



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Συσχετίσεις του πολυμορφισμού rs1834481 του γονιδίου της
Ιντερλευκίνης 18 με την πρόγνωση ασθενών με SARS-CoV-2 λοίμωξη**

Παλιάτσα Βασιλική του Βασιλείου

Τριμελής επιτροπή:

- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας,
Συνεπιβλέπων
- Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Μέλος



University of Thessaly

Department of Biochemistry & Biotechnology

Association of rs1834481 functional polymorphism of IL-18 gene in patients with SARS-CoV-2 infection

Paliatsa Vasiliki

Examining Committee:

- Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology
- Matthiopoulos Konstantinos, Professor of Molecular Biology
- Giakountis Antonios, Assistant Professor of Molecular Biology

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια που μου έδωσε, αλλά και για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γιακουντή Αντώνιο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Ραφτοπούλου Σοφία για την υποστήριξη σε κάθε βήμα της πτυχιακής μου εργασίας, όπου με τη βοήθεια και τις συμβουλές της κατάφερα να ολοκληρώσω την εργασία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου που με τη βοήθειά τους αλλά και τη στήριξή τους δημιούργησαν ένα φιλικό περιβάλλον που διευκόλυνε τη διεκπεραίωση της πτυχιακής και διαμόρφωσαν τις καλύτερες συνθήκες για την ανταλλαγή γνώσεων και εμπειριών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου που με στήριξαν και ήταν πάντα δίπλα μου.

Περίληψη

Το Δεκέμβριο του 2019 εμφανίστηκαν κρούσματα πνευμονίας σε μία πόλη της Κίνας, τα οποία προκλήθηκαν από ένα νέο στέλεχος κορονοϊού, τον SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-Corona Virus-2). Λόγω της γρήγορης εξάπλωσης του ιού σε παγκόσμιο επίπεδο ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ανακοίνωσε ότι πρόκειται για Έκτακτη Ανάγκη Δημόσιας Υγείας Διεθνούς Ανησυχίας. Έτσι, η προσοχή της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας στράφηκε στην κατανόηση του μηχανισμού του ιού με σκοπό την αντιμετώπισή του.

Ο ιός προκαλεί την ασθένεια COVID-19 (Corona Virus Disease-2019), η οποία παρουσιάζει στις περισσότερες περιπτώσεις ήπια συμπτώματα. Ωστόσο, μπορεί να προκύψει αναπνευστική ανεπάρκεια στις σοβαρές περιπτώσεις που συνοδεύεται από μια συστημική φλεγμονώδη αντίδραση, η οποία χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών και κακή πρόγνωση. Αυτή η παθολογική κατάσταση σχετίζεται με απόκριση της φυσικής ανοσίας λόγω της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος της οικογένειας υποδοχέων τύπου NOD με περιοχή πυρίνης 3 (NLRP3) και της απελευθέρωσης των προϊόντων της, συμπεριλαμβανομένων των φλεγμονωδών κυτταροκινών Ιντερλευκίνη-1β και Ιντερλευκίνη- 18.

Έτσι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs1834481 του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 18, με σκοπό την ανίχνευση πιθανών συσχετισμών με την κλινική εικόνα ασθενών με COVID-19. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 264 ασθενείς με επιβεβαιωμένη λοίμωξη SARS-CoV-2 (180 άνδρες/84 γυναίκες, με διάμεση ηλικία \pm SD: 42.8 \pm 18.4 χρόνια), οι οποίοι παρουσίασαν ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου COVID-19 (ασυμπτωματικοί έως βαριά πάσχοντες με σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια και θάνατο). Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του πολυμορφισμού συσχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με τον κλινικό φαινότυπο της νόσου και συγκεκριμένα με αυξημένη παρουσία πυρετού, δύσπνοιας κατά την ηρεμία, πνευμονίας και κοιλιακού άλγους. Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη συνάγεται ότι ο παρών πολυμορφισμός θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός-βιολογικός δείκτης για την πρόγνωση της νόσου.

Abstract

In December of 2019, there were cases of pneumonia in China, caused by a new member of coronavirus, which was identified later as SARS-CoV-2. Due to the global expansion of the infection, World Health Organization declared that SARS-CoV-2 epidemic is a Public Health Emergency of International Concern (PHEIC). Therefore, the attention of the world scientific community was focused on understanding the mechanism of the virus in order to address it.

The virus causes COVID-19 (Corona Virus Disease), which in most cases has mild symptoms. However, respiratory failure may occur in severe cases accompanied by an inflammatory reaction, which is characterized by the release of inflammatory cytokines and poor prognosis. This pathological condition is associated with an innate immune response due to the activation of the Nod-like receptor family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome pathway and the release of its products, including the proinflammatory cytokines Interleukin-1 β and Interleukin-18.

Thus, in the present study, a functional polymorphism of the Interleukin 18 gene (rs18324481) was studied, in order to discover whereas it associates with the clinical manifestation of the COVID-19 infection. Specifically, we analyzed 264 patients with confirmed SARS-CoV-2 infection (180 men/84 women, median age \pm SD: 42.8 \pm 18.4 years), who presented a variety of clinical symptoms (asymptomatic to severe disease and death). The presence of the polymorphism was associated with the clinical phenotype of the disease ($p=0.046$) and with an increased presence of fever, dyspnea at rest, pneumonia and abdominal pain. In conclusion, the present study shows that the rs1834481 polymorphism could be used as a molecular-biological indicator for the prognosis of COVID-19.

Περιεχόμενα

Γενικό μέρος	8
A. Εισαγωγή	9
A.1 SARS-CoV-2	9
A.1.1 Προέλευση	9
A.1.2 Γενικές πληροφορίες	9
A.1.3 Ανίχνευση ιού	12
A.1.3.1 Μοριακή μέθοδος	12
A.1.3.2 Ανίχνευση αντιγόνου	13
A.1.3.3 Ορολογική μέθοδος	13
A.1.4 Μετάδοση	14
A.1.5 Κλινικά χαρακτηριστικά-Συμπτωματολογία	14
A.1.6 Μηχανισμός ανοσιακής απάντησης στον SARS-CoV-2	16
A.2 Φλεγμονόσωμα	19
A.2.1 NLRP3	19
A.2.1.1 NLRP3 και COVID-19	21
A.3 Ιντερλευκίνη 18	24
A.3.1 Μονοπάτι Μεταγωγής σήματος	24
A.3.2 Ρόλος Ιντερλευκίνης 18	25
A.3.3 Πολυμορφισμός rs1834481	26
B. Σκοπός	26
Ειδικό μέρος	27
A. Υλικά και Μέθοδοι	28
A.1 Άτομα που μελετήθηκαν	28
A.2 Μεθοδολογία	31
A.2.1 Απομόνωση DNA	31
A.2.2 PCR	32
A.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%	32

A.2.4 Πέψη	33
A.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 3%	33
A.2.6 Αλληλούχηση προϊόντων PCR	34
A.2.6.1 Καθαρισμός προϊόντων PCR	34
A.2.6.2 Αλληλούχηση	35
A.2.7 Βιοστατιστική ανάλυση	35
B. Αποτελέσματα	36
Γ. Συζήτηση	39
Δ. Συμπέρασμα	40
Ε. Βιβλιογραφία	41

Γενικό μέρος

A. Εισαγωγή

A.1 SARS-CoV-2

Το Δεκέμβριο του 2019 εντοπίστηκαν κρούσματα πνευμονίας στην πόλη Wuhan της Κίνας, χωρίς να έχει ταυτοποιηθεί η αιτία που τα προκάλεσε. Λίγο αργότερα βρέθηκε ότι πρόκειται για ένα νέο στέλεχος κορονοϊού και συγκεκριμένα για τον SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2) που προκαλεί την ασθένεια, η οποία ονομάστηκε COVID-19 (Corona Virus Disease-2019) (1).

Πολύ σύντομα, ο ιός εξαπλώθηκε παγκοσμίως κι έτσι, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ανακοίνωσε ότι πρόκειται για πανδημία. Το γεγονός αυτό οδήγησε την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα στην ενασχόληση με τον ιό, προκειμένου να συλληθούν δεδομένα και να επιτευχθεί η αντιμετώπισή του. Ο ιός έχει προσβάλλει περισσότερους από 180.000.000 ανθρώπους παγκοσμίως, ενώ περισσότεροι από 3.500.000 έχουν χάσει τη ζωή τους.

A.1.1 Προέλευση

Ο SARS-CoV-2 πιθανολογείται ότι προέρχεται από τις νυχτερίδες καθώς το γονιδίωμά του παρουσιάζει κατά 96,2% ομοιότητα με το συνολικό γονιδίωμα του κορονοϊού νυχτερίδας RaTG13 (2, 3, 4) και κατά 93,1% ομοιότητα μεταξύ της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της Spike πρωτεΐνης (4). Ωστόσο, η μεγάλη ομοιότητα της περιοχής πρόσδεσης στην Spike πρωτεΐνη του SARS-CoV-2 με αυτή του κορονοϊού των παγκολίνων υποδηλώνει ότι μπορεί να αποτελεί τον ενδιάμεσο ξενιστή (4, 5).

A.1.2 Γενικές Πληροφορίες

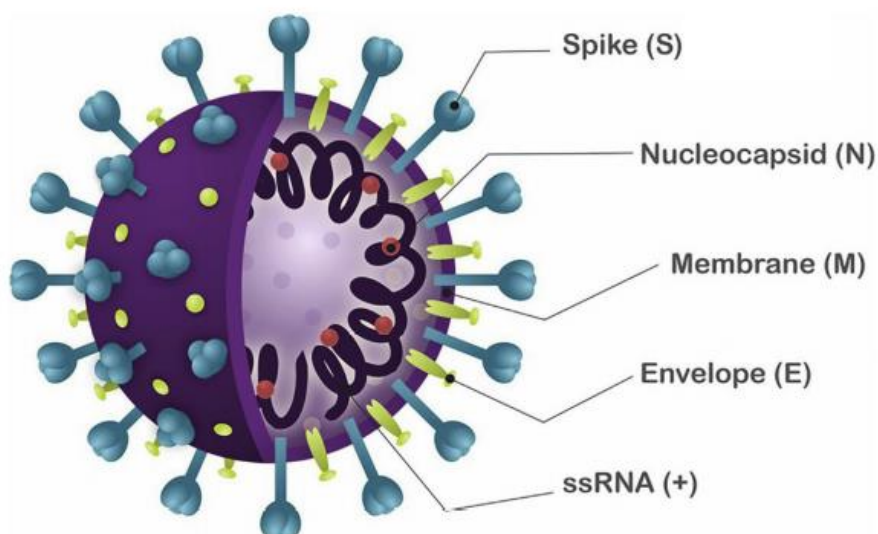
Ο SARS-CoV-2 ανήκει στην οικογένεια Coronaviridae και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια Coronavirinae, η οποία υποδιαιρείται σε 4 γένη (α, β, γ και δ). Οι α και β προσβάλλουν τα θηλαστικά, ενώ οι γ και δ τα πτηνά και τους χοίρους (3, 6).

Ο SARS-CoV-2 είναι μέλος των β-κορονοϊών που έχουν συσχετιστεί με σοβαρές λοιμώξεις του αναπνευστικού. Μάλιστα, τα προηγούμενα χρόνια δύο ακόμα κορονοϊοί είχαν προκαλέσει ανησυχία – ο SARS-CoV το 2002, που παρουσιάζει ομοιότητα κατά 79% με τον SARS-CoV-2 (Εικόνα 1) και ο MERS-CoV (Middle Eastern Respiratory Virus) το 2012 με ομοιότητα κατά 50%. Ο SARS-CoV προσέβαλε 8.000 άτομα με ποσοστό θνητότητας 11%, ενώ ο MERS-CoV προσέβαλε περίπου 2.500 άτομα αλλά είχε ποσοστό θνητότητας 34% (4, 7).

Virus strain	ORF1ab	S	E	M	N
SARS-CoV Urbani Protein ID	AAP13442.1	AAP13441.1	QHD43418.1	QHD43419.1	QHD43423.2
SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 Protein ID	QHD43415.1	QHD43416.1	AAP13443.1	AAP13444.1	AAP13445.1
% Identity (a.a.)	86.46	77.46	96.00	89.59	89.74

Εικόνα 1 Ποσοστά ομοιότητας της αμινοξικής αλληλουχίας πρωτεϊνών μεταξύ SARS-CoV και SARS-CoV-2 (8).

Το γονιδίωμα του ιού είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Το μέγεθός του είναι περίπου 30 kb, γεγονός που τον καθιστά έναν από τους μεγαλύτερους RNA ιούς (6). Περιλαμβάνει 11 λειτουργικά Open Reading Frames (ORFs). Κωδικοποιεί 27 πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη λειτουργικότητα και τη μολυσματικότητά του (9). Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται 4 δομικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι η Spike πρωτεΐνη, η διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη M (Membrane), η πρωτεΐνη N (Νουκλεοκαψιδίου-Nucleocapsid) και η πρωτεΐνη E (Φακέλου-Envelope) (Εικόνα 2, Εικόνα 3) (6, 7, 9).



