom (za podatke sa normalnom distribucijom), ili Mann-Whitney U testom (za nenormalnu distribuciju). Za poređenje zavisnih merenja unutar iste grupe iskorišćen je parni t-test (za normalnu distribuciju), ili Wilcoxonov test znakova ranga (za nenormalnu distribuciju).

Korelaciona analiza sprovedena je Pearsonovim koeficijentom korelacije (za normalnu distribuciju) ili Spearmanovim koeficijentom korelacije (za nenormalnu distribuciju). Višestruka regresiona analiza korišćena je za procenu nezavisnog uticaja demografskih karakteristika i prisustva komorbiditeta na ispitivane parametre.

U svim testovima, statistička značajnost prihvatana je za vrednosti $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1.Osnovne karakteristike i metodološka podela uzorka

Doktorska disertacija je obuhvatila 513 ispitanika koji su zadovoljili kriterijume za uključivanje u studiju (Odeljak 4.2.), a koji su prethodno primili dve doze vakcine protiv SARS-CoV-2 i tokom trajanja istraživanja i treću (buster) dozu, u skladu sa nacionalnim preporukama o imunizaciji.

Istraživanje je sprovedeno u dve komplementarne faze:

- U okviru **prve faze**, praćen je humoralni imunski odgovor, određivanjem nivoa anti-S1 IgG antitela u šest vremenskih tačaka: tri i šest meseci nakon druge doze, pre buster doze, kao i jedan, tri i šest meseci nakon buster doze. Analiza je obuhvatila ispitanike koji su svrstani u jednu od četiri vakcinalne grupe: tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, tri doze Pfizer-BioNTech vakcine, tri doze Sputnik V vakcine, ili heterolognu kombinaciju (dvostruka doza Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine i treća doza Pfizer-BioNTech vakcine, odnosno Sinopharm/Pfizer-BioNTech grupa ispitanika). Pored nivoa antitela, u ovoj fazi su ispitani i parametri oksidativnog stresa (ukupni proteini, tioli, nitriti, DPPH, FRAP i albumini), i to u dve vremenske tačke: pre primene buster doze vakcine i mesec dana nakon buster doze.
- U okviru **druge faze**, izvršena je dodatna procena humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora, kao i parametara redoks statusa, šest meseci nakon buster doze kod ispitanika koji su primili sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine. Analizirani su nivoi ukupnih neutrališućih antitela, anti-S1 IgG, anti-N IgG, anti-N IgM i anti-RBD IgM antitela, kao i koncentracija IFN- γ . Paralelno su određeni i redoks parametri (ukupni proteini, tioli, nitriti, DPPH, FRAP i albumini).

Od ukupno 513 ispitanika, 203 (39,6%) su bili muškarci, a 310 (60,4%) žene. Svi učesnici su bili uključeni u najmanje jednu fazu istraživanja. S obzirom da su dve faze imale različitu dinamiku uzorkovanja i specifične kriterijume za izbor ispitanika, u nastavku su prikazane demografske i kliničke karakteristike učesnika posebno za svaku fazu istraživanja, uključujući raspodelu po polu, prethodnoj SARS-CoV-2 infekciji, prisustvu komorbiditeta, kao i pripadnosti određenoj vakcinalnoj grupi.

5.2.Dinamika humoralnog imunskog odgovora i redoks homeostaze nakon buster doze vakcine

5.2.1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika

U ovoj fazi istraživanja, koja je obuhvatila vremensko praćenje nivoa anti-S1 IgG antitela i analizu parametara oksidativnog stresa pre i nakon primene buster doze vakcine, uključeno je ukupno 410 ispitanika. Od toga, 178 (43.4%) su bili muškarci, a 232 (56.6%) žene. Demografski i anamnestički podaci ispitanika prikazani su u Tabeli 8.

Na osnovu primljene vakcine, ispitanici su svrstani u četiri vakcinalne grupe:

- tri doze **Pfizer-BioNTech** COVID-19 vakcine – **88** ispitanika;
- tri doze **Sinopharm** [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine – **156** ispitanika;
- tri doze **Sputnik V** vakcine – **33** ispitanika;
- **Sinopharm/Pfizer-BioNTech** grupa ispitanika (dvostruka Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vaccine i treća doza Pfizer-BioNTech COVID-19 vakcine) – **133** ispitanika.

Tabela 8. Demografski i anamnestički podaci ispitanika uključenih u prvu fazu istraživanja

Ukupan broj	Broj ispitanika	
	410	Prosečna starost ($\pm$ SD)
Sve tri doze Pfizer-BioNTech COVID-19 vakcine	88	49 $\pm$ 2
Sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine	156	54 $\pm$ 1
Sve tri doze Sputnik V Vakcine	33	53 $\pm$ 2
Sinopharm/Pfizer-BioNTech	133	52 $\pm$ 1
Pol ispitanika	Ž	M
	232	178
Prisustvo kardiovaskularnih bolesti kod ispitanika	Da	110
		Hipertenzija (n=91)
		Perikarditis (n=2)
	Ne	300
Neurološki poremećaji kod ispitanika	Da	9
		Bolesti srčanih zalizaka (n=4)
		Druge kardiovaskularne bolesti (n=13)
	Ne	401
Endokrini poremećaji kod ispitanika	Da	38
		Moždani udar (n=3)
		Epilepsija (n=2)
	Ne	372
Bolesti jetre	Da	5
		Bolesti štitaste žlezde (n=14)
		Druge bolesti endokrinog sistema (n=5)
	Ne	405
Bolesti bubrega	Da	3
	Ne	407
Bolesti pluća	Da	13
	Ne	397
Alergijske reakcije	Da	51
	Ne	359
Autoimune bolesti	Da	10
	Ne	400

Ž – žene; M – muškarci; Starost je prikazana kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

Na osnovu anamnestičkih podataka, prethodna infekcija virusom SARS-CoV-2 potvrđena je kod 213 ispitanika (51,9%), dok je 197 ispitanika (48,1%) bilo bez dokaza o ranijem kontaktu sa virusom. Distribucija prethodnih PCR potvrda infekcije prikazana je u Tabeli 9, s posebnim prikazom pozitivnosti na virus pre i nakon buster doze u okviru svake vakcinalne grupe.

U grupi ispitanika koji su primili sve tri doze Pfizer-BioNTech COVID-19 vakcine (n = 88), prethodna infekcija potvrđena je kod 33 ispitanika (37,5%), od kojih je kod 8 ispitanika (24%) PCR-pozitivan rezultat zabeležen pre primene treće odnosno buster doze. U grupi koja je primila tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine (n = 100), 14 ispitanika (14%) imalo je PCR potvrđenu infekciju pre buster doze vakcine (Tabela 9).

Ispitanici sa potvrđenom SARS-CoV-2 infekcijom nakon treće doze vakcine dodatno su klasifikovani na osnovu vremena koje je proteklo od vakcinacije do poslednjeg pozitivnog PCR nalaza. Formirane su, tako, četiri grupe: (1) oni koji su imali PCR-pozitivan rezultat u roku od mesec dana nakon treće doze; (2) oni kod kojih je infekcija potvrđena između prvog i trećeg

meseca nakon treće doze; (3) oni sa PCR-pozitivnim rezultatom između trećeg i šestog meseca nakon treće doze; (4) oni kod kojih je PCR-pozitivan nalaz zabeležen više od šest meseci nakon primene treće doze vakcine.

Tabela 9. Anamnestički podaci o prethodnoj infekciji virusom SARS-CoV-2

	Broj ispitanika							
	Ukupno	SARS-CoV-2 infekcija		PCR pozitivan rezultat			% ispitanika sa PCR pozitivnim rezultatom	
		Da	Ne	pre treće doze	posle treće doze	pre i posle treće doze	pre treće doze	posle treće doze
Sve tri doze Pfizer-BioNTech COVID-19 vakcine	88	33	55	8	25	0	24%	76%
Sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine	156	100	56	14	70	16	14%	70%
Sve tri doze Sputnik V Vakcine	33	19	14	5	11	3	26%	78%
Sinopharm/Pfizer-BioNTech	133	61	72	11	50	0	18%	82%

Kod ukupno 70 ispitanika, iz grupe sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, registrovan je pozitivan PCR nalaz nakon treće doze. Od toga, 12 ispitanika bilo je pozitivno tokom prvog meseca, 15 u periodu od 1–3 meseca, 17 u periodu od 3–6 meseci, dok je 26 ispitanika bilo pozitivno više od šest meseci nakon vakcinacije (Tabela 10).

Tabela 10. Dinamika PCR pozitivnosti na virus nakon buster doze COVID-19 vakcine

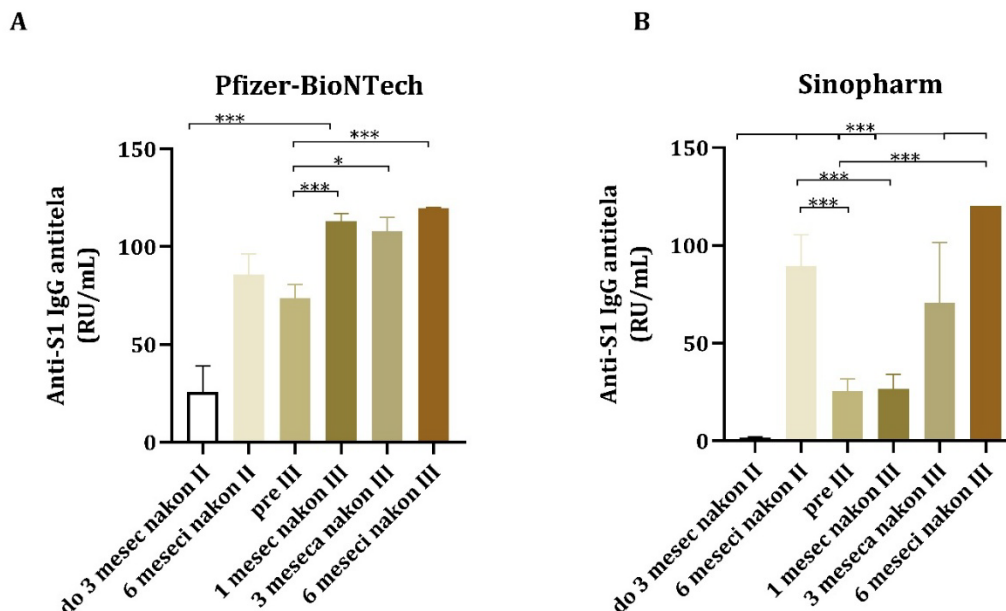
	Broj ispitanika			
	Mesec dana nakon treće doze	3 meseca nakon treće doze	6 meseci nakon treće doze	Više od 6 meseci nakon treće doze
Sve tri doze Pfizer-BioNTech COVID-19 vakcine	4	7	6	8
Sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine	12	15	17	26
Sve tri doze Sputnik V Vakcine	2	3	5	4
Sinopharm/Pfizer-BioNTech	3	10	19	18

Prisustvo jednog ili više komorbiditeta zabeleženo je kod 239 ispitanika (58,3%). Najčešće su registrovane kardiovaskularne bolesti (110 ispitanika), alergijske reakcije (51), endokrini poremećaji (38), autoimunske bolesti (10), kao i neurološki poremećaji (9). Nijedna od ispitanica u trenutku uključivanja u studiju nije bila trudna, niti je dojila. Takođe, nijedan od ispitanika nije imao/imala dijagnostikovanu primarnu ili sekundarnu imunodeficijenciju, niti oboljenja hematopoetskog sistema.

5.2.2. Određivanje dinamike humoralnog imunskog odgovora

Nivoi anti-S1 IgG antitela praćeni su u ukupno šest vremenskih tačaka: tri i šest meseci nakon druge doze vakcine, neposredno pre primene treće doze, kao i jedan, tri i šest meseci nakon buster doze vakcine. Na osnovu PCR potvrde prethodne infekcije SARS-CoV-2 virusom i anamnestičkih podataka, ispitanici su podeljeni u dve grupe: COVID-19 pozitivne (**COVID-19+**), koji su imali potvrđenu i preležanu infekciju, i COVID-19 negativne (**COVID-19-**), bez dokaza o prethodnoj infekciji.

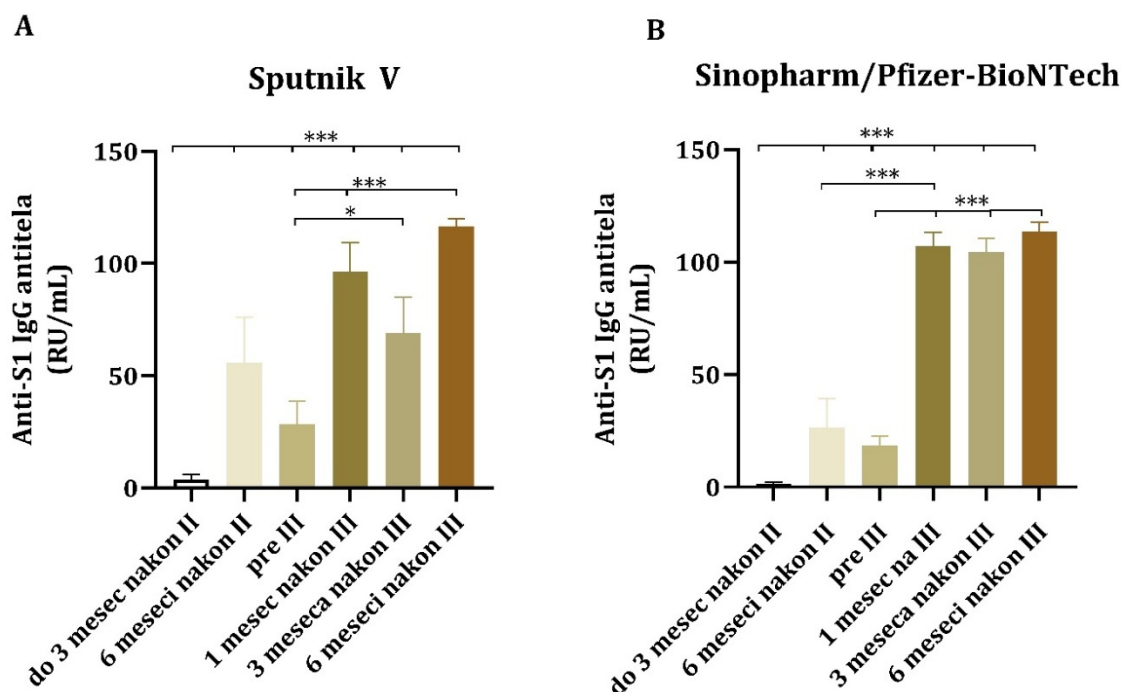
U grupi ispitanika koji su primili tri doze Pfizer-BioNTech vakcine i nisu imali potvrđenu infekciju SARS-CoV-2 virusom, odnosno COVID-19- ispitanici, šest meseci nakon druge doze vakcine detektovan je blagi porast nivoa anti-S1 IgG antitela, bez statističke značajnosti, dok je neposredno pre treće doze uočen blag pad. Nakon primene buster doze, zabeležen je statistički značajan *porast* nivoa anti-S1 IgG antitela u sve tri posmatrane tačke: jedan, tri i šest meseci nakon vakcinacije (Slika 16A).



Slika 16. Nivoi anti-S1 IgG antitela nakon vakcinacije kod ispitanika **bez prethodne infekcije SARS-CoV-2 virusom**: (A) tri doze Pfizer-BioNTech vakcine i (B) tri doze Sinopharm [Vero Cell] inaktivisane vakcine. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Kod COVID-19- ispitanika, koji su primili tri doze doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine (Slika 16B), anti-S1 IgG antitela su tri meseca nakon druge doze bila detektovana u koncentracijama iznad limita detekcije (1,2 RU/mL), ali ispod referentnog praga za pozitivnost definisanog od strane proizvođača (8,0 RU/mL), što ukazuje na nizak nivo humoralnog odgovora u ovom periodu. Nakon toga, šest meseci posle druge doze, zabeležen je statistički značajan porast koncentracije antitela. Ipak, neposredno pre primene buster doze, usledio je novi pad nivoa antitela, dok mesec dana nakon buster vakcinacije nije zabeleženo značajno povećanje u odnosu na prethodni vremenski momenat. Značajno povećanje nivoa anti-S1 IgG antitela zabeleženo je tek *šest meseci* nakon primene buster doze ($p < 0,001$).

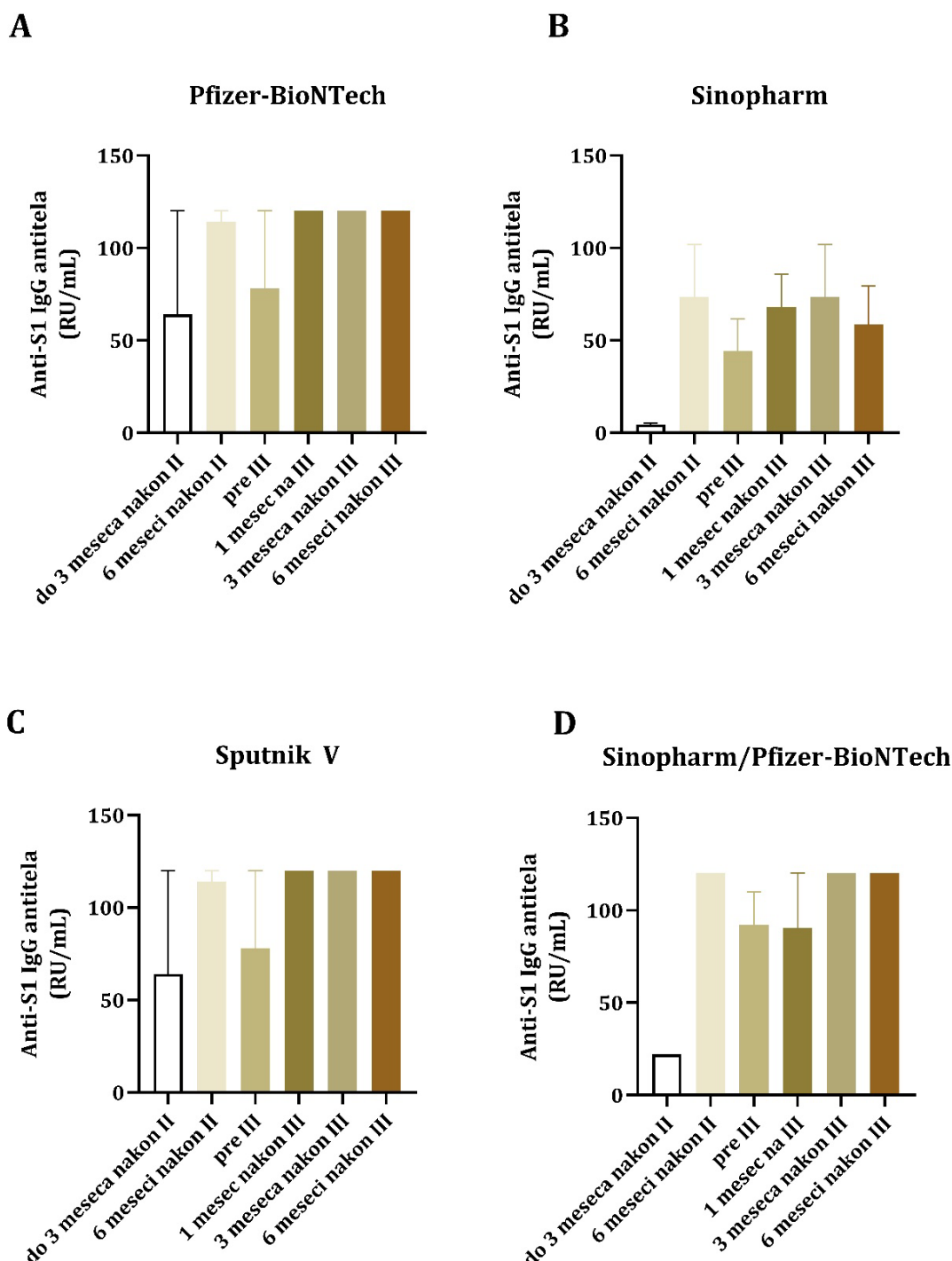
Situacija sa Sputnik V vakcinom bila je slična kao i sa Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom — nivoi anti-S1 IgG antitela su tri meseca nakon druge doze bili detektovani u koncentracijama iznad limita detekcije testa, ali ispod klinički relevantnog praga. Nakon šest meseci zabeležen je blagi porast bez statističke značajnosti, dok je neposredno pre treće doze uočen ponovni pad nivoa ovih antitela. Nakon primene buster doze vakcine, primećen je statistički značajan porast nivoa anti-S1 IgG antitela već jedan mesec nakon vakcinacije ($p < 0,001$). Tri meseca nakon treće doze, nivo antitela je i dalje bio povišen, uz statističku značajnost ($p < 0,05$), dok je šest meseci nakon buster doze dostigao još viši nivo, uz visoko značajnu razliku ($p < 0,001$) u odnosu na početne vrednosti (Slika 17A).



Slika 17. Nivoi anti-S1 IgG antitela nakon vakcinacije kod ispitanika **bez prethodne infekcije**: (A) tri doze Sputnik V vaccine i (B) heterologna kombinacija (Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vaccine i treća doza Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine (Sinopharm/Pfizer-BioNTech). Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$.

Četvrtu grupu činili su ispitanici koji su primili prve dve doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vaccine, ali su zbog nezadovoljavajućeg imunskog odgovora, kao treću dozu primili Pfizer-BioNTech vakcinu. Tri meseca nakon druge doze, nivoi anti-S1 IgG antitela kod ovih ispitanika bili su ispod referentnog praga za seropozitivnost, što ukazuje na slab odgovor na primarnu vakcinaciju, slično kao i u grupi koja je primila tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vaccine. Zatim je zabeležen blagi porast nivoa ovih antitela nakon šest meseci, a potom pad neposredno pre treće doze vaccine. Nakon primene Pfizer-BioNTech vaccine kao buster doze, zabeležen je visoko statistički značajan *porast* nivoa anti-S1 IgG antitela već jedan mesec nakon vakcinacije, a povišeni nivoi su se zadržali i tri i šest meseci nakon treće doze ($p < 0,001$) (Slika 17B).

Nivo anti-S1 IgG antitela kod ispitanika koji su imali potvrđenu infekciju virusom SARS-CoV-2 (COVID-19+) *razlikovao se* u odnosu na ispitanike bez prethodne infekcije. U prvoj (tri doze Pfizer-BioNTech), trećoj (tri doze Sputnik V) i četvrtoj grupi (Sinopharm/Pfizer-BioNTech), uočen je *porast* nivoa anti-S1 IgG antitela šest meseci nakon druge doze, koji se održao tokom celog posmatranog perioda, ali bez statistički značajnih razlika u kasnijim vremenskim tačkama (Slika 18A, 18C i 18D). U drugoj grupi, koja je primila tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vaccine, zabeležen je drugačiji obrazac imunskog odgovora (Slika 18B). Naime, nakon druge doze uočen je *umeren porast* nivoa anti-S1 IgG antitela, dok je intenzitet njihovog porasta šest meseci nakon treće doze bio manji u poređenju sa ostalim grupama.

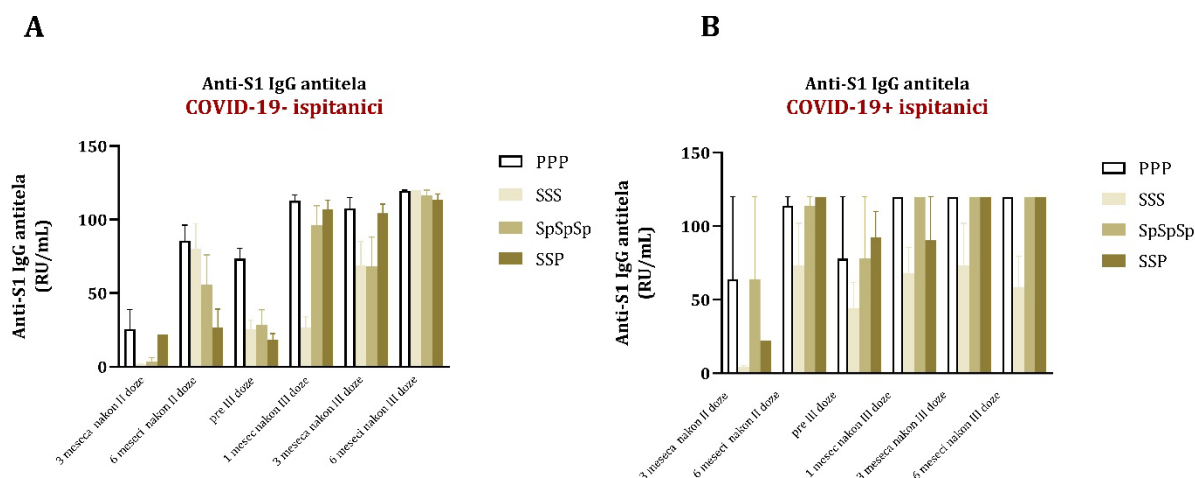


Slika 18. Nivoi anti-S1 IgG antitela nakon vakcinacije kod ispitanika **sa prethodnom infekcijom**: (A) tri doze Pfizer-BioNTech vakcine; (B) tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine; (C) tri doze Sputnik V vakcine i (D) heterologna kombinacija (Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vaccine i treća doza Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine Sinopharm/Pfizer-BioNTech). Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$.

5.2.3. Uporedna analiza nivoa anti-S1 IgG antitela po vakcinalnim grupama

Upoređivanjem efikasnosti vakcina (Pfizer-BioNTech, Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcina, Sputnik V i Sinopharm/Pfizer-BioNTech) u istim vremenskim tačkama – tri i šest meseci nakon druge doze, neposredno pre treće doze, kao i jedan, tri i šest meseci nakon buster doze – kod ispitanika bez prethodne infekcije virusom SARS-CoV-2 (COVID-19-), utvrđene su značajne *razlike* u nivou anti-S1 IgG antitela (Slika 19A). Ispitanici koji su primili heterolognu kombinaciju Sinopharm/Pfizer-BioNTech (SSP) imali su statistički

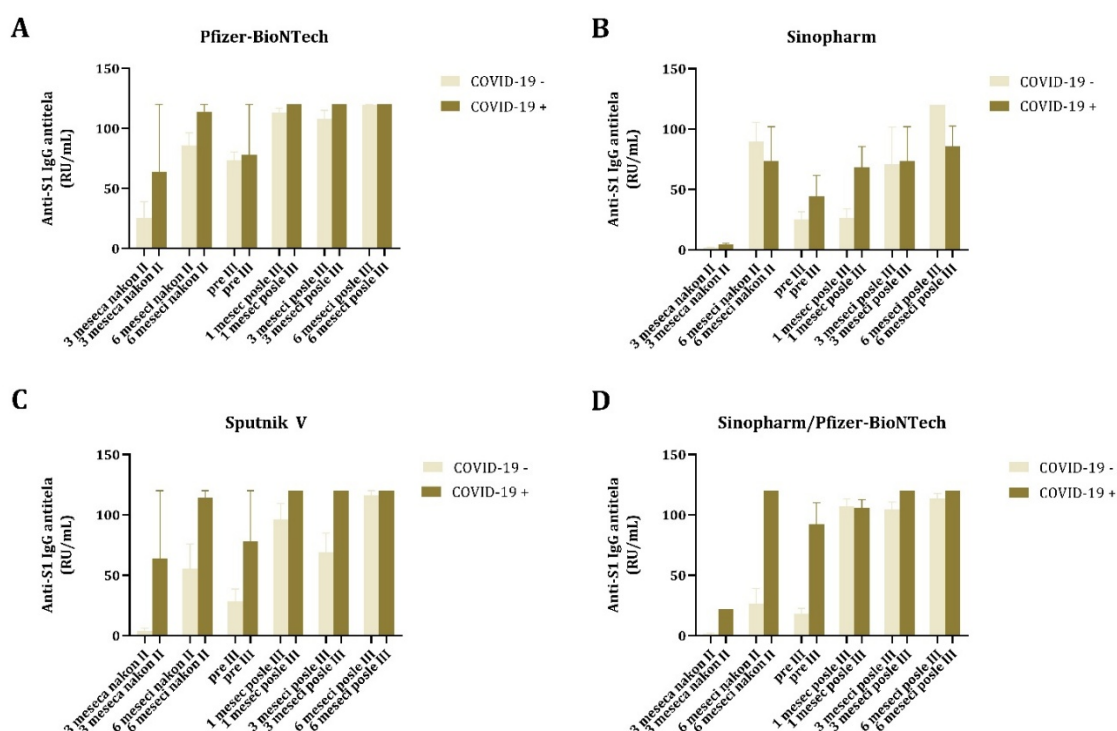
značajno *niže* nivoe anti-S1 IgG antitela *šest meseci* nakon druge doze, u poređenju sa grupama koje su primile tri doze Pfizer-BioNTech (PPP) i tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine (SSS) ($p < 0,001$). U PPP grupi ispitanika, nivoi ovih antitela su ostali viši neposredno pre treće doze i statistički su se razlikovali od preostale tri grupe ispitanika ($p < 0,001$).



Slika 19. Nivoi anti-S1 IgG antitela, kao markera humoralnog imunskog odgovora, u šest vremenskih tačaka: tri i šest meseci nakon druge (II) doze vakcine, neposredno pre treće (III) doze, kao i jedan, tri i šest meseci nakon treće doze vakcine. Prikazana je dinamika odgovora kod ispitanika koji su primili: sve tri doze Pfizer-BioNTech vakcine (PPP), sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine (SSS), sve tri doze Sputnik V vakcine (SpSpSp), kao i heterolognu kombinaciju Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcina (SSP). Rezultati su prikazani za ispitanike (A) bez prethodne infekcije SARS-CoV-2 (COVID-19-) i (B) sa prethodnom infekcijom (COVID-19+). Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Mesec dana nakon primene treće doze, grupa koja je primila tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine (SSS) imala je statistički značajno *niže* nivoe anti-S1 IgG antitela u poređenju sa ostalim grupama, a ta razlika se zadržala i tri meseca nakon buster doze, u poređenju sa PPP grupom ($p < 0,05$). U istom periodu, grupa koja je primila tri doze Sputnik V vakcine (SpSpSp) imala je takođe *niže* vrednosti ovih antitela u odnosu na PPP grupu ($p < 0,05$). Međutim, šest meseci nakon treće doze, svi vakcinalni režimi pokazali su slične, maksimalne vrednosti anti-S1 IgG antitela, bez statistički značajnih razlika među grupama (Slika 19A).

Kod COVID-19+ ispitanika, nije bilo statistički značajnih razlika u nivou anti-S1 IgG antitela između vakcinalnih grupa u različitim vremenskim tačkama (ANOVA analiza nije pokazala značajnost) (Slika 19B). Iako su COVID-19+ ispitanici u svim analiziranim grupama imali više bazalne vrednosti anti-S1 IgG antitela tri meseca nakon druge doze, ove razlike nisu bile statistički značajne. Međutim, u SSS grupi, zabeležen je *viši* nivo antitela mesec dana nakon treće doze kod COVID-19+ ispitanika ($p < 0,05$), ali se ta razlika preokrenula šest meseci nakon buster doze (Slika 20). Takođe, kod heterologne SSP grupe, prethodna infekcija je *produžila* imunski odgovor i dovela do značajno viših nivoa antitela tri meseca nakon druge doze vakcine ($p < 0,05$), kao i pre treće doze ($p < 0,001$).



Slika 20. Uporedni prikaz nivoa anti-S1 IgG antitela kod ispitanika sa (COVID-19+) i bez prethodne infekcije SARS-CoV-2 (COVID-19-) u različitim vremenskim tačkama: 3 i 6 meseci nakon druge (II) doze; neposredno pre treće (III) doze; kao i 1, 3 i 6 meseci nakon treće doze vakcine. Analiza je prikazana za: (A) sve tri doze Pfizer-BioNTech vakcine; (B) sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine; (C) sve tri doze Sputnik V vakcine; (D) heterolognu kombinaciju dve doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine i treće doze Pfizer-BioNTech vakcine (Sinopharm/Pfizer-BioNTech). Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

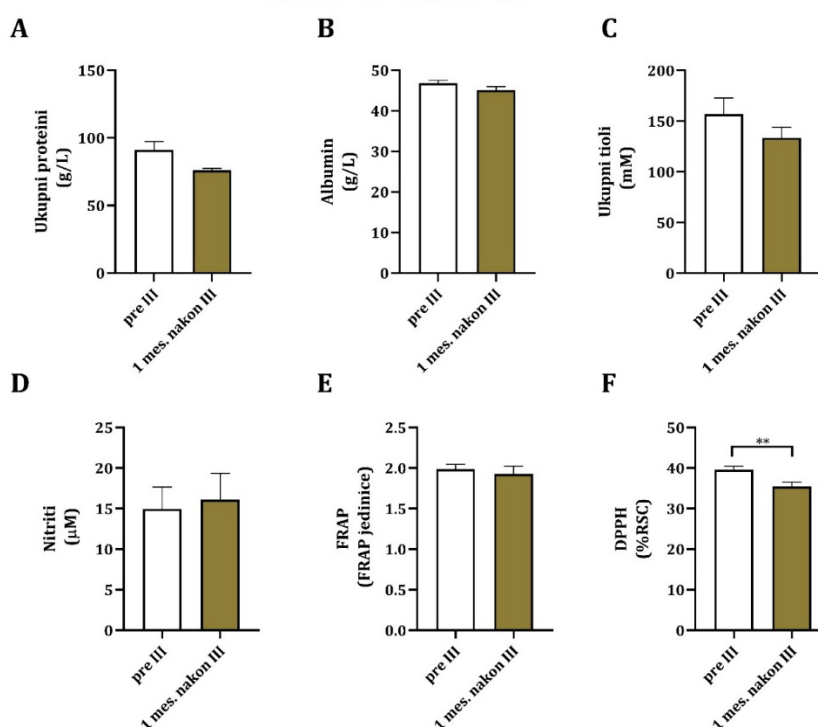
5.2.4. Analiza redoks parametara pre i posle treće doze vakcine

U okviru ove analize ispitanici su, takođe, grupisani prema tipu primljene vakcine i statusu prethodne SARS-CoV-2 infekcije (COVID-19+ i COVID-19-). Za svaku podgrupu, vrednosti ispitanih redoks parametara (DPPH, FRAP, tioli, nitriti, albumini i ukupni proteini) upoređeni su pre i mesec dana nakon primene buster doze vakcine, u cilju procene promena u redoks statusu usled dodatne imunizacije.

