



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο Ρόλος Λειτουργικών Πολυμορφισμών της Φυσικής Ανοσίας στην Επίπτωση
Λοιμώξεων σε Ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία**

Χρήστος Παπαδόπουλος
Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Νικόλαος Γιαννακούλας, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Επιβλέπων
- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας – Κλινικής Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις
Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY

**SCHOOL OF HEALTH
SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

MASTER THESIS

**The Role of Functional Polymorphisms of Innate Immunity in Incidence of
Infections in Patients with Acute Myeloid Leukemia**

By

**Christos Papadopoulos
Biochemist & Biotechnologist**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Nikolaos Giannakoulas, Assistant Professor of Internal Medicine–Hematology, Supervisor
- Matthaios Speletas, Professor of Medical Immunology
- Efthimia Peteinaki, Professor of Medical Biopathology–Clinical Microbiology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Application of Molecular Medicine

Larisa, October 2020

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract	7
Εισαγωγή	8
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1.1 Αιμοποίηση	9
1.2 Λευχαιμίες	10
1.2.1 Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	10
1.2.2 Πρωτοπαθής και Δευτεροπαθής ΟΜΛ	11
1.2.3 Ταξινόμηση της νόσου	11
1.2.4 Παθοφυσιολογία των ΟΜΛ	12
1.2.5 Διάγνωση	13
1.3 Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία και Λοιμώξεις	13
1.4 Υποδοχείς τύπου Toll TLRs.	14
1.4.1 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος των TLRs.	15
1.4.2 Σηματοδότηση των TLRs μέσω του μορίου MyD88.	16
1.4.3 Σηματοδότηση των TLRs μέσω του μορίου TRIF.	16
1.4.4 Αρνητική ρύθμιση των TLRs.	17
1.5 Υποδοχέας TLR4	17
1.5.1 Γενικά	17
1.5.2 Προσδέτης του TLR4	17
1.5.3 Μονοπάτι TLR4	19
1.5.4 Γενετικοί πολυμορφισμοί του TLR4.	19
1.6 Υποδοχέας TLR2	21
1.6.1 Γενικά για TLR2	21
1.6.2 Προσδέτης του υποδοχέα TLR2.	21
1.6.3 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος του υποδοχέα TLR2	22
1.6.4 Πολυμορφισμοί του υποδοχέα TLR2.	22
1.7 Σύστημα του Συμπλήρωματος	23
1.7.1 Γενικά για το Σύστημα του Συμπληρώματος	23
1.8 Πρωτεΐνη του συμπληρώματος C2	24
1.8.1 Γενικά για την πρωτεΐνη C2	24
1.8.2 Πολυμορφισμοί του μορίου C2	24
Σκοπός της Εργασίας	25
2. Ειδικό μέρος	26
Υλικά και Μέθοδοι	26

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	26
2.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΥΛΙΚΟΥ	26
2.3 Πειραματικό μέρος.....	27
2.3.1 Απομόνωση DNA.....	27
2.3.2 Εντοπισμός πολυμορφισμού rs9332736 του γονιδίου C2.....	28
2.3.3 Εντοπισμός των πολυμορφισμών rs4986790 D299G & rs4986791 T399I του γονιδίου TLR4.	29
2.3.4 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs5743708 του γονιδίου TLR2.	32
2.4 Στατιστική ανάλυση.	34
3.1 Κλινικά στοιχεία.	35
3.1.1 Αριθμός λοιμώξεων κατά την διάρκεια της θεραπείας.....	35
3.1.2 Απομονωμένοι μικροοργανισμοί.....	36
3.2 Γονότυποι των ασθενών με ΟΜΛ.	37
3.3 Συσχετίσεις	38
3.3.1 Έλεγχος συσχέτισης του ελλείματος C2.....	38
3.3.2 Έλεγχος συσχέτισης του SNP TLR4 D299G.....	39
3.3.3 Έλεγχος συσχέτισης του SNP TLR4 T399I.....	40
3.3.4 Έλεγχος συσχέτισης του συνεντοπισμού των SNP TLR4 D299G & T399I	41
3.3.5 Έλεγχος συσχέτισης του SNP TLR2 R753Q.....	42
4. Συζήτηση	44
4.1 Συμπεράσματα	46
Βιβλιογραφία	47

Ευχαριστίες

Το 2020 αποτέλεσε αδιαμφισβήτητα μια από τις πιο αβέβαιες και περίπλοκες χρονιές του 21^{ου} αιώνα. Η κρίση της πανδημίας του κορωνοϊού έμελλε να παίξει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της παγκόσμιας καθημερινότητας. Παρά τις πρωτοφανείς αυτές συνθήκες, η διεξαγωγή των πειραμάτων για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας επιτεύχθηκε στον προβλεπόμενο χρόνο, και το γεγονός αυτό αποτελεί έναν επιπρόσθετο λόγο για να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην υλοποίηση της.

Για την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας και την επιστημονική καθοδήγηση, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Δρ. Νικόλαο Γιαννακούλα ο οποίος ανέλαβε την επίβλεψη του παρόντος μεταπτυχιακού.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας και διευθυντή του εργαστηρίου Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας Δρ. Ματθαίο Σπελέτα, για της πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου επέτρεψε ελεύθερα να διεξάγω τα πειράματα της διπλωματικής στο εργαστήριο το οποίο διευθύνει.

Επιπρόσθετα, για τις πολύτιμες συμβουλές σχετικά με την ομαδοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών της διπλωματικής εργασίας καθώς και τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή της διπλωματικής, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας – Κλινικής Μικροβιολογίας Δρ. Πετεινάκη Ευθυμία.

Τίποτα δεν θα ήταν εφικτό χωρίς την πολύτιμη συνεργασία με τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας. Για αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υπ. Διδάκτορα Γερασιμίνα Τσιντή για τη συνολική επίβλεψη των πειραμάτων, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες θεωρητικές γνώσεις σε θέματα βιολογίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την τεχνολόγο ιατρικών εργαστηρίων Αθανασία Φουσίκα, την υπ. Διδάκτορα Σοφία Ραφτοπούλου, τον μεταπτυχιακό φοιτητή Ιωάννη Κουλά και την προπτυχιακή φοιτήτρια Ευδοξία Βακαλούλη για την άψογη συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων.

Ακόμη για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υπ. Διδάκτορα του εργαστηρίου Υγιεινής & Επιδημιολογίας Κατερίνα Δαδούλη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνολική στήριξη στο σύνολο των σπουδών μου.

Περίληψη

Οι ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ) παρουσιάζουν κατά την διάρκεια της νοσηλείας-θεραπείας, μεγάλες περιόδους ουδετεροπενιών. Αυτό τους καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητους σε λοιμώξεις από μια σειρά παθογόνων. Από μόνες τους οι λοιμώξεις αποτελούν παράγοντες υψηλού κινδύνου. Η πρόκληση λοιμώξεων σε ασθενείς με ΟΜΛ κατά την διάρκεια της θεραπείας, έχει ως συνέπεια την καθυστέρηση της προβλεπόμενης θεραπείας, αυξάνοντας παράλληλα την νοσηρότητα και την θνητότητα των ασθενών.

Η φυσική ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε μικροβιακά παθογόνα, ενώ παράλληλα αποτελεί τον ενορχηστρωτή της ειδικής ανοσίας. Διαταραχές στα κύρια μόρια της φυσικής ανοσίας όπως είναι οι υποδοχείς TLRs ή σε επιμέρους συστατικά άλλων συστημάτων όπως το συμπλήρωμα, είναι πιθανόν να δημιουργούν ένα δυσμενές υπόβαθρο για τον ήδη επιβαρυσμένο ασθενή.

Κοινοί λειτουργικοί πολυμορφισμοί των TLR μπορεί να αποτελούν παράγοντες αρνητικής πρόγνωσης σε ασθενείς με ΟΜΛ απέναντι στην πρόκληση λοιμώξεων. Επιπλέον γονιδιακά ελλείματα πρωτεϊνών του συμπληρώματος φαίνεται πως αποτελούν παράγοντες που σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις αυξάνουν την ευαισθησία απέναντι σε λοιμώξεις.

Στην παρούσα μελέτη, τέθηκε το ερώτημα αν οι πολυμορφισμοί D299G & T299I του γονιδίου TLR4, ο πολυμορφισμός R753Q του γονιδίου TLR2 και ο η πιο κοινή έλλειψη του γονιδίου C2 αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες πρόκλησης μικροβιακών λοιμώξεων σε ασθενείς ΟΜΛ.

Η μελέτη περιελάμβανε 107 ασθενείς της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν, ανιχνεύτηκαν σε ποσοστά κοντά σε αυτά του γενικού Ευρωπαϊκού πληθυσμού. Οι πολυμορφισμοί D299G & T299I του γονιδίου TLR4 συνεντοπίστηκαν σε μεγάλο ποσοστό, κάτι το οποίο συχνά αναφέρεται.

Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες οι οποίες παρουσίασαν μια συσχέτιση της ύπαρξης πολυμορφισμών των γονιδίων TLR2 & TLR4 με αύξηση της ευαισθησίας έναντι μικροβιακών λοιμώξεων, στην μελέτη μας δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά, κανενός πολυμορφισμού των γονιδίων TLR2, TLR4 και C2, έναντι των ασθενών που φέρουν γονότυπο αγρίου τύπου, όσων αφορά την επίπτωση σε λοιμώξεις και την εμφάνιση κάποιου μικροβιακού τύπου.

Λέξεις κλειδιά: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, TLR, TLR2, TLR4, C2, SNP, λοιμώξεις, ΟΜΛ

Abstract

Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) display long periods of neutropenia due to marrow failure and chemotherapy. This makes them particularly susceptible to infections from a large range of pathogens. Infections alone are high risk factors. The presence of infections in AML patients under treatment, may delay subsequent treatment regimens and also increase the morbidity and mortality of the patients.

Innate immune system is the first line of defense against microbial pathogens, while at the same time it is the orchestrator of adaptive immunity. Disorders in the major molecules of innate immunity such as TLRs receptors or in individual components of other systems such as the complement, might be aggravating factor for the already immune-compromised patient.

Common functional polymorphisms of TLRs appear to be negative prognostic factors for infections, in patients with AML. In addition, complement protein deficiencies could be factors that, in combination with other mutations, increase susceptibility to infections.

In the present study, the question was whether the D299G & T299I polymorphisms of the TLR4 gene, the R753Q polymorphism of the TLR2 gene, and the most common deletion of the C2 gene are prognostic factors for the development of microbial infections in AML patients.

The study included 107 patients of the Hematology Clinic of the University Hospital of Larissa. The polymorphisms studied were detected at frequencies similar to those of the general European population. We detected a high frequency of patients with both of the polymorphisms D299G & T399I of TLR4 gene, as usually reported.

In contrast to previous studies which have shown an association of TLR2 & TLR4 gene polymorphisms with increased susceptibility to microbial infections, in our study, no statistically significant difference was observed, none of the polymorphisms of the TLR2, TLR4 and C2 genes, compared to patients with a wild-type genotype, in terms of the incidence of infections and the occurrence of a microbial type.

Key words: AML, Acute Myeloid Leukemia, infections, SNP, TLR, TLR2, TLR4, C2, D299G, T399I, R753Q

Εισαγωγή

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία είναι μία αιματολογική κακοηθής νεοπλασία των κυττάρων της μυελικής σειράς. Αποτελεί την πιο κοινή οξεία λευχαιμία σε ενήλικες και αντιπροσωπεύει το 80% των περιστατικών αυτής της ομάδας. Η κλινική πορεία της νόσου είναι συνυφασμένη με μεγάλες περιόδους ουδετεροπενιών καθώς και πανκυτταροπενίας. Τέτοιες καταστάσεις οδηγούν στην αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης λοιμώξεων.

Οι λοιμώξεις πολλές φορές είναι ανασταλτικός παράγοντας θεραπειών. Οι ασθενείς είτε εμφανίζουν μακρά διαστήματα πυρετού κάτι το οποίο καθυστερεί την προβλεπόμενη στιγμή χορήγησης του χημειοθεραπευτικού σχήματος, είτε μετά την έναρξη της θεραπείας, εμφανίζονται λοιμώξεις οι οποίες δεν επιτρέπουν την ολοκλήρωση της θεραπείας. Η παρεμβολή στην θεραπεία αλλά και η επικινδυνότητα που φέρουν οι λοιμώξεις σε ήδη επιβαρυσμένους ασθενείς, οδηγούν σε αύξηση των διαστημάτων νοσηλείας, της νοσηρότητας και της θνητότητας.

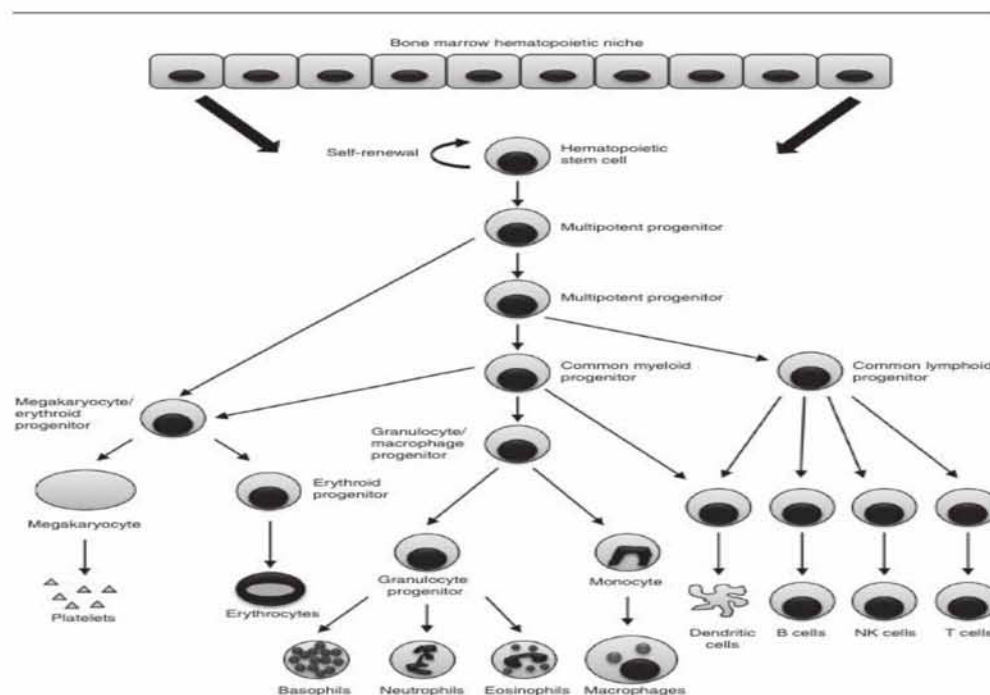
Η φυσική ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε μικροβιακά παθογόνα, ενώ παράλληλα αποτελεί τον ενορχηστρωτή της ειδικής ανοσίας. Διαταραχές στα κύρια μέρη της φυσικής ανοσίας όπως είναι οι υποδοχείς TLRs ή σε επιμέρους συστατικά άλλων συστημάτων όπως το συμπλήρωμα, φαίνεται πως δημιουργούν ένα δυσμενές υπόβαθρο για τον ήδη επιβαρυσμένο ασθενή. Κοινοί λειτουργικοί πολυμορφισμοί των TLR φαίνεται πως αποτελούν παράγοντες αρνητικής πρόγνωσης απέναντι στην πρόκληση λοιμώξεων. Επιπλέον γονιδιακά ελλείματα πρωτεϊνών του συμπληρώματος φαίνεται πως αποτελούν παράγοντες που σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις αυξάνουν την ευαισθησία απέναντι σε λοιμώξεις.

Για αυτούς τους λόγους κρίνεται επιτακτική ανάγκη διαρκούς διερεύνησης των παραγόντων που επιβαρύνουν την κλινική πορεία ασθενών με υψηλό βαθμό ευαισθησίας, όπως είναι οι ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Αιμοποίηση

Η αιμοποίηση είναι μια δια βίου διαδικασία μέσω της οποίας συντηρείται η ομοιόσταση των κυττάρων του αίματος. Στον μυελό των οστών βρίσκεται μία αιμοποιητική μήτρα, τα πρόδρομα πολυδύναμα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs), με δυνατότητα αυτό-ανανέωσης, μέσω των οποίων μπορούν να δημιουργηθούν όλα τα κύτταρα του "αιμοκυτταρικού" δέντρου. Κατά την πορεία της κυτταρικής διαφοροποίησης δημιουργούνται προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, χωρίς δυνατότητα αυτο-ανανέωσης, τα οποία αργότερα θα δώσουν τις επιμέρους κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 1 Απεικόνιση των σταδίων της αιμοποίησης "Αιμοποιητικό δέντρο". Ανατύπωση από (Hoggatt J. et.al 2013) (1)

Τέτοια προγονικά κύτταρα είναι το κοινό προγονικό λεμφοκύτταρο(CLP), ο οποίος θα δώσει στην συνέχεια την λεμφική σειρά. Ο πρόδρομος πρόγονος της μυελικής σειράς (CMP), το προγονικό κύτταρο των μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων (GMP) και η ερυθρά σειρά (MEP) που θα δώσει ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. (Εικόνα 1.) Το δίκτυο των αιμοκυττάρων περιπλέκεται σε όλο το φάσμα της βιολογικής υπόστασης των θηλαστικών. Βλάβες σε κυτταρικές σειρές, προγονικά και βλαστικά κύτταρα της αιμοποίησης δημιουργούν μια σειρά από παθολογικές καταστάσεις, με συχνότερες τις λευχαιμίες(1).

