

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ -
ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Διευθυντής: Καθ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής

**ΛΕΚΤΙΝΗ ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΗ
ΜΕ ΤΗ ΜΑΝΝΟΖΗ
(mannose-binding lectin, MBL)
ΚΑΙ
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ**

ΙΟΡΔΑΝΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθαίος Σπελέτας

Επίκουρος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας (επιβλέπων)

Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Χρήστος Χατζηχριστοδούλου

Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθαίος Σπελέτας

Επίκουρος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Χρήστος Χατζηχριστοδούλου

Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας

Γεώργιος Νταλέκος

Καθηγητής Παθολογίας

Γεώργιος Συρογιαννόπουλος

Καθηγητής Παιδιατρικής

Αντώνιος Γούναρης

Αναπληρωτής Καθηγητής Νεογνολογίας

Ευθυμία Πετεινάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Στους γονείς μου, Τιμόθεο και Μάλαμα

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|---|-----------|
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ | 3 |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | 6 |
| ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ | 8 |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ | 9 |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 11 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 12 |
| 1.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ | 12 |
| 1.1.1. <i>ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΚΑΙ ΒΛΕΝΟΓΟΝΝΟΙ ΦΡΑΓΜΟΙ</i> | 12 |
| 1.1.2. <i>ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ</i> | 14 |
| 1.1.3. <i>ΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ</i> | 15 |
| 1.2. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΝΕΟΓΝΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ | 17 |
| 2. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ MBL: ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ..... | 19 |
| 2.1. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΗΣ MBL..... | 19 |
| 2.2. Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL | 20 |
| 2.3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL..... | 22 |
| 2.4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MBL2..... | 26 |
| 2.5. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΩΝ..... | 30 |
| 3. MASPS, MBL –ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ..... | 32 |
| 3.1. ΔΟΜΗ..... | 32 |
| 3.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ..... | 32 |
| 3.3. ΣΥΜΠΛΟΚΑ MASP-MBL..... | 33 |
| 4. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ MBL ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ | 35 |
| 4.1. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΕΣ | 35 |
| 4.1.1. <i>ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΑΙ MBL</i> | 36 |
| 4.1.2. <i>ΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ</i> | 38 |
| 4.1.3. <i>ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΙΟΥΣ</i> | 39 |
| 4.1.4 <i>ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ</i> | 41 |
| 4.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΣΕ ΝΕΟΓΝΑ | 43 |
| ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 47 |
| 1. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ | 48 |
| 2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ..... | 48 |
| 3. ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ | 51 |
| 3.1. ΥΛΙΚΑ..... | 51 |
| 3.1.1. <i>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ</i> | 52 |
| 3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA..... | 55 |

| | |
|---|------------|
| 3.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ | 55 |
| 3.3.1. PCR RFLP ΓΙΑ ΤΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ARG52CYS, GLY54ARG ΚΑΙ GLY57GLU ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ ΚΑΙ -550G>C, -221G>C ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MBL2..... | 55 |
| 3.3.2. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ ARG52CYS ΜΕ SEQUENCE SPECIFIC PCR, ASO-PCR | 63 |
| 3.3.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ..... | 65 |
| 3.3.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ.. | 66 |
| 3.4. ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (ENZYMELINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY, ELISA) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MBL..... | 67 |
| 3.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ | 68 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 69 |
| 4.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ | 69 |
| 4.1.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MBL2..... | 71 |
| 4.2. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ | 81 |
| 4.2.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MBL ΜΕ ELISA | 81 |
| 4.3. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 88 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 91 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 100 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 104 |

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

| | |
|---|--|
| APP (Antimicrobial proteins and peptides) | Αντιμικροβιακά πεπτίδια και πρωτεΐνες |
| ASO-PCR (Allele specific oligonucleotide-PCR) | PCR με χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών για κάθε αλληλόμορφο |
| CCP (contiguous complement control protein) | Συνεχόμενη πρωτεΐνη ελέγχου του συμπληρώματος |
| CpG (Cytosine-phosphate-guanosine) | Δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανοσίνης |
| CR-1 (complement receptor 1) | Υποδοχέας 1 του συμπληρώματος |
| CRDs (Cysteine rich domains) | Πεδία πλούσια σε κυστεΐνες |
| CRP (C-reactive protein) | C-αντιδρώσα πρωτεΐνη |
| DNA (Deoxyribonucleic acid) | Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ |
| EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) | Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ |
| EGF (epidermal growth factor) | Επιδερμικού αυξητικού παράγοντα |
| HBC (Hepatitis C virus) | Ιός της ηπατίτιδας C |
| HBV (Hepatitis V virus) | Ιός της ηπατίτιδας V |
| Het (Heterozygous) | Ετερόζυγος |
| HGH (Human Growth Hormone) | Ανθρώπινη αυξητική ορμόνη |
| HIV (Human Immunodeficiency Virus) | Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας |
| Hom (Homozygous) | Ομόζυγος |
| HRP (horseradish peroxidase) | Υπεροξειδάση της ραπανίδας |
| IFN (Interferon) | Ιντερφερόνη |
| IL (Interleukin) | Ιντερλευκίνη |
| LBP (LPS-binding protein) | Πρωτεΐνη συνδέουσα LPS |
| LGA (large for gestational age)- | Νεογνά μεγάλα για την ηλικία κύησης |
| LPS (Lipopolysaccharide) | Λιποπολυσακχαρίτες |
| MAC (membrane attack complex) | Μεμβρανολυτικό σύμπλεγμα |
| MASP's (MBL -associated serine protease) | MBL-συνδεόμενες πρωτεΐνες με δράση πρωτεάσης σερίνης |
| MBL (mannose binding lectin) | Λεκτίνη προσδεδεμένη σε μανόζη |
| MBP (myelin binding protein) | Πρωτεΐνη συνδεόμενη με μυελίνη |
| NF-κB (Nuclear factor-kappa B) | Πυρηνικός παράγοντας-κB |
| PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) | Μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με την παθογονικότητα |
| PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) | Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος |
| PBS (Phosphate Buffered Saline) | Ουδέτερο διάλυμα φωσφορικού άλατος |
| PCR (Polymerase Chain Reaction) | Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης |
| PMN (polymorphonuclear leukocytes) | Πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα. |

| | |
|--|--|
| PRRs (Pattern recognition receptors) | Υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων |
| RFLP (Restriction fragment length polymorphism) | Πολυμορφισμός τμημάτων περιορισμένου μήκους |
| RT (Room Temperature) | Θερμοκρασία δωματίου |
| S (Soluble) | Διαλυτό |
| SGA (small for gestational age) | Νεογνά με χαμηλό βάρος για την ηλικία κύησης |
| SP (Serine protease) | Σερίνη πρωτεάση |
| SPR (Surface plasmon resonance) | Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων |
| TLRs (Toll-like receptors) | Ανάλογοι των Toll υποδοχείς |
| TMB (tetramethylbenzidine) | Τετραμεθυλβενζιδίνη |
| TNF-α (Tumor Necrosis Factor -α) | Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α |
| TNF (Tumor necrosis factor) | Παράγοντας νέκρωσης των όγκων |
| U (Units) | Μονάδες ενζύμου |
| Wt (Wild type) | Άγριου τύπου |
| MEΘ | Μονάδα Εντατικής Θεραπείας |
| NT | Νεογνολογικό Τμήμα |
| PA | Ρευματοειδής αρθρίτιδα |
| ΣΑΔ | Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας |
| ΣΕΛ | Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος |

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Γεώργιος Ιορδανάκης του Τιμοθέου
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 25 Σεπτεμβρίου 1980
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Θεσσαλονίκη
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμος
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Ολυμπιάδος 89 – 56224 Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 2310-771529 – Κινητό τηλέφωνο: 6944-460163
E-mail: iordanakisgio@gmail.com
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά (καλά), Ιταλικά (άριστα)

ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

2006 Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών - Πανεπιστήμιο Σπουδών, Λ' Ακουϊλα, Ιταλία.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. SPELETAS M, MAMARA A, PAPADOPOULOU-ALATAKI E, **IORDANAKIS G**, LIADAKI K, BARDAKA F, KANARIOU M, GERMENIS AE. TNFRSF13B/TAC1 alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *J Clin Immunol* 2011, 31:550-559.
2. **IORDANAKIS G**, GOUNARIS A, KONSTANTINIDI K, TSITSAMI E, GERMENIS AE, SPELETAS M. "Mannose-binding lectin (MBL) deficiency in neonates as a predisposing factor to respiratory distress syndrome" *Genetics in Medicine*, υπό δημοσίευση.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. SPELETAS M, MAMARA A, **IORDANAKIS G**, PAPADOPOULOU-ALATAKI E, TSITSAMI E, GERMENIS AE. TAC1 expression and mutational status in Greek patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009. European Journal of Immunology 39 (Suppl. S1):S457, 2009.
2. SPELETAS M, PAPADOPOULOU-ALATAKI E, LOULES G, **IORDANAKIS G**, GERMENIS AE. Novel TAC1 mutations (V220A and P251L) possibly not implicated in common variable immunodeficiency pathogenesis. 22st European Immunogenetics & Histocompatibility Conference, Toulouse 2008. Tissue Antigens 71:337, 2008.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι λοιμώξεις αποτελούν την κυριότερη αιτία νεογνικής και βρεφικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Κατά τη νεογνική περίοδο, οι μηχανισμοί της ειδικής ανοσιακής απάντησης δεν έχουν αναπτυχθεί επαρκώς, με αποτέλεσμα η νεογνική ανοσία να στηρίζεται κυρίως στους παράγοντες και τις λειτουργίες της φυσικής ανοσίας έναντι διαφόρων παθογόνων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του γενετικού υπόβαθρου με το φλεγμονώδες περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το νεογνό, φαίνεται να καθορίζει την προδιάθεσή του για την ανάπτυξη λοιμώξεων. Ωστόσο, ελλειπείς είναι οι πληροφορίες σχετικά με το ρόλο των γενετικών παραλλαγών που παρουσιάζονται σε γονίδια της φυσικής ανοσίας, όσον αφορά την ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων. Ένα από αυτά είναι το γονίδιο *MBL2* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MBL, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, κατά τη νεογνική ηλικία, ως κύριος παράγοντας της φυσικής ανοσίας. Δεδομένου ότι γενετικές παραλλαγές του συγκεκριμένου γονιδίου φαίνεται να καθορίζουν τη συγκέντρωση και ανεπάρκεια της πρωτεΐνης MBL στον ορό και έχουν βρεθεί να σχετίζονται επιλεκτικά με διάφορες λοιμώξεις σε ενήλικες, στην παρούσα μελέτη αναζητήθηκε εάν η MBL ανεπάρκεια, γονοτυπικά και ορολογικά οριζόμενη, σχετίζεται με την επίπτωση περιγεννητικών λοιμώξεων, καθώς και με αυξημένο κίνδυνο περιγεννητικής νοσηρότητας.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν νεογνά που προήλθαν από την Μαιευτική Κλινική αλλά και από το Νεογνολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας <<Άγιος Παντελεήμων>>.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής: τον κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, που με δέχτηκε στο εργαστήριο του, μου έδωσε την ευκαιρία να υλοποιήσω το στόχο μου και μου εξασφάλισε όλες τις προϋποθέσεις για ένα κατάλληλο περιβάλλον εργασίας. Τις θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα κ. Ματθαίο Σπελέτα, Επίκουρο Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, για την επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Είναι ένας επιστήμονας που σέβομαι απεριόριστα και αποτελεί τιμή για μένα η συνεργασία μαζί του. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω το

τρίτο μέλος της Τριμελούς Επιτροπής, τον κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας, για την άμεση ανταπόκριση κάθε φορά που χρειαζόταν η παρέμβαση του σε θέματα της διατριβής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Αντώνιο Γούναρη, Αναπληρωτή Καθηγητή Νεογνολογίας, για την άψογη συνεργασία κατά τη διαδικασία της συλλογής του υλικού της μελέτης, όπου χωρίς την παρουσία του δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί η παρούσα διατριβή. Θερμές ευχαριστίες οφείλω να αποδώσω στην κ. Έλενα Τσιτσάμη, για τη συνεργασία που είχαμε κατά καιρούς σε ερευνητικά θέματα αλλά και θέματα καταγραφής των κλινικο-εργαστηριακών στοιχείων κάθε νεογνού.

Επίσης ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής, τον κ. Γεώργιο Νταλέκο, Καθηγητή Παθολογίας, τον κ. Γεώργιο Συρογιαννόπουλο, Καθηγητή Παιδιατρικής και την κ. Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, για την τιμή που μου έκαναν.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την Αντιγόνη Μαμάρα, τη Νίκη Αργέντου, την Αντιγόνη Αβραμούλη, την Κυριακή Λιαδάκη, την Φωτεινή Σούκου, την Φωτεινή Μπαρδάκα, τον Στέφανο Τσόχα και τον Κώστα Τσολή για τις ατελείωτες ώρες συνεργασίας μας, τη βοήθεια, την υποστήριξη και τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Ευχαριστώ απο καρδιάς τους φίλους μου, Στέλιο, Θοδωρή, Βασίλη, Νίκο, Γιάννη, Φωτεινή αλλά και τις αδερφές μου, Μαρία και Κωνσταντίνα που στάθηκαν δίπλα μου τις όμορφες αλλά και τις δύσκολες στιγμές της ζωής μου.

Τέλος, αφιερώνω αυτή τη διατριβή στους γονείς μου, Τιμόθεο και Μάλαμα για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια σε όλους τους τομείς. Χωρίς αυτούς δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί η παρούσα διατριβή και για αυτό τους ευχαριστώ πολύ.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια, οι λοιμώξεις εξακολουθούν να αποτελούν την κύρια αιτία νεογνικής και βρεφικής νοσηρότητας και θνησιμότητας, με περίπου 4 εκατομμύρια θανάτους ετησίως [1]. Το ξεχωριστό ανοσιακό σύστημα του νεογνού, αν και φαίνεται να διαθέτει, στις περισσότερες περιπτώσεις, αποτελεσματικούς μηχανισμούς προστασίας από διάφορους τύπους λοιμώξεων, παραμένει ωστόσο ευάλωτο σ' αυτούς, συγκριτικά με τους ενήλικες [2, 3]. Επίσης, παρόλο που το ανοσιακό σύστημα του νεογνού διαθέτει ευελιξία και πλαστικότητα, που επιτρέπει στα νεογνά την ανάπτυξη αποτελεσματικών απαντήσεων στα διάφορα παθογόνα, φαίνεται να στηρίζεται κυρίως σε μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας [4].

Διάφοροι παράγοντες πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τον τοκετό, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ωριμότητα του ανοσιακού συστήματος του νεογνού, όπως η εβδομάδα τοκετού, η έκθεση της μητέρας σε αντιβιοτικά, η γενετική προδιάθεση και οι περιγεννητικές λοιμώξεις. Πολλοί απ' αυτούς φαίνεται να επηρεάζουν πιο έντονα τα πρόωρα νεογνά, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός τους. Αρχικά, θα γίνει αναφορά στην υπάρχουσα γνώση όσον αφορά τη συμμετοχή των παραγόντων και των λειτουργιών της φυσικής ανοσίας, οι οποίοι αποσκοπούν αφενός στην προστασία του νεογνού από τις λοιμώξεις και αφετέρου στον περιορισμό του κινδύνου μιας μη ελεγχόμενης φλεγμονώδους απάντησης.

1.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ

Οι παράγοντες και οι λειτουργίες της φυσικής ανοσίας του νεογνού, συμπεριλαμβάνουν φραγμούς της αναπνευστικής και εντερικής οδού, ανοσοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα-μακροφάγα, NK κύτταρα), πρωτεΐνες φλεγμονώδους απάντησης, πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση καθώς και ένα σύστημα παθογονικής αναγνώρισης. Επιπρόσθετα, δε θα πρέπει να παραληφθεί, ο ρόλος της παθητικής πρόσληψης ανοσοσφαιρινών από τη μητέρα οι οποίες συνδράμουν στην αποτελεσματικότερη ανοσιακή του απάντηση.

1.1.1. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΚΑΙ ΒΛΕΝΟΓΟΝΝΟΙ ΦΡΑΓΜΟΙ

Υπάρχουν δυο κομβικής σημασίας φραγμοί στα νεογνά, οι οποίοι αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των βακτηρίων και μυκήτων: οι βλεννογόνοι (αναπνευστικής και εντερικής οδού) και το δέρμα. Στο ενδομήτριο, το έμβρυο προστατεύεται εν μέρει από τα διάφορα παθογόνα, μέσω ενός αποστειρωμένου περιβάλλοντος που παρέχει το αμνιακό υγρό, εμπλουτισμένο με APPs και πρωτεΐνες

οξείας φάσης, που παράγονται από τα κύτταρα της τροφοβλάστης [4]. Κατά τη γέννηση, το δέρμα του νεογνού καλύπτεται από ένα σμήγμα ειδικής σύστασης (*vernix caseosa*, *smegma embryonum*), το οποίο ισχυροποιεί το φραγμό του δέρματος. Το παραπάνω σμήγμα, που απουσιάζει σε πρόωρα νεογνά (<28 εβδομάδων κύησης), παρέχει προστασία καθώς σταθεροποιεί τη θερμοκρασία του σώματος, προλαμβάνει την απώλεια νερού και περιέχει APPs, όπως ντιφενσίνες και καθελισιδίνες, λυσοζύμη, ψωριασίνη και άλλες ουσίες με αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων βακτηρίων και μυκήτων **(Εικόνα 1)** [5]. Επιπρόσθετα, το δέρμα περικλείεται από την κεράτινη στοιβάδα, η οποία εμποδίζει την είσοδο των παθογόνων, διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία του σώματος και μειώνει τον κίνδυνο αφυδάτωσης [6].

Από την άλλη πλευρά, οι βλεννογόνοι του πεπτικού και αναπνευστικού συστήματος περιέχουν συστατικά, όπως APPs, βλέννα, ένζυμα, ανοσοκύτταρα, οψωνίνες, επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες A και D και άλλα στοιχεία, τα οποία θεωρούνται χρήσιμα στο να προλαμβάνουν πιθανές λοιμώξεις στα νεογνά [7]. Μετά τον τοκετό ο εντερικός βλεννογόνος, εκτίθεται σε παθογόνα του περιβάλλοντος καθώς και της εντερικής χλωρίδας. Η επάρκεια του ανοσιακού συστήματος στον πεπτικό σωλήνα είναι ουσιώδους σημασίας στην άμυνα του οργανισμού κατά της εισβολής των παθογόνων και αποσκοπεί στον έλεγχο μιας αναπτυσσόμενης φλεγμονής αλλά και μιας ομαλής εγκατάστασης της εντερικής χλωρίδας [8].