Kod COVID-19- ispitanika, koji su primili tri doze Pfizer-BioNTech vakcine, uočen je trend *smanjenja* vrednosti većine ispitivanih parametara redoks sistema nakon vakcinacije (Slika 21). Međutim, statistički značajna razlika uočena je samo kod rezultata DPPH testa ($p = 0,048$), što sugeriše smanjenu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala specifičnih za DPPH test mesec dana nakon buster vakcinacije (Slika 21F). Kod ostalih redoks parametara, iako je uočen trend smanjenja, promene nisu dostigle nivo statističke značajnosti razlika.

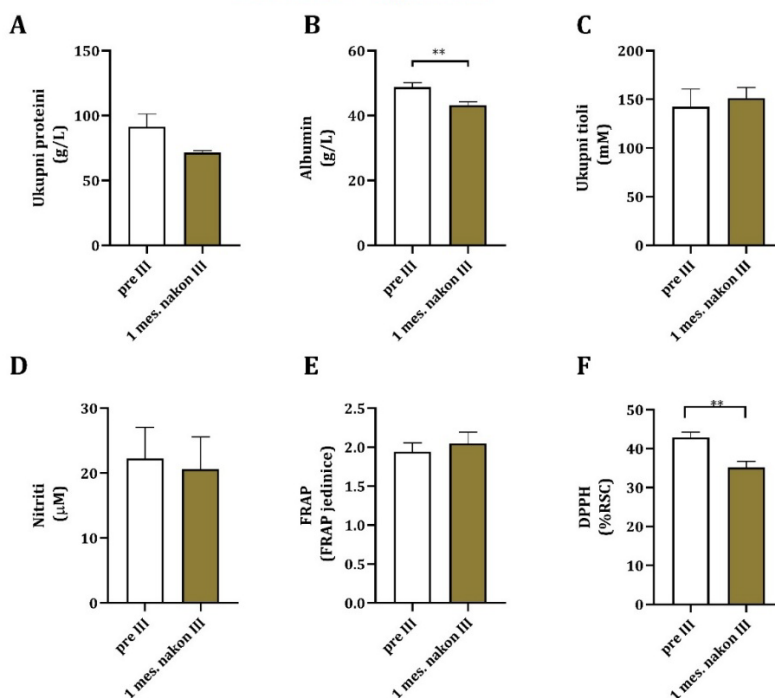
Kao i kod COVID-19- ispitanika, i u grupi COVID-19+ ispitanika koji su primili tri doze Pfizer-BioNTech vakcine, uočen je opšti trend *smanjenja* vrednosti većine redoks parametara nakon vakcinacije (Slika 22). Statistički značajno smanjenje zabeleženo je za koncentraciju serumskog albumina ($p = 0,004$) (Slika 22B). Takođe, DPPH test je pokazao značajno smanjenu antioksidativnu aktivnost seruma prema slobodnim radikalima ($p = 0,011$), što sugeriše smanjenu sposobnost organizma da neutrališe oksidativni stres (Slika 22F). Nasuprot tome, iako su ukupni proteini i nivo nitrita pokazali pad nakon buster doze, ove promene nisu bile statistički značajne. Parametri FRAP testa i ukupni tioli su, naprotiv, pokazali blag porast, ali takođe bez statističke značajnosti, što ukazuje na očuvanu, ili blago poboljšanu, komponentu antioksidativne zaštite kod ispitanika iz ove grupe.

**Pfizer-BioNTech vakcina
COVID-19- ispitanici**



Slika 21. Promene redoks parametara kod ispitanika koji su primili tri doze **Pfizer-BioNTech** COVID-19 vakcine i **bez prethodne infekcije SARS-CoV-2 virusom** (COVID-19-): (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) Ukupni tioli, (D) Nitriti, (E) FRAP, (F) DPPH. Prikazane su vrednosti navedenih parametara pre i mesec dana nakon treće doze vakcine. Statistički značajne razlike označene su sa ** $p < 0,01$.

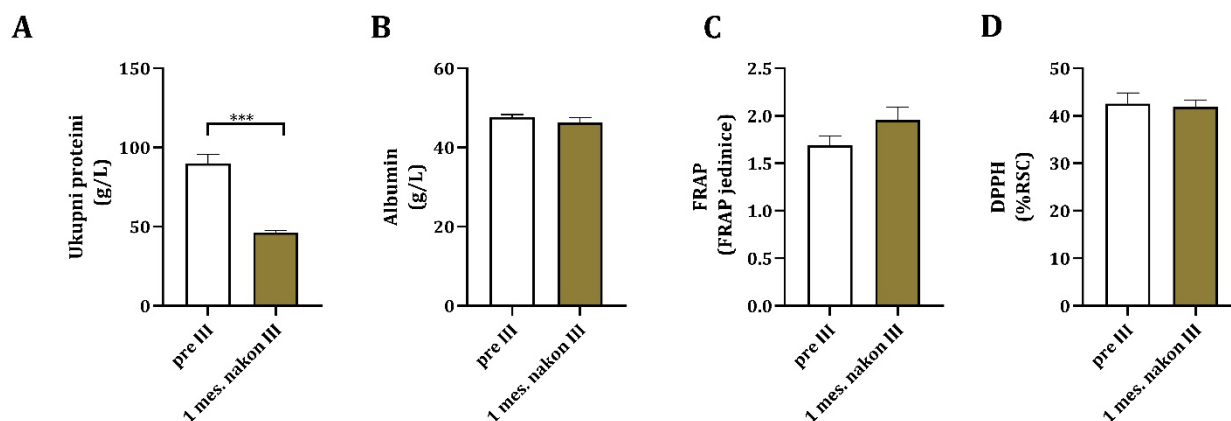
**Pfizer-BioNTech vakcina
COVID-19+ ispitanici**



Slika 22. Promene redoks parametara kod ispitanika koji su primili tri doze **Pfizer-BioNTech** COVID-19 vakcine **sa prethodnom SARS-COV-2 infekcijom** (COVID-19+): (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) Ukupni tioli, (D) Nitriti, (E) FRAP, (F) DPPH. Prikazane su vrednosti navedenih parametara pre i mesec dana nakon treće doze vakcine. Statistički značajne razlike označene su sa ** $p < 0,01$.

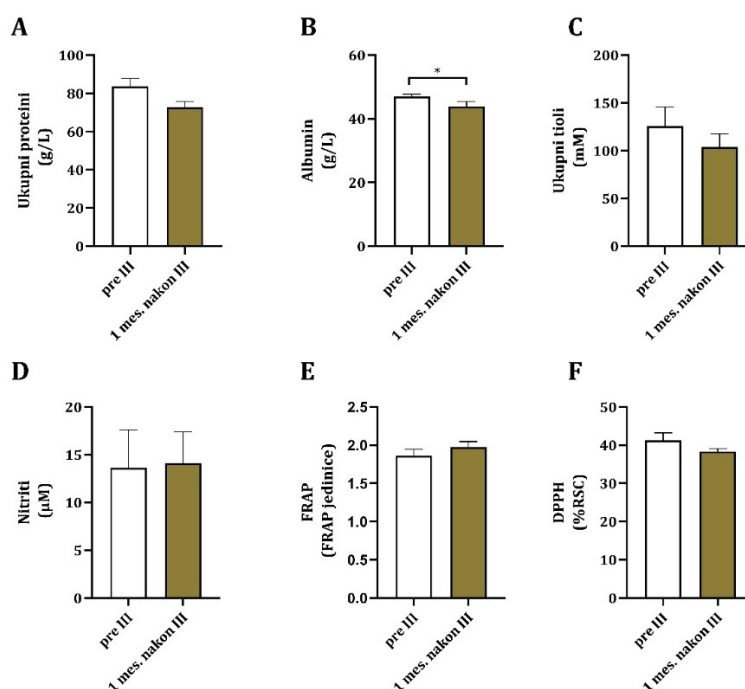
Kod COVID-19- ispitanika, koji su primili sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, uočava se značajno *smanjenje* ukupnih proteina, uz blagi pad sadržaja albumina (Slika 23). Parametri antioksidativnog statusa, mereni DPPH i FRAP esejima, pokazuju stabilne vrednosti – DPPH bez značajne promene, dok FRAP beleži trend porasta, ali nijedan od ovih nalaza nije dostigao statističku značajnost.

Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcina COVID-19- ispitanici



Slika 23. Promene redoks parametara kod ispitanika koji su primili tri doze **Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated** COVID-19 vakcine **bez prethodne SARS-COV-2 infekcije** (COVID-19- grupa). (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) FRAP, (D) DPPH. Prikazane su vrednosti pre i mesec dana nakon treće doze vakcine. Statistički značajne razlike označene su sa *** $p < 0,001$.

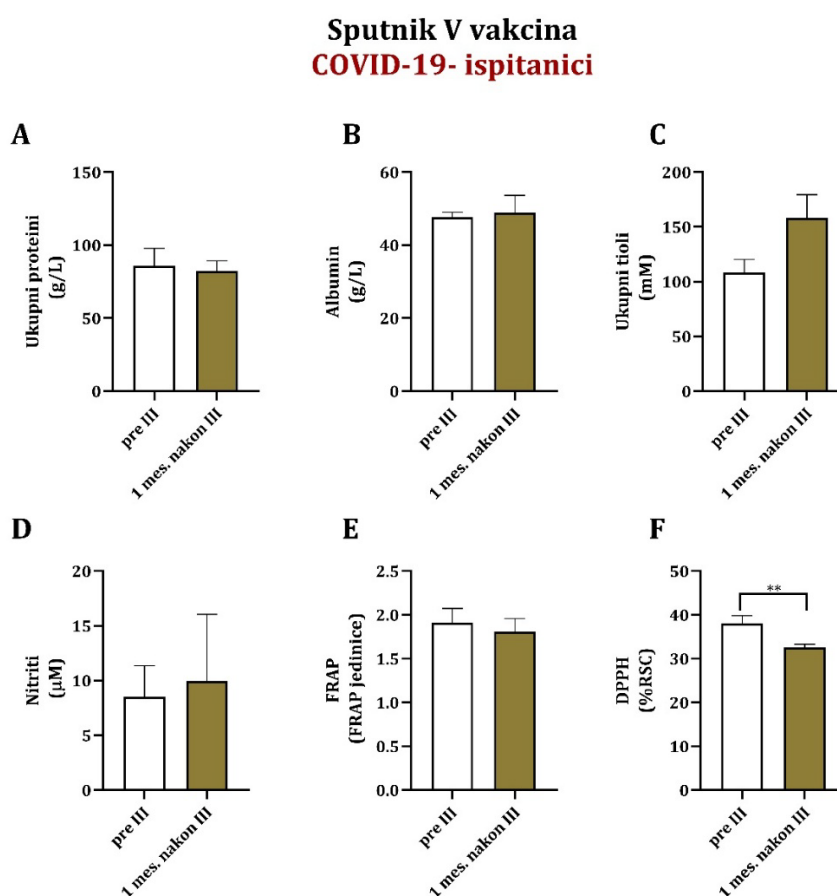
Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcina COVID-19+ ispitanici



Slika 24. Promene redoks parametara kod ispitanika koji su primili tri doze **Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated** COVID-19 vakcine **sa prethodnom SARS-COV-2 infekcijom** (COVID-19+ grupa): (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) Ukupni tioli, (D) Nitriti, (E) FRAP, (F) DPPH. Prikazane su vrednosti pre i mesec dana nakon treće doze vakcine. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$.

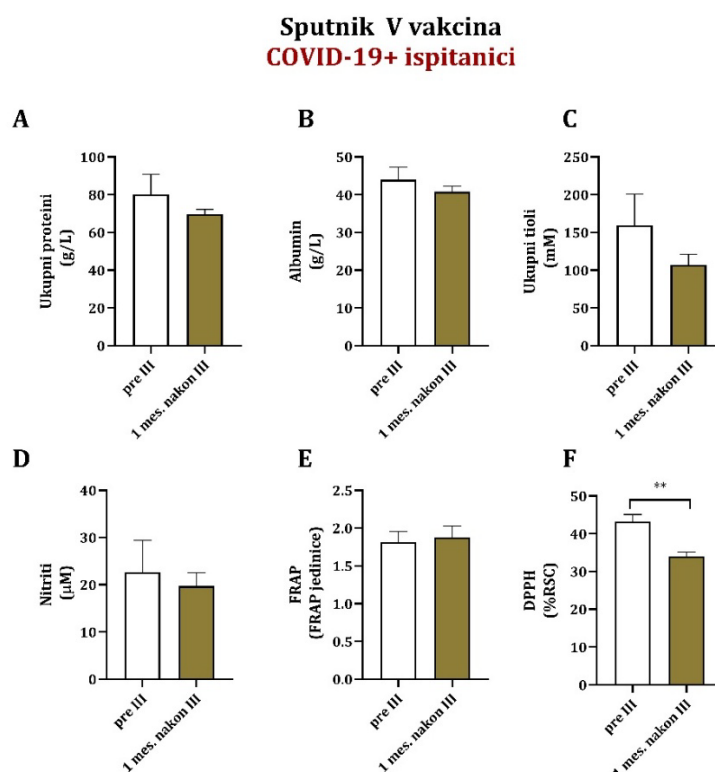
S druge strane, kod COVID-19+ ispitanika koji su primili tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine (Slika 24), statistički značajno *smanjenje* je registrovano u koncentraciji serumskog albumina ($p < 0,05$), što može ukazivati na blage postvakcinalne promene u homeostazi proteina, moguće usled inflamatornih procesa (Slika 24B). Vrednosti za ukupne proteine, iako numerički niže nakon vakcinacije, nisu pokazale statističku značajnost razlika. Kod parametara antioksidativnog kapaciteta plazme (DPPH i FRAP esej), nije uočena značajna promena – DPPH rezultati su pokazali blagi pad, dok je FRAP test ukazao na blago povećanje redukcionog kapaciteta, ali bez statističke značajnosti. Vrednosti nitrita i ukupnih tiola takođe su ostale relativno stabilne, uz blagi porast koncentracije nitrita i diskretan pad nivoa tiola, što ukazuje na odsustvo značajnog oksidativnog disbalansa nakon buster doze kod ispitanika sa prethodno preležanom SARS-CoV-2 infekcijom.

Na slici 25 prikazana je promena redoks parametara kod COVID-19– ispitanika koji su primili tri doze Sputnik V vakcine. Statistički značajan *pad* uočeno je u vrednostima u DPPH antioksidativnom testu (%RSC) nakon buster doze vakcine ($p < 0,01$), što ukazuje na smanjenu sposobnost seruma da neutrališe slobodne radikale putem ovog testa i može reflektovati kratkotrajnu potrošnju ili redistribuciju antioksidanasa (Slika 25F). Kod ostalih redoks parametara seruma nisu uočene statistički značajne promene. Vrednosti ukupnih proteina i albumina ostale su stabilne, uz blagi porast nivoa albumina. Takođe, FRAP test rezultati i sadržaj nitrita nisu bili značajno promenjeni, dok su ukupni tioli pokazali numerički izražen *porast*, što može ukazati na aktivaciju endogenih tiolskih antioksidativnih mehanizama, iako bez statističke potvrde.



Slika 25. Promene redoks parametara kod ispitanika koji su primili tri doze **Sputnik V** COVID-19 vakcine **bez prethodne SARS-COV-2 infekcije** (COVID-19– grupa): (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) Ukupni tioli, (D) Nitriti, (E) FRAP, (F) DPPH. Prikazane su vrednosti pre i mesec dana nakon treće doze vakcine. Statistički značajne razlike označene su sa ** $p < 0,01$.

Sličan obrazac u nivou parametara povezanih sa antioksidativnom odbranom organizma uočen je i kod COVID-19+ ispitanika koji su takođe primili tri doze Sputnik V vakcine, gde je statistički značajno *smanjenje* registrovano u neutralisanju DPPH radikala ($p < 0,01$). Kod ostalih analiziranih parametara nisu uočene značajne promene (Slika 26).

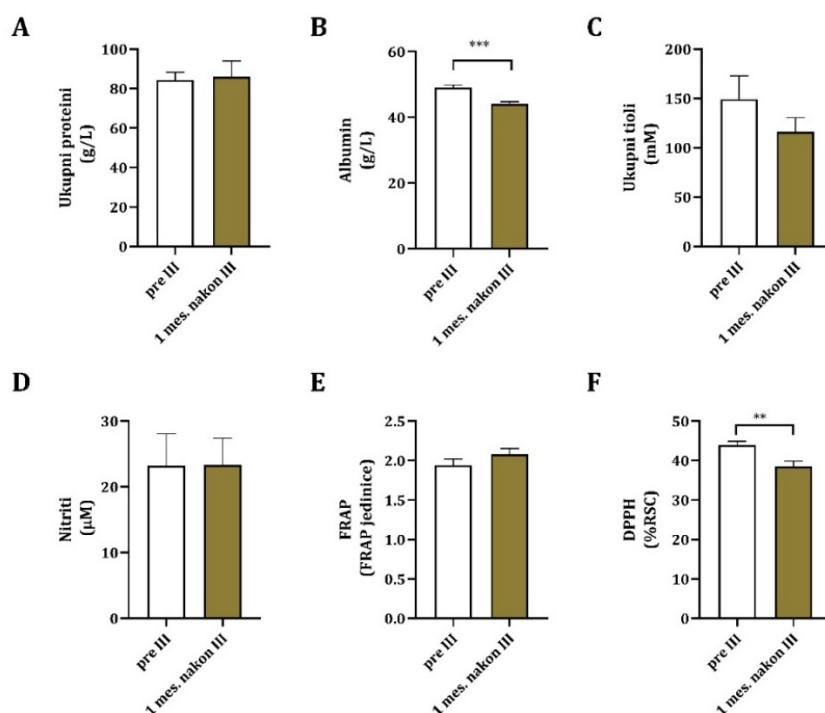


Slika 26. Promene redoks parametara kod ispitanika koji su primili tri doze **Sputnik V** COVID-19 vakcine **sa prethodnom SARS-COV-2 infekcijom** (COVID-19+ grupa): (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) Ukupni tioli, (D) Nitriti, (E) FRAP, (F) DPPH. Prikazane su vrednosti pre i mesec dana nakon treće doze vakcine. Statistički značajne razlike označene su sa ** $p < 0,01$.

Kod COVID-19– ispitanika koji su primili heterolognu kombinaciju Sinopharm/Pfizer-BioNTech (Slika 27) statistički značajne promene uočene su kod koncentracije serumskog albumina i vrednosti DPPH testa. Koncentracija albumina bila je značajno *niža* mesec dana nakon buster doze u poređenju sa vrednostima pre vakcinacije ($p < 0,001$) (Slika 27B), dok je sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, procenjena DPPH testom, takođe pokazala značajan pad ($p < 0,01$) (Slika 27F). Ostali redoks parametri nisu pokazali značajne promene: sadržaj ukupnih proteina i nitrita u serumu je ostao stabilan, dok je FRAP test pokazao numerički porast vrednosti bez statističke značajnosti razlika. Vrednosti tiola su bile nešto niže nakon vakcinacije buster dozom, ali takođe bez značajnih razlika.

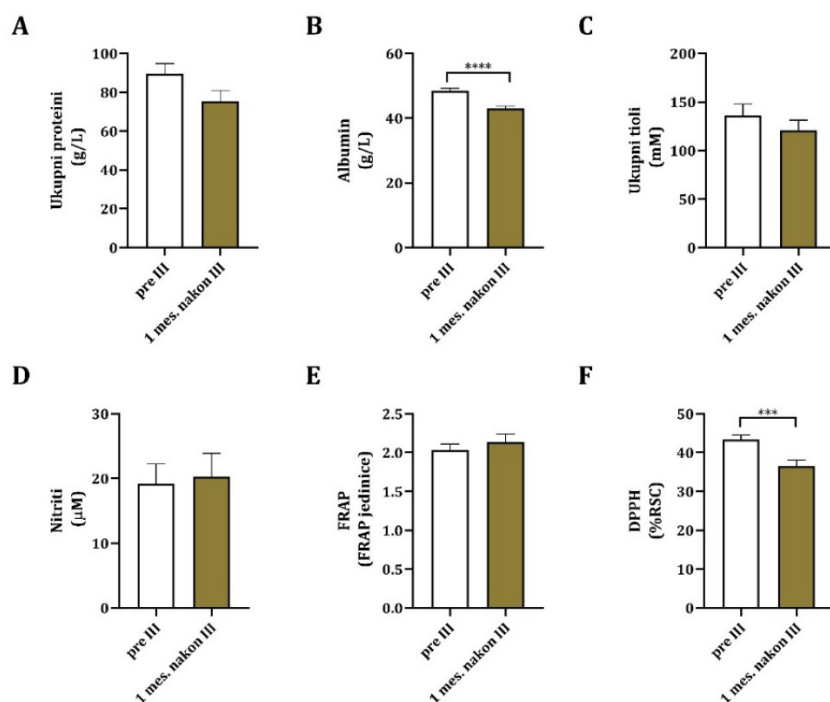
Sličan obrazac promena u antioksidativnom kapacitetu u serumu zabeležen je i kod COVID-19+ ispitanika, a koji su takođe vakcinisani heterolognom kombinacijom Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcina (Slika 28). U ovoj podgrupi takođe su zabeležene statistički značajne promene u dva parametra: vrednosti albumina su opale nakon treće doze ($p < 0,0001$), a DPPH aktivnost je takođe bila značajno niža u postvakcinalnom periodu ($p < 0,001$), što može ukazivati na dodatnu aktivaciju ili iscrpljivanje antioksidativnih mehanizama kod osoba sa prethodnom izloženošću SARS-CoV-2 virusu. Ostali parametri nisu pokazali statistički značajne promene nakon buster doze vakcine. Vrednosti ukupnih proteina i tiola su se numerički smanjile, dok su FRAP esej rezultati i vrednosti nitrita pokazali blagi porast (Slika 28).

Sinopharm/Phizer-BioNTech vakcina COVID-19- ispitanici



Slika 27. Promene redoks parametara kod ispitanika koji su primili heterolognu kombinaciju **Sinopharm/Pfizer-BioNTech** vakcine **bez prethodne SARS-COV-2 infekcije** (COVID-19- grupa): (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) Ukupni tioli, (D) Nitriti, (E) FRAP, (F) DPPH. Prikazane su vrednosti pre i mesec dana nakon treće doze. Statistički značajne razlike označene su sa ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Sinopharm/Phizer-BioNTech vakcina COVID-19+ ispitanici



Slika 28. Promene redoks parametara kod ispitanika koji su primili heterolognu kombinaciju **Sinopharm/Pfizer-BioNTech** vakcine **sa prethodnom SARS-COV-2 infekcijom** (COVID-19+ grupa): (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) Ukupni tioli, (D) Nitriti, (E) FRAP, (F) DPPH. Prikazane su vrednosti pre i mesec dana nakon treće doze vakcine. Statistički značajne razlike označene su sa *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

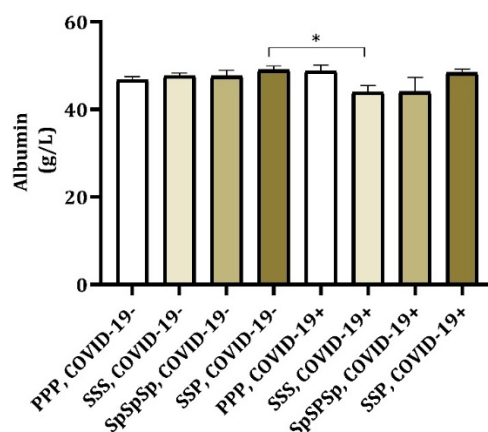
Zbirni prikaz statistički značajnih promena redoks parametara nakon primene buster doze vakcine (Tabela 11) ukazuje na razlike u postvakcinalnim odgovorima u zavisnosti od primenjenog vakcinalnog režima i prethodne izloženosti SARS-CoV-2 infekciji. Najveći broj značajnih promena uočen je u grupi sa *heterolognom vakcinacijom* (Sinopharm/Pfizer-BioNTech), gde su kod COVID-19- i COVID-19+ ispitanika zabeleženo izraženo smanjenje u koncentraciji albumina ($p < 0,001$ i $p < 0,0001$) i antioksidativne aktivnosti prema DPPH ($p < 0,01$ i $p < 0,001$), što ukazuje na snažan, ali potencijalno iscrpljujući efekat kombinovane imunizacije na antioksidativnu ravnotežu u serumu ispitanika. Kod COVID-19- ispitanika, vakcinisanih sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, uočen je značajan pad ukupnih proteina ($p < 0,001$), dok su kod COVID-19+ osoba vrednosti albumina takođe opale ($p < 0,05$). Značajno smanjenje DPPH aktivnosti registrovano je u obe Sputnik V grupe (COVID-19- i COVID-19+), dok su ostali parametri ostali stabilni. Kod osoba vakcinisanih sa tri doze Pfizer-BioNTech vakcine, došlo je do značajnog pada aktivnosti u DPPH testu i nivoa albumina, ali samo u COVID-19- grupi, dok su kod COVID-19+ ispitanika ove promene takođe bile prisutne, ali ne i (statistički) značajne.

Tabela 11. Zbirna tabela sa statičkim značajnim razlikama parametrima redoks serumskog odgovora pre i nakon III doze različitih COVID-19 vakcina.

	Pfizer-BioNTech		Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine		Sputnik V		Sinopharm/Pfizer-BioNTech	
Parametar	COVID-19-	COVID-19+	COVID-19-	COVID-19+	COVID-19-	COVID-19+	COVID-19-	COVID-19+
Ukupni proteini			***					
Albumin		**		*			***	****
Nitriti								
Tioli								
DPPH	**	**			**	**	**	***
FRAP								

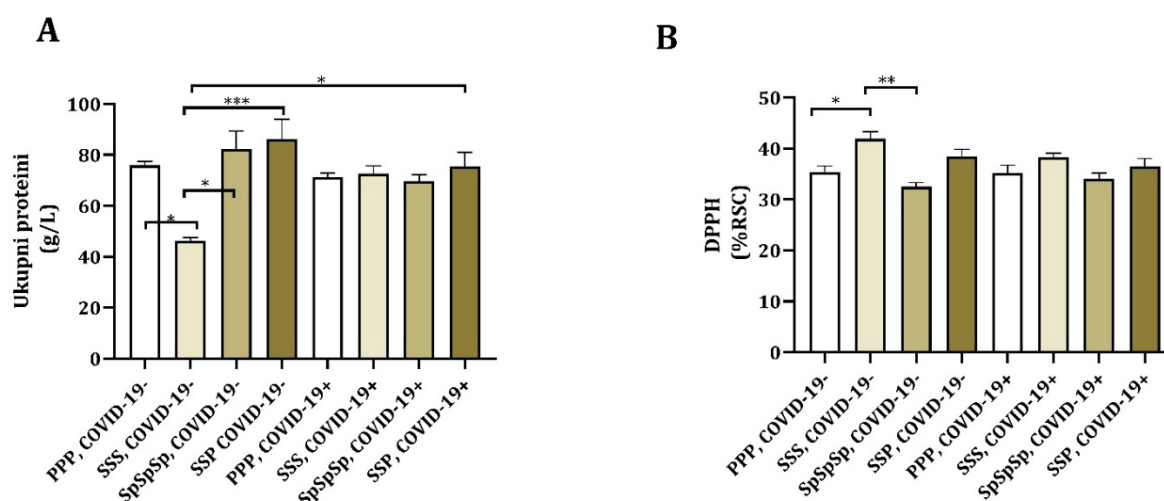
5.2.5. Promene redoks parametara po vakcinalnim grupama

Prilikom poređenja serumskih redoks parametara među svim vakcinalnim grupama, posmatrano zasebno, pre i nakon primene buster doze vakcine, statistički značajna razlika uočena je za određene pokazatelje oksidativnog statusa. Konkretno, nivo albumina pokazao je statistički značajnu razliku *pre treće doze* između COVID-19- ispitanika koji su primili heterolognu Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcinu (SSP) i COVID-19+ ispitanika koji su primili tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine (SSS) ($p < 0,05$), što ukazuje na moguću ulogu prethodne SARS-CoV-2 infekcije, kao i tipa vakcine, u modulaciji ovog parametra antioksidativne zaštite (Slika 29).



Slika 29. Nivoi serumskih albumina kod ispitanika pre primene treće doze COVID-19 vakcine, po vakcinalnim grupama i COVID-19 statusu. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$.

Nakon primene treće doze vakcine, najuočljivije razlike među vakcinalnim grupama zabeležene su u nivou ukupnih proteina (Slika 30A). Statistički značajna razlika uočena je između ispitanika iz grupe PPP i grupe SSS, obe bez prethodne COVID-19 infekcije ($p < 0,05$), kao i između ispitanika iz grupe SSS i grupe SpSpSp koji takođe nisu preležali infekciju ($p < 0,05$). Značajne razlike zabeležene su i između grupe SSS (COVID-19-) i grupe SSP (COVID-19+), kao i u poređenju sa grupom SSP (COVID-19+, $p < 0,05$). Ovo dodatno ukazuje na specifičan profil odgovora kod ispitanika vakcinisanih Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom bez prethodne infekcije. Pored toga, i DPPH test je pokazao statistički značajne razlike, i to između grupa PPP i SSS (obe COVID-19-, $p < 0,05$), kao i između SSS i SpSpSp takođe obe COVID-19- grupe (Slika 30B). Ostali analizirani parametri redoks statusa u serumu nisu pokazali statistički značajne razlike među grupama.



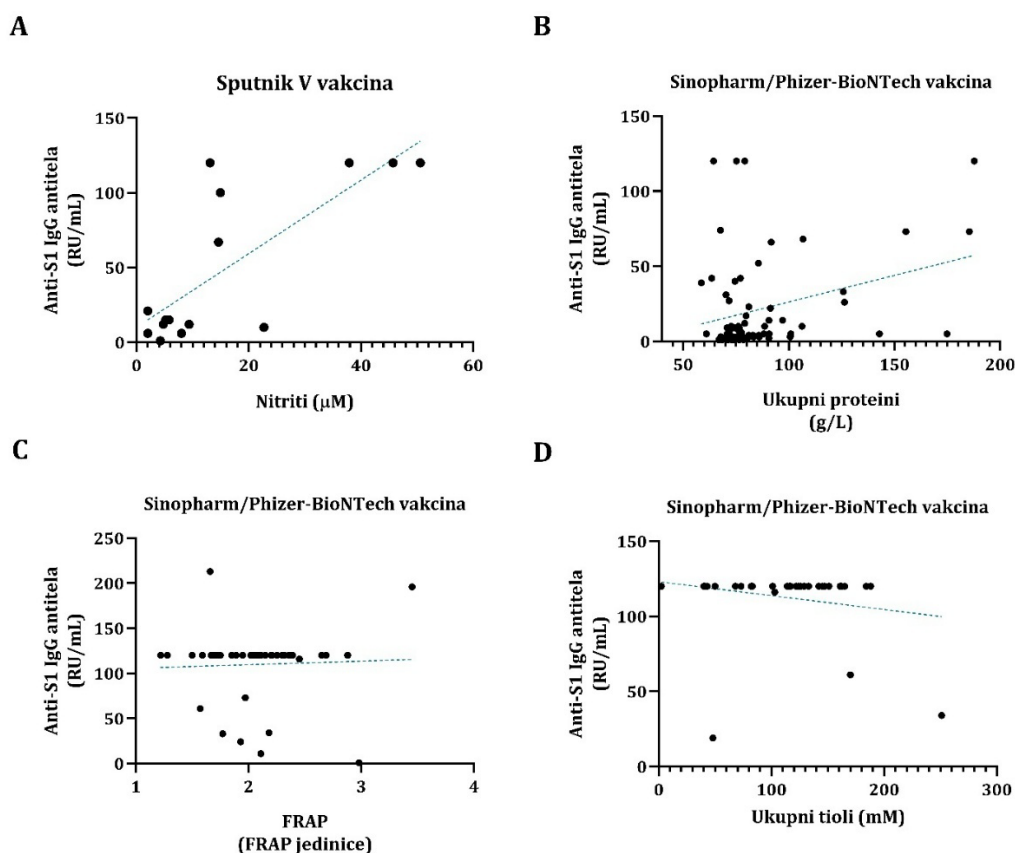
Slika 30. Poređenje redoks parametara kod ispitanika mesec dana **nakon treće doze** COVID-19 vakcine, podeljenih po vakcinalnim grupama i COVID-19 statusu: (A) ukupni proteini, (B) DPPH. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.6. Korelacija između nivoa antitela i redoks parametara

Analiza višestruke linearne regresije, sprovedena zasebno po vakcinalnim grupama ispitanika, ukazala je na različite obrasce povezanosti između redoks parametara i nivoa anti-S1 IgG antitela na SARS-CoV-2. U grupama vakcinisanih sa tri doze Pfizer-BioNTech COVID-19 i tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, nije pronađena statistički značajna povezanost između redoks parametara i anti-S1 IgG antitela na SARS-CoV-2, niti pre,

niti nakon primene treće doze vakcine. Suprotno tome, kod ispitanika vakcinisanih sa tri doze Sputnik V vakcine, pre treće doze registrovana je značajna pozitivna povezanost između koncentracije nitrita i nivoa IgG antitela ($p = 0,0008$), dok nakon buster doze nije uočena statistička značajnost razlika (Slika 31A).

Najizraženija povezanost je primećena u grupi sa heterolognom Sinopharm/Pfizer-BioNTech COVID-19 vakcinacijom. U ovoj grupi je, pre treće doze, utvrđena statistički značajna povezanost između ukupnih proteina i anti-S1 IgG antitela ($p = 0,0227$) (Slika 31B), dok je nakon treće doze vakcine zabeležena negativna korelacija između rezultata FRAP testa i nivoa anti-S1 IgG antitela ($p = 0,0372$), kao i između sadržaja tiola i anti-S1 IgG antitela ($p = 0,0008$) (Slika 31C-D). Negativni beta koeficijenti u ovom modelu ukazuju da porast koncentracije anti-S1 IgG antitela prati blago smanjenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (FRAP esej) i nivoa slobodnih tiola u serumu, što može ukazati na imunološki posredovanu potrošnju antioksidanasa i adaptivne promene u redoks ravnoteži u postinfekcijskom periodu nakon buster doze COVID-19 vakcine.