1.2 Λευχαιμίες

Οι λευχαιμίες αποτελούν κάποιες από τις σημαντικότερες νεοπλασίες των κυττάρων του αίματος, κυρίως την λευκοκυττάρων. Η πολυποικίλη σύσταση του αίματος συναρτά και μια σειρά διαφορετικών κακοηθειών, σχεδόν σε κάθε επιμέρους συστατικό.

Για τον λόγο αυτόν, οι λευχαιμίες διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες. Αυτές οι κατηγορίες είναι οι λευχαιμίες που λαμβάνουν χώρα σε κύτταρα της μυελικής σειράς, οι οποίες καλούνται ως μυελογενείς και τις λεμφογενείς που συμβαίνουν στα κύτταρα της λεμφικής σειράς.

Με βάση την παθολογική και κλινική πορεία της νόσου οι λευχαιμίες χωρίζονται σε οξείες και χρόνιες. Οι οξείες χαρακτηρίζονται από ραγδαία κινητικότητα της νόσου, με αυξημένο πολλαπλασιασμό των άωρων λευχαιμικών κυττάρων και βαρύτερη πρόγνωση.

Οι χρόνιες χαρακτηρίζονται από καλύτερη πρόγνωση, η αύξηση συμβαίνει με χαμηλότερους ρυθμούς και λαμβάνουν χώρα συνήθως σε ώριμα κύτταρα.

Η πλήρης παθογενετική αιτία δεν έχει κωδικοποιηθεί πλήρως, είναι πιθανό μεταλλάξεις σε πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα να οδηγούν σε αναστολή της διαφοροποίησης με παράλληλη κλωνική εξέλιξη σε κάποιο στάδιο της ωρίμανσης. (Mehranfaretal., 2017).(1)

Εκτός από τις δύο βασικές κατηγορίες των οξείων λευχαιμιών, μυελογενής και λεμφοκυτταρική, παρατηρείται μια κατηγορία λευχαιμιών που παρουσιάζουν συνδυασμό φαινοτύπων (MIXTED PHENOTYPE ACUTE LEUKEMIA (MPAL)).(2)

Τύπος κυττάρων	Οξείες	Χρόνιες
Λεμφική σειρά	Οξεία Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΟΛΛ, ALL) ή Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία ή Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ, CLL)
Μυελική σειρά	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ, AML)	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML, ΧΜΛ)

Πίνακας 1: Βασικές κατηγορίες λευχαιμιών.

1.2.1 Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι ένα νόσημα το οποίο περιέγραψε πρώτος ο Γάλλος ανατόμος Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau το 1827. Αποτελεί την πιο κοινή οξεία λευχαιμία σε ενήλικες που αντιπροσωπεύει το 80% των περιστατικών αυτής της ομάδας. Στις ΗΠΑ η συχνότητα της ΟΜΛ κυμαίνεται από 3 ως 5 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα του

πληθυσμού. Η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται με την ηλικία, ασθενείς κάτω των 65 έχουν συχνότητα εμφάνισης 2,7 στις 100.000, ενώ ασθενείς άνω των 65 ετών έχουν συχνότητα εμφάνισης 12,2 στους 100.000.(3)(4)

Η ΟΜΛ είναι μια μία αρκετά ετερογενής νόσος. Κατά την ΟΜΛ παρουσιάζεται οξεία αύξηση των ανώμαλων λευκοκυττάρων τα οποία εντοπίζονται συσσωρευμένα στον μυελό των οστών, παρεμποδίζοντας την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων του αίματος. Οι λευχαιμικοί βλάστες λόγω του υψηλού βαθμού της ετερογένειας τους, παρουσιάζουν ποικιλία παραλλαγών στον φαινότυπο και την μορφολογία, γεγονός που αντικατοπτρίζει και το ευρύ φάσμα της παθογένειας.

1.2.2 Πρωτοπαθής και Δευτεροπαθής ΟΜΛ.

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία διακρίνεται σε πρωτοπαθή (de novo AML) και σε δευτεροπαθή (secondary AML). Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται απευθείας με ΟΜΛ χωρίς κάποιο ιστορικό κακοήθους νόσου ή αυτοί οι οποίοι δεν φαίνεται να έχουν έρθει σε επαφή με κάποιον μεταλλαξιγόνο-γενετοξικό παράγοντα κατατάσσονται στους ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ.

Η δευτερογενής ΟΜΛ είναι μια μη επαρκώς προσδιορισμένη κατηγορία. Συχνά ο όρος δευτεροπαθής ΟΜΛ αναφέρεται σε περιπτώσεις ανάπτυξης ΟΜΛ μετά από προηγούμενη νόσο όπως το MDS ή μετά από θεραπείες κάποιας προηγούμενης κακοήθειας. Η χημειοθεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες και αναστολείς τοποϊσομεράσης II, η ακτινοβολία και τα φάρμακα όπως η αζαθειοπρίνη, αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες πρόκλησης s-ΟΜΛ (5). Ωστόσο δευτερογενής ΟΜΛ μπορεί να προκληθεί από άλλου τύπου θεραπείες όπως είναι οι αλλογενείς μεταμοσχεύσεις σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες (λέμφωμα Hodgkin). Τέλος περιβαλλοντικοί παράγοντες και επαγγελματικές καρκινογόνες ενώσεις, όπως το βενζόλιο, φαίνεται πως συχνά συσχετίζονται με την πρόκληση ΟΜΛ.(6)

1.2.3 Ταξινόμηση της νόσου

Το Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανικό (FAB) σύστημα τυποποίησης, αντιπροσωπεύει την πρώτη προσπάθεια διάκρισης μεταξύ των διάφορων τύπων ΟΜΛ. Ιδρύθηκε το 1976 και κατηγοριοποιεί την ΟΜΛ σε 8 υπότυπους (M0-M7). Οι υπότυποι αυτοί είναι βασισμένοι σε μορφολογικά και κυτταροχημικά χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων.

Αργότερα, το 2001 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ-WHO) εισήγαγε μια νέα ταξινόμηση στα πλαίσια της προόδου της διάγνωσης και διαχείρισης της νόσου. Το 2016

κυκλοφόρησε μια νέα αναθεωρημένη έκδοση της ταξινόμησης του Π.Ο.Υ η οποία ενσωματώνει τον συσχετισμό των γενετικών πληροφοριών με την μορφολογία, τον ανοσοφαινότυπο και την κλινική εικόνα, ορίζοντας 6 κύριες ομάδες ασθενειών. Α) ΟΜΛ σχετιζόμενη με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες. Β) ΟΜΛ σχετιζόμενη με μυελοδυσπλασία. Γ) ΟΜΛ σχετιζόμενη με θεραπεία. Δ) Μη ταυτοποιήσιμες ΟΜΛ. Ε) ΟΜΛ σχετιζόμενη με σάρκωμα του μυελού. Ζ) ΟΜΛ σχετιζόμενη με τον μυελικό πολλαπλασιασμό σε άτομα με τρισωμία 21 (Down syndrome). (3)

1.2.4 Παθοφυσιολογία των ΟΜΛ

Η ΟΜΛ μπορεί να προκύψει σε ασθενείς με υποκείμενες αιματολογικές διαταραχές ή ως συνέπεια προηγούμενης θεραπείας (π.χ έκθεση σε τοποϊσομεράσες ΙΙ, ακτινοβολία ή αλκυλιούντες παράγοντες). Εντούτοις ως επί τον πλείστον εμφανίζεται de novo κακοήθεια σε προηγούμενα υγιή άτομα. Ανεξάρτητα από τα αίτια πρόκλησης της νόσου, η παθογένεση η οποία διέπει τους ασθενείς με ΟΜΛ περιλαμβάνει τον ακανόνιστο πολλαπλασιασμό και την άναρχη διαφοροποίηση ενός πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων της μυελικής σειράς.

Κάποιες καλά χαρακτηρισμένες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις όπως η t(8:21)(q22;q22) ΟΜΛ, του πυρηνικού παράγοντα δέσμευσης (CBF-AML)(7) και η t(15-17) της οξεία προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας ALP, οδηγούν στην μεταβολή της φυσιολογικής ωρίμανσης των πρόδρομων μυελοκυττάρων, μέσω του σχηματισμού χειμερινών πρωτεϊνών (RUNX1-RUNX1T1 και PML-RARA(8), αντίστοιχα). (3)

Εκτός των μεγάλων χρωμοσωμικών ανωμαλιών, έχουν συσχετιστεί αρκετοί γενετικοί παράγοντες. Επί της ουσίας, το ποσοστό των ατόμων με ΟΜΛ που δεν παρουσιάζει χρωμοσωμικές μεταβολές, αλλά εμφανίζει γενετικές μεταλλάξεις, ενίοτε σχετιζόμενες με παθογένεση, αποτελεί το 97%.

Μελέτες σε πειραματόζωα οδήγησαν στην δημιουργία ενός μοντέλου με το οποίο μπορούν να εξετάζονται μεταλλάξεις οι οποίες πιθανώς συμβάλουν στην λευχαιμιόγνεση. Το μοντέλο αυτό δείχνει πως, για την δημιουργία των συνθηκών πρόκλησης της λευχαιμίας, απαιτούνται 2 τύπων μεταλλαγές. Οι μεταλλάξεις τύπου I, είναι μεταλλάξεις σε μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό κυτταρικών σειρών, αυτού του τύπου οι μεταλλάξεις πρέπει να συμβαίνουν σε συνδυασμό με τις μεταλλάξεις τύπου II. Οι μεταλλάξεις τύπου II συμβαίνουν σε γονίδια που εμπλέκονται στην αιμοποιητική διαφοροποίηση.

Μεταλλάξεις τύπου I όπως αυτές των γονιδίων FLT3(9) (εσωτερικοί επαναλαμβανόμενοι διπλασιασμοί, ITD και μεταλλάξεις σε περιοχές κινάσης τυροσίνης, TKD), K/NRAS, TP53 και c-KIT έχουν αντίστοιχα βρεθεί σε ποσοστά 28, 12, 8 και 4%. Μελέτες σε στερεούς όγκους και

αιματολογικές κακοήθειες επιδεικνύουν τον ρόλο μορίων μεταγωγής σήματος όπως το μόριο STAT3(10). Τέτοια μόρια επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων. Αύξηση της φωσφορυλίωσης τυροσίνης του STAT3 μέσω αύξησης κυτταροκινών (IL-6) ή μέσω μεταλλάξεων του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (FLT ITD ή χαμηλή συχνότητα JAK2) εμφανίζεται στο 50% των ασθενών με OML και υποδηλώνει κακή πρόγνωση. Κάποιες από τις συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις τύπου II, είναι αυτές σε γονίδια όπως το CEBRA και NPM1 που σε ασθενείς με OML συναντώνται σε ποσοστά 6 και 27% αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις αυτές συχνά συσχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση.

Τελευταία φαίνεται πως υπάρχει ένα "τρίτο χτύπημα", αυτή η κατηγορία εμπλέκει γονίδια επιγενετικών τροποποιήσεων. Κάποια από τα γονίδια, των οποίων ορισμένες μεταλλάξεις συναντώνται σε ασθενείς με OML σε ποσοστά άνω του 40%, είναι γονίδια που σχετίζονται με DNA-μεθυλίωση, όπως τα DNMT3A, TET2, IDH-1 & IDH-2. Επιπλέον, δυσλειτουργία ομοιωτικών γονιδίων HOX φαίνεται πως εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα της παρέκκλισης της αιμοποίησης και της πρόκλησης OML(11).

1.2.5 Διάγνωση

Σύμφωνα με τον WHO (2016) στα κριτήρια για την διάγνωση της OML απαιτείται να εντοπίζονται >20% μυελοβλάστες, στον μυελό ή το περιφερικό αίμα και η διάγνωση να γίνεται με πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής (MFC). Εξαιρέσεις στο κριτήριο του 20% των μυελοβλαστών, αποτελούν οι περιπτώσεις διάγνωσης CBF-AML, AML με μετάλλαξη του NMP1 και οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία APL, όπου στις παραπάνω περιπτώσεις το ποσοστό των βλαστών διαφέρει και είναι μοναδικό για κάθε περίπτωση. Επιπροσθέτως παρατηρούνται περιπτώσεις κατά τις οποίες οι βλάστες εκφράζουν δείκτες τόσο της μυελικής, όσο και λεμφικής σειράς, όπως στις περιπτώσεις MPAL. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες το ποσοστό των μυελοβλαστών υπερβαίνει το 20% αλλά δεν είναι δυνατή η τυποποίηση της νόσου, αυτές εντάσσονται στην κατηγορία των μη-προσδιορισμένων λευχαιμιών.(12)

1.3 Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία και Λοιμώξεις.

Οι ασθενείς με αιματολογική κακοήθεια κατά την περίοδο νοσηλείας τους σε αιματολογικές κλινικές είναι αρκετά ευάλωτοι σε λοιμώξεις από Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια και μυκητιάσεις(13). Οι ασθενείς με OML παρουσιάζουν μακρά διαστήματα ουδετεροπενιών, κάτι το οποίο φαίνεται πως αντικατοπτρίζει υψηλό κίνδυνο γενικευμένων λοιμώξεων και σήψης(14). Οι λοιμώξεις πολλές φορές παρατείνουν την διάρκεια της νοσηλείας, καθυστερούν ή εμποδίζουν την χορήγηση του χημειοθεραπευτικού σχήματος και αυξάνουν την

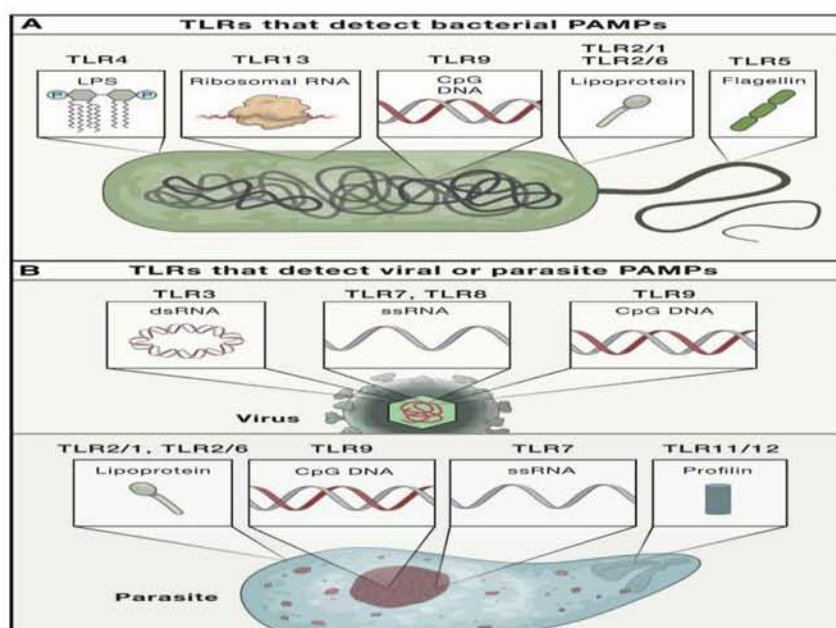
θνησιμότητα που σχετίζεται με την θεραπεία(15). Μελέτες πολυμορφισμών γονιδίων της φυσικής ανοσίας σε ΟΜΛ αλλά και άλλα νοσήματα δείχνουν πως κάποιοι πολυμορφισμοί αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες της πρόκλησης λοιμώξεων(16).

1.4 Υποδοχείς τύπου Toll TLRs.

Οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll Like Receptors, TLRs) είναι υποδοχείς PRRs (Pattern Recognition Receptors) της φυσικής ανοσίας, οι οποίοι αναγνωρίζουν διατηρημένες περιοχές μικροβιακής προέλευσης, γνωστές και ως PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns). Η αναγνώριση των PAMPs από τους PRRs οδηγεί στην πυροδότηση μονοπατιών που οδηγούν στην επαγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, χημοκινών, ιντερφερονών και την αύξηση συν-διεγερτικών μορίων. Επιπλέον διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται μέσω της σηματοδότησης τους οι TLRs είναι η αυτοφαγία, η απόπτωση, η γλυκόλυση, και η οξειδωτική φωσφορυλίωση.(17) Αρκετοί τύποι κυττάρων συμπεριλαμβανομένων κυρίως αυτών της φυσικής ανοσίας, όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), τα φυσικά φονικά (NKs) αλλά και κύτταρα που δεν ανήκουν στην ανοσιακό σύστημα όπως οι ινοβλάστες εκφράζουν υποδοχείς TLRs.