Οι λοιμώξεις που αναπτύσσονται με ή χωρίς ενδομήτρια φλεγμονή μητρικής προέλευσης του ομφάλιου λώρου (χοριοαμνιτίδα) και η μόλυνση του νεογνού από μικρόβια που διοχετεύονται μέσω αυτού, αντιπροσωπεύουν τις κύριες πηγές ανάπτυξης πρώιμης σήψης [9]. Πρώτη γραμμή εισόδου των παθογόνων στα νεογνά θεωρήθηκε η αναπνευστική οδός. Στο ενδομήτριο τα APPs του αμνιακού υγρού και των πνευμόνων, οι επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες A και D, τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα PMNs στο αίμα και τα κύτταρα της τροφοβλάστης στον πλακούντα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των διαφόρων παθογόνων **(Εικόνα 1)**. Ωστόσο, αμέσως μετά τον τοκετό, οι λειτουργίες των βλεννογόνων του αναπνευστικού μπορεί να διαταραχθούν, λόγω πιθανής ανεπάρκειας των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών, αλλοιωμένης παραγωγής βλέννας ή ενδεχόμενης μηχανικής υποστήριξης, που μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική δυσχέρεια. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η ανεπάρκεια των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών A και D στα νεογνά καθώς και αυτή των αντιμικροβιακών πεπτιδίων του επιθηλίου της αναπνευστικής οδού, οδηγεί σε μειωμένη αντιμικροβιακή απάντηση έναντι παθογόνων, αυξάνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης αναπνευστικών λοιμώξεων [10].

1.1.2. ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ

Αφού διαπεράσουν τους παραπάνω φραγμούς, τα παθογόνα έρχονται σε επαφή, μέσω των PRRs, με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που περιλαμβάνουν μονοκύτταρα, μακροφάγα, και δενδριτικά κύτταρα. Η συγκεκριμένη αναγνώριση, πυροδοτεί την έναρξη φλεγμονώδους απάντησης μέσω της παραγωγής κυτταροκινών, φαγοκυττάρωσης και λύσης των κυττάρων στόχων, αλλά και παρουσίασης αντιγόνων στα κύτταρα της ειδικής ανοσίας [7].

Ο αριθμός των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στα νεογνά δε φαίνεται να διαφέρει σημαντικά, συγκριτικά με τους ενήλικες. Ωστόσο, οι ανοσιακές απαντήσεις, κατόπιν ευαισθητοποίησης των PRRs στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος των νεογνών, εμφανίζονται μειωμένες [11, 12]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί *in vitro* ότι τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα ομφαλικού αίματος, έπειτα από ευαισθητοποίηση με αγωνιστές των TLRs, παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών που ευνοούν την Th1 απάντηση (TNF- α , IFN γ και IL-12), ενώ αντιθέτως εμφάνισαν αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών της Th2/Th17 απάντησης και άλλων αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως IL-6, IL-10, IL-17 και IL-23 [13]. Εκτός από τη διαφορετική παραγωγή κυτταροκινών και τη μειωμένη αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα, τα μονοκύτταρα παρουσιάζουν συν τοις άλλης και αδυναμίες στη φαγοκυτταρική τους ικανότητα και χημειοταξία, κατά τη διάρκεια νεογνικής σήψης [14]. Όσον αφορά στην παρουσίαση των αντιγονικών επιτόπων στα κύτταρα της ειδικής ανοσίας, τα νεογνικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα και δενδριτικά) φαίνεται να υστερούν σε σχέση με αυτά των ενηλίκων [15]. Συμπερασματικά, τα παραπάνω κύτταρα επιδεικνύουν στα νεογνά, αδυναμίες στην αναγνώριση των παθογόνων, στην ενεργοποίησή τους κατόπιν ευαισθητοποίησης, στη φαγοκυτταρική και λυτική τους ικανότητα, καθώς και στην επαγωγή ειδικής ανοσιακής απάντησης.

Τα ουδετερόφιλα, από την άλλη, αποτελούν τους πρώτους διαβιβαστές νεογνικής φυσικής απάντησης. Πολλές ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές έχουν καταδειχθεί συγκριτικά με αυτά των ενηλίκων [16, 17]. Κατά τη διάρκεια πρώιμης νεογνικής σήψης έχει βρεθεί να αυξάνονται σε αριθμό, τόσο σε τελειόμηνα όσο και σε πρόωρα νεογνά [18, 19]. Οι ποιοτικές διαφορές τους, όπου φαίνεται να υστερούν συγκριτικά με τους ενήλικες, αφορούν στην αντίδρασή τους σε χημειοτακτικά ερεθίσματα, στην ικανότητα προσκόλλησης και κύλισης στο αγγειακό ενδοθήλιο, στην προβολή λαμινοποδίων αλλά και στους μηχανισμούς βακτηριακής λύσης [17, 20]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι η μειωμένη ή πολύ αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ουδετερόφιλα, όπως LFA-1 στα πρόωρα και CR3 ή L -σελεκτίνης σε όλα τα νεογνά κατά τη διάρκεια σήψης,

περιορίζει την κύλιση και την επακόλουθη διαπίδυσή τους [21, 22]. Τέλος, διαπιστώθηκε πως οι ιδιότητες αποκοκκίωσης των νεογνικών ουδετερόφιλων δε διαφέρουν μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών, ωστόσο το περιεχόμενό τους διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τους ενήλικες. Τα PMNs αποτελούν τη μεγαλύτερη πηγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, ενώ έχει διαπιστωθεί στα τελειόμηνα νεογνά ότι τα επίπεδα μυελοϋπεροξειδάσης και ντιφενσινών δε διαφέρουν με αυτά των ενηλίκων. Ωστόσο, τα επίπεδα της λακτοφερρίνης, του BPI και της ελαστάσης στα νεογνά είναι σημαντικά μειωμένα, συγκριτικά με τους ενήλικες [23, 24]

1.1.3. ΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ

Τα μη κυτταρικά στοιχεία της φυσικής ανοσίας περιλαμβάνουν πρωτεΐνες φλεγμονώδους απάντησης, όπως αυτές του συμπληρώματος, πρωτεΐνες οξείας φάσης, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, πρωτεΐνες πήξης και αγγειοενεργά συστατικά. Οι λειτουργίες του συμπληρώματος, περιλαμβάνουν την οψωνοποίηση, το θάνατο των παθογόνων, την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, την έναρξη ενός καταρράκτη ενζυμικών αντιδράσεων και της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως θα δούμε παρακάτω.

Τα νεογνά, ανάλογα με την εβδομάδα κύησης, παρουσιάζουν μειωμένη συγκέντρωση των παραγόντων του συμπληρώματος, σε σχέση με τους ενήλικες [25, 26]. Πιο συγκεκριμένα, τα νεογνά διαθέτουν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα του μορίου C9, το οποίο θεωρείται καταλυτικό στη δημιουργία του MAC και συνεπώς καθίστανται επιρρεπή σε λοιμώξεις από *Neisseria* [27].

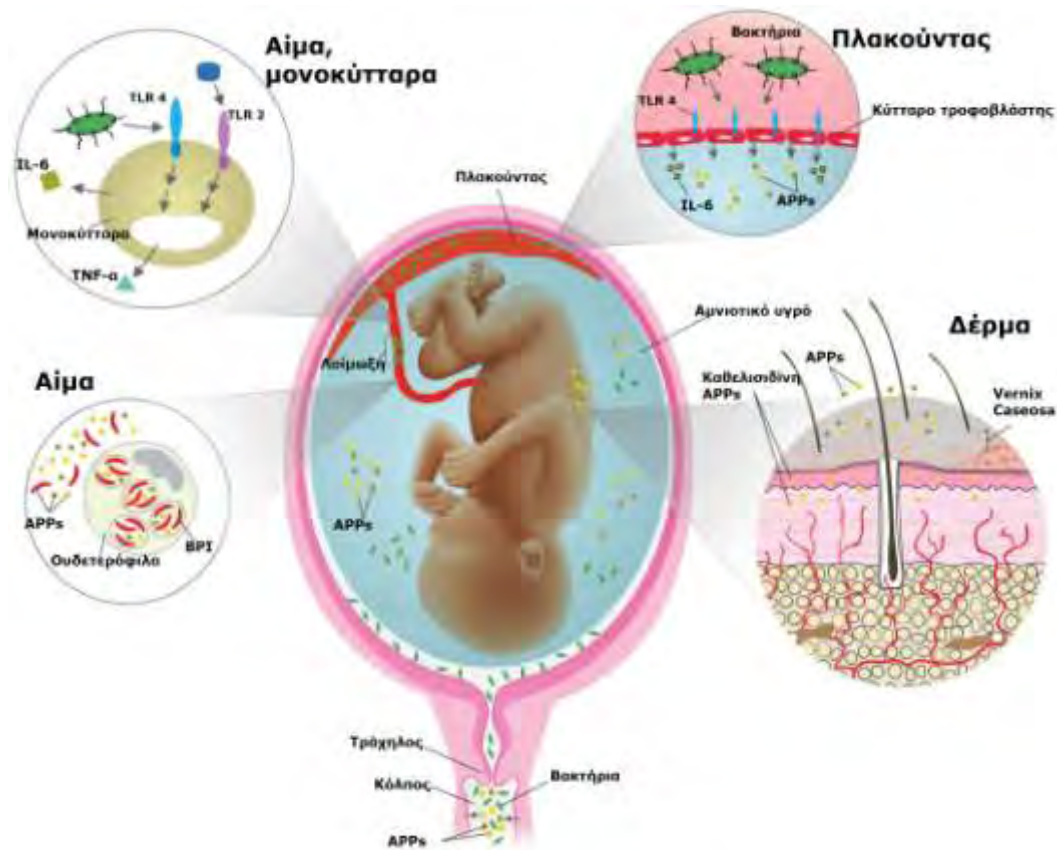
Κατά τη διάρκεια βακτηριδιακής λοίμωξης, η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος αποτελεί την πρώτη γραμμή ενεργοποίησής του, τόσο στα πρόωρα νεογνά όσο και στα τελειόμηνα [28, 29]. Σημαντικά αυξημένα επίπεδα παραγόντων της εναλλακτικής οδού έχουν βρεθεί στο πλάσμα νεογνών με σήψη, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα B, του C3a^{desArg}, του C3bBbP (C3 κονβερτάση) και του sC5b-9 (MAC), με τον C3a^{desArg} να αγγίζει τα επίπεδα ενηλίκων προσβεβλημένων από λοίμωξη. Στις παραπάνω μελέτες, οι δείκτες της κλασικής οδού ενεργοποίησης δεν βρέθηκαν σε υψηλά επίπεδα, καταδεικνύοντας έτσι, ότι η εξαρτώμενη από αντισώματα ενεργοποίηση του συμπληρώματος δεν παίζει καθοριστικό ρόλο στη νεογνική σήψη [28,29].

Στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης παρατηρείται αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών της φυσικής ανοσίας από τα ηπατοκύτταρα, γνωστές ως πρωτεΐνες οξείας φάσης. Ωστόσο η συγκέντρωση πολλών πρωτεϊνών οξείας φάσης (CRP, MBL, sCD14 και LPB) μετά τον

τοκετό είναι χαμηλή και αυξάνεται κατά την πρώτη εβδομάδα ζωής του νεογνού. Το ακριβώς αντίστροφο παρατηρείται για άλλες περιπτώσεις πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η προλευκωματίνη [7]. Μία από τις βασικές πρωτεΐνες οξείας φάσης η οποία είναι ικανή να ενεργοποιήσει, πέραν της λεκτινικής οδού, και την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος είναι η πρωτεΐνη MBL. Μάλιστα, μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης MBL, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο σήψης κατά τον πρώτο μήνα μετά τον τοκετό. Περαιτέρω δεδομένα για τον ρόλο της MBL στο ανοσιακό σύστημα του νεογνού περιγράφονται παρακάτω [30, 31].

Η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των ανοσοκυττάρων κατά τη λοίμωξη, οφείλεται κυρίως στην παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών, μετά την ενεργοποίηση των PRRs. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια των νεογνικών λοιμώξεων παρατηρούνται στον ορό υψηλότερες συγκεντρώσεις κυτταροκινών που ευνοούν κύρια την Th2 ανοσιακή απάντηση (IL-1β, IL-6, IL-18), έναντι αυτών που ευνοούν την Th1 (IL-12, IFN-γ, TNF-α), παρότι και οι τελευταίες ανευρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα [32]. Το γεγονός αυτό έχει συσχετιστεί με την αυξημένη προδιάθεση για λοιμώξεις, που παρατηρούνται κατά τη νεογνική ηλικία [33, 34, 35, 36]. Επιπρόσθετα, η ασυμμετρία αυτή της Th1/Th2 διαφοροποίησης των T-κυττάρων, συγκριτικά με τους ενήλικες, μπορεί να οδηγήσει σε μη ελεγχόμενη φλεγμονώδη απάντηση, γεγονός που χαρακτηρίζει συχνά την πορεία σχεδόν όλων των λοιμώξεων κατά τη νεογνική ηλικία.

Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει και στη συνεισφορά των APPs του πλάσματος στη φυσική ανοσιακή απάντηση του νεογνού (**Εικόνα 1**). Πολλά από τα APPs (LL-37, α/β ντιφενσίνες και BPI) διαθέτουν την ικανότητα να μειώνουν την ένταση της φλεγμονώδους απάντησης, σε συνεργασία με την παρουσία βακτηριδιακών τοξινών. Επιπρόσθετα, η ανεπάρκεια αυτών, σε συνάρτηση με προωρότητα, φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων [4].



Εικόνα 1. Ο ρόλος της φυσικής ανοσίας στην ενδομήτρια λοίμωξη.

Τα APPs, εντός του κόλπου και του αμνιακού υγρού είναι βασικής σημασίας στον περιορισμό και λύση των βακτηρίων και φαίνεται ότι αυξάνονται κατά την ενδομήτρια λοίμωξη. Τα κύτταρα της τροφοβλάστης του πλακούντα αποτελούν την πρώτη γραμμή κυτταρικής αναγνώρισης των παθογόνων, όπου μέσω των TLRs επάγουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και παρέχουν στο αμνιακό APPs καθώς και πρωτεΐνες οξειάς φάσης. Ταυτόχρονα τα νεογνικά μονοκύτταρα, ενεργοποιούνται μέσω των TLRs, με επακόλουθη παραγωγή κυτταροκινών που οδηγεί σε ενεργοποίηση άλλων κυττάρων της φυσικής ανοσίας (ουδετερόφιλα, μακροφάγα) καθώς και την επαγωγή της παραγωγής πρωτεϊνών οξειάς φάσης από τα ηπατοκύτταρα. Τέλος η παρουσία των APPs στο δέρμα και στο σμήγμα ειδικής σύστασης, προσδίδει αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων βακτηρίων και μυκήτων (Από Wynn και συν., με τροποποιήσεις [7]).

1.2. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΝΕΟΓΝΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Τα τελευταία χρόνια έχει καταδειχτεί ότι η επίπτωση, η βαρύτητα, αλλά και η έκβαση των λοιμώξεων επηρεάζεται από τη γενετική ποικιλομορφία του ξενιστή. Η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και η διαλεύκανση των κοινών γενετικών αλλοιώσεων οδήγησαν τους ερευνητές να μελετήσουν την επιρροή των γενετικών αλλαγών στην ανάπτυξη ασθενειών. Σήμερα γνωρίζουμε ότι μεταβολές ορισμένων γονιδίων προδιαθέτουν σε ευαισθησία ή αντίσταση έναντι συγκεκριμένων

παθογόνων [37]. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει ότι η ευαισθησία ή η αντίσταση έναντι αρκετών παθογόνων, σχετίζεται με αλληλόμορφα γονιδίων της φυσικής καθώς και της ειδικής ανοσίας [38].

Γενετικές παραλλαγές γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στη φυσική ανοσία, έχουν μελετηθεί και έχουν συσχετισθεί τόσο με τον πρόωρο τοκετό όσο και με τον αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης περιγεννητικών λοιμώξεων [39]. Μία απ' αυτές είναι η γενετική παραλλαγή στη θέση -308 της περιοχής του υποκινητή στο γονίδιο *TNFA*, η οποία έχει συσχετισθεί με την προωρότητα [40, 41]. Ο ίδιος πολυμορφισμός έχει συσχετισθεί με αυξημένη παραγωγή της φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF-α από λευκοκύτταρα, όπως και με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας από σήψη σε πρόωρα νεογνά [42, 43]. Μια άλλη κυτταροκίνη η οποία παίζει θεμελιώδη ρόλο στη έναρξη φλεγμονωδών διεργασιών και της οποίας γενετικές αλλοιώσεις φάνηκαν να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο σήψης και προωρότητας, είναι η IL-6 [44, 45, 46]. Ωστόσο, έχουν δημοσιευθεί μελέτες, των οποίων τα αποτελέσματα θέτουν υπό αμφισβήτηση τις παραπάνω παρατηρήσεις [47, 48, 49].

Στο ίδιο πλαίσιο διερευνήθηκαν και άλλες κυτταροκίνες, μεσολαβητές της φυσικής ανοσιακής απάντησης, όπως η IL-10, η IL-4 και IL-1, των οποίων γενετικές παραλλαγές συσχετίστηκαν με πρόωρο τοκετό και νεογνική σήψη [39]. Αξίζει να σημειωθεί, επίσης ότι πέραν των ανωτέρω κυτταροκινών, αναζητήθηκαν παρόμοιες συσχετίσεις και σε μόρια, όπως ο υποδοχέας TLR4 αλλά και το sCD14 [50, 51]. Ειδικότερα, ενώ οι πολυμορφισμοί D299G and T399I του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα TLR4 φαίνεται να έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της αρτηριοσκλήρωσης [52] στους ενήλικες, στα νεογνά ωστόσο έχουν συνδεθεί τόσο με πρόωρη κύηση όσο και με σήψη από Gram (+) μικρόβια [53, 54]. Στην περίπτωση του πολυμορφισμού C159T-*CD14*, διαπιστώθηκε ότι ρυθμίζει τα επίπεδα συγκέντρωσης της αντίστοιχης πρωτεΐνης, γεγονός που φαίνεται να επηρεάζει την ισορροπία Th1/Th2 και να έχει ως επακόλουθο την αυξημένη επίπτωση αλλεργιών αλλά και λοιμώξεων κατά τη νεογνική περίοδο [51].

Όσον αφορά τη σημασία των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *MBL2*, στην επίπτωση περιγεννητικών λοιμώξεων, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη MBL συμμετέχει ενεργά κατά τη νεογνική ηλικία στην άμυνα του οργανισμού, υπάρχουν σχετικά λίγες μελέτες στη βιβλιογραφία με εν μέρει αντικρουόμενα συμπεράσματα, γεγονός που αποτέλεσε έναυσμα για το σχεδιασμό της παρούσας διατριβής. Αναφορά στις εν λόγω μελέτες γίνεται παρακάτω.

2. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ MBL: ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.