Slika 31. Linearna zavisnost između koncentracije anti-S1 IgG antitela i redoks parametara kod ispitanika vakcinisanih različitim COVID-19 vakcinama, pre i nakon treće (buster) doze: (A) Korelacija između koncentracije nitrita i nivoa anti-S1 IgG antitela kod ispitanika vakcinisanih sa tri doze **Sputnik V vakcine**, pre primene treće doze; (B) Korelacija između ukupnih proteina i nivoa anti-S1 IgG antitela kod ispitanika vakcinisanih kombinacijom **Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcina**, pre treće doze; (C) Odnos između vrednosti FRAP (ukupnog antioksidativnog kapaciteta) i nivoa anti-S1 IgG antitela kod **Sinopharm/Pfizer-BioNTech** grupe ispitanika, nakon treće doze vakcine; (D) Negativna korelacija između ukupnih tiola i nivoa anti-S1 IgG antitela kod ispitanika vakcinisanih kombinacijom **Sinopharm/Pfizer-BioNTech** vakcina, nakon treće doze.

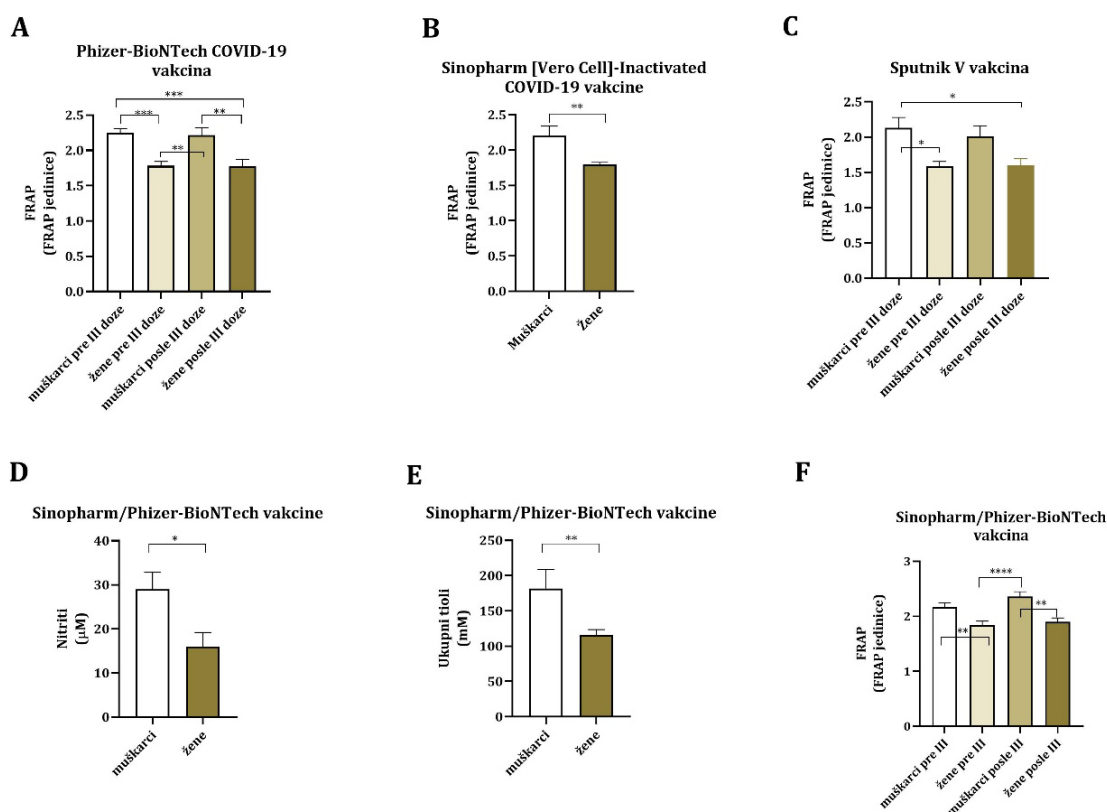
5.2.7. Uticaj demografskih i kliničkih faktora na imunski odgovor i redoks parametre

Analiziran je i uticaj prisustva komorbiditeta (hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti, bolesti štitaste žlezde i drugih hroničnih stanja) na koncentracije anti-S1 IgG antitela. U okviru svih analiziranih vakcinalnih grupa i COVID statusa (COVID-19+ i COVID-19-), prisustvo

komorbiditeta nije pokazalo statistički značajan uticaj na nivoe anti-S1 IgG antitela niti u jednoj od izabranih vremenskih tačaka ($p > 0,05$). Ovi rezultati ukazuju da komorbiditeti nisu imali značajniji efekat na razvoj humoralnog imunskog odgovora u posmatranom periodu.

S druge strane, analiza uticaja pola na redoks parametre pokazala je statistički značajne razlike između muškaraca i žena, kako pre, tako i nakon primene treće doze vakcine (Slika 32). Kod ispitanika vakcinisanih Pfizer-BioNTech vakcinom, muškarci su pre treće doze imali značajno više vrednosti u FRAP eseju u odnosu na žene ($p < 0,001$). Sličan obrazac zadržao se i nakon buster doze, iako su FRAP vrednosti u obe grupe opale, pri čemu su muškarci i dalje imali statistički viši (ukupni) antioksidativni kapacitet ($p < 0,01$) (Slika 32A). Kod osoba koje su primile Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinu, takođe su uočene više FRAP vrednosti kod muškaraca u odnosu na žene nakon treće doze vakcine ($p < 0,01$) (Slika 32B), dok su kod ispitanika koji su primili tri doze Sputnik V vakcine, muškarci pokazali značajno više FRAP vrednosti pre treće doze u poređenju sa ženama ($p < 0,05$) (Slika 32C).

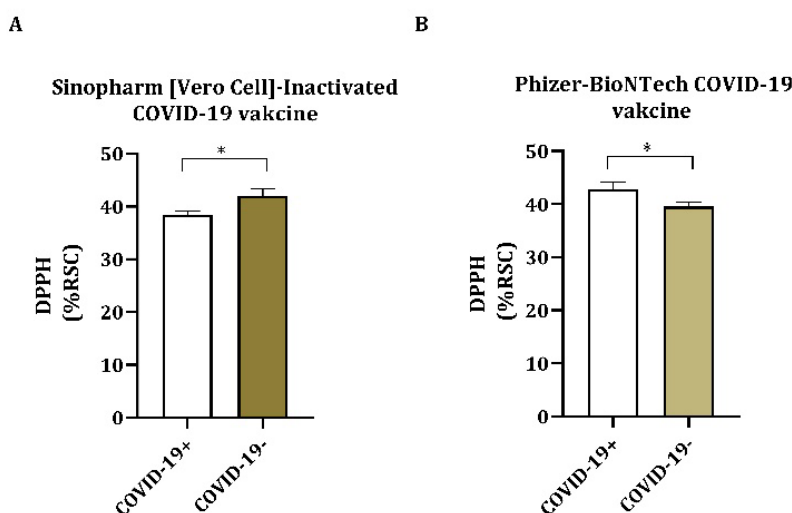
U grupi heterologne vakcinacije (Sinopharm/Pfizer-BioNTech), nakon treće doze uočena je značajno viša koncentracija nitrita kod muškaraca u odnosu na žene ($p < 0,05$), dok su pre treće doze tioli bili značajno viši kod muškaraca ($p < 0,01$), ukazujući na izraženiji antioksidativni odgovor kod muškog pola (Slika 32D-E). Najizraženija razlika u FRAP vrednostima u okviru ove grupe zabeležena je nakon treće doze vakcine, gde su muškarci pokazali viši ukupni antioksidativni kapacitet u odnosu na žene ($p < 0,0001$) (Slika 32F). Ovi nalazi sugerišu da pol može imati modulatorski efekat na redoks ravnotežu, kako u kontekstu osnovnog fiziološkog statusa, tako i u odgovoru na vakcinaciju.



Slika 32. Polno specifične razlike u redoks parametrima kod ispitanika pre i nakon buster doze različitih COVID-19 vakcina: (A) FRAP vrednosti kod ispitanika vakcinisanih Pfizer-BioNTech vakcinom; (B) FRAP nakon treće doze Sinopharm vakcine; (C) FRAP nakon treće doze Sputnik V vakcine; (D) Nitriti nakon treće doze Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcine; (E) Ukupni tioli pre treće doze Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcine; (F) FRAP vrednosti kod ispitanika vakcinisanih Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcinom. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Analiza uticaja preležane SARS-CoV-2 infekcije na serumski redoks status, pokazala je statističku značajnost samo kod DPPH testa u okviru dve vakcinalne grupe (Slika 33A). Naime, kod ispitanika vakcinisanih sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, nakon treće doze uočen je veći procenat neutralizacije slobodnih radikala (%RSC) kod COVID-19- osoba u poređenju sa onima koji su preležali infekciju ($p < 0,05$), što ukazuje na očuvani, ili reaktivisani antioksidativni odgovor u odsustvu prethodnog virusnog izazova.

Slično tome (Slika 33B), u grupi ispitanika koji su primili sve tri doze Pfizer-BioNTech vakcine, pre primene treće doze takođe je registrovana statistički značajna razlika, ali u suprotnom pravcu – osobe koje su preležale COVID-19 imale su više vrednosti DPPH aktivnosti u poređenju sa COVID-19- ispitanicima ($p < 0,05$). Ovakav nalaz može ukazivati na postinfekcijsku kompenzaciju, kroz povećan antioksidativni odgovor u serumu prethodno inficiranih ispitanika.



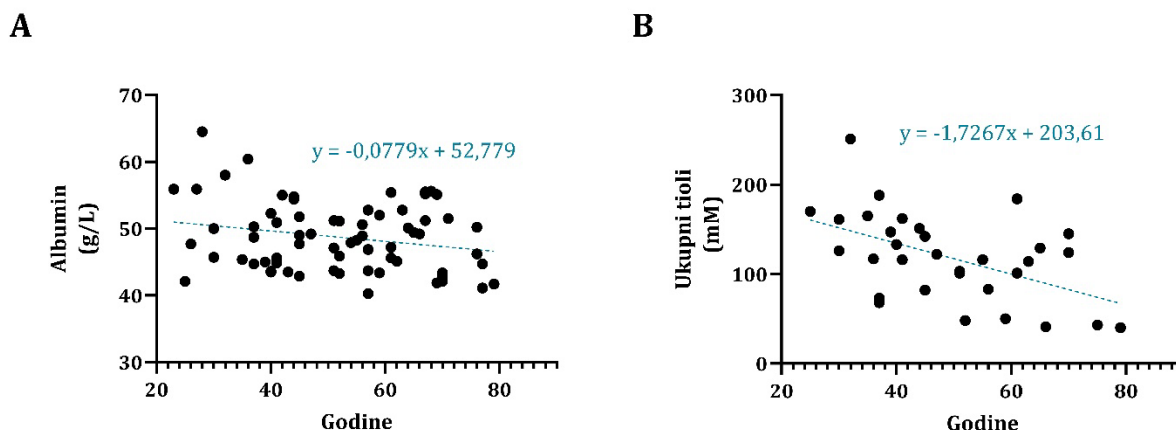
Slika 33. Uticaj prethodne SARS-CoV-2 infekcije na DPPH aktivnost kod ispitanika koji su primili tri doze vakcine. (A) ispitanici vakcinisani sa 3 × Sinopharm vakcinom, nakon treće doze; (B) ispitanici vakcinisani sa 3 × Pfizer-BioNTech vakcinom, pre treće doze. Statistički značajna razlika označena je sa * $p < 0,05$.

U cilju procene uticaja starosti, pola i preležane SARS-CoV-2 infekcije na redoks parametre u serumu ispitanika, urađena je višestruka linearna regresija, a statistički značajni rezultati uočeni su na nivou nitrita kod ispitanika koji su primili tri doze Sputnik V vakcine, kao i na nivou albumina i tiola kod ispitanika koji su primili heterolognu Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcinaciju. U grupi ispitanika koji su primili tri doze Sputnik V vakcine, pre primene treće doze starost ispitanika pokazala se kao značajan prediktor nivoa nitrita ($\beta = 1,098$; $p = 0,0042$), što ukazuje da sa porastom broja godina ispitanika dolazi do statistički značajnog povećanja sadržaja nitrita u serumu (Grafik 1).



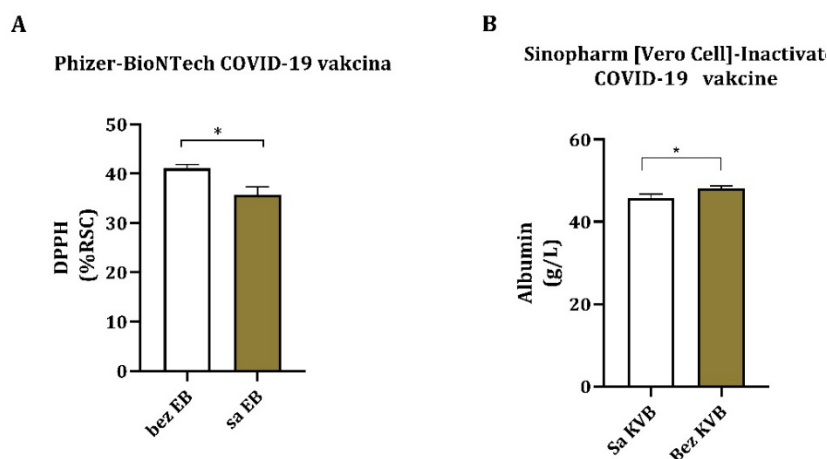
Grafik 1. Linearna regresiona analiza odnosa između starosti i koncentracije nitrita kod ispitanika vakcinisanih sa tri doze Sputnik V vakcine, pre treće doze.

U grupi ispitanika koji su primili heterolognu Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcinaciju, pre treće doze identifikovana je statistički značajna negativna povezanost između starosti i nivoa albumina ($\beta = -0,08166$; $p = 0,0496$), što ukazuje da stariji ispitanici imaju niže vrednosti serumskih albumina (Slika 34A). Nakon treće doze vakcine, značajna negativna korelacija uočena je između godina i nivoa serumskih tiola ($\beta = -1,832$; $p = 0,0023$), što ukazuje na pad ukupne antioksidativne zaštite sa starenjem u ovoj populaciji (Slika 34B).



Slika 34. Odnos između starosti i serumskog nivoa albumina (A) i tiola (B), kod ispitanika koji su primili heterolognu Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcinaciju

U skladu sa prethodnim nalazima o razlikama u redoks statusu, dodatno je ispitivan potencijalni uticaj komorbiditeta na varijacije u oksidativno-antioksidativnim parametrima među ispitanicima različitih vakcinalnih grupa. Kod ispitanika koji su primili tri doze Pfizer-BioNTech vakcine, prisustvo endokrinih bolesti bilo je povezano sa značajno izmenjenim vrednostima u DPPH testu (Slika 35A), pre treće doze vakcine ($p = 0,0258$). Slično tome, u grupi vakcinisanih sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, prisustvo kardiovaskularnih bolesti (KVB) bilo je statistički značajno povezano sa promenama u nivou albumina pre treće doze ($p = 0,0311$) (Slika 35B). Ostali komorbiditeti nisu pokazali statistički značajne razlike sa parametrima redoks homeostaze u serumu ispitanika.



Slika 35. Uticaj komorbiditeta na serumske redoks parametre pre treće doze COVID-19 vakcine. (A) ispitanici koji su primili tri doze Pfizer-BioNTech vakcine, poređenje DPPH vrednosti između osoba sa i bez endokrinih bolesti; (B) ispitanici koji su primili tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated vakcine, poređenje nivoa albumina između osoba sa i bez kardiovaskularnih bolesti. Statistički značajna razlika označena je sa * $p < 0,05$.

5.3. Imunski i redoks odgovor šest meseci nakon buster doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine

U okviru **druge faze** istraživanja, sprovedena je procena imunskog odgovora i parametara redoks statusa kod ispitanika koji su primili tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine. Analiza je obuhvatila određivanje nivoa ukupnih neutrališućih antitela, specifičnih anti-S1 IgG, anti-N IgG, anti-N IgM i anti-RBD IgM antitela, kao i koncentracije IFN- γ kao markera ćelijskog imunskog odgovora. Paralelno su ispitani i redoks parametri, uključujući ukupne proteine, tiolne grupe, nitrite, DPPH i FRAP vrednosti, kao i sadržaj albumine. Svi uzorci su uzeti šest meseci nakon primene treće (buster) doze vakcine, kako bi se procenila perzistencija imunskog odgovora i potencijalna povezanost sa oksidativnim stresom u kasnoj fazi postvakcinalne imunosti.

5.3.1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika

U drugoj fazi istraživanja u okviru ove disertacije, učestvovalo je ukupno 103 ispitanika koji su prethodno primili tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, a uzorkovanje je sprovedeno šest meseci nakon primanja treće (buster) doze. Od ukupnog broja, 75 ispitanika su bile žene, a 28 muškarci. Na osnovu anamnestičkih podataka i PCR nalaza, 43 ispitanika (41,7%) imalo je potvrđenu prethodnu infekciju SARS-CoV-2 virusom, pri čemu je infekcija kod 16 ispitanika zabeležena pre, a kod 27 ispitanika nakon buster doze.

Prisustvo jednog ili više komorbiditeta zabeleženo je kod značajnog broja ispitanika. Kardiovaskularne bolesti su bile najčešće (36 ispitanika), uključujući hipertenziju (32), miokarditis (1), perikarditis (1) i bolesti srčanih zalizaka (2). Endokrini poremećaji su registrovani kod 11 ispitanika, najčešće *diabetes melitus* (3), bolesti štitaste žlezde (2) i primarni poremećaji endokrinog sistema (6). Neurološki poremećaji su zabeleženi kod jednog ispitanika, dok je prisustvo alergijskih reakcija evidentirano kod 10 ljudi, a autoimunih bolesti kod 9. Bolesti jetre, bubrega i pluća nisu registrovane u ovoj grupi. Demografski i anamnestički podaci ispitanika prikazani su u Tabeli 12.

Tabela 12. Demografski i anamnestički podaci ispitanika uključenih u drugu fazu istraživanja

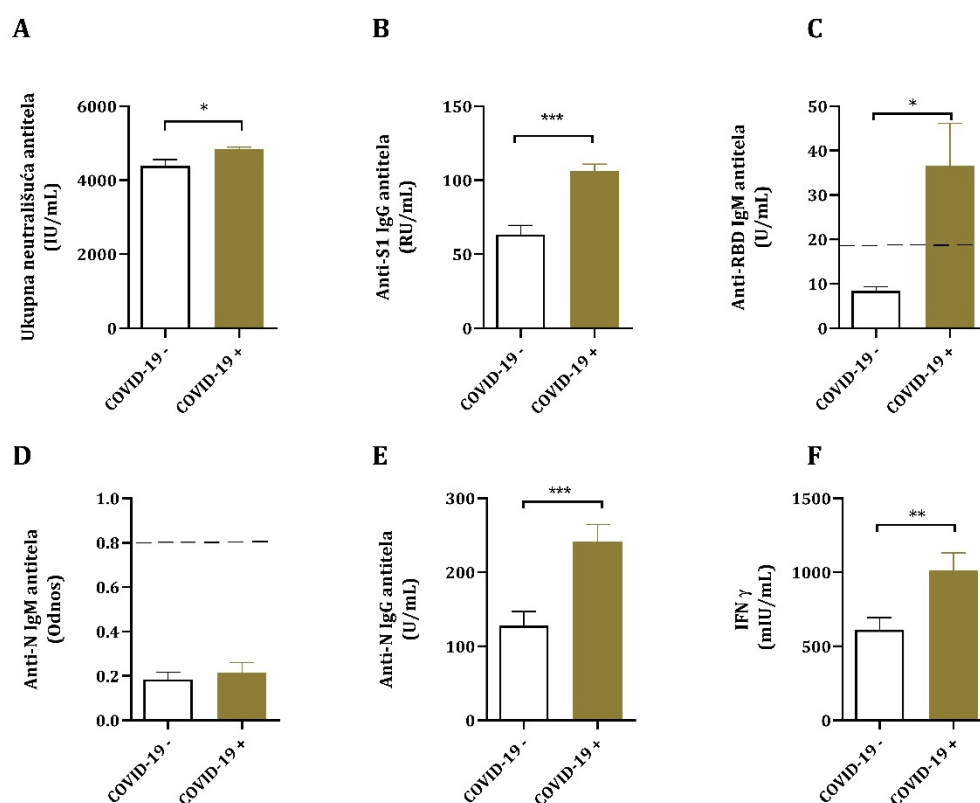
Broj ispitanika			
COVID-19 pozitivnost	Da	43	Pre III doze 16
	Ne	60	Posle III doze 27
Ukupan broj	103		
Pol	Ž	75	
	M	28	
Prisustvo kardiovaskularnih bolesti	Da	36	Hipertenzija (n=32) Miokarditis (n=1) Perikarditis (n=1) Bolesti srčanih zalizaka (n=2)
	Ne	67	
Neurološki poremećaji	Da	1	
	Ne	102	
Endokrini poremećaji	Da	11	Diabetes mellitus (n=3) Bolesti štitaste žlezde (n=7) Prolaktin (n=1)
	Ne	92	
Bolesti jetre	Da	2	
	No	101	

Bolesti bubrega	Da	1
	Ne	102
Bolesti pluća	Da	4
	Ne	99
Alergijske reakcije	Da	13
	Ne	99
Autoimune bolesti	Da	2
	Ne	101

5.3.2. Procena imunskog odgovora

5.3.2.1. Uticaj prethodne infekcije SARS-CoV-2 na imunski odgovor

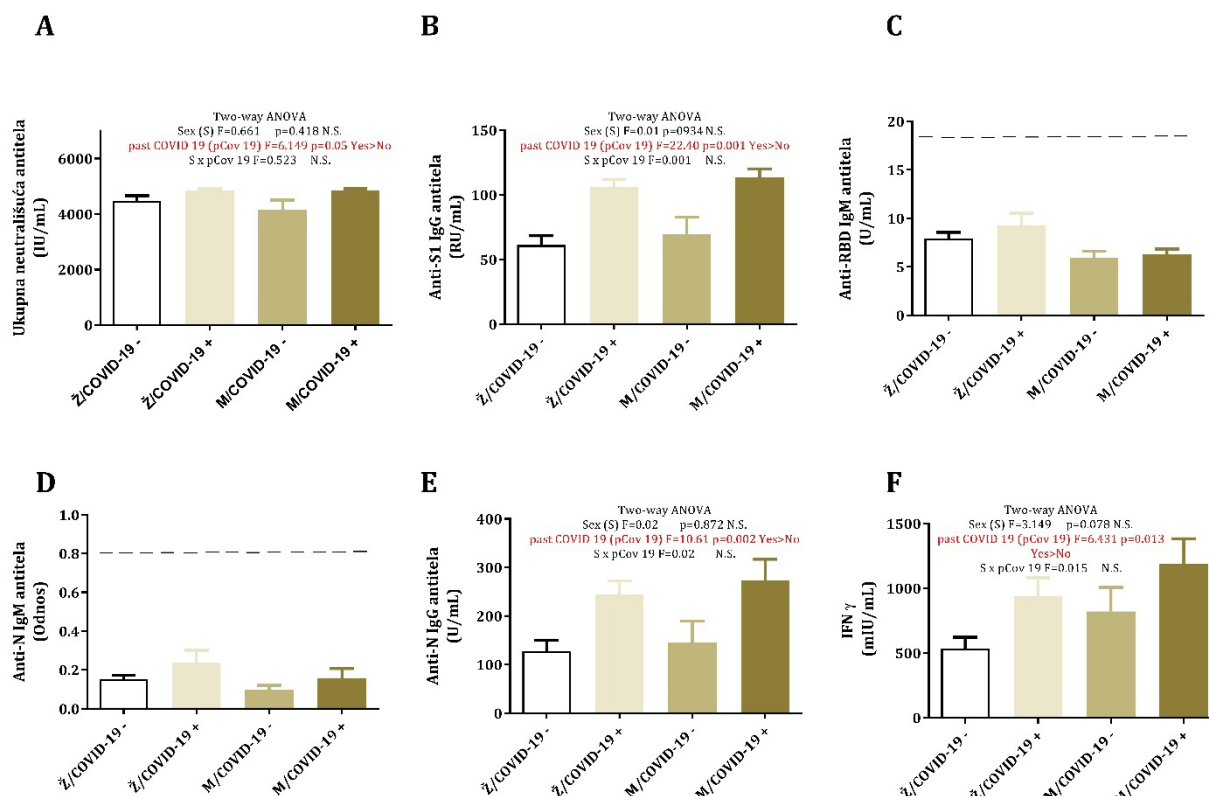
Kao što je prethodno navedeno, od ukupno 103 ispitanika, 43 (41,7%) imalo je potvrđenu prethodnu SARS-CoV-2 infekciju (COVID-19+ grupa), dok je 60 (58,3%) bilo bez dokaza o prethodnoj infekciji (COVID-19-). Uporedna analiza pokazala je da su nivoi ukupnih neutrališućih antitela, anti-S1 IgG i anti-N IgG antitela, kao i koncentracije IFN- γ , bili statistički značajno viši kod ispitanika koji su pre vakcinacije imali potvrđenu infekciju virusom SARS-CoV-2, u poređenju sa onima koji su primili tri doze vakcine, ali nisu imali prethodnu infekciju (Slika 36). Takođe, vrednosti anti-RBD IgM antitela u COVID-19+ grupi bile su statistički značajno više i prelazile prag pozitivnosti (>18 U/mL), dok su kod COVID-19- ispitanika ostajale ispod graničnih vrednosti, te su se smatrale negativnim.



Slika 36. Markeri humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora kod ispitanika **bez prethodne infekcije** (COVID-19-) i **sa prethodnom infekcijom** SARS-CoV-2 (COVID-19+) nakon vakcinacije sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine: (A) ukupna neutrališuća antitela, (B) anti-S1 IgG antitela, (C) anti-RBD IgM antitela, (D) anti-N IgM antitela, (E) anti-N IgG antitela i (F) IFN- γ . Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; vrednosti ispod linije označavaju negativne rezultate.

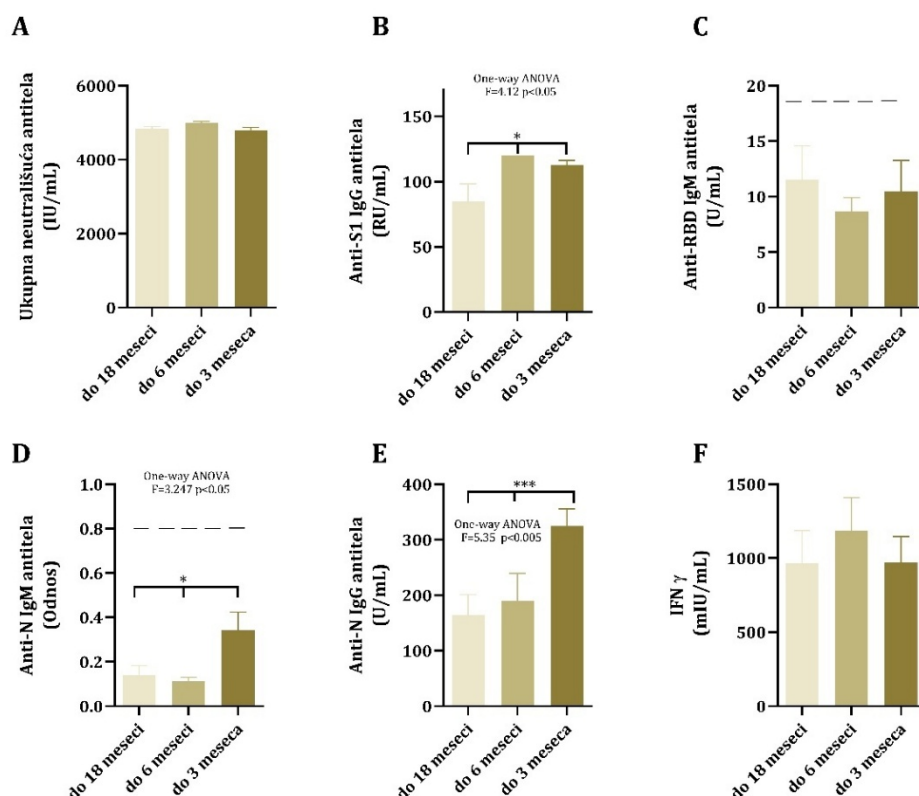
Kada su svi ispitanici dodatno podeljeni prema polu i prethodnoj infekciji virusom SARS-CoV-2, i kada je primenjena dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA), rezultati su pokazali da pol nije imao značajan uticaj na imunski odgovor. Nasuprot tome, kod COVID-19+

ispitanika uočene su povišene koncentracije IFN- γ , anti-N IgG i anti-S1 IgG antitela, što ukazuje na statistički značajan efekat prethodne infekcije na ove parametre imunskog odgovora organizma (Slika 37).



Slika 37. Markeri humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora nakon vakcinacije sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine u **zavisnosti od pola i COVID-19 statusa**: (A) ukupna neutrališuća antitela, (B) anti-S1 IgG antitela, (C) anti-RBD IgM antitela, (D) anti-N IgM antitela, (E) anti-N IgG antitela i (F) IFN- γ . Ž/COVID-19-: žene bez prethodne SARS-CoV-2 infekcije; Ž/COVID-19+: žene sa potvrđenom infekcijom; M/COVID-19-: muškarci bez prethodne infekcije; M/COVID-19+: muškarci sa potvrđenom virusnom infekcijom. N.S. – nije statistički značajno; vrednosti ispod linije označavaju negativne rezultate.

U cilju procene dinamike promena nivoa antitela tokom vremena, ispitanici su podeljeni u tri podgrupe na osnovu perioda koji je protekao od poslednje kliničke prezentacije simptoma COVID-19 do trenutka testiranja (do 3 meseca, od 3 do 6 meseci i do 18 meseci nakon infekcije). Rezultati su pokazali da ne dolazi do pada nivoa neutrališućih antitela i IFN- γ u periodu od 3, 6 i 18 meseci nakon preležane virusne infekcije. Međutim, zabeležen je statistički značajan pad koncentracije anti-S1 IgG antitela šest meseci nakon infekcije, kao i pad nivoa anti-N IgG antitela 18 meseci nakon infekcije. Statistički značajna razlika utvrđena je i za nivoe anti-N IgM antitela, iako su njihove vrednosti ostale ispod granične vrednosti za pozitivnost (Slika 38).



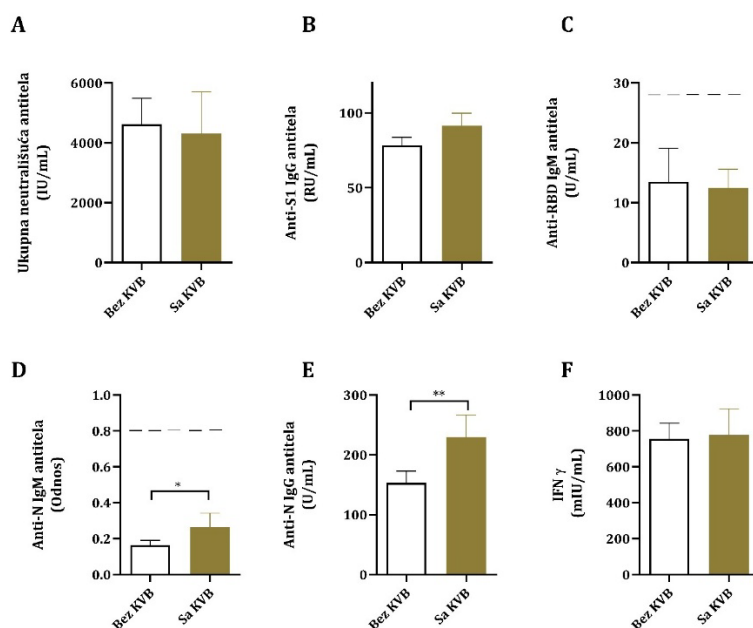
Slika 38. Markeri humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora nakon vakcinacije sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine u zavisnosti od vremena proteklog od poslednje kliničke prezentacije simptoma COVID-19 do trenutka testiranja: (A) ukupna neutrališuća antitela, (B) anti-S1 IgG antitela, (C) anti-RBD IgM antitela, (D) anti-N IgM antitela, (E) anti-N IgG antitela i (F) IFN- γ . Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; vrednosti ispod linije označavaju negativne rezultate.