Εικόνα 2 Η δομή του SARS-CoV-2 (13).

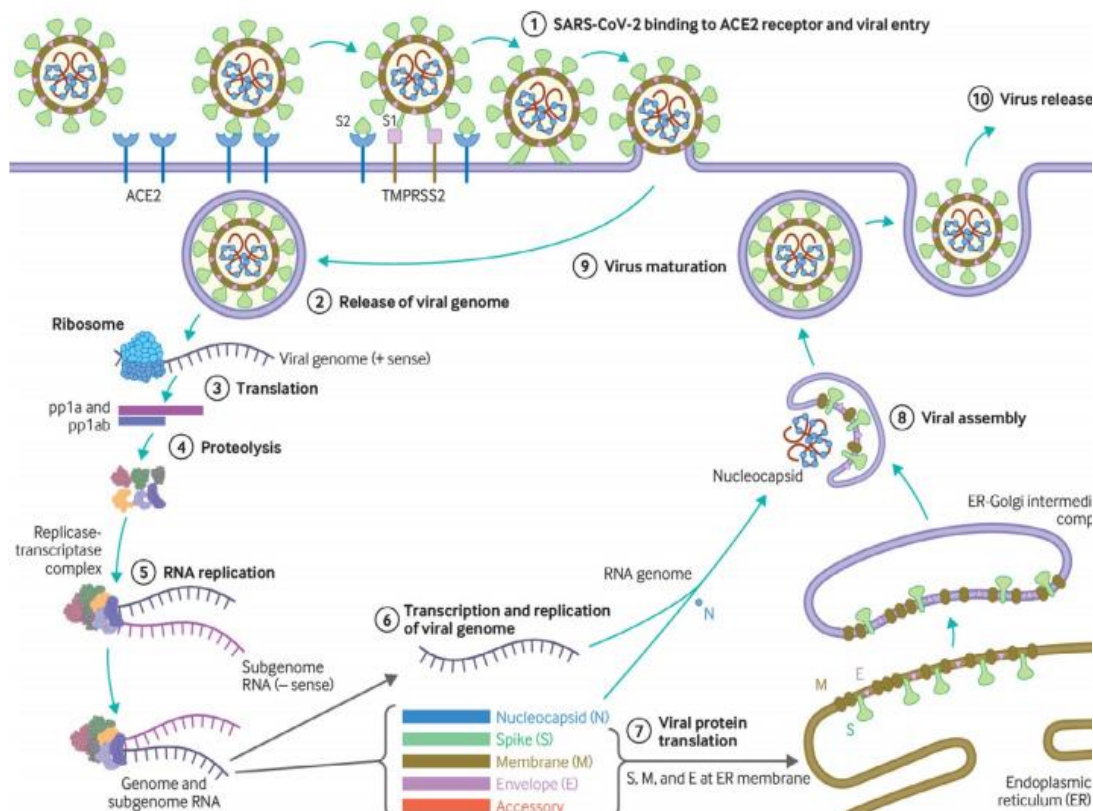


Εικόνα 3 Η αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιεί ο SARS-CoV-2 (6).

Πρωτεΐνη Spike

Μια από τις πιο σημαντικές είναι η πρωτεΐνη Spike (S), η οποία καθώς εξέρχεται από την ιική επιφάνεια του δίνει και τη χαρακτηριστική εικόνα της κορόνας στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 2). Η S πρωτεΐνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που καθίσταται υπεύθυνη για τη σύνδεση του ιού με το κύτταρο ξενιστή και αποτελείται από 2 υπομονάδες, τις S1 και S2. Η S1 υπομονάδα περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα (Receptor Binding Domain-RBD), μέσω της οποίας συνδέεται με τον υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή. Ο ιός χρησιμοποιεί ως υποδοχέα το μετατρεπτικό ένζυμο ACE2 (Agiotensin Converting Enzyme 2), το οποίο φυσιολογικά εντοπίζεται σε κύτταρα της αναπνευστικής οδού, του μυοκαρδίου και της γαστρεντερικής οδού. Η S2 υπομονάδα είναι υπεύθυνη για τη σύντηξη της ιικής μεμβράνης με τη μεμβράνη του ξενιστή (1).

Μετά την πρόσδεση της S πρωτεΐνης στον ACE2 ακολουθεί η διάσπαση της S από πρωτεάσες (TMPRSS2- transmembrane protease serine 2), με αποτέλεσμα την έκθεση της RBD της S1 υπομονάδας (10, 11). Αυτό συνεπάγεται τη σύντηξη των μεμβρανών ιού και ξενιστή. Έτσι, το ιικό γονιδίωμα εισέρχεται στο κύτταρο, όπου απελευθερώνεται και ξεκινά τη διαδικασία για τον πολλαπλασιασμό του. Το ιικό RNA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη N για να σχηματίσει το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που θα σχηματίσει τα ιικά σωματίδια. Τέλος, τα νέα μόρια ιού που δημιουργούνται εξωκυτταρώνονται αφού πρώτα μεταφερθούν κοντά στην κυτταρική επιφάνεια μέσω κυστιδίων (Εικόνα 4) (7, 11).



Εικόνα 4 Η είσοδος του SARS κορονοϊού 2 στο κύτταρο ξενιστή και ο πολλαπλασιασμός του (7).

A.1.3 Ανίχνευση ιού

Υπάρχουν τρεις μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ιού. Κάθε μία από αυτές βασίζεται σε διαφορετική αρχή μεθόδου και διαφέρει ως προς την αποτελεσματικότητα και την εξειδίκευση. Πρόκειται για τη μοριακή μέθοδο, για την ανίχνευση αντιγόνου και για την ορολογική μέθοδο.

A.1.3.1 Μοριακή Μέθοδος

Η Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) είναι μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται πιο συχνά και ανιχνεύει το γονιδίωμα του ιού. Για τη διάγνωση χρησιμοποιείται ως δείγμα ρινοφαρυγγικό ή στοματοφαρυγγικό επίχρισμα. Η μέθοδος στηρίζεται στη δημιουργία ενός συμπληρωματικού DNA (cDNA) που ακολουθείται από πολλαπλασιασμό, κάνοντας χρήση μιας αλληλουχίας ειδικής για τον ιό. Ο στόχος μπορεί να είναι μία ή διάφορες περιοχές του ιού, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων των S, N ή E πρωτεϊνών. Μεγαλύτερο υικό φορτίο στο εκάστοτε δείγμα συνεπάγεται και ταχύτερο χρόνο πολλαπλασιασμού, το οποίο δίνει νωρίς θετικό σήμα (7).

Ο SARS-CoV-2 συνήθως ανιχνεύεται 48 ώρες πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων έως και 14 ημέρες μετά. Η μέθοδος εμφανίζει ευαισθησία πάνω από 92% και εξειδίκευση πάνω από 95%. Αυτό υποδηλώνει ότι σε περίπτωση αρνητικού

αποτελέσματος δεν πρέπει να αποκλείεται η πιθανότητα μόλυνσης και κυρίως σε περιπτώσεις χαμηλού ιικού φορτίου, όπως συμβαίνει σε ασυμπτωματικούς ή προ-συμπτωματικούς (7, 12).

A.1.3.2 Ανίχνευση Αντιγόνου

Μία δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιείται, καθώς είναι γρήγορη και εύκολη στη χρήση είναι τα Rapid (γρήγορα) διαγνωστικά tests αντιγόνου.

Το test περιλαμβάνει μία πλαστική κασέτα στην οποία περιέχεται μία ταινία νιτρογλυκερίνης, εμποτισμένη με αντισώματα έναντι των ιικών πρωτεϊνών και δύο λωρίδες σταθερών αντισωμάτων που αλλάζουν χρώμα παρουσία του συζευγμένου αντιγόνου-στόχου η μία και του συζευγμένου control η δεύτερη.

Το δείγμα που είναι, επίσης, ρινοφαρυγγικό επίχρισμα, στοματοφαρυγγικό επίχρισμα ή σάλιο τοποθετείται σε ένα πηγαδάκι αφού έχει αναμειχθεί με το buffer του test. Το αποτέλεσμα παρέχεται σε λιγότερο από 30 λεπτά.

Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει ευαισθησία πάνω από 80% και εξειδίκευση πάνω από 97%, αλλά χρησιμοποιείται σε μεγάλο ποσοστό λόγω της δυνατότητας για την εμφάνιση του άμεσου αποτελέσματος (7).

A.1.3.3 Ορολογική Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή εξυπηρετεί την ανίχνευση ανοσιακής απόκρισης έναντι του SARS-CoV-2. Βασίζεται στον εντοπισμό της παρουσίας ανοσοσφαιρίνης G, M ή A με τη χρήση της μεθόδου ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) (7, 12).

Ένα θετικό test σημαίνει ότι το άτομο έχει εκτεθεί στον SARS-CoV-2 και έχει αποκτήσει αντισώματα. Ωστόσο, η διάρκεια των αντισωμάτων και η προστασία που προσφέρουν δεν είναι ξεκάθαρες (7, 13).

Η μέθοδος αυτή δε χρησιμοποιείται τόσο για την ανίχνευση του ιού τη δεδομένη στιγμή που γίνεται το test, αλλά δίνει την πληροφορία για πιθανή έκθεση στον ιό το προηγούμενο χρονικό διάστημα.

A.1.4 Μετάδοση

Έχει βρεθεί ότι η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο μέσω σταγονιδίων που απελευθερώνονται στο περιβάλλον λόγω βήχα ή φτερνίσματος και μέσω επαφής από τη στοματική, τη ρινική και την οφθαλμική βλεννογόνο.

Επίσης, μικρόβια σε σταγονίδια μεγαλύτερα σε διάμετρο από 5μm μπορούν να μένουν στον αέρα για μεγάλο χρονικό διάστημα και να μεταδίδονται και σε απόσταση μεγαλύτερη του 1 μέτρου.

Ακόμα, η μετάδοση μπορεί να επιτευχθεί έμμεσα μέσω της επαφής με κάποιο μολυσμένο αντικείμενο.

Η μολυσματική περίοδος ξεκινά δύο ημέρες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων και τελειώνει αφού περάσουν δέκα ημέρες, ο ασθενής δεν παρουσιάζει πια συμπτώματα και δεν έχει εμφανίσει πυρετό για 72 ώρες (13).

Τέλος, έρευνα εξέτασε την παρουσία του ιού στους όρχεις και στο σπέρμα, αλλά δε βρέθηκε θετικό RT-PCR. Έτσι, προέκυψε ότι η COVID-19 δεν μπορεί να μεταδοθεί σεξουαλικά από άνδρες που νοσούν (12, 14).

A.1.5 Κλινικά χαρακτηριστικά-Συμπτωματολογία

Η σοβαρότητα της COVID-19 στους περισσότερους ασθενείς είναι ήπια έως μέτρια, χωρίς να χρειάζεται νοσηλεία, ενώ ένα ποσοστό είναι ασυμπτωματικό παρά το θετικό RT-PCR test. Τα συμπτώματα της νόσου μοιάζουν με αυτά της εποχικής γρίπης, με πιο συχνά τον πυρετό, το βήχα, τον πονοκέφαλο και την κούραση (1).

Με κριτήριο τη σοβαρότητα της νόσου οι ασθενείς διαχωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες (1, 15):

- Ασυμπτωματικοί: Ένώ έχει βρεθεί θετικό RT-PCR test, τα άτομα δεν έχουν κανένα σύμπτωμα. Ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις, αναπτύχθηκαν συμπτώματα μετά την ανίχνευση του ιού.
- Ήπια νόσος: Οι ασθενείς παρουσιάζουν τα πιο συχνά συμπτώματα (πυρετός, πονοκέφαλος, βήχας, μυϊκοί πόνοι, έλλειψη γεύσης και όσφρησης) αλλά όχι δύσπνοια ή δυσκολία στην αναπνοή. Επίσης, μπορεί να εμφανίσουν ήπια πνευμονία.
- Σοβαρή νόσος: Άτομα με δύσπνοια, κορεσμό οξυγόνου $\leq 93\%$, αναπνευστική συχνότητα ≥ 30 ανάσες το λεπτό, πνευμονικό διήθημα $>50\%$ εντός 24 έως 48 ωρών.
- Κρίσιμη νόσος: Άτομα με αναπνευστική ανεπάρκεια, σηπτικό σοκ ή/και πολυοργανική δυσλειτουργία.

Τα συμπτώματα της νόσου συνήθως εμφανίζονται δύο ημέρες μετά την προσβολή από τον ιό και μπορεί να διατηρηθούν έως και 14 ημέρες μετά (13).