Πολλοί οργανισμοί εκφράζουν υποδοχείς της οικογενείας των TLR, στα θηλαστικά συγκεκριμένα έχουν αναφερθεί ως σήμερα 13 τύποι. Οι TLR1, -2, -4, -5, -6 και 10 εκφράζονται σε κυτταρικές επιφάνειες ενώ οι TLR3, -7, -8, -9, -11, -12 και -13 σε ενδοκυτταρικές περιοχές όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα λυσοσώματα.

Οι προσδέτες των TLRs κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και στοιχεία με βάση τα λιπίδια. Εικόνα (2)

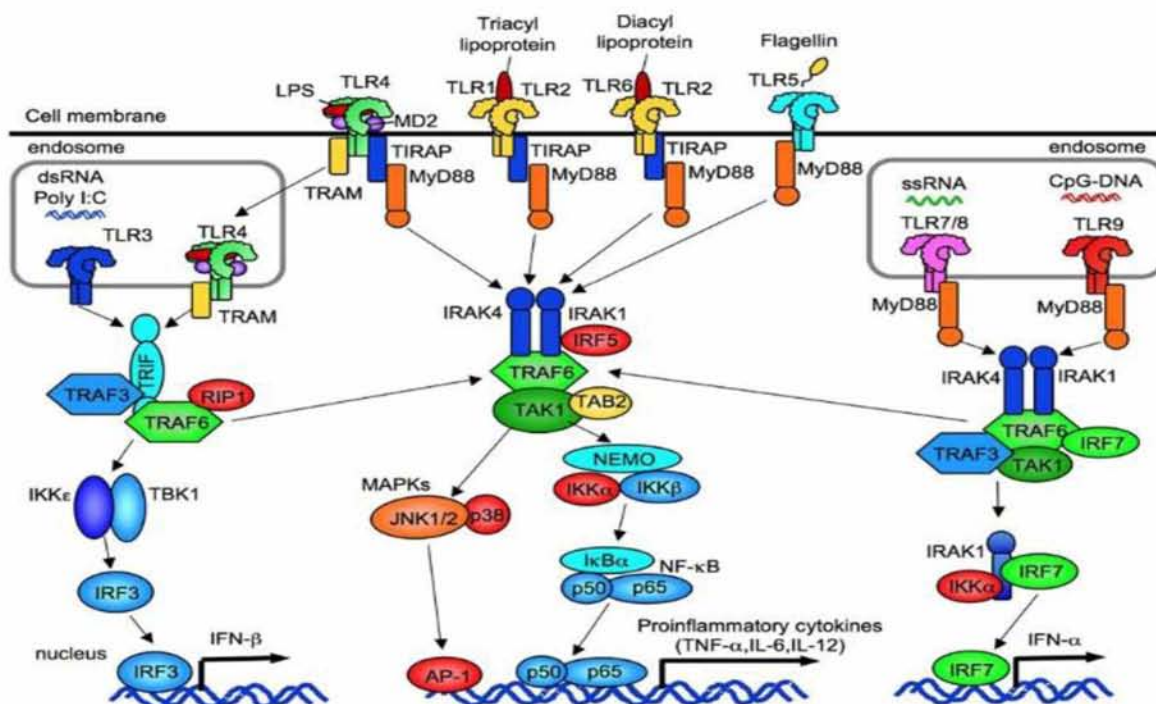


Εικόνα 2 Απεικόνιση των υποδοχέων TLRs και των αντίστοιχων προσδετών(PAMPs). Ανατύπωση από (Fitzerald KA, et.al 2020)(17)

Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I που στην εξωκυτταρική περιοχή τους διαθέτουν μια δομή πλούσια σε λευκίνη (LRR, Leucin Rich Repeat), η οποία αποτελεί την θέση αναγνώρισης των PAMPs καθώς και των DAMPs (Damage-associated molecular patterns), τα οποία προέρχονται από κατεστραμμένα-νεκρά κύτταρα του ξενιστή. Στην ενδοκυτταρική περιοχή των TLRs υπάρχει ο υποδοχέας TLR-ιντερλευκίνης 1(IL1) TIR1, ο οποίος απαιτείται για την μεταγωγή σήματος. Οι υποδοχείς TLRs μπορούν να διαχωριστούν σε 6 κύριες ομάδες, μέσω του αριθμού των επαναλήψεων των LRRs και μέσω του μοτίβου στρωμάτωσης 2 συστάδων κυστεΐνης που συνδέουν τα LRRs.(18)

Για την μεταγωγή σήματος μετά την διέγερση των TLRs, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται 5 μόρια προσαρμογείς. Τα μόρια αυτά είναι: ο παράγοντας μυελικής διαφοροποίησης 88 (My88D), η πρωτεΐνη προσαρμογέας (TRIF) που περιέχει δομή TIR και IFN-β, η πρωτεΐνη προσαρμογέας με δομή TIR (TIRAP) ή αλλιώς MAL (My88D adaptor like), η πρωτεΐνη προσαρμογέας που συσχετίζεται με το TRIF(TRAM) και τον SARM (sterile a and HEAT-Armadillo motifs-containing protein). Επιπλέον, έχει βρεθεί πως στην διαδικασία της σηματοδότησης συμμετέχουν και άλλες πρωτεΐνες όπως, η PI3K, SLP65/76 και η SCIMP(19). Διαφορετικοί TLRs αλληλεπιδρούν με διαφορετικά από αυτά τα 5 μόρια. Ο υποδοχέας TLR4 είναι ο μόνος υποδοχέας που αλληλοεπιδρά και με τα 5 παραπάνω μόρια Εικόνα(3) (20)(21)(22)

1.4.1 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος των TLRs.



Εικόνα 3 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος των υποδοχέων TLRs. Α) Μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω του μορίου MyD88 (κέντρο). Β) Εναλλακτικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω του μορίου MyD88 (αριστερά). Γ) Μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω του μορίου TRIF (δεξιά). Ανατύπωση από (Yang L. et.al 2012) (22).

1.4.2 Σηματοδότηση των TLRs μέσω του μορίου MyD88.

Το MyD88 ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων ιντερλευκίνης 1(IL-1R), αποτελεί ένα κοινό μόριο προσαρμογέα το οποίο συμπλέκεται με όλους του υποδοχείς TLR, εκτός τους TLR3. Η σηματοδότηση μέσω του MyD88 γνωστού και ως myddosome, οδηγεί στην ενεργοποίηση παραγόντων όπως ο NF-Κβ, το μονοπάτι MAP κινασών και το μονοπάτι IRF5, τα οποία οδηγούν στην έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι TNF-α, IL-1β και IL-6.

Το MyD88 συνδέεται απευθείας με τα ενεργοποιημένα διμερή των TLR, εξαιρουμένων των TLR2 και TLR4 στα οποία η σύνδεση γίνεται μέσω της μεσολάβησης του μορίου TIRAP. Το σύμπλοκο TLR/TIRAP-MAL, το οποίο σχηματίζεται μετά τον διμερισμό των TLR, ονομάζεται υπερμοριακό κέντρο οργάνωσης SMOC.(17) Το MyD88, αφού έρθει σε επαφή με το SMOC, στρατολογεί την κινάση 4 του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IRAK4) και δεσμεύεται μέσω της αλληλεπίδρασης με τις δομές θανάτου (DD). Έπειτα, η IRAK4 ενεργοποιεί τις IRAK1 και IRAK2. Με την ενεργοποίηση τους οι IRAKs, αποδεσμεύονται από το MyD88 και αλληλοεπιδρούν με τα μόρια TRAF6 και την E3 λιγάση της ουβικουιτίνης. Το TRAF6 και το E2 ουβικουιτινίωσυσζευκτικό ένζυμο Ubc13-Uev1A καταλύουν την σύνθεση πολυουβικουιτινικής αλυσίδα, η οποία συζευγνύεται με την Lys(63) του TRAF6 και του IRAK1, το οποίο ενεργοποιεί την κινάση TAK1(κινάση 1 του TGF-β) και τις πρωτεΐνες TAB2 και -3(TAK1 binding protein). Στην συνέχεια το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα του TAK1 ενεργοποιεί τα μονοπάτια MAPKs ERK1/2, p38 και JNK τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση του AP-1. Εικόνα(3A)

Παράλληλα το σύμπλεγμα TAK1 ενεργοποιεί το σύμπλοκο IKK το οποίο αποτελείται από τις κινάσες NEMO (IKKγ), IKKα, και IKKβ και φωσφοριλώνει την πρωτεΐνη IκBα. Με την φωσφοριλωση και ουβικουιτινίωση του IκBα, αποδεσμεύεται ο NF-κB ο οποίος μετατοπίζεται προς τον πυρήνα. Η μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα, έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως είναι οι TNF-α IL-6 και η IL-12. (22)(21) Εικόνα(3β)

Μία επιπλέον πορεία που μπορεί να διαγράψει το myddosome, μέσω της ενεργοποίησης του TBK1 από το TRAF6, είναι η σηματοδότηση διεργασιών όπως η γλυκόλυσης, Η TBK1 φωσφορυλιώνει την AKT κινάση, η οποία στην συνέχεια φωσφορυλιώνει την εξοκινάση. (17)

Η σηματοδότηση μέσω του myddosome των υποδοχέων TLR7 και 9, έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση ιντερφερόνων τύπου I. Εικόνα(3B)

1.4.3 Σηματοδότηση των TLRs μέσω του μορίου TRIF.

Οι υποδοχείς TLR4 και -3 εκτός από το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω του μορίου MyD88, διαθέτουν ένα επιπλέον σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο λαμβάνει χώρα μέσω του μορίου TRIF. Για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω TRIF, είναι απαραίτητη η εσωτερίκευση του TLR4 μέσω του CD14. Στην συνέχεια το TRIF συνδέεται με τις πρωτεΐνες TRAF3 και TRAF6. Το σύμπλοκο TRIF-TRAF3 σηματοδοτεί και ενεργοποιεί τις IKKs, το TBK και τον μεταγραφικό παράγοντα IRF3, ο οποίος επάγει την έκφραση ιντερφερονών τύπου β. Εναλλακτικά ο παράγοντας TRIF συνδέεται με την πρωτεΐνη προσαρμογέα RIP1, μέσω τις οποίας δημιουργεί ένα σύμπλεγμα σηματοδότησης το οποίο περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες TRAF6, TRADD, RIP1 και RIP3. Το προηγούμενο σύμπλοκο ενεργοποιεί την TAK1 μέσω της οποίας πραγματοποιείται σηματοδότηση μέσω MAPK κινασών και NF-κΒ ΕΙΚΟΝΑ(3Γ).(22)

1.4.4 Αρνητική ρύθμιση των TLRs.

Η σηματοδότηση των TLRs ελέγχεται από έναν αριθμό αρνητικών ρυθμιστών, έτσι ώστε το σήμα να σταματάει πριν η διέγερση προκαλέσει ζημιές στον οργανισμό. Στους αρνητικούς ρυθμιστές εμπεριέχονται παραλλάγματα ματίσματος των πρωτεϊνών προσαρμογέων ή άλλων σχετικών πρωτεϊνών, λιγάσες ουβικουιτίνης, από-ουβικουιτινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες, miRNAs, τα οποία καταστέλλουν την σηματοδότηση των TLR σε διάφορα επίπεδα. (22)

1.5 Υποδοχέας TLR4

1.5.1 Γενικά

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη Toll της *Drosophila* σηματοδοτεί αναπτυξιακές και ανοσολογικές διαδικασίες. Στον άνθρωπο, η ομόλογη της Toll πρωτεΐνη είναι ο υποδοχέας TLR4. Οι υποδοχείς TLR4 ήταν οι πρώτοι υποδοχείς που ανακαλύφθηκαν στον άνθρωπο. Το γονίδιο TLR4 χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 9q32-q33. Το γονίδιο του TLR4 παράγει ένα mRNA μεγέθους 7kb το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεγέθους 839a.a και μοριακού βάρους 90kD(23). Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον πλακούντα, τον σπλήνα και τα περιφερικά λευκοκύτταρα. Επιπλέον εντοπίζεται στα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και κάποιου τύπου Τ-λεμφοκυττάρων. Ο υποδοχέας TLR4 είναι βρίσκεται ως διμερές στην πλασματική μεμβράνη.

1.5.2 Προσδέτης του TLR4

Ο κύριος προσδέτης/διεγερτικό μόριο, του υποδοχέα TLR4 είναι το LPS (λιποπολυσακχαρίτης), υπάρχουν και άλλοι διεγέρτες, όπως είναι η πρωτεΐνη του περιβλήματος

του συγκιτιακού ιού, τα φωσφολιπίδια γλυκοινοσιτόλης του τρυπανοσώματος και η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60 (21).

Το μόριο LPS είναι ένα σύνθετο γλυκολιπίδιο και αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Το LPS αποτελείται από 3 επιμέρους συστατικά. Μια επαναλαμβανόμενη αλυσίδα ολιγοσακχαρίτη η οποία εκτίθεται σε υδρόφιλο διαλύτη, γνωστή ως O-αντιγόνο, έναν πολυσακχαρίτη-πυρήνα πλησίον της μεμβράνης και έναν σκελετό δι-γλυκοζαμίνης η οποία ενσωματώνεται στην μεμβράνη μέσω ποικίλου αριθμού αλυσίδων ακυλίου, το οποίο είναι το κύριο διεγερτικό στοιχείο του LPS και είναι γνωστό ως λιπίδιο A Εικόνα(2). Παρόλο που η σύνδεση του LPS με το TLR4 δεν είναι ισχυρή, ποσότητες LPS της τάξεως του picomolar είναι ικανές να διεγείρουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις σε μακροφάγα. Αυτό συμβαίνει λόγω των πρωτεϊνών που δρουν παράλληλα με την σύνδεση του υποδοχέα-προσδέτη.

Η εξωκυτταρική πρωτεΐνη δέσμευσης του LPS (LBP) έρχεται σε επαφή με την μεμβράνη του παθογόνου και διευκολύνει την πρωτεΐνη CD14 να συνδεθεί με το LPS. Η CD14 είναι είτε διαλυτή στην εξωκυττάρια περιοχή είτε είναι αγκυροβολημένη στο εξωτερικό μέρος της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων των θηλαστικών. Η δράση του μορίου CD14 είναι η μεταφορά ενός μορίου LPS στην πρωτεΐνη MD2. Το MD2 είναι μια πρωτεΐνη μικρού M.B. που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TLR4, σχηματίζοντας στον λειτουργικό υποδοχέα. Με την μεσολάβηση των μορίων CD14 στην μεταφορά του LPS στο MD2, συμβαίνει ο διμερισμός του TLR4. Ο διμερισμός του υποδοχέα TLR4 συμβαίνει μέσω της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις ακυλικές αλυσίδες του λιπιδίου A και περιοχές του ετεροδιμερούς TLR4-MD2.

Η μεταφορά του LPS από το LBP στο CD14 φαίνεται ότι δημιουργεί καταλληλότερες συνθήκες. Η μεταφορά μέσω αυτής της αλληλουχίας μορίων καθιστά το σύμπλεγμα ευαίσθητο. Μέσω αυτής της διαδικασίας επιτυγχάνεται επιπλέον ενίσχυση του σήματος και έτσι από λίγα μόνο βακτηριακά κύτταρα να ενεργοποιηθούν αρκετά μακροφάγα, με ισχυρότερη φλεγμονώδη αντίδραση.

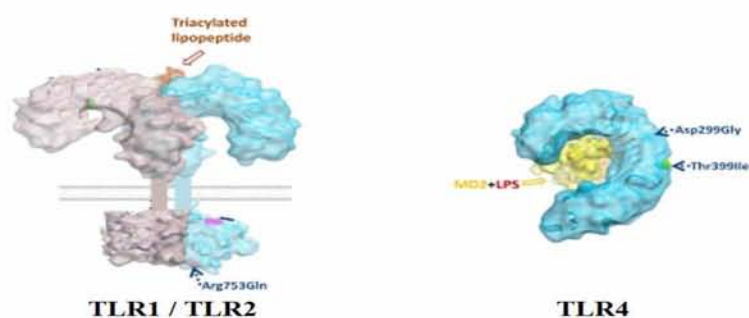
Ένα επιπλέον όφελος που προσδίδει η μεταφορά του LPS μέσω του CD14, είναι πως ορισμένα κύτταρα που εκφράζουν TLR4 στην επιφάνεια τους δεν εκφράζουν τον προσδεμένο CD14. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχει και μια διαλυτή μορφή του CD14. Η διαλυτή αυτή μορφή δίνει την δυνατότητα σε κύτταρα που δεν εκφράζουν CD14 όπως είναι τα ενδοθηλιακά, να λαμβάνουν το σήμα του LPS μέσω του κυκλοφορούντος στο αίμα CD14. Επιπλέον το CD14 εκκρίνεται στο μητρικό γάλα.