2.1. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΗΣ MBL

Μια οψωνική δραστηριότητα, η οποία πλέον αποδίδεται στην πρωτεΐνη MBL, περιγράφηκε για πρώτη φορά να σχετίζεται με τη φυσική ανοσία το 1968 [55]. Σε ένα μικρό κορίτσι, που έπασχε από δερματίτιδα και επανειλημμένες βακτηριακές λοιμώξεις σε συνδυασμό με αδυναμία φαγοκυττάρωσης, βρέθηκε *in vitro* ότι έλειπε ένας κληρονομήσιμος παράγοντας του πλάσματος, ο οποίος αδυνατούσε να φαγοκυτταρώσει το ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*. Αυτή η ενεργότητα οψωνίνης βρέθηκε αργότερα ότι απουσίαζε, σε ποσοστό 5 με 10%, από φαινοτυπικά υγιείς ενήλικες, αλλά η συσχέτιση της απουσίας της με μολύνσεις κατά την παιδική ηλικία επιβεβαιώθηκε από μία μικρή αλλά σημαντική μελέτη, λίγα χρόνια μετά [56].

Από μία σειρά βιοχημικών ερευνών, που ξεκίνησαν στις αρχές του 1970, ανακαλύφθηκε τυχαία η ύπαρξη της πρωτεΐνης MBL, η οποία προσδένονταν σε μαννόζη, ενώ παράλληλα εμπόδιζε την παραγωγή της α-μανοσιδάσης στο ανθρώπινο ήπαρ [57]. Παρόμοιες λεκτίνες απομονώθηκαν από το ήπαρ και τον ορό διαφόρων θηλαστικών, μεταξύ αυτών και του ανθρώπου.

Η πρωτεΐνη MBL απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1978 από το κυτταρόπλασμα ηπατοκυττάρων κουνελιών, χρησιμοποιώντας σωματίδια μαννόζης από τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* [58]. Το 1983 οι Wild και συν., απομόνωσαν την πρωτεΐνη MBL στο ανθρώπινο ήπαρ [59]. Λίγα χρόνια μετά διαπιστώθηκε η σημασία της στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, όταν ενώνεται με πολυμαννοζικά συστατικά του μικροβιακού τοιχώματος [60]. Τελικά, το 1989 οι Super και συν., απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη MBL ήταν υπεύθυνη της φαγοκυτταρικής ανεπάρκειας, που αρχικά είχε παρατηρηθεί το 1968 [61].

Η αρχική ονομασία της MBL ήταν πρωτεΐνη προσδεόμενη σε μαννόζη, η οποία δεν χρησιμοποιείται πλέον, επειδή η συντόμευσή της MPB (mannan binding protein) μπορεί να παραπέμπει λανθασμένα στην πρωτεΐνη προσδεόμενη με μυελίνη (myelin binding protein, MBP). Για το λόγο αυτό, η ονομασία λεκτίνη προσδεόμενη σε μαννόζη ή σε πολυσακχαρίτη μαννάνη, με συντόμευση MBL (mannose binding lectin ή mannan-binding lectin), θεωρείται η πιο κατάλληλη και ειδική σήμερα. Η MBL ανιχνεύεται συχνά λόγω της ικανότητας πρόσδεσής της σε μαννόζη στερεής φάσης, ωστόσο η πρόσδεση αυτή δεν είναι ειδική, ούτε συγκεκριμένα ευαίσθητη σε μαννόζη, εν αντιθέσει με την

οικογένεια πρωτεϊνών των λεκτίνων ειδικά προσδεόμενων σε μαννόζη, που εντοπίζονται στα μονοκοτυλήδωνα φυτά της οικογένειας Amaryllidaceae [62].

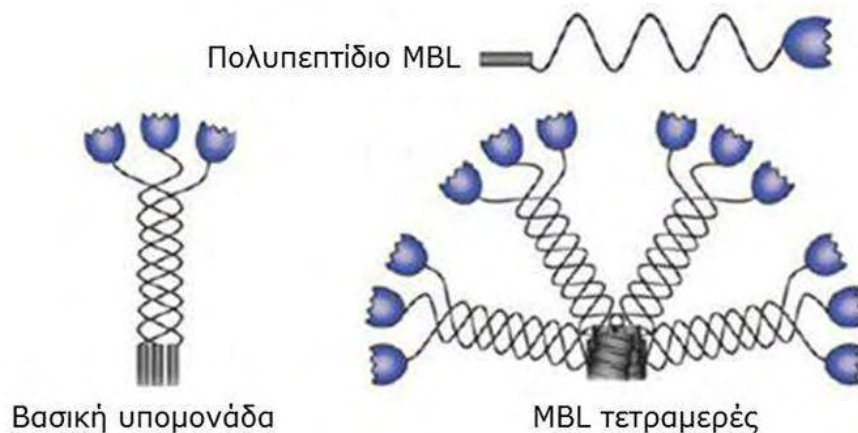
2.2. Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL

Η πρωτεΐνη MBL ανήκει στην οικογένεια των κολλεκτινών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μία περιοχή όμοια με κολλαγόνο (Collagen-like domain) ενωμένη με μία καρβοξυτελική περιοχή (CRD domain). Συντίθεται στο ήπαρ και από εκεί εκκρίνεται στο αίμα, όπου και βρίσκεται κυρίως, ως ένας από τους βασικούς sPRRs [63]. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και οι επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες A και D, οι οποίες ομοιάζουν δομικά με την πρωτεΐνη MBL και ανευρίσκονται κυρίως στο βλεννογόνο του πνεύμονα και σε βλεννογόνους άλλων οργάνων. Η λειτουργική μορφή της πρωτεΐνης MBL δημιουργείται μέσω του ολιγομερισμού βασικών υπομονάδων της, οι οποίες με τη σειρά τους αποτελούνται από τρεις όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μοριακού βάρους 32Kda, ενωμένες στη βάση τους με δυσουλφιδικούς δεσμούς όπως φαίνεται στην εικόνα 2 [64, 65].

Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από τέσσερις δομικές περιοχές, οι οποίες κωδικοποιούνται από τέσσερα εξόνια του γονιδίου *MBL2*, που βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 10, όπως θα δούμε παρακάτω. Κάθε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα περιλαμβάνει μια καρβοξυτελική περιοχή 188 αμινοξέων, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η αναγνώριση των υδατανθράκων στην επιφάνεια των μικροοργανισμών. Ακολουθεί μια περιοχή λαιμού, με δομή α έλικας 30 αμινοξέων (Coiled-coil neck region), κομβικής σημασίας για την έναρξη του πολυμερισμού, μια περιοχή 59 αμινοξέων που δομικά μοιάζει με κολλαγόνο, η οποία αποτελείται από επαναλήψεις της τριπλέτας Gly-X-Y (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ, και όπου Y είναι η υδροξυπρολίνη) και μια αμινοτελική περιοχή 21 αμινοξέων, πλούσια σε κυστεΐνες, έτσι ώστε να δημιουργηθούν δυσουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των υπομονάδων (N-terminal cysteines). Οι τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες διαμορφώνουν μια τριπλή έλικα μέσα στην κολλαγονική περιοχή, που σταθεροποιείται από υδροφοβικούς και δυσουλφιδικούς δεσμούς στις αμινοτελικές περιοχές, που είναι πλούσιες σε κυστεΐνες, έτσι ώστε να συγκροτηθεί η βασική υπομονάδα [64, 65, 66, 67, 68] **(Εικόνα 2)**.

Για να ασκήσει τη βιολογική της δράση η MBL, υπόκειται σε ολιγομερισμό της βασικής υπομονάδας διαμορφώνοντας ολιγομερή 2-6 υπομονάδων και δημιουργώντας δομές με μοριακά βάρη που διαφέρουν μέχρι και 500kda. Ως αποτέλεσμα, σχηματίζονται τετραεδρικές μορφές που ομοιάζουν με "μπολ από τουλίπες", όμοια με το μόριο C1q, όπως φαίνεται στην εικόνα 2 [66]. Πιστεύεται ότι οι κυρίαρχες μορφές ολιγομερών στους ανθρώπους είναι διμερή, τριμερή και τετραμερή [67, 68]. Η ικανότητα πρόσδεσης

μεταξύ της πρωτεΐνης και των παθογόνων αυξάνεται σημαντικά με το βαθμό ολιγομερισμού. Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι η βασική τριπλέτα (υπομονάδα) δεν προσδένεται σε μαννόζη στερεής φάσης και δεν μπορεί να ενεργοποιήσει το συμπλήρωμα [69, 70]. Με το σχηματισμό τετραμερούς κυρίως (ολιγομερική μορφή), οι υπομονάδες της MBL (τριπλέτες) ενώνονται στην αμινοτελική περιοχή του μορίου της μαννόζης με μία αντίδραση που καθορίζεται γενετικά, όπως αναλύεται παρακάτω.



Εικόνα 2. Η λειτουργική (ολιγομερική) δομή της πρωτεΐνης MBL, η δομική υπομονάδα της και το πολυπεπτίδιο MBL. (από Ip και σύν., με τροποποιήσεις [71])

Η ολιγομερική (κυρίως τετραμερή) δομή της MBL παρέχει τη δυνατότητα σύνδεσης με μαννόζη, φουκόζη, N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη και γενικά με σάκχαρα στην επιφάνεια μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και ιοί, αλλά όχι με τις περισσότερες ανθρώπινες γλυκοπρωτεΐνες. Οι Drickamer και συν., κάνοντας χρήση κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X, καθόρισαν τη στερεοχημική δομή της καρβοξυτελικής περιοχής του πολυπεπτιδίου MBL, στο σημείο όπου συνδέεται με τα συστατικά των διαφόρων μικροοργανισμών [72]. Έτσι διαπίστωσαν, ότι ο κύριος παράγοντας της υδατανθρακικής αναγνώρισης είναι η παρουσία οριζόντιων ομάδων υδροξυλίου (OH) στις θέσεις 3' και 4' των δακτυλίων πιρανόσης, στα προαναφερθέντα σάκχαρα. Στην περίπτωση σακχάρων (όπως η D-γαλακτόζη), που περιέχουν κάθετες ομάδες υδροξυλίου (OH), η ένωση με την πρωτεΐνη MBL δεν καθίσταται δυνατή [64, 65]. Επιπρόσθετα, παρατήρησαν ότι οι καρβοξυλιωμένες δομές πρόσδεσης κάθε τριπλέτας (υπομονάδας) απέχουν περίπου 54°, επιτρέποντας την εύκολη αλληλεπίδραση με τις σακχαρικές επαναλήψεις, που είναι χαρακτηριστικές των μικροβιακών επιφανειών, αλλά σπάνια σχετίζονται με δομές μαννόζης των θηλαστικών. Λίγα χρόνια μετά, σημαντικό εύρημα αποτέλεσε το γεγονός, ότι η σταθερά διάσπασης (Kd) μεταξύ μίας μεμονωμένης καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης MBL και διαφόρων σακχάρων ήταν της τάξεως 10Mm, εν αντιθέσει με την ολιγομερική μορφή, όπου η σύνδεση ήταν ιδιαίτερα ισχυρή

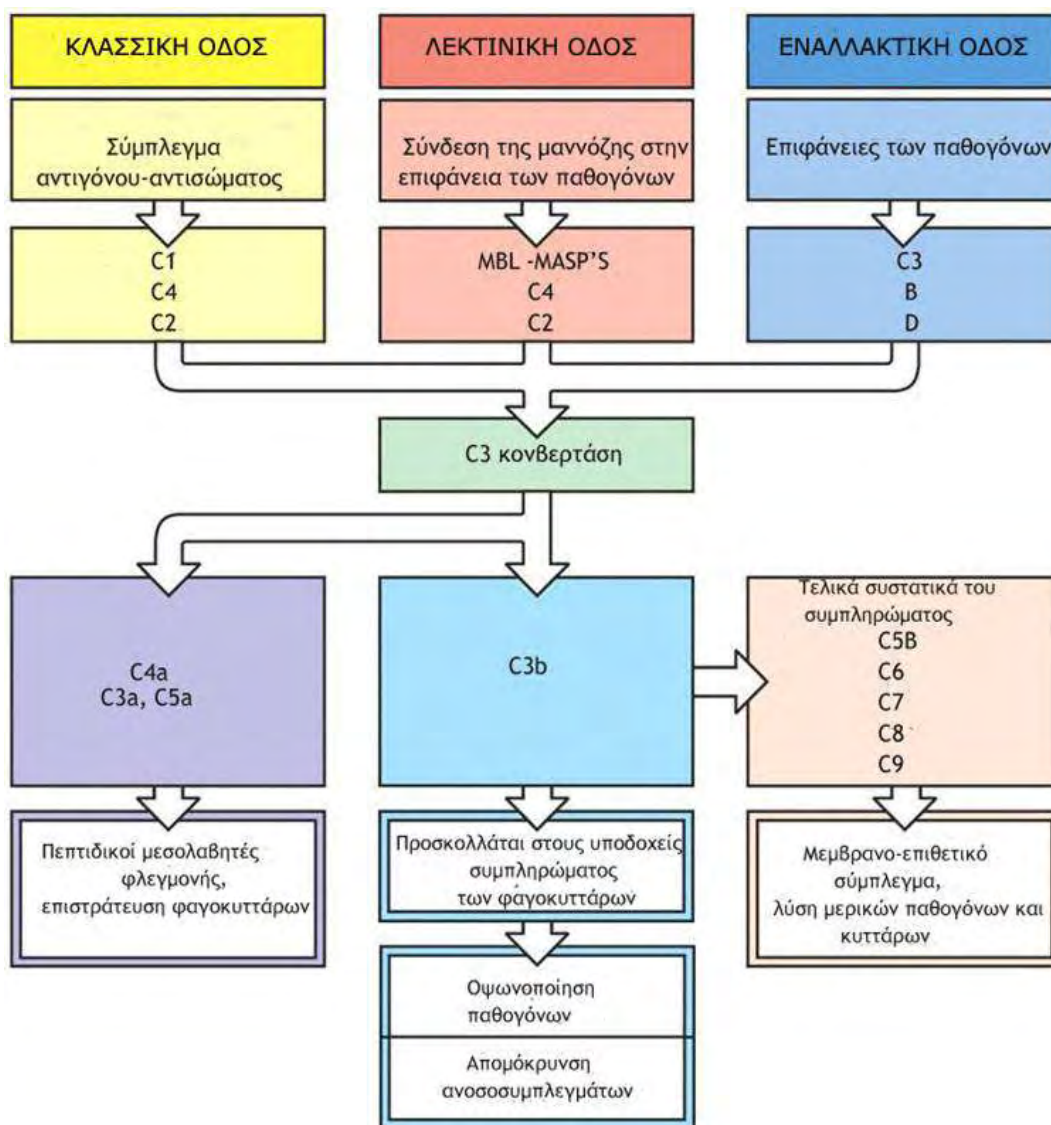
(περίπου 2Nm) [73]. Το συγκεκριμένο γεγονός δείχνει τη σημασία του ολιγομερισμού της MBL στη σύνδεσή της με τα παθογόνα και κατ' επέκταση στη λειτουργία της [74], όπως θα δούμε παρακάτω.

2.3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MBL

Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό άμυνας της φυσικής ανοσίας, ενώ παράλληλα συμβάλλει και στην ειδική ανοσιακή απάντηση. Οι κύριες λειτουργίες του επικεντρώνονται στην άμυνα κατά των λοιμώξεων (βακτήρια, μύκητες, ιούς), στη γεφύρωση της φυσικής με την ειδική ανοσία και στην κάθαρση ανοσοσυμπλεγμάτων. Η άμυνα εναντίον των διαφόρων παθογόνων επιτυγχάνεται μέσω οψωνοποίησης, ενεργοποίησης της φλεγμονής και λύσης των βακτηρίων-κυττάρων στόχων [75].

Το συμπλήρωμα αποτελείται από 35 διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζονται τόσο στις επιφάνειες των κυττάρων της φυσικής ανοσίας όσο και στο πλάσμα. Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, στα μονοκύτταρα, στα ιστικά μακροφάγα καθώς και στα επιθηλιακά κύτταρα του ουροποιητικού και γαστρεντερικού συστήματος. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται στο πλάσμα ως ανενεργά ένζυμα (ζυμογόνα), τα οποία ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση και ακόλουθη επικάλυψη της ενζυμικής τους περιοχής. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος περιλαμβάνει έναν ενζυμικό καταρράκτη αντιδράσεων, στον οποίο το προϊόν της πρωτεόλυσης ενός ζυμογόνου αποτελεί καταλύτη για την διεκπεραίωση του επόμενου σταδίου.

Υπάρχουν τρεις βασικές οδοί ενεργοποίησης: η κλασσική, η εναλλακτική και η λεκτινική οδός, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 3.



Εικόνα 3. Η αναπαράσταση των κύριων συστατικών και οι δράσεις του συμπληρώματος. (από Janeway και συν., με τροποποιήσεις [75]).

Αρχικά είχε προταθεί από τους Ikeda και συν., ότι η πρωτεΐνη MBL ήταν ικανή να ενεργοποιήσει την κλασσική οδό του συμπληρώματος [60]. Ωστόσο, είναι πλέον γνωστό, ότι μια από τις βασικές λειτουργίες της πρωτεΐνης MBL είναι η ενεργοποίηση της λεκτινικής οδού, η οποία ενεργοποιείται κατόπιν σύνδεσής της με υδατάνθρακες της κυτταρικής επιφάνειας των παθογόνων [75].

Το 1992 οι Matsushita και συν., ανέδειξαν την παρουσία ενός νέου παράγοντα του συμπληρώματος, ο οποίος θεωρήθηκε ότι συνδεόμενος με την πρωτεΐνη MBL, εμπλέκεται στη δημιουργία της κομβερτάσης C3(C4b2a) και κατ' επέκταση στην ενεργοποίηση της κλασσικής οδού [76]. Τελικά, ήταν οι Thiel και συν., το 1997 που

απέδειξαν ότι διαμεσολαβητής της συγκεκριμένης ενεργότητας, ήταν μια πρωτεΐνη με δράση πρωτεάσης σερίνης, ονόματι MASP-2 [77].

Στην κυκλοφορία λοιπόν του αίματος, συμπλέγματα της MBL με υδατάνθρακες της επιφάνειας των παθογόνων, δεσμεύονται από πρωτεΐνες με δράση πρωτεασών σερίνης (MASPs), με επακόλουθη ενεργοποίηση της λεκτινικής οδού [75, 77, 78]. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι πρωτεάσες γίνονται ενεργές, μόλις η MBL ενωθεί στην επιφάνεια των παθογόνων που φέρουν υδατάνθρακες, όπως μαννόζη και N-ακετυλογλυκοζαμίνες. Ακολουθεί πρωτεολυτική κατάτμηση των μορίων C4 και C2 και η συγκρότηση της κομβερτάσης C3 (C4b2a).

Η κομβερτάση C3 αποτελεί κομβικό μόριο της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και κοινό σημείο σύγκλισης των 3 οδών ενεργοποίησης. Η κομβερτάση C3 καταλύει την πρωτεόλυση του συστατικού C3 σε C3b και C3a. Το C3b θεωρείται το κύριο δραστικό μόριο του συστήματος, διότι δρα ως οψωνίνη, καθιστώντας τους μικροοργανισμούς πιο δεκτικούς στην φαγοκυττάρωση και επιπρόσθετα προσδένεται στο μόριο C4b2a, επάγοντας το σχηματισμό της κομβερτάσης C5. Ο σχηματισμός της κομβερτάσης C5 εμφανίζεται και στις 3 οδούς ενεργοποίησης, στο τέλος της οποίας δημιουργείται το σύμπλοκο MAC. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο οδηγεί στην καταστροφή των κυττάρων στόχων [75].