5.3.2.2. Uticaj demografskih karakteristika i komorbiditeta na imunski odgovor

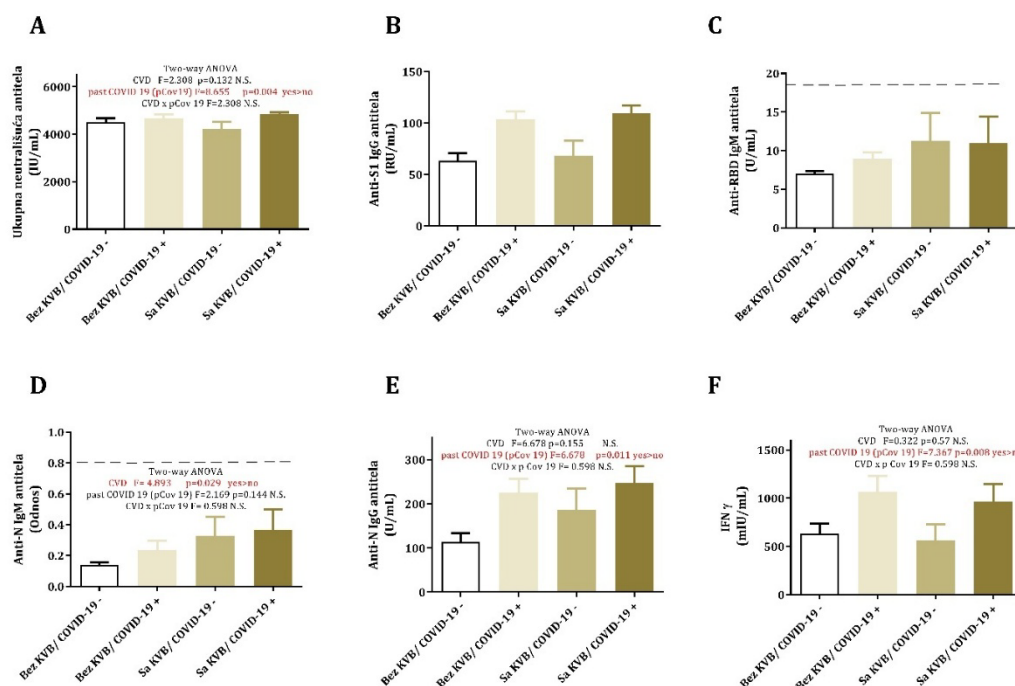
Rezultati ove analize su pokazali da starost ispitanika, pri čemu su oni bili podeljeni u desetogodišnje starosne kategorije (20–30, 30–40, 40–50 i 50–60 godina života), nije imala statistički značajan uticaj na analizirane imunološke parametre: nivo ukupnih neutrališućih anti-SARS-CoV-2 antitela ($F = 1,02$; $p > 0,05$), anti-S1 IgG antitela ($F = 0,21$; $p > 0,05$), anti-N IgG antitela ($F = 0,17$; $p > 0,05$), kao ni na ćelijski imunski odgovor, procenjen koncentracijom IFN- γ ($F = 1,03$; $p > 0,05$). Slično tome, niti pol nije pokazao statistički značajan uticaj na analizirane parametre. Poređenjem između muških i ženskih ispitanika nisu uočene značajne razlike u nivou ukupnih neutrališućih antitela ($F = 12,58$; $p > 0,05$), anti-N IgG antitela ($F = 1,029$; $p > 0,05$), anti-S1 IgG antitela ($F = 0,492$; $p > 0,05$), niti u nivou IFN- γ , kao pokazatelju ćelijskog imunskog odgovora ($F = 1,157$; $p > 0,05$).

Od ukupno 103 ispitanika uključenih u ovo istraživanje, 36 (35%) je, na osnovu anamnestičkih podataka, imalo dijagnostikovanu kardiovaskularnu bolest (KVB). Prilikom podele ispitanika na one sa i one bez KVB, statistička analiza je pokazala da su ispitanici sa kardiovaskularnim oboljenjima imali značajno povišene nivoe anti-N IgG antitela u poređenju sa ispitanicima bez ovih komorbiditeta (Slika 39).

Iako su vrednosti anti-N IgM antitela bile ispod praga za pozitivnost testa, kod ispitanika sa KVB zabeležene su statistički značajno više koncentracije anti-N IgM antitela (Slika 39). Zanimljivo je da su, nakon uključivanja COVID-19 statusa kao dodatnog parametra i sprovođenja dvofaktorske analize varijanse (two-way ANOVA), ispitanici sa KVB pokazali statistički značajno *povećanje* nivoa isključivo anti-N IgM antitela, nezavisno od toga da li su imali prethodnu SARS-CoV-2 infekciju (Slika 40).

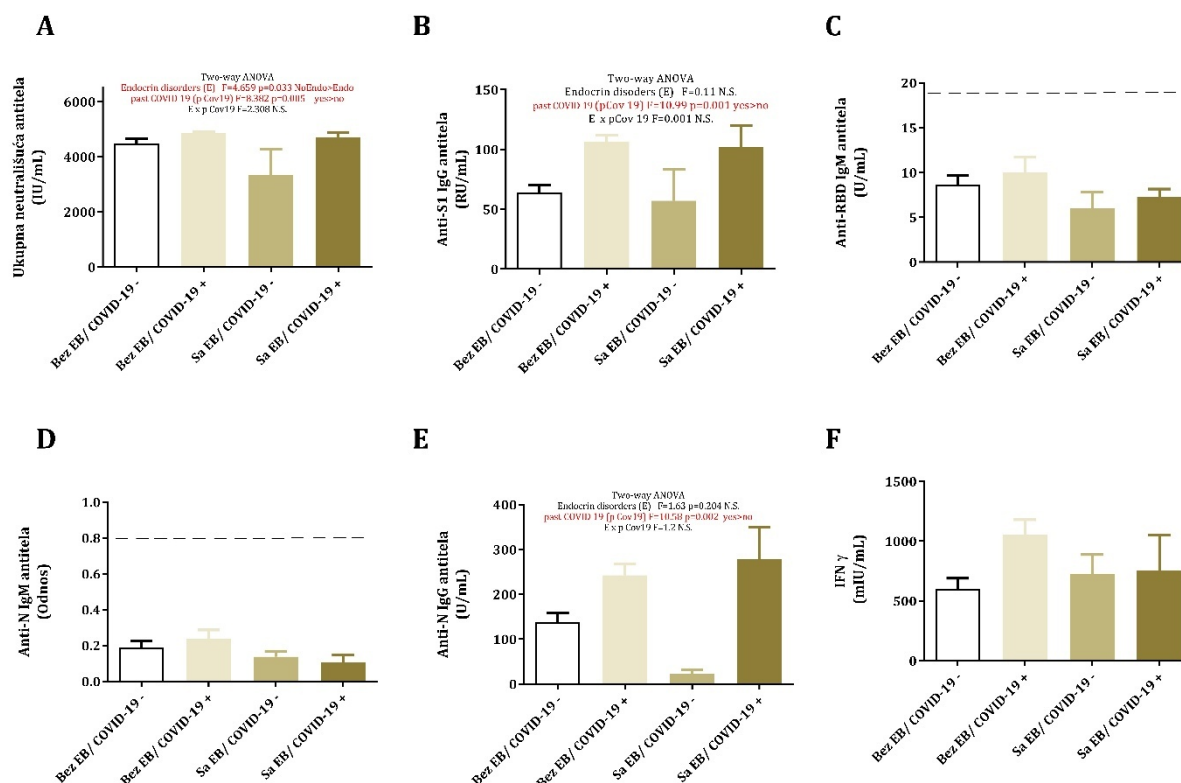


Slika 39. Markeri humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora nakon vakcinacije sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine u odnosu na prisustvo kardiovaskularnih bolesti: (A) ukupna neutrališuća antitela, (B) anti-S1 IgG antitela, (C) anti-RBD IgM antitela, (D) anti-N IgM antitela, (E) anti-N IgG antitela i (F) IFN- γ . **Bez KVB**: ispitanici bez kardiovaskularnih bolesti; **Sa KVB**: ispitanici sa prisutnim kardiovaskularnim bolestima. Vrednosti ispod linije označavaju negativne rezultate. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



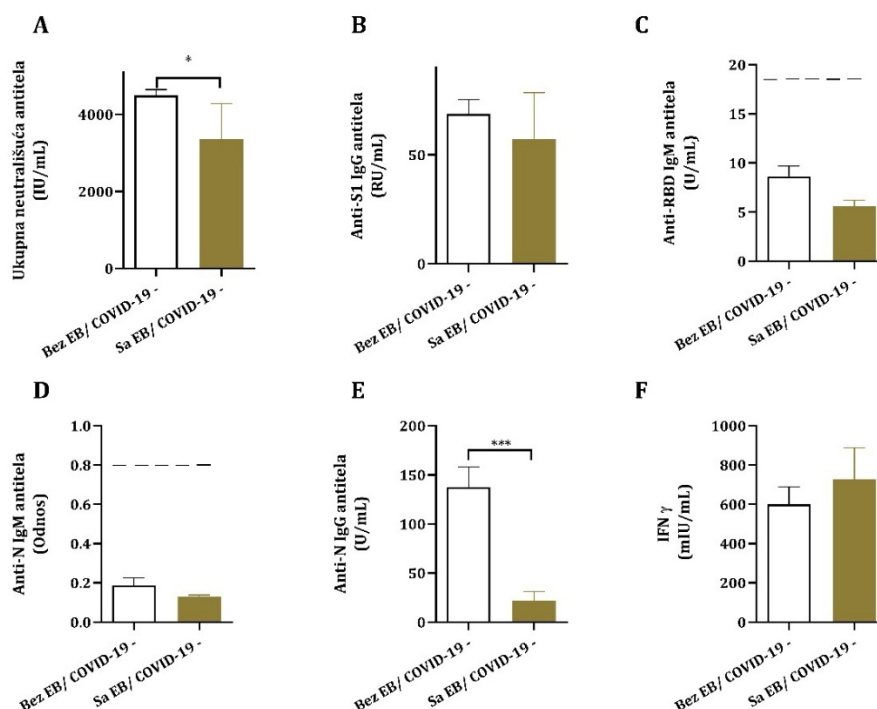
Slika 40. Markeri humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora nakon vakcinacije sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine u zavisnosti od prisustva kardiovaskularnih bolesti (KVB) i prethodne SARS-CoV-2 infekcije (COVID-19 status): (A) ukupna neutrališuća antitela, (B) anti-S1 IgG antitela, (C) anti-RBD IgM antitela, (D) anti-N IgM antitela, (E) anti-N IgG antitela i (F) IFN- γ . **Bez KVB/COVID-19-**: ispitanici bez kardiovaskularnih bolesti i bez prethodne COVID-19 infekcije; **Bez KVB/COVID-19+**: ispitanici bez kardiovaskularnih bolesti, ali sa prethodnom virusnom infekcijom; **Sa KVB/COVID-19-**: ispitanici sa kardiovaskularnim bolestima, bez prethodne infekcije; **Sa KVB/COVID-19+**: ispitanici sa kardiovaskularnim bolestima i prethodnom virusnom infekcijom. Vrednosti ispod linije označavaju negativne rezultate.

Prisustvo endokrinoloških poremećaja (EB) nije statistički značajno uticalo na analizirane parametre imunskog odgovora, uključujući serumske nivoe ukupnih neutrališućih anti-SARS-CoV-2 antitela ($F = 2,91$; $p > 0,05$), anti-S1 IgG antitela ($F = 1,33$; $p > 0,05$), anti-N IgG antitela ($F = 1,095$; $p > 0,05$), niti na ćelijski imunski odgovor meren sadržajem IFN- γ ($F = 2,069$; $p > 0,05$). Međutim, kada je u analizu dodat COVID-19 status kao drugi faktor (two-way ANOVA), rezultati su pokazali da endokrinološki poremećaji *umanjuju* porast nivoa ukupnih neutrališućih antitela kod vakcinisanih ispitanika bez prethodne SARS-CoV-2 infekcije (Slika 41).



Slika 41. Markeri humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora nakon vakcinacije sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine u zavisnosti od prisustva endokrinoloških poremećaja (EB) i prethodne SARS-CoV-2 infekcije: (A) ukupna neutrališuća antitela, (B) anti-S1 IgG antitela, (C) anti-RBD IgM antitela, (D) anti-N IgM antitela, (E) anti-N IgG antitela i (F) IFN- γ . Bez EB/COVID-19-: ispitanici bez endokrinoloških poremećaja i bez prethodne infekcije; Bez EB/COVID-19+: ispitanici bez endokrinoloških poremećaja, ali sa prethodnom infekcijom; Sa EB/COVID-19-: ispitanici sa endokrinološkim poremećajima koji nisu imali COVID-19; Sa EB/COVID-19+: ispitanici sa endokrinološkim poremećajima koji su preležali COVID-19. Vrednosti ispod linije označavaju negativne rezultate.

Rezultati su pokazali da prethodna infekcija SARS-CoV-2 virusom dovodi do porasta nivoa ukupnih neutrališućih antitela, anti-S1 IgG i anti-N IgG antitela (Slika 36). Kako prisustvo endokrinoloških poremećaja i prethodna infekcija nisu pokazali statistički značajan uticaj na humoralni ili ćelijski imunski odgovor ispitanika, izuzev u slučaju neutrališućih antitela, dalje je analizirana podgrupa ispitanika koji nisu imali COVID-19. Ova grupa je podeljena na ispitanike sa i bez endokrinoloških poremećaja. Statistička analiza (t-test) pokazala je da su nivoi neutrališućih antitela i anti-N IgG antitela bili značajno *niži* u grupi Bez EB/COVID-19-, što ukazuje da su ispitanici sa endokrinološkim poremećajima, koji su primili Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinu, a nisu imali prethodnu infekciju, ispoljili *slabiji* humoralni imunski odgovor u poređenju sa vakcinisanim ispitanicima bez endokrinoloških poremećaja (Slika 42).



Slika 42. Markeri humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora nakon vakcinacije sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine kod ispitanika sa prisutnim endokrinološkim poremećajima (EB) i bez prethodne COVID-19 infekcije: (A) ukupna neutrališuća antitela, (B) anti-S1 IgG antitela, (C) anti-RBD IgM antitela, (D) anti-N IgM antitela, (E) anti-N IgG antitela i (F) IFN- γ . Bez EB/COVID-19-: ispitanici bez endokrinoloških poremećaja i bez prethodne infekcije; Bez EB/COVID-19+: ispitanici bez endokrinoloških poremećaja, ali sa prethodnom infekcijom; Sa EB/COVID-19-: ispitanici sa endokrinološkim poremećajima koji nisu imali COVID-19; Sa EB/COVID-19+: ispitanici sa endokrinološkim poremećajima koji su preležali COVID-19. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; vrednosti ispod linije označavaju negativne rezultate.

Korelaciona analiza sprovedena na celokupnom uzorku pokazala je da kod vakcinisanih ispitanika postoje značajne pozitivne korelacije između markera humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora – ukupnih neutrališućih antitela, anti-S1 IgG, anti-N IgG antitela i IFN- γ . Ovi nalazi ukazuju na postojanje jedinstvenog, koordinisanog imunskog odgovora specifičnog za SARS-CoV-2 (Tabela 13).

Tabela 13. Korelaciona analiza između titra neutrališućih antitela, IFN- γ , anti-N IgG antitela (nukleokapsid), anti-RBD IgM antitela (receptor-vezujući domen), anti-N IgM antitela i anti-S1 IgG antitela (uključujući RBD), sprovedena na celokupnom uzorku. Crvenom bojom označene su statistički značajne korelacije između analiziranih parametara.

	Ukupna Neutrališuća antitela	Anti-S1 IgG antitela	Anti-RBD IgM antitela	Anti-N IgM antitela	Anti-N IgG antitela	IFN γ
Ukupna neutrališuća antitela						
anti-S1 IgG antitela	0,400 ***					
anti-RBD IgM antitela	0,0525	0,0923				
anti-N IgM antitela	0,078	0,0002	0,098			
anti-N IgG antitela	0,240 ***	0,666 ***	-0,099	-0,039		
IFN γ	0,142	0,392 ***	0,196	0,0923	0,336 ***	

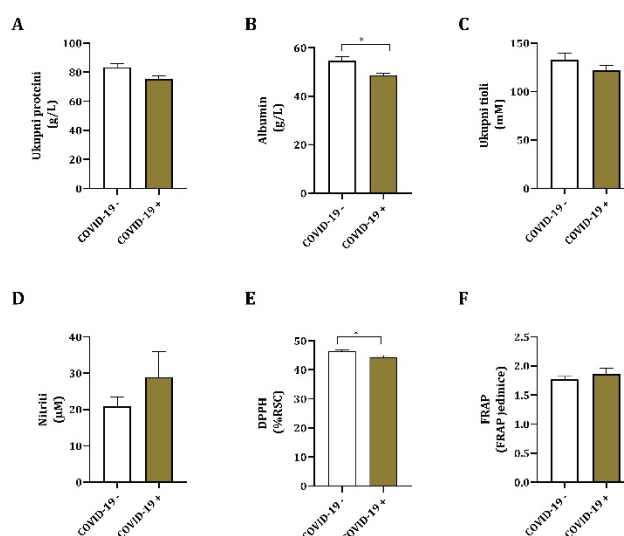
*** $p < 0,05$.

5.3.3. Procena redoks statusa

5.3.3.1. Uticaj prethodne infekcije SARS-CoV-2 na redoks parametre

Šest meseci nakon primene treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, sprovedena je analiza redoks parametara kod ispitanika koji su primili sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, sa podelom na grupe prema prethodnom COVID-19 statusu (COVID-19+ i COVID-19-). S obzirom da ovi podaci nisu bili normalno raspodeljeni, za poređenje grupa iskorišćen je Mann-Whitney U test.

Uočena je statistički značajna razlika u vrednostima DPPH i koncentraciji albumina kod ispitanika, pri čemu su ispitanici sa prethodnom istorijom COVID-19 infekcije (COVID-19+ ispitanici) imali značajno *niže* nivoe albumina i smanjenu antioksidativnu aktivnost (niže DPPH vrednosti) u poređenju sa osobama koje nisu preležale infekciju (Slika 43).



Slika 43. Poređenje redoks parametara između ispitanika koji nisu preležali COVID-19 infekciju (COVID-19-) i onih sa prethodnom infekcijom (COVID-19+), šest meseci nakon treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated vakcine: (A) Ukupni proteini, (B) Albumin, (C) Ukupni tioli, (D) Nitriti, (E) FRAP, (F) DPPH. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0,05$.

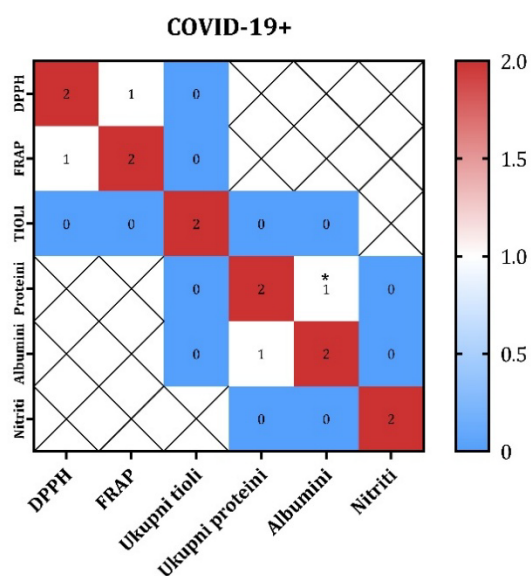
Kako bi se bolje razumela međuzavisnost između različitih serumskih redoks parametara u kontekstu prethodne SARS-CoV-2 infekcije, sprovedena je korelaciona analiza u okviru zasebnih grupa ispitanika: onih koji su preležali COVID-19 infekciju (COVID-19+) i onih bez dokaza o prethodnoj infekciji (COVID-19-). Cilj ove analize bio je da se identifikuju moguće unutrašnje veze između biohemijskih markera oksidativnog statusa, te uoče eventualne razlike u obrascima povezanosti između grupa sa i bez postinfekcijskog imenskog opterećenja.

Rezultati korelacione analize (Tabela 14) su pokazali da, u COVID-19+ grupi, postoji statistički značajna pozitivna korelacija između ukupnih proteina i albumina ($r = 0,439$; $p = 0,036$), što ukazuje na njihovu povezanost u postakutnoj fazi bolesti. Korelacija između sadržaja nitrita i proteina bila je negativna, ali nije dostigla statističku značajnost ($r = -0,173$; $p = 0,440$). Takođe, u ovoj grupi nije utvrđena značajna korelacija između antioksidativnih parametara (DPPH i FRAP vrednosti) i nivoa tiola. U COVID-19- grupi je uočena snažna i statistički visoko značajna korelacija između ukupnih proteina i albumina ($r = 0,743$; $p = 1,6 \times 10^{-11}$), što ukazuje na stabilnu homeostazu proteina u odsustvu prethodne infekcije. Slično kao u COVID-19+ grupi, negativna korelacija između sadržaja nitrita i proteina ($r = -0,193$; $p = 0,148$) nije bila značajna, dok su DPPH i FRAP vrednosti pokazale blago pozitivnu korelacije ($r = 0,243$), ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$).

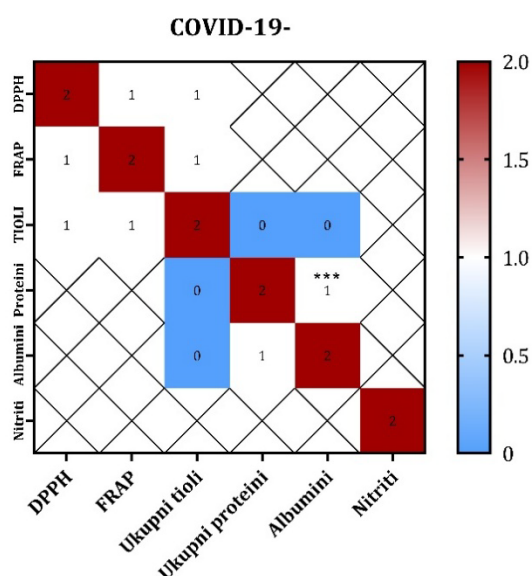
Tabela 14. Koeficijenti korelacije (r) i p vrednosti za međuzavisnost redoks parametara u odnosu na prethodni COVID-19 status (COVID-19+ i COVID-19-). Crvenom bojom su označeni statistički značajni rezultati.

COVID+ ispitanici								
r	DPPH	FRAP	TIOLI		p	DPPH	FRAP	TIOLI
DPPH	1	0,113	-0,140		DPPH	0	0,609	0,545
FRAP	0,113	1	-0,180		FRAP	0,609	0	0,435
TIOLI	-0,140	-0,180	1		TIOLI	0,545	0,435	0
r	Proteini	Albumin	Nitriti		p	Proteini	Albumin	Nitriti
Proteini	1	0,439	-0,173		Proteini	0	0,036	0,440
Albumin	0,439	1	-0,303		Albumin	0,036	0	0,170
Nitriti	-0,173	-0,303	1		Nitriti	0,440	0,170	0
COVID– ispitanici								
r	DPPH	FRAP	TIOLI		p	DPPH	FRAP	TIOLI
DPPH	1	0,243	0,072		DPPH	0	0,064	0,593
FRAP	0,243	1	0,087		FRAP	0,064	0	0,518
TIOLI	0,072	0,087	1		TIOLI	0,593	0,518	0
r	Proteini	Albumin	Nitriti		p	Proteini	Albumin	Nitriti
Proteini	1	0,743	-0,193		Proteini	0	1,6 x 10 ⁻¹¹	0,148
Albumin	0,743	1	-0,047		Albumin	1,6 x 10 ⁻¹¹	0	0,729
Nitriti	-0,193	-0,047	1		Nitriti	0,148	0,729	0

A



B



Slika 44. Vizuelni prikaz korelacija između redoks parametara kod ispitanika šest meseci nakon treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine. A) COVID-19+ grupa (osobe koje su preležale infekciju); B) COVID-19- grupa (osobe bez prethodne infekcije). Vrednosti u matrici predstavljaju relativnu jačinu korelacija između parametara (DPPH, FRAP, tioli, ukupni proteini, albumini i nitriti). Jačina korelacije označena je skalom boja, pri čemu su crvene nijanse indikator pozitivne, a plave negativne korelacije. Statistički značajne korelacije označene su sa * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$.

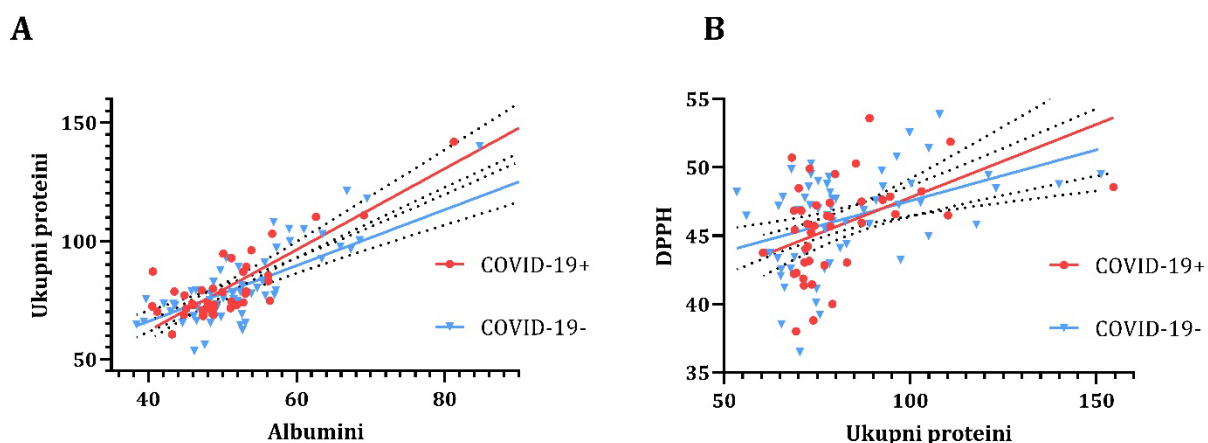
Korelaciona analiza je pokazala da najizraženija i statistički značajna veza postoji između ukupnih proteina i albumina, sa znatno jačom korelacijom u COVID-19- grupi ($r =$

0,743; $p < 0,0001$) u poređenju sa COVID-19+ ispitanicima ($r = 0,439$; $p = 0,036$). Ova razlika je vizuelno prikazana na slici 44, gde su uočljive *jače* nijanse crvene boje u donjem levom kvadrantu heat mape za COVID-19- grupu (B). Nitriti su pokazali tendenciju negativne korelacije sa ukupnim proteinima u obe grupe, ali bez statističke značajnosti, prikazano svetloplavim kvadratima u odgovarajućim segmentima heat mape (Slika 44, A i B pozicija: nitriti–proteini). Pored toga, antioksidativni parametri DPPH i FRAP nisu pokazali značajnu međusobnu povezanost sa koncentracijom tiola, što može ukazati na nezavisne mehanizme oksidativnog stresa u odnosu na tiolne grupe. Odsustvo značajne korelacije između ovih parametara jasno je vidljivo kroz bele i svetloplave kvadrate na dijagonalama koje uključuju tiolne vrednosti u oba panela heat mape.

5.3.3.2. Rezultati višestruke regresione analize

Višestruka regresiona analiza je pokazala da su godine statistički značajan *negativan* prediktor nivoa DPPH vrednosti ($\beta = -0,091$; $p = 0,017$), pri čemu stariji ispitanici imaju niži antioksidativni kapacitet, što ukazuje na postepeno slabljenje antioksidativne zaštite sa starenjem. Takođe, utvrđena je pozitivna povezanost ukupnih proteina sa DPPH vrednostima ($\beta = 0,119$; $p = 0,002$), što sugerise da osobe sa višim proteinskim statusom imaju izraženiji antioksidativni kapacitet.

Kao najjači prediktor nivoa ukupnih proteina identifikovani su serumski albumini, sa vrlo izraženom *pozitivnom* korelacijom ($\beta = 1,163$; $p < 0,0001$), što potvrđuje direktnu vezu između proteinskog statusa i koncentracije albumina u serumu (Slika 45A). Antioksidativni kapacitet, meren DPPH metodom, takođe je značajan pozitivan prediktor ukupnih proteina ($\beta = 1,015$; $p = 0,002$), što dodatno naglašava vezu između redoks balansa i nutritivnog/proteinskog statusa (Slika 45B). Nasuprot tome, tioli su pokazali *negativnu* povezanost sa ukupnim proteinima ($\beta = -0,042$; $p = 0,018$), ukazujući na postojanje različitih regulatornih mehanizama između tiolne antioksidativne zaštite i proteinskog profila u serumu ispitanika.

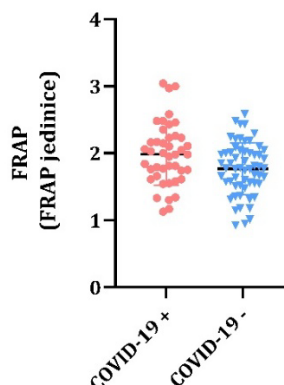


Slika 45. Scatter plot prikaz međuzavisnosti ukupnih proteina sa albuminima (A) i antioksidativnim kapacitetom (DPPH test) (B), sa odvojenim regresionim linijama za ispitanike sa prethodnom COVID-19 infekcijom (COVID-19+, crvena linija) i bez nje (COVID-19-, plava linija).

Rezultati su pokazali i da su godine života značajan *negativan* prediktor nivoa tiola ($\beta = -2,115$; $p = 0,003$), pri čemu se starijim ispitanicima registruju niže vrednosti tiola, ukazujući na slabljenje tiolne komponente antioksidativne zaštite tokom starenja. Takođe, utvrđena je negativna povezanost ukupnih proteina sa tiolima ($\beta = -1,717$; $p = 0,018$), dok su albumini pokazali pozitivnu povezanost sa nivoom tiola ($\beta = 2,010$; $p = 0,049$), što sugerise da viši nivo albumina doprinosi očuvanju tiolne ravnoteže, kroz stabilizaciju redoks statusa.

Prisustvo preležanog COVID-19 identifikovano je kao statistički značajan prediktor FRAP vrednosti ($\beta = -21,250$; $p = 0,015$), pri čemu osobe koje nisu preležale infekciju imaju niže

FRAP vrednosti u poređenju sa COVID-19+ ispitanicima (Slika 46). Ova razlika ukazuje da COVID-19+ ispitanici poseduju viši antioksidativni kapacitet, što može biti rezultat dugoročnih adaptivnih promena u redoks ravnoteži nakon virusne infekcije. Analizom je utvrđeno da je preležani COVID-19 značajan negativan prediktor anti-S1 IgG antitela ($\beta = -21,25$; $p = 0,0148$), što ukazuje da COVID-19- osobe imaju značajno *niži* nivo anti-S1 IgG antitela u odnosu na COVID-19+ populaciju.



Slika 46. Povezanost COVID-19 statusa i FRAP vrednosti (korelaciona analiza)

Među ostalim značajnim prediktorima, anti-N IgG antitela pokazuju jaku pozitivnu povezanost sa anti-S1 IgG antitelima ($\beta = 0,140$; $p < 0,0001$), što je u skladu sa ulogom oba parametra u humoralnom imunskom odgovoru organizma. Takođe, ukupna neutrališuća antitela su se pokazala kao značajan pozitivan prediktor ($\beta = 0,010$; $p = 0,003$), čime se ističe značaj neutralizacije virusa kao dela efikasnog imunskog odgovora. Konačno, albumini su pokazali pozitivnu povezanost sa anti-S1 IgG antitelima ($\beta = 1,457$; $p = 0,0073$), što ukazuje na povezanost nutritivnog/proteinskog statusa sa intenzitetom imunološke reakcije.

5.3.3.3. Uticaj demografskih karakteristika i komorbiditeta na redoks parametre

Na osnovu sprovedene korelacione analize između godina starosti i redoks parametara, statistički značajna povezanost utvrđena je isključivo u grupi ispitanika koji *nisu* preležali COVID-19. U toj grupi, zabeležena je slaba, ali statistički značajna negativna korelacija između godina starosti i koncentracije ukupnih tiola ($r = -0,260$; $p = 0,048$). Ovaj nalaz ukazuje da se sa porastom starosti blago smanjuje nivo tiolnih jedinjenja, što može reflektovati postepeni pad antioksidativne zaštite u zdravoj populaciji. U grupi osoba koje su preležale COVID-19 infekciju, nije uočena značajna korelacija između starosti i bilo kog od redoks parametara.

Ovaj nalaz dodatno je potvrđen analizom višestruke regresije, u kojoj je DPPH vrednost postavljena kao zavisna promenljiva. Među analiziranim prediktorima, godine starosti su se pokazale kao statistički značajan negativan prediktor DPPH vrednosti ($\beta = -0,091$; $p = 0,017$), što potvrđuje da sa porastom starosti dolazi do smanjenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta u serumu ispitanika. Pored toga, ukupni proteini su identifikovani kao snažan pozitivan prediktor DPPH vrednosti ($\beta = 0,119$; $p = 0,002$), što sugeriše da je viši nivo proteina povezan sa izraženijim antioksidativnim odgovorom. Zajedno, ovi nalazi ukazuju da i starosna dob i proteinski status značajno utiču na redoks homeostazu, što može imati klinički značaj u kontekstu imunskog statusa i oporavka nakon COVID-19 infekcije.

S obzirom da hronične nezarazne bolesti mogu značajno uticati na oksidativno-antioksidativnu ravnotežu organizma, izvršena je analiza uticaja komorbiditeta na redoks parametre. Cilj ove analize bio je da se identifikuje da li prisustvo komorbiditeta (npr. KVB, bolesti pluća, bubrega i centralnog nervnog sistema (CNS)) utiču na serumske nivoe proteina, albumina, tiola, nitrita, kao i na antioksidativni kapacitet meren DPPH i FRAP metodama.

Tabela 15. Uticaj komorbiditeta na redoks parametre kod ispitanika šest meseci nakon treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine. Prikazani su statistički značajni odnosi između prisustva komorbiditeta i nivoa ukupnih proteina, albumina, tiola, nitrita, kao i antioksidativnih parametara (DPPH i FRAP) u serumu. Statistička značajnost je označena odgovarajućim p vrednostima.