1.5.3 Μονοπάτι TLR4.

Η μεταγωγή σήματος του TLR4 δεν διαφέρει ιδιαίτερα από αυτή των άλλων υποδοχέων TLR. Ο υποδοχέας TLR4 ακολουθεί την σηματοδότηση μέσω των οδών του MyD88 και του TRIF όπως περιγράφεται στις ενότητες (2.4.2, 2.4.3) και αποτυπώνεται στην Εικόνα (3).

2.5.4 Γενετικοί πολυμορφισμοί του TLR4.

Εξαιτίας της καίριας θέσης των υποδοχέων TLRs στην έμφυτη ανοσία και όπως τελευταία φαίνεται και στην ειδική ανοσία, γενετικές μεταβολές επηρεάζουν την ευαισθησία και την ανοχή απέναντι σε παθογόνα. Ο TLR4 φαίνεται πως εμφανίζει πολύ μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών. Οι συχνότεροι πολυμορφισμοί του TLR4 φαίνεται πως εντοπίζονται στην εξωκυτταρική περιοχή LRR. Οι πρώτοι γενετικοί πολυμορφισμοί που αναφέρθηκαν ήταν δυο πολυμορφισμοί, αλλαγής αμινοξέος (D299G & T399I) του υποδοχέα TLR4. Οι πολυμορφισμοί (D299G & T399I) φαίνεται σύμφωνα με τους (Arbour, N.C. et al 2000 & Lorenz, E. 2002)(24) πως μειώνουν την αλληλεπίδραση του LPS με τον υποδοχέα και αυξάνουν την ευαισθησία των ασθενών σε σήψη απέναντι σε Gram-αρνητικά βακτήρια.



Εικόνα 4 Οι θέσεις των κοινών λειτουργικών πολυμορφισμών R753Q του TLR2 και D299G&T399I του TLR4. Ανατύπωση από (Skevaki C. et.al) (23).

Οι δύο συχνότεροι πολυμορφισμοί του TLR4, δύο παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, οι οποίες συχνά παρατηρούνται μαζί(25)(26), ο Asp299Gly (rs4986790, 896A/G) και ο Thr399Ile (rs4986791, 1196C/T) συμβαίνουν στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα. Η μετάλλαξη Asp299Gly έχει αναφερθεί ότι συσχετίζεται με χαμηλή απόκριση απέναντι σε εισπνεόμενο LPS. Η αμινο-τελική περιοχή του TLR4 διαθέτει δυο υψηλά συντηρημένες περιοχές. Η θέση 299 βρίσκεται ανάμεσα στην περιοχή δέσμευσης της MD-2 με τον TLR4. Η αύξηση της ελευθερίας περιστροφής του πεπτιδικού δεσμού και η μείωση του αρνητικού φορτίου του αμινοξέος στην θέση 299, μπορεί να μεταβάλει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο LPS/TLR4, κάτι το οποίο επηρεάζει τις ανοσιακές απαντήσεις(27). Μελέτη της δομής του TLR4 έδειξε πως ο

πολυμορφισμός Asp299Gly προκαλεί δομικές αλλαγές στον βρόγχο LRR, ενώ Thr399Ile δεν εμφανίζει κάποια δομική μεταβολή του υποδοχέα Εικόνα(4)(28). Άλλη μελέτη έχει δείξει πως ο πολυμορφισμός Asp299Gly και όχι ο Thr399Ile, μεταβάλλει την απόκριση απέναντι στο LPS, και μειώνει την έκκριση κυττοκινών και άλλων μορίων της φλεγμονής(29).

Ο πολυμορφισμός Asp299Gly φαίνεται πως συσχετίζεται με υψηλό κίνδυνο σήψης μετά από εγκαύματα, ενώ επιπλέον καταδεικνύεται μια τάση αύξησης της θνησιμότητας σε ασθενείς σηπτικού συνδρόμου (SIRS). Ενώ μια άλλη μελέτη (Komproti et.al 2017(30)) δείχνει έναν προστατευτικό ρόλο των πολυμορφισμών D299G&T399I αναφορικά με την εμφάνισή σήψης στις ΜΕΘ. Η παρουσία μεταλλάξεων Asp299Gly και Thr399Ile σε βρέφη, φαίνεται πως αποτελεί παράγοντα κινδύνου για λοίμωξη από μηνιγγιτιδοκόκκο μετά από επέμβαση. Ωστόσο σε άλλες μελέτες δεν φάνηκε συσχέτιση με ευαισθησία ή σοβαρότητα, αυτών των πολυμορφισμών, σε λοιμώξεων από μηνιγγιτιδοκόκκο. Σε μετά-ανάλυση ασθενών με φυματίωση, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική σύνδεση με τους πολυμορφισμούς, D299G&T399I. Επιπλέον οι πολυμορφισμοί Asp299Gly&Thr399Ile φαίνεται πως συσχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία εκδήλωσης τυφοειδούς πυρετού, μυκητιασικών λοιμώξεων από *Candida*, βρουκέλωση, υψηλού κινδύνου ελονοσίας σε παιδιά της Αφρικής, μητρική αναιμία και γέννηση παιδιών χαμηλού βάρους από μητέρες φορείς ελονοσίας, φλεγμονές της στοματικής κοιλότητας, λοίμωξη από ηπατίτιδα C δερματική λεισημανιώση και την φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD). Ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση με την εκδήλωση λοίμωξη από *Aspergillus* μετά από επέμβαση, κολπικές καντιτιάσεις, σπλαχνική λεισημανιώση και νόσο του Chagas. Ο γονότυπος Asp299Gly βρέθηκε πως αυξάνει τον κίνδυνο UTI (λοίμωξη του ουροποιητικού) σε παιδιά και ενήλικες, όμως άλλες μελέτες αντικρούουν αυτήν την ερμηνεία(27).

Επιπροσθέτως, πέρα από την εμφάνιση κινδύνου σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, οι πολυμορφισμοί 299&399 φαίνεται πως έχουν προστατευτικό ρόλο, όπως στην νόσο των λεγεωνάριων και την λοίμωξη από *Streptococcus Pneumoniae*. Σε μελέτες περιστατικών χρόνιας περιοδοντίτιδας και επιθετικής περιοδοντίτιδας αναφέρθηκε πως το SNP Asp299Gly αποτελεί παράγοντα κινδύνου πρόκλησης χρόνιας περιοδοντίτιδας ενώ το SNP Thr399Ileu έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της επιθετικής περιοδοντίτιδας(27). Επίσης οι (Liadaki et.al 2011(26)) έδειξαν πως το SNP Thr399Ileu μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης αμυγδαλίτιδας από *Haemophilus influenzae* και οι (Hawn et.al 2009 (31)) έδειξαν πως υπάρχει προστατευτικός ρόλος του Asp299Gly απέναντι στην εμφάνιση κυστίτιδας σε γυναίκες.

Ο ρόλος των πολυμορφισμών του TLR4 στην επίπτωση των λοιμώξεων, σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες δεν έχει αποσαφηνιστεί, καθώς ο αριθμός των μελετών δεν είναι μεγάλος. Σε ασθενείς με ΟΜΛ, η εμφάνιση των πολυμορφισμών Asp299Gly&Thr399Ile

συσχετίζεται με ευαισθησία στην πρόκληση πνευμονίας(14) και υψηλό κίνδυνο λοίμωξης από *Candida*(32). Ενώ σε μια διερεύνηση 172 ασθενών με ΟΜΑ από την Κίνα, δεν εντοπίστηκαν οι πολυμορφισμοί Asp299Gly & Thr399Ile(16).

1.6 Υποδοχέας TLR2

1.6.1 Γενικά για TLR2

Ο υποδοχέας TLR2 ανήκει στις τύπου I διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες διαθέτουν μια διαμεμβρανική περιοχή TIR, μια έλικα που διαπερνά την μεμβράνη και μια προεκβάλλουσα σωληνοειδούς μορφής περιοχή. Η εξωμεμβρανική περιοχή περιέχει την θέση αναγνώρισης LRR, η οποία αποτελείται από 16-28 επαναλήψεις λευκίνης. Ο λειτουργικός υποδοχέας TLR2 είναι ένα ετεροδιμερές και συμπλέκεται με τα μόρια TLR1 και TLR6(18).

Η πρωτεΐνη TLR2 αποτελείται από 784 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 84kD. Το γονίδιο του TLR2 χαρτογραφείται στην θέση 4q32 και έχει μέγεθος 26,5kb. Εκφράζεται υψηλά στα λευκοκύτταρα και ιδιαίτερα στα μονοκύτταρα, τον μυελό των οστών, στον λεμφικό ιστό και τον σπλήνα. Επιπλέον έχει φανεί πως εκφράζεται στους πνεύμονες και το ήπαρ των εμβρύων, ενώ εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και σε άλλους ιστούς(18)(23).

1.6.2 Προσδέτης του υποδοχέα TLR2.

Ο λειτουργικός υποδοχέας TLR2 είναι ετεροδιμερής και διμερίζεται με τους TLR1 και TLR6. Ο ετεροδιμερισμός αυτός είναι απαραίτητος για την αναγνώριση των παθογόνων και την μεταγωγή σήματος του υποδοχέα. Ο ομοδιμερισμός είναι εφικτός, όμως δεν έχει φανεί αν είναι λειτουργικός. Ο υποδοχέας πριν την επαφή του με τον προσδέτη φαίνεται πως προ-διμερίζεται στην πλασματική μεμβράνη. Ωστόσο, χωρίς την σύνδεση του προσδέτη, δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδοκυτταρικών τμημάτων.

Η κρυσταλλική δομή των 2 ετεροδιμερών δείχνει πως οι περιοχές LRRs μετά την σύνδεση τους, στην εξωκυττάρια περιοχή, παίρνουν σχήμα που μοιάζει με πέταλο ενώ η σύνδεση των διμερών με τον προσδέτη δημιουργεί ένα σχήμα που μοιάζει με το γράμμα (m) το οποίο σταθεροποιεί την δομή του υποδοχέα.

Οι προσδέτες του υποδοχέα TLR2 περιλαμβάνουν μόρια με τμήματα δι- και τρι-άκυλογλυκερόλης, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Ο κύριος προσδέτης του υποδοχέα TLR2 είναι οι λιποπρωτεΐνες, οι οποίες συναντώνται σε όλα τα βακτήρια και ιδιαίτερα στις μεμβράνες των Gram-θετικών βακτηρίων. Από τις λιποπρωτεΐνες ο υποδοχέας αναγνωρίζει μια λιποκυστεΐνη στο αμινοτελικό άκρο η οποία περιέχει μια N-ακυλο-S-διακυλογλυκερόλη. Η δομή αυτή έχει συνήθως τρεις αλυσίδες (τριάκυλ-) εξαιρουμένων των λιποπρωτεΐνων των μυκοβακτηριδίων τα οποία διαθέτουν δύο αλυσίδες (διάκυλ-). Οι υποδοχείς TLR1/2

αναγνωρίζουν τριάκυλο-γλυκερόλες, ενώ οι TLR2/6 διάκυλο-γλυκερόλες. Η σύνδεση του TLR1/2 με τις τριάκυλο-γλυκερόλες γίνεται μέσω σχηματισμού αμιδικού δεσμού. Η δομή του TLR6 εμποδίζει την δημιουργία αμιδικού δεσμού με τις τριακυλογλυκερόλες, κάτι το οποίο αντικατοπτρίζει την διαφοροποίηση της αναγνώρισης του προσδέτη.

Επιπροσθέτως υπάρχουν πρωτεϊνικά μόρια πλησίον του υποδοχέα τα οποία ενισχύουν την σύνδεση του με τον προσδέτη. Τέτοια μόρια είναι το CD14, CD36 και Dectin-1.

Τέλος υπάρχουν και ενδογενής προσδέτες των TLR2 οι οποίοι λειτουργούν ως σήματα ειδοποίησης κινδύνου. Ως τέτοιοι προσδέτες μπορούν να χαρακτηριστούν μόρια όπως β-ντεφενσίνες, θραύσματα υαλουρονικού, πρωτεΐνες θερμικού σοκ και πρωτεΐνες (high mobility group box 1)(18).

1.6.3 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος του υποδοχέα TLR2

Η μεταγωγή σήματος του υποδοχέα TLR2 ακολουθεί την σηματοδότηση μέσω του μορίου MyD88 Εικόνα(3A,B).

1.6.4 Πολυμορφισμοί του υποδοχέα TLR2.

Ο υποδοχέας TLR2 είναι ένας ετεροδιμερής υποδοχέας, ο οποίος αναγνωρίζει έναν μεγάλο αριθμό παθογόνων, κυρίως Gram-θετικών βακτηρίων. Στην πρωτεΐνη TLR2 εντοπίζονται αρκετοί πολυμορφισμοί. Ένας κοινός λειτουργικός πολυμορφισμός, ο οποίος είναι διατηρημένος και συχνά εμφανίζεται στους καυκάσιους, είναι ο πολυμορφισμός rs5743708. Η μετάλλαξη αυτή είναι μια μετάπτωση γουανίνης σε αδενίνη, η οποία αλλάζει το αμινοξύ αργυνίνη προς μια γλουταμίνη. Η θέση 753 βρίσκεται στην περιοχή TIR, η οποία βρίσκεται στο καρβοξύ-τελικό άκρο του TLR2 και έχει συσχετιστεί με μεταβολή της σηματοδότησης Εικόνα (4) (23)(18)(33).

Ο πολυμορφισμός φαίνεται πως μειώνει την λειτουργία του TLR2 και την έκκριση κυτταροκινών μετά από μόλυνση από *Borelli burgdorferi*(27). Παρουσία Arg753Gln συσχετίστηκε με παρεμβολή στην σηματοδότηση μέσω TLR1/2 το οποίο έχει ως συνέπεια την μείωση της προστασίας απέναντι στην ανάπτυξη της νόσου του Lyme. Ενώ σε in-vitro μελέτες μειώνει την απόκριση απέναντι σε βακτήρια και αυξάνει την ευαισθησία λοίμωξης από *Staphylococcus aureus*, κάτι το οποίο δεν επαναλαμβάνεται στα πειράματα των Moore et al. (34). Συνδυασμός του Arg753Gln με την μετάλλαξη Asp299Gly του TLR4 συσχετίστηκε με αύξηση του κινδύνου απώλειας της ακοής σε άτομα που επιβίωσαν από βακτηριακή μηνιγγίτιδα. Επιπλέον βρέθηκε μια ισχυρή συσχέτιση με τον κίνδυνο πρόκληση υποτροπιάζουσας

βακτηριακής λοίμωξης σε παιδιά στην Τουρκία ενώ στους Καυκάσιους παρατηρήθηκε αυξημένος κίνδυνος σήψης από Gram-αρνητικά βακτήρια και ανάπτυξη λοιμώξεων σε μονάδες εντατικής θεραπείας.(27) Σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος βρέθηκε πως το συγκεκριμένο SNP συσχετίζεται με υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, σηπτικά σοκ που οφείλονται σε Gram(+)βακτήρια, χωρίς να συσχετίζεται με την θνησιμότητα(35).

Το παραπάνω SNP βρέθηκε επιπλέον να σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στην ανάπτυξη και σοβαρότητα της φυματίωσης. Οι φορείς του ετερόζυγου γονοτύπου παρουσίασαν 1,6 φορές υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης φυματίωσης, ενώ οι φέροντες το ομόζυγο γονότυπο παρουσίασαν 6,04 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο. Αυτό αντικατοπτρίζει την λειτουργικότητα της μετάλλαξης(36).

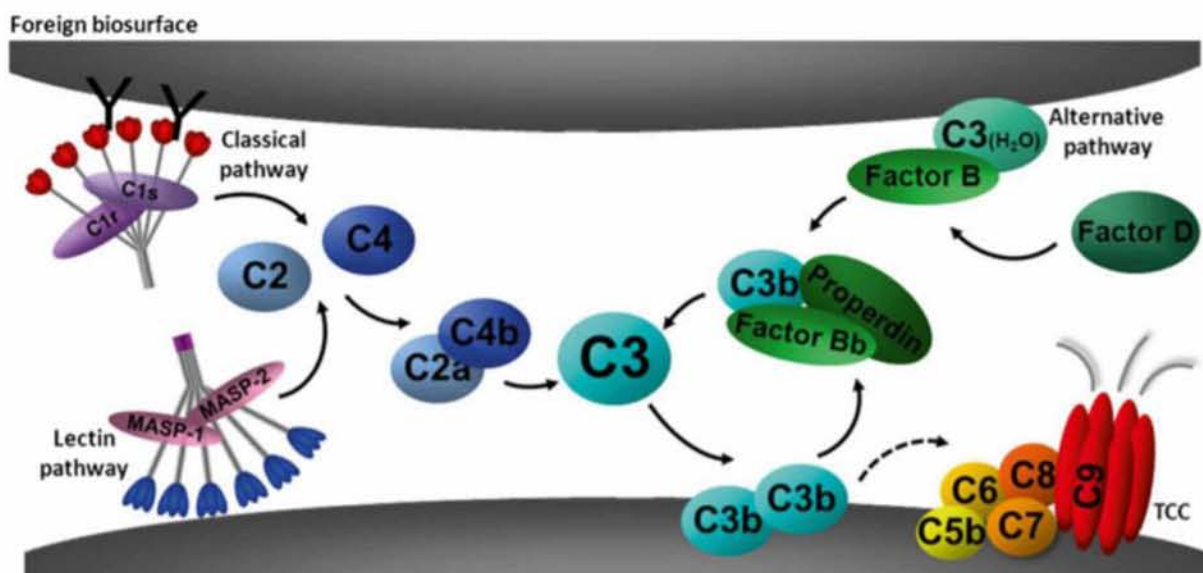
Σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, το SNP Arg753Gln έχει συσχετιστεί με αύξηση της ευαισθησίας για πρόκληση πνευμονίας και σήψης (14). Επιπλέον μια άλλη έρευνα δείχνει πως υπάρχει συσχέτιση με ευαισθησία σε μυκητιάσεις των πνευμόνων(37). Τέλος μια πρόσφατη έρευνα σε ασθενείς με OML στην Κίνα δεν εντόπισε τον παραπάνω πολυμορφισμό(16).