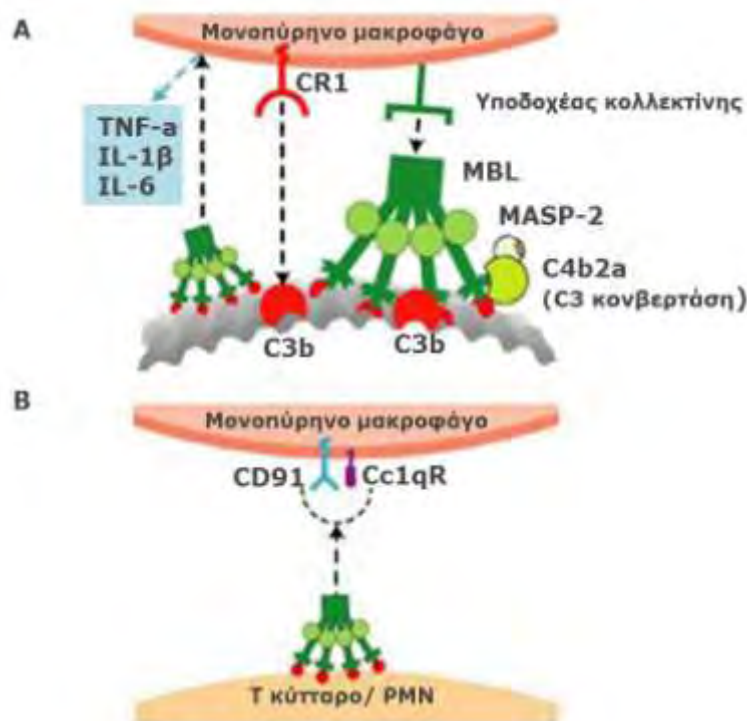
Η συνεισφορά της πρωτεΐνης MBL στη φυσική ανοσία δεν περιορίζεται μόνο στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, καθώς πολλές ενδείξεις συνηγορούν στο ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εμπλέκεται και σε άλλες λειτουργίες, όπως στην οψωνοποίηση, την απόπτωση και τη φλεγμονή, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Ενδιαφέρουσες πληροφορίες που προέκυψαν από έρευνες των τελευταίων ετών, αποδεικνύουν ότι η MBL μπορεί να δράσει ως οψωνίνη, επάγοντας τη φαγοκυττάρωση ξένων μορίων πάνω στα οποία έχει προσδεθεί. Όπως προαναφέρθηκε, έμμεσα, κατόπιν ενεργοποίησης της λεκτινικής οδού που οδηγεί στη δημιουργία μορίων C3b και άμεσα, απουσία του μορίου C3, συνδεδεμένη απευθείας σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων (**Εικόνα 4**).

Για την άμεση οψωνοποίηση έχουν ενοχοποιηθεί αρκετοί υποδοχείς, με κυριότερους την καλρετικιουλίνη/Cc1qR, που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα της MBL, τον C1qRP/CD93 αλλά και τον CR1/CD35 [79, 80, 81]. Επιπρόσθετα, φαίνεται να λειτουργεί και ως συντονιστής της φλεγμονώδους διεργασίας και να επάγει απόπτωση [81, 82].

Η πιθανή εμπλοκή της πρωτεΐνης MBL στην επαγωγή απόπτωσης προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Ogden και συν., οι οποίοι κατέδειξαν ότι η συγκεκριμένη κολλεκτίνη είναι ικανή να συνδέεται *in vitro*, στην επιφάνεια αποπτωτικών T κυττάρων αλλά και σε ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα μέσω των CRD περιοχών, όπως φαίνεται

στην εικόνα 4. Η συγκεκριμένη σύνδεσή της στην επιφάνεια των μονοπύρηνων-μακροφάγων επιτυγχάνεται μέσω του διμερούς CD91-καλρετικιουλίνης/Cc1qR, που εντοπίζεται στην επιφάνεια των ανωτέρων και της καρβοξυτελικής περιοχής της και φαίνεται να είναι κομβικής σημασίας στην επαγωγή της απόπτωσης. Τελικά, αποτέλεσμα της συγκεκριμένης διεργασίας είναι η εγκόλπωση των αποπτωτικών κυττάρων μέσω μακροπινοκύττωσης (**Εικόνα 4**) [82].



Εικόνα 4. Λειτουργίες της MBL πρωτεΐνης. **A)** Η πρωτεΐνη MBL, προσδεμένη σε μικροβιακές επιφάνειες, είναι ικανή να επάγει φαγοκυττάρωση με 2 μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός επιτελείται μέσω της ενεργοποίησης της λεκτινικής οδού του συμπληρώματος. Πιο συγκεκριμένα, η εν λόγω ενεργότητα επιτυγχάνεται μέσω των Masps, που οδηγεί στην συγκρότηση μιας πρωτεάσης, η οποία καλείται C3 κονβερτάση. Η C3 κονβερτάση κατατέμνει το μόριο C3 και δημιουργεί δύο δραστικά μόρια του συστήματος του συμπληρώματος: μια οψωνίνη, την C3b, που δεσμεύεται ομοιοπολικά στην επιφάνεια του παθογόνου και ένα μικρό πεπτιδίο, μεσολαβητή της φλεγμονής, την C3a. Τα θραύσματα C3b αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα 1 του συμπληρώματος CR1 (CD35) στην επιφάνεια του μακροφάγου, με ακόλουθη ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης. Έχει προταθεί, επίσης, ότι η πρωτεΐνη MBL μπορεί να δράσει άμεσα ως οψωνίνη, όταν θα βρεθεί συνδεδεμένη σε συγκεκριμένους επιφανειακούς υποδοχείς, όπως η καλρεκτικιουλίνη/ Cc1qR, τον C1qRP/CD93 αλλά και με τον υποδοχέα 1 του συμπληρώματος (complement receptor 1, CR1/CD35). **B)** Έχει προταθεί, επίσης, ένας πιθανός ρόλος της στην επαγωγή απόπτωσης, μέσω πρόσδεσής της στην επιφάνεια αποπτωτικών T κυττάρων, αλλά και στην επιφάνεια ουδετεροφίλων-πολυμορφοπύρηνων μέσω CRD περιοχών. Η σύνδεσή της στην επιφάνεια των μονοπύρηνων-μακροφάγων γίνεται εφικτή μέσω του διμερούς CD91 και καλρετικιουλίνης/Cc1qR, και έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή απόπτωσης μέσω εγκόλπωσης των αποπτωτικών κυττάρων με μακροπινοκύττωση (Από Turner και συν., με τροποποιήσεις [63]).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ρόλος της στην φλεγμονή δεν έχει διευκρινιστεί αν και η παρουσία της έχει βρεθεί να σχετίζεται με την ευαισθητοποίηση μονοκυττάρων στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών [83].

Τα συμπεράσματα που απορρέουν εξ αυτών των παρατηρήσεων καθιστούν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη πολύ σημαντικό μόριο της φυσικής ανοσίας και αποκαλύπτουν τον σημαντικό ρόλο της στην άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων.

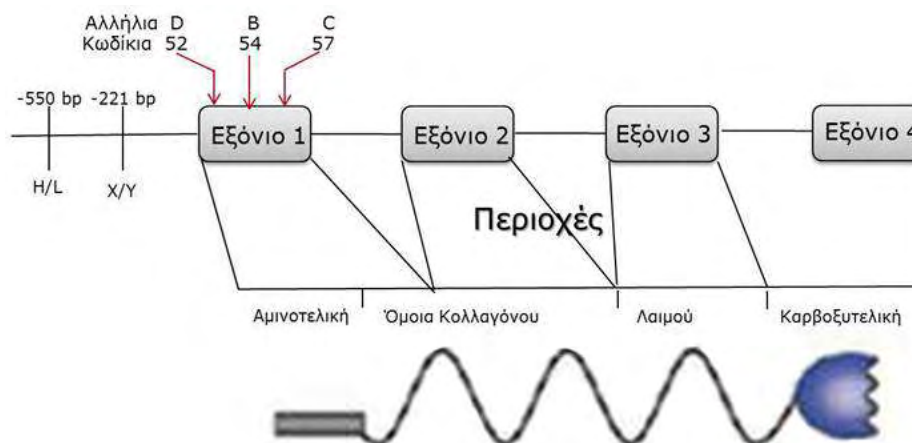
2.4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MBL2*

Η μοριακή δομή του ανθρώπινου γονιδίου *MBL2*, διαλευκάνθηκε το 1989 [84, 85]. Ωστόσο, δέκα χρόνια μετά διαπιστώθηκε η ύπαρξη και ενός εκφραζόμενου ψευδογονιδίου με την ονομασία *MBL1* (*MBL1P1*) [86]. Προγονικά, τα *MBL1* και *MBL2* εκτιμάται ότι προέρχονται από το διπλασιασμό ενός κοινού προγονικού γονιδίου *MBL* [87].

Στο ποντίκι, δυο διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης MBL κωδικοποιούνται από δύο ξεχωριστά γονίδια, γνωστά ως *mb1-a* και *mb1-c*, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικούς χρωμοσωμικούς τόπους, στα χρωμόσωμα 14 και 19 αντίστοιχα [88].

Εν αντιθέσει, τα ανάλογα ανθρώπινα γονίδια *MBL2* και *MBL1* εδράζονται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 10 (10q11.2-q21) σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους [86, 87]. Η περιοχή υπεύθυνη για την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης MBL, που αντιστοιχεί στο γονίδιο *MBL2*, περιλαμβάνει 4 εξόνια τα οποία διακόπτονται από 3 ιντρόνια 600, 1350 και 800 bp σε μέγεθος αντίστοιχα **(Εικόνα 5)** [85].

Το πρώτο εξόνιο δίνει τη γενετική πληροφορία για το τμήμα της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στην πλούσια σε κυστεΐνες αμινοτελική περιοχή (N-terminal cysteines) και για ένα μέρος της περιοχής με δομή κολλαγόνου (Collagen-like domain) που περιέχει 7 αντίγραφα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας Gly-X-Y. Το υπόλοιπο μέρος της περιοχής αυτής κωδικοποιείται από το δεύτερο εξόνιο και περιλαμβάνει τη διπλέτα Gly-Glu και άλλα 12 αντίγραφα της τριπλέτας Gly-X-Y. Η περιοχή λαιμού (coiled-coil-neck region) κωδικοποιείται από το τρίτο εξόνιο, ενώ η περιοχή δέσμευσης υδατανθράκων (CRD domain) κωδικοποιείται από το τέταρτο εξόνιο [85, 86], όπως φαίνεται παρακάτω **(Εικόνα 5)**.



Εικόνα 5 . Το ανθρώπινο γονίδιο *MBL2*. Η οργάνωση των εξονίων και τα τμήματα του πολυπεπτιδίου *MBL* που κωδικοποιούν. Διακρίνονται επίσης οι θέσεις των γενετικών παραλλαγών στην περιοχή του υποκινητή και του πρώτου εξονίου. (Από Ιρ και συν., με τροποποιήσεις [71]).

Αξίζει να σημειωθεί η ύπαρξη ενός επιπρόσθετου εξονίου, ονόματι O, 1000 νουκλεοτιδικές βάσεις πριν το πρώτο εξόνιο, στο γονίδιο *MBL2* [88]. Το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης *MBL*, το οποίο έχει παραχθεί στο ήπαρ, προέρχεται από μετάγραφα των οποίων η μεταγραφή ξεκινά από το εξόνιο 1. Ωστόσο, σε ποσοστό 10-15 % των περιπτώσεων, η μεταγραφή ξεκινά εναλλακτικά από το εξόνιο O, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός πολυπεπτιδίου, όμοιου με το βασικό μετάγραφο, χωρίς όμως να εμπλέκεται στη συγκρότηση της λειτουργικής πρωτεΐνης *MBL* [89].

Η ανακάλυψη του 1968, ότι η αρχικά περιγεγραμμένη φαγοκυτταρική αδυναμία οφείλονταν στην *MBL* ανεπάρκεια, έδωσε το έναυσμα μιας σειράς πειραμάτων για τον καθορισμό των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτήν [61]. Έχει διαπιστωθεί πλέον ότι η ύπαρξη μεταλλάξεων στο πρώτο από τα τέσσερα εξόνια του ανθρώπινου γονιδίου της *MBL2* στο χρωμόσωμα 10, έχει ως επακόλουθο την αδυναμία συγκρότησης της βασικής υπομονάδας (τριπλέτας) και κατά συνέπεια του σχηματισμού της ολιγομερικής μορφής [63]. Αναλύοντας την αλληλουχία βάσεων όλων των εξονίων του γονιδίου *MBL2* σε 3 παιδιά, που παρουσίαζαν ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης *MBL* στον ορό, σε συνάρτηση με φαγοκυτταρική ανεπάρκεια και αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης λοιμώξεων, αναδείχθηκε ότι έφεραν μια σημειακή μετάλλαξη στο κωδίκιο 54 στην περιοχή του πρώτου εξονίου [90]. Έτσι προτάθηκε, ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη, που προκύπτει από την μετάπτωση μιας γουανίνης σε αδενίνη (G>A) (rs1800450) και καταλήγει στην αντικατάσταση ενός καταλοΐπου γλυκίνης σε ασπαρτικό οξύ, είχε ως επακόλουθο την αδυναμία συγκρότησης της κλασσικής τριπλής έλικας, που χαρακτηρίζει τη βασική υπομονάδα της *MBL* πρωτεΐνης και κατά συνέπεια τη χαμηλή συγκέντρωση

της στον ορό [90]. Το μεταλλαγμένο αλληλίο ως προς την προαναφερθείσα μετάλλαξη ονομάστηκε B ενώ το φυσιολογικό A. Αποτελεί την πιο συνηθισμένη μετάλλαξη σε άτομα Ευρωπαϊκής προέλευσης, ενώ είναι ιδιαίτερα σπάνια σε άτομα της Δυτικής Αφρικής, όπως φαίνεται στον πίνακα 1 [91, 92]

Σε μεταγενέστερη μελέτη του Limbscombe και συν., η οποία πραγματοποιήθηκε κυρίως σε Αφρικανούς αλλά και σε άτομα διαφορετικής εθνικής προέλευσης, εντοπίστηκε μια επιπρόσθετη σημειακή μετάλλαξη που αφορούσε το κωδικίο 57. Επρόκειτο για μια αλλαγή μιας γουανίνης σε αδενίνη (G>A) (rs1800451) που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη σε γλουταμινικό οξύ. Το μεταλλαγμένο αλληλίο, ως προς την προαναφερθείσα μετάλλαξη, ονομάστηκε C, ενώ η συχνότητα του στη συγκεκριμένη μελέτη σε άτομα της Δυτικής Αφρικής ήταν ιδιαίτερα υψηλή, της τάξεως του 29 % [93]. Ωστόσο, η συχνότητα του αλληλίου C σε Ευρωπαίους βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα χαμηλή, ενώ απουσίαζε πλήρως από τους Ασιάτες. Όπως και στην περίπτωση της παρουσίας του B αλληλίου, έτσι και σ' αυτήν του αλληλίου C, διαπιστώθηκε ότι επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης MBL και φαίνεται να συνδέεται με χαμηλές συγκεντρώσεις της στον ορό [92].

Λίγα χρόνια αργότερα ανακαλύφθηκε η παρουσία μιας τρίτης σημειακής μετάλλαξης στο κωδικίο 52 του πρώτου εξονίου, η οποία προκύπτει από τη μετάπτωση μιας κυτοσίνης σε θυμίνη (C>T) (rs5030737) και οδηγεί στην αντικατάσταση μιας αργινίνης σε κυστεΐνη [94]. Το μεταλλαγμένο αλληλίο ονομάστηκε D, ενώ η συχνότητα τόσο σε άτομα της Ανατολικής Αφρικής όσο και σε Καυκάσιους ήταν χαμηλή, της τάξεως 5 % [91]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο αλληλίο, όπως και στην περίπτωση του αλληλίου C, βρέθηκε να απουσιάζει από Ασιάτες αλλά και Αφρικανούς της Δύσης [92]. Στον πίνακα 1 φαίνονται συνοπτικά οι συχνότητες των τριών προαναφερθέντων μεταλλάξεων, βάσει μελετών που διεξήχθησαν σε άτομα διαφορετικής εθνικής προέλευσης [93, 95, 96, 97, 98, 99, 100].

Ακολουθως αναζητήθηκαν συσχετίσεις των συγκεκριμένων γενετικών παραλλαγών με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης και διαπιστώθηκε ότι άτομα ετερόζυγα A/D για την εν λόγω μετάλλαξη παρουσίαζαν χαμηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση σε σχέση με αυτά που έφεραν το φυσιολογικό αλληλίο A. Η επιρροή όμως του αλληλίου D στη συγκέντρωση της MBL ήταν λιγότερο ισχυρή, σε σχέση με τα αλληλία B και C αντίστοιχα [95]. Παρόλ' αυτά, άτομα ομόζυγα με γονότυπο D/D, όπως και γονότυποι ετερόζυγοι που προκύπτουν από τον συνδυασμό των αλληλίων D, B και C, ασκούν σημαντική επιρροή φαινοτυπικά στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης MBL. Δεδομένου ότι τα ποικίλα αλληλία D, B και C φαίνεται να καθορίζουν γενετικά τα επίπεδα συγκέντρωσης της με όμοια ισχύ, για την

ενίσχυση και την βέλτιστη ισχύ των στατιστικών συσχετίσεων, ο κοινός χαρακτηρισμός τους είναι O, ενώ A του φυσιολογικού αλληλίου [63].

Πίνακας 1: Οι συχνότητα των αλληλίων B, C και D, σε άτομα διαφορετικής εθνικής και φυλετικής προελεύσεως.

A

| Ήπειρος | Εθνικότητα/ Χώρα | Συχνότητα αλληλίων % | | |
|-----------|---------------------------|----------------------|------|-----|
| | | B | C | D |
| Ευρώπη | Δανία ^A | 12.0 | 3.0 | 6.0 |
| | Αγγλία ^Γ | 14.0 | 2.0 | 7.0 |
| | Κένυα ^B | 3.0 | 24.0 | 5.0 |
| Αφρική | Γκάνα ^Γ | 0.4 | 32.0 | 0 |
| | Ναμίβια ^Γ | 3.0 | 7.0 | 0 |
| | Νότια αφρική ^B | 0 | 27.0 | 0 |
| Ασία | Κίνα ^A | 11.0 | 0 | 0 |
| | Ιαπωνία ^A | 23.0 | 0 | 0 |
| | Νέα Γουινέα ^A | 1.0 | 0 | 0 |
| Αυστραλία | Αυστραλία ^E | 0 | 0 | 0 |
| Αμερική | Εσκιμός ^A | 12.0 | 0 | 0 |
| | Αργεντινή ^B | 42.0 | 0 | 0 |
| | Περού ^B | 80.0 | 0 | 0 |

Garred και συν., [97, 98, 99]. ^B Madsen και συν., [96]. ^Γ Lipscombe και συν., [93]. ^A Juliger και συν., [100]. ^E Turner και συν., [101].