Parametar	Komorbiditet i statistička značajnost		
Proteini	KVB ($\beta = 10,33$; $p = 0,016$)*		
Albumin	Bolesti pluća ($\beta = -21,94$; $p = 0,004$)**		
DPPH	KVB ($\beta = 1,842$; $p = 0,016$)*	Bubrezi ($\beta = -6,959$, $p = 0,048$)*	Onkološke promene ($\beta = -14,49$; $p = 0,023$)*
FRAP	CNS ($\beta = -1,186$; $p = 0,008$)**		
Nitriti	KVB ($\beta = -10,73$; $p = 0,049$)*		

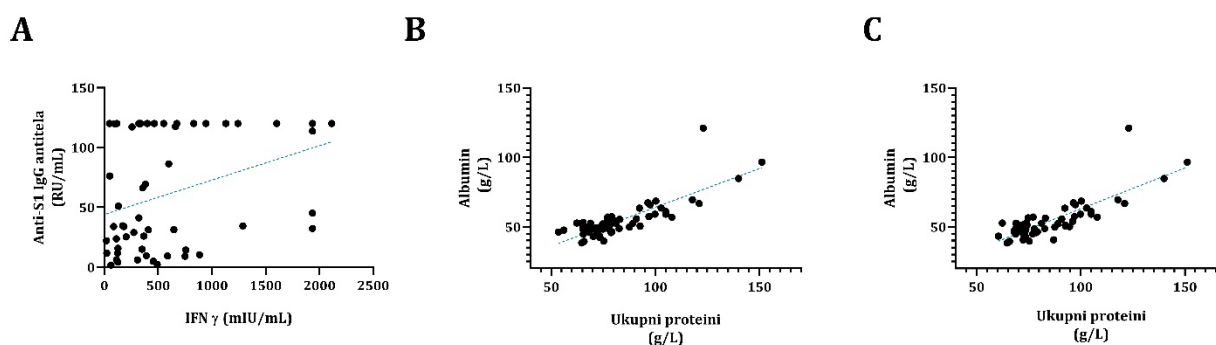
*KVS – kardiovaskularne bolesti

Rezultati prikazani u Tabeli 15 pokazuju da s KVB statistički značajno povezane sa smanjenjem nivoa ukupnih proteina ($p = 0,016$), smanjenim DPPH vrednostima ($p = 0,016$), kao i povišenim koncentracijama nitrita ($p = 0,049$). Ovi nalazi ukazuju na izražen oksidativni stres kod osoba sa KVB, verovatno kao posledicu hronične inflamacije i disfunkcije endotelne regulacije. Plućne bolesti su bile u značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom albumina ($p = 0,004$), što može reflektovati prisustvo hronične upale, malnutricije, ili pojačanog katabolizma proteina kod ovih pacijenata. Smanjene vrednosti DPPH zabeležene su i kod osoba sa bubrežnim oboljenjima ($p = 0,048$), kao i kod onkoloških pacijenata ($p = 0,023$), što sugerise da je antioksidativni kapacitet posebno kompromitovan kod ovih grupa, verovatno usled pojačanog oksidativnog stresa izazvanog hroničnim oboljenjem, terapijom ili tumorskim metabolizmom. Nasuprot tome, tioli nisu pokazali statistički značajnu povezanost niti sa jednim analiziranim komorbiditetom, što ukazuje na njihovu relativnu stabilnost, ili da su oni manje podložni uticaju hroničnih bolesti u posmatranom periodu. Ovi nalazi ukazuju da komorbiditeti, posebno kardiovaskularna, plućna, bubrežna i onkološka oboljenja, mogu značajno modifikovati oksidativni status ispitanika, što može imati kliničke implikacije u kontekstu imuniteta, oporavka i odgovora na vakcinaciju.

5.3.4. Korelaciona analiza redoks parametara i markera imunskog odgovora

Na osnovu rezultata korelacione analize između redoks parametara i markera humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora, uočene su određene povezanosti koje ukazuju na razlike između osoba koje su preležale COVID-19 (COVID-19+) i onih koje nisu (COVID-19-).

U COVID-19- grupi, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između IFN- γ i anti-S1 IgG antitela ($r = 0,334$; $p = 0,013$) (Slika 47A), kao i između nitrita i IFN- γ ($r = 0,313$; $p = 0,022$), što ukazuje na funkcionalnu povezanost redoks i ćelijskog imunskog odgovora. Takođe, nitriti su pokazali negativnu korelaciju sa anti-N IgM antitelima ($r = -0,092$), ali bez statističkog značaja ($p > 0,05$). U ovoj grupi uočena je i pozitivna korelacija između sadržaja tiola i IFN- γ ($r = 0,235$; $p = 0,090$), ali ona nije dostigla nivo statističke značajnosti. Takođe, FRAP i IFN- γ pokazuju blagu negativnu korelaciju ($r = -0,088$), ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$). U grupi COVID-19- ispitanika, uočene su i negativne korelacije rezultata DPPH testa sa IFN- γ vrednostima ($r = -0,217$), anti-S1 IgG antitelima ($r = -0,184$) i anti-N IgM antitelima ($r = -0,239$), što ukazuje na inverzan odnos između antioksidativne aktivnosti slobodnih radikala i aktivacije imunskog sistema. Međutim, ove korelacije nisu dostigle statističku značajnost ($p > 0,05$).



Slika 47. Korelaciona analiza redoks parametara i markera imunskog odgovora nakon treće (buster) doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine: (A) Korelacija između koncentracije IFN- γ i nivoa anti-S1 IgG antitela; (B) Korelacija između koncentracije ukupnih proteina i albumina kod COVID-19- ispitanika; (C) Korelacija između ukupnih proteina i albumina kod COVID-19+ ispitanika.

U COVID-19+ grupi, uočena je pozitivna korelacija između proteina i albumina u serumu ($r = 0,439$; $p = 0,03$), mada slabija u poređenju sa COVID-19- grupom ($r = 0,743$; $p = 1,6 \times 10^{-11}$) (Slika 47B-C). Iako se očekivala značajna povezanost između antioksidativnih markera DPPH i FRAP, u ovoj grupi ta korelacija nije bila statistički značajna ($r = 0,113$; $p > 0,05$). Kao i kod COVID-19- ispitanika, uočena je negativna korelacija između FRAP vrednosti i IFN- γ ($r = -0,33$; $p > 0,05$), što ukazuje na uticaj oksidativnog stresa na ćelijski imunski odgovor, iako oba statistički nisu potvrđena. Zanimljivo je da je DPPH test pokazao različite obrasce korelacija u zavisnosti od COVID statusa ispitanika. U COVID-19- grupi, DPPH je bio u negativnoj korelaciji sa IFN- γ , anti-S1 IgG antitelima i anti-N IgM antitelima (redom, r vrednosti od $-0,217$, $-0,184$ i $-0,239$), dok su u COVID-19+ grupi uočene pozitivne korelacije sa IFN- γ i anti-N IgM antitelima ($r = 0,267$; $r = 0,268$), a negativna samo sa anti-S1 IgG antitelima ($r = -0,259$). Iako ove korelacije nisu dostigle statističku značajnost ($p > 0,05$), divergentni obrasci ukazuju na moguću imunološko-redoks dinamiku specifičnu za prethodnu infekciju.

Uporedna analiza između grupa pokazala je da su proteini i albumini snažnije povezani u COVID-19- grupi, što ukazuje na stabilniji metabolički status kod ovih osoba. Korelacija između proteina i anti-S1 IgG antitela postaje negativnija u COVID-19+ grupi, što moguće odražava disbalans imunskog odgovora nakon infekcije. Takođe, veza između DPPH vrednosti i tiola slabi kod COVID-19+ ispitanika ($r = -0,140$; $p > 0,05$) u odnosu na COVID-19- ispitanike ($r = 0,072$; $p > 0,5$). Korelacija između nivoa nitrita i anti-S1 IgG antitela bila je slaba i bez statističke značajnosti u obe grupe: COVID-19- ($r = 0,046$; $p = 0,731$) i COVID-19+ ($r = -0,054$; $p = 0,810$), što ukazuje na odsustvo funkcionalne povezanosti između ovog redoks parametra i humoralnog imunskog odgovora organizma. S druge strane, blago negativna korelacija između DPPH i anti-S1 IgG antitela u obe grupe sugerše da je antioksidativni status u određenoj meri povezan sa postinfektivnim IgG odgovorom.

Ove korelacije ističu složen odnos između oksidativnog stresa i imunskog odgovora, te ukazuju na potrebu za daljim istraživanjima kako bi se razumela dugoročna posledica SARS-CoV-2 infekcije na redoks i imunski status organizma čoveka.

6. DISKUSIJA

Ova doktorska disertacija imala je za cilj da proceni trajanje i kvalitet postvakcinalnog imunskog odgovora, kao i promene u redoks statusu, u serumu osoba koje su primile treću (buster) dozu vakcine protiv COVID-19. Istraživanje je sprovedeno u dva segmenta: u prvom delu analizirana je dinamika humoralnog imunskog odgovora, kao i promene redoks parametara, pre i nakon aplikacije buster doze različitih tipova vakcina (Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated vakcine, Pfizer-BioNTech vakcine, Sputnik V vakcine i heterolognih kombinacija ovih vakcina), dok je u drugom delu, šest meseci nakon treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, istovremeno procenjen humoralni, ćelijski i redoks odgovor u serumu ispitanika.

Pri tumačenju dobijenih rezultata, neophodno je uzeti u obzir brojne faktore koji mogu uticati na efikasnost vakcinacije. Efikasnost vakcine zavisi od složenog međudejstva karakteristika domaćina (poput starosti, prisustva komorbiditeta i prethodne infekcije), osobina patogena (npr. prisustva novih varijanti), kao i karakteristika same vakcine – njenog tipa i vremena proteklog od primene [223–225]. Vakcinacija protiv COVID-19 u Republici Srbiji započela je u januaru 2021. godine. S obzirom na dostupnost različitih vakcina i slobodu izbora ljudi u odabiru vakcina koju će primiti, značajan deo stanovništva primio je različite kombinacije vakcina, što je direktno uticalo na izbor ispitanika uključenih u ovu studiju. Ispitanici obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom primili su Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19, Pfizer-BioNTech, ili Sputnik V vakcinu, pri čemu su sve one bile razvijene od originalnog (Wuhan) soja SARS-CoV-2 virusa.

Upravo sloboda izbora vakcine predstavlja jedan od razloga zašto je drugi deo ove disertacije, koji se odnosi na analizu imunskog i redoks odgovora organizma šest meseci nakon treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, sproveden na ograničenom broju ispitanika (n=103). Ograničen uzorak posledica je više faktora, od kojih se dva izdvajaju kao ključna: prvo, mogućnost izbora buster vakcine rezultirala je time da su mnogi ispitanici, koji su prethodno primili dve doze inaktivisane Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, odlučili da kao treću dozu prime iRNK vakcinu (zbog izostanka detektabilnih nivoa neutrališućih antitela neposredno pre buster doze). Drugo, značajan broj ljudi uopšte nije primio treću dozu COVID-19 vakcine, jer su verovali da ne pripadaju rizičnim grupama, ili su smatrali da su sa prethodnim dozama stekli dovoljan stepen zaštite.

Genomska analiza virusa SARS-CoV-2, sprovedena tehnikom sekvenciranja u Republici Srbiji u periodu od marta 2020. do januara 2023. godine, identifikovala je tri epidemiološka talasa sa različitim dominantnim varijantama virusa. Ove varijante pripadale su VOC grupi, uključujući Alfa, Delta i Omikron soj, koje su se sukcesivno smenjivale u populaciji. Prvi talas karakterisala je dominacija Alfa varijante (B.1.1.7), u periodu od kraja decembra 2020. do avgusta 2021. godine, pri čemu je maksimalna učestalost ove varijante virusa zabeležena u aprilu 2021. godine (100% analiziranih sekvenci). Delta varijanta (AY.122) dominirala je od juna do decembra 2021, dok je od kraja decembra 2021. do januara 2023. godine bila najzastupljenija Omikron varijanta (BA.1.1) [226,227].

Ovakvi podaci omogućili su povezivanje vremena infekcije kod ispitanika sa specifičnim varijantama virusa. Na osnovu PCR nalaza na prisustvo SARS-CoV-2 virusa, ispitanici su podeljeni u dve grupe: oni koji su infekciju preležali pre primene treće doze i oni koji su oboleli nakon treće doze vakcine, što je omogućilo precizniju analizu imunskog odgovora u zavisnosti od hronologije infekcije. Svi sa pozitivnim PCR nalazima pre buster doze bili su zaraženi Alfa varijantom virusa, dok su se svi ispitanici koji su se razboleli nakon vakcinacije inficirali u periodu dominacije Delta i Omikron varijanti (Tabela 9). U okviru podgrupe ispitanika koji su analizirani šest meseci nakon treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine,

27 ispitanika prebolelo je infekciju nakon vakcinacije (svi u periodu januar–mart 2022, u vreme dominacije Omikron varijante), dok je 16 ispitanika infekciju preležalo pre početka imunizacije, u periodu novembar 2020 – septembar 2021, što vremenski odgovara dominaciji Alfa i Delta varijante (Tabela 12).

Efikasan imunski odgovor na SARS-CoV-2 uključuje koordinisano delovanje humoralne i ćelijske imunosti [228]. Među četiri strukturna proteina virusa (S, E, M, N), za imunološku detekciju najvažniji su S i N proteini. S glikoprotein posreduje ulazak virusa u ćeliju domaćina preko ACE2 receptora, a RBD domen S1 subjediniice sadrži epitope za neutrališuća antitela i T-ćelijski odgovor [229,230]. N protein, kao imunodominantni antigen, visoko je eksprimiran u inficiranim ćelijama i sadrži epitope za CD4+ i CD8+ T-limfocite [231].

Nakon prirodne infekcije virusom SARS-CoV-2, imunski odgovor uključuje razvoj antitela na N protein, koji nije prisutan u većini dostupnih vakcina. Antitela klase IgM i IgG na N protein mogu se detektovati već u prvoj nedelji nakon pojave simptoma. IgM antitela obično dostižu vrhunac u drugoj nedelji, dok IgG ostaju prisutna duže vreme i predstavljaju pouzdan marker prethodne prirodne infekcije, s obzirom na to da vakcine zasnovane na S proteinu ne indukuju njihovu produkciju [232,233]. Kod vakcinacije, glavna antigenska meta jeste S1 podjedinica S proteina, posebno RBD, koji je ključan za vezivanje virusa za ACE2 receptor na ćelijama domaćina. IgG antitela na RBD i S1 postaju detektabilna 7 do 14 dana nakon prve doze, dok se značajan porast titra beleži nakon druge doze, sa maksimumom između druge i četvrte nedelje [234]. Zbog toga većina seroloških testova koristi S i N antigene kao osnovu za merenje imunskog odgovora organizma na izloženost virusu.

Antitela nastala tokom prethodnih infekcija drugim humanim koronavirusima mogu pokazivati unakrsnu reaktivnost, naročito ako su iz istog roda (npr. HCoV-OC43, HKU1, 229E, NL63) [235]. Međutim, iako su N antigen i S2 domen relativno konzervisani među koronavirusima, antitela nastala tokom prethodnih infekcija ne pružaju zaštitu protiv SARS-CoV-2 virusa [235–237].

Efikasnost različitih vakcina protiv SARS-CoV-2 može varirati usled različitog mehanizma dejstva, budući da su razvijene primenom različitih tehnologija (npr. iRNK, vektorske, subjedinične ili inaktivisane) koje ciljaju različite delove strukture virusa i podstiču različite imunske puteve [238]. Većina vakcina je dizajnirana da podstakne odgovor isključivo na S antigen, zbog čega se za praćenje efikasnosti vakcinacije najčešće koriste testovi koji mere prisustvo neutrališućih antitela [239–241]. Za razliku od njih, Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcina, kao inaktivisana celovirusna vakcina, indukuje imunski odgovor tela na sve strukturne antigene virusa, uključujući i S i N antigene. Zbog toga je analiza serološkog profila kod vakcinisanih i/ili inficiranih osoba od velikog značaja za razumevanje ukupnog imunskog odgovora organizma.

Imunski odgovor na vakcinu uobičajeno dostiže svoj maksimum 14–28 dana nakon druge doze primarne vakcine [242,243]. Za razliku od IgG antitela protiv brojnih drugih patogena, koja mogu da perzistiraju tokom čitavog života, antitela protiv SARS-CoV-2 postepeno opadaju, tako da nekoliko meseci nakon vakcinacije mogu pasti ispod nivoa koji se smatra zaštitnim [243–245]. Prema literaturnim podacima, dve doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine pokazale su varijabilnu kratkoročnu efikasnost protiv simptomatskog COVID-19 u periodu od šest meseci nakon vakcinacije: efikasnost se kretala od 83,5% u Turskoj, preko 50,7% u Brazilu, do 65,9% u Čileu. Efikasnost u prevenciji hospitalizacija bila je znatno viša – u Brazilu je iznosila 83,7% (95% CI: 58,0–93,7), a u Čileu 87,5% (95% CI: 86,7–88,2) [245–248]. Faza 3 kliničkih ispitivanja vakcina pokazala je ukupnu efikasnost od 50,7%, dok je zaštita od teških oblika bolesti bila značajno veća [249,250]. U skladu sa tim nalazima, efikasnost inaktivisanih vakcina protiv COVID-19 nakon primene dve doze generalno je procenjena na 70–80% [174,251].

Na osnovu gore navedenih nalaza, preporučena je primena treće – buster doze – koja, prema rezultatima i ove disertacije, doprinosi produženom imunskom odgovoru na originalni soj virusa [252].

6.1. Dinamika humoralnog imunskog odgovora i redoks homeostaze nakon buster doze vakcine

Prema podacima iz literature, tokom šestomesečnog perioda praćenja Pfizer-BioNTech vakcine, ovaj tip vakcine je, uprkos postepenom padu efikasnosti, zadržala povoljan bezbednosni profil i visoku zaštitu od COVID-19 infekcije [244,246,247]. Efikasnost protiv simptomske COVID-19 iznosila je 91,3% kod osoba bez prethodne infekcije SARS-CoV-2, dok je zaštita od teških formi bolesti bila 96,7%. Zabeležen je postepeni pad efikasnosti vakcine, pri čemu su vrednosti varirale od 86% do 100% u zavisnosti od zemlje, starosti, pola, etničke pripadnosti i prisustva faktora rizika. Efikasnost vakcine u prevenciji teških oblika bolesti iznosila je 96,7% [244,247].

U okviru ove studije, kod većine ispitanika vakcinisanih inaktivisanom Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, a bez prethodne infekcije SARS-CoV-2 virusom tri meseca nakon završene primarne vakcinacije i neposredno pre treće (buster) doze, zabeleženi su nedetektibilni, ili veoma niski nivoi anti-S1 IgG antitela u skladu sa kriterijumima definisanim uputstvom proizvođača (Slika 16B). Suprotno tome, kod ispitanika koji su primili Pfizer-BioNTech vakcinu uočen je blagi, statistički neznačajan porast anti-S1 IgG antitela šest meseci nakon druge doze, praćen blagim padom neposredno pre buster vakcinacije (Slika 16A). Sličan trend zabeležen je i kod vakcinisanih Sputnik V vakcinom – vrednosti antitela su ostale niske do trećeg meseca nakon druge doze, a zatim su blago porasle do šestog meseca, praćene blagim padom pre treće doze, bez statističke značajnosti (Slika 17A).

Prethodna SARS-CoV-2 infekcija, bilo da se javila između osnovne vakcinacije i buster doze ili nakon buster vakcinacije, značajno je povećala imunski odgovor organizma. U *svim* vakcinalnim grupama zabeležen je porast titra anti-S1 IgG antitela kod osoba sa prethodnom infekcijom, što potvrđuje izražen efekat tzv. hibridne imunosti (Slika 20).

Antigen-specifična IgG antitela koja nastaju tokom prirodne infekcije uglavnom su dugotrajna i mogu perzistirati pri ponovnoj izloženosti patogenu. Međutim, kada je reč o prirodnoj infekciji virusom SARS-CoV-2, titar specifičnih IgG antitela najčešće dostiže visok nivo u toku prva tri meseca, nakon čega dolazi do postepenog opadanja. Studije pokazuju da se SARS-CoV-2-specifična IgG antitela mogu detektovati već u prvoj nedelji nakon infekcije, dok većina obolelih razvija antitela u roku od 3–4 nedelje od pojave simptoma [242,246]. Istraživanja su takođe ukazala da na nivo antitela mogu uticati starije životno doba, muški pol, etnička pripadnost, gojaznost, pušenje, konzumacija alkohola, hronične bolesti i primena imunosupresivne terapije [253–256]. Vreme pojave, maksimalni nivo i trajanje specifičnih antitela varirali su prema podacima različitih studija.

Imunitet stečen vakcinacijom podložan je oscilacijama i opada tokom vremena, zbog čega je za održanje zaštite potrebna dodatna buster doza. Istovremeno, antigenski drift SARS-CoV-2 virusa dovodi do pojave novih VOC, protiv kojih je za efikasnu zaštitu neophodan viši nivo anti-S1 antitela. Postepeni pad antitela dovodi ne samo do smanjene zaštite od infekcije, već i do delimičnog gubitka zaštite od hospitalizacije i smrtnog ishoda, naročito kod starijih osoba [257]. U vreme sprovođenja buster vakcinacije, u Republici Srbiji dominirala je Omikron varijanta, dok vakcine prilagođene novim varijantama tada još nisu bile dostupne [258]. Zbog toga je preporuka bila da se primeni treća doza dostupnih vakcina, uz mogućnost izbora vrste vakcine za prethodno vakcinisane osobe.

Rezultati ove disertacije pokazali su da treća, homologna buster doza svih analiziranih

vakcina, dovodi do statistički značajnog *porasta* nivoa antitela, u poređenju sa nivoom postignutim nakon dve doze osnovne vakcinacije, kada se buster daje približno šest meseci nakon druge doze. Kod ispitanika bez prethodne SARS-CoV-2 infekcije, koji su primili tri doze Pfizer-BioNTech ili Sputnik V vakcine, zabeležen je značajan porast anti-S1 IgG antitela mesec dana nakon buster doze (Slika 16A i Slika 17A). Nasuprot tome, kod ispitanika sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, porast anti-S1 IgG antitela bio je statistički značajan tek šest meseci nakon treće doze (Slika 16B). Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature, koji pokazuju da treća doza Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, primenjena šest meseci nakon druge, dovodi do značajnog porasta titra neutrališućih antitela u odnosu na nisku bazalnu vrednost [259,260]. Ovakvi nalazi dobijaju dodatni značaj kada se sagledaju zajedno sa parametrima ćelijskog imunskog odgovora, među kojima je, u drugom delu studije određivan, nivo IFN- γ , koji je pokazao statistički značajno povećanje nakon buster vakcinacije, ukazujući na očuvanu funkcionalnost T-limfocita (Slika 36).

U ovoj studiji analizirane su i razlike u humoralnom imunskom odgovoru nakon primene homolognih i heterolognih buster doza kod ispitanika koji su prethodno primili dve doze inaktivisane Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine. Heterologna vakcinacija obuhvatala je primenu Pfizer-BioNTech vakcine kao treće doze. Rezultati su pokazali da su obe kombinacije, i homologna i heterologna, dovele do značajnog *porasta* anti-S1 IgG antitela, pri čemu je heterologna vakcinacija indukovala izraženiji/jači imunski odgovor. Tri meseca nakon dve doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine zabeležen je vrlo nizak titar anti-S1 IgG antitela, dok su buster doze, bez obzira na tip, značajno *pojačale* humoralni odgovor (Slika 19). Literatura takođe pokazuje da je intenzitet imunskog odgovora organizma bio izraženiji nakon buster doze vakcinom Sputnik V ili iRNK vakcinom (Pfizer-BioNTech), u poređenju sa homolognim režimom, pri čemu je najviši nivo odgovora postignut nakon primene iRNK buster vakcine [261–263]. Kod starijih osoba, prema podacima iz literature, heterologna buster vakcinacija, nakon primarne imunizacije inaktivisanom Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, rezultirala je 8–22 puta višim titrom neutrališućih antitela u poređenju sa homolognom buster dozom [261]. Ipak, rezultati ove disertacije nisu potvrdili ovaj nalaz, što se najverovatnije može pripisati ograničenom broju starijih ispitanika uključenih u studiju. Treća doza inaktivisane vakcine dala je približno 20-puta veći porast titra neutrališućih antitela u odnosu na bazalne vrednosti, što premašuje 12-puta zabeležen porast nivoa anti-S1 IgG antitela. Razlike u populaciji i korišćenim testovima mogu objasniti odstupanja u zabeležom apsolutnom imunskom odgovoru. Buster doze vektorskih i iRNK vakcina značajno povećavaju neutralizacioni kapacitet protiv Delta i Omikron varijanti (seropozitivnost $\geq 90\%$ nakon buster vakcine), dok se kod Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 buster doze beleži niži odgovor, sa samo 35% seropozitivnih na Omikron [264,265]. Jedno istraživanje je takođe pokazalo 1,4-puta veći porast neutralizacije Omikrona nakon iRNK buster doze kod osoba prethodno vakcinisanih Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, u poređenju sa dvema dozama iRNK vakcine [244,264,265].

Rezultati ove disertacije pokazuju da je vakcinacija sa dve doze pružila određeni stepen zaštite kod svih vakcinisanih osoba, što je potvrđeno PCR dijagnostikom SARS-CoV-2 infekcije (Tabela 9). Neočekivano, iRNK vakcina (Pfizer-BioNTech) i rekombinantna vektorska vakcina (Sputnik V) pokazale su nešto *nižu* efikasnost u poređenju sa inaktivisanom Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, u suprotnosti sa ranije objavljenim podacima [266]. Međutim, kada se efikasnost vakcina procenjuje na osnovu titra anti-S1 IgG antitela, slika je obrnuta: najniži titar zabeležen je kod primalaca Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, a najviši kod onih vakcinisanih Pfizer-BioNTech vakcinom, što je u skladu sa podacima iz literature. Buster doza je značajno povećala nivo antitela, posebno kod heterologne kombinacije, ali je njena efikasnost vremenom opadala, što je vidljivo po povećanju broja PCR-

pozitivnih slučajeva nakon buster doze (Tabela 9). Ovaj pad efikasnosti ne može se objasniti smanjenjem nivoa anti-S1 IgG antitela, budući da su njihove vrednosti ostale povišene i šest meseci nakon buster vakcinacije. Najverovatniji uzrok smanjenja efikasnosti vakcina predstavlja dominacija Omikron varijante virusa u periodu posle aplikacije buster doze vakcine.

Najviša efikasnost vakcine zabeležena je pre primene buster doze, pri čemu se efikasnost protiv Alfa i Beta varijanti virusa kretala od 14% do 26%. Najbolji rezultati uočeni su kod ispitanika koji su primili tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine. Na osnovu PCR potvrda infekcije pre buster doze, infekcija je zabeležena kod 14% osoba vakcinisanih Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, 24% kod primalaca Pfizer-BioNTech, 26% kod ljudi vakcinisanih Sputnik V, kao i 18% kod ispitanika sa heterolognom kombinacijom Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcina (Tabela 9).

Ipak, efikasnost vakcinacije opadala je tokom vremena, što se najverovatnije može pripisati promenama u dominaciji varijanti od značaja. Naime, osnovna vakcinacija sprovedena je u periodu kada je dominirala Alfa varijanta, dok su buster doze primenjene tokom perioda dominacije Omikron varijante. U tom kontekstu, smanjenje efikasnosti nakon buster vakcinacije ne predstavlja iznenađenje. Na osnovu PCR potvrđenih nalaza nakon buster doze, njena efikasnost je iznosila 70% kod osoba koje su primile buster Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinu, 76% kod osoba koje su primile Pfizer-BioNTech, 78% za Sputnik V i 82% kod osoba koje su inicijalno vakcinisane Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinu, a primile buster dozu Pfizer-BioNTech vakcine (Tabela 9).

Uprkos značajnim benefitima koje vakcinacija pruža, sve više istraživanja ukazuje na to da ponovljena primena vakcina koje sadrže identičan antigenski sastav može dovesti do smanjenja njihove ukupne efikasnosti [267]. Najnovije publikacije bave se mehanizmima u osnovi ovog fenomena. Ovi mehanizmi se uglavnom svode na: (1) model brze eliminacije virusnih antigena, pri čemu već prisutna antitela dovode do ubrzane eliminacije antigena iz vakcine; (2) model negativne signalizacije posredovane Fc receptorima, gde cirkulišuća antitela vezuju komponente vakcine i inhibiraju aktivaciju B ćelija; i (3) model maskiranja epitopa, pri čemu antitela iz cirkulacije vezuju i maskiraju neutrališuće epitope, omogućavajući time stimulaciju B ćelija koje prepoznaju udaljenije (manje dominantne) epitope [268,269].

Rezultati ove disertacije pokazali su da treća doza Pfizer-BioNTech i Sputnik V vakcina značajno utiču na kvalitet humoralnog imuniteta, sa statistički višim nivoima antitela mesec dana nakon buster doze u poređenju sa vrednostima mesec dana nakon druge doze. Sličan trend uočen je i kod ispitanika primarno vakcinisanih Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, koji su buster dozu dobili u vidu Pfizer-BioNTech vakcine (Slika 19A). Nasuprot tome, kod ispitanika koji su pre treće doze već preležali COVID-19, porast nivoa anti-S1 antitela nakon buster vakcinacije nije bio statistički značajan, što ukazuje da je dodatno povećanje titra antitela kod osoba sa prethodnom infekcijom i tri primljene doze vakcine ograničeno (Slika 19B). Ovakav fenomen, poznat kao „imunološko zasićenje“ (engl. immune ceiling), primećen je i kod sezonskih vakcina protiv gripa. Naime, istraživanja su pokazala da starije osobe koje se redovno vakcinišu iz godine u godinu mogu imati slabiji serološki odgovor i nižu efektivnost vakcine u poređenju sa onima koje se vakcinišu prvi put, što ukazuje na ograničen kapacitet imunog sistema da generiše snažan imunski odgovor nakon više uzastopnih ekspozicija istom antigenu [270–273].

Međutim, mutacije i selekcija novih VOC zahtevaju redovnu imunizaciju vakcinama koje sadrže ažurirane varijante virusnih proteina. Budući da SARS-CoV-2 nastavlja da cirkuliše i da dolazi do antigenskog pomeranja usled genetskog drifta, povremeno se pojavljuju nove varijante virusa protiv kojih prethodno stečen imunitet, bilo prirodnom infekcijom ili vakcinacijom, može biti nedovoljan [274–277]. Primer za to je Omikron varijanta SARS-CoV-2,

koja je zbog povećane prenosivosti klasifikovana kao varijanta od značaja. Ova varijanta sadrži preko 37 amino-kiselinskih supstitucija u S proteinu, od kojih se 15 nalazi unutar RBD domena. Pretpostavlja se da neke mutacije omogućavaju izbegavanje delovanja neutrališućih antitela, koja predstavljaju ključnu komponentu zaštite od infekcije [249,278,279]. U okviru sprovedene analize zabeležen je porast broja PCR-pozitivnih slučajeva tokom vremena nakon primene buster doze (Tabela 9), što ukazuje na mogući pad efikasnosti vakcina u kontekstu novih varijanti. Ovi nalazi podržavaju preporuku o uvođenju godišnje vakcinacije za imunokompromitovane osobe, po uzoru na vakcinaciju protiv sezonskog gripa, imajući u vidu njihov povećan rizik od razvoja težih oblika bolesti i tendenciju opadanja stečenog imunskog odgovora tokom vremena [280]. Preporuka se posebno odnosi na upotrebu vakcina koje su ažurirane tako da ciljaju aktuelne, cirkulišuće varijante virusa SARS-CoV-2, čime se dodatno unapređuje zaštita ove osetljive populacije.

Analiza serumskih redoks parametara pokazala je da treća doza vakcine različito utiče na redoks ravnotežu, u zavisnosti od tipa vakcine i prethodnog COVID-19 statusa ispitanika. Kod COVID-19 negativnih osoba, najkonzistentniji nalaz bio je pad vrednosti u DPPH testu u većini vakcinalnih grupa, što ukazuje na prolazno smanjenje specifične antioksidativne aktivnosti nakon buster doze vakcine. Ovo smanjenje može biti posledica povećane potrošnje antioksidativnih molekula tokom rane postvakcinalne imunološke aktivacije i pojačane produkcije ROS [281–283]. Istovremeno, porast FRAP vrednosti može ukazivati na kompenzatornu aktivaciju alternativnih neenzimskih antioksidanasa koje DPPH metoda ne detektuje [284]. Smanjenje albumina i ukupnih proteina kod osoba vakcinisanih Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom i kod heterologne Sinopharm/Pfizer-BioNTech grupe, mogu odražavati blagu akutno-faznu reakciju izazvanu vakcinacijom, pri čemu je albumin prepoznat kao negativni reaktant akutne faze [285,286]. Stabilne vrednosti nitrita u svim vakcinalnim podgrupama COVID-19 negativnih ispitanika sugerišu da nitro-oksidativni put ($\bullet\text{NO}/\text{O}_2^{\bullet-}$) nije značajno pogođen buster vakcinacijom. Kako nitriti u serumu predstavljaju stabilne metabolite $\bullet\text{NO}$, koji nastaje katalitičkim delovanjem NOS, odsustvo promena u njihovom nivou ukazuje da vakcinacija nije izazvala značajan endotelni ili imunološki odgovor koji bi povećao sintezu $\bullet\text{NO}$, ili njegov raspad u (opasan) ONOO^- . Očuvana stabilnost nivoa nitrita u serumu ukazuje da eventualni oksidativni stres nakon vakcinacije nije bio dovoljno izražen da naruši homeostazu $\bullet\text{NO}$, što može biti rezultat efikasne kompenzacije endogenih antioksidativnih mehanizama [287,288].

U COVID-19+ grupi zabeležen je konzistentan *pad* koncentracije serumskog albumina mesec dana nakon buster vakcinacije, bez obzira na tip primljene vakcine. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodnim istraživanjima, koja sugerišu da je albumin osetljiv biomarker nutritivnog i inflamatornog statusa tokom i nakon SARS-CoV-2 infekcije. Vaz-Rodrigues i saradnici (2023) su pokazali da se albumin, zajedno sa transtiretinom i serotransferinom, značajno smanjuje kod pacijenata sa težom kliničkom slikom COVID-19, dok inflamatorni markeri, poput C-reaktivnog proteina (CRP), beleže porast vrednosti [289]. Autori su takođe zabeležili da ove promene mogu opstati i nakon vakcinacije, što sugeriše da vakcinalni imunski odgovor može privremeno modifikovati homeostazu transportnih proteina. Ovi nalazi podržavaju hipotezu da pad albumina nakon buster vakcinacije, posebno kod osoba sa prethodnom infekcijom, može odražavati kombinovani efekat rezidualne postinfektivne inflamacije i redistribucije proteinskih resursa tokom adaptivnog imunskog odgovora organizma [290].

Sličan obrazac promena primećen je i kod parametara antioksidativnog statusa: DPPH antioksidativni esej u više vakcinalnih podgrupa pokazao je značajan pad aktivnosti nakon buster doze, što ukazuje na privremeno iscrpljivanje niskomolekulskih antioksidanasa u serumu ispitanika i preraspodelu antioksidativnih resursa tokom imunske aktivacije. Nasuprot tome, FRAP test, koji meri ukupni redukcionu kapacitet plazme, u većini podgrupa beležio je

blag porast vrednosti bez statističke značajnosti, što može odražavati očuvanu ili blago pojačanu aktivnost metal-vezujućih antioksidativnih proteina (npr. transferin, ceruloplazmin) tokom postvakcinalnog perioda. Iako je DPPH test pokazao smanjenje, a FRAP povećanje antioksidativnog kapaciteta seruma, ova razlika odražava različite aspekte antioksidativnog sistema – DPPH meri direktnu neutralizaciju slobodnih radikala, dok FRAP pokazuje ukupnu redukcionu sposobnost, pa oba testa zajedno pružaju komplementarnu sliku antioksidativnog statusa.