1.7 Σύστημα του Συμπλήρωματος

1.7.1 Γενικά για το Σύστημα του Συμπληρώματος

Το συμπλήρωμα αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της φυσικής ανοσίας. Η κύρια λειτουργία του είναι η ενεργοποίηση και ενορχήστρωση της φλεγμονώδους απόκρισης. Το συμπλήρωμα αποτελείται από περισσότερες από 30 διαλυτές πρωτεΐνες στην κυκλοφορία του αίματος. Το σύστημα του συμπληρώματος είναι καλά συντηρημένο και οι πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από την εμβρυική φάση σε αντίθεση με την ειδική ανοσία στην οποία συμβαίνουν σωματικές υπερμεταλλάξεις προς την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων. Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος περιέχουν μόρια που αναγνωρίζουν πρότυπα μοτίβα, όμοια με αυτά που αναγνωρίζουν οι TLRs. Τέτοια μοτίβα προέρχονται από παθογόνα (PAMPs) και ενδογενώς (DAMPs). Το συμπλήρωμα ενεργοποιείται άμεσα απέναντι στα παθογόνα, κάτι το οποίο κερδίζει χρόνο ως την αργή ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας. Αυτού του τύπου η ενεργοποίηση πολλές φορές αποτελεί δίκωπο μαχαίρι απέναντι στο οργανισμό, διότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου πρόκλησης παθολογικών καταστάσεων.

Το σύστημα του συμπληρώματος ακολουθεί 3 μονοπάτια ενεργοποίησης Εικόνα 5. Το μονοπάτι λεκτίνης, το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης και το εναλλακτικό μονοπάτι(38)(39).



Εικόνα 5 Ενδεικτικό σχήμα των 3^{ων} μονοπατιών ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του συμπληρώματος ξεκινά με την δέσμευση του συμπλέγματος C1q με τις PAMPs ενώ το μονοπάτι της λεκτινής με την δέσμευση των συλλεκτινών σε συνδυασμό με τα MASPs. Μετά την δέσμευση, τα δύο μονοπάτια μεσολαβούν στη διάσπαση των C2 και C4. Μετά από την διάσπαση των μορίων C2&C4 σχηματίζεται η C3 κονβεράση. Στο εναλλακτικό μονοπάτι, η C3 κονβεράση σχηματίζεται έπειτα από την αυθόρμητη υδρόλυση του παράγοντα B. Οι C3 κονβεράσες διασπούν την πρωτεΐνη C3 προς τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου μορίου C3b. Το C3b ανατροφοδοτεί τον σχηματισμό επιπλέον C3 κονβερασης και επιπλέον συμμετέχει στον σχηματισμό του τελικού δραστικού συμπλέγματος του συμπληρώματος (TCC) . Ανατύπωση από (Hein E, et.al 2015) (38).

1.8 Πρωτεΐνη του συμπληρώματος C2

1.8.1 Γενικά για την πρωτεΐνη C2

Η πρωτεΐνη C2 είναι μέρος του κλασικού μονοπατιού του συμπληρώματος. Ανήκει στις πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου III. Το γονίδιο χαρτογραφείται στην θέση 6p21.33. Αποτελείται από 752 aa και έχει μοριακό βάρος 83,2KD. Διασπάται από το ενεργοποιημένο C1 σε C2a & C2b. Το C2a είναι μια πρωτεάση σερίνης, συμπλέκεται με το παράγοντα C4b του συμπληρώματος ενεργοποιούν την C3. Στο C3 διασπά δεσμό Arg-Ser προς τον σχηματισμό C3a & C3b, ενώ στο C5 διασπά δεσμό Arg-Xaa προς την παραγωγή C5a & C5b (uniprot P06681).

1.8.2 Πολυμορφισμοί του μορίου C2

Η πιο κοινή διαταραχή του συμπληρώματος είναι η ανεπάρκεια παραγωγής του C2, ανιχνεύεται σε 1:20000 Καυκάσιους. Η πιο συχνή αιτία, περίπου το 90% των περιπτώσεων αποτελεί η ύπαρξη ενός γονιδιακού ελλείματος 28bp (rs9332736) στο γονίδιο που κωδικοποιεί το C2. Η έλλειψη αυτή είναι γνωστή και ως τύπου I έλλειψη του C2. Εξαιτίας του ελλείματος, το

αναγνωστικό πλαίσιο μετατοπίζεται με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα κωδικόνιο λήξης. Οι ομόζυγοι του παραπάνω ελλείματος δεν παράγουν την πρωτεΐνη C2. (40)

Οι ετερόζυγοι φορείς έχουν συσχετιστεί με αύξηση της ευαισθησίας απέναντι σε λοιμώξεις και αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης μηνιγγίτιδας.(41) Περίπου το ½ των ασθενών με έλλειψη του C2 εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων, ενώ έχουν συσχετισθεί αυτοάνοσες διαταραχές όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η πορφύρα Henoch-Schönlein και η πολυμυοσίτιδα. Ένα μεγάλο μέρος των ατόμων που φέρουν την έλλειψη δεν εμφανίζουν νοσολογικές εκδηλώσεις. Κατά τον συνεντοπισμό της έλλειψης του C2 με άλλες διαταραχές όπως είναι η COVID, η έλλειψη προπερδίνης υπάρχει συμβολή στην βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων(42)(43)(41).

Στην βιβλιογραφία δεν βρέθηκε κάποια μελέτη σε ασθενείς με ΟΜΛ που να έχει διερευνήσει την σχέση της έλλειψης τύπου I του C2 με την επίπτωση των λοιμώξεων.

Σκοπός της Εργασίας

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου σε περιπτώσεις άλλων ασθενειών φανέρωσαν έναν άμεσο λειτουργικό ρόλο των προς μελέτη πολυμορφισμών. Τόσο η μελέτη των (Liadaki et.al 2011(26)) όσο και των (Komproti et.al 2017(30)) δείχνουν πως μεταλλάξεις στον TLR4 προσδίδουν έναν προστατευτικό ρόλο έναντι των λοιμώξεων.

Παρόμοιες μελέτες σε ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία αναφέρουν αντίθετα αποτελέσματα. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων TLR2 & TLR4 φαίνεται πως έχουν μια αύξηση της ευαισθησίας έναντι κάποιων παθογόνων σε σχέση με τα άτομα που φέρουν γονότυπο αγρίου τύπου(14) (37) (32).

Σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν η διερεύνηση του ρόλου τεσσάρων πολυμορφισμών της φυσικής ανοσίας, στην επίπτωση λοιμώξεων σε ασθενείς με ΟΜΛ. Η διερεύνηση έγινε μέσω της καταγραφής των κλινικών στοιχείων των ασθενών και του προσδιορισμού των γονοτύπων τους, μέσω μοριακών τεχνικών.

2. Ειδικό μέρος

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

- I. Καταγραφή κλινικών στοιχείων ασθενών με ΟΜΛ της τελευταίας δεκαετίας, οι οποίοι είχαν συναινέσει για την δυνατότητα μελέτης του γενετικού τους υλικού.
 - Τύπος ΟΜΛ
 - Ηλικία διάγνωσης
 - Φύλο
 - Επιβίωση
 - Αριθμός λοιμώξεων
 - Τύπος λοιμώξεων
 - Αριθμός απομονωμένων παθογόνων
 - Τύπος απομονωμένων παθογόνων
 - Αιτία θανάτου
- II. Συλλογή του γενετικού υλικού από την βάση του εργαστηρίου.
- III. Συλλογή δειγμάτων από νέους ασθενείς, με παράλληλη καταγραφή των κλινικών στοιχείων.
- IV. Εξαγωγή ολικού DNA από τους νέους ασθενείς.
- V. Σχεδιασμός εκκινητών και PCR, οπτικοποίηση μέσω ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης .
- VI. Πέψη των προϊόντων με ένζυμα περιορισμού RFLP, οπτικοποίηση μέσω ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης.
- VII. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

2.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΥΛΙΚΟΥ

Η μελέτη μας περιελάμβανε 107 ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία από την αιματολογική κλινική του πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας. Οι ασθενείς που ήταν εν ζωή ήταν 12, ενώ οι υπόλοιποι 95 απεβίωσαν.

Στο σύνολο των ασθενών, 84 ασθενείς διαγνώστηκαν με πρωτοπαθή ΟΜΛ, ενώ σε 23 ασθενείς είχε προηγηθεί μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Οι γυναίκες ήταν 34 ενώ οι άντρες 73. Ο μέσος όρος της ηλικίας διάγνωσης των ασθενών, ήταν 68,1 έτη(S.D 12,6 έτη) και ο μέσος όρος του διαστήματος επιβίωσης των ασθενών που απεβίωσαν ήταν 9 μήνες.

Από την καταγραφή των κλινικών στοιχείων οι ασθενείς οι οποίοι απεβίωσαν κατά την διάρκεια ενεργούς λοίμωξης ήταν 35, ενώ για τους υπόλοιπους 72, ως αιτία θανάτου αναφέρθηκε αποκλειστικά η ΟΜΛ. Πίνακας 2

Descriptive Statistics		
Φύλο / Sex N (%)	Άντρες	73 (68.2)
	Γυναίκες	34 (31.8)
Κατάσταση N (%)	Εν ζωή	12 (11.2)
	Νεκροί	95 (88.8)
Θάνατος Λόγω Λοίμωξης N (%)	No	72 (67.3)
	Yes	35 (32.7)
Διάγνωση Πρωτοπαθής(1), Μετά από MDS (2)	Πρωτοπαθής	84 (78.5)
	Μετά από MDS	23 (21.5)
Ηλικία διάγνωσης μέσος όρος(S.D.)		68.1 (12.6)

Πίνακας 2 Περιγραφικά στοιχεία των προς μελέτη ασθενών.

Η καταγραφή των κλινικών στοιχείων όπως αναφορικά περιγράφεται παραπάνω, είχε 2 βασικούς άξονες. Πρώτον την καταγραφή των γενικών χαρακτηριστικών του ασθενή από το ιστορικό και την πορεία της νόσου. Δεύτερον, την καταγραφή των λοιμώξεων/εμπύρετων επεισοδίων, πριν, μετά και κατά τη διάρκεια της θεραπείας, με ταυτόχρονη καταγραφή του τύπου της λοίμωξης και συγκεκριμένα του μικροβιακού παθογόνου το οποίο προκαλεί την λοίμωξη.

2.3 Πειραματικό μέρος

2.3.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του PureLink[®] Genomic DNA kit (Qiagen & Invitrogen). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σύμφωνα με τον κατασκευαστή του Kit ήταν το εξής:

1. Σε σωληνάριο φυγοκέντρησης, erppendorf 1,5mL έγινε προσθήκη 200μL περιφερικού αίματος ή μυελού.
2. Ακολουθεί προσθήκη 20 μl proteinase K και 20μL RNAase, το οποία αναδεύονται και επωάζονται για 2min.
3. Προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης (PureLink[®] Genomic Lysis/Binding Buffer) και έπειτα ανάδευση με Vortex.
4. Το περιεχόμενο του βήματος (3) επωάζεται στους 55°C για διάρκεια 40-60min.

5. Μετά την επώαση προστίθεται 200μL αιθανόλη 96-100% και γίνεται μεταφορά του διαλύματος σε στήλη απομόνωσης (PureLink® Spin Column).
6. Έπειτα η στήλη φυγοκεντρήται στα 13.000 rpm για 1min, ακολουθούν 2 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με την προσθήκη 500μl wash buffer 1 (WB1) και 500μl wash buffer 2 (WB2) μέσω φυγοκέντρισης για 1min στα 13.000rpm και τέλος για να αφαιρεθεί η αιθανόλη του WB2 φυγοκεντρούνται για 3min στα 13.400rpm.
7. Η στήλη μετά το πέρας του βήματος (6) τοποθετείται σε καινούργιο Eppendorf 1,5ml και προστίθεται 100μl από το buffer έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer). Το elution buffer επωάζεται για 5min με την στήλη και στην συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση για 1min στα 13.400rpm.
8. Τα δείγματα DNA διατηρούνται στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.3.2 Εντοπισμός πολυμορφισμού rs9332736 του γονιδίου C2.

Ο εντοπισμός του πολυμορφισμού rs9332736 γίνεται μέσω PCR, καθώς πρόκειται για ένα έλλειμα 28 βάσεων κάτι που καθιστά δυνατή την διάκριση με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης. Το προς ενίσχυση τμήμα του γονιδίου C2 έχει μέγεθος 174bp, ενώ στα άτομα που φέρουν το έλλειμα θα ενισχυθούν 146bp. Αν το άτομο είναι ετερόζυγο θα εντοπιστούν μέσω ηλεκτροφόρησης 2 μπάντες φθορισμού, μια για τον φυσιολογικό και μία μικρότερου μεγέθους που θα αποτελεί το προϊόν ενίσχυσης του κλώνου με το έλλειμα. Αν το άτομο φέρει ομοζυγωτία της έλλειψης, τότε κατά την ηλεκτροφόρηση θα εμφανιστεί μόνο μία μπάντα φθορισμού, μεγέθους 146bp. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του pattern φθορισμού κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιείται ένας μάρτυρας αγρίου τύπου και ένα ετερόζυγο άτομο. Οι εκκινητές της αντίδρασης PCR και οι συνθήκες αναγράφονται στον Πίνακα 3 & 4 .

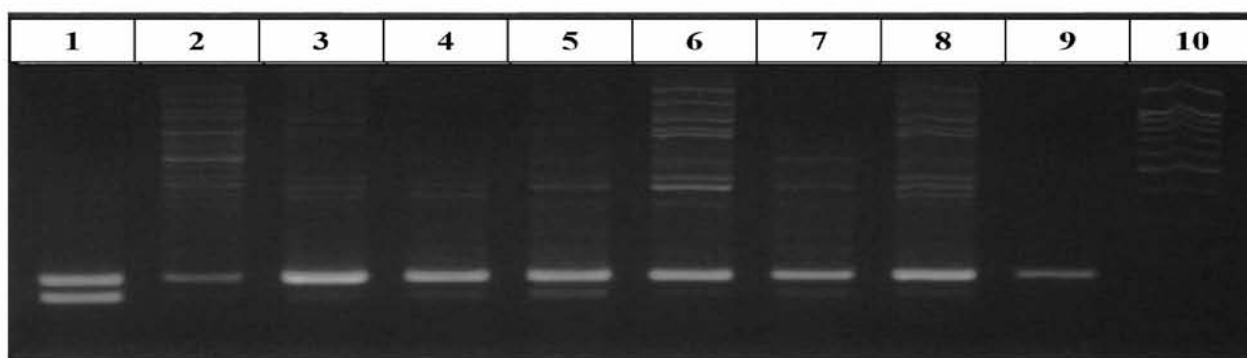
Η αντίδραση PCR έγινε με DFS-Taq polymerase. Η αντίδραση PCR οπτικοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης, πυκνότητας 3% για 30min. Ο προσδιορισμός της ύπαρξης ή όχι του πολυμορφισμού αποτυπώνεται στην Εικόνα(6), η μπάντα φθορισμού στην θέση (1) δείχνει το pattern ενός ετερόζυγου ατόμου, ενώ τα επόμενα 8 είναι αγρίου τύπου άτομα και στην θέση (10) απεικονίζεται ο Ladder.

Primers rs9332736	Forward 5'-GCCTGGGCCGTAAAATCCAAAT-3'
	Reverse 5'-GCACAGGAAGGCCTCTGCTGGA-3'

Πίνακας 3 Εκκινητές PCR για τον προσδιορισμό του rs9332736

<u>Συνθήκες</u>
Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 min
Αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec
Υβριδοποίηση στους 62°C για 45 sec
Επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec
Επανάληψη των βημάτων(2-4) για 30 κύκλους
Τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min

Πίνακας 4 Συνθήκες αντίδρασης PCR για τον προσδιορισμό του rs9332736



Εικόνα 6 Ηλεκτροφόρηση σε 3% gel agarose των προϊόντων της αντίδρασης PCR, για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού rs9332736.