Η ίδια λογική, αναφορικά με τη σημασία των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *MBL2* στα επίπεδα της MBL στον ορό, έδωσε το έναυσμα στην διερεύνηση και των πολυμορφισμών στην περιοχή του εκκινητή. Αναλύοντας, λοιπόν, την αλληλουχία του εκκινητή βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα πολυμορφική [95, 96, 99]. Πιο συγκεκριμένα, τρεις πολυμορφισμοί φάνηκαν να επηρεάζουν τη συγκέντρωση της στον ορό και εδράζονται στις θέσεις -550 (G>C, αλληλία H/L, rs11003125), -221 (G>C, αλληλία X/Y, rs7096206) καθώς και στην 4'μη μεταφραζόμενη περιοχή του πρώτου εξονίου +4 (C>T, αλληλία P/Q, rs7095891) [99].

Ενδεικτικά στον πίνακα 2 διακρίνονται οι συντομεύσεις, τα κοινά ονόματα που χρησιμοποιούνται στη διεθνή βιβλιογραφία καθώς και η περιοχή που ανευρίσκονται οι προαναφερθείσες μεταλλάξεις.

Πίνακας 2. Ονομασία και συντόμευση των αλληλίων του γονιδίου *MBL2*.

| ΚΟΙΝΟ ΟΝΟΜΑ- (ΠΕΡΙΟΧΗ) | ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΤΑ HGVS* [25] |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| -550G>C (υποκινητής) | H/L | -617G>C |
| -221G>C (υποκινητής) | X/Y | -290G>C |
| +4C>T (υποκινητής) | P/Q | -66C>T |
| Arg52Cys (εξόνιο1) | A/D | 154C>T |
| Gly54Asp (εξόνιο 1) | A/B | 161G>A |
| Gly57Glu (εξόνιο 1) | A/C | 170G>A |

*HUMAN GENOME VARIATION SOCIETY

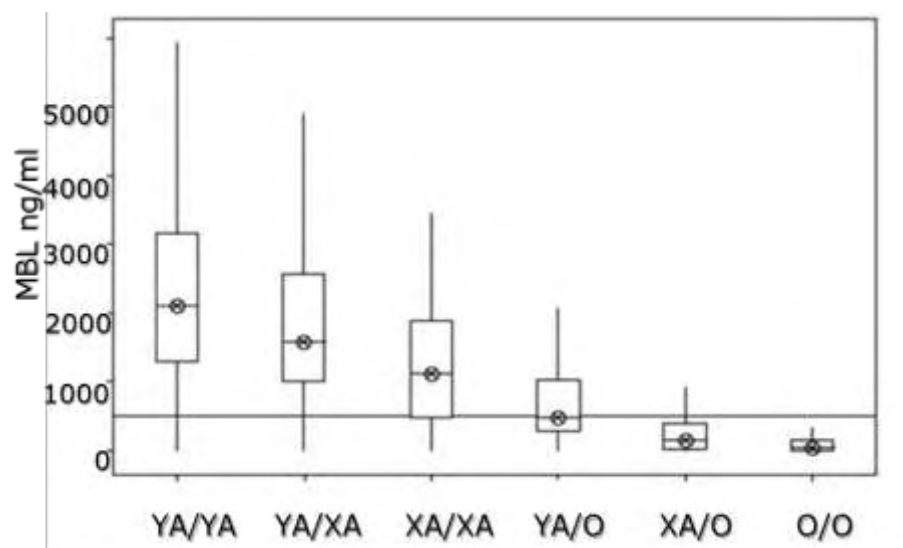
Κάθε αλληλίο του πρώτου εξονίου βρίσκεται σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης με τα αλληλία του υποκινητή, με αποτέλεσμα να έχουν προσδιοριστεί 7 κοινοί απλότυποι (HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, LYPB, LYQC και HYPD). Σποραδικά σπάνιοι απλότυποι μπορούν να παρατηρηθούν, όπως LYPD και HXA [92, 99]. Οι συχνότητες των απλοτύπων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ ατόμων διαφορετικής εθνικής προελεύσεως, γεγονός που αντικατοπτρίζει τις χρονολογίες εύρεσης τους, την ιστορία των μεταναστεύσεων καθώς και την επίδραση της περιβαλλοντικής πίεσης και της φυσικής επιλογής, που ασκείται στο ανθρώπινο γονιδίωμα [95, 96, 98, 101].

2.5. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MBL ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΩΝ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της λειτουργικής μορφής MBL (τριμερή, τετραμερή και άνω) στον ορό βασίζεται κυρίως στη χρήση ανοσοενζυμικής δοκιμασίας (sandwich double ELISA) [99]. Είναι ενδιαφέρον ότι υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις στα επίπεδα της MBL στο αίμα στους ενήλικες από 50 ng/ml έως 10 µg/ml, με μέση τιμή στα 1.2 µg/ml. Από την άλλη, αν και δεν έχουν προσδιοριστεί με ακρίβεια οι φυσιολογικές τιμές της σε νεογνά, φαίνεται να είναι περίπου 60% μικρότερης από εκείνης των ενηλίκων, ενώ γνωρίζουμε ότι είναι εμβρυοπλακουντιακής προέλευσης [102, 103, 104, 105]. Οι τιμές της αυξάνονται σταδιακά μέχρι την ηλικία των 3 μηνών περίπου και σταθεροποιούνται. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 100 άτομα καυκασιανής καταγωγής, οι αποκλίσεις των επιπέδων της στον ορό ήταν από 8 ng/ml έως 5600 ng/ml [92].

Η παρουσία λοιπόν πολυμορφισμών, τόσο στο πρώτο εξόνιο όσο και στον υποκινητή του γονιδίου *MBL2*, φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα της MBL στο αίμα [92]. Συνολικά τα ευρήματα ενισχύουν την εκτίμηση, ότι βάσει γονότυπου, θεωρούνται τα άτομα MBL επαρκή αυτά που φέρουν τους γονότυπους A/A και A/O, ενώ άτομα MBL ανεπαρκή αυτά που φέρουν τους γονότυπους O/O στα οποία ουσιαστικά η ποσότητα της πρωτεΐνης MBL είναι μη ανιχνεύσιμη. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί από αρκετές μελέτες, ότι

η παρουσία των πολυμορφισμών του υποκινητή και ιδιαίτερα του πολυμορφισμού στη θέση -221 (X και Y αλληλία) αποτελεί σημαντικό παράγοντα καθορισμού της συγκέντρωσης [95]. Έξι γονότυποι (YA/YA, YA/XA, XA.XA, YA/O, XA/O και O/O) προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό των γενετικών παραλλαγών του πρώτου εξονίου με τον πολυμορφισμό στη θέση -221 οι οποίοι σχετίζονται με υψηλή, μεσαία και πολύ χαμηλή συγκέντρωση όπως φαίνεται στο θηκόγραμμα της εικόνας 6, όπου οι γονότυποι XA/O και O/O φαίνεται να χαρακτηρίζουν γενετικά την MBL ανεπάρκεια και σχετίζονται με πολύ χαμηλή συγκέντρωση MBL [99, 106].



Εικόνα 6. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων που αφορούν την συγκέντρωση της πρωτεΐνης MBL στον ορό. (από Garred και συν., [99]).

Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως, σε μερικές περιπτώσεις, εμφανίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ ατόμων που φέρουν τον ίδιο γονότυπο στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης MBL στον ορό [104]. Επομένως, δεν μπορεί να θεωρηθεί ο γονότυπος σε όλες τις περιπτώσεις, ως μοναδικός δείκτης της συγκέντρωσης της στον ορό, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη και άλλων παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή της ή τη συγκέντρωσή της στο αίμα [99].

Για παράδειγμα, η MBL είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης και κατά συνέπεια παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια λοίμωξης και φλεγμονής [107]. Άλλοι παράγοντες, όπως αυξητικές ορμόνες, γλουκοκορτικοειδή και κυτταροκίνες, μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή της [108].

Όσον αφορά τα νεογνά, δεν έχουν μέχρι σήμερα προσδιοριστεί με ακρίβεια οι φυσιολογικές τιμές της, ωστόσο φαίνεται ότι τα πρόωρα νεογνά παρουσιάζουν

χαμηλότερες τιμές συγκέντρωσης της MBL συγκριτικά με τα τελειόμηνα, ανεξαρτήτως του γονότυπου που φέρουν [30, 109]. Τέλος, ελλείψεις είναι οι πληροφορίες μελετών συσχέτισης, μεταξύ της MBL ανεπάρκειας, γονοτυπικά και ορολογικά καθορισμένης, με την επίπτωση λοιμώξεων και νεογνικής νοσηρότητας. Η παραπάνω παρατήρηση έδωσε το έναυσμα της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

3. MASPS, MBL –ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ

3.1. ΔΟΜΗ

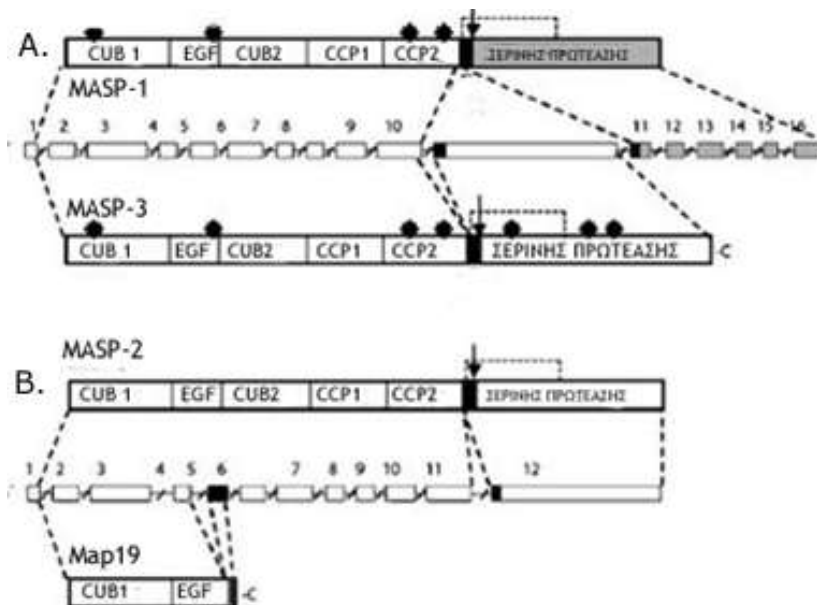
Το 1992 ο Matsushita και συν., ανέδειξαν την παρουσία ενός νέου παράγοντα του συμπληρώματος, ο οποίος ονομάστηκε MBL-συνδεόμενη πρωτεΐνη με δράση πρωτεάσης σερίνης (η οποία σήμερα ονομάζεται MASP-1) [76]. Αρχικά πιστεύονταν ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελούσε κύριο διαμεσολαβητή του σχηματισμού της C3 κονβερτάσης, ωστόσο μεταγενέστερη μελέτη του Thiel και συν., απέδειξε ότι αυτή η ενεργότητα επιτυγχάνεται μέσω μιας άλλης MASP, της MASP-2 [110]. Μετέπειτα ανακαλύφθηκε η ύπαρξη της MASP-3 και της MAr19 [111, 112]. Στην κυκλοφορία του αίματος η πρωτεΐνη MBL φαίνεται να δημιουργεί σύμπλοκα με 4 σχετιζόμενες δομικά πρωτεΐνες, της MASPs-1,-2,-3 και MAr19 [113]. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα των ανθρώπινων MASP-1 και -3 αποτελείται από 699 και 728 αμινοξέα αντίστοιχα, ενώ οι MAr19 και MASP-2 από 185 και 689 αμινοξέα [114]. Ξεκινώντας από το N-αμινοτελικό άκρο οι MASPs-1,-2 και -3 περιλαμβάνουν μια περιοχή CUB1, που διακόπτεται από μια περιοχή όμοια του EGF και μιας δεύτερης περιοχής CUB2. Ακολουθούν δυο περιοχές CCP και στο καρβοξυτελικό άκρο μια καταλυτική περιοχή SP, όμοια με χυμοθρυψίνη (chymotrypsin-like SP domain). Το MAr19 περιέχει μόνο μια περιοχή CUB1 που ακολουθείται από μια περιοχή EGF. Η περιοχή CUB1 περιέχει αμινοξέα τα οποία εμπλέκονται στη σύνδεση με ιόντα Ca^{++} και θεωρείται πολύ σημαντική έτσι ώστε να επιτευχθεί η συγκρότηση συμπλόκου μεταξύ των MASPs και της πρωτεΐνης MBL. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι η περιοχή SP περιέχει την καταλυτική τριάδα His/Asp/Ser, η οποία είναι χαρακτηριστική των πρωτεϊνών με δράση πρωτεασών σερίνης [112].

3.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Στην κυκλοφορία του αίματος η πρωτεΐνη MBL και οι φικολίνες, βρίσκονται συνδεδεμένες με τέσσερις πρωτεΐνες με δράση πρωτεασών σερίνης, τις MASP-1,-2,-3 και MAr19. Οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου των γονιδίων *MASP1/3* και *MASP2/MAr19*. Το γονίδιο *MASP1/3* εδράζεται

στο χρωμόσωμα 3 και αποφέρει ένα μετάγραφο mRNA, υπεύθυνο για την δημιουργία τόσο της πρωτεΐνης MASP-1 όσο και της -3. Αποτελείται από 17 εξόνια, από τα οποία τα πρώτα δέκα κωδικοποιούν τις περιοχές CUB1, EGF, CUB2 και τις δυο περιοχές CCP. Το εξόνιο 11 κωδικοποιεί την καταλυτική περιοχή SP στην περίπτωση της MASP-3, ενώ η ίδια περιοχή της MASP-1 δημιουργείται από τα εξόνια 12 έως 17 (**Εικόνα 7**) [113].

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες MASP-2 και MAr19, αποτελούν και αυτές προϊόντα ενός εναλλακτικού μεταγράφου mRNA, το οποίο προέρχεται από τη μεταγραφή του γονιδίου *MASP2/MAr19*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 και περιέχει 12 εξόνια. Τα πρώτα τέσσερα εξόνια κωδικοποιούν τις περιοχές CUB1 και EGF τόσο της πρωτεΐνης MASP-2 όσο και της MAr19. Οι υπόλοιπες περιοχές στην περίπτωση της MASP-2 κωδικοποιούνται από τα εξόνια 5 έως 11, ενώ η καταλυτική περιοχή SP από το εξόνιο 12 (**Εικόνα 7**) [114, 115, 116].



Εικόνα 7. Γονιδιακή οργάνωση και πρωτεϊνική δομή των MASPs και MAr19. Α) Διακρίνεται η δομή του γονιδίου *MASP1/3*. Οι αστερίσκοι σημειώνουν τις θέσεις υψηλής γλυκοσυλίωσης. Β) Διακρίνεται η δομή του γονιδίου *MASP2/MAr19* (Από Sorensen και συν., με τροποποιήσεις [113])

3.3. ΣΥΜΠΛΟΚΑ MASP-MBL

Η πρωτεΐνη MASP-2 προσδεόμενη με την πρωτεΐνη MBL έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί το συμπλήρωμα χωρίς την ανάγκη των MASP-1, -3 και MAr19 [117, 118]. Εντούτοις, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση ανασυνδυασμένης MASP-2 ή περιοχών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της (CCP1- CCP2- SP), ενισχύεται σημαντικά, όταν βρίσκεται συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη MBL, ιδιαίτερα όταν η MBL ενώνεται σε ένα

μικροοργανισμό στόχο μέσω υδατανθρακικής αναγνώρισης [63]. Έχει επίσης βρεθεί ότι η MASP-2, δρα ως μεσολαβητής κατάτμησης του μορίου C4 στον καταρράκτη ενζυμικών αντιδράσεων του συμπληρώματος, 20 φορές πιο ενεργά απ' ότι το μόριο C1s [119]. Η κατάτμηση του μορίου C2 από την MASP-2 είναι πιο ασθενής [120].

Η πρωτεΐνη MASP-1 με τη σειρά της είναι ικανή στο να κατατέμνει το μόριο C2 με την ίδια ισχύ και κατά συνέπεια να ευοδώνει με τον ίδιο τρόπο τη δημιουργία της C3 κονβερτάσης [121]. Ωστόσο, η πρωτεΐνη MASP-1 δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί από μόνη την λεκτινική οδό του συμπληρώματος. Η δε ενζυμική δραστηριότητα της ανασυνδυσμένης MASP-3, μελετήθηκε και αποδείχθηκε να μην έχει την ικανότητα να κατατέμνει παράγοντες συμπληρώματος ή άλλα συνθετικά υποστρώματα *in vitro* [122].

Οι πρωτεΐνες MASP-1, -2, -3 και MAp19 σχηματίζουν ομοδιμερή στην κυκλοφορία του αίματος. Η σύνδεση αυτών των δομών με πρωτεΐνες, όπως η MBL και φικολίνες, διαμεσολαβείται μέσω της περιοχής CUB1-EGF και εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου. Η χηλίωση των ιόντων ασβεστίου στην περιοχή CUB1 είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου MBL-MASP-2. Με σκοπό τη μελέτη των αντιδράσεων, που καθορίζουν τη δημιουργία συμπλόκων MBL, MASPs και MAp19, οι Teillet και συν., εισήγαγαν στο γονίδιο *MBL2* μια σειρά σημειακών μεταλλάξεων και μελέτησαν πώς αυτές επηρεάζουν τη σύνδεση ανάμεσα στη MBL και σ' αυτές [123]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *MBL2*, που αφορούν την περιοχή που κωδικοποιεί τη λυσίνη 55 της περιοχής που ομοιάζει με κολλαγόνο και οδηγούν σε αντικατάσταση της σε αλανίνη, φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την μεταξύ τους σύνδεση, με επακόλουθο η τελευταία να γίνεται πιο ασθενής. Συμπληρωματικά, αξίζει να σημειωθεί ότι οι MASPs και η MAp19 ενώνονται με MBL ολιγομερή διαφορετικού μεγέθους. Έχει διαπιστωθεί λοιπόν με SPR ότι οι πρωτεΐνες MASP-1 και MAp19 συνδέονται κυρίως με τριμερή της βασικής υπομονάδας MBL. Εν αντιθέσει, MASP-2 και -3 δημιουργούν σύμπλοκα με ολιγομερή μεγαλύτερου βαθμού ανασυνδυσμένης κεκαθαρμένης MBL [124].