U COVID-19+ grupi, vrednosti nitrita su u svim vakcinalnim podgrupama ostale stabilne, ili su zabeležile samo blag porast nakon buster vakcinacije, bez statističke značajnosti. Ova stabilnost nivoa nitrita sugerise da nitro-oksidativni put, u kome je •NO centralni mediator, verovatno nije bio značajno pogođen imunološkom aktivacijom izazvanom vakcinacijom kod osoba sa preležanom SARS-CoV-2 infekcijom.

Prisustvo komorbiditeta, uključujući hipertenziju, kardiovaskularne bolesti, poremećaje funkcije štitaste žlezde i druga hronična oboljenja, nije imalo statistički značajan uticaj na koncentraciju anti-S IgG antitela niti u jednoj vakcinalnoj grupi, bez obzira na prethodnu SARS-CoV-2 infekciju. Ovi nalazi ukazuju da hronične bolesti nisu bile ograničavajući faktor za razvoj humoralnog imunskog odgovora nakon treće doze vakcine. Ovi rezultati su u skladu sa pojedinim ranijim istraživanjima koja su pokazala da imunogenost vakcina ostaje očuvana i kod osoba sa komorbiditetima, iako efikasnost vakcinacije može biti smanjena kod starijih osoba i onih sa izraženijom imunosupresijom [291,292].

S druge strane, analiza redoks parametara otkrila je jasne polno-specifične razlike (Slika 32). Kod ispitanika vakcinisanih Pfizer-BioNTech vakcinom, muškarci su imali značajno viši FRAP pre i nakon treće doze, a slični obrasci su uočeni i kod osoba koje su primile Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 i Sputnik V vakcinu. U heterolognoj grupi (Sinopharm/Pfizer-BioNTech vakcina), viši nivoi nitrita i tiola, kao i izraženiji FRAP odgovor kod muškaraca, dodatno ukazuju na snažniji antioksidativni potencijal kod muškog pola.

U pogledu uticaja prethodne infekcije, značajne razlike su uočene u DPPH antioksidativnom testu. Kod osoba vakcinisanih Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, veća antioksidativna aktivnost primećena je kod osoba bez prethodne infekcije, dok je kod primalaca Pfizer-BioNTech vakcine više DPPH vrednosti zabeležene kod COVID-19 pozitivnih osoba (Slika 33). Ovo ukazuje na moguć postinfekcijski adaptivni odgovor koji se ogleda u povećanoj neutralizaciji slobodnih radikala, kao i na različitu dinamiku oksidativnog odgovora u zavisnosti od tipa vakcine i prethodne izloženosti virusu.

Starost ispitanika pokazala se kao značajan prediktor u višestrukoj regresionoj analizi. Kod osoba koje su primile Sputnik V vakcinu, *stariji* ispitanici su imali više koncentracije nitrita, dok je kod heterologno vakcinisanih ispitanika zabeležen negativan trend između godina i nivoa albumina (pre treće doze) i tiola (nakon treće doze). Najverovatnije sa starenjem dolazi do pada određenih komponenti zaštitnog antioksidativnog sistema, što može imati implikacije na ukupni imunološki odgovor i efikasnost vakcinacije u starijim populacijama.

Na kraju, kod ispitanika sa endokrinim bolestima koji su primili Pfizer-BioNTech vakcinu, uočene su značajne promene u DPPH vrednostima pre primene treće doze, dok je kod ispitanika sa kardiovaskularnim bolestima koji su primili Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinu zabeležen statistički značajan pad nivoa serumskih albumina. Iako nema (direktnih) dokaza u literaturi o uticaju specifičnih komorbiditeta na rezultate u DPPH testu, ili na serumski nivo albumina nakon vakcinacije, brojna istraživanja potvrđuju da endokrini i kardiovaskularni poremećaji narušavaju redoks ravnotežu, putem povećanog oksidativnog stresa, smanjenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta organizma, sniženih koncentracija tiola i oksidativne modifikacije albumina [293–295].

6.2. Imunski i redoks odgovor šest meseci nakon buster doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine

Rezultati prvog dela disertacije pokazali su da, kod ispitanika koji su primili tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, šest meseci nakon buster doze, dolazi do pada koncentracije anti-S1 IgG antitela, što ukazuje na postepeno smanjenje specifičnog humoralnog imunskog odgovora tokom vremena (Slika 18B). Analiza redoks parametara u istoj populaciji nije pokazala statistički značajne promene, ali su zabeleženi određeni trendovi: vrednosti DPPH testa pokazale su blago smanjenje, što sugerise smanjenu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, dok su vrednosti FRAP testa pokazale blagi porast, što može ukazivati na neznatno povećanje ukupnog redoks antioksidativnog kapaciteta (Slike 23 i 24). Takođe, zabeležene su niže vrednosti serumskog albumina i ukupnih proteina, što može odražavati promene u proteinskoj komponenti antioksidativne odbrane (Slike 23 i 24). Ovi nalazi bili su osnov za sprovođenje drugog dela istraživanja, u kojem je kod ispitanika koji su primili sve tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, šest meseci nakon treće doze, istovremeno procenjen humoralni, ćelijski i redoks odgovor organizma, radi dobijanja sveobuhvatnijeg uvida u trajanje i kvalitet postvakcinalnog imuniteta.

Humoralni i ćelijski imunski odgovor analizirani su odvojeno kod vakcinisanih osoba koje su preležale COVID-19. Ove osobe poseduju tzv. hibridni imunitet, koji predstavlja kombinaciju prirodnog i vakcinom indukovano imuniteta. U literaturi se ovaj oblik imuniteta često opisuje kao „superiorni imunitet“ [296–299]. Kod vakcinisanih osoba, bez prethodne SARS-CoV-2 infekcije, uočen je značajan pad nivoa anti-S1 IgG antitela i IFN- γ (Slika 36). Nasuprot tome, osobe koje su prethodno stekle prirodni imunitet putem infekcije, a zatim bile vakcinisane, razvijaju snažniji imunski odgovor na SARS-CoV-2 [251,300]. Više autora ističe značaj memorijskog imuniteta, a studije pokazuju da osobe sa hibridnim imunitetom razvijaju veći broj memorijskih B-ćelija u poređenju sa osobama koje su imale samo prirodnu infekciju, ili su bile samo vakcinisane [301–305].

Prema podacima iz literature, i prethodna infekcija sama po sebi, kao i u kombinaciji sa poslednjom dozom vakcine, obezbeđuje visok i dugotrajan nivo zaštite od hospitalizacije i teških oblika bolesti [306]. S obzirom na ograničene podatke o serološkom statusu nakon vakcinacije Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom, rezultati ove disertacije upoređeni su sa nalazima seroloških markera nakon vakcinacije iRNK vakcinama.

Nakon jedne doze iRNK vakcine, nivo humoralnog imuniteta je 10–45 puta viši kod osoba koje su prethodno bile zaražene u poređenju sa osobama koje nisu imale infekciju [307,308]. Primena druge doze dovodi do trostrukog povećanja koncentracije antitela kod osoba bez imuniteta, dok taj efekat nije zabeležen kod osoba sa prethodnom infekcijom. Osobe koje su primile dve doze iRNK vakcine i ranije preležale infekciju imaju i do šest puta viši nivo antitela u odnosu na one koje su bile samo prirodno inficirane, ili samo vakcinisane. Takođe, vakcinacija prethodno inficiranih osoba dovodi do značajno viših nivoa unakrsno-neutrališućih antitela u poređenju sa potpuno vakcinisanim osobama bez prethodne infekcije [303].

U ovoj disertaciji, ispitanici koji su pre vakcinacije preležali COVID-19, i bili potpuno imunizovani sa tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, pokazali su statistički značajan porast svih tipova antitela specifičnih za SARS-CoV-2, naročito anti-S1 IgG i anti-N IgG (Slika 36). Titar neutrališućih antitela takođe je bio viši kod osoba sa prethodnom infekcijom, kao i nivo IFN- γ , što potvrđuje pojavu hibridnog imuniteta, koji prema humoralnim biomarkerima pruža najjaču i najtrajniju zaštitu. Kod više učesnika, posebno onih koji su imali COVID-19 neposredno pre ili nakon vakcinacije, detektovana su pozitivna anti-RBD IgM antitela, što se verovatno može objasniti razlikom između soja virusa sadržanog u vakcini i soja koji je izazvao infekciju, čime je stimulisana *de novo* produkcija IgM antitela [309,310].

Pored opšte populacije ispitanika, poseban fokus ove studije bio je usmeren na osobe sa hroničnim oboljenjima koja mogu uticati na funkciju imunskog sistema, a samim tim i na odgovor na vakcinaciju protiv SARS-CoV-2. Dobro je poznato da pacijenti sa kardiovaskularnim i endokrinološkim bolestima imaju povećan rizik od komplikacija i smrtnog ishoda nakon COVID-19, pri čemu je humoralni imunski odgovor nakon prirodne infekcije često slabiji u ovim grupama [311]. U tom kontekstu, vakcinacija, a naročito primena buster doze, ima za cilj da poveća nivo zaštite i ojača imunski odgovor na virusnu infekciju.

Prema podacima iz literature, kardiovaskularne bolesti, posebno arterijska hipertenzija, predstavljaju značajan kofaktor za razvoj teških formi COVID-19 [312–315]. U ovoj studiji, 85% (27 od 32) ispitanika sa kardiovaskularnim bolestima koristilo je ACE inhibitore kao deo terapije. Dosadašnja istraživanja ukazuju da hipertenzija, među ostalim kardiovaskularnim oboljenjima, može biti povezana sa slabijim odgovorom antitelima nakon iRNK vakcinacije, dok je antihipertenzivna terapija, nasuprot tome, u nekim studijama povezana sa kliničkim benefitima kod COVID-19. Smatra se da je ovaj pozitivan efekat posledica poboljšane produkcije antitela putem modulacije inflamatornih puteva i efikasnije prezentacije antigena [311].

S obzirom da su stariji ispitanici u našem uzorku uglavnom bili lečeni zbog hipertenzije ili drugih kardiovaskularnih bolesti, moguće je da je uočena pozitivna povezanost između ovih bolesti i imunskog odgovora posledica efekta terapije. Ipak, u ovoj studiji nisu registrovane statistički značajne razlike u markerima humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora između ispitanika sa kardiovaskularnim bolestima i ostalih učesnika, izuzev nivoa anti-N IgM antitela, koji je bio viši u grupi sa kardiovaskularnim oboljenjima (Slika 40).

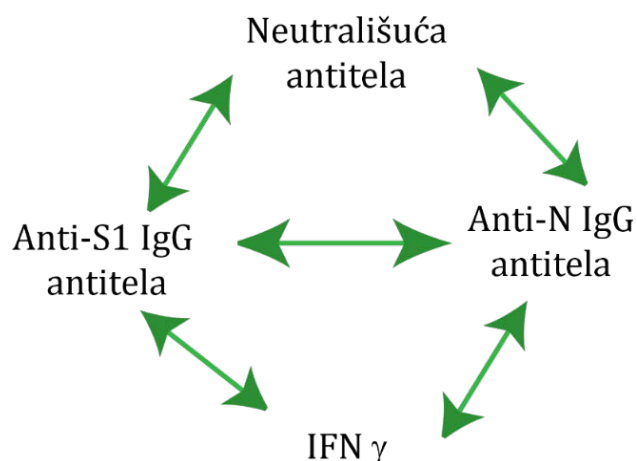
Endokrini poremećaji takođe utiču na efikasnost imunskog odgovora [316,317]. Prema rezultatima naše studije, ispitanici sa endokrinim poremećajima imaju statistički značajno oslabljen humoralni imunski odgovor nakon vakcinacije, sa nižim vrednostima za sva testirana antitela (neutrališuća antitela, anti-S1 IgG i anti-N IgG) (Slika 42). To ukazuje da osobe sa endokrinim poremećajima razvijaju *slabiji* humoralni odgovor nakon vakcinacije Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcinom. Međutim, ove razlike nisu bile prisutne u grupi ispitanika sa prethodnom COVID-19 infekcijom i endokrinim poremećajima, kod kojih nije bilo statistički značajnih razlika niti u markerima humoralnog, niti u markerima ćelijskog imunskog odgovora organizma (Slika 41).

Nivoi neutrališućih antitela i IFN- γ ostaju stabilni kod osoba koje su pre vakcinacije preležale COVID-19 i kasnije primile tri doze inaktivisane vakcine, u periodu do 18 meseci od poslednje kliničke manifestacije infekcije. Za razliku od toga, anti-N IgG antitela pokazuju statistički značajan pad već 3 meseci nakon infekcije, dok je kod anti-S1 IgG antitela pad uočen nakon 6 meseci (Slika 38). Na osnovu kompletne analize podataka, primena buster doze pokazala se kao ključna strategija za očuvanje i jačanje zaštitnog imunskog odgovora. Očuvanje neutralizujuće aktivnosti i ćelijskog imuniteta, uz postepeni pad pojedinih specifičnih antitela, u skladu je sa konceptom hibridnog imuniteta, koji nastaje kombinacijom prirodne infekcije i vakcinacije. Ovaj oblik imunskog odgovora obezbeđuje *najviši* stepen adaptivnog imuniteta, verovatno efikasnog kako protiv originalnog soja virusa, tako i protiv njegovih varijanti.

U grupi ispitanika sa prethodnom infekcijom, titar neutrališućih antitela i IFN- γ ostao je stabilan tokom perioda praćenja, dok su anti-S1 IgG i anti-N IgG antitela pokazala statistički značajan *pad* 18 meseci nakon infekcije (Slika 38). Ovi nalazi potvrđuju da inaktivisana Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcina, slično iRNK i vektorskim vakcinama, izaziva efikasnu produkciju neutrališućih antitela. Prirodni imunitet i vakcinom izazvan imunitet zajednički doprinose zaštiti od reinfekcije SARS-CoV-2 virusom, pri čemu T-ćelijski odgovor, posebno imunološka memorija, ima važnu ulogu u održavanju dugotrajne zaštite.

Korelaciona analiza je pokazala da se imunitet uspostavlja putem pozitivne kooperativnosti između anti-S1 IgG i anti-N IgG antitela, koja međusobno stimulišu svoju

proizvodnju, kao i putem interakcije sa neutrališućim antitelima i IFN- γ , pri čemu se ovi procesi odvijaju kroz nezavisne i odvojene imunološke puteve (Slika 48).



Slika 48. Shematski prikaz usklađenog toka imunskog odgovora organizma na vakcinaciju

Šest meseci nakon primene treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, analiza redoks parametara pokazala je značajne *razlike* između ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom i onih bez prethodne infekcije virusom. Kod COVID-19+ ispitanika utvrđene su statistički značajno niže vrednosti serumskog albumina i u DPPH testu, sugerišući smanjenu antioksidativnu sposobnost i moguću perzistenciju redoks disbalansa kao posledicu prethodne infekcije. Smanjena DPPH aktivnost, koja odražava smanjenu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u serumu, može biti posledica produženog oksidativnog stresa, izazvanog postakutnim inflamatornim procesima, u skladu sa nalazima drugih autora, koji opisuju perzistentni oksidativni stres mesecima nakon preležanog COVID-19 [208,209].

Korelaciona analiza pokazala je i izražene razlike u obrascima povezanosti između grupa ispitanika. Kod COVID-19– ispitanika zabeležena je snažna pozitivna korelacija ukupnih proteina i albumina, što ukazuje na stabilnu homeostazu proteinske frakcije seruma u odsustvu inflamatornog opterećenja (Slika 47A). U COVID-19+ grupi, ova korelacija je bila značajno slabija, verovatno usled postinfekcijskih promena u sintezi, katabolizmu, ili distribuciji albumina (Slika 47B). Albumin, glavni nosilac antioksidativnog kapaciteta seruma/plazme, podložan je oksidativnim modifikacijama u uslovima povišenog stvaranja ROS, što doprinosi smanjenju njegove koncentracije i funkcionalne aktivnosti [318]. Odsustvo značajne povezanosti između DPPH/FRAP vrednosti i tiolnih grupa sugerise da su ovi antioksidativni sistemi aktivirani kroz nezavisne mehanizme, u skladu sa ranijim studijama koje navode da se oksidativna i nitroksidativna oštećenja (makro)molekula u post-COVID periodu odvijaju kroz više paralelnih i međusobno nepovezanih puteva [319,320].

Rezultati višestruke regresione analize pokazali su da su godine starosti značajan negativan prediktor nivoa DPPH vrednosti i sadržaja serumskih tiola, u skladu sa literaturom o postepenom slabljenju antioksidativne zaštite tokom starenja [321]. Albumin se izdvojio kao najjači prediktor ukupnih proteina, potvrđujući svoju ključnu ulogu u održanju proteinske homeostaze i antioksidativne zaštite organizma, putem svoje slobodne tiolne grupa u bočnom ostatku cisteina (Cys34), koja neutrališe ROS [318,322,323]. Prisustvo prethodne COVID-19 infekcije identifikovano je kao značajan prediktor FRAP vrednosti, pri čemu su COVID-19+ ispitanici imali viši antioksidativni kapacitet, moguće kao posledica adaptivnih promena u redoks homeostazi i aktivacije imunološke memorije [283,324–326]. Dodatno, albumin je pokazao pozitivnu povezanost sa nivoom anti-S1 IgG antitela, što sugerise moguću ulogu nutritivnog statusa u modulaciji humoralnog odgovora [327–331].

Povezanost redoks i imunoloških parametara zavisila je od prethodnog COVID-19 statusa. U grupi COVID-19- ispitanika, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa IFN- γ i anti-S1 IgG antitela, kao i između sadržaja nitrita i IFN- γ , što ukazuje na funkcionalnu vezu između redoks statusa i ćelijskog imunskog odgovora [209,332]. Negativna povezanost DPPH vrednosti sa IFN- γ i antitelima sugerise da viši antioksidativni kapacitet može biti praćen nižim stepenom imunološke aktivacije [209]. Promenjen smer korelacije rezultata DPPH testa sa imunskim markerima u COVID-19+ grupi ukazuje na dugotrajne posledice SARS-CoV-2 infekcije na oksidativno-imunološku homeostazu. Iako u dostupnoj literaturi nema direktnih izveštaja o povezanosti DPPH vrednosti sa IFN- γ ili anti-S1 IgG antitelima, prethodna istraživanja su pokazala da post-COVID period karakterišu perzistentni oksidativni stres i inflamatorna aktivacija [319,333], što može predstavljati osnovu za uočene promene u redoks-imunološkoj interakciji.

Analiza rezultata je pokazala da starija životna dob ima značajan, ali relativno slab negativan efekat na antioksidativni status kod osoba koje nisu preležale COVID-19, najizraženiji kroz smanjenje nivoa tiolnih jedinjenja i DPPH vrednosti u serumu ispitanika. Ovaj nalaz je u skladu sa literaturom, koja potvrđuju da starenje prati povećanu proizvodnju ROS/RNS, smanjuje kapacitet antioksidativnih sistema, uz povećeno oštećenje proteina i lipidnih struktura usled oksidativnog stresa [334,335]. Takođe, u našem uzorku, viši nivoi ukupnih proteina bili su povezani sa većim serumskim antioksidativnim kapacitetom, što potvrđuje ulogu proteinskog i nutritivnog statusa u očuvanju redoks ravnoteže [336–339].

Analiza komorbiditeta ukazala je da osobe sa kardiovaskularnim, plućnim, bubrežnim i onkološkim oboljenjima imaju značajno *smanjene* antioksidativne parametre u serumu (uključujući ukupne proteine, DPPH i albumine), kao i povišene vrednosti oksidativnih markera poput nitrita. Ovi nalazi su usklađeni sa literaturom, koja jasno opisuje sinergijski efekat hronične inflamacije, endotelne disfunkcije i metaboličkih poremećaja kod hroničnih bolesti, dovodeći do sistemskog oksidativnog stresa i smanjenog antioksidativnog kapaciteta u telu čoveka [340–342].

7. ZAKLJUČCI

Pandemija COVID-19 pokazala je da efikasna vakcinacija sa praćenjem vakcinalnog imuniteta, predstavlja ključnu strategiju u kontroli širenja SARS-CoV-2 virusa i prevenciji teških formi bolesti. Na osnovu postavljenih ciljeva, primenjene metodologije i dobijenih rezultata ovog istraživanja, mogu se izvući sledeći najvažniji zaključci:

1. Treća (buster) doza vakcine protiv COVID-19 značajno povećava humoralni imunski odgovor u svim ispitivanim vakcinalnim grupama, pri čemu su najizraženiji efekti zabeleženi kod heterolognih kombinacija vakcina, kao i kod osoba sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom (hibridni imunitet);
2. Hibridni imunitet, šest meseci nakon tri doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, obezbeđuje viši titar anti-S1 IgG, anti-N IgG i neutrališućih antitela, uz očuvanu aktivnost IFN- γ , u poređenju sa osobama bez prethodne infekcije;
3. Kod osoba bez prethodne infekcije SARS-CoV-2, šest meseci nakon treće doze Sinopharm [Vero Cell]-Inactivated COVID-19 vakcine, zabeležen je pad koncentracije anti-S1 IgG antitela, što ukazuje na postepeno slabljenje humoralnog imunskog odgovora tokom vremena, moguće usled ponovljene stimulacije imunskog sistema vakcinom sa identičnom antigenskom strukturom;
4. Analiza redoks statusa u serumu ispitanika pokazala je da prethodna infekcija može dovesti do trajnog smanjenja antioksidativnog kapaciteta (niže vrednosti u DPPH testu i smanjeni nivo albumina) i promenjenih obrazaca povezanosti između redoks i imunoloških parametara;
5. Starija životna dob povezana je sa smanjenjem serumskih tiolnih jedinjenja i DPPH vrednosti, što ukazuje na postepeno slabljenje antioksidativne zaštite tokom starenja;
6. Viši proteinski status pozitivno korelira sa antioksidativnim kapacitetom i nivoom anti-S1 IgG antitela, naglašavajući značaj nutritivnog statusa u održavanju imunskog i redoks balansa u organizmu/krv;
7. Komorbiditeti, posebno kardiovaskularne, plućne, bubrežne i onkološke bolesti, povezani su sa smanjenjem antioksidativnih parametara u serumu (uključujući ukupne proteine, DPPH vrednosti i albumine) i/ili povećanjem oksidativnih markera poput nitrita;
8. Povezanost redoks i imunoloških parametara zavisi od prethodnog COVID-19 statusa – kod COVID-19- ispitanika utvrđena je pozitivna korelacija nivoa IFN- γ sa anti-S1 IgG antitelima i nitritima, dok su kod COVID-19+ ispitanika obrasci korelacija izmenjeni, što može odražavati dugoročne posledice infekcije na oksidativno–imunološku homeostazu.

Dobijeni rezultati iz ove doktorske disertacije dodatno naglašavaju značaj buster vakcinacije, posebno heterolognih kombinacija vakcina, potrebu za individualizovanim pristupom imunizaciji rizičnijih populacija, kao i važnost praćenja redoks parametara kao dopunskog biomarkera postvakcinalnog imuniteta.

8. LITERATURA

- [1] WHO. COVID-19 epidemiological update – 24 December 2024. 2024. Pristupljeno 06.04.2025. Dostupno na <https://iris.who.int/handle/10665/379898>
- [2] Beladiya J, Kumar A, Vasava Y, Parmar K, Patel D, Patel S, et al. Safety and efficacy of COVID-19 vaccines: A systematic review and meta-analysis of controlled and randomized clinical trials. *Rev Med Virol* 2024;34. <https://doi.org/10.1002/rmv.2507>.
- [3] Nagy A, Alhatlani B. An overview of current COVID-19 vaccine platforms. *Comput Struct Biotechnol J* 2021;19:2508–17. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.04.061>.
- [4] Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7:146. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00996-y>.
- [5] Markovic-Denic L, Popadic D, Jovanovic T, Bonaci-Nikolic B, Samardzic J, Tomic Spiric V, et al. Developing COVID-19 vaccine recommendations during the pandemic: The experience of Serbia's Expert Committee on Immunization. *Front Public Health* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1056670>.
- [6] WHO. Interim statement on booster doses for COVID-19 vaccination. 2021. Pristupljeno 06.04.2025. Dostupno na: <https://www.who.int/news/item/22-12-2021-interim-statement-on-booster-doses-for-covid-19-vaccination---update-22-december-2021>
- [7] Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis, 2015, p. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
- [8] Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen K-Y. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. *Exp Biol Med* 2009;234:1117–27. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>.
- [9] Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:181–92. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.
- [10] 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;579:270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- [11] Santos I de A, Grosche VR, Bergamini FRG, Sabino-Silva R, Jardim ACG. Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? *Front Microbiol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01818>.
- [12] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1798174254> Pristupljeno 06.04.2025.
- [13] Wu C, Yin W, Jiang Y, Xu HE. Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* 2022;43:3021–33. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00851-w>.
- [14] Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708264>.
- [15] Zhou Z, Huang C, Zhou Z, Huang Z, Su L, Kang S, et al. Structural insight reveals SARS-CoV-2 ORF7a as an immunomodulating factor for human CD14+ monocytes. *IScience* 2021;24:102187. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102187>.

- [16] Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004;203:631–7. <https://doi.org/10.1002/path.1570>.
- [17] Chen P, Wu M, He Y, Jiang B, He M-L. Metabolic alterations upon SARS-CoV-2 infection and potential therapeutic targets against coronavirus infection. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8:237. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01510-8>.
- [18] Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2020;117:11727–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>.
- [19] V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 2021;19:155–70. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
- [20] Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* 2020;41:1100–15. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.
- [21] Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen H-L, Chan MCW, et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe* 2020;1:e10. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30003-3).
- [22] Biryukov J, Boydston JA, Dunning RA, Yeager JJ, Wood S, Reese AL, et al. Increasing Temperature and Relative Humidity Accelerates Inactivation of SARS-CoV-2 on Surfaces. *MSphere* 2020;5. <https://doi.org/10.1128/msphere.00441-20>.
- [23] Xu J, Xu C, Chen R, Yin Y, Wang Z, Li K, et al. Stability of SARS-CoV-2 on inanimate surfaces: A review. *Microbiol Res* 2023;272:127388. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127388>.
- [24] Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Prasad PV, Steele M, Brooks JT, et al. SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms. *JAMA Netw Open* 2021;4:e2035057. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.35057>.
- [25] Guo M, Tao W, Flavell RA, Zhu S. Potential intestinal infection and faecal–oral transmission of SARS-CoV-2. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18:269–83. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00416-6>.
- [26] Zhou J, Liu G, Huang X, Gan H. The importance of fecal nucleic acid detection in patients with coronavirus disease (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* 2022;94:2317–30. <https://doi.org/10.1002/jmv.27652>.
- [27] Cerrada-Romero C, Berastegui-Cabrera J, Camacho-Martínez P, Goikoetxea-Aguirre J, Pérez-Palacios P, Santibáñez S, et al. Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. *Sci Rep* 2022;12:7397. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11439-7>.
- [28] Termansen MB, Frische S. Fecal-oral transmission of SARS-CoV-2: A systematic review of evidence from epidemiological and experimental studies. *Am J Infect Control* 2023;51:1430–7. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2023.04.170>.
- [29] Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr* 2020;9:51–60. <https://doi.org/10.21037/tp.2020.02.06>.

- [30] Deniz M, Tezer H. Vertical transmission of SARS CoV-2: a systematic review. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2022;35:2655–62. <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1793322>.
- [31] Verdecchia P, Cavallini C, Spanevello A, Angeli F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur J Intern Med* 2020;76:14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.04.037>.
- [32] Sodhi CP, Wohlford-Lenane C, Yamaguchi Y, Prindle T, Fulton WB, Wang S, et al. Attenuation of pulmonary ACE2 activity impairs inactivation of des-Arg 9 bradykinin/BKB1R axis and facilitates LPS-induced neutrophil infiltration. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2018;314:L17–31. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00498.2016>.
- [33] Qudus MS, Tian M, Sirajuddin S, Liu S, Afaq U, Wali M, et al. The roles of critical pro-inflammatory cytokines in the drive of cytokine storm during SARS-CoV-2 infection. *J Med Virol* 2023;95. <https://doi.org/10.1002/jmv.28751>.
- [34] Fahmy OH, Daas FM, Salunkhe V, Petrey JL, Cosar EF, Ramirez J, et al. Is Microthrombosis the Main Pathology in Coronavirus Disease 2019 Severity?—A Systematic Review of the Postmortem Pathologic Findings. *Crit Care Explor* 2021;3:e0427. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000427>.
- [35] Chen W, Pan JY. Anatomical and Pathological Observation and Analysis of SARS and COVID-19: Microthrombosis Is the Main Cause of Death. *Biol Proced Online* 2021;23:4. <https://doi.org/10.1186/s12575-021-00142-y>.
- [36] Wadowski PP, Panzer B, Józkowicz A, Kopp CW, Gremmel T, Panzer S, et al. Microvascular Thrombosis as a Critical Factor in Severe COVID-19. *Int J Mol Sci* 2023;24:2492. <https://doi.org/10.3390/ijms24032492>.
- [37] Ehrenfeld M, Tincani A, Andreoli L, Cattalini M, Greenbaum A, Kanduc D, et al. Covid-19 and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2020;19:102597. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102597>.
- [38] Tatal E, Ozaras R, Leblebicioglu H. Systematic review of COVID-19 and autoimmune thyroiditis. *Travel Med Infect Dis* 2022;47:102314. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102314>.
- [39] Yazdanpanah N, Rezaei N. Autoimmune complications of COVID-19. *J Med Virol* 2022;94:54–62. <https://doi.org/10.1002/jmv.27292>.
- [40] 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;172:577–82. <https://doi.org/10.7326/M20-0504>.
- [41] Baj J, Karakuła-Juchnowicz H, Teresiński G, Buszewicz G, Ciesielka M, Sitarz R, et al. COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge. *J Clin Med* 2020;9:1753. <https://doi.org/10.3390/jcm9061753>.
- [42] Lee LYW, Cazier J-B, Starkey T, Briggs SEW, Arnold R, Bisht V, et al. COVID-19 prevalence and mortality in patients with cancer and the effect of primary tumour subtype and patient demographics: a prospective cohort study. *Lancet Oncol* 2020;21:1309–16. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30442-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30442-3).

- [43] Russell CD, Lone NI, Baillie JK. Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. *Nat Med* 2023;29:334–43. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02156-9>.
- [44] Gao Y, Ding M, Dong X, Zhang J, Kursat Azkur A, Azkur D, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy* 2021;76:428–55. <https://doi.org/10.1111/all.14657>.
- [45] Berumen-Lechuga MG, Leaños-Miranda A, Molina-Pérez CJ, García-Cortes LR, Palomo-Piñón S. Risk Factors for Severe–Critical COVID-19 in Pregnant Women. *J Clin Med* 2023;12:5812. <https://doi.org/10.3390/jcm12185812>.
- [46] Garg P, Arora U, Kumar A, Wig N. The “post-COVID” syndrome: How deep is the damage? *J Med Virol* 2021;93:673–4. <https://doi.org/10.1002/jmv.26465>.
- [47] Greenhalgh T, Knight M, A’Court C, Buxton M, Husain L. Management of post-acute covid-19 in primary care. *BMJ* 2020;m3026. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3026>.
- [48] Triggler CR, Bansal D, Ding H, Islam MM, Farag EABA, Hadi HA, et al. A Comprehensive Review of Viral Characteristics, Transmission, Pathophysiology, Immune Response, and Management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a Basis for Controlling the Pandemic. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631139>.
- [49] Harne R, Williams B, Abdelaal HFM, Baldwin SL, Coler RN. SARS-CoV-2 infection and immune responses. *AIMS Microbiol* 2023;9:245–76. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2023015>.
- [50] van Eijk LE, Binkhorst M, Bourgonje AR, Offringa AK, Mulder DJ, Bos EM, et al. COVID-19: immunopathology, pathophysiological mechanisms, and treatment options. *J Pathol* 2021;254:307–31. <https://doi.org/10.1002/path.5642>.
- [51] Rashid F, Xie Z, Suleman M, Shah A, Khan S, Luo S. Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940756>.
- [52] Hoang H-D, Naeli P, Alain T, Jafarnejad SM. Mechanisms of impairment of interferon production by SARS-CoV-2. *Biochem Soc Trans* 2023;51:1047–56. <https://doi.org/10.1042/BST20221037>.
- [53] Sievers BL, Cheng MTK, Csiba K, Meng B, Gupta RK. SARS-CoV-2 and innate immunity: the good, the bad, and the “goldilocks.” *Cell Mol Immunol* 2023;21:171–83. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01104-y>.
- [54] Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, Wu G-C, Deng K, Chen Y-K, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020;26:845–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>.
- [55] Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med* 2021;13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd2223>.
- [56] Post N, Eddy D, Huntley C, van Schalkwyk MCI, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One* 2020;15:e0244126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244126>.
- [57] Koh G. Faculty Opinions recommendation of Evaluation of antibody testing for SARS-Cov-2 using ELISA and lateral flow immunoassays. *Faculty Opinions – Post-Publication Peer*

Review of the Biomedical Literature 2020.
<https://doi.org/10.3410/f.737781597.793573881>.