Σε περιπτώσεις σοβαρής νόσου, οι ασθενείς παρουσιάζουν πυρετό που δεν υποχωρεί, αυξημένους δείκτες φλεγμονής (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη/C-reactive protein-CRP, φερριτίνη) και αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών, λόγω μιας εκτεταμένης απόκρισης που συνοδεύεται από φλεγμονή. Αυτό συμβαίνει συνήθως σχετικά αργά στη διάρκεια της νόσου και έχει συσχετιστεί με αυξημένη θνησιμότητα (7).

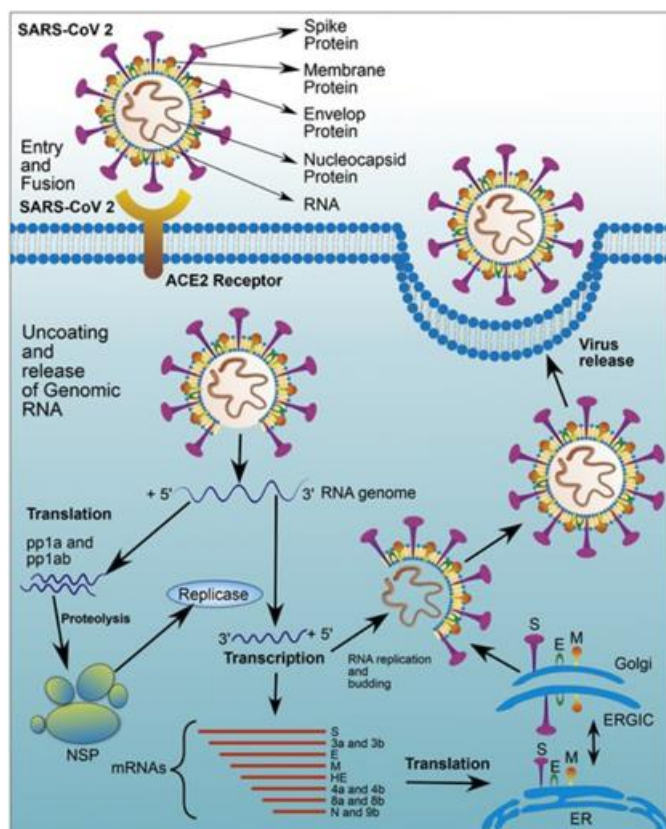
Ακόμη, υπάρχουν υποκείμενα νοσήματα που αυξάνουν την πιθανότητα για δυσμενή έκβαση της νόσου COVID-19. Μερικά από αυτά είναι τα εξής (7):

- Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια
- Καρδιαγγειακή νόσος
- Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2
- Παχυσαρκία
- Χρόνια νεφρική νόσος
- Δρεπανοκυτταρική νόσος
- Καρκίνος

Η σοβαρή έκβαση της νόσου μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ηλικία, ωστόσο οι πιθανότητες είναι ιδιαίτερα αυξημένες σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας με υποκείμενα νοσήματα (7, 15).

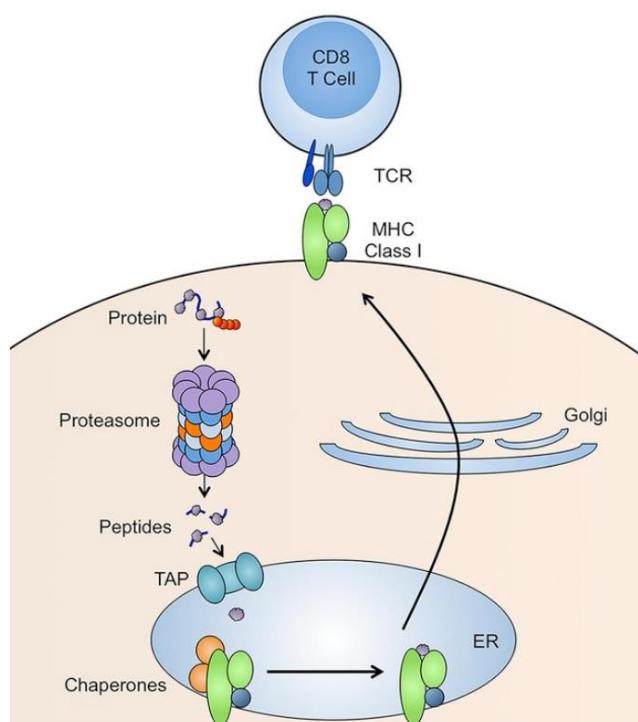
A.1.6 Μηχανισμός ανοσιακής απάντησης στον SARS-CoV-2

Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, ακολουθεί μία σειρά αντιδράσεων του ανοσιακού συστήματος που περιλαμβάνει μηχανισμούς τόσο της φυσικής όσο και της ειδικής ανοσίας. Το γενετικό υλικό του ιού εισέρχεται στο κύτταρο-ξενιστή και εκμεταλλεύεται τους εγγενείς μηχανισμούς αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης, προκειμένου να αναπαραχθεί (Εικόνα 5) (16).



Εικόνα 5 Πολλαπλασιασμός του ιού αφού εισέλθει στο κύτταρο-ξενιστή μέσω του ACE2 (16).

Ωστόσο, το πρωτεάσωμα, που αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ενδοκυττάριο σύστημα άμυνας έναντι των παθογόνων, αναγνωρίζει τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες του ιού και επιχειρεί να τις καταστρέψει. Στη συνέχεια, τμήματα των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών συνδέονται με μόρια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex-MHC), τα οποία είναι μεμβρανοσυνδεδεμένες γλυκοπρωτεΐνες που δημιουργούν σταθερά συμπλέγματα με αντιγονικά πεπτίδια, και τα παρουσιάζουν στην κυτταρική επιφάνεια, με σκοπό να αναγνωριστούν από τα Τ λεμφοκύτταρα και συγκεκριμένα τα Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα (CD8+) (Εικόνα 6). Αυτά σε επόμενη φάση θα συνδεθούν στα MHC μέσω του υποδοχέα TCR (T-cell receptor) και θα καταστρέψουν το μολυσμένο κύττατο είτε μέσω του μονοπατιού απόπτωσης Fas/FasL είτε μέσω της οδού της περφορίνης (17).



Εικόνα 6 Αντιγονοπαρουσίαση πεπτιδίων του ιού στα T κυτταροτοξικά κύτταρα μέσω του MHC I (17).

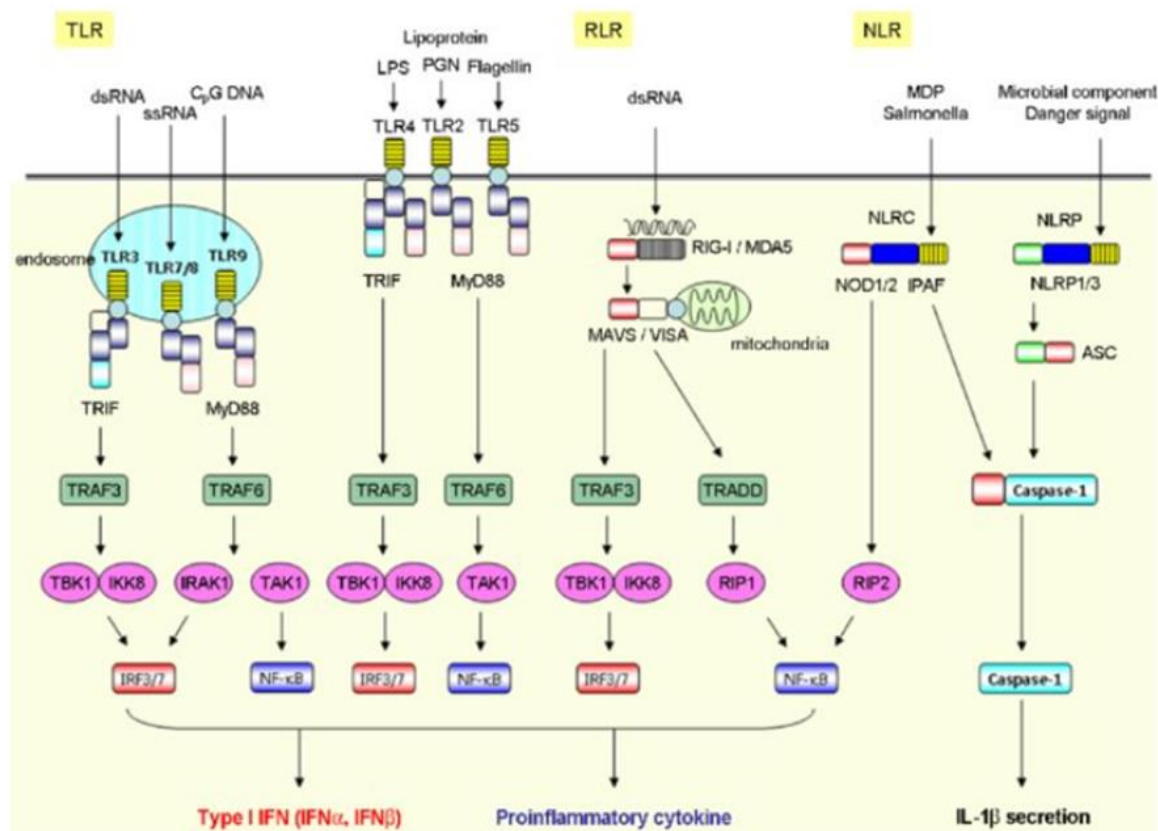
PRRs (Pattern Recognition Receptors) συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων τύπου Toll (TLRs), υποδοχέων τύπου NOD (NLRs), και υποδοχέων τύπου RIG (RLRs) αναγνωρίζουν δομές του ιού (Pathogen Associated Molecular Patterns-PAMPs), όπως είναι τα λιπίδια, οι λιποπρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα ικής προέλευσης ή μόρια που απελευθερώνονται από το κύτταρο που έχει μολυνθεί και λειτουργούν ως «σήματα κινδύνου» (Damage Associated Molecular Patterns-DAMPs), όπως είναι το ATP, ή οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ανοσιακής απάντησης (Εικόνα 7) (18, 19, 20).

Συγκεκριμένα, οι TLR7 και TLR8 αναγνωρίζουν το μονόκλωνο ιικό RNA, ενώ ο TLR3 και ο RIG1/MDA5 μπορούν να αναγνωρίσουν τα ενδιάμεσα προϊόντα του διπλασιασμού του ιού, συμπεριλαμβανομένου και του δίκλωνου RNA. Έτσι, ενεργοποιούνται μονοπάτια σηματοδότησης, όπως αυτό του NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και των IRFs (interferon regulatory factors) (21). Ο NF- κ B προωθεί τη μεταγραφή φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- α , IL-1 β , IL-6) και προκαλεί Th1 και Th17 φλεγμονώδη απάντηση με επακόλουθη έκκριση INF- γ και IL-17. Οι IRFs προκαλούν την παραγωγή IFN τύπου I με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK1/TYK2-STAT1/2. Η πρώιμη παραγωγή της IFN τύπου I είναι απαραίτητη για την άμεση άμυνα του οργανισμού έναντι του ιού και την καταστολή της εξάπλωσής του, καθώς προωθεί την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση του RNA, επάγει την επιδιόρθωση των ιστών και

ενεργοποιεί μια παρατεταμένη απόκριση του ειδικού ανοσιακού συστήματος (18, 22).

Οι RLRs μπορούν να ανιχνεύσουν ενδοκυττάρια δίκλωνο RNA ιού μέσω της περιοχής RNA ελικάσης τους. Κατά την ανίχνευση του κυτταροπλασματικού dsRNA, οι RLRs αλληλεπιδρούν με τη μιτοχondριακή αντιική πρωτεΐνη σηματοδότησης (mitochondrial antiviral signaling protein-MAVS), που είναι απαραίτητη πρωτεΐνη για τους μηχανισμούς φυσικής ανοσίας έναντι των ιών. Η αλληλεπίδραση του RIG-I με τη MAVS στη συνέχεια ενεργοποιεί έναν καταρράκτη σηματοδότησης που οδηγεί στην παραγωγή αντιικής IFN τύπου I και φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως συμβαίνει και με τις οδούς σηματοδότησης που προκαλούνται από TLRs (19, 23).