Έχει προταθεί επίσης ότι, τόσο η πρωτεΐνη MASP-3 όσο και η MAp19, εμποδίζουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, η οποία επάγεται από την MASP-2 [125]. Να σημειώσουμε, ωστόσο, ότι προσθήκη ανασυνδυσμένων MASP-2 και MAp19 στον ορό ποντικών, στα οποία έχουν αδρανοποιηθεί τα γονίδια ως προς αυτά τα μόρια (knock out), απέδειξε ότι η παρουσία της MAp19 δεν επηρεάζει την ενεργότητα της MASP-2. Τα συμπεράσματα αυτών των ευρημάτων, καθιστούν σαφές ότι χρειάζονται και άλλοι παράγοντες που να εμποδίζουν τη λειτουργία της MASP-2 και κατ' επέκταση να επηρεάσουν τη σύνδεσή της με την MBL και άλλων παραγόντων του συμπληρώματος [117].

4. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ MBL ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

4.1. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΕΣ

Τα τελευταία χρόνια εντείνεται το ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό του ρόλου της πρωτεΐνης MBL στην ανθρώπινη υγεία και πιο ειδικά στην ανάπτυξη λοιμώξεων. Αναφορικά με τον ορισμό της MBL ανεπάρκειας, τόσο στους ενήλικες όσο και στα νεογνά, έχουν αποδοθεί διάφοροι ορισμοί. Έχοντας ως κύριο άξονα την συγκέντρωση της πρωτεΐνης MBL στον ορό, η καλύτερα τεκμηριωμένη άποψη είναι, να θεωρούνται MBL λειτουργικά ανεπαρκείς οι ενήλικες που παρουσιάζουν τιμές χαμηλότερες των 500 ng/ml, το οποίο ορίζεται ως η χαμηλότερη αναγκαία ποσότητα πρωτεΐνης, έτσι ώστε να μπορεί να δράσει επαρκώς ως οψωνίνη [126]. Ωστόσο, σημειώνουμε ότι οι ορισμοί της MBL ανεπάρκειας γονοτυπικά ποικίλουν, διότι αρκετές μελέτες την ορίζουν, χωρίς να λάβουν υπόψη την επιρροή του πολυμορφισμού -221G>C και πιο συγκεκριμένα την συνδέουν μόνο με τους γονότυπους A/O και O/O. Παρόλα αυτά, οι μελέτες στο σύνολο τους, κυρίως σε ενήλικες, ενισχύουν την εκτίμηση, ότι η MBL ανεπάρκεια φαίνεται να συνδέεται με τους γονότυπους XA/O και O/O, οι οποίοι προδιαθέτουν γενετικά τα άτομα σε σχεδόν μη ανιχνεύσιμη ποσότητα της πρωτεΐνης στον ορό. Πλήθος μελετών σε ενήλικες αποδεικνύουν και συνηγορούν στο γεγονός, ότι η MBL ανεπάρκεια φαίνεται να συνδέεται επιλεκτικά με αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων αλλά και άλλων νοσημάτων, επηρεάζοντας σημαντικά την πορεία αλλά και την έκβαση της νόσου [126, 127, 128, 129]. Εντούτοις, η προδιάθεση είναι ιδιαίτερος αισθητή σε άτομα που παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης MBL με συνυπάρχουσες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες αντισωμάτων ή δευτεροπαθείς ανοσοανεπάρκειες (AIDS, ΣΕΛ) [130, 131].

Μελέτες σε ενήλικες υποστηρίζουν ότι ασθενείς με MBL ανεπάρκεια, οι οποίοι υφίστανται ανοσοκαταστολή έπειτα από χημειοθεραπεία ή μεταμόσχευση, έχουν αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης λοιμώξεων [132]. Υπάρχει όμως η εκτίμηση ότι ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία στις γενετικές παραλλαγές του πρώτου εξονίου του *MBL2*, ίσως να έχει προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες, όπως φυματίωση, λείσμανίωση και δρεπανοκυτταρική αναιμία [133, 134, 135], γεγονός που πιθανός εξηγεί την αυξημένη συχνότητα των συγκεκριμένων παραλλαγών στον πληθυσμό.

Οι λοιμώξεις των ενηλίκων που σχετίζονται με την MBL ανεπάρκεια είναι κυρίως μικροβιακές (όπως μηνιγγίτιδα από μηνιγγιτιδόκοκκο), αλλά και παρασιτικές (όπως η ελονοσία) ή λοιμώξεις προερχόμενες από ιούς, όπως αυτών της ηπατίτιδας Β και C [132]. Επιπροσθέτως, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα ποικίλα αλληλία της MBL

ενδέχεται να σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα όπως, συστηματικός ερυθρωματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα και άλλα μη λοιμώδη νοσήματα, όπως η κυστική ίνωση και η ισχαιμική καρδιακή νόσος [136, 137], τα οποία θα αναφερθούν παρακάτω.

Η παρουσία λοιπόν των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου MBL2 σε συνάρτηση με τη χαμηλή της συγκέντρωση στον ορό και τον αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης διαφόρων νοσημάτων, την καθιστά σημαντική, τόσο για την πρόληψη όσο και για το πιθανό σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων, μια και υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν τη δυνατότητα χορήγησης κεκαθαρμένης ή ανασυνδυασμένης MBL πρωτεΐνης [138].

4.1.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΑΙ MBL

Ενδιαφέρουσες πληροφορίες, που προέκυψαν από έρευνες των τελευταίων ετών, φαίνεται να συνδέουν την MBL ανεπάρκεια με διάφορες βακτηριακές λοιμώξεις [62]. Σε μελέτες *in vitro*, παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη MBL έχει τη δυνατότητα να ενωθεί με αρκετά στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών [139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146] όπως φαίνεται στον πίνακα 3. *Staphylococcus aureus* και β-αιμολυτική ομάδα A στρεπτόκοκκων, μπορούν να συνδεθούν ισχυρά μέσω υδατανθρακικής αναγνώρισης με την πρωτεΐνη MBL (**Πίνακας 3**). Μολαταύτα, έχει διαπιστωθεί για μικροοργανισμούς, όπως η *Escherichia coli* και *Haemophilus influenzae*, ότι μόνο ένα στέλεχος τους μπορεί να προσδεθεί ικανά με την πρωτεΐνη MBL. Παρόμοιες μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχουν παθογόνα βακτήρια όπως *Clostridia* και *Bacteroides*, τα οποία δεν μπορούν να προσδεθούν στην MBL [62]

Πίνακας 3. Διάφοροι μικροοργανισμοί που μπορούν να συνδεθούν μέσω υδατανθρακικής αναγνώρισης με την πρωτεΐνη MBL.

| Βακτήρια | Ιός | Μύκητες | Πρωτόζωα |
|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> [139] | HIV-1 και 2 [161] | <i>Aspergillus fumigatus</i> [139] | <i>Plasmodium falciparum</i> [145] |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> [139] | Influenza A [139] | <i>Candida albicans</i> [139] | <i>Cryptosporidium par</i> [144] |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> [139] | Herpex simplex 2 [143] | <i>Cryptococcus neoformans</i> [144] | <i>Trypanosoma cruzi</i> [146] |
| <i>Enterococcus spp.</i> [139] | Ηπατίτιδα Β [139] | | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> [140] | Ηπατίτιδα C [139] | | |
| <i>Haemophilus influenza</i> [139] | | | |
| <i>Neisseria meningitidis</i> [139] | | | |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> [139] | | | |
| <i>Escherichia coli</i> [140] | | | |
| <i>Klesbiella spp</i> [139] | | | |
| <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> [141] | | | |
| <i>Salmonella Montevideo</i> [62] | | | |
| <i>Salmonella typhimurium</i> [62] | | | |
| <i>Chlamydia pneumonia</i> [142] | | | |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> [62] | | | |
| <i>Mycobacterium avium</i> [62] | | | |

Μια από τις βακτηριακές λοιμώξεις που έχει μελετηθεί εκτενώς, είναι η μηνιγγίτιδα προερχόμενη από τον μικροοργανισμό *Neisseria meningitidis*. Η πρωτεΐνη MBL παρακινεί τη φαγοκυττάρωση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού μέσω ουδετερόφιλων και μακροφάγων, αυξάνοντας το ποσοστό των κατεστραμμένων παθογόνων, ενώ παράλληλα φαίνεται να ενορχηστρώνει την ανοσιακή απάντηση του ξενιστή, μειώνοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών [147]. Η σύνδεση της με την *Neisseria meningitides*, έχει βρεθεί να είναι ιδιαίτερα ισχυρή στην περίπτωση απουσίας από την επιφάνεια του παθογόνου καταλοίπων σιαλικού οξέος [147, 148]. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αγγλία σε παιδιά με μηνιγγίτιδα, διαπιστώθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των ποικίλων αλληλίων του γονιδίου *MBL2* με την επίπτωση της νόσου [149]. Ωστόσο, τα ευρήματα δεν επιβεβαιώθηκαν σε ανάλογη μελέτη που διεξήχθη στην Νορβηγία, σε παιδιά προσβεβλημένα με *N.meningitidis* τύπου Β και C [150]. Στο ίδιο πλαίσιο, άλλες ερευνητικές ομάδες στη Δανία ανέδειξαν ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στη συχνότητα των γενετικών παραλλαγών μεταξύ ατόμων με μηνιγγίτιδα και φυσιολογικών μαρτύρων [151]. Οι διαφορές των συμπερασμάτων που προκύπτουν μεταξύ των παραπάνω μελετών ίσως οφείλονται στο διαφορετικό

αριθμό ατόμων που εντάχθηκαν στις παραπάνω μελέτες (99 άτομα στη Δανία αντί 266 στην Αγγλία) [149, 151]. Συμπερασματικά, ο ρόλος της πρωτεΐνης MBL στην ανάπτυξη μηνιγγίτιδας δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως.

Υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες στη βιβλιογραφία για το ρόλο της MBL ανεπάρκειας στην ανάπτυξη πνευμονίας από βακτήρια όπως αυτό του *Streptococcus pneumoniae*. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη που συμπεριέλαβε μεγάλο αριθμό ατόμων που έπασχαν από λοιμώξεις του αναπνευστικού λόγω του συγκεκριμένου παθογόνου, παρατηρήθηκε υψηλότερη συχνότητα ποικίλων αλληλίων του γονιδίου *MBL2* σε ομόζυγη ή διπλά ετερόζυγη κατάσταση (B/B, B/D, C/D και D/D), σε σχέση με φυσιολογικά άτομα ίδιας ηλικίας, όπως φαίνεται στον πίνακα 4 [152]. Ωστόσο, σε παρόμοια μελέτη από τη Δανία, τέτοιου είδους διαφορά στη συχνότητα των ποικίλων αλληλίων δεν ήταν στατιστικά σημαντική [153]. Αξίζει επίσης να αναφερθεί πρόσφατη μελέτη, στην οποία μελετήθηκαν οι γονότυποι *MBL2* και όχι μεμονωμένα αλληλία, όπου διαπιστώθηκε ότι οι συχνότητες των γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια (XA/O, O/O) δεν διέφεραν μεταξύ ασθενών με πνευμονία και φυσιολογικών μαρτύρων (18% έναντι 17%) [154].

Αρκετές μελέτες συσχετίζουν το *Chlamidia pneumoniae* με τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Ανασυνδυασμένη ανθρώπινη MBL, βρέθηκε να μπορεί να συνδεθεί με τον συγκεκριμένο οργανισμό και να αποτρέπει την πιθανή εξάπλωση του σε κύτταρα HeLa [127]. Αυτό το γεγονός ίσως μπορεί να εξηγήσει την ισχυρή σύνδεση μεταξύ της MBL γονοτυπικής ανεπάρκειας και ανάπτυξης αρτηριοσκλήρωσης που παρατηρήθηκε σε μελέτη στη Νορβηγία [155]. Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις που συνδέουν τα ποικίλα αλληλία της *MBL2*, με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης άσθματος από το εν λόγω βακτήριο [156].

4.1.2. ΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Ο ολιγοσακχαρίτης μαννάνη αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του τοιχώματος των μυκητών και μελέτες *in vitro*, αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη MBL είναι ικανή να προσδεθεί σε αυτόν με μεγάλη συγγένεια, στις επιφάνειες των μικροοργανισμών. Μύκητες όπως ο *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* και *Saccharomyces Ceverisiae* όπως φαίνεται στον πίνακα 3, αποτελούν στόχο της πρωτεΐνης MBL [139, 144, 157, 158]. Ωστόσο, ελλείπει είναι οι πληροφορίες, περί συσχέτισης των γενετικών αλλοιώσεων του γονιδίου *MBL2* και της επίπτωσης μυκητιασικών λοιμώξεων, τόσο σε ενήλικες όσο και σε νεογνά.

Αξίζει να σημειωθεί μια μελέτη στην οποία παρατηρήθηκε αύξηση του κινδύνου μυκητιασικής λοίμωξης από *Candida albicans*, σε άτομα τα οποία ήταν ομόζυγα (O/O)

στα ποικίλα αλληλόμορφα του πρώτου εξονίου [159]. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι άτομα με χρόνια νεκρωτική πνευμονική ασπεργίλλωση παρουσίασαν υψηλότερη συχνότητα του αλληλίου D (rs5030737), κατόπιν σύγκρισης με υγιή άτομα [160].

4.1.3. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΙΟΥΣ

Ο ρόλος των γενετικών παραλλαγών, τόσο του πρώτου εξονίου όσο και του υποκινητή στο γονίδιο *MBL2*, σε ασθενείς που φέρουν τον ιό HIV, αποτέλεσε επίκεντρο πλήθους μελετών. Σε μελέτη *in vitro*, διαπιστώθηκε ότι η MBL πρωτεΐνη μπορεί να ενωθεί μέσω της επιφανειακής γλυκοπρωτεΐνης gp120 σε στελέχη του ιού HIV [161] **(Πίνακας 3)**.

Το σύνολο των μελετών ενισχύει την άποψη, ότι ο κίνδυνος ιογενούς λοίμωξης από HIV φαίνεται να σχετίζεται με γονότυπους που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια, όμως σαφή ευρήματα όσον αναφορά την πρόοδο και βαρύτητα της νόσου δεν έχουν αποσαφηνιστεί [162, 163, 164]. Συγκεκριμένα, οι Garred και συν., παρατήρησαν ότι ασθενείς φορείς του ιού HIV, παρουσίαζαν με υψηλότερη συχνότητα τα ποικίλα αλληλία (D, B και C) -συγκρίνοντας τους με φυσιολογικά άτομα- σε συνδυασμό με χαμηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης, όπως αναμένονταν [162]. Ανάλογα ευρήματα προέκυψαν από μελέτη σε Αφρικανούς προσβεβλημένους με τον ανωτέρω ιό, όπου βάσει των ορολογικών ευρημάτων απεφάνθη ότι οι ασθενείς παρουσίαζαν συχνότερα MBL ανεπάρκεια σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες [163]. Παρόμοια μελέτη το 2011 επιβεβαίωσε τα παραπάνω ευρήματα όπως φαίνεται στον πίνακα 4 [165].

Οι Amoroso και συν., επιθυμώντας να μελετήσουν την κλινική συσχέτιση μεταξύ των γενετικών παραλλαγών της MBL με την πρόοδο της νόσου, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι παιδιά με ταχεία εξελισσόμενη νόσο παρουσίαζαν το αλληλίο B σε ποσοστό 52%, ενώ παιδιά με βραδεία πρόοδο της νόσου σε ποσοστό 18.5%, χωρίς όμως στατιστικά ισχυρή σημαντικότητα [166]. Γενικά φαίνεται ότι στα άτομα που φέρουν τα ποικίλα αλληλία, που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια, αυξάνεται η πιθανότητα ανάπτυξης AIDS και ο κίνδυνος επίπτωσης δευτερογενών λοιμώξεων, που σχετίζονται με τον προαναφερόμενο ιό. Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα [60].

Ο ρόλος της MBL ανεπάρκειας στην ανάπτυξη λοιμώξεων από HBV και HCV, είναι υπό διερεύνηση. Η παρουσία τόσο του αλληλίου D όσο και του B, έχει συσχετιστεί με την επίπτωση αλλά και την πρόοδο της ιογενούς ηπατίτιδας από HBV [167, 168]. Παρόλα αυτά, μελέτη στη Γερμανία απέτυχε να αναδείξει παρόμοιες συσχετίσεις μεταξύ των προαναφερθέντων αλληλίων, σε άτομα προσβεβλημένα με το συγκεκριμένο εντεροϊό [169].

Όσον αφορά την ηπατίτιδα από HCV, σε μελέτη στην Ιαπωνία, όλοι οι ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C και κίρρωση σε ενεργό στάδιο, παρουσίαζαν το αλληλίο B, εν αντιθέσει με ασθενείς με μη ενεργό στάδιο της νόσου. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στην εν λόγω μελέτη, δείκτης βαρύτητας της νόσου ήταν τα επίπεδα αμινοτρανσφερασών, τα οποία από μόνα τους αδυνατούν να χαρακτηρίσουν απόλυτα σε πιο στάδιο της νόσου βρίσκονται οι ασθενείς [170]. Επίσης, στο ίδιο πλαίσιο οι Matsushita και συν., λαμβάνοντας υπόψη την επιρροή του πολυμορφισμού -221, παρατήρησαν ότι ο απλότυπος LXB, ανευρίσκονταν με υψηλότερη συχνότητα σε ασθενείς με ηπατίτιδα από HCV, οι οποίοι δε χρειάστηκαν θεραπεία με IFNγ, σε σχέση με αυτούς που την έλαβαν [171]. Ανάλογα ευρήματα διαπιστώθηκαν το 2010 σε μελέτη που έγινε σε άτομα με χρόνια ηπατίτιδα από HCV στη Βραζιλία [172]. Συνολικά τα ευρήματα μάλλον ενισχύουν την εκτίμηση ότι η MBL ανεπάρκεια συσχετίζεται με την πρόοδο τόσο της χρόνιας ηπατίτιδας από HBV όσο και από HCV και όχι με την επίπτωσή της **(Πίνακας 4)**.

Ο ιός της γρίπης A έχει διαπιστωθεί να ενώνεται *in vitro* με την πρωτεΐνη MBL, ωστόσο δεν υπάρχουν ευρήματα συσχέτισης των γενετικών αλλοιώσεων του γονιδίου *MBL2* με την επίπτωση λοιμώξεων από το συγκεκριμένο ιό [139].