- [58] Chen Y, Zhao X, Zhou H, Zhu H, Jiang S, Wang P. Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Nat Rev Immunol* 2023;23:189–99. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00784-3>.
- [59] Carrillo J, Izquierdo-Useros N, Ávila-Nieto C, Pradenas E, Clotet B, Blanco J. Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2021;538:187–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.108>.
- [60] Takamatsu Y, Omata K, Shimizu Y, Kinoshita-Iwamoto N, Terada M, Suzuki T, et al. SARS-CoV-2-Neutralizing Humoral IgA Response Occurs Earlier but Is Modest and Diminishes Faster than IgG Response. *Microbiol Spectr* 2022;10. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02716-22>.
- [61] Garcia-Beltran WF, Lam EC, Astudillo MG, Yang D, Miller TE, Feldman J, et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell* 2021;184:476–488.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.015>.
- [62] Legros V, Denolly S, Vogrig M, Boson B, Siret E, Rigai J, et al. A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity. *Cell Mol Immunol* 2021;18:318–27. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00588-2>.
- [63] Schlickeiser S, Schwarz T, Steiner S, Wittke K, Al Beshar N, Meyer O, et al. Disease Severity, Fever, Age, and Sex Correlate With SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Responses. *Front Immunol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.628971>.
- [64] Chen W, Zhang J, Qin X, Wang W, Xu M, Wang L-F, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels are correlated with severity of COVID-19 pneumonia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020;130:110629. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110629>.
- [65] Wang X, Guo X, Xin Q, Pan Y, Hu Y, Li J, et al. Neutralizing Antibody Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Coronavirus Disease 2019 Inpatients and Convalescent Patients. *Clinical Infectious Diseases* 2020;71:2688–94. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa721>.
- [66] Jeewandara C, Jayathilaka D, Gomes L, Wijewickrama A, Narangoda E, Idampitiya D, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in patients with varying severity of acute COVID-19 illness. *Sci Rep* 2021;11:2062. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81629-2>.
- [67] Wang K, Long Q-X, Deng H-J, Hu J, Gao Q-Z, Zhang G-J, et al. Longitudinal Dynamics of the Neutralizing Antibody Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Clinical Infectious Diseases* 2021;73:e531–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1143>.
- [68] Wang L, Peng H-Y, Pham A, Villazana E, Ballard DJ, Das JK, et al. T Cell Response to SARS-CoV-2 Coinfection and Comorbidities. *Pathogens* 2023;12:321. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020321>.
- [69] Lu X, Yamasaki S. Current understanding of T cell immunity against SARS-CoV-2. *Inflamm Regen* 2022;42:51. <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00242-6>.
- [70] Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T

- Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* 2020;181:1489-1501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>.
- [71] Karl V, Hofmann M, Thimme R. Role of antiviral CD8+ T cell immunity to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *J Virol* 2025;99. <https://doi.org/10.1128/jvi.01350-24>.
- [72] Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* 2022;23:186–93. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w>.
- [73] Almendro-Vázquez P, Laguna-Goya R, Paz-Artal E. Defending against SARS-CoV-2: The T cell perspective. *Front Immunol* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1107803>.
- [74] WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape. 2023. Pristupljeno 25.09.2025. Dostupno na: <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19/covid-19-vaccine-tracker-and-landscape>
- [75] Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Stručni komitet za imunizaciju, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”. STRUČNO-METODOLOŠKO UPUTSTVO za sprovođenje vanredne preporučene imunizacije protiv COVID-19 u Republici Srbiji vakcinama: PFIZER-BIONTECH COVID-19 VACCINE (Comirnaty), Gam-KOVID-Vak, SARS-CoV-2 Vaccine (Vero Cell), Inactivated, ChAdOx1 nCoV-19 Corona Virus Vaccine (Recombinant) COVISHIELD/AstraZeneca SKBio AZD1222-COVID-19 Vaccine (ChAdOx1-S(recombinant))/COVID-19 Vaccine AstraZeneca (Vaxzevria) i SPIKEVAX (ranije COVID-19 Vaccine Moderna). 2022. Pristupljeno: 06.04.2025. Dostupno na: <https://www.batut.org.rs/download/smuZaVanrednuPreporucenuImunizacijuProtivCOVID19.pdf>
- [76] Creech CB, Walker SC, Samuels RJ. SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA* 2021;325:1318. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3199>.
- [77] https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/sage/2021/april/4_sage29apr2021_sinovac.pdf Pristupljeno 10.04.2025.
- [78] WHO. Interim recommendations for use of the inactivated COVID-19 vaccine BIBP developed by China National Biotec Group (CNBG), Sinopharm 2022. Pristupljeno 10.04.2025. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-BIBP>
- [79] FDA Philipiness. Emergency Use Authorization (EUA) for COVID-19 Vaccine (Vero Cell), Inactivated manufactured by Sinopharm/China National Pharmaceutical Group/Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd. 2021. Pristupljeno 10.04.2025. Dostupno na: <https://www.fda.gov.ph/wp-content/uploads/2021/08/EUA-Sinopharm-2-World-Traders-Website.pdf>
- [80] WHO. WHO recommendation Bharat Biotech International Ltd – COVID-19 vaccine (Whole Virion Inactivated Corona Virus). 2021. Pristupljeno 10.04.2025. Dostupno na https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/7-jan_22006_covaxin_vaccine-explainer_for-web.pdf
- [81] WHO. Interim recommendations for use of the Valneva VLA2001 vaccine against COVID-19. 2022. Pristupljeno 10.04.2025. Dostupno na <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE->

recommendation-Valneva-VLA2001

- [82] WHO. COVID-19 Vaccine Explainer: Moderna COVID-19 vaccine (mRNA-1273). 2021. Pristupljeno 10.04.2025. Dostupno na: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/2021-dha-docs/23-sept_21299_update_moderna-vaccine-explainer_final-for-the-web.pdf?sfvrsn=324e9c17_21&download=true
- [83] WHO. Interim recommendations for use of the Pfizer–BioNTech COVID-19 vaccine, BNT162b2, under Emergency Use Listing. 2022. Pristupljeno 10.04.2025. Dostupno na: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/461c4424-5d1c-4dd6-a510-6230a0ca15f5/content>
- [84] WHO. Interim recommendations for use of the Novavax NVX-CoV2373 vaccine against COVID-19 . 2022. Pristupljeno 25.09.2025. Dostupno na: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/5c20a8c3-f380-4113-89dd-7db4bc26e1e9/content>
- [85] Patel M, Zipursky S, Orenstein W, Garon J, Zaffran M. Polio endgame: the global introduction of inactivated polio vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2015;14:749–62. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1001750>.
- [86] André F, Van Damme P, Safary A, Banatvala J. Inactivated hepatitis A vaccine: immunogenicity, efficacy, safety and review of official recommendations for use. *Expert Rev Vaccines* 2002;1:9–23. <https://doi.org/10.1586/14760584.1.1.9>.
- [87] Sridhar S, Brokstad K, Cox R. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines (Basel)* 2015;3:373–89. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020373>.
- [88] Hu L, Sun J, Wang Y, Tan D, Cao Z, Gao L, et al. A Review of Inactivated COVID-19 Vaccine Development in China: Focusing on Safety and Efficacy in Special Populations. *Vaccines (Basel)* 2023;11:1045. <https://doi.org/10.3390/vaccines11061045>.
- [89] Sanders B, Koldijk M, Schuitemaker H. Inactivated Viral Vaccines. *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015, p. 45–80. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45024-6_2.
- [90] Cramer JP. Principles of Immunization. *Travel Medicine*, Elsevier; 2019, p. 65–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54696-6.00009-4>.
- [91] Castrodeza-Sanz J, Sanz-Muñoz I, Eiros JM. Adjuvants for COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)* 2023;11:902. <https://doi.org/10.3390/vaccines11050902>.
- [92] Lim JME, Hang SK, Hariharaputran S, Chia A, Tan N, Lee ES, et al. A comparative characterization of SARS-CoV-2-specific T cells induced by mRNA or inactive virus COVID-19 vaccines. *Cell Rep Med* 2022;3:100793. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100793>.
- [93] Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA, Mathew D, Meng W, Rosenfeld AM, et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science (1979)* 2021;374. <https://doi.org/10.1126/science.abm0829>.
- [94] Zou L, Zhang H, Zheng Z, Jiang Y, Huang Y, Lin S, et al. Serosurvey in SARS-CoV-2 inactivated vaccine-elicited neutralizing antibodies against authentic SARS-CoV-2 and its viral variants. *J Med Virol* 2022;94:6065–72. <https://doi.org/10.1002/jmv.28049>.

- [95] Yu X, Wei D, Xu W, Liu C, Guo W, Li X, et al. Neutralizing activity of BBIBP-CorV vaccine-elicited sera against Beta, Delta and other SARS-CoV-2 variants of concern. *Nat Commun* 2022;13:1788. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29477-0>.
- [96] Mahmoud S, Ganesan S, Al kaabi N, Naik S, Elavalli S, Gopinath P, et al. Immune response of booster doses of BBIBP-CORV vaccines against the variants of concern of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Virology* 2022;150–151:105161. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105161>.
- [97] <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/coronavirus/in-depth/different-types-of-covid-19-vaccines/art-20506465> Pristupljeno 10.04.2025.
- [98] Travieso T, Li J, Mahesh S, Mello JDFRE, Blasi M. The use of viral vectors in vaccine development. *NPJ Vaccines* 2022;7:75. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00503-y>.
- [99] Folegatti PM, Bittaye M, Flaxman A, Lopez FR, Bellamy D, Kupke A, et al. Safety and immunogenicity of a candidate Middle East respiratory syndrome coronavirus viral-vectored vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, uncontrolled, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* 2020;20:816–26. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30160-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30160-2).
- [100] Zhu F-C, Hou L-H, Li J-X, Wu S-P, Liu P, Zhang G-R, et al. Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet* 2015;385:2272–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60553-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60553-0).
- [101] Radošević K, Rodriguez A, Lemckert AAC, van der Meer M, Gillissen G, Warnar C, et al. The Th1 Immune Response to *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Is Boosted by Adenovirus Vectors 35 and 26 with a Homologous Insert. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010;17:1687–94. <https://doi.org/10.1128/CVI.00311-10>.
- [102] Radošević K, Rodriguez A, Lemckert A, Goudsmit J. Heterologous prime–boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:577–92. <https://doi.org/10.1586/erv.09.14>.
- [103] Zahn R, Gillisen G, Roos A, Koning M, van der Helm E, Spek D, et al. Ad35 and Ad26 Vaccine Vectors Induce Potent and Cross-Reactive Antibody and T-Cell Responses to Multiple Filovirus Species. *PLoS One* 2012;7:e44115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044115>.
- [104] Medaglini D, Siegrist C-A. Immunomonitoring of human responses to the rVSV-ZEBOV Ebola vaccine. *Curr Opin Virol* 2017;23:88–94. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.008>.
- [105] World Health Organization (WHO). Vaccines and immunization for monkeypox: Interim guidance. 2022. Pristupljeno 24.04.2025. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MPX-Immunization>
- [106] Sebastian S, Gilbert SC. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based malaria vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2016;15:91–103. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1106319>.
- [107] López-Camacho C, Kim Y, Abbink P, Larocca R, Huiskonen J, Barouch D, et al. Assessment of Immunogenicity and Efficacy of a Zika Vaccine Using Modified Vaccinia Ankara Virus as Carriers. *Pathogens* 2019;8:216. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040216>.

- [108] Altenburg A, Kreijtz J, De Vries R, Song F, Fux R, Rimmelzwaan G, et al. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) as Production Platform for Vaccines against Influenza and Other Viral Respiratory Diseases. *Viruses* 2014;6:2735–61. <https://doi.org/10.3390/v6072735>.
- [109] Monath TP, Guirakhoo F, Nichols R, Yoksan S, Schrader R, Murphy C, et al. Chimeric Live, Attenuated Vaccine against Japanese Encephalitis (ChimeriVax-JE): Phase 2 Clinical Trials for Safety and Immunogenicity, Effect of Vaccine Dose and Schedule, and Memory Response to Challenge with Inactivated Japanese Encephalitis Antigen. *J Infect Dis* 2003;188:1213–30. <https://doi.org/10.1086/378356>.
- [110] Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *New England Journal of Medicine* 2015;372:113–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411037>.
- [111] Ewer KJ, Barrett JR, Belij-Rammerstorfer S, Sharpe H, Makinson R, Morter R, et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat Med* 2021;27:270–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01194-5>.
- [112] Alter G, Yu J, Liu J, Chandrashekar A, Borducchi EN, Tostanoski LH, et al. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans. *Nature* 2021;596:268–72. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03681-2>.
- [113] Barouch DH, Kik S V., Weverling GJ, Dilan R, King SL, Maxfield LF, et al. International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine* 2011;29:5203–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.025>.
- [114] Dicks MDJ, Spencer AJ, Edwards NJ, Wadell G, Bojang K, Gilbert SC, et al. A Novel Chimpanzee Adenovirus Vector with Low Human Seroprevalence: Improved Systems for Vector Derivation and Comparative Immunogenicity. *PLoS One* 2012;7:e40385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040385>.
- [115] Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine* 2021;384:2092–101. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2104840>.
- [116] Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 2008;9:776–88. <https://doi.org/10.1038/nrg2432>.
- [117] Pereira VB, Zurita-Turk M, Saraiva TDL, De Castro CP, Souza BM, Mancha Agresti P, et al. DNA Vaccines Approach: From Concepts to Applications. *World J Vaccines* 2014;04:50–71. <https://doi.org/10.4236/wjv.2014.42008>.
- [118] Hobernik D, Bros M. DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? *Int J Mol Sci* 2018;19:3605. <https://doi.org/10.3390/ijms19113605>.
- [119] Fynan EF, Lu S, Robinson HL. One Group's Historical Reflections on DNA Vaccine Development. *Hum Gene Ther* 2018;29:966–70. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.066>.
- [120] Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *NPJ Vaccines* 2020;5:11. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0159-8>.
- [121] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology.

Nat Rev Drug Discov 2018;17:261–79. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>.

- [122] Fathizadeh H, Afshar S, Masoudi MR, Gholizadeh P, Asgharzadeh M, Ganbarov K, et al. SARS-CoV-2 (Covid-19) vaccines structure, mechanisms and effectiveness: A review. *Int J Biol Macromol* 2021;188:740–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.076>.
- [123] Sheridan C. First COVID-19 DNA vaccine approved, others in hot pursuit. *Nat Biotechnol* 2021;39:1479–82. <https://doi.org/10.1038/d41587-021-00023-5>.
- [124] Khobragade A, Bhate S, Ramaiah V, Deshpande S, Giri K, Phophle H, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. *The Lancet* 2022;399:1313–21. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00151-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00151-9).
- [125] Yadav T, Kumar S, Mishra G, Saxena SK. Tracking the COVID-19 vaccines: The global landscape. *Hum Vaccin Immunother* 2023;19. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2191577>.
- [126] Espeseth AS, Cejas PJ, Citron MP, Wang D, DiStefano DJ, Callahan C, et al. Modified mRNA/lipid nanoparticle-based vaccines expressing respiratory syncytial virus F protein variants are immunogenic and protective in rodent models of RSV infection. *NPJ Vaccines* 2020;5:16. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0163-z>.
- [127] Feldman RA, Fuhr R, Smolenov I, (Mick) Ribeiro A, Panther L, Watson M, et al. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials. *Vaccine* 2019;37:3326–34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.074>.
- [128] Medina-Magües LG, Gergen J, Jasny E, Petsch B, Lopera-Madrid J, Medina-Magües ES, et al. mRNA Vaccine Protects against Zika Virus. *Vaccines (Basel)* 2021;9:1464. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121464>.
- [129] Fleeton MN, Chen M, Berglund P, Rhodes G, Parker SE, Murphy M, et al. Self-Replicative RNA Vaccines Elicit Protection against Influenza A Virus, Respiratory Syncytial Virus, and a Tickborne Encephalitis Virus. *J Infect Dis* 2001;183:1395–8. <https://doi.org/10.1086/319857>.
- [130] Ajbani SP, Velhal SM, Kadam RB, Patel V V., Lundstrom K, Bandivdekar AH. Immunogenicity of virus-like Semliki Forest virus replicon particles expressing Indian HIV-1C gag , env and pol RT genes. *Immunol Lett* 2017;190:221–32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.019>.
- [131] Tarke A, Sidney J, Methot N, Yu ED, Zhang Y, Dan JM, et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Rep Med* 2021;2:100355. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100355>.
- [132] Parvin N, Joo SW, Mandal TK. Enhancing Vaccine Efficacy and Stability: A Review of the Utilization of Nanoparticles in mRNA Vaccines. *Biomolecules* 2024;14:1036. <https://doi.org/10.3390/biom14081036>.
- [133] Acevedo-Whitehouse K, Bruno R. Potential health risks of mRNA-based vaccine therapy: A hypothesis. *Med Hypotheses* 2023;171:111015. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2023.111015>.
- [134] Park JW, Lagniton PNP, Liu Y, Xu R-H. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *Int J Biol Sci* 2021;17:1446–60. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59233>.

- [135] Gote V, Bolla PK, Kommineni N, Butreddy A, Nukala PK, Palakurthi SS, et al. A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *Int J Mol Sci* 2023;24:2700. <https://doi.org/10.3390/ijms24032700>.
- [136] WHO. WHO issues its first emergency use validation for a COVID-19 vaccine and emphasizes need for equitable global access. Press release . 2020. Pristupljeno 17.04.2025. Dostupno na: <https://www.who.int/news/item/31-12-2020-who-issues-its-first-emergency-use-validation-for-a-covid-19-vaccine-and-emphasizes-need-for-equitable-global-access>
- [137] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* 2020;383:2603–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>.
- [138] Dagan N, Barda N, Biron-Shental T, Makov-Assif M, Key C, Kohane IS, et al. Effectiveness of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in pregnancy. *Nat Med* 2021;27:1693–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01490-8>.
- [139] Tang P, Hasan MR, Chemaitelly H, Yassine HM, Benslimane FM, Al Khatib HA, et al. BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccine effectiveness against the SARS-CoV-2 Delta variant in Qatar. *Nat Med* 2021;27:2136–43. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01583-4>.
- [140] Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, et al. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *New England Journal of Medicine* 2021;384:1412–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101765>.
- [141] Thompson MG, Stenehjem E, Grannis S, Ball SW, Naleway AL, Ong TC, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines in Ambulatory and Inpatient Care Settings. *New England Journal of Medicine* 2021;385:1355–71. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2110362>.
- [142] Luring AS, Tenforde MW, Chappell JD, Gaglani M, Ginde AA, McNeal T, et al. Clinical severity of, and effectiveness of mRNA vaccines against, covid-19 from omicron, delta, and alpha SARS-CoV-2 variants in the United States: prospective observational study. *BMJ* 2022:e069761. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-069761>.
- [143] Liu Y, Zhao D, Wang Y, Chen Z, Yang L, Li W, et al. A vaccine based on the yeast-expressed receptor-binding domain (RBD) elicits broad immune responses against SARS-CoV-2 variants. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1011484>.
- [144] Stuible M, Gervais C, Lord-Dufour S, Perret S, L'Abbé D, Schrag J, et al. Rapid, high-yield production of full-length SARS-CoV-2 spike ectodomain by transient gene expression in CHO cells. *J Biotechnol* 2021;326:21–7. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.005>.
- [145] Emini EA, Ellis RW, Miller WJ, McAleer WJ, Scolnick EM, Gerety RJ. Production and immunological analysis of recombinant hepatitis B vaccine. *Journal of Infection* 1986;13:3–9. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(86\)92563-6](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(86)92563-6).
- [146] Tian J-H, Patel N, Haupt R, Zhou H, Weston S, Hammond H, et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat Commun* 2021;12:372. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20653-8>.
- [147] Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, et al. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* 2021;385:1172–83.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>.

- [148] Marchese AM, Zhou X, Kinol J, Underwood E, Woo W, McGarry A, et al. NVX-CoV2373 vaccine efficacy against hospitalization: A post hoc analysis of the PREVENT-19 phase 3, randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine* 2023;41:3461–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.054>.
- [149] Bhiman JN, Richardson SI, Lambson BE, Kgagudi P, Mzindle N, Kaldine H, et al. Novavax NVX-COV2373 triggers neutralization of Omicron sub-lineages. *Sci Rep* 2023;13:1222. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27698-x>.
- [150] Raiser F, Davis M, Adelglass J, Cai MR, Chau G, Cloney-Clark S, et al. Immunogenicity and safety of NVX-CoV2373 as a booster: A phase 3 randomized clinical trial in adults. *Vaccine* 2023;41:5965–73. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.07.056>.
- [151] Dhawan M, Sharma A, Priyanka, Thakur N, Rajkhowa TK, Choudhary OP. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. *Hum Vaccin Immunother* 2022;18. <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2068883>.
- [152] Chen Z, Zhang Y, Wang M, Islam MS, Liao P, Hu Y, et al. Humoral and Cellular Immune Responses of COVID-19 vaccines against SARS-Cov-2 Omicron variant: a systemic review. *Int J Biol Sci* 2022;18:4629–41. <https://doi.org/10.7150/ijbs.73583>.
- [153] Ford CT, Jacob Machado D, Janies DA. Predictions of the SARS-CoV-2 Omicron Variant (B.1.1.529) Spike Protein Receptor-Binding Domain Structure and Neutralizing Antibody Interactions. *Frontiers in Virology* 2022;2. <https://doi.org/10.3389/fviro.2022.830202>.
- [154] Karim SSA, Karim QA. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. *The Lancet* 2021;398:2126–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02758-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02758-6).
- [155] Muik A, Wallisch A-K, Sanger B, Swanson KA, Muhl J, Chen W, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera. *Science* (1979) 2021;371:1152–3. <https://doi.org/10.1126/science.abg6105>.
- [156] Wu K, Werner AP, Koch M, Choi A, Narayanan E, Stewart-Jones GBE, et al. Serum Neutralizing Activity Elicited by mRNA-1273 Vaccine. *New England Journal of Medicine* 2021;384:1468–70. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2102179>.
- [157] Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cardenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *New England Journal of Medicine* 2021;384:2187–201. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101544>.
- [158] Bruxvoort KJ, Sy LS, Qian L, Ackerson BK, Luo Y, Lee GS, et al. Effectiveness of mRNA-1273 against delta, mu, and other emerging variants of SARS-CoV-2: test negative case-control study. *BMJ* 2021:e068848. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-068848>.
- [159] Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Sachdeva R, Gower C, et al. Effectiveness of COVID-19 booster vaccines against COVID-19-related symptoms, hospitalization and death in England. *Nat Med* 2022;28:831–7. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01699-1>.
- [160] Bar-On YM, Goldberg Y, Mandel M, Bodenheimer O, Freedman L, Kalkstein N, et al. Protection of BNT162b2 Vaccine Booster against Covid-19 in Israel. *New England Journal of Medicine* 2021;385:1393–400. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114255>.

- [161] Atmar RL, Lyke KE, Deming ME, Jackson LA, Branche AR, El Sahly HM, et al. Homologous and Heterologous Covid-19 Booster Vaccinations. *New England Journal of Medicine* 2022;386:1046–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116414>.
- [162] Gilboa M, Regev-Yochay G, Mandelboim M, Indenbaum V, Asraf K, Fluss R, et al. Durability of Immune Response After COVID-19 Booster Vaccination and Association With COVID-19 Omicron Infection. *JAMA Netw Open* 2022;5:e2231778. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.31778>.
- [163] Grewal R, Nguyen L, Buchan SA, Wilson SE, Nasreen S, Austin PC, et al. Effectiveness of mRNA COVID-19 vaccine booster doses against Omicron severe outcomes. *Nat Commun* 2023;14:1273. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36566-1>.
- [164] Belik M, Jalkanen P, Lundberg R, Reinholm A, Laine L, Väisänen E, et al. Comparative analysis of COVID-19 vaccine responses and third booster dose-induced neutralizing antibodies against Delta and Omicron variants. *Nat Commun* 2022;13:2476. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30162-5>.
- [165] Cervantes-Luevano K, Espino-Vazquez AN, Flores-Acosta G, Bernaldez-Sarabia J, Cabanillas-Bernal O, Gasperin-Bulbarela J, et al. Neutralizing antibodies levels are increased in individuals with heterologous vaccination and hybrid immunity with Ad5-nCoV in the north of Mexico. *PLoS One* 2022;17:e0269032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269032>.
- [166] Jacobsen H, Sitaras I, Katzmarzyk M, Cobos Jiménez V, Naughton R, Higdon MM, et al. Systematic review and meta-analysis of the factors affecting waning of post-vaccination neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2. *NPJ Vaccines* 2023;8:159. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00756-1>.
- [167] Walmsley S, Nabipoor M, Qi F, Lovblom LE, Ravindran R, Colwill K, et al. Declining Levels of Neutralizing Antibodies to SARS-CoV-2 Omicron Variants Are Enhanced by Hybrid Immunity and Original/Omicron Bivalent Vaccination. *Vaccines (Basel)* 2024;12:564. <https://doi.org/10.3390/vaccines12060564>.
- [168] Frei A, Kaufmann M, Amati R, Dettwiler AB, Wyl V von, Annoni AM, et al. Development of hybrid immunity during a period of high incidence of infections with Omicron subvariants: A prospective population based multi-region cohort study 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.10.14.22281076>.
- [169] Andreano E, Paciello I, Piccini G, Manganaro N, Pileri P, Hyseni I, et al. Hybrid immunity improves B cells and antibodies against SARS-CoV-2 variants. *Nature* 2021;600:530–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04117-7>.
- [170] Bates TA, McBride SK, Leier HC, Guzman G, Lyski ZL, Schoen D, et al. Vaccination before or after SARS-CoV-2 infection leads to robust humoral response and antibodies that effectively neutralize variants. *Sci Immunol* 2022;7. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abn8014>.
- [171] Minervina AA, Pogorelyy M V., Kirk AM, Crawford JC, Allen EK, Chou C-H, et al. SARS-CoV-2 antigen exposure history shapes phenotypes and specificity of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2022;23:781–90. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01184-4>.
- [172] Bertoletti A, Le Bert N, Tan AT. SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic. *Immunity* 2022;55:1764–78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.008>.

- [173] Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020;584:457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>.
- [174] Nordström P, Ballin M, Nordström A. Risk of SARS-CoV-2 reinfection and COVID-19 hospitalisation in individuals with natural and hybrid immunity: a retrospective, total population cohort study in Sweden. *Lancet Infect Dis* 2022;22:781–90. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00143-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00143-8).
- [175] Feldstein LR, Ruffin J, Wiegand RE, Borkowf CB, James-Gist J, Babu TM, et al. Effectiveness of mRNA COVID-19 Vaccines and Hybrid Immunity in Preventing SARS-CoV-2 Infection and Symptomatic COVID-19 Among Adults in the United States. *J Infect Dis* 2025;231:e743–53. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaf007>.
- [176] Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol* 2023;97:2499–574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>.
- [177] Ramiro-Cortijo D, Rodríguez-Rodríguez P, de Pablo ÁLL, López-Giménez MR, González MC, Arribas SM. Fetal Undernutrition and Oxidative Stress: Influence of Sex and Gender. *Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation*, Cham: Springer International Publishing; 2017, p. 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40007-5_32-1.
- [178] Hong Y, Boiti A, Vallone D, Foulkes NS. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. *Antioxidants* 2024;13:312. <https://doi.org/10.3390/antiox13030312>.
- [179] Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci* 2021;22:4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>.
- [180] Floyd RA, Watson JJ, Harris J, West M, Wong PK. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;137:841–6. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)91156-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)91156-3).
- [181] Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: Mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992;32:S22–7. <https://doi.org/10.1002/ana.410320706>.
- [182] Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003;329:23–38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2).
- [183] Ellis EM. Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 2007;115:13–24. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.015>.
- [184] Całyniuk B, Grochowska-Niedworok E, Walkiewicz K, Kawecka S, Popiołek E, Fatyga E. Malondialdehyde (MDA) – product of lipid peroxidation as marker of homeostasis disorders and aging. *Annales Academiae Medicae Silesiensis* 2016;70:224–8. <https://doi.org/10.18794/aams/65697>.
- [185] Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:13725–8. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36703-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36703-0).

- [186] Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett* 1998;427:225–8. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00430-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00430-X).
- [187] Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:669–702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>.
- [188] Li L, Hu F. The correlation between S-nitrosylation and type 2 diabetes mellitus: a review. *Endokrynol Pol* 2024;75:473–8. <https://doi.org/10.5603/ep.100226>.
- [189] Liu M, Zaman R, Sawczak V, Periasamy A, Sun F, Zaman K. S-nitrosothiols signaling in cystic fibrosis airways. *J Biosci* 2021;46:111. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00223-w>.
- [190] Nakamura T, Lipton SA. Protein S -Nitrosylation as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:73–84. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.10.002>.
- [191] Radi R. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects. *Acc Chem Res* 2013;46:550–9. <https://doi.org/10.1021/ar300234c>.
- [192] Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol* 2013;74:1392–9. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.06.009>.
- [193] Bandoowala M, Sengupta P. 3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience* 2020;130:1047–62. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1713776>.
- [194] Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:123–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.022>.
- [195] Benhar M. Nitric oxide and the thioredoxin system: a complex interplay in redox regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2015;1850:2476–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.010>.
- [196] De Armas MI, Esteves R, Viera N, Reyes AM, Mastrogiovanni M, Alegria TGP, et al. Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2019;130:369–78. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.451>.
- [197] Randall LM, Manta B, Hugo M, Gil M, Batthyány C, Trujillo M, et al. Nitration Transforms a Sensitive Peroxiredoxin 2 into a More Active and Robust Peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 2014;289:15536–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.539213>.
- [198] Peterhans E. Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;91:383–92. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)90630-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)90630-2).
- [199] Yang X, Liu X, Nie Y, Zhan F, Zhu B. Oxidative stress and ROS-mediated cellular events in RSV infection: potential protective roles of antioxidants. *Virol J* 2023;20:224. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02194-w>.

- [200] Biagioli MC, Kaul P, Singh I, Turner RB. The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999;26:454–62. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00233-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00233-0).
- [201] Liu M, Chen F, Liu T, Chen F, Liu S, Yang J. The role of oxidative stress in influenza virus infection. *Microbes Infect* 2017;19:580–6. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.08.008>.
- [202] Pavlova E, Atanasov P, Ivanov I, Dyankov G. Biomarkers of Oxidative Stress in COVID-19 Patients. *Int J Mol Sci* 2025;26:3869. <https://doi.org/10.3390/ijms26083869>.
- [203] Laforge M, Elbim C, Frère C, Hémadi M, Massaad C, Nuss P, et al. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020;20:515–6. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1>.
- [204] Xie J, Yuan C, Yang S, Ma Z, Li W, Mao L, et al. The role of reactive oxygen species in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-COV-2) infection-induced cell death. *Cell Mol Biol Lett* 2024;29:138. <https://doi.org/10.1186/s11658-024-00659-6>.
- [205] Chen I-Y, Moriyama M, Chang M-F, Ichinohe T. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. *Front Microbiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00050>.
- [206] Marczevska A, Wojciechowska C, Marczewski K, Gospodarczyk N, Dolibog P, Czuba Z, et al. Elevated Levels of IL-1Ra, IL-1 β , and Oxidative Stress in COVID-19: Implications for Inflammatory Pathogenesis. *J Clin Med* 2025;14:2489. <https://doi.org/10.3390/jcm14072489>.
- [207] Chernyak B V., Popova EN, Prikhodko AS, Grebenchikov OA, Zinovkina LA, Zinovkin RA. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochemistry (Moscow)* 2020;85:1543–53. <https://doi.org/10.1134/S0006297920120068>.
- [208] Muhammad Y, Kani YA, Iliya S, Muhammad JB, Binji A, El-Fulaty Ahmad A, et al. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria. *SAGE Open Med* 2021;9. <https://doi.org/10.1177/2050312121991246>.
- [209] Pincemail J, Cavalier E, Charlier C, Cheramy-Bien J-P, Brevers E, Courtois A, et al. Oxidative Stress Status in COVID-19 Patients Hospitalized in Intensive Care Unit for Severe Pneumonia. A Pilot Study. *Antioxidants* 2021;10:257. <https://doi.org/10.3390/antiox10020257>.
- [210] Tepebaşı MY, İlhan İ, Temel EN, Sancer O, Öztürk Ö. Investigation of inflammation, oxidative stress, and DNA damage in COVID-19 patients. *Cell Stress Chaperones* 2023;28:191–9. <https://doi.org/10.1007/s12192-023-01330-3>.
- [211] Morris G, Gevezova M, Sarafian V, Maes M. Redox regulation of the immune response. *Cell Mol Immunol* 2022;19:1079–101. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00902-0>.
- [212] Wheeler ML, DeFranco AL. Prolonged Production of Reactive Oxygen Species in Response to B Cell Receptor Stimulation Promotes B Cell Activation and Proliferation. *The Journal of Immunology* 2012;189:4405–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201433>.
- [213] Angajala A, Lim S, Phillips JB, Kim J-H, Yates C, You Z, et al. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01605>.

- [214] Vené R, Delfino L, Castellani P, Balza E, Bertolotti M, Sitia R, et al. Redox Remodeling Allows and Controls B-Cell Activation and Differentiation. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:1145–55. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.3078>.
- [215] Yarosz EL, Chang C-H. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-mediated Immunity and Disease. *Immune Netw* 2018;18. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e14>.
- [216] Gerriets VA, Kishton RJ, Nichols AG, Macintyre AN, Inoue M, Ilkayeva O, et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4+ T cell subsets and inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 2015;125:194–207. <https://doi.org/10.1172/JCI76012>.
- [217] Rosén A, Lundman P, Carlsson M, Bhavani K, Srinivasa BR, Kjellström G, et al. A CD4 + T cell line-secreted factor, growth promoting for normal and leukemic B cells, identified as thioredoxin. *Int Immunol* 1995;7:625–33. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.4.625>.
- [218] Simundic A-M, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC, et al. Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2018;56:2015–38. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0602>.
- [219] Hu M-L. [41] Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, 1994, p. 380–5. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33044-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33044-1).
- [220] Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization, 2008, p. 361–80. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00823-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00823-3).
- [221] Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62:231–6. <https://doi.org/10.1080/003655102317475498>.
- [222] Hinkle ED, Wiersma W, Jurs GS. *Applied Statistics for Behavioral Sciences*. 2nd ed. Boston, MA, USA: Houghton Mifflin Company; 1994.
- [223] Zimmermann P, Curtis N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin Microbiol Rev* 2019;32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-18>.
- [224] Endale H, Aliye S, Mathewos M. Vaccine epidemiology, evaluation, and constraints of vaccine effectiveness -A review. *Veterinary Vaccine* 2022;1:100004. <https://doi.org/10.1016/j.vetvac.2022.100004>.
- [225] Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol* 2021;21:83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>.
- [226] Novkovic M, Banovic Djeri B, Ristivojevic B, Knezevic A, Jankovic M, Tanasic V, et al. Genome sequence diversity of SARS-CoV-2 in Serbia: insights gained from a 3-year pandemic study. *Front Microbiol* 2024;15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1332276>.
- [227] Banjac J, Vuković V, Pustahija T, Bohucki N, Berić DK, Medić S, et al. Epidemiological Characteristics of COVID-19 during Seven Consecutive Epidemiological Waves (2020–2022) in the North Bačka District, Serbia. *Viruses* 2023;15:2221. <https://doi.org/10.3390/v15112221>.
- [228] Liu B, Han J, Cheng X, Yu L, Zhang L, Wang W, et al. Reduced numbers of T cells and B cells correlates with persistent SARS-CoV-2 presence in non-severe COVID-19 patients. *Sci*

Rep 2020;10:17718. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73955-8>.