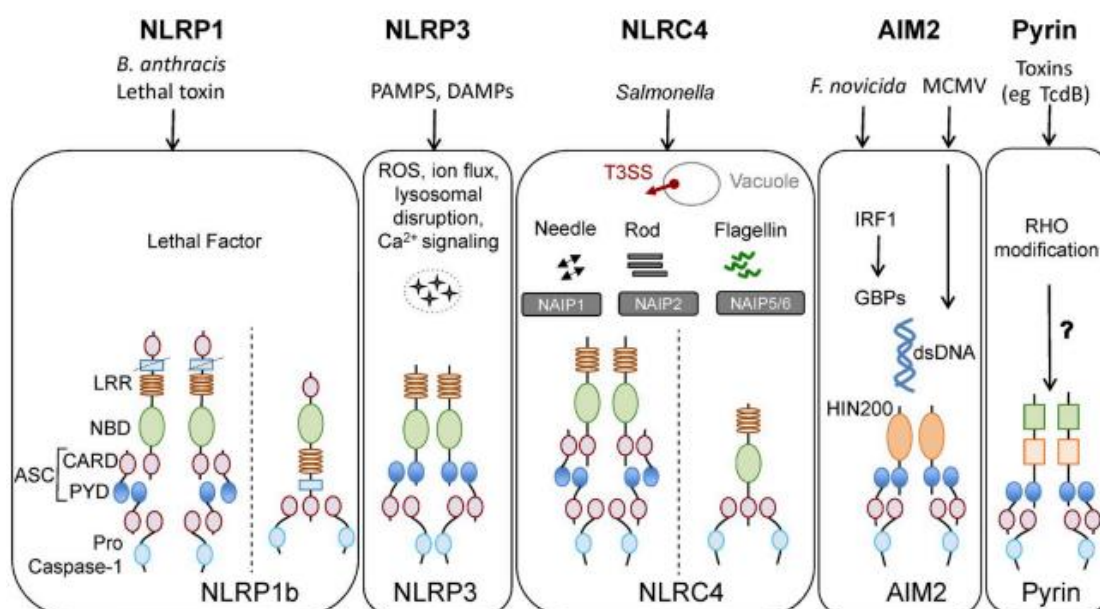
Οι NLRs έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν ενδοκυτταρικά διαταραχές της ομοιόστασης ή «σήματα κινδύνου» (πχ. ROS). Η εμπλοκή των NLRs φαίνεται λόγω της αύξησης των επιπέδων της IL-1β, του IL-1Ra και της IL-18. Αυτοί οι υποδοχείς μπορούν να δημιουργήσουν ένα σύμπλοκο που ονομάζεται φλεγμονόσωμα, το οποίο είναι ο κύριος μηχανισμός ενεργοποίησης της πυρόπτωσης (λυτικός προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος για την αντιμετώπιση ενδοκυττάρων παθογόνων, όπως οι ιοί) (18).



Εικόνα 7 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των PRRs (TLRs, NLRs και RLRs) (23).

A.2 Φλεγμονόσωμα

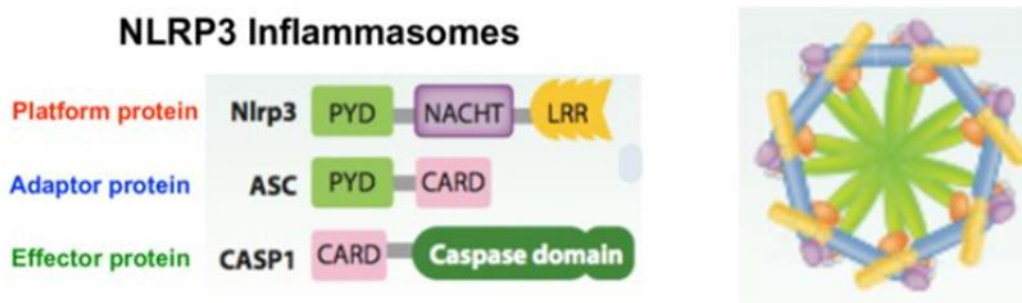
Το φλεγμονόσωμα αποτελεί μέρος της φυσικής ανοσίας. Πρόκειται για ένα σύμπλοκο, το οποίο περιλαμβάνει έναν αισθητήρα (sensor/platform protein), έναν προσαρμογέα (adaptor protein) και μία πρωτεΐνη-τελεστή (effector protein). Οι αισθητήρες του φλεγμονοσώματος, ανάλογα με τη δομή τους, διαχωρίζονται στους υποδοχείς τύπου NOD (Nucleotide-binding domain-like receptors-NLRs), τους υποδοχείς ALRs (Absent in melanoma 2-like receptors) και στην πυρίνη (Εικόνα 8). Αυτοί οι υποδοχείς είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό και την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Το ενζυματικό συστατικό του συμπλόκου είναι η κασπάση-1, η οποία ενεργοποιείται μέσω των αισθητήρων. Ακόμη, οι δομές αυτές αποτελούνται από έναν προσαρμογέα, το ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain) (24).



Εικόνα 8 Οι διαφορετικοί τύποι φλεγμονοσώματος και οι ενεργοποιητές τους (24).

A.2.1 NLRP3

Το NLRP3 φλεγμονόσωμα ανήκει στην οικογένεια των NLRs (24). Είναι ένα τριμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει το αμινο-τελικό άκρο που αποτελείται από μια περιοχή πυρίνης (Pyrin Domain-PYD), μια περιοχή πρόσδεσης και ολιγομερισμού νουκλεοτιδίων, γνωστή ως NACHT και μια καρβοξυ-τελική περιοχή LRR (Leucine-rich repeat). Η περιοχή πυρίνης του NLRP3 αλληλεπιδρά με την περιοχή πυρίνης του ASC για να ξεκινήσει η διαδικασία συναρμολόγησης του φλεγμονοσώματος (Εικόνα 9) (24, 25).



Εικόνα 9 Τα δομικά στοιχεία του NLRP3 φλεγμονοσώματος (26).

Το NLRP3 σχετίζεται με κληρονομικά αυτοφλεγμονώδη σύνδρομα, που χαρακτηρίζονται από δερματικά εξανθήματα και πυρετό. Επιπλέον, έχουν βρεθεί πάνω από 90 μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθένειες κοντά ή εντός της NBD που καθιστούν το NLRP3 συστατικά ενεργό (24).

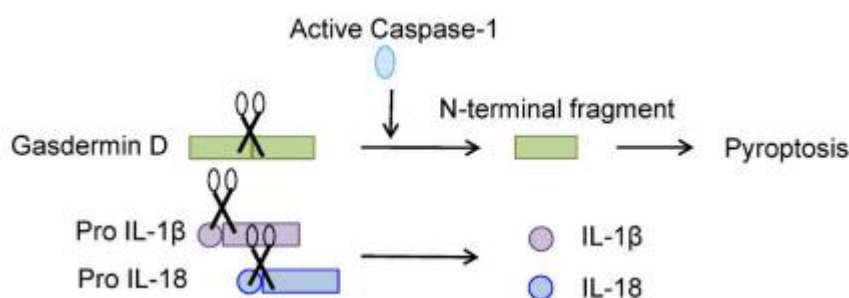
Το NLRP3 ανταποκρίνεται σε ένα ευρύ φάσμα μολυσματικών και ενδογενών προσδετών και εμπλέκεται στην παθογένεση αρκετών αυτοφλεγμονωδών ασθενειών, όπως είναι η αρθρίτιδα, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και το Alzheimer (24).

Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος διαμεσολαβείται από μία διαδικασία που αποτελείται από δύο βήματα: την προετοιμασία της ενεργοποίησης και τελικά την ενεργοποίηση (25, 27). Το πρώτο βήμα επιτρέπει τη μετάφραση των γονιδίων του NLRP3 μέσω του NF-κB ως απόκριση στα PAMPs και DAMPs που αναγνωρίζονται από τους PRRs. Επιπλέον, επάγει τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που αφορούν το φλεγμονόσωμα (ουβικουιλίνωση, φωσφορύλιωση, σουμοϋλίωση) και το σταθεροποιεί σε μια κατάσταση καταστολής, έτοιμο να δεχτεί το σήμα που θα το ενεργοποιήσει (28). Στη συνέχεια, μπορεί να ενεργοποιηθεί ως απόκριση σε πολλά ερεθίσματα. Μερικά από αυτά είναι τα νουκλεϊκά οξέα ή ενδογενή σήματα κινδύνου όπως το ATP και το αμυλοειδές A (20, 29). Γενικά, το φλεγμονόσωμα αντιδρά σε μόρια που σχετίζονται με κυτταρικό στρες όπως η παραγωγή ROS, η εκροή K^+ , η αλλαγή του όγκου του κυττάρου ή οι αλλαγές στη Ca^{+2} -εξαρτώμενη σηματοδότηση (24).

Η ενεργοποίηση του συμπλόκου οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που ακολουθείται από φλεγμονή, συμβαίνει στα T λεμφοκύτταρα και ονομάζεται πυρόπτωση (20). Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω της διάσπασης της γασδερίνης D (GSDMD) από την κασπάση-1 και οδηγεί σε μια σειρά γεγονότων μέσα στο κύτταρο που περιλαμβάνει διόγκωση του κυτταροπλάσματος, ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και σταθεροποίηση του πυρήνα με απελευθέρωση κυτταροπλασματικών συστατικών στον εξωκυτταρικό χώρο (27). Η GSDMD περιέχει στο άμινο-τελικό άκρο μία περιοχή κυτταρικού θανάτου, η οποία εκτίθεται μετά τη

διάσπαση από την κασπάση και μέσω αυτής προσδένονται μόρια φωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και φωσφατιδυλοσερίνης στην κυτταρική μεμβράνη, και σχηματίζει έναν πόρο που προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο από το εσωτερικό. Επιπροσθέτως, η GSDMD μεσολαβεί στην έκκριση IL-1 β και IL-18 (20).

Ο κυτταρικός θάνατος είναι μια σημαντική αιτία παθογένεσης σε ιογενείς λοιμώξεις. Ακόμα και η μόλυνση από HIV-1 έχει συσχετιστεί με κυτταρικό θάνατο μέσω πυρόπτωσης στα παρακείμενα κύτταρα και αποτελεί ένα μηχανισμό εξάντλησης των ανοσοκυττάρων, διαμεσολαβούμενο από το φλεγμονόσωμα (20).



Εικόνα 10 Η ενεργοποίηση της κασπάσης-1, με αποτέλεσμα την πρωτεόλυση των τελεστών της (24).

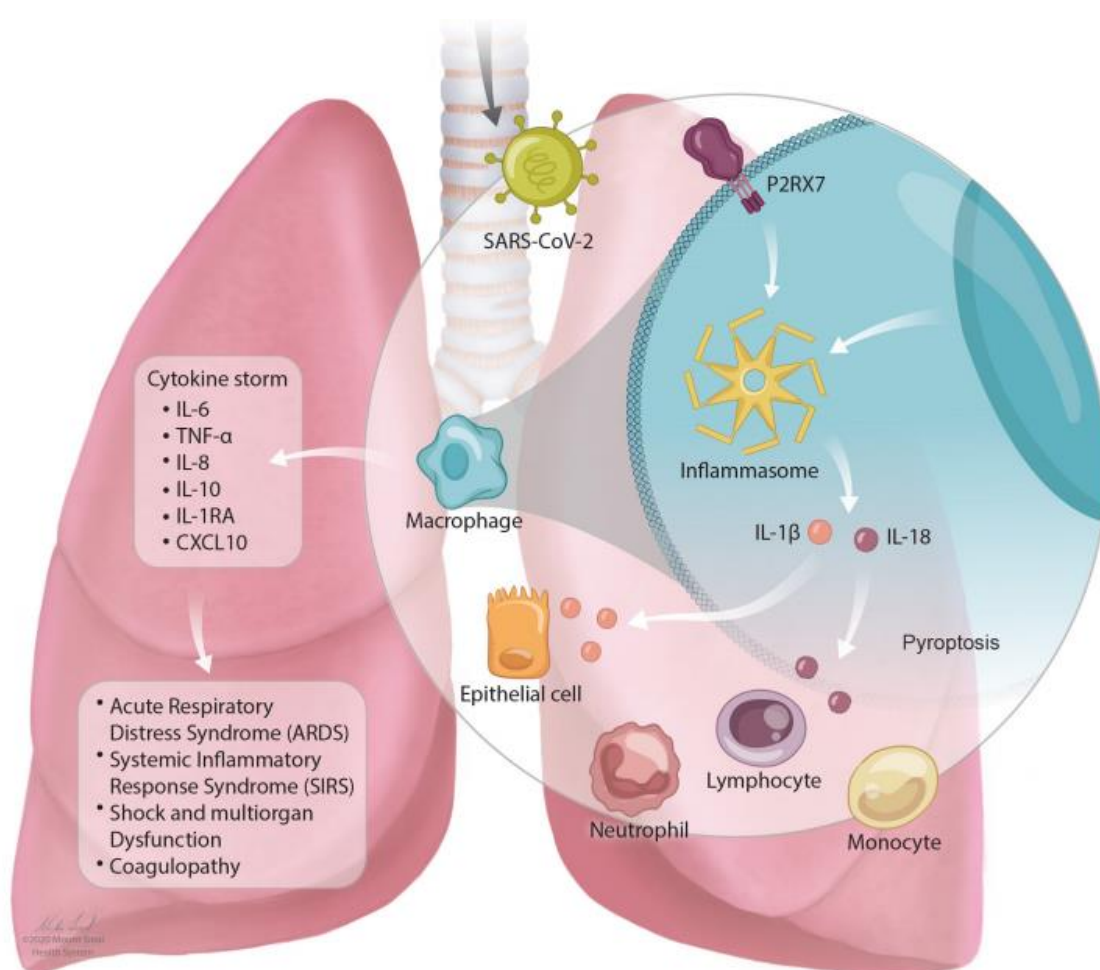
A.2.1.1. NLRP3 και COVID-19

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το φλεγμονόσωμα NLRP3 και η IL-1 β επάγουν τη φλεγμονή κατά τη διάρκεια πνευμονικής βλάβης. Το βρογχοκυψελιδικό υγρό και το πλάσμα ασθενών με Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας (Acute respiratory distress syndrome-ARDS) έχουν αυξημένα επίπεδα IL-1 β σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (18, 20). Ακόμα, και σε ασθενείς με ARDS λόγω λοίμωξης από τον SARS-CoV και τον MERS-CoV παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα IL-1 β , IL-6 και IL-8. Επιπλέον, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, σε ποντίκια με ανεπάρκεια στα συστατικά του φλεγμονοσώματος παρατηρήθηκε μειωμένη βλάβη στον πνευμονικό ιστό και αυξημένη πιθανότητα επιβίωσης μετά τη μόλυνση από γρίπη (20).