Πίνακας 4. Επιλεγμένες μελέτες συσχέτισης μεταξύ των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *MBL2* και διαφόρων λοιμώξεων ή άλλων νοσημάτων σε ενήλικες.

| Βακτηριακές λοιμώξεις | | |
|----------------------------------|---|--|
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | Ασθενείς που έφεραν τα ποικίλα αλληλία του γονιδίου <i>MBL2</i> , παρουσίασαν υψηλότερη συχνότητα ανάπτυξης άσθματος (OR: 5.38, 95% CI: 1.75-14.36, p=0.01) [152] | |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των ποικίλων αλληλίων του γονιδίου <i>MBL2</i> με την επίπτωση της μηνιγγίτιδας (p=0.01) [149] | |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Ασθενείς με λοιμώξεις του αναπνευστικού λόγω του συγκεκριμένου παθογόνου, παρουσίασαν σε μεγαλύτερη συχνότητα τα ποικίλα αλληλία του γονιδίου <i>MBL2</i> σε ομόζυγη κατάσταση (B/B, B/D, C/D και D/D) σε σχέση με φυσιολογικά άτομα ίδιας ηλικίας (OR: 2.59, 95% CI: 1.39-4.83, p=0.002) [152] | |
| Μυκητιασικές λοιμώξεις | | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Το 70% των ασθενών και 26% των φυσιολογικών μαρτύρων έφεραν τα ποικίλα αλληλία <i>MBL2</i> p=0.004 [160] | |
| Ιογενείς λοιμώξεις | | |
| Ηπατίτιδα Β | Γονότυποι ΧΑ/Ο και Ο/Ο, συσχετίστηκαν θετικά με την πρόοδο της νόσου [168] | |
| Ηπατίτιδα C | Το αλληλίο Β συνδέθηκε με χαμηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης ΜΒL και αυξημένη πρόοδο της νόσου (p=0.001) [172] | |
| HIV | Αυξημένη συχνότητα του απλότυπου LXA/O και Ο/Ο σε ασθενείς με HIV [165] | |
| Αυτοάνοσα νοσήματα | | |
| Συστηματικός Ερυθρωματώδης Λύκος | Οι γονότυποι ΧΑ/Ο και Ο/Ο, βρέθηκε να σχετίζονται με μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα σε άτομα με ΣΕΛ (OR: 2.09, 95% CI: 1.20-3.68, p=0.005) [184] | |
| Ρευματοειδή Αρθρίτιδα | Διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των ποικίλων αλληλίων <i>MBL2</i> με τη βαρύτητα και πρόοδο της νόσου (p=0.001) [173] | |
| Καρδιολογικές Παθήσεις | | |
| Ισχαιμική Καρδιακή Νόσος | Αυξημένος κίνδυνος επίπτωσης ΙΚΝ σε άτομα που έφεραν ΜΒL ανεπαρκείς γονότυπους (OR: 2.3, 95% CI: 1.3 - 4.2, p=0.005) [189] | |
| Γενετικές Ανωμαλίες | | |
| Κυστική Ίνωση | Μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΚΙ παρουσίασαν γονοτυπικά ΜΒL ανεπάρκεια [188] | |

4.1.4 ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι η ΜΒL ανεπάρκεια σχετίζεται με τις κλινικές εκδηλώσεις και τη σταδιοποίηση της ΡΑ [62, 173, 174, 175]. Σε μελέτη επί 99 ασθενών που παρουσίαζαν τη συγκεκριμένη αυτοάνοση νόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης ΜΒL μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών ατόμων [176]. Σε ακόλουθη μελέτη, στην οποία διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση του αλληλίου Β με την επίπτωση της ΡΑ σε 181 Βρετανούς, δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά ως προς την συχνότητά του στους ασθενείς, σε σχέση με τους

φυσιολογικούς μάρτυρες [177]. Επιπλέον, σε μελέτη όπου καθορίστηκαν οι γονότυποι *MBL2*, δε διαπιστώθηκε συχνότερη παρουσία των γονοτύπων που αντιπροσωπεύουν την MBL ανεπάρκεια (XA/O, O/O) σε ασθενείς με PA (16,7% έναντι 15,5%, $p=0,648$) [178].

Παρόλ' αυτά σε μελέτη, στην οποία έλαβαν μέρος Δανοί ασθενείς με PA, παρατηρήθηκε διαφορά ως προς τη συχνότητα εμφάνισης λειτουργικής MBL ανεπάρκειας (11% των ασθενών και 3% των φυσιολογικών μαρτύρων παρουσίαζαν MBL ανεπάρκεια) [62]. Σε δύο ακόλουθες δημοσιεύσεις των ίδιων ερευνητών, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια με την επίπτωση της νόσου, αλλά με κακή πρόγνωσή της [179, 180]. Επίσης, διαπιστώθηκε σε Δανούς κατά τη διάρκεια μονοετούς παρακολούθησης, ότι γονότυποι που συνδέονται με χαμηλές συγκεντρώσεις MBL σχετίζονται με τη βαρύτητα και πρόοδο της νόσου [173] (**Πίνακας 4**). Παρόμοια συμπεράσματα επιβεβαιώθηκαν από αντίστοιχη μελέτη σε Κινέζους [174]. Συνοψίζοντας τα βιβλιογραφικά δεδομένα, συμπεραίνουμε ότι η MBL ανεπάρκεια και οι γονότυποι που τη χαρακτηρίζουν, δεν σχετίζονται με την εμφάνιση της PA αλλά μάλλον με την πορεία της νόσου.

Σύμφωνα με μελέτες των τελευταίων ετών, φαίνεται ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση στην ανάπτυξη ΣΕΛ [181]. Αρκετές είναι οι μελέτες σε άτομα διαφορετικής εθνικότητας, οι οποίες υποστηρίζουν ότι η συχνότητα με την οποία απαντώνται τα ποικίλα αλληλία του γονιδίου *MBL2* στους ασθενείς είναι υψηλότερη σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες [182, 183, 184]. Σε μία απ' αυτές βρέθηκαν να συμβαδίζουν τα γενετικά ευρήματα με τα αντίστοιχα ορολογικά [182]. Σε ακόλουθη μελέτη, οι Garred και συν., διαπίστωσαν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ΣΕΛ ήταν 1,6 φορές μεγαλύτερος σε ασθενείς που έφεραν τα ποικίλα αλληλία (D, B και C) απ' ότι σε αυτούς που φέρουν το φυσιολογικό αλληλίο A [185]. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που αντικρούουν τα προαναφερθέντα αποτελέσματα [186]. Γενικότερα, οι παραπάνω μελέτες μας οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι η MBL ανεπάρκεια μάλλον συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης αλλά και βαρύτητας σε ΣΕΛ.

Οι συνέπειες της παρουσίας των γενετικών παραλλαγών του *MBL2* έχουν διερευνηθεί και σε σχέση με αρκετά ακόμα νοσήματα. Ένα από αυτά, που κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα είναι η κυστική ίνωση. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Δανία σε 149 ενήλικες ασθενείς (ομόζυγοι στη μετάλλαξη ΔF508 του γονιδίου *CFTR*) είχε μελετηθεί η σχέση μεταξύ της κυστικής ίνωσης με την MBL ανεπάρκεια [187]. Στην παραπάνω μελέτη συμπεριλήφθηκαν και 250 φυσιολογικοί μάρτυρες. Η κατανομή των ποικίλων αλληλίων στο πρώτο εξόνιο ήταν όμοια τόσο στους πάσχοντες όσο και στους φυσιολογικούς. Σημαντικό εύρημα ήταν ότι οι ασθενείς που παρουσίασαν τους γονότυπους A/O και O/O του πρώτου εξονίου, είχαν μειωμένο χρόνο

επιβίωσης στο τελευταίο στάδιο της κυστικής ίνωσης, σε σχέση με αυτούς που έφεραν τον A/A. Στο ίδιο πλαίσιο, επιπρόσθετες μελέτες έδειξαν θετική σύνδεση μεταξύ MBL ανεπάρκειας και την πρόγνωση της νόσου [188].

Αξιζει, επίσης, να αναφέρουμε ότι οι γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *MBL2* έχουν συσχετισθεί και με άλλες παθήσεις, όπως η ισχαιμική καρδιακή νόσος, η αρτηριοσκλήρωση αλλά και ο καρκίνος του παχέος εντέρου όπως φαίνεται στον πίνακα 4 [189, 190, 191].

4.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΣΕ ΝΕΟΓΝΑ

Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη MBL συμμετέχει ενεργά κατά τη νεογνική ηλικία στους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού, ο ρόλος της MBL ανεπάρκειας στην ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες οι οποίες αναδεικνύουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ MBL ανεπάρκειας και σήψης στα νεογνά, που αξίζει να αναφερθούν και θα αποτελέσουν σημείο αναφοράς και σύγκρισης με την παρούσα μελέτη [30, 31, 192, 193, 194, 195, 196].

Το 2004 οι Ahrens και συν., μελετώντας διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στη φυσική ανοσία και φαίνεται να σχετίζονται με τη σήψη, ανίχνευσαν τις μεταλλάξεις του γονιδίου *MBL2* στο πρώτο εξόνιο σε νεογνά VLBW. Γονοτυπικά θεώρησαν MBL ανεπαρκή τα νεογνά που έφεραν το γονότυπο A/O και O/O, ενώ δεν υπολόγισαν τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης MBL στον ορό. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην εν λόγω μελέτη δεν είχε ληφθεί υπόψη η επιρροή του αλληλίου που προκύπτει από τον πολυμορφισμό -221G>C (αλληλία, X και Y). Κατέληξαν στη διαπίστωση, ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης σήψης ήταν ίδιος μεταξύ των νεογνών που έφεραν τον γονότυπο A/A με αυτών που έφεραν τους γονότυπους A/O και O/O, όπως φαίνεται στον πίνακα 5 [192].

Η σημασία της MBL ανεπάρκειας με βάση τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στον ορό, στην ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων, αναζητήθηκε σε μεταγενέστερη μελέτη, η οποία συμπεριέλαβε μόνο νεογνά τα οποία νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της κυκλοφορούσας πρωτεΐνης MBL μεταξύ νεογνών με διαπιστωμένη σήψη και νεογνών χωρίς σήψη στη ΜΕΘ (170 ng/ml έναντι 1450 ng/ml) [193]. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν καθορίστηκε ο γονότυπος, ως προς τις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *MBL2*, και επομένως δεν αναδείχθηκε πιθανή συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια με τον κίνδυνο επίπτωσης λοιμώξεων κατά την νοσηλεία των νεογνών στη ΜΕΘ.

Πρόσφατα οι Hingerdorff και συν., μελέτησαν τις μεταλλάξεις του πρώτου εξονίου και τους πολυμορφισμούς στην περιοχή του υποκινητή στο γονίδιο *MBL2* σε νεογνά αποκλειστικά πολύ πρόωρα (<32 εβδομάδων), εκ των οποίων πολλά παρουσίαζαν

λοιμώξεις στις πρώτες 72 ώρες ζωής. Χαρακτηριστικό εύρημα της προαναφερόμενης μελέτης ήταν ότι τόσο η παρουσία του αλληλίου B όσο και του αλληλίου X, συσχετίστηκε με βρογχοπνευμονική δυσπλασία, χωρίς όμως να σχετίζονται τα παραπάνω αλληλία με την επίπτωση λοιμώξεων κατά τις πρώτες 72 ώρες ζωής [194].

Σύμφωνα με μια πρόσφατη ανασκόπηση, όπου συνοψίζονται διάφορες μελέτες, όσον αφορά την MBL ανεπάρκεια και την ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων, δύο ήταν οι καλύτερα τεκμηριωμένες μελέτες συσχέτισης, οι οποίες περιείχαν πλήρη κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία [106].

Η πρώτη μελέτη ήταν των Frakking και συν., που διεξήχθη σε νεογνά της ΜΕΘ και συμπεριέλαβε τόσο πρόωρα όσο και τελειόμηνα [30]. Στη συγκεκριμένη μελέτη καθορίστηκε ο γονότυπος, ως προς τις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *MBL2*, και παράλληλα η συγκέντρωση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Θεωρήθηκαν MBL ανεπαρκή τα νεογνά που παρουσίαζαν συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 700 ng/ml. Με βάση τον γονότυπο που έφεραν και λαμβάνοντας υπόψη τον πολυμορφισμό στη θέση -221, κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο υποομάδες: νεογνά με *MBL2* επαρκείς γονότυπους (YA/YA, YA/XA, XA/XA και YA/O) και νεογνά με *MBL2* ανεπαρκείς γονότυπους (XA/O και O/O). Παρατήρησαν ότι νεογνά με χαμηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης MBL κατά τη γέννηση φαίνονται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διαπιστωμένης σε καλλιέργεια σήψης αλλά και πνευμονίας, όπως φαίνεται στον πίνακα 5. Τα νεογνά που έφεραν τους γονότυπους XA/O και O/O παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης διαπιστωμένης σήψης στις πρώτες 72 ώρες μετά την κύηση, σήψης κατά τον πρώτο μήνα μετά την κύηση, καθώς και περιγεννητικών λοιμώξεων. Στον πίνακα 5 φαίνονται αναλυτικά τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της μελέτης καθώς και οι αντίστοιχες συσχετίσεις.

Στο ίδιο πλαίσιο μεταγενέστερη μελέτη προσπάθησε να διερευνήσει τη σημασία της MBL ανεπάρκειας στην ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων [195]. Η MBL ανεπάρκεια εκφράστηκε γενετικά με τους γονότυπους XA/O και O/O, ενώ σε πρωτεϊνικό επίπεδο θεωρήθηκαν ανεπαρκή τα νεογνά που παρουσίαζαν τιμές χαμηλότερες από 150 ng/ml. Συνοπτικά, διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα λοιμώξεων από βακτήρια, μύκητες και ιούς ήταν σημαντικά υψηλότερη σε νεογνά γονοτυπικά ανεπαρκή (XA/O και O/O) σε σχέση με αυτά που έφεραν τα φυσιολογικά αλληλία (**Πίνακας 5**). Δεν παρατηρήθηκε, ωστόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά στην εμφάνιση λοιμώξεων μεταξύ των νεογμών που περιείχαν ανεπαρκή ποσότητα πρωτεΐνης, σε σχέση με τα υπόλοιπα που περιείχαν άνω των 150 ng/ml πρωτεΐνης στον ορό.

Συμπερασματικά, από τις παραπάνω μελέτες φαίνεται, ότι η χαμηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση της MBL πιθανά συνδέεται με την ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων, ωστόσο ο ρόλος των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *MBL2* δεν είναι απόλυτα

ξεκάθαρος. Μόνο σε δύο μελέτες, διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της MBL ανεπάρκειας γενετικά καθορισμένης με τους γονότυπους ΧΑ/Ο, Ο/Ο και επίπτωσης λοίμωξης ή σήψης στα νεογνά [30, 195].

Πίνακας 5. Μελέτες συσχέτισης μεταξύ MBL ανεπάρκειας και περιγεννητικών λοιμώξεων

| | Bodamer και συν., [109] | Ahrens και συν., [192] | Frakking και συν., [30] | Hilgendorff και συν., [194] | Van der Zwet και συν., [196] | Swiertzko και συν., [195] | De Benedetti και συν., [193] |
|--|--|-------------------------------------|--|--|--|--|--|
| Αριθμός ασθενών | 204 | 356 | 88 | 284 | 188 | 1832 | 206 |
| Κριτήρια ένταξης | Τελειόμηνα και πρόωρα (<36 weeks) | Πολύ μικρά νεογνά (VLBW) (<1500 gr) | ΜΕΘ | Πρόωρα (<32 weeks) | >4 μέρες στη ΜΕΘ | ΜΕΘ και φυσιολογικά | ΜΕΘ |
| Ομάδα φυσιολογικών | 102 τελειόμηνα | ΜΕ | ΜΕ | ΜΕ | ΜΕ | ΜΕ | ΜΕ |
| MBL γενετική ανάλυση | | | | | | | |
| MBL2 αλληλία προς διερεύνηση | B,C,D, H/L, X/Y | B,C,D | B,C,D,X/Y, H/L, P/Q | B,C,D,X/Y | B,C,D X/Y,H/L,P/Q | B,C,D,X/Y,H/L,P/Q | ΔΚ |
| Αριθμός ατόμων | 204 | 356 | 70 | 260 | 186 | 1800 | ΔΚ |
| A/A έναντι A/O+O/O | ΜΕ | 240 έναντι 116 | 47 έναντι 18+5 | 162 έναντι 84+14 | 125 έναντι 47+14 | 1091 έναντι 637+72 | ΔΚ |
| Γονοτυπικός ορισμός της MBL ανεπάρκειας | XA/O+ O/O | A/O+ O/O | XA/O+ O/O | ΔΚ | ΔΚ | XA/O+ O/O | ΔΚ |
| MBL πρωτεϊνική ανάλυση | | | | | | | |
| Αριθμός ατόμων | ΔΚ | ΔΚ | 88 | ΔΚ | ΔΚ | 1807 | 206 |
| MBL ανεπάρκειας (<ng/ml) | ΔΚ | ΔΚ | 700 | ΔΚ | ΔΚ | 150 | ΔΑ |
| Λοιμώξεις | | | | | | | |
| Καταγραφή | ΜΕ | Διαπιστωμένη σήψη | Διαπιστωμένη σε καλλιέργεια σήψη (72h) και (1μήνας), Πνευμονία (1 μήνας) | Κλινικά πρώιμη (<72 ώρες) λοίμωξη | Σήψη, πνευμονία | Περιγεννητικές λοιμώξεις (βακτήρια, μύκητες, παράσιτα.ιοί) | Νοσοκομειακή σήψη (>48 ώρες) Διαπιστωμένη έναντι ύποπτης |
| Συμπεράσματα | | | | | | | |
| MBL-ανεπαρκών σε σύγκριση με MBL-επαρκών γονοτύπων | | Δεν βρέθηκε συσχέτιση | Αυξημένη συχνότητα EOS (p<0.01) και πνευμονία (p=0.05) | Δεν βρέθηκε συσχέτιση Μεμονωμένων αλληλίων με την επίπτωση λοιμώξεων | Δεν βρέθηκε συσχέτιση του γονότυπου με λοιμώξεις ή πνευμονία | Αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων (p=0.015) | ΜΕ |
| MBL-ανεπαρκών σε σύγκριση με MBL-επαρκών ποσοτήτων πρωτεΐνης | ΔΚ | ΔΚ | Αυξημένη συχνότητα EOS(P=0,01), Πνευμονία (P=0,04) Σήψη (p=0,02) | ΔΚ | ΔΚ | Δεν βρέθηκε συσχέτιση με λοιμώξεις | Βρέθηκε διαφορά στη συγκέντρωση μεταξύ νεογνών με σήψη ή χωρίς |
| Άλλες παρατηρήσεις | Υψηλότερη συχνότητα XA/O,O/O στα πρόωρα (19,6έναντι 9,8%) p=0.05 | | όχι | Το αλληλίο Β συσχετίστηκε με βρογχοπνευμονική δυσπλασία (OR 3,59 , CI= 1,62-7,98) όπως και το αλληλίο Χ (OR 2.40, CI=1.16–4.96). | Θετική συσχέτιση μεταξύ γονοτύπων χαμηλής συγκέντρωσης με την προωρότητα | Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ MBL ανεπάρκειας στον ορό με πολύ μικρά νεογνά | |
| Στατιστική Μέθοδοι (test) | Χ ² | Χ ² | Χ ² , Πολυωνυμική λογιστική παλινδρόμηση | Λογιστική παλινδρόμηση | Πολυωνυμική λογιστική παλινδρόμηση | Χ ² | Mann-Whitney U test |

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Λαμβάνοντας υπόψη τα ορολογικά και γενετικά ευρήματα σε συνδυασμό με τα κλινικοεργαστηριακά και δημογραφικά χαρακτηριστικά νεογνών, σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ της λειτουργικής και γονοτυπικής MBL ανεπάρκειας με την επίπτωση περιγεννητικών λοιμώξεων αλλά και νοσηρότητας των νεογνών.