- [229] Huang Y, Yang C, Xu X, Xu W, Liu S. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* 2020;41:1141–9. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>.
- [230] Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 2020;181:281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- [231] Tilocca B, Soggiu A, Sanguinetti M, Musella V, Britti D, Bonizzi L, et al. Comparative computational analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein epitopes in taxonomically related coronaviruses. *Microbes Infect* 2020;22:188–94. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.04.002>.
- [232] Shi D, Weng T, Wu J, Dai C, Luo R, Chen K, et al. Dynamic Characteristic Analysis of Antibodies in Patients With COVID-19: A 13-Month Study. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708184>.
- [233] Li K, Huang B, Wu M, Zhong A, Li L, Cai Y, et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat Commun* 2020;11:6044. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19943-y>.
- [234] Xu Q-Y, Xue J-H, Xiao Y, Jia Z-J, Wu M-J, Liu Y-Y, et al. Response and Duration of Serum Anti-SARS-CoV-2 Antibodies After Inactivated Vaccination Within 160 Days. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.786554>.
- [235] Grifoni A, Sidney J, Zhang Y, Scheuermann RH, Peters B, Sette A. A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 2020;27:671-680.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.002>.
- [236] Murray SM, Ansari AM, Frater J, Klenerman P, Dunachie S, Barnes E, et al. The impact of pre-existing cross-reactive immunity on SARS-CoV-2 infection and vaccine responses. *Nat Rev Immunol* 2023;23:304–16. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00809-x>.
- [237] Breathnach AS, Riley PA, Cotter MP, Houston AC, Habibi MS, Planche TD. Prior COVID-19 significantly reduces the risk of subsequent infection, but reinfections are seen after eight months. *Journal of Infection* 2021;82:e11–2. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.01.005>.
- [238] Heinz FX, Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. *NPJ Vaccines* 2021;6:104. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00369-6>.
- [239] Mok CKP, Cohen CA, Cheng SMS, Chen C, Kwok K, Yiu K, et al. Comparison of the immunogenicity of BNT162b2 and CoronaVac COVID -19 vaccines in Hong Kong. *Respirology* 2022;27:301–10. <https://doi.org/10.1111/resp.14191>.
- [240] Premikha M, Chiew CJ, Wei WE, Leo YS, Ong B, Lye DC, et al. Comparative Effectiveness of mRNA and Inactivated Whole-Virus Vaccines Against Coronavirus Disease 2019 Infection and Severe Disease in Singapore. *Clinical Infectious Diseases* 2022;75:1442–5. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac288>.
- [241] Ella R, Reddy S, Blackwelder W, Potdar V, Yadav P, Sarangi V, et al. Efficacy, safety, and lot-to-lot immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBV152): interim results of a randomised, double-blind, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*

2021;398:2173–84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02000-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02000-6).

- [242] Petrović V, Vuković V, Patić A, Marković M, Ristić M. Immunogenicity of BNT162b2, BBIBP-CorV and Gam-COVID-Vac vaccines and immunity after natural SARS-CoV-2 infection—A comparative study from Novi Sad, Serbia. *PLoS One* 2022;17:e0263468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263468>.
- [243] Kanai D, Wakui H, Haze T, Azushima K, Kinguchi S, Tsukamoto S, et al. SARS-CoV-2 spike protein antibody titers 6 months after SARS-CoV-2 mRNA vaccination among patients undergoing hemodialysis in Japan. *Clin Exp Nephrol* 2022;26:988–96. <https://doi.org/10.1007/s10157-022-02243-8>.
- [244] Zhuang C, Liu X, Chen Q, Sun Y, Su Y, Huang S, et al. Protection Duration of COVID-19 Vaccines: Waning Effectiveness and Future Perspective. *Front Microbiol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.828806>.
- [245] Nordström P, Ballin M, Nordström A. Risk of infection, hospitalisation, and death up to 9 months after a second dose of COVID-19 vaccine: a retrospective, total population cohort study in Sweden. *The Lancet* 2022;399:814–23. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00089-7).
- [246] Zhang Y, Ma X, Yan G, Wu Y, Chen Y, Zhou Z, et al. Immunogenicity, durability, and safety of an mRNA and three platform-based COVID-19 vaccines as a third dose following two doses of CoronaVac in China: A randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 2 trial. *EClinicalMedicine* 2022;54:101680. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101680>.
- [247] McMahan K, Yu J, Mercado NB, Loos C, Tostanoski LH, Chandrashekar A, et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature* 2021;590:630–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03041-6>.
- [248] Kanai D, Wakui H, Haze T, Azushima K, Kinguchi S, Kanaoka T, et al. Improved Immune Response to the Third COVID-19 mRNA Vaccine Dose in Hemodialysis Patients. *Kidney Int Rep* 2022;7:2718–21. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2022.09.005>.
- [249] Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis* 2021;21:181–92. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4).
- [250] Viveiros-Rosa SG, Mendes CDS, Farfán-Cano GG, El-Shazly M. The race for clinical trials on Omicron-based COVID-19 vaccine candidates: Updates from global databases. *Narra J* 2022;2:e88. <https://doi.org/10.52225/narra.v2i3.88>.
- [251] Hall VJ, Foulkes S, Charlett A, Atti A, Monk EJM, Simmons R, et al. SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative health-care workers in England: a large, multicentre, prospective cohort study (SIREN). *The Lancet* 2021;397:1459–69. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00675-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00675-9).
- [252] Barda N, Dagan N, Cohen C, Hernán MA, Lipsitch M, Kohane IS, et al. Effectiveness of a third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: an observational study. *The Lancet* 2021;398:2093–100. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02249-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02249-2).
- [253] Nomura Y, Sawahata M, Nakamura Y, Koike R, Katsube O, Hagiwara K, et al. Attenuation

of Antibody Titers from 3 to 6 Months after the Second Dose of the BNT162b2 Vaccine Depends on Sex, with Age and Smoking Risk Factors for Lower Antibody Titers at 6 Months. *Vaccines (Basel)* 2021;9:1500. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121500>.

- [254] Matsuura T, Fukushima W, Nakagama Y, Kido Y, Kase T, Kondo K, et al. Factors impacting antibody kinetics, including fever and vaccination intervals, in SARS-CoV-2-naïve adults receiving the first four mRNA COVID-19 vaccine doses. *Sci Rep* 2024;14:7217. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57931-0>.
- [255] Anastassopoulou C, Antoni D, Manoussopoulos Y, Stefanou P, Argyropoulou S, Vrioni G, et al. Age and sex associations of SARS-CoV-2 antibody responses post BNT162b2 vaccination in healthcare workers: A mixed effects model across two vaccination periods. *PLoS One* 2022;17:e0266958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266958>.
- [256] Visalli G, Laganà A, Lo Giudice D, Calimeri S, Caccamo D, Trainito A, et al. Towards a Future of Personalized Vaccinology: Study on Individual Variables Influencing the Antibody Response to the COVID-19 Vaccine. *Vaccines (Basel)* 2023;11:217. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020217>.
- [257] Ferrara P, Gianfredi V, Tomaselli V, Polosa R. The Effect of Smoking on Humoral Response to COVID-19 Vaccines: A Systematic Review of Epidemiological Studies. *Vaccines (Basel)* 2022;10:303. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020303>.
- [258] First adapted COVID-19 booster vaccines recommended for approval in the EU. 2022.
- [259] Ma J, Cheng ZJ, Xue M, Huang H, Li S, Fang Y, et al. Investigation of Antibody Levels During Three Doses of Sinopharm/BBIBP Vaccine Inoculation. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.913732>.
- [260] Matula Z, Gönczi M, Bekő G, Kádár B, Ajzner É, Uher F, et al. Antibody and T Cell Responses against SARS-CoV-2 Elicited by the Third Dose of BBIBP-CorV (Sinopharm) and BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) Vaccines Using a Homologous or Heterologous Booster Vaccination Strategy. *Vaccines (Basel)* 2022;10:539. <https://doi.org/10.3390/vaccines10040539>.
- [261] Zhang X, Xia J, Jin L, Wu Y, Zheng X, Cao X, et al. Effectiveness of homologous or heterologous immunization regimens against SARS-CoV-2 after two doses of inactivated COVID-19 vaccine: A systematic review and meta-analysis. *Hum Vaccin Immunother* 2023;19. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2221146>.
- [262] Kuloğlu ZE, El R, Guney-Esken G, Tok Y, Talay ZG, Barlas T, et al. Effect of BNT162b2 and CoronaVac boosters on humoral and cellular immunity of individuals previously fully vaccinated with CoronaVac against SARS-CoV-2: A longitudinal study. *Allergy* 2022;77:2459–67. <https://doi.org/10.1111/all.15316>.
- [263] Mallah SI, Alawadhi A, Jawad J, Wasif P, Alsaffar B, Alalawi E, et al. Safety and efficacy of COVID-19 prime-boost vaccinations: Homologous BBIBP-CorV versus heterologous BNT162b2 boosters in BBIBP-CorV-primed individuals. *Vaccine* 2023;41:1925–33. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.01.032>.
- [264] Kyaw MH, Spinardi J, Zhang L, Oh HML, Srivastava A. Evidence synthesis and pooled analysis of vaccine effectiveness for COVID-19 mRNA vaccine BNT162b2 as a heterologous booster after inactivated SARS-CoV-2 virus vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2023;19. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2165856>.

- [265] Taucher C, Lazarus R, Dellago H, Maurer G, Weisova P, Corbic-Ramljak I, et al. Safety and immunogenicity against ancestral, Delta and Omicron virus variants following a booster dose of an inactivated whole-virus COVID-19 vaccine (VLA2001): Interim analysis of an open-label extension of the randomized, controlled, phase 3 COV-COMPARE trial. *Journal of Infection* 2023;87:242–54. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.06.022>.
- [266] World Health Organization. The Pfizer-BioNTech Vaccine: Real-world Performance. Pfizer Press Release New York, NY, USA, 2021. Pristupljeno: 13.08.2025. Dostupno na: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/real-world-evidence-confirms-high-effectiveness-pfizer>
- [267] Tuekprakhon A, Nutalai R, Dijokaite-Guraliuc A, Zhou D, Ginn HM, Selvaraj M, et al. Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. *Cell* 2022;185:2422–2433.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.005>.
- [268] Assawakosri S, Kanokudom S, Suntronwong N, Auphimai C, Nilyanimit P, Vichaiwattana P, et al. Neutralizing Activities Against the Omicron Variant After a Heterologous Booster in Healthy Adults Receiving Two Doses of CoronaVac Vaccination. *J Infect Dis* 2022;226:1372–81. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac092>.
- [269] Richards KA, Shannon I, Treanor JJ, Yang H, Nayak JL, Sant AJ. Evidence That Blunted CD4 T-Cell Responses Underlie Deficient Protective Antibody Responses to Influenza Vaccines in Repeatedly Vaccinated Human Subjects. *J Infect Dis* 2020;222:273–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz433>.
- [270] Sherman AC, Lai L, Bower M, Natrajan MS, Huerta C, Karmali V, et al. The Effects of Imprinting and Repeated Seasonal Influenza Vaccination on Adaptive Immunity after Influenza Vaccination. *Vaccines (Basel)* 2020;8:663. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040663>.
- [271] Lim WW, Cowling BJ, Nakafero G, Feng S, Nguyen-Van-Tam JS, Bolt H. The impact of repeated vaccination on relative influenza vaccine effectiveness among vaccinated adults in the United Kingdom. *Epidemiol Infect* 2022;1–30. <https://doi.org/10.1017/S0950268822001753>.
- [272] Cobey S, Hensley SE. Immune history and influenza virus susceptibility. *Curr Opin Virol* 2017;22:105–11. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.12.004>.
- [273] Thompson MG, Cowling BJ. How repeated influenza vaccination effects might apply to COVID-19 vaccines. *Lancet Respir Med* 2022;10:636–8. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00162-X).
- [274] Money KM, Baber U, Saart E, Samaan S, Sloane JA. Blunted Post-COVID-19 Humoral Immunity in Patients With CNS Demyelinating Disorders on Anti-CD20 Treatments. *Front Neurol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.843081>.
- [275] Kanai D, Wakui H, Hanaoka M, Haze T, Azushima K, Shinoda S, et al. Blunted humoral immune response to the fourth dose of BNT162b2 COVID-19 vaccine in patients undergoing hemodialysis. *Clin Exp Nephrol* 2023;27:639–47. <https://doi.org/10.1007/s10157-023-02342-0>.
- [276] Bar-On YM, Goldberg Y, Mandel M, Bodenheimer O, Amir O, Freedman L, et al. Protection by a Fourth Dose of BNT162b2 against Omicron in Israel. *New England Journal of Medicine* 2022;386:1712–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2201570>.

- [277] Khong K-W, Zhang R, Hung IF-N. The Four Ws of the Fourth Dose COVID-19 Vaccines: Why, Who, When and What. *Vaccines (Basel)* 2022;10:1924. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111924>.
- [278] Cheng SMS, Mok CKP, Leung YWY, Ng SS, Chan KCK, Ko FW, et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant BA.1 following homologous and heterologous CoronaVac or BNT162b2 vaccination. *Nat Med* 2022;28:486–9. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01704-7>.
- [279] Addetia A, Crawford KHD, Dingens A, Zhu H, Roychoudhury P, Huang M-L, et al. Neutralizing Antibodies Correlate with Protection from SARS-CoV-2 in Humans during a Fishery Vessel Outbreak with a High Attack Rate. *J Clin Microbiol* 2020;58. <https://doi.org/10.1128/JCM.02107-20>.
- [280] Anderer S. CDC Recommends Additional COVID-19 Booster for Older Adults. *JAMA* 2024;331:1081. <https://doi.org/10.1001/jama.2024.2071>.
- [281] Majumder N, Deepak V, Hadique S, Aesoph D, Velayutham M, Ye Q, et al. Redox imbalance in COVID-19 pathophysiology. *Redox Biol* 2022;56:102465. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102465>.
- [282] Öztürk EZ, Yüce N, Alyar G, Arslan V, Baygutalp NK, Parlak E, et al. Determination of oxidant-antioxidant levels in individuals vaccinated against COVID-19 before and after vaccination 2025. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6594299/v1>.
- [283] Bastin A, Abbasi F, Roustaei N, Abdesheikhi J, Karami H, Gholamnezhad M, et al. Severity of oxidative stress as a hallmark in COVID-19 patients. *Eur J Med Res* 2023;28:558. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01401-2>.
- [284] Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* 2021;22:3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- [285] Khalil R, Al-Humadi N. Types of acute phase reactants and their importance in vaccination (Review). *Biomed Rep* 2020. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1276>.
- [286] Powanda MC, Moyer ED. A brief, highly selective history of acute phase proteins as indicators of infection, inflammation and injury. *Inflammopharmacology* 2021;29:897–901. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00820-z>.
- [287] Ahmed SA, Alahmadi YM, Abdou YA. The Impact of Serum Levels of Reactive Oxygen and Nitrogen Species on the Disease Severity of COVID-19. *Int J Mol Sci* 2023;24:8973. <https://doi.org/10.3390/ijms24108973>.
- [288] Nikolaidis A, Kramer R, Ostojic S. Nitric Oxide: The Missing Factor in COVID-19 Severity? *Medical Sciences* 2021;10:3. <https://doi.org/10.3390/medsci10010003>.
- [289] Vaz-Rodrigues R, Mazuecos L, Villar M, Urra JM, Gortázar C, de la Fuente J. Serum biomarkers for nutritional status as predictors in COVID-19 patients before and after vaccination. *J Funct Foods* 2023;101:105412. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105412>.
- [290] Kablan A, Otal Y, Avcioğlu G, Kösa MT. The Effect of the Vaccination Status of RT-PCR Covid-19 Cases on Albumin, N/L Ratio, CRP, and D-Dimer Levels. *Mevlana Medical Sciences* 2023. <https://doi.org/10.56752/Mevmedsci.2023.23>.
- [291] Kontopoulou K, Nakas CT, Belai C, Papazisis G. Antibody titers after a third dose of the

- SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in immunocompromised adults in Greece: Is a fourth dose necessary? *J Med Virol* 2022;94:5056–60. <https://doi.org/10.1002/jmv.27954>.
- [292] Collier DA, Ferreira IATM, Kotagiri P, Datir RP, Lim EY, Touizer E, et al. Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature* 2021;596:417–22. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03739-1>.
- [293] Sastre-Oliva T, Corbacho-Alonso N, Rodriguez-Sanchez E, Mercado-García E, Perales-Sanchez I, Hernandez-Fernandez G, et al. Albumin Redox Modifications Promote Cell Calcification Reflecting the Impact of Oxidative Status on Aortic Valve Disease and Atherosclerosis. *Antioxidants* 2024;13:108. <https://doi.org/10.3390/antiox13010108>.
- [294] Nuñez-Selles AJ, Nuñez-Musa RA, Guillen-Marmolejos RA. Linking oxidative stress biomarkers to disease progression and antioxidant therapy in hypertension and diabetes mellitus. *Front Mol Biosci* 2025;12. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2025.1611842>.
- [295] Boarescu P-M, Boarescu I, Pop RM, Roşian ŞH, Bocşan IC, Rus V, et al. Evaluation of Oxidative Stress Biomarkers, Pro-Inflammatory Cytokines, and Histological Changes in Experimental Hypertension, Dyslipidemia, and Type 1 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 2022;23:1438. <https://doi.org/10.3390/ijms23031438>.
- [296] Suryawanshi R, Ott M. SARS-CoV-2 hybrid immunity: silver bullet or silver lining? *Nat Rev Immunol* 2022;22:591–2. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00771-8>.
- [297] Paniskaki K, Konik MJ, Anft M, Meister TL, Marheinecke C, Pfaender S, et al. Superior humoral immunity in vaccinated SARS-CoV-2 convalescence as compared to SARS-CoV-2 infection or vaccination. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031254>.
- [298] Baum HE, Santopaolo M, Francis O, Milodowski EJ, Entwistle K, Oliver E, et al. Hybrid B- and T-Cell Immunity Associates With Protection Against Breakthrough Infection After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Vaccination in Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) Participants. *J Infect Dis* 2025. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaf246>.
- [299] Pušnik J, Monzon-Posadas WO, Zorn J, Peters K, Baum M, Proksch H, et al. SARS-CoV-2 humoral and cellular immunity following different combinations of vaccination and breakthrough infection. *Nat Commun* 2023;14:572. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36250-4>.
- [300] Bobrovitz N, Ware H, Ma X, Li Z, Hosseini R, Cao C, et al. Protective effectiveness of previous SARS-CoV-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: a systematic review and meta-regression. *Lancet Infect Dis* 2023;23:556–67. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00801-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00801-5).
- [301] Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, Bodenheimer O, Freedman LS, Ash N, et al. Protection and Waning of Natural and Hybrid Immunity to SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine* 2022;386:2201–12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2118946>.
- [302] Spinardi JR, Srivastava A. Hybrid Immunity to SARS-CoV-2 from Infection and Vaccination—Evidence Synthesis and Implications for New COVID-19 Vaccines. *Biomedicines* 2023;11:370. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020370>.
- [303] Stamatatos L, Czartoski J, Wan Y-H, Homad LJ, Rubin V, Glantz H, et al. mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Science*

- (1979) 2021;372:1413–8. <https://doi.org/10.1126/science.abg9175>.
- [304] Bozhkova M, Raycheva R, Petrov S, Dudova D, Kalfova T, Murdjeva M, et al. Humoral and Memory B Cell Responses Following SARS-CoV-2 Infection and mRNA Vaccination. *Vaccines (Basel)* 2025;13:799. <https://doi.org/10.3390/vaccines13080799>.
- [305] Bausch-Jurken M, Alter G. The immunological impact of revaccination in a hybrid-immune world. *Front Immunol* 2025;16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1588259>.
- [306] Chen S, Guan F, Candotti F, Benlagha K, Camara NOS, Herrada AA, et al. The role of B cells in COVID-19 infection and vaccination. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.988536>.
- [307] Misra A, Theel ES. Immunity to SARS-CoV-2: What Do We Know and Should We Be Testing for It? *J Clin Microbiol* 2022;60. <https://doi.org/10.1128/jcm.00482-21>.
- [308] Grigoryan L, Pulendran B. The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Semin Immunol* 2020;50:101422. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101422>.
- [309] Castro Dopico X, Ols S, Loré K, Karlsson Hedestam GB. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J Intern Med* 2022;291:32–50. <https://doi.org/10.1111/joim.13372>.
- [310] Alsoussi WB, Malladi SK, Zhou JQ, Liu Z, Ying B, Kim W, et al. SARS-CoV-2 Omicron boosting induces de novo B cell response in humans. *Nature* 2023;617:592–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06025-4>.
- [311] Pellini R, Venuti A, Pimpinelli F, Abril E, Blandino G, Campo F, et al. Initial observations on age, gender, BMI and hypertension in antibody responses to SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine. *EClinicalMedicine* 2021;36:100928. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100928>.
- [312] Ielapi N, Licastro N, Provenzano M, Andreucci M, Francis S de, Serra R. Cardiovascular Disease As A Biomarker for An Increased Risk of Covid-19 Infection and Related Poor Prognosis. *Biomark Med* 2020;14:713–6. <https://doi.org/10.2217/bmm-2020-0201>.
- [313] Nishiga M, Wang DW, Han Y, Lewis DB, Wu JC. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* 2020;17:543–58. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0413-9>.
- [314] Chung MK, Zidar DA, Bristow MR, Cameron SJ, Chan T, Harding C V., et al. COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2021;128:1214–36. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.317997>.
- [315] Kuijpers Y, Picavet HSJ, de Rond L, de Zeeuw-Brouwer M, Rutkens R, Gijssbers E, et al. Potential determinants of antibody responses after vaccination against SARS-CoV-2 in older persons: the Doetinchem Cohort Study. *Immunity & Ageing* 2023;20:57. <https://doi.org/10.1186/s12979-023-00382-4>.
- [316] Guo W, Li M, Dong Y, Zhou H, Zhang Z, Tian C, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes Metab Res Rev* 2020;36. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3319>.
- [317] Bornstein SR, Rubino F, Khunti K, Mingrone G, Hopkins D, Birkenfeld AL, et al. Practical recommendations for the management of diabetes in patients with COVID-19. *Lancet*

- Diabetes Endocrinol 2020;8:546–50. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30152-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30152-2).
- [318] Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 2008;582:1783–7. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.057>.
- [319] Cecchini R, Cecchini AL. SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. *Med Hypotheses* 2020;143:110102. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110102>.
- [320] Delgado-Roche L, Mesta F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Arch Med Res* 2020;51:384–7. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.04.019>.
- [321] Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018;Volume 13:757–72. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.
- [322] Taverna M, Marie A-L, Mira J-P, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care* 2013;3:4. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-4>.
- [323] Oetl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007;151:580–90. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707251>.
- [324] Soto ME, Guarner-Lans V, Díaz-Díaz E, Manzano-Pech L, Palacios-Chavarría A, Valdez-Vázquez RR, et al. Hyperglycemia and Loss of Redox Homeostasis in COVID-19 Patients. *Cells* 2022;11:932. <https://doi.org/10.3390/cells11060932>.
- [325] Georgieva E, Ananiev J, Yovchev Y, Arabadzhiev G, Abrashev H, Abrasheva D, et al. COVID-19 Complications: Oxidative Stress, Inflammation, and Mitochondrial and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2023;24:14876. <https://doi.org/10.3390/ijms241914876>.
- [326] Karkhanei B, Talebi Ghane E, Mehri F. Evaluation of oxidative stress level: total antioxidant capacity, total oxidant status and glutathione activity in patients with COVID-19. *New Microbes New Infect* 2021;42:100897. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100897>.
- [327] Oktaria V, Wiratama BS, Riyanto S, Purbaningrum RP, Kusuma CW, Saraswati LD, et al. A scoping review: the impact of nutritional status on the efficacy, effectiveness, and immunogenicity of COVID-19 vaccines. *Trop Dis Travel Med Vaccines* 2025;11:21. <https://doi.org/10.1186/s40794-025-00258-z>.
- [328] Villaverde-Núñez A, Ramírez-López MT, Antón-Rodríguez C, Hammel IC, Pérez Ramos C, Álvarez Villarreal M, et al. Vaccination and Nutritional Outcomes of Hemodialysis Patients Infected With SARS-CoV-2. *Nurs Res* 2024;73:138–48. <https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000707>.
- [329] Jacobson-Naftali M, Azoulay O, Frishman S, Godny L, Zingerman B, Rozen-Zvi B, et al. The Humoral Response to SARS-CoV-2 Vaccine in Hemodialysis Patients Is Correlated with Nutritional Status. *Vaccines (Basel)* 2023;11:1141. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071141>.
- [330] Lin T-Y, Hung N-K, Hung S-C. Association of malnutrition with SARS-CoV-2 vaccine response in patients undergoing hemodialysis. *Clinical Nutrition* 2022;41:2683–90. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.10.011>.

- [331] Angel-Korman A, Peres E, Bryk G, Lustig Y, Indenbaum V, Amit S, et al. Diminished and waning immunity to COVID-19 vaccination among hemodialysis patients in Israel: the case for a third vaccine dose. *Clin Kidney J* 2022;15:226–34. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfab206>.
- [332] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010;49:1603–16. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- [333] Valente Coronel PM, Luiz Soares Basilio DC, Teixeira Espinoça I, Souza de Souza KF, Miranda Campos N, Seiji Nakano Ota R, et al. Involvement of oxidative stress in post-acute sequelae of COVID-19: clinical implications. *Redox Report* 2025;30. <https://doi.org/10.1080/13510002.2025.2471738>.
- [334] Yang J, Luo J, Tian X, Zhao Y, Li Y, Wu X. Progress in Understanding Oxidative Stress, Aging, and Aging-Related Diseases. *Antioxidants* 2024;13:394. <https://doi.org/10.3390/antiox13040394>.
- [335] Maldonado E, Morales-Pison S, Urbina F, Solari A. Aging Hallmarks and the Role of Oxidative Stress. *Antioxidants* 2023;12:651. <https://doi.org/10.3390/antiox12030651>.
- [336] Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Haller D, et al. A Consideration of Biomarkers to be Used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. *British Journal of Nutrition* 2013;109:S1–34. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005119>.
- [337] Bourdon E, Blache D. The Importance of Proteins in Defense Against Oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:293–311. <https://doi.org/10.1089/152308601300185241>.
- [338] Bekar C, Armagan B, Sari A, Ayaz A. Evaluation of serum total antioxidant level, nutritional status and Mediterranean diet adherence of adult women with rheumatoid arthritis: a case–control study. *British Journal of Nutrition* 2025;133:239–45. <https://doi.org/10.1017/S0007114524003386>.
- [339] Çekiç SD, Kara N, Tütem E, Başkan KS, Apak R. Protein–Incorporated Serum Total Antioxidant Capacity Measurement by a Modified CUPRAC (CUPRIC Reducing Antioxidant Capacity) Method. *Anal Lett* 2012;45:754–63. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.653901>.
- [340] Duni A, Liakopoulos V, Rapsomanikis K-P, Dounousi E. Chronic Kidney Disease and Disproportionally Increased Cardiovascular Damage: Does Oxidative Stress Explain the Burden? *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9036450>.
- [341] Zalba G, Moreno MU. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease and Comorbidities. *Antioxidants* 2022;11:1519. <https://doi.org/10.3390/antiox11081519>.
- [342] Charlton A, Garzarella J, Jandeleit-Dahm KAM, Jha JC. Oxidative Stress and Inflammation in Renal and Cardiovascular Complications of Diabetes. *Biology (Basel)* 2020;10:18. <https://doi.org/10.3390/biology10010018>.

9. PRILOZI

Prilog I

Popunjava ispitanik			
I Opšti podaci			
1. Ime i prezime:			
2. Pol:	M	Ž	
3. Datum rođenja:			
4. Broj telefona i e-mail adresa:			
II Anamnestički podaci			
1. Prethodna infekcija virusom SARS-CoV-2:	da	ne	
	Datum:		
2. Prisustvo teških alergijskih reakcija u anamnezi:	da	ne	
3. Trudnoća:	da	ne	
4. Dojenje:	da	ne	
5. Bolesti kardiovaskularnog sistema	Hipertenzija	da	ne
	Ishemijska bolest srca	da	ne
	Srčana insuficijencija	da	ne
	Bolesti srčanih zalistaka	da	ne
	Miokarditis	da	ne
	Endokarditis	da	ne
	Perikarditis	da	ne
	Tromboza dubokih vena	da	ne
	Drugo		
6. Bolesti centralnog nervnog sistema	Cerebrovaskularna oboljenja	da	ne
	Moždani udar	da	ne
	Epilepsija	da	ne
	Multipla skleroza	da	ne
	Polineuropatija	da	ne
	Neuroboelioza	da	ne
	Drugo		
7. Poremećaji endokrinog sistema:	Diabetes mellitus	da	ne
	Metabolički sindrom	da	ne
	Hipertireoza	da	ne
	Hipotireoza	da	ne
	Cushing-ov sindrom	da	ne
	Drugo		
8. Oboljenja jetre:	Hepatitis B	da	ne
	Hepatitis C	da	ne
	Ciroza jetre	da	ne
	Drugo		

9. Oboljenja bubrega:	Hipertenzivna nefropatija	da	ne
	Dijabetesna nefropatija	da	ne
	Hidronefroza	da	ne
	Hronična insuficijencija bubrega	da	ne
	Drugo		
10. Plućne bolesti	Astma	da	ne
	HOBP	da	ne
	Emfizem pluća	da	ne
	Plućna hipertenzija	da	ne
	Drugo		
11. Prisustvo alergijskih reakcija:	Atopija	da	ne
	Alergijski dermatitis	da	ne
	Alergijski rinitis	da	ne
	Alergijska astma	da	ne
	Drugo		
12. Autoimune bolesti:	Sistemički lupus	da	ne
	Reumatoidni artritis	da	ne
	Sistemska skleroza	da	ne
	Drugo		
13. Primarne i sekundarne imunodeficijencije:	da	ne	
14. Teška oboljenja hematopoetskog sistema:	da	ne	
15. Onkološke bolesti:	da	ne	
III Podaci o imunizaciji			
1. Vakcinacija protiv SARS-CoV-2:	da		ne
I doza	Datum vakcinacije	Naziv vakcine	Neželjena reakcija
II doza	Datum vakcinacije	Naziv vakcine	Neželjena reakcija
III doza	Datum vakcinacije	Naziv vakcine	Neželjena reakcija

10. BIOGRAFIJA AUTORA

Marija (Radovan) Vukčević rođena je 31. marta 1993. godine u Kruševcu. Srednju školu – Gimnaziju „Vuk Karadžić“, prirodno-matematičkog smera, završila je u Trsteniku 2012. godine. Iste godine upisala je osnovne akademske studije biohemije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (<https://www.chem.bg.ac.rs/studije/19-l.html>), koje je završila 2017. godine sa prosečnom ocenom 7,97, stičući zvanje diplomirani biohemičar. Završni rad pod nazivom: „*Izolovanje mutanata Ustilago maydis osetljivih na vodonik-peroksid*“ odbranila je sa ocenom 10 (deset). Školske 2017/2018. godine upisala je master akademske studije biohemije na istom fakultetu (<https://www.chem.bg.ac.rs/studije/23-l.html>), koje je završila 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,40 i stekla zvanje master biohemičar. Master rad pod nazivom: „*Izolovanje mutanata Ustilago maydis osetljivih na desikaciju*“ odbranila je takođe sa ocenom 10 (deset). Doktorske akademske studije na studijskom programu Biohemija, na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (<https://www.chem.bg.ac.rs/studije/26-l.html>), upisala je školske 2018/2019. godine, pod mentorstvom v. profesora dr Milana Nikolića.

Od februara 2019. godine zaposlena je u Zavodu za biocide i medicinsku ekologiju u Beogradu (<https://www.biocidi.org.rs/>). Radila je na poslovima analitičara u Odseku za fizičko-hemijska ispitivanja i Odseku za mikrobiološka i molekularna ispitivanja, a trenutno obavlja poslove rukovodioca Odseka za biohemijska ispitivanja. Tokom dosadašnjeg rada u Zavodu, stekla je značajno praktično iskustvo u primeni hromatografskih tehnika (GC-FID, GC-ECD, GC-MS, HPLC-UV, HPLC-DAD, LC-MS/MS), molekularnih metoda (RT-PCR, qPCR), kao i u oblasti biohemijske, imunohemijske i hematološke dijagnostike. Učestvovala je u radu laboratorije akreditovane u skladu sa zahtevima standarda SRPS ISO/IEC 17025 i SRPS EN ISO 15189. Tokom pandemije COVID-19, bila je angažovana na poslovima molekularne detekcije SARS-CoV-2 virusa u kliničkim i ekološkim uzorcima. Pored toga, školske 2023/2024. godine upisala je integrisane akademske studije medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu u Novom Sadu, Univerzitet Privredna akademija (<https://www.privrednaakademija.edu.rs/fakulteti/farmaceutski-fakultet-novi-sad.html>).

U okviru stručnog usavršavanja aktivno je učestvovala na brojnim naučnim skupovima, kongresima i simpozijumima u zemlji i inostranstvu. Član je Biohemijskog društva Srbije (<http://www.bds.org.rs/>) od 2022. godine.

Prilog 2

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Marija Vukčević

Broj indeksa DB06/2018

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Analiza seroloških markera imunskog odgovora i parametara redoks statusa nakon
primene buster doze COVID-19 vakcina

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

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Marija Vukčević

Broj indeksa: DB06/2018

Studijski program: Biohemija

Naslov rada: "Analiza seroloških markera imunskog odgovora i parametara redoks
statusa nakon primene buster doze COVID-19 vakcina"

Mentori: dr Milan Nikolić, vanredni profesor, dr Aleksandra Nikolić Kokić, naučni savetnik

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

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Analiza seroloških markera imunskog odgovora i parametara redoks statusa nakon primene buster doze COVID-19 vakcina

koja je moje autorsko delo

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.