Η ανοσιακή απόκριση έναντι του SARS-CoV-2 προκαλείται από φλεγμονώδη κυψελιδικά και προερχόμενα από μονοκύτταρα μακροφάγα που ενεργοποιούνται από τα PAMPs και τα DAMPs που απελευθερώνονται από τα αποπτωτικά πνευμονοκύτταρα. Ο TNF- α και η IL-1 β που εκκρίνονται από τα μακροφάγα εκκινούν έναν καταρράκτη γεγονότων που προκαλούν φλεγμονή αμέσως μετά τη μόλυνση. Αυτό επάγει τη στρατολόγηση μιας ανοσιακής απάντησης, που περιλαμβάνει εκτεταμένη ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός καταρράκτη θετικής ανάδρασης φλεγμονωδών κυτταροκινών (20).

Η παθολογική ανοσιακή απόκριση έναντι του ιού δεν ξεκινά από μια συστημική φλεγμονή αλλά από μια υπερφλεγμονώδη απάντηση που εντοπίζεται στο σημείο βλάβης του ιστού. Αυτό φαίνεται και από το γεγονός ότι η έκκριση των TNF-α και IL-1β επάγουν την περαιτέρω έκκριση κυτταροκινών του NLRP3, όπως είναι και η IL-18 (18, 20).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ασθενείς που νοσούν από COVID-19 παρατηρείται μία αλλαγή της ανοσιακής απάντησης που χαρακτηρίζεται από μία έξαρση έκκρισης κυτταροκινών (cytokine storm) διαμεσολαβούμενη από το NLRP3, η οποία ακολουθείται στη συνέχεια από μια κατάσταση ανοσοκαταστολής. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει και την καταστολή του φλεγμονοσώματος.



Εικόνα 11 Η συμμετοχή του NLRP3 φλεγμονοσώματος στη φλεγμονή του πνευμονικού ιστού μετά από SARS-CoV-2 λοίμωξη (20).

Cytokine storm

Οι κυτταροκίνες συμβάλλουν σημαντικά στην ανοσιακή απόκριση κατά την αντιμετώπιση μιας ιογενούς λοίμωξης. Η γρήγορη και καλά συντονισμένη απόκριση της φυσικής ανοσίας αποτελεί την πιο σημαντική άμυνα του οργανισμού σε μια τέτοια λοίμωξη. Ωστόσο, η μη ρυθμισμένη και η υπερβολική ανοσιακή απάντηση μπορεί να προκαλέσει βλάβες στους ιστούς (28, 30, 31).

Σε ασθενείς με κακή έκβαση της COVID-19 έχει παρατηρηθεί μια αρχική αδυναμία του ανοσιακού συστήματος να αντιμετωπίσει τον ιό, με αποτέλεσμα, στην προσπάθεια να εξαλείψει τον ιό, να οδηγείται σε μια υπερ-αντίδραση που ακολουθείται από μια υπερέκκριση κυτταροκινών (αυξημένα επίπεδα IL-2, IL-6, IL-7, IL-10). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταπόνηση του ανοσιακού συστήματος που οδηγεί στην ανοσοκαταστολή (10, 32, 33).

In vitro πειράματα έδειξαν ότι η καθυστερημένη απελευθέρωση κυτταροκινών και χημειοκινών συμβαίνει σε αναπνευστικά επιθηλιακά, δενδριτικά και μακροφάγα κύτταρα στο αρχικό στάδιο της λοίμωξης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκκρίνουν χαμηλά επίπεδα IFNs και υψηλά επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών και TNF (34, 35, 36).

Όπως αναφέρθηκε, η παραγωγή IFN παίζει κύριο ρόλο στην αντιμετώπιση του ιού στο αρχικό στάδιο της ιογενούς λοίμωξης (15, 18, 22). Έτσι, η καθυστερημένη απελευθέρωση IFN στην αρχή της μόλυνσης εμποδίζει την απόκριση του οργανισμού έναντι του ιού. Έπειτα η αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών προσελκύει φλεγμονώδη κύτταρα (ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα), με αποτέλεσμα τη διάχυτη διήθηση του πνεύμονα από αυτά τα κύτταρα που προκαλεί τη βλάβη στον πνευμονικό ιστό (11, 34, 37).

Η ανοσιακή απάντηση της IFN, σε ηλικιωμένους ασθενείς ή σε ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα είναι είτε καθυστερημένη είτε εξασθενημένη, επομένως ακολουθεί η υπερέκκριση των κυτταροκινών που έχει ως αποτέλεσμα την κακή έκβαση της νόσου.

Επιπλέον, μια ακόμα συνέπεια της γρήγορης αναπαραγωγής του ιού και της εκτεταμένης παραγωγής κυτταροκινών είναι η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι IFN- α/β και IFN- γ επάγουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του αεραγωγού και των κυψελίδων μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν τα μονοπάτια απόπτωσης Fas-FasL και TRAIL. Η απόπτωση αυτών των κυττάρων προκαλεί βλάβες στη μικροαγγειακή δομή των πνευμόνων και στις κυψελιδοτριχοειδικές μεμβράνες. Αυτά έχουν ως συνέπεια, την εξαγγείωση και το κυψελιδικό οίδημα που προκαλεί υποξία, γεγονός που παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του ARDS, το οποίο αποτελεί και την κύρια αιτία θανάτου στους ασθενείς που νοσούν με COVID-19 (34).

Στους περισσότερους ασθενείς, η ραγδαία επιδείνωση των συμπτωμάτων παρατηρείται, συνήθως, 7 με 10 ημέρες μετά τη λοίμωξη (8, 18).

A.3 Ιντερλευκίνη 18

Η Ιντερλευκίνη 18 αποτελεί μέλος της οικογένειας της Ιντερλευκίνης 1. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 στους ανθρώπους και περιλαμβάνει 6 εξόνια (38). Πρόκειται για μια φλεγμονώδη κυτταροκίνη, η οποία, όπως αναφέρεται παραπάνω, συντίθεται ως ανενεργό πρόδρομο μόριο που διασπάται από την κασπάση-1, η οποία προηγουμένως έχει ενεργοποιηθεί από το NLRP3 φλεγμονόσωμα.

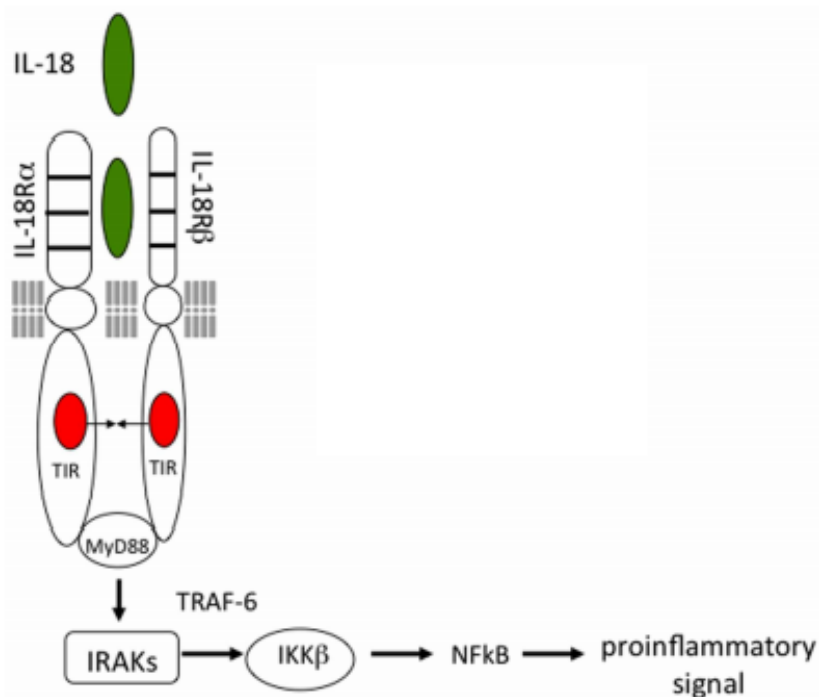
Το μόριο της IL-18 μπορεί να διασπαστεί και ανεξάρτητα από τη δράση της κασπάσης-1. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του Fas Ligand των κυττάρων Kupffer που εκφράζουν Fas ή των μακροφάγων του σπλήνα από ποντίκια μολυσμένα με *Propionibacterium acnes*, μπορεί να επεξεργαστεί την ενεργή IL-18 με μεσολάβηση της κασπάσης 8 (39).

Το πρόδρομο μόριο της Ιντερλευκίνης 18 εκφράζεται συνεχώς στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, και στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού. Το ενεργό μόριο εκκρίνεται από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, ενώ το πρόδρομο μόριο παραμένει στον ενδοκυττάριο χώρο. Επιπλέον, το πρόδρομο μόριο μπορεί να απελευθερωθεί και από κύτταρα που πεθαίνουν και να υποστεί επεξεργασία εξωκυτταρικά από πρωτεάσες ουδετεροφίλων (πρωτεϊνάση-3) (38, 40, 41).

A.3.1 Μονοπάτι Μεταγωγής Σήματος

Η IL-18 σχηματίζει ένα σύμπλοκο σηματοδότησης μέσω σύνδεσης με την άλφα αλυσίδα του υποδοχέα της IL-18 (IL-18R α). Ωστόσο αυτή η δέσμευση είναι χαμηλής συγγένειας. Στα κύτταρα που εκφράζεται ο συν-υποδοχέας, δηλαδή η βήτα αλυσίδα του υποδοχέα της IL-18 (IL-18R β), σχηματίζεται ένα σύμπλοκο υψηλής συγγένειας, ικανό να ξεκινήσει τη σηματοδότηση. Τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν IL-18R α , ενώ IL-18R β εκφράζεται κυρίως στα T-κύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα (42).

Με το σχηματισμό του ετεροδιμερούς οι περιοχές Toll-IL-1 υποδοχέα (TIR) πλησιάζουν και ξεκινά ο καταρράκτης της διαδοχικής στρατολόγησης της MyD88, της φωσφορυλίωσης τεσσάρων IRAKs (interleukin-1 receptor-associated kinases), του TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) και της ενεργοποίησης του NF- κ B (Εικόνα 12) (42).



Εικόνα 12 Μεταγωγή σήματος IL-18 (42).

A.3.2 Ρόλος Ιντερλευκίνης 18

Η IL-18 παίζει ρόλο α) στην επαγωγή της IFN- γ και β) στην ενεργοποίηση των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων (Natural Killer cells-NK).

Η IL-18 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των T κυτταρικών πληθυσμών. Ακόμα, μαζί με την IL-12 συμμετέχουν στην Th1 απόκριση. Χωρίς την IL-12 ή την IL-15, η IL-18 δεν επάγει την παραγωγή της IFN- γ , καθώς οι IL-12 και IL-15 αυξάνουν την έκφραση της IL-18R β , που είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της σηματοδότησης. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των T κυττάρων σε Th2 κύτταρα, παράγοντας IL-13 και IL-4 (29, 43).

Η IL-18 σε συνδυασμό με την IL-12 δρα σε CD4, CD8 T κύτταρα και σε NK κύτταρα για να προκαλέσει παραγωγή IFN- γ , μέσω ταυτόχρονης ενεργοποίησης του NF- κ B από IL-18 και STAT-4 από IL-12. Η IFN- γ μπορεί να ενεργοποιήσει μακροφάγα, με αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF α).

Επίσης, τα μακροφάγα μπορούν να παράγουν IFN- γ όταν ενεργοποιούνται από IL-18 και IL-12.

Επιπλέον, προκαλεί την παραγωγή IL-17 από $\gamma\delta$ T-κύτταρα που εκφράζουν IL-18R α και αυτός ο μηχανισμός πιθανόν εμπλέκεται σε ασθένειες όπως η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, η συστηματική Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα-NIA (Juvenile idiopathic arthritis-JIA) ή η νεογνική σήψη (29, 39).