2.3.3 Εντοπισμός των πολυμορφισμών rs4986790 D299G & rs4986791 T399I του γονιδίου TLR4.

2.3.3.1 Αντίδραση PCR για το γονίδιο TLR4.

Ο εντοπισμός των πολυμορφισμών rs4986790 & rs4986791 έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου(25). Οι συνθήκες των PCR για τους δυο πολυμορφισμούς είναι κοινές με την μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε διαφορετική Taq πολυμεράσης. Για τον rs4986790 χρησιμοποιήθηκε MyTaq polymerase ενώ για τον πολυμορφισμό rs4986791 χρησιμοποιήθηκε DFS-Taq Polymerase. Για την αξιολόγηση της αντίδρασης PCR ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε gel agarose πυκνότητας 2%, για 30min.

Στην αντίδραση ενίσχυσης του rs49868790–D299G έχει γίνει αλλαγή μιας βάσης στον Forward εκκινητή έτσι ώστε στο επόμενο βήμα, αυτό της πέψης, να υπάρξει θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού. Η αλλαγή αυτή φαίνεται παρακάτω στον πίνακα των εκκινητών. Η βάση

η οποία είναι υπογραμμισμένη, μια κυττοσίνη εν προκειμένου, αντικαθίσταται από την βάση της παρένθεσης (γουανίνη). Το προϊόν ενίσχυσης της PCR για το D299G έχει μέγεθος 249bp.

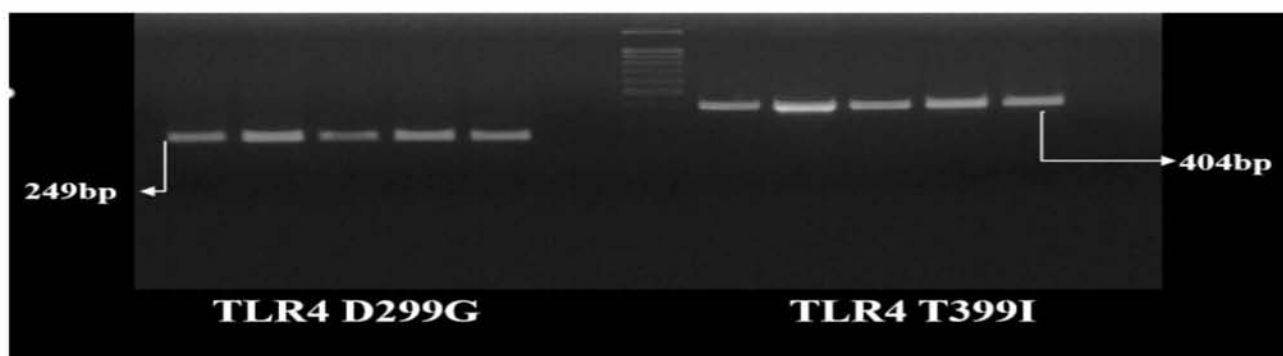
Η ίδια διαδικασία αλλαγής μιας βάσης, ακολουθήθηκε και στον πρόσθιο εκκινητή του rs4986791-T399I. Το προϊόν ενίσχυσης της PCR για το T399I έχει μέγεθος 404bp.

Εκκινητές / Primers rs4986790	Forward 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTC(G) <u>C</u> ATG-3'
	Reverse 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'
Εκκινητές / Primers rs4986791	Forward 5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGA(C) <u>G</u> AA-3
	Reverse 5'-ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGC-3'

Πίνακας 5 Εκκινητές πολυμορφισμών rs4986790 & rs4986791 του γονιδίου TLR4.

Συνθήκες
Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 min
Αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec
Υβριδοποίηση στους 57°C για 30 sec
Επιμήκυνση στους 72°C για 60 sec
Επανάληψη των βημάτων(2-4) για 32 κύκλους
Τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min

Πίνακας 6 Συνθήκες PCR για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών rs4986790 & rs4986791 του γονιδίου TLR4.



Εικόνα 6 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR των πολυμορφισμών rs4986790 & rs4986791.

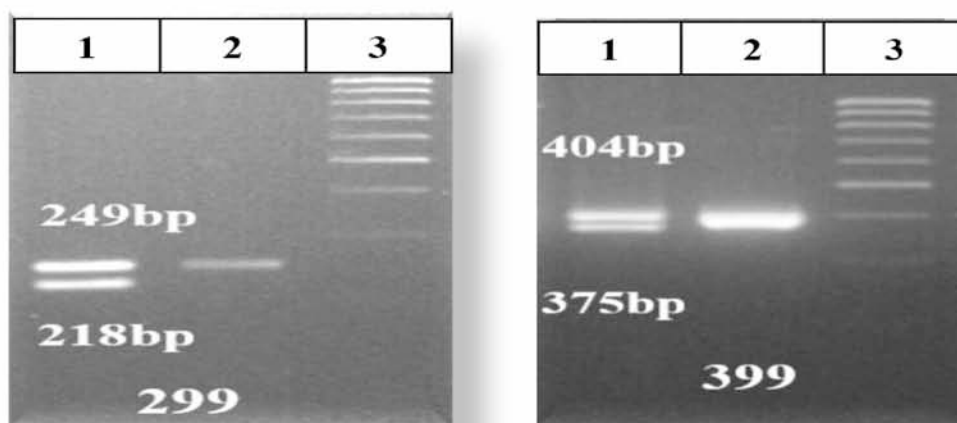
2.3.3.2 Πέψη με ένζυμα περιορισμού, RFLP του γονιδίου TLR4 για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών rs4986790 & rs4986791.

Τα προϊόντα της PCR αφού αξιολογηθούν με ηλεκτροφόρηση, υποβάλλονται σε αντίδραση πέψης με ένζυμα περιορισμού. Μετά την επώαση με τα ένζυμα περιορισμού

ηλεκτροφορούνται σε γέλη αγαρόζης, στο οποίο προσδιορίζεται ο γονότυπος σύμφωνα με το πρότυπο των φθορίζοντων θραυσμάτων. Για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού **rs4986790 (D299G)** χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού **NcoI**, ενώ για τον **rs4986791** το ένζυμο **HinfI**. Οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων αναφέρονται παρακάτω στον Πίνακα (7). Το πρωτόκολλο της διαδικασίας παρουσιάζεται σχηματικά παρακάτω στην Εικόνα (8). Σε κάθε αντίδραση πέψης υπάρχει, θετικός μάρτυρας. Ως θετικό μάρτυρα χρησιμοποιούμε το DNA ενός ατόμου που επιβεβαιωμένα φέρει την θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται ένα PCR προϊόν με θέση αναγνώρισης. Επιπλέον ηλεκτροφορείται αρνητικός μάρτυρας ο οποίος είναι το PCR προϊόν. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε γέλη αγαρόζης πυκνότητας 3% για 1h.

Τα αναμενόμενα προϊόντα (θραύσματα) της πέψης για τον πολυμορφισμό **rs4986790** έχουν τα εξής μεγέθη: α) για τα άτομα με γονότυπο **αγρίου** τύπου προκύπτει μια μπάντα φθορισμού μεγέθους 249bp, β) για τα άτομα με **ετερόζυγο** γονότυπο, προκύπτουν 2 μπάντες φθορισμού κατά την ηλεκτροφόρηση, μία άκοπη μεγέθους 249bp και μια που έχει υποστεί πέψη μεγέθους 218bp, γ) τα άτομα με **ομόζυγο** για τον πολυμορφισμό, γονότυπο, εμφανίζουν μια μπάντα φθορισμού μεγέθους 218bp.

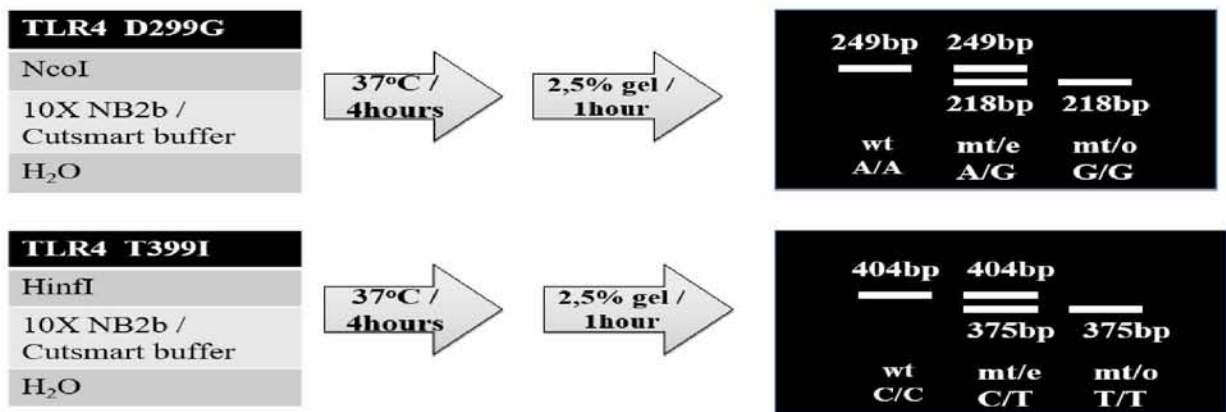
Τα αναμενόμενα προϊόντα (θραύσματα) της πέψης για τον πολυμορφισμό **rs4986791** έχουν τα εξής μεγέθη: α) για τα άτομα με γονότυπο **αγρίου** τύπου προκύπτει μια μπάντα φθορισμού μεγέθους 404bp, β) για τα άτομα με **ετερόζυγο** γονότυπο, προκύπτουν 2 μπάντες φθορισμού κατά την ηλεκτροφόρηση, μία άκοπη μεγέθους 404bp και μια που έχει υποστεί πέψη μεγέθους 375bp, γ) τα άτομα με **ομόζυγο** για τον πολυμορφισμό, γονότυπο, εμφανίζουν μια μπάντα φθορισμού μεγέθους 375bp.



Εικόνα 7 Αριστερά) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του πολυμορφισμού rs4986790 του γονιδίου TLR4 ((1) ετερόζυγο άτομο., (2) άτομο με γονότυπο αγρίου τύπου, (3) Ladder). Δεξιά) rs4986791 ((1) ετερόζυγο άτομο., (2) άτομο με γονότυπο αγρίου τύπου, (3) Ladder).

Πολυμορφισμός	Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης
TLR4-D299G(rs4986790)	NcoI	5'...C↓C A T G G...3'
TLR4-T399I(rs4986791)	HinfI	5'...G↓ A N T C...3'

Πίνακας 7 Ένζυμο περιορισμού για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών του γονιδίου TLR4.



Εικόνα 8 Πρωτόκολλο πέψης με ένζυμο περιορισμού των πολυμορφισμών rs4986790 & rs4986791.

2.3.4 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs5743708 του γονιδίου TLR2.

2.3.4.1 Αντίδραση PCR για το γονίδιο TLR2

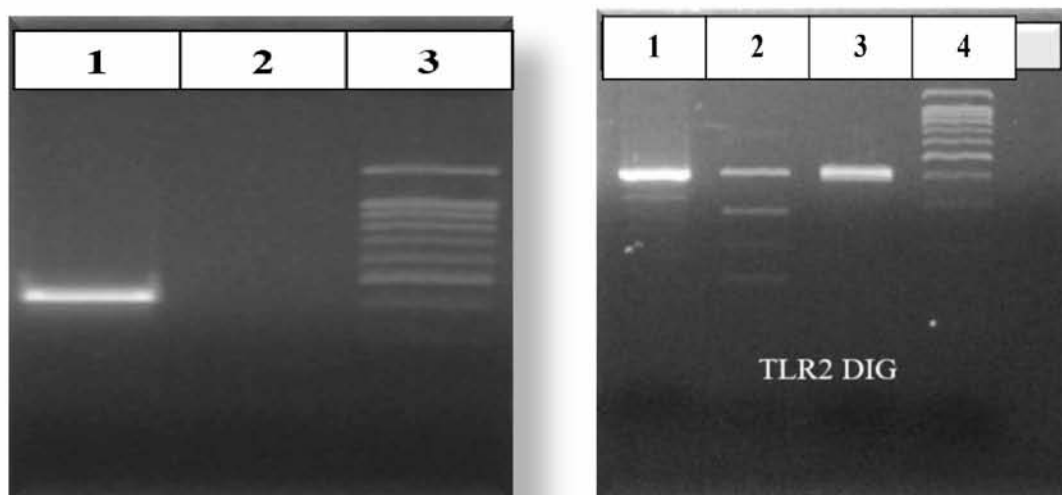
Ο εντοπισμός του πολυμορφισμού **rs5743708**, ομοίως με το TLR4 έγινε με πρωτοκόλλου προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου(26). Η διαδικασία εντοπισμού έγινε μέσω της μεθόδου RFLP. Κατά την αντίδραση PCR ενισχύθηκε ένα τμήμα DNA μεγέθους **430bp**. Για την PCR χρησιμοποιήθηκε το DFS-Taq polymerase. Τα προϊόντα της PCR αξιολογήθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε agarose gel, πυκνότητας 2% για 30min.

Εκκινητές /	Forward 5'-TATGGTCCAGGAGCTGGAGA-3'
Primers rs5743708	Reverse 5'-TGACATAAAGATCCCAACTAGACAA-3'

Πίνακας 8 Εκκινητές PCR για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού rs5743708 του γονιδίου TLR2.

Συνθήκες
Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 min
Αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec
Υβριδοποίηση στους 64°C για 30 sec
Επιμήκυνση στους 72°C για 45 sec
Επανάληψη των βημάτων(2-4) για 38 κύκλους
Τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min

Πίνακας 9 Συνθήκες PCR για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού rs5743708 του γονιδίου TLR2.



Εικόνα 9 Αριστερά) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR του πολυμορφισμού rs5743708. Δεξιά) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης του πολυμορφισμού rs5743708 του γονιδίου TLR2 ((1) άτομο με γονότυπο αγρίου τύπου, (2) ετερόζυγο άτομο, (3) άπεπτο προϊόν PCR, (4) Ladder).

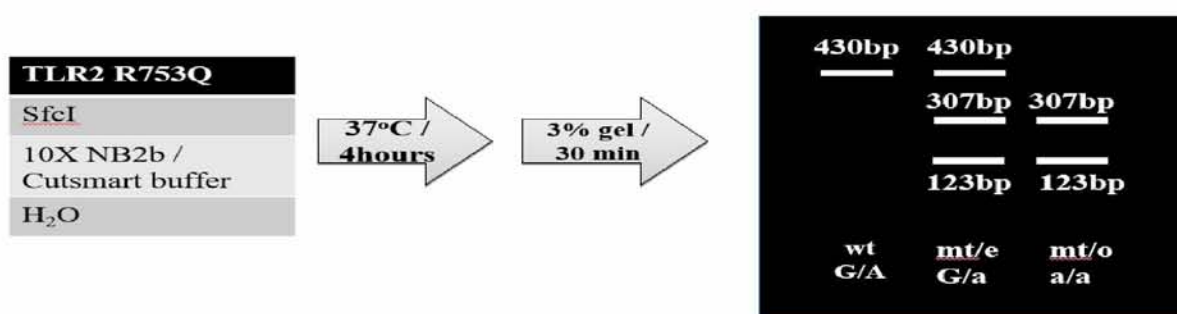
2.3.4.2 Πέψη με ένζυμα περιορισμού, RFLP του γονιδίου TLR2 για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών rs5743708.

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με ένζυμα περιορισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το **SfcI**, σύμφωνα με το πρωτόκολλο στην Εικόνα (10). Σε κάθε αντίδραση πέψης υπάρχει θετικός μάρτυρας. Ως θετικό μάρτυρα χρησιμοποιούμε το DNA ενός ατόμου που επιβεβαιωμένα φέρει την θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού, εναλλακτικά χρησιμοποιείται ένα PCR προϊόν με θέση αναγνώρισης. Επιπλέον ηλεκτροφορείται αρνητικός μάρτυρας ο οποίος είναι το PCR προϊόν. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης πυκνότητας 3% για 30min.

Τα αναμενόμενα προϊόντα (θραύσματα) της πέψης για τον πολυμορφισμό **rs5743708** έχουν τα εξής μεγέθη: α) για τα άτομα με γονότυπο **αγρίου τύπου** προκύπτει μια μπάντα φθορισμού μεγέθους 430bp, β) για τα άτομα με **ετερόζυγο** γονότυπο, προκύπτουν 3 μπάντες φθορισμού κατά την ηλεκτροφόρηση, μία άκοπη μεγέθους 430bp και δύο μπάντες από την αλυσίδα που έχει υποστεί πέψη 307bp και 123bp, γ) τα άτομα με **ομόζυγο** για τον πολυμορφισμό, γονότυπο, εμφανίζουν δύο μπάντες από την αλυσίδα που έχει υποστεί πέψη 307bp και 123bp

Πολυμορφισμός	Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης
TLR2-R753Q(5743708)	SfcI	5'...C↓TRYAG...3'

Πίνακας 10 Ένζυμο περιορισμού για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού rs5743708 του γονιδίου TLR2.