Τέλος, η IL-18 παρουσιάζει χαρακτηριστικά φλεγμονώδους κυτταροκίνης, όπως αύξηση στα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, σύνθεση νιτρικού οξειδίου και παραγωγή χημειοκινών (39).

A.3.3 Πολυμορφισμός rs1834481

Ο πολυμορφισμός rs1834481, εντοπίζεται στο τρίτο ιντρόνιο του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 18. Φυσιολογικά στο γονίδιο, στη θέση του πολυμορφισμού υπάρχει νουκλεοτίδιο κυτοσίνης, το οποίο αντικαθίσταται από νουκλεοτίδιο γουανίνης.

Ο πολυμορφισμός παρατηρείται σε ποσοστό γενικού πληθυσμού κατά 7%. Σύμφωνα με τη gnomAD, στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (εκτός Φινλανδών), το ποσοστό αυτό φτάνει το 24%.

Γενικά, έχει βρεθεί ότι το αλληλίο της κυτοσίνης συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, ενώ το αλληλίο της γουανίνης παρουσιάζει έναν προστατευτικό ρόλο (44). Επιπλέον, το αλληλίο της γουανίνης έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο NSCLC (non-small cell lung cancer) (45).

Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με διαφοροποίηση των επιπέδων της Ιντερλευκίνης 18 στο πλάσμα. Οι Martinez-Hervas et al., σε μελέτη που διενέργησαν για να εκτιμήσουν αν τα επίπεδα της IL-18 ρυθμίζονται από τα SNPs και την πιθανή συσχέτισή τους με τα επίπεδα ινσουλίνης και άλλους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, διαπίστωσαν ότι άτομα με CC γονότυπο παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα IL-18 (46).

B. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η γενετική ανάλυση ασθενών που προσβλήθηκαν από τον SARS-CoV-2 για τον πολυμορφισμό rs1834481 του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 18, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η μετάλλαξη επηρεάζει την έκβαση της νόσου (ασυμπτωματική, ήπια, σοβαρή νόσος).

Ειδικό μέρος

A. Υλικά και Μέθοδοι

A.1 Άτομα που μελετήθηκαν

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 264 άτομα τα οποία είχαν προσβληθεί από τον SARS-CoV 2. Από τους 264, οι 180 ήταν άνδρες και οι 84 γυναίκες, με διάμεση ηλικία \pm SD: 42.8 ± 18.4 χρόνια. Η εθνικότητα των ασθενών περιελάμβανε 152 Έλληνες, 62 Τούρκους, 16 Ουκρανούς, 15 Ινδονησιανούς, 6 Ουζμπέκους, 3 Μολδαβούς, 3 Αμερικάνους, 2 Κουβανούς και 1 αθηνή από καθεμία από τις ακόλουθες χώρες: Αλβανία, Βουλγαρία, Γερμανία, Κιργιστάν και Λευκορωσία.

Έγινε μια αρχική ομαδοποίηση των ασθενών σε 5 ομάδες ανάλογα με την σοβαρότητα της ασθένειας:

1. Ασυμπτωματικοί (65, 24.6%)
2. Ήπια νόσος (85, 32.1%)
3. Μέτρια νόσος που απαιτεί νοσηλεία (15, 5.7%)
4. Σοβαρή νόσος με πνευμονία (77, 29.2%)
5. Σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια που απαιτεί διασωλήνωση και μηχανικό αερισμό (22, 8.3%)

Από τους 264 ασθενείς, οι 4 (1.5%) πέθαναν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους.

Ο πολυμορφισμός μελετήθηκε σε συνάρτηση με τα παρακάτω συμπτώματα:

- Πυρετός
- Βήχας
- Φαρυγγίτιδα
- Πονοκέφαλος
- Κούραση
- Αρθραλγία/Μυαλγία
- Δύσπνοια κατά την άσκηση
- Δύσπνοια σε ηρεμία
- Διάρροια
- Κοιλιακό άλγος
- Ναυτία και έμετος
- Ανοσμία
- Αγευσία

Στον Πίνακα 1 φαίνονται τα δημογραφικά και τα κλινικά δεδομένα των ασθενών.

Παράμετρος	Σύνολο	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4	Ομάδα 5	p [#]
Νο.	264	65	85	15	77	22	0
Φύλο (♂/♀)	180/84	44/21	58/27	9/6	55/22	14/8	0.902 (C)
Ηλικία (διάμεση ± SD), γ	42.8 ± 18.4	35.1 ± 13.7	30.9 ± 11.0	45.1 ± 16.9	56.4 ± 16.2	62.7 ± 13.4	<0.001 (K-W)
Συννοσηρότητα (n, %)	94, 35.6	6, 9.2	8, 9.4	5, 33.3	56, 72.7	19, 86.4	<0.001 (C)
Παχυσαρκία (n, %)	31, 11.7	0, 0	2, 2.4	2, 13.3	22, 28.6	5, 22.7	<0.001 (C)
Υπέρταση (n, %)	49, 18.6	1, 1.5	1, 1.2	2, 13.3	33, 42.8	12, 54.5	<0.001 (C)
Χρόνια καρδιακή νόσος* (n, %)	11, 4.2	0, 0	0, 0	0, 0	7, 9.1	4, 18.2	<0.001 (C)
Χρόνια εγκεφαλοαγγειακή νόσος** (n, %)	8, 3.0	0, 0	0, 0	1, 6.7	3, 3.9	4, 18.2	<0.001 (C)
Χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις*** (n, %)	20, 7.6	1, 1.5	1, 1.2	0, 0	11, 14.3	7, 31.8	<0.001 (C)
Δυσλιπιδαιμία (n, %)	19, 7.2	1, 1.5	0, 0	1, 6.7	14, 18.2	3, 13.6	<0.001 (C)
Σακχαρώδης διαβήτης (n, %)	21, 8.0	0, 0	2, 2.4	0, 0	14, 18.2	5, 22.7	<0.001 (C)
Υποθυρεοειδισμός (n, %)	12, 4.5	0, 0	2, 2.4	2, 13.3	6, 7.8	2, 9.1	0.047 (C)
Κακοήθειες (n, %)	6, 2.3	0, 0	2, 2.4	0, 0	2, 2.6	2, 9.1	0.163 (C)
Χρόνιες ηπατικές/νεφρικές παθήσεις (n, %)	6, 2.3	1, 1.5	0, 0	0, 0	5, 6.5	0, 0	0.057 (C)
Χρόνιες ανολογικές και/ή αιματολογικές νόσοι ^ (n, %)	6, 2.3	1, 1.5	0, 0	0, 0	3, 3.9	2, 9.1	0.092 (C)
Άλλα^^ (n, %)	16, 6.1	3, 4.6	0, 0	1, 6.7	11, 14.3	1, 4.5	0.005 (C)

Πίνακας 1 Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη. Οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε 5 ομάδες ανάλογα με τη σοβαρότητα της ασθένειας: Ομάδα 1, ασυμπτωματικοί – Ομάδα 2, ήπια νόσος – Ομάδα 3, μέτρια νόσος που απαιτεί νοσηλεία – Ομάδα 4, σοβαρή νόσος με πνευμονία – Ομάδα 5, σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια που απαιτεί διασωλήνωση και μηχανικό αερισμό.

Συντομογραφίες: SD, standard deviation: τυπική απόκλιση

* κολπική μαρμαρυγή, καρδιακή ανεπάρκεια, αρρυθμίες, προσθετική βαλβίδα,

** συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας φλεβικής νόσου

*** χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, άσθμα, άπνοια ύπνου

^ συμπεριλαμβανομένων ασθενών με συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο (1), ρευματοειδή αρθρίτιδα (1), ανεπάρκεια IgA (1), β-θαλασσαιμία (1), δρεπανοκυτταρική νόσο (1), αυτοφλεγμονώδη νόσο (1)

^^ συμπεριλαμβανομένων ασθενών με ιστορικό μεταμόσχευσης (ήπαρ ή νεφρό), ιστορικό σοβαρών λοιμώξεων (μηνιγγίτιδα, γρίπη λόγω H1N1, υποτροπιάζουσες ουρολογικές λοιμώξεις), ιστορικό μείζονος χειρουργικής επέμβασης (μερική γαστρεκτομή, νεφρεκτομή, μερική κολεκτομή), άνοια, κατάθλιψη

Στατιστική ανάλυση: C, Chi-square – F, H ακριβής δοκιμή του Fisher – K-W, Δοκιμή Kruskal Wallis – M-W , Mann-Whitney U test

A.2 Μεθοδολογία

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη ήταν περιφερικό αίμα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- I. Απομόνωση DNA από το δοθέν υλικό.
- II. Σχεδίαση συγκεκριμένων εκκινήτων για το υπό μελέτη ιντρόνιο και στη συνέχεια PCR για τον πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου τμήματος.
- III. Πέψη με περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφόρηση για να εντοπίσουμε την ύπαρξη του πολυμορφισμού.
- IV. Αλληλούχηση κατά Sanger για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της πέψης.

A.2.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA, χρησιμοποιήθηκε το Kit (Blirt). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η προτεινόμενη από τον κατασκευαστή με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

1. Σε erpendorf των 1,5mL τοποθετήθηκαν 200μL περιφερικού αίματος.
2. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1000μL διαλύματος λύσης και επώαση για 5 λεπτά στον πάγκο, προκειμένου να λυθούν τα ερυθροκύτταρα.
3. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 8.600 g για 4 λεπτά.
4. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος με την προσθήκη 375μL δεύτερου λυτικού διαλύματος.
5. Ύστερα, προστέθηκαν 10μL Πρωτεϊνάσης K.
6. Ακολούθησε επώαση στους 55°C για 30 λεπτά.
7. Μετά την προσθήκη 4μL RNAάσης A, ακολούθησε δεύτερη επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
8. Μετά το πέρας των επώασεων, το διάλυμα αφαιρέθηκε από το υδατόλουτρο και έγινε προσθήκη 400μL GB Buffer και ανάδευση.
9. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.000g για 2 λεπτά.
10. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη.
11. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό και ακολούθησαν δύο πλύσεις με 600μL Wash Buffer 1 και 500μL Wash Buffer 2 αντίστοιχα και φυγοκεντρήσεις στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα μετά από κάθε πλύση και μία τελική φυγοκέντρηση στα 16.000g για 2 λεπτά.
12. Τέλος, προστέθηκαν 100μL Elution Buffer στη στήλη, η οποία προηγουμένως είχε τοποθετηθεί σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 1,5mL, όπου μετά από επώαση στον πάγκο για 5 λεπτά, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό.

A.2.2 PCR

Για τη μελέτη του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 18 σχεδιάστηκαν εκκινητές, με σκοπό την ενίσχυση τμήματος του ιντρονίου 3, με τη βοήθεια του Primer Blast και του προγράμματος Oligo. Το ζεύγος εκκινητών, το οποίο χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον Πίνακα 2:

Πίνακας 2 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Primer	Sequence
Forward	5'-TTCTGTTGTAGGGGAGCGT-3'
Reverse	5'-CATCAGGTTGCTTCCAGCCA-3'

Η PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες (Πίνακας 3):

Πίνακας 3 Συνθήκες PCR του πειράματος.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	2 min
Αποδιάταξη	94 °C	30 sec
Υβριδισμός εκκινητών	60 °C	30 sec
Επέκταση κλώνου	72 °C	30 sec
Τελική επέκταση	72 °C	1 min
Κύκλοι PCR		30

A.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%

Όλα τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων. Αυτό επετεύχθη με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους που έδωσε τη δυνατότητα σύγκρισης με τα προϊόντα της PCR.

Η γέλη αγαρόζης δημιουργήθηκε με 2 γραμμάρια αγαρόζης και 100mL ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE, στο οποίο προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (τελική συγκέντρωση 5ng/mL), το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στο μόριο του DNA και να φθορίζει όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 5μL προϊόντος PCR και 5μL χρωστικής (loading dye) που επιτρέπει τη σταθεροποίηση του δείγματος στη γέλη.

Τέλος, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V και 400 mA για 30 λεπτά.

Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems) και οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.

A.2.4 Πέψη

Για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού στο εκάστοτε δείγμα πραγματοποιήθηκε επώαση με το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII* με αλληλουχία κοπής 5'-GG/CC-3'.

Για κάθε πέψη χρησιμοποιήθηκαν 6μL δείγματος και 9μL ενός διαλύματος με σύσταση 150μL H₂O, 30μL 10X *CutSmart Buffer* και 5μL ενζύμου.

Η επώαση έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3 ώρες.

Το ένζυμο διασπά το τμήμα του DNA και δημιουργεί τα θραύσματα που φαίνονται στον Πίνακα 4:

Πίνακας 4 Θραύσματα που προκύπτουν από την πέψη των προϊόντων της PCR με το ένζυμο *HaeIII*.

PCR (bp)	WT (bp)	Heterozygote (bp)	Homozygote (bp)
522	308, 174	522, 308, 174	522

A.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 3%

Μετά την πέψη ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 3% (3 γραμμάρια αγαρόζης και 100mL ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE, στο οποίο προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου).

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 15μL δείγματος και 5μL χρωστικής (loading dye).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V και 400mA για 35 λεπτά.

Έτσι, ήταν εύκολη η απεικόνιση της ύπαρξης ή όχι του πολυμορφισμού σε κάθε δείγμα.

A.2.6 Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Τέλος, ακολούθησε αλληλούχηση ορισμένων προϊόντων της PCR προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της πέψης. Η διαδικασία της αλληλούχησης απαιτεί να γίνει πρώτα ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με σκοπό την απομάκρυνση των εκκινητών, του ενζύμου και των αλάτων.

A.2.6.1 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του Extract ME DNA Clean-up kit της Bliirt DNA GDANSK με την εξής διαδικασία:

1. Αρχικά, προστέθηκαν 50μL Binding Buffer που περιέχει ισοπροπανόλη στο φιαλίδιο με το προϊόν της PCR.
2. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε το δείγμα σε ειδική στήλη (Purelink PCR Purification Kit).
3. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρωσης.
4. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η πρώτη πλύση με προσθήκη 700μL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer).
5. Ακολούθησε ακόμα μία φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του διαλύματος της φυγοκέντρωσης.
6. Πραγματοποιήθηκε δεύτερη πλύση με προσθήκη 700μL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer).
7. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και μία δεύτερη φυγοκέντρηση στα 11.000g για 3 λεπτά για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από τη στήλη.
8. Τέλος, απορρίφθηκε το διάλυμα της φυγοκέντρωσης και η στήλη μεταφέρθηκε στο τελικό φιαλίδιο των 1,5mL. Σε αυτό προτέθηκαν 30μL διαλύματος έκλουσης και μετά από επώαση για 1 λεπτό, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό.

Στη συνέχεια, το καθαρισμένο προϊόν ηλεκτροφορείται με τη διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω για τον έλεγχο της ποιότητάς του και την ποσοτικοποίησή του.

Το καθαρισμένο προϊόν αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την ανάλυση.

A.2.6.2 Αλληλούχηση

Η αλληλούχηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με την τυποποιημένη μέθοδο SANGER. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν με χρήση του ABI Prism BigDye (v1.1) και αναλύθηκαν με το ABI 3100 Sequencer. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Forward 5'-TTCTGTTGTAGGGGAGCGT-3' και η σύγκριση έγινε με την αλληλουχία ENSG00000150782 του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 18 της βάσης Ensemble.

Για την ανάλυση της αλληλούχησης και των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Indigo του Gear Genomics και το SnapGene Viewer.

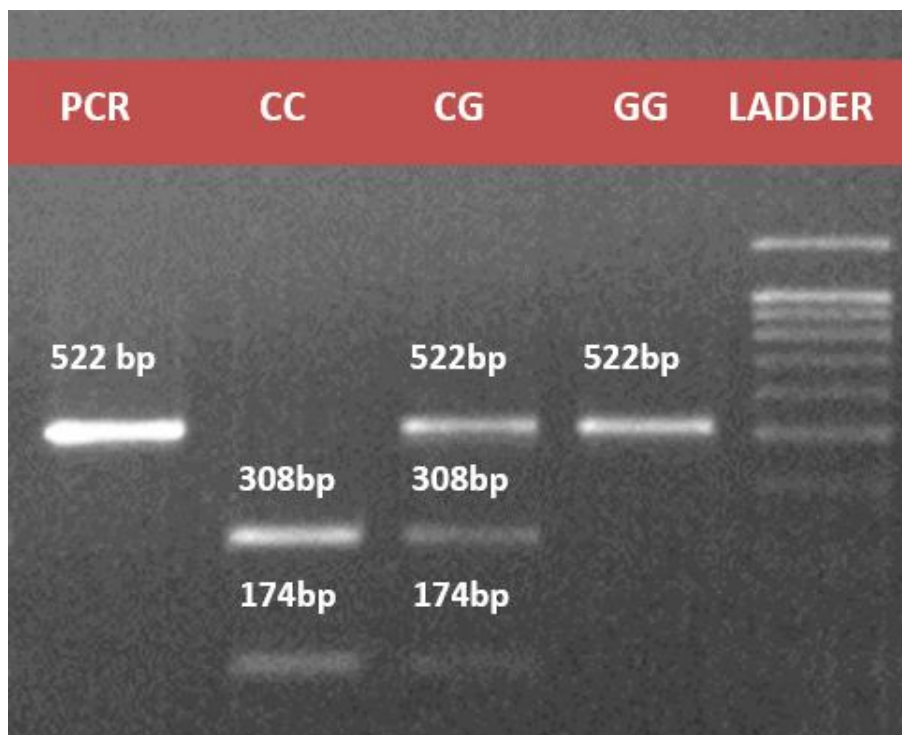
A.2.7 Βιοστατιστική ανάλυση

Η βιοστατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος Wizard και της δοκιμασίας χ^2 (Chi-square), και η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε για $p < 0.05$.

Οι κατανομές των γονοτύπων ελέγχθηκαν για απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Β. Αποτελέσματα

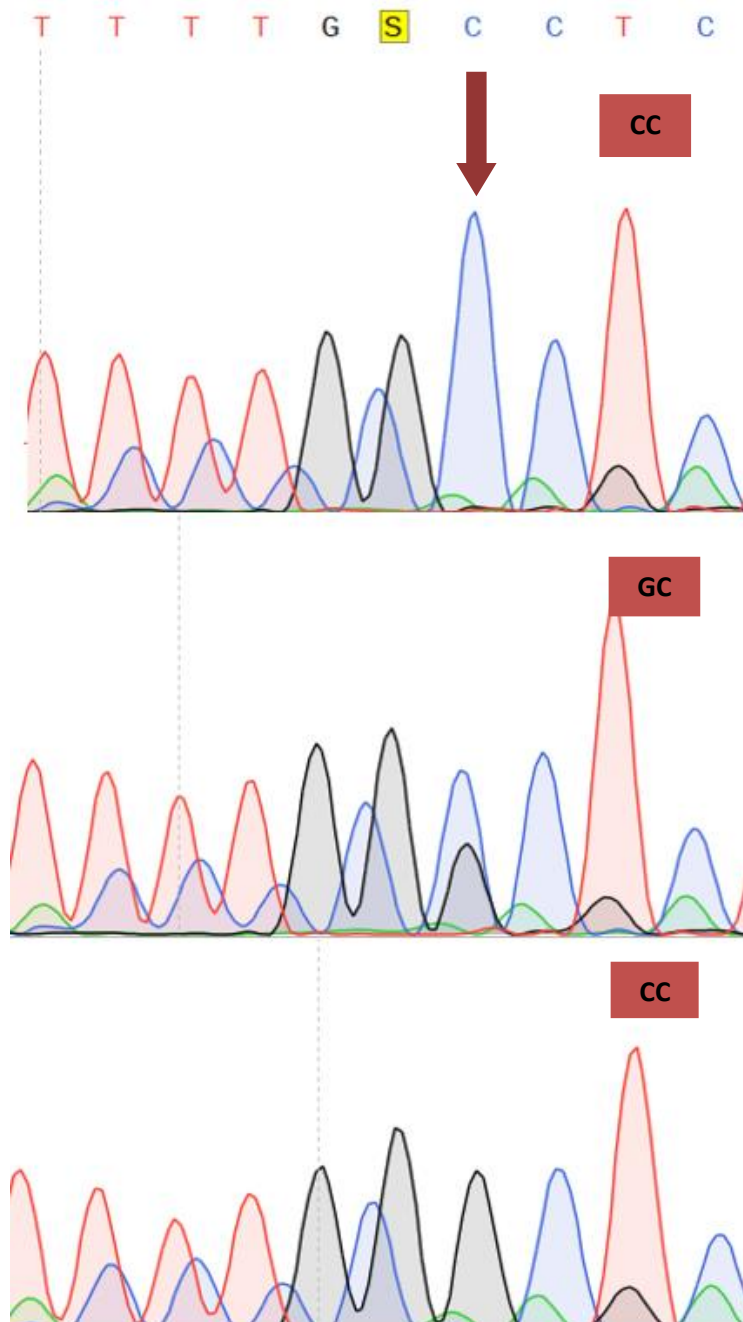
Τα αποτελέσματα της πέψης των προϊόντων της PCR με το περιοριστικό ένζυμο HaeIII φαίνονται στην Εικόνα 13:



Εικόνα 13 Απεικόνιση αποτελεσμάτων πέψης με το περιοριστικό ένζυμο HaeIII.

Το προϊόν της PCR είναι 522bp. Καθώς η αλληλουχία κοπής του ενζύμου συμφωνεί με την αλληλουχία του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 18 σε CC γονότυπο δημιουργεί 2 θραύσματα των 308 και 174 bp, σε άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό στο ένα αλληλίο (CG) δημιουργεί 3 θραύσματα των 522, 308 και 174 bp και τέλος, σε άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία (GG) παρατηρείται μόνο μία ζώνη των 522bp.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger που πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πέψης φαίνονται στην Εικόνα :



Εικόνα 14 Χρωματογραφήματα από δείγματα ασθενών με γονότυπο CC, GC και GG. Στο χρωματογράφημα του CC γονοτύπου υπάρχει μία επικρατούσα κορυφή που αντιστοιχεί σε νουκλεοτίδιο κυτοσίνης. Στο χρωματογράφημα του CG γονοτύπου (ετερόζυγο ως προς τον πολυμορφισμό), συνυπάρχουν δύο κορυφές που αντιστοιχούν η μία στο νουκλεοτίδιο γουανίνης που υπάρχει φυσιολογικά στο γονίδιο και η άλλη στο νουκλεοτίδιο κυτοσίνης που υποδεικνύει την ύπαρξη του πολυμορφισμού. Στο χρωματογράφημα του GG γονοτύπου (ομόζυγο ως προς τον πολυμορφισμό), φαίνεται μόνο μία κορυφή που αντιστοιχεί σε νουκλεοτίδιο γουανίνης.

Από την παραπάνω διαδικασία, προέκυψε ότι από τους 264 ασθενείς, οι 199 έφεραν και στα δύο αλληλία κυτοσίνη (CC), οι 56 έφεραν τον πολυμορφισμό στο ένα αλληλίο (GC), ενώ μόνο 9 έφεραν και στα δύο αλληλίο γουανίνη (GG) (Πίνακας 5).

Πίνακας 5 Συχνότητα γονοτύπων (CC, GC, GG).

Γονότυπος	Σύνολο ασθενών
CC	199
GC	56
GG	9

Η συχνότητα αλληλίου στο σύνολο των ασθενών που συμμετείχαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν 14,01%. Το SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ήταν σε συμφωνία με την ισορροπία Hardy-Weinberg: $p > 0.051$.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι υπάρχει μια συσχέτιση των γονοτύπων GC, GG, δηλαδή των ασθενών που φέρουν μία ή δύο φορές τον πολυμορφισμό με την εμφάνιση συμπτωμάτων αφού προσβληθούν από τον ιό ($p = 0.046$).

Ακόμα, η ύπαρξη του πολυμορφισμού σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία συσχετίστηκε με την εκδήλωση ορισμένων συμπτωμάτων μετά την προσβολή από τον SARS-CoV-2 (Πίνακας 6). Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς που φέρουν τον παραπάνω πολυμορφισμό εμφάνισαν πυρετό ($p = 0.015$), εκδήλωσαν δύσπνοια σε ηρεμία ($p = 0.02$), εμφάνισαν πνευμονία ($p = 0.019$) και παρουσίασαν κοιλιακό πόνο ($p = 0.028$).

Πίνακας 6 Αποτελέσματα βιοστατιστικής ανάλυσης.

Συμπτώματα	p
Πυρετός	0.015
Δύσπνοια σε ηρεμία	0.02
Πνευμονία	0.019
Κοιλιακό άλγος	0.028

Ο πολυμορφισμός δεν συσχετίστηκε με κάποιο από τα υπόλοιπα συμπτώματα της λοίμωξης ($p > 0.05$).

Τέλος, από τη μελέτη δεν προέκυψε ότι ο πολυμορφισμός αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα.

Γ. Συζήτηση

Η ξαφνική εξάπλωση της λοίμωξης από SARS-CoV-2 σε παγκόσμιο επίπεδο προκάλεσε ανησυχία λόγω της υψηλής νοσηρότητας και θνητότητας. Για αυτό το λόγο καθίσταται υψίστης σημασίας η ενασχόληση με τον ιό από την επιστημονική κοινότητα, προκειμένου να συλλεχθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες.

Η COVID-19 προκαλεί ένα σύνολο συμπτωμάτων και η πιο σοβαρή έκβαση της νόσου προκύπτει από έναν καταρράκτη κυτταροκινών που οδηγεί σε ένα φαινόμενο υπερφλεγμονής, το οποίο διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Το φλεγμονόσωμα συμμετέχει στην ενεργοποίηση της Ιντερλευκίνης 18, που αποτελεί μια φλεγμονώδη κυτταροκίνη (47).