Εικόνα 10 Πρωτόκολλο πέψης με ένζυμα περιορισμού των πολυμορφισμών rs4986790 & rs4986791.

2.4 Στατιστική ανάλυση.

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το εργαλείο SPSS 2017. Η μελέτη της συσχέτισης ανάμεσα στην εμφάνιση των πολυμορφισμών και των λοιμώξεων, έγινε μέσω Fisher exact test. Σε όλες τις αναλύσεις, το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $\alpha=0.05$ (δικατάληκτο).

3. Αποτελέσματα

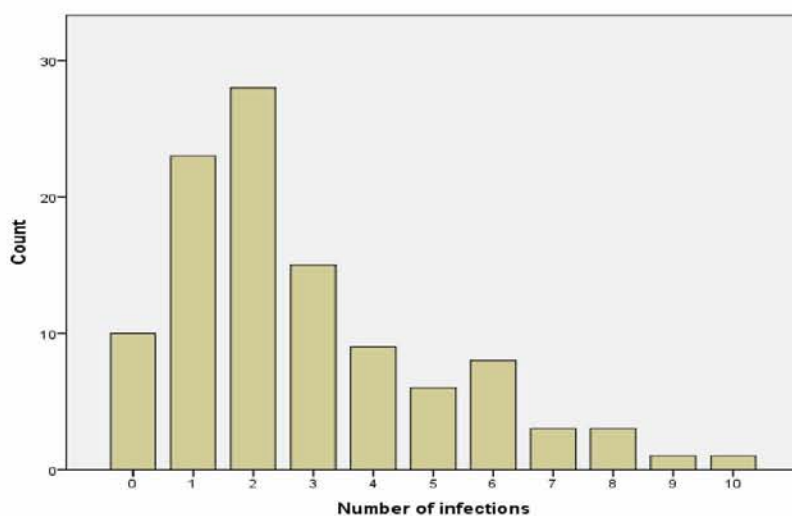
3.1 Κλινικά στοιχεία.

3.1.1 Αριθμός λοιμώξεων κατά την διάρκεια της θεραπείας.

Μετά την καταγραφή των κλινικών στοιχείων των ασθενών με ΟΜΛ προέκυψαν τα εξής δεδομένα. Το 90,7% των ασθενών, παρουσίασε τουλάχιστον μια λοίμωξη, κατά την διάρκεια της νοσηλείας-θεραπείας. Το 61,7% των ασθενών εμφάνισαν 1-3 λοιμώξεις κατά την διάρκεια της νοσηλείας. Το 21,7% των ασθενών εμφάνισε 3-6 λοιμώξεις. Ενώ το υπόλοιπο 6,8% των ασθενών εμφάνισαν 7-10 λοιμώξεις.

		Συχνότητα N (%)
Αριθμός Λοιμώξεων	0	10 (9.3)
	1	23 (21.5)
	2	28 (26.2)
	3	15 (14.0)
	4	9 (8.4)
	5	6 (5.6)
	6	8 (7.5)
	7	3 (2.8)
	8	3 (2.8)
	9	1 (0.9)
	10	1 (0.9)

Πίνακας 11 Αριθμός λοιμώξεων σε ασθενείς με ΟΜΛ κατά την διάρκεια της νοσηλείας



Γράφημα 1 Ποσοστά αριθμού λοιμώξεων κατά την διάρκεια της νοσηλείας.

3.1.2 Απομονωμένοι μικροοργανισμοί.

Από την μελέτη των κλινικών φακέλων των ασθενών με ΟΜΛ, καταγράφηκαν οι μικροοργανισμοί οι οποίοι απομονώθηκαν μετά από λοίμωξη.

Στο μεγαλύτερο ποσοστό των λοιμώξεων (52%) δεν απομονώθηκε κάποιος μικροοργανισμός. Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν σε επεισόδια λοιμώξεων ήταν 40,2% βακτήρια, 4,7% μύκητες και σε ποσοστό 6,5% παρατηρήθηκαν και οι δύο ομάδες.

		Συχνότητα N (%)
Βακτήρια / Μύκητες	Μη απομονωμένος Μικροοργανισμός / Απουσία Λοίμωξης	52 (48.6)
	Βακτήρια	43 (40.2)
	Μύκητες	5 (4.7)
	Βακτήρια / Μύκητες	7 (6.5)

Πίνακας 12 Ποσοστά απομονωμένων μικροοργανισμών κατά την διάρκεια των λοιμώξεων.

Έπειτα, οι μικροοργανισμοί ομαδοποιήθηκαν. Η πρώτη ομαδοποίηση αφορά την διαφοροποίηση μεταξύ βακτηρίων και μυκήτων. Η επόμενη ομαδοποίηση έγινε εντός του συνόλου των βακτηρίων και προέκυψαν οι ομάδες των Gram-θετικών κόκκων, Gram-αρνητικών βακίλων και αυτή των *Clamylidia pneumoniae*. Τέλος ανάμεσα στους Gram-αρνητικών βάκιλων, προέκυψαν οι ομάδες των εντεροβακτηριοειδών και των μη ζυμωτικών (non-fermentative) βακτηρίων. Το σύνολο των μικροοργανισμών περιγράφεται στον Πίνακα 13 .

Απομονωμένοι Μικροοργανισμοί	Είδος / Species	Συχνότητα N%
Gram-Θετικοί Κόκκοι	<i>Staphylococcus Aureus</i>	8,41%
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,93%
	<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	0,93%
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,93%
	<i>Staphylococcus hominis</i>	0,93%
	<i>Streptococcus mitis</i>	0,93%
	<i>Streptococcus oralis</i>	0,93%
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,93%
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,93%
	<i>Enterococcus faecium</i>	10,28%

Gram-αρνητικοί Βάκιλοι	Enterobacterales	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13,08%
		<i>Escherichia coli</i>	8,41%
		<i>Enterococcus Clocae</i>	0,93%
		<i>Proteus mirabilis</i>	2,80%
		<i>Enterobacter cloacal</i>	0,93%
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,87%
		<i>Citrobacter freundii</i>	0,93%
	Non-fermentative	<i>Acenitobacter baumani</i>	6,54%
		<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	3,74%
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,41%
Chlamydia pneumoniae		<i>Clamydia genus</i>	0,93%
Μύκητες		<i>Candida albicans</i>	6,54%
		<i>Aspergillus spp.</i>	2,80%

Πίνακας 133 Πίνακας απομονωμένων μικροοργανισμών από την καταγραφή των κλινικών χαρακτηριστικών.

3.2 Γονότυποι των ασθενών με ΟΜΛ.

Μετά την ανάλυση του συνόλου των ασθενών μέσω της μεθόδου RFLP, προέκυψαν τα παρακάτω ποσοστά αλληλομόρφων (Πίνακας 15).

	C2 SNP (rs9332736) N (%)	TLR4 299 SNP (rs4986790) N (%)	TLR4 399 SNP (rs4986791) N (%)	TLR4 299 & 399 N (%)	TLR2 753 SNP (rs5743708) N (%)
Ετερόζυγα άτομα / συχνότητα γονοτύπου	3 (2.8)	12 (11.2)	12 (11.2)	9 (8.4)	3 (2.8)
Αγρίου Τύπου / Wild type	104 (97.2)	95 (88.8)	95 (88.8)	98 (91.6)	104 (97.2)
Συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλίου / Mutant allele frequency	1,4%	5,6%	5,6%	4,2%	1,4%
Συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου / Ευρωπαϊκός πληθυσμός	0,005% (καυκάσιοι)	5,5%	6,9%	-	3,1%

Πίνακας 14 Παρατηρούμενη συχνότητα των αλληλομόρφων στα προς μελέτη γονιδίων.

Οι πολυμορφισμοί rs4986790 D299G και rs4986791 T399I του γονιδίου TLR4 εμφανίστηκαν σε ίδια ποσοστά (11,2%), ενώ 9 ασθενείς (8,4%) έφεραν και τους δυο πολυμορφισμούς.

Ο πολυμορφισμός rs5743708 R753Q του γονιδίου TLR2, παρατηρήθηκε σε 3 ασθενείς (2,8%).

Η έλλειψη του γονιδίου C2 rs9332736 παρατηρήθηκε σε τρεις ασθενείς (2.8%).

3.3 Συσχετίσεις

3.3.1 Έλεγχος συσχέτισης του ελλείματος C2.

Η έλλειψη του γονιδίου C2 όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 15, δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση κανενός μικροοργανισμού στα επεισόδια λοιμώξεων των ασθενών με OML.

Αρχικά στο ερώτημα αν υπάρχει κάποια προδιάθεση με παθογόνα του βασιλείου των βακτηρίων ή των μυκήτων, τα P-Value ήταν P-Value Bacteria = 0.598 και P-Value Fungi = 0.303 αντίστοιχα. Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά της συνθήκης του (P<0.05) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

Στο δεύτερο ερώτημα, αν δηλαδή το έλλειμα του C2 εμφανίζει κάποια συσχέτιση με Gram(-), Gram(+) ή Chlamydia . Τα P-Value είχαν τις τιμές P-Value Gram(+) = 0.537, P-Value Gram(-) = 0.999 και P-Value Chlamydia = 0.999 αντίστοιχα.

Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά της συνθήκης του (P<0.05) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

C2 SNP (rs9332736)	Λοίμωξη από Gram (+)		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	2	1	0.537	0.57 (0.05-6.55)
Αγρίου Τύπου / Wild type	81	23		
	Λοίμωξη από Gram (-)		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	2	1	0.999	1.20 (0.11-13.67)
Αγρίου Τύπου / Wild type	65	39		
	Λοίμωξη από Μύκητες		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	2	1	0.303	0.24 (0.02-2.83)
Αγρίου Τύπου / Wild type	93	11		
	Chlamydia genus		Fisher's Exact Test	Odds Ratio

	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	3	0	0.999	n/a
Αγρίου Τύπου / Wild type	103	1		
	Λοίμωξη απο Βακτήρια		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	1	2	0.598	0.43 (0.04-4.87)
Αγρίου Τύπου / Wild type	56	48		

Πίνακας 15 Αποτελέσματα της ανάλυσης Fisher, για το έλλειμμα του γονιδίου C2. (P-Value<0.05)

3.3.2 Έλεγχος συσχέτισης του SNP TLR4 D299G

Ο πολυμορφισμός D299G του γονιδίου TLR4, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 16, δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση κανενός μικροοργανισμού στα επεισόδια λοιμώξεων των ασθενών με ΟΜΛ.

Αρχικά στο ερώτημα αν υπάρχει κάποια προδιάθεση με παθογόνα του βασιλείου των βακτηρίων ή των μυκήτων, τα P-Value ήταν P-Value_{Bacteria} = 0.767 και P-Value_{Fungi} = 0.999 αντίστοιχα. Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά της συνθήκης του (P<0.05) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

Στο δεύτερο ερώτημα, αν δηλαδή ο πολυμορφισμός D299G εμφανίζει κάποια συσχέτιση με Gram(-), Gram(+) ή Chlamydia. Τα P-Value είχαν τις τιμές P-Value_{Gram(+)} = 0,729 P-Value_{Gram(-)} = 0.760 και P-Value_{Chlamydia} = 0.999 αντίστοιχα.

Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά της συνθήκης του (P<0.05) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

TLR4 299 SNP rs4986790	Λοίμωξη από Gram (+)		Fisher's Exact Test	Odds Ratio (M/W)
	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	9	3	0.729	0.85 (0.21-3.43)
Αγρίου Τύπου / Wild type	74	21		
	Λοίμωξη από Gram (-)		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	7	5	0.760	0.82 (0.24-2.78)
Αγρίου Τύπου / Wild type	60	35		
	Λοίμωξη απο Μύκητες		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	

Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	11	1	0.999	1.44 (0.17-12.26)
Αγρίου Τύπου / Wild type	84	11		
	Chlamydia genus		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	12	0	0.999	n/a
Αγρίου Τύπου / Wild type	94	1		
	Λοίμωξη από Βακτήρια		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	7	5	0.767	1.26 (0.37-4.25)
Αγρίου Τύπου / Wild type	50	45		

Πίνακας 16 Αποτελέσματα της ανάλυσης Fisher, για τον πολυμορφισμό D299G γονιδίου TLR4. (P-Value<0.05)

3.3.3 Έλεγχος συσχέτισης του SNP TLR4 T399I

Ο πολυμορφισμός T399I του γονιδίου TLR4, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 19, δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση κανενός μικροοργανισμού στα επεισόδια λοιμώξεων των ασθενών με OMA.

Αρχικά στο ερώτημα αν υπάρχει κάποια προδιάθεση με παθογόνα του βασιλείου των βακτηρίων ή των μυκήτων, τα P-Value ήταν P-Value_{Bacteria} = 0.541 και P-Value_{Fungi} = 0.353 αντίστοιχα. Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά της συνθήκης του (P<0.05) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

Στο δεύτερο ερώτημα, αν δηλαδή ο πολυμορφισμός T399I εμφανίζει κάποια συσχέτιση με Gram(-), Gram(+) ή Chlamydia. Τα P-Value είχαν τις τιμές P-Value_{Gram(+)} = 0,461 P-Value_{Gram(-)} = 0.126 και P-Value_{Chlamydia} = 0.999 αντίστοιχα.

Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά της συνθήκης του (P<0.05) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

TLR4 399 SNP	Λοίμωξη από Gram (+)		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	8	4	0.461	0.53 (0.15-1.95)
Αγρίου Τύπου / Wild type	75	20		
	Λοίμωξη από Gram (-)		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	

Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	5	7	0.126	0.38 (0.11-1.29)
Αγρίου Τύπου / Wild type	62	33		
	Λοίμωξη απο Μύκητες		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	12	0	0.353	n/a
Αγρίου Τύπου / Wild type	83	12		
	Chlamydia genus		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	12	0	0.999	n/a
Αγρίου Τύπου / Wild type	94	1		
	Λοίμωξη απο Βακτήρια		Fisher's Exact Test	Odds Ratio
	No	Yes	P-Value	
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	5	7	0.541	0.59 (0.18-1.99)
Αγρίου Τύπου / Wild type	52	43		

Πίνακας 17 Αποτελέσματα της ανάλυσης Fisher, για τον πολυμορφισμό T399I γονιδίου TLR4. (P-Value<0.05)

3.3.4 Έλεγχος συσχέτισης του συνεντοπισμού των SNP TLR4 D299G & T399I

Ο συνεντοπισμός των πολυμορφισμών D299G & T399I του γονιδίου TLR4, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 20, δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση κανενός μικροοργανισμού στα επεισόδια λοιμώξεων των ασθενών με OML.

Αρχικά στο ερώτημα αν υπάρχει κάποια προδιάθεση με παθογόνα του βασιλείου των βακτηρίων ή των μυκήτων, τα P-Value ήταν P-Value_{Bacteria} = 0.731 και P-Value_{Fungi} = 0.593 αντίστοιχα. Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά της συνθήκης του (P<0.05) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

Στο δεύτερο ερώτημα, αν δηλαδή ο συνεντοπισμός των πολυμορφισμών D299G & T399I εμφανίζει κάποια συσχέτιση με Gram(-), Gram(+) ή Chlamydia. Τα P-Value είχαν τις τιμές P-Value_{Gram(+)} = 0,416 P-Value_{Gram(-)} = 0.290 και P-Value_{Chlamydia} = 0.999 αντίστοιχα. Τα P-value

αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά της συνθήκης του ($P < 0.05$) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

TLR4 299 & 399	Λοίμωξη από Gram (+)		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	6	3	0.416	0.55 (0.13-2.37)
Αγρίου Τύπου / Wild type	77	21		
	Λοίμωξη από Gram (-)		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	4	5	0.290	0.44 (0.11-1.76)
Αγρίου Τύπου / Wild type	63	35		
	Λοίμωξη από Μύκητες		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	9	0	0.593	n/a
Αγρίου Τύπου / Wild type	86	12		
	Chlamydia genus		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	9	0	0.999	n/a
Αγρίου Τύπου / Wild type	97	1		
	Λοίμωξη από Βακτήρια		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	4	5	0.731	0.68 (0.17-2.68)
Αγρίου Τύπου / Wild type	53	45		

Πίνακας 18 Αποτελέσματα της ανάλυσης Fisher, για τον συνεντοπισμό των πολυμορφισμών D299G&T399I γονιδίου TLR4. ($P\text{-Value} < 0.05$)

3.3.5 Έλεγχος συσχέτισης του SNP TLR2 R753Q

Ο πολυμορφισμός R753Q του γονιδίου TLR2, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 21, δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση κανενός μικροοργανισμού σε επεισόδια λοιμώξεων των ασθενών με ΟΜΛ.