Έτσι, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση του λειτουργικού πολυμορφισμού rs1834481 με την εκδήλωση συμπτωμάτων και την πρόγνωση της ασθένειας σε 5 ομάδες νοσούντων ποικίλης σοβαρότητας νόσου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, ο πολυμορφισμός σχετίστηκε με την παρουσία των συμπτωμάτων του πυρετού, της πνευμονίας, της δύσπνοιας κατά την ηρεμία και του κοιλιακού άλγους.

Η σχέση της IL-18 με πνευμονικές ασθένειες έχει μελετηθεί εκτενώς και υπάρχουν πολλές αναφορές για αυξημένη έκφρασή της στις παθογενείς καταστάσεις. Συγκεκριμένα, η IL-18 εμπλέκεται στην παθογένεια του αλλεργικού άσθματος, μέσω Th2 απόκρισης που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή. Η έκφραση της IL-18 βρέθηκε αυξημένη στα επιθηλιακά και στα λεία μυϊκά κύτταρα από βιοψίες αεραγωγών ασθενών (39, 48, 49).

Επιπλέον, σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης στα κυψελιδικά μακροφάγα, CD8 T λεμφοκύτταρα, όπως και στα βρογχικά και κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα (39, 50, 51).

Τέλος, σε ασθενείς με περιπτώσεις σοβαρής πνευμονικής βλάβης όπως είναι το ARDS, βρέθηκαν υψηλά επίπεδα IL-18, τα οποία συσχετίστηκαν και με την σοβαρότητα αλλά και με τα ποσοστά θνητότητας (39, 52, 53). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μόλυνση από στελέχη του ιού της γρίπης όπου υπήρξε υπερ-ενεργοποίηση του NLRP3, η παραγωγή της IL-18 ήταν εκτεταμένη με αποτέλεσμα την πρόκληση ενός καταρράκτη κυτταροκινών, διαμεσολαβούμενο από την IFN γ , χαρακτηριστικό γνώρισμα του ARDS. Το ίδιο συνέβη και σε περιπτώσεις λοίμωξης από τον SARS κορονοϊό (39).

Επομένως, λόγω της υπέρμετρης ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος από την είσοδο του SARS-CoV-2 στο κύτταρο, που αποτελεί παράγοντα αυξημένης ενεργοποίησης της IL-18, σε συνδυασμό με την ύπαρξη του πολυμορφισμού που έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα της κυτταροκίνης, αιτιολογείται η εμφάνιση της πνευμονίας σε ασθενείς με COVID-19 που φέρουν ένα ή δύο αλληλία με το SNP.

Αντίστοιχα, το σύμπτωμα της δύσπνοιας κατά την ηρεμία που αποτελεί επίσης δυσλειτουργία των πνευμόνων αιτιολογεί τα παραπάνω ευρήματα.

Ακόμα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η IL-1β είναι αυτή που συμμετέχει στο μονοπάτι του πυρετού, ενώ πειράματα σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε με ένεση IL-18 δεν παρουσίασαν πυρετό (54). Το παράδοξο με τα ευρήματα της συγκεκριμένης εργασίας είναι ότι η ύπαρξη του πολυμορφισμού στο συγκεκριμένο γονίδιο, που αυξάνει τα επίπεδα της IL-18, συσχετίστηκε με την εμφάνιση του συμπτώματος του πυρετού ($p=0.015$).

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό, είτε σε ομόζυγη είτε σε ετερόζυγη κατάσταση, εμφάνισαν οξύ κοιλιακό άλγος. Το γεγονός αυτό δεν επιβεβαιώνεται από σχετική βιβλιογραφία, ωστόσο, τα ευρήματα υποστηρίζουν ότι δεν πρόκειται για τυχαίο γεγονός ($p=0.028$).

Δ. Συμπέρασμα

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ύπαρξη του πολυμορφισμού μπορεί, πιθανόν, να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για τη λοίμωξη COVID-19. Καθώς βρέθηκε η συσχέτιση του SNP με κάποια από τα συμπτώματα, ο γονιδιακός έλεγχος για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού στον εκάστοτε ασθενή μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την πιθανή έκβαση της νόσου. Ωστόσο, είναι αναγκαία η μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτό το συμπέρασμα.

E. Βιβλιογραφία

1. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 587269.
2. Inchingolo AD, Inchingolo AM, Bordea IR, Malcangi G, Xhajanka E, Scarano A, Lorusso F, Farronato M, Tartaglia GM, Isacco CG, Marinelli G, D’Oria MT, Hazballa D, Santacroce L, Ballini A, Contaldo M, Inchingolo F, Dipalma G. SARS-CoV-2 Disease through Viral Genomic and Receptor Implications: An Overview of Diagnostic and Immunology Breakthroughs. *Microorganisms.* 2021 Apr 10;9(4):793.
3. Ludwig S, Zarbock A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesth Analg.* 2020 Apr 20
4. Malaiyan J, Arumugam S, Mohan K, Radhakrishnan GG. An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues. *J Med Virol.* 2021 Jan;93(1):499-505.
5. Lam TTY, Jia N, Cao WC. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature.* 2020 Jul;583(7815):282-285.
6. Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK, Kaushik S, Kumar S, Verma V. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS Pathog.* 2020 Aug 21;16(8): e1008762.
7. Marks M, O’Hara G, Houlihan C, Bell L, Heightman M, Hart N. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. Reference Module in Biomedical Sciences. 2021: B978-0-08-102723-3.00139-6.
8. Wang YT, Landeras-Bueno S, Hsieh LE, Terada Y, Kim K, Ley K, Shresta S, Sapphire EO, Regla-Nava JA. Spiking Pandemic Potential: Structural and Immunological Aspects of SARS-CoV-2. *Trends Microbiol.* 2020 Aug;28(8):605-618
9. Nagy A, Alhatlani B. An overview of current COVID-19 vaccine platforms. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021; 19:2508-2517.
10. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology,* 2020 June 27.

11. Oliveira DS, Medeiros NI, Gomesa JAS. Immune response in COVID-19: What do we currently know? *Microbial Pathogenesis* Volume 148, November 2020, 104484.
12. Esakandari H, Nabi-Afjadi M, Fakkari-Afjadi J, Farahmandian N, Miresmaeili SM, Bahreini E. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biol Proced Online*. 2020 Aug 4; 22:19.
13. Lamberghini F, Testai FD. COVID-2019 fundamentals. *J Am Dent Assoc*. 2021 May; 152(5): 354–363.
14. Song C, Wang Y, Li W, Hu B, Chen G, Xia P, Wang W, Li C, Diao F, Hu Z, Yang X, Yao B, Liu Y. Absence of 2019 novel coronavirus in semen and testes of COVID-19 patient. *Biol Reprod*. 2020 Jun 23;103(1):4-6.
15. Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Ji J, Wen C. Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Front Immunol*. 2020 Jul 10; 11:1708.
16. Kumar Samudrala P, Kumar P, Choudhary K, Thakur N, Wadekar GS, Dayaramani R, Agrawal M, Alexander A. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *Eur J Pharmacol*. 2020 Sep 15; 883:173375.
17. McCarthy MK, Weinberg JB. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front Microbiol*. 2015 Jan 29; 6:21.
18. Jamilloux Y, Henry T, Belot A, Viel S, Fauter M, El Jammal T, Walzer T, François B, Sève P. Should we stimulate or suppress immune responses in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions. *Autoimmun Rev*. 2020 Jul;19(7):102567.
19. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, Pan P, Wang W, Hu D, Liu X, Zhang Q, Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020 Apr;92(4):424-432.
20. Freeman TL, Swartz TH. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front Immunol*. 2020; 11: 1518.
21. Sahu U, Biswas D, Singh AK, Khare P. Mechanism involved in the pathogenesis and immune response against SARS-CoV-2 infection. *Virusdisease*. 2021 May 4;1-9.

22. García LF. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Front Immunol.* 2020 Jun 16; 11:1441.
23. Hong S, Park S, Yu JW. Pyrin Domain (PYD)-containing Inflammasome in Innate Immunity. *Journal of Bacteriology and Virology*, Vol.41(3) : 133-146, 2011.
24. Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol.* 2016 Jun 20;213(6):617-29.
25. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 6;20(13):3328.
26. Lee SM. Role of NLRP3 Inflammasome in Pathogenesis of Pulpal Disease. 2015
27. Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome - A Key Player in Antiviral Responses. *Front Immunol.* 2020; 11: 211.
28. Berg DFvd, Velde AAT. Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated. *Front Immunol.* 2020 Jun 26; 11:1580.
29. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012; 28:137-61.
30. Ratajczak MZ, Kucia M. SARS-CoV-2 infection and overactivation of Nlrp3 inflammasome as a trigger of cytokine “storm” and risk factor for damage of hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2020 Jul;34(7):1726-1729.
31. Yap JKY, Moriyama M, Iwasaki A. Inflammasomes and Pyroptosis as Therapeutic Targets for COVID-19. *J Immuno.* 2020 Jul 15;205(2):307-312.
32. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun;20(6):355-362.
33. Huang Q, Wu X, Zheng X, Luo S, Xu S, Weng J. Targeting inflammation and cytokine storm in COVID-19. *Pharmacol Res.* 2020 Sep; 159:105051.
34. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19. *J Infect.* 2020 Jun;80(6):607-613.
35. Law HKW, Cheung CY, Ng HY, Sia SF, Chan YO, Luk W, Nicholls JM, Malik Peiris JS, Lau YL. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2366-74.
36. Lau SKP, Lau CCY, Chan KH, Li CPY, Chen H, Jin DY, Chan JFW, Woo PCY, Yuen KY. Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus:

- implications for pathogenesis and treatment. *J Gen Virol.* 2013 Dec;94(Pt 12):2679-2690.
37. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the Immune System. *Physiol Res.* 2020 Jul 16;69(3):379-388.
38. Vecchié A, Bonaventura A, Toldo S, Dagna L, Dinarello CA, Abbate A. IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? *J Cell Physiol.* 2021 Mar;236(3):1638-1657.
39. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2018 Jan;281(1):138-153.
40. Omoto Y, Yamanaka K, Tokime K, Kitano S, Kakeda M, Akeda T, Mizutani H. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *J Dermatol Sci.* 2010 Aug;59(2):129-35.
41. Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, Hanzawa K, Kumagai K, Okamura H, Takada H. Neutrophil proteinase 3- mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol.* 2001 Dec 1;167(11):6568-75.
42. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol.* 2013 Oct 8; 4:289.
43. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Ann Rev Immunol (2001) 19:423–74.* doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.423.
44. Koch W, Wolferstetter H, Schatke A, Schömig A, Kastrati A. Interleukin 18 gene variation and risk of acute myocardial infarction. *Cytokine.* 2011 Dec;56(3):786-91.
45. Zhang W, Dang S, Zhang G, He H, Wen X. Genetic polymorphisms of IL-10, IL-18 and IL12B are associated with risk of non-small cell lung cancer in a Chinese Han population. *Int Immunopharmacol.* 2019 Dec; 77:105938.
46. Martinez-Hervas S, Martínez-Barquero V, Savall EN, Lendínez V, Olivares L, Benito E, Real JT, Chaves FJ, Ascaso JF. Plasma IL-18 levels are related to insulin and are modulated by IL-18 gene polymorphisms. *Clin Investig Arterioscler.* Nov-Dec 2015;27(6):265-71.
47. Chen IY, Moriyama M, Chang MF, Ichinohe T. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. *Front Microbiol.* 2019 Jan 29; 10:50.

48. Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Teramoto S, Shiratori M, Hashimoto M, Ohmichi M, Abe S. IL-18 might reflect disease activity in mild and moderate asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107:331-336.
49. Imaoka H, Gauvreau GM, Watson RM, Smith SG, Dua B, Baatjes AJ, Howie K, Hoshino T, Killian KJ, Aizawa H, O'Byrne PM. Interleukin-18 and interleukin-18 receptor- α expression in allergic asthma. *Eur Respir J.* 2011; 38:981-983.
50. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kato S, Iwasaki H, Watanabe K, Aizawa H. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur Respir J.* 2008; 31:287-297.
51. Wang J, Liu X, Xie M, Xie J, Xiong W, Xu Y. Increased expression of interleukin-18 and its receptor in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *COPD.* 2012;9:375-381.
52. Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185:1225-1234.
53. Makabe H, Kojika M, Takahashi G, Matsumoto N, Shibata S, Suzuki Y, Inoue Y, Endo S. Interleukin-18 levels reflect the long-term prognosis of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *J Anesth.* 2012; 26:658-663.
54. Lee JK, Kim SY, Lewis EC, Azam T, Reznikov LL, Dinarello CA. Differences in signaling pathways by IL-1 β and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 8;101(23):8815-20.