Αρχικά στο ερώτημα αν υπάρχει κάποια προδιάθεση με παθογόνα του βασιλείου των βακτηρίων ή των μυκήτων, τα P-Value ήταν $P\text{-Value}_{\text{Bacteria}} = 0.598$ και $P\text{-Value}_{\text{Fungi}} = 0.999$ αντίστοιχα. Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα της συνθήκης του ($P < 0.05$) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

Στο δεύτερο ερώτημα, αν δηλαδή ο πολυμορφισμός R753Q εμφανίζει κάποια συσχέτιση με Gram(-), Gram(+) ή Chlamydia. Τα P-Value είχαν τις τιμές P-Value_{Gram(+)} = 0,126 P-Value_{Gram(-)} = 0.999 και P-Value_{Chlamydia} = 0.999 αντίστοιχα.

Τα P-value αυτής της υπόθεσης ήταν πολύ μεγαλύτερα της συνθήκης του (P<0.05) κάτι το οποίο απορρίπτει την υπόθεση συσχέτισης.

TLR2 753	Λοίμωξη από Gram (+)		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	1	2	0.126	0.13 (0.01-11.32)
Αγρίου Τύπου / Wild type	82	22		
	Λοίμωξη από Gram (-)		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	2	1	0.999	1.20 (0.11-11.67)
Αγρίου Τύπου / Wild type	65	39		
	Λοίμωξη από Μύκητες		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	3	0	0.999	n/a
Αγρίου Τύπου / Wild type	92	12		
	Chlamydia genus		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	3	0	0.999	n/a
Αγρίου Τύπου / Wild type	103	1		
	Λοίμωξη από Βακτήρια		Fisher's Exact Test P-Value	Odds Ratio
	No	Yes		
Ετερόζυγο άτομο / Mutant type	1	2	0.598	0.43 (0.04-4.87)
Αγρίου Τύπου / Wild type	56	48		

Πίνακας 19 Αποτελέσματα της ανάλυσης Fisher, για τον πολυμορφισμό R399Q γονιδίου TLR2. (P-Value<0.05)

4. Συζήτηση

Οι ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία παρουσιάζουν κατά την διάρκεια της νοσηλείας-θεραπείας, μεγάλες περιόδους ουτετεροπενιών. Αυτό τους καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητους σε λοιμώξεις από μια σειρά παθογόνων. Η πρόκληση των λοιμώξεων κατά την διάρκεια της θεραπείας, έχει ως συνέπεια την παρεμπόδιση της προβλεπόμενης θεραπείας, αυξάνοντας παράλληλα την νοσηρότητα και την θνητότητα των ασθενών. Το 95% των ασθενών με ΟΜΛ εμφανίζουν κατά την διάρκεια της θεραπείας, τουλάχιστον μια λοίμωξη, με μέσο όρο 1,4 λοιμώξεις ανά ασθενή (15).

Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό των ασθενών που παρουσίασαν τουλάχιστον μία λοίμωξη κατά την διάρκεια της θεραπείας-νοσηλείας είναι αρκετά κοντά με αυτόν της βιβλιογραφίας. Το 90,7% των ασθενών παρουσίασε τουλάχιστον μια λοίμωξη, με μέσο όρο 2,8 λοιμώξεις κατά την διάρκεια της θεραπείας. Οι ασθενείς που απεβίωσαν ενώ είχαν ενεργή λοίμωξη είχαν ποσοστό 32,7%, το οποίο είναι ιδιαίτερα υψηλό (15). Αξίζει να σημειωθεί πως καταγράφηκαν αρκετά περιστατικά λοιμώξεων από παθογόνα τα οποία αποτελούν παράγοντες υψηλού κινδύνου. Τέτοια παθογόνα ήταν Gram-αρνητικά βακτήρια όπως τα *Acinetobacter baumani*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Proteus mirabilis* και περιπτώσεις ανθεκτικών *Pseudomonas aeruginosa*. Η εμφάνιση τέτοιων παθογόνων αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την θνητότητα.

Προηγούμενες αναφορές για τα SNPs των γονιδίων TLR4 & TLR2 σε ασθενείς με ΟΜΛ έχουν δείξει πως τα SNPs D299G, T399I και R753Q προσδίδουν ευαισθησία σε λοιμώξεις. Πιο συγκεκριμένα σε ασθενείς με ΟΜΛ, η εμφάνιση των πολυμορφισμών Asp299Gly & Thr399Ile του γονιδίου TLR4 συσχετίστηκε με ευαισθησία στην πρόκληση πνευμονίας(14) και υψηλό κίνδυνο λοίμωξης από *Candida*(32). Ενώ ο πολυμορφισμός του γονιδίου TLR2 R753Q έχει συσχετιστεί με αύξηση της ευαισθησίας για πρόκληση πνευμονίας, σήψης (14) και μυκητιάσεων των πνευμόνων (37). Μελέτες του εργαστηρίου μας, σε άλλου τύπου ασθένειες, (Liadaki et.al 2011(26)) & (Komproti et.al 2017(30)) έχουν αντιθέτως καταδείξει μια προστατευτική δράση έναντι ορισμένων παθογόνων.

Τα ερωτήματα τα οποία τέθηκαν μετά την καταγραφή των κλινικών στοιχείων παράλληλα με την αρχική υπόθεση ήταν αν οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν, μαρτυρούν κάποια πρόγνωση (αρνητική ή θετική), πρώτον απέναντι σε λοιμογόνους παράγοντες όπως βακτήρια ή μύκητες και δεύτερον απέναντι σε Gram-(-), Gram-(+) ή *Chlamydia*.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν πως ο πολυμορφισμός D299G του γονιδίου TLR4 ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 5,6% (allele frequency). Το ποσοστό εμφάνισης στον ευρωπαϊκού πληθυσμού είναι 5,5%. Οι ασθενείς που μελετήθηκαν φέραν ομόζυγο γονότυπο αγρίου τύπου και ετερόζυγο. Δεν ανιχνεύτηκε άτομο που έφερε την μετάλλαξη σε ομόζυγη μορφή. Μετά από

την ανάλυση της υπόθεσης συσχέτισης, με την οποία εξετάσαμε το ενδεχόμενο το συγκεκριμένο SNP να αυξάνει την ευαισθησία έναντι παθογόνων, δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά απέναντι σε όλα τα ενδεχόμενα λοιμώξεων σε σύγκριση με τον γονότυπο αγρίου τύπου. Παρομοίως το SNP T399I το οποίο ανιχνεύτηκε σε ίδιο ποσοστό με το D299G. Το ποσοστό του αλληλομόρφου στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 6,9%. Ο ετερόζυγος γονότυπος του T399I δεν φαίνεται να προσδίδει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα άτομα που ήταν ομόζυγα προς το αγρίου τύπου αλληλόμορφο.

Οι πολυμορφισμοί D299G & T399I συνεντοπίστηκαν σε ποσοστό 4,7 % (allele frequency) κάτι το οποίο συμφωνεί με τα ευρήματα του εργαστηρίου αλλά και της βιβλιογραφίας(30). Κάτι το οποίο αντίστοιχα με τους επιμέρους πολυμορφισμούς, δεν παρουσίασε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στην επίπτωση των λοιμώξεων.

Το SNP R753Q του γονιδίου TLR2 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 1,4% (allele frequency). Η συχνότητα του αλληλομόρφου στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 3,1%. Αντίστοιχα με τους παραπάνω πολυμορφισμούς του γονιδίου TLR4 δεν συσχετίζεται με ευαισθησία ή προστασία απέναντι σε λοιμώξεις παθογόνων.

Το έλλειμα του γονιδίου C2 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 2,8%. Οι τρεις ασθενείς, φέραν το αλληλόμορφο σε ετερόζυγη μορφή. Όλοι οι υπόλοιποι ήταν αγρίου τύπου. Όμοιως με τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με την επίπτωση σε λοιμώξεις.

Προηγούμενες μελέτες στην βιβλιογραφία αναφέρουν συσχετίσεις των πολυμορφισμών των γονιδίων TLR2 & TLR4, με την αύξηση της ευαισθησίας έναντι κάποιου τύπου λοίμωξης. Σε αυτές τις μελέτες δεν αναφέρεται πουθενά, πλην μιας, αυτής των (Fisher M, et.al 2016), ο λοιμογόνος παράγοντας. Στην μελέτη των (Schnetzke U. et.al 2015) αναφέρεται πως οι πολυμορφισμοί των TLR4 & TLR2 αντικατοπτρίζουν αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης πνευμονίας μετά από θεραπεία. Παρόλη την τεκμηριωμένη μελέτη της παραπάνω εργασίας, δεν αναφέρεται ο αιτιολογικός παράγοντας ο οποίος μέσω του πολυμορφισμού οδηγεί στην αύξηση ευαισθησίας έναντι πρόκλησης πνευμονίας. Στην μελέτη των (Fisher M, et.al 2016) εν αντιθέσει με αυτή των (Schnetzke U. et.al 2015) τίθεται η συνιστώσα του λοιμογόνου παράγοντα, όμως περιορίζει την μελέτη στην εμφάνιση ενός τύπου λοίμωξης. Αναγωγές που δεν συμπεριλαμβάνουν την συνιστώσα του αιτιολογικού παράγοντα, είναι πιθανό να εμπεριέχουν κάποιου είδους προκατάληψη (bias). Ως εκ τούτου, θεωρούμε πως τέτοιου είδους αναγωγές απαιτούν αποσαφήνιση της συλλογιστικής πορείας, καθώς εύκολα μπορεί να εξαχθούν ασαφή αποτελέσματα τα οποία αργότερα θα μεταφραστούν με διαφορετικό τρόπο.

4.1 Συμπεράσματα

Σε αντίθεση με τις αναφορές των (Schnetzke. et.al 2015, , Et.al, Fisher M 2016. et.al) οι οποίοι συσχετίζουν την εμφάνιση των SNP (D299G, T399I & R753Q) των γονιδίων TLR4 και TLR2, με ευαισθησία έναντι μικροβιακών λοιμώξεων. Στην μελέτη μας, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση των SNP των γονιδίων TLR2, TLR4 και C2 σε σχέση με την εμφάνιση απομονωθέντων λοιμογόνων παραγόντων. Για αυτό θεωρούμε πως αυτοί οι πολυμορφισμοί δεν αποτελούν βιοδεικτες προφύλαξης έναντι πρόκλησης λοιμώξεων. Τα δεδομένα μας θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση μελλοντικής μετά-ανάλυσης, με σκοπό την αποσαφήνιση του ρόλου των πολυμορφισμών έναντι λοιμώξεων σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Βιβλιογραφία

1. Hoggatt J, Pelus LM. Hematopoiesis. *Brenner's Encycl Genet* Second Ed. 2013;3:418–21.
2. Cernan M, Sztokowski T, Pikalova Z. Mixed-phenotype acute leukemia: State-of-the-art of the diagnosis, classification and treatment. *Biomed Pap*. 2017;161(3):234–41.
3. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update.' *Blood Cancer J*. 2016;6(7).
4. Downey H, Weidenreich F. Über die Bildung der Lymphocyten in Lymphdrüsen und Milz. *Arch für Mikroskopische Anat*. 1912;80(1):306–95.
5. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2018;392(10147):593–606.
6. Tauro S, Craddock C, Peggs K, Begum G, Mahendra P, Cook G, et al. Allogeneic stem-cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen has the capacity to produce durable remissions and long-term disease-free survival in patients with high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9387–93.
7. Sinha C, Cunningham LC, Liu PP, Transplant BM, Therapy C, Transplant BM, et al. Core binding factor AML: New prognostic categories and therapeutic opportunities. *Semin Hematol*. 2015;52(3):215–22.
8. Chen Z, Chen SJ. RARA and PML genes in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1992;8(4–5):253–60.
9. Gary Gilliland D, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532–42.
10. Loh CY, Arya A, Naema AF, Wong WF, Sethi G, Looi CY. Signal transducer and activator of transcription (STATs) proteins in cancer and inflammation: Functions and therapeutic implication. *Front Oncol*. 2019;9(FEB):1–15.
11. Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*. 2013;27(5):1000–8.
12. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2018;93(10):1267–91.
13. Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, Abrahamsson J, Adachi S, Aplenc R, et al. Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2949–62.
14. Schnetzke U, Spies-Weissbart B, Yomade O, Fischer M, Rachow T, Schrenk K, et al. Polymorphisms of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) are associated with the risk of infectious complications in acute myeloid leukemia. *Genes Immun*. 2015;16(1):83–8.
15. Mulanovich V, Kontoyiannis DP. Acute myeloid leukemia and the infectious diseases consultant. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2018;59(6):1284–91. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1365861>
16. Chen M, Hu R, Jiang X, Wu Y, He Z, Chen J, et al. Dectin-1 rs3901533 and rs7309123 Polymorphisms Increase Susceptibility to Pulmonary Invasive Fungal Disease in Patients with Acute Myeloid Leukemia from a Chinese Han Population *. 2019;39(6):906–12.
17. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* [Internet]. 2020;180(6):1044–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
18. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol*. 2012;3(APR):1–17.
19. Luo L, Lucas RM, Liu L, Stow JL. Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors. *J Cell Sci*. 2019;133(5).
20. Kawai T, Akira S. TLR signaling. 2007;19:24–32.
21. Satoh T, Akira S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. 2016;1–7.
22. Yang L, Seki E. Toll-like receptors in liver fibrosis : cellular crosstalk and mechanisms. 2012;3(May):1–18.
23. Skevaki C, Pararas M. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and

- susceptibility to infectious diseases.
24. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LAJ. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol.* 2012;13(6):535–42.
 25. Speletas M, Merentiti V, Kostikas K, Liadaki K, Minas M, Gourgoulianis K, et al. Association of TLR4-T399I polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease in smokers. *Clin Dev Immunol.* 2009;2009.
 26. Liadaki K, Petinaki E, Skoulakis C, Tsirevelou P, Klapsa D, Germenis AE, et al. Toll-like receptor 4 gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to streptococcus pyogenes and haemophilus influenzae. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(2):217–22.
 27. Noreen M, Arshad M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunol Res [Internet].* 2015;62(2):234–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-015-8640-6>
 28. Ohto U, Yamakawa N, Akashi-takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural Analyses of Human Toll-like Receptor 4. 2012;287(48):40611–7.
 29. Long H, O'Connor BP, Zemans RL, Zhou X, Yang I V., Schwartz DA. The Toll-Like Receptor 4 polymorphism Asp299Gly but not Thr399Ile influences TLR4 signaling and function. *PLoS One.* 2014;9(4).
 30. Kompoti M, Michopoulos A, Michalia M, Clouva-Molyvdas PM, Germenis AE, Speletas M. Genetic polymorphisms of innate and adaptive immunity as predictors of outcome in critically ill patients. *Immunobiology [Internet].* 2015;220(3):414–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.10.006>
 31. Hawn TR, Scholes D, Li SS, Wang H, Yang Y, Roberts PL, et al. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PLoS One.* 2009;4(6).
 32. Van der Graaf CAA, Netea MG, Morr e SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JWM, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17(1):29–34.
 33. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A Novel Polymorphism in the Toll-Like Receptor 2 Gene and Its Potential Association with Staphylococcal Infection. *Infect Immun.* 2000;68(11):6398–401.
 34. Moore CE, Segal S, Berendt AR, Hill AVS, Day NPJ. Lack of association between toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(6):1194–7.
 35. Perkins JD. Techniques to ensure adequate portal flow in the presence of splenorenal shunts. *Liver Transplant.* 2007;13(5):767–8.
 36. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Kaser I, et al. The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J.* 2004;23(2):219–23.
 37. Fischer M, Spies-Weissbart B, Schrenk K, Gruhn B, Wittig S, Glaser A, et al. Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 predispose to invasive fungal disease in patients with acute myeloid leukemia. *PLoS One.* 2016;11(3):1–13.
 38. Hein E, Garred P. The lectin pathway of complement and biocompatibility. *Adv Exp Med Biol.* 2015;865:77–92.
 39. Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat Rev Nephrol [Internet].* 2016;12(7):383–401. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2016.70>
 40. Johnson CA, Densen P, Hurford RKJ, Colten HR, Wetsel RA. Type I human complement C2 deficiency. A 28-base pair gene deletion causes skipping of exon 6 during RNA splicing. *J Biol Chem.* 1992 May;267(13):9347–53.
 41. Igreja RP. Infectious diseases associated with caves. Vol. 22, *Wilderness and Environmental Medicine.* 2011. 115–121 p.

42. Schröder-Braunstein J, Kirschfink M. Complement deficiencies and dysregulation: Pathophysiological consequences, modern analysis, and clinical management. *Mol Immunol* [Internet]. 2019;114(July):299–311. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.08.002>
43. Jönsson G, Truedsson L, Sturfelt G, Oxelius VA, Braconier JH, Sjöholm AG. Hereditary C2 deficiency in Sweden: Frequent occurrence of invasive infection, atherosclerosis, and rheumatic disease. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(1):23–34.