2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Το υλικό της παρούσας διατριβής αποτέλεσαν δείγματα αίματος και ορού 306 νεογνών, τα οποία προήλθαν από την μαιευτική κλινική (Μαιευτήριο) αλλά και από το NT του Γενικού Νοσοκομείου Πειραιά <<Αγίου Παντελεήμων>>. Η συλλογή του υλικού έγινε κατά το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου του 2007 με Οκτώβριο του 2010.

Τα νεογνά διαιρέθηκαν σε δύο βασικές ομάδες: την ομάδα ελέγχου και την ομάδα μαρτύρων ανάλογα με το είδος νοσηλείας. Η ομάδα ελέγχου περιλάμβανε 153 νεογνά τα οποία νοσηλεύτηκαν στο NT, ενώ την ομάδα μαρτύρων αποτέλεσαν άλλα 153 νεογνά που δεν χρειάστηκαν τέτοιου είδους νοσηλεία και κατ' επέκταση θεωρήθηκαν ως φυσιολογικοί μάρτυρες (Μαιευτηρίου). Επιπρόσθετα η ομάδα ελέγχου σε δεύτερη φάση, υποδιαιρέθηκε στην ανάλυση σε δύο υποομάδες, ανάλογα με τις εβδομάδες κύησης: την υποομάδα 96 τελειόμηνων νεογνών και την υποομάδα 57 πρόωρων νεογνών της ΜΕΘ. Θεωρήθηκαν πρόωρα τα νεογνά τα οποία γεννήθηκαν σε ηλικία ≤ 36 εβδομάδων κύησης.

Για το σκοπό της εργασίας κρίθηκε απαραίτητη η καταγραφή των δημογραφικών και κλινικο-εργαστηριακών ευρημάτων κατά την νοσηλεία τους, τόσο στην ομάδα ελέγχου, όσο και στην ομάδα των μαρτύρων (αναμνηστικό). Η ομάδα ελέγχου περιλάμβανε νεογνά στο αναμνηστικό των οποίων αναφέρονταν ένα ή περισσότερα αίτια εισαγωγής τους στο NT. Η ύπαρξη κλινικών σημείων ύποπτων για σήψη, εγκαθιστούσε απαραίτητο τον εργαστηριακό έλεγχο που συμπεριελάμβανε απαραίτητα τη λήψη καλλιέργειας αίματος και ούρων. Όλα τα νεογνά της ομάδας ελέγχου, με την τεκμηρίωση της διάγνωσης λοίμωξης, υποβάλλονταν στην κατάλληλη αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία. Τα δημογραφικά στοιχεία των δυο βασικών ομάδων, του μαιευτηρίου (φυσιολογικών) και νεογνών του NT (ασθενών) συνοψίζονται στον πίνακα 6, ενώ των δύο υποομάδων του NT στον πίνακα 7.

Πίνακας 6: Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και μαρτύρων.

| ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ | ΝΕΟΓΝΑ ΤΟΥ ΝΤ | | ΝΕΟΓΝΑ ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟΥ | | P |
|--|---------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------|
| | n (%) | Μέση τιμή (εύρος τιμών) | n (%) | Μέση τιμή (εύρος τιμών) | |
| No. ^a | 153 | | 153 | | |
| Χαρακτηριστικά νεογνών | | | | | |
| Άρρεν | 92 (60.1) | | 62 (40.5) | | 0.001 |
| Θήλυ | 61 (39.9) | | 91 (59.5) | | |
| Βάρος κύησης (γρ) | | 2800 (880-5050) | | 3250 (2200-4350) | - |
| Εβδομάδα κύησης | | 36 (27-42) | | 39 (36-41) | |
| Πρωωρότητα (<36εβδομ) | 57 (37.2) | | 2 (1.3) | | <0.001 |
| SGA (χαμηλού βάρους) | 23 (15) | | 5 (3.2) | | 0.001 |
| LGA (υψηλού βάρους) | 6 (3.9) | | 1 (0.6) | | 0.056 |
| Αναπνευστική δυσχέρεια | 93 (60.7) | | 0 (0) | | <0.001 |
| Σπασμοί | 6 (3.9) | | 0 (0) | | <0.001 |
| Περιγεννητικό stress | 19 (12.4) | | 0 (0) | | <0.001 |
| Ίκτερος | 54 (35.2) | | 0 (0) | | <0.001 |
| Χαρακτηριστικά κύησης | | | | | |
| Νοσήματα που σχετίζονται με την κύηση | | | | | |
| Διαβήτης κύησης | 14 (9.1) | | 3 (1.9) | | 0.006 |
| Υπέρταση | 5 (3.2) | | 3 (1.9) | | 0.474 |
| Προεκλαμψία | 4 (2.6) | | 1 (0.6) | | 0.176 |
| Είδος τοκετού | | | | | |
| Φυσιολογικός | 59 (38.5) | | 105 (68.6) | | <0.001 |
| Καισαρική | 94 (61.5) | | 48 (31.4) | | |
| Περιγεννητικές λοιμώξεις | 25 (16.3) | | 0 (0) | | <0.001 |

^a n (number), αριθμός ατόμων.

Πίνακας 7: Δημογραφικά στοιχεία νεογνών του Νεογνολογικού Τμήματος.

| ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ | ΝΕΟΓΝΑ ΤΟΥ ΝΤ ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΑ | | ΝΕΟΓΝΑ ΤΟΥ ΝΤ ΠΡΩΩΡΑ | | P |
|--|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------|
| | n (%) | Μέση τιμή (εύρος τιμών) | n (%) | Μέση τιμή (εύρος τιμών) | |
| No. | 96 | | 57 | | |
| Χαρακτηριστικά νεογνών | | | | | |
| Άρρεν | 57 (59.3) | | 35 (61.4) | | 0.804 |
| Θήλυ | 39 (40.7) | | 22 (38.6) | | |
| Βάρος κύησης (γρ) | | 3090 (1610-5050) | | 2000 (880-3400) | - |
| SGA (χαμηλού βάρους) | 18 (18.7) | | 5 (8.7) | | 0.103 |
| LGA (υψηλού βάρους) | 5 (5.2) | | 1 (1.7) | | 0.282 |
| Αναπνευστική δυσχέρεια | 53 (55.2) | | 40 (70.1) | | 0.067 |
| Σπασμοί | 5 (5.2) | | 1 (1.7) | | 0.282 |
| Περιγεννητικό stress | 16 (16.6) | | 3 (5.2) | | 0.039 |
| Ίκτερος | 24 (25.5) | | 30 (52.6) | | 0.001 |
| Άλλα ^β | 36 (37.5) | | 12 (21.4) | | 0.046 |
| Χαρακτηριστικά κύησης | | | | | |
| Νοσήματα που σχετίζονται με την κύηση | | | | | |
| Διαβήτης κύησης | 10 (10.4) | | 4 (7) | | 0.269 |
| Υπέρταση | 2 (2) | | 3 (5.2) | | 0.285 |
| Προεκλαμψία | 1 (1) | | 3 (5.2) | | 0.114 |
| Είδος τοκετού | | | | | |
| Φυσιολογικός | 44 (45.8) | | 15 (26.3) | | |
| Καισαρική | 52 (54.2) | | 42 (73.7) | | 0.016 |
| Περιγεννητικές λοιμώξεις | | | | | |
| Με απομόνωση παθογόνου | | | 8 (14) | | 0.552 |
| Gram (+) | 6 (6.2) | | 4 (7.1) | | 0.853 |
| Gram (-) | 1 (1) | | 2 (3.5) | | 0.287 |
| Χωρίς απομ. παθογόνου | | | | | |
| Πνευμονία | 1 (1) | | 0 (0) | | 0.587 |
| Ουρολοίμωξη | 2 (2) | | 0 (0) | | 0.277 |
| Σήψη | 4 (4.1) | | 7 (12.5) | | 0.006 |

^α n (number), αριθμός ατόμων, ^β Παροδική ταχύπνοια, εισρόφηση αμνιακού υγρού, δυσκολία στη σίτιση και άλλα

3. ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

Ένα φιαλίδιο γενική αίματος (σε EDTA) και ένα φιαλίδιο βιοχημικού λήφθηκε από κάθε νεογνό. Ο ορός καταψύχθηκε άμεσα στους -20°C . Οι γενικές αίματος συντηρήθηκαν χωρίς επεξεργασία στους 4°C , και η απομόνωση γενετικού υλικού έγινε εντός μίας βδομάδας.

Αρχικά έγινε ο προσδιορισμός της λειτουργικής MBL πρωτεΐνης με ELISA και στη συνέχεια γενετικός προσδιορισμός των πολυμορφισμών του *MBL2*. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πολυμορφισμών του *MBL2* έγιναν με πρωτόκολλο PCR-RFLP ενώ για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, αναφορικά με τον καθορισμό της γενετικής παραλλαγής Arg52Cys, σε αρκετά δείγματα έγινε χρήση ASO-PCR.

3.1. ΥΛΙΚΑ

Στο σύνολο των διεργασιών που έλαβαν χώρα κατά την εκπόνηση της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους πίνακες 8 και 9, αντίστοιχα.

3.1.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

| Αντιδραστήριο | Όνομα προϊόντος | Αρ.Καταλόγου | Προέλευση |
|--|--|--------------|--------------------------|
| Αλβουμίνη βοδινού ορού | 10x BSA | B9001S | New England Biolabs, USA |
| Αιθανόλη 100% | Absolute Ethanol | E/0650DF/C17 | Fischer Scientific, Eu |
| Αποστειρωμένο νερό | Water for injection | - | DEMO S.A, Greece |
| Αγαρόζη | Agarose | 16500-500 | Invitrogen, UK |
| Βρωμιούχο αιθίδιο | Ethidium Bromide, 10 mg/mL | 15585-011 | BioRad, USA |
| Διάλυμα TBE | TBE 10x buffer | 15581-028 | Invitrogen,UK |
| Διάλυμα πλύσης | Buffer AW1 | 19081 | Qiagen, Germany |
| Διάλυμα πλύσης | Buffer AW2 | 19072 | Qiagen, Germany |
| Διάλυμα εκχύλισης | Elution Buffer AE | 19077 | Qiagen, Germany |
| Διάλυμα λύσης | Lysis Buffer AL | 19075 | Qiagen, Germany |
| Διάλυμα ρυθμιστικό χωρίς MgCl ₂ | PCR Run Buffer 10x (-MgCl ₂) | Y02028 | Invitrogen, UK |
| Διάλυμα ρυθμιστικό με MgCl ₂ | 50Mm MgCl ₂ | Y02016 | Invitrogen, UK |
| Διάλυμα NEB 2 | 10x NEBuffer 2 Restriction Endonuclease Buffer | B7002S | New England Biolabs, USA |
| Διάλυμα NEB 3 | 10x NEB Buffer 3 Restriction Endonuclease Buffer | B7003S | New England Biolabs, USA |
| Διάλυμα NEB 4 | 10x NEB Buffer 4 Restriction Endonuclease Buffer | B7004S | New England BioLabs, USA |
| Μάρτυρας DNA | 10bp DNA Ladder | 10821-015 | Invitrogen, UK |
| Μάρτυρας DNA | 100bp DNA Ladder | 15622805 | Invitrogen, UK |
| Μάρτυρας DNA | E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder | 12373-031 | Invitrogen, UK |
| Νερό ελεύθερο Ρησών | Ultra Pure Water | 10977-015 | Gibco, USA |
| Ολιγονουκλεοτίδια | 100mM dNTP set | 10297-018 | Invitrogen, UK |
| Περιοστική ενδονουκλεάση Mwo I | Mwo I Restriction Enzyme | R0573L | New England Biolabs, USA |
| Περιοστική ενδονουκλεάση Ban I | Ban I Restriction Enzyme | R0118L | New England Biolabs, USA |
| Περιοστική ενδονουκλεάση Mbo II | Mbo II Restriction Enzyme | R0148L | New England BioLabs, USA |
| Περιοστική ενδονουκλεάση Btg I | Btg I Restriction Enzyme | R0608L | New England BioLabs, USA |
| Περιοστική ενδονουκλεάση Drd I | Drd I Restriction Enzyme | R0530L | New England Biolabs, USA |
| Πολυακρυμίδη | 20% TBE Gels 1.0 mm, 15 well | EC63155BOX | Invitrogen, UK |

| | | | |
|----------------------|--|-----------|----------------------|
| Πολυμεράση Taq | Taq DNA polymerase | 18038-042 | Invitrogen, UK |
| Πρωτεΐνάση | Qiagen Protease | 19131 | Qiagen, Germany |
| Χρωστική | 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer | 10816-015 | Invitrogen, UK |
| ELISA kit | MBL Oligomer Elisa kit | KIT 029 | Bioporto Diagnostics |
| DNA kit | QiAamp DNA Blood Mini Kit | 51104 | Qiagen, Germany |
| PCR kit | Taq PCR Master Mix Kit | 201445 | Qiagen, Germany |
| PCR purification kit | QiAquick PCR Purification Kit | 28106 | Qiagen, Germany |
| Gel Extraction kit | QiAquick Gel Extraction Kit | 28706 | Qiagen, Germany |

Πίνακας 9: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους

| Αναλώσιμα | Όνομα προϊόντος | Αρ.Καταλόγου | Προέλευση |
|---------------------------------|---|---------------------|--------------------|
| Κυβέτες φωτομέτρου | Uvette 220-1600 nm | 9520010051 | Eppendorf, UK |
| Μπουκάλι 1000 mL | 1L Storage bottles | 430518 | Corning, USA |
| Μπουκάλι 250 mL | 250 mL Storage bottles | 430281 | Corning, USA |
| Μπουκάλι 500 mL | 500 mL Storage bottles | 430282 | Corning, USA |
| Ρύγχη πιπέτας 10 µL | 10 µL sterilised long tips | DL10ST | Gilson Inc, USA |
| Ρύγχη πιπέτας 100 µL, με φίλτρο | 100 µL sterilised filter tips | DF100ST | Gilson Inc, USA |
| Ρύγχη πιπέτας 1000 µL | 1000 µL sterilised filter tips | DF1000ST | Gilson Inc, USA |
| Ρύγχη πιπέτας 200 µL | 200 µL sterilised tips | D200ST | Gilson Inc, USA |
| Ρύγχη πιπέτας 200 µL, με φίλτρο | 200 µL sterilised filter tips | DF200ST | Gilson Inc, USA |
| Ρύγχη πιπέτας 30 µL, με φίλτρο | 30 µL sterilised filter tips | DF30ST | Gilson Inc, USA |
| Σωληνάρια γενικής αίματος | VACUETTE® EDTA tubes | 454087 | Vacurette, USA |
| Σωληνάριο ορού | Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST) | 367954 | BD Vacutainer, USA |
| Φιαλίδιο PCR | PCR tubes, Flat cap, sterile | 6571 | Corning, USA |
| Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL | Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes | AM12400 | Ambion, USA |

3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του γενετικού υλικού (γενωμικού DNA) έγινε με τη χρήση ειδικού συστήματος (kit), του QiAamp DNA Blood Mini Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen). Το σύστημα απομόνωσης περιλάμβανε 4 τύπους διαλυμάτων, η σύσταση των οποίων δεν αναφέρεται από την εταιρία. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA) από εμπύρηντα λευκοκύτταρα και στον περαιτέρω καθαρισμό του από πρωτεΐνες και άλατα στα επόμενα στάδια. Αρχικά, από κάθε φιαλίδιο αίματος με αντιπηκτικό K₃EDTA έγινε λήψη 200 μL, τα οποία προστέθηκαν σε σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1,5 mL που περιείχε 200 μL διαλύματος λύσης (Buffer AL) και 20 μL Qiagen πρωτεάσης. Σκοπός της πρωτεάσης, είναι η απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών προσδεμένων στο DNA, μέσω της πέψης πεπτιδικών δεσμών σε αλειφατικά, αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα. Ακολούθησε ανάδευση (vortex) και επώαση του μείγματος σε υδατόλουτρο στους 56°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL απόλυτης αιθανόλης 96-100% και κατόπιν συντελέστηκε μεταφορά του μείγματος σε ειδική στήλη (QiAamp Spin Column). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για ένα λεπτό. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με τα διαλύματα AW1 και AW2 στις 8000 rpm για ένα λεπτό και 14000 rpm για 3 λεπτά, αντίστοιχα. Μέσω των προαναφερθέντων διαλυμάτων επιτεύχθηκε η απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων στοιχείων, που μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και περιεκτικότητα του DNA και κατ' επέκταση να παρεμποδίσουν πιθανά την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Τέλος, προστέθηκαν σε κάθε στήλη 100 μL διαλύματος εκχύλισης AE (Elution Buffer), ακολούθησε επώαση για ένα λεπτό και τελική φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του DNA ήταν περίπου 50-200 ng/μL. Τα δείγματα DNA μπορούσαν να διατηρηθούν στους 2-8°C για λίγες μέρες ή κατά προτίμηση σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως στην δική μας περίπτωση.

3.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

3.3.1. PCR RFLP ΓΙΑ ΤΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ARG52CYS, GLY54ARG ΚΑΙ GLY57GLU ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ ΚΑΙ -550G>C, -221G>C ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MBL2*

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε η κλασσική αντίδραση πολυμεράσης, ακολουθούμενη από πέψεις με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP), με σκοπό την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών Arg52Cys, Gly54Arg και Gly57Glu στο πρώτο

εξόνιο, καθώς και των -550G>C και -221G>C του υποκινητή. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, που αντλήθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι οποίοι αποσκοπούσαν στη μελέτη συγκεκριμένου αναγνωστικού πλαισίου, όπου εδράζονται οι εν λόγω γενετικές παραλλαγές. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν των Tin και συν., με παραλλαγές σύμφωνα με το οποίο έγινε ενίσχυση σε δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης, τόσο της περιοχής του υποκινητή όσο και του πρώτου εξονίου στο οποίο εμπεριέχονται οι παραπάνω γενετικές παραλλαγές και ακολούθησε πέψη με περιοριστικά ένζυμα [197].

3.3.1.1. PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MBL2*

Για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών Arg52Cys, Gly54Arg και Gly57Glu του πρώτου εξονίου και των -550G>C και -221G>C στην περιοχή του υποκινητή, έγινε τροποποίηση των εκκινητών στο 3' άκρο με τέτοιο τρόπο ώστε να γίνει εισαγωγή θέσεων πέψης (όπου δεν υπήρχαν). Η συγκεκριμένη τροποποίηση δεν εμποδίζει τη σύνδεση του εκκινητή στην αλληλουχία του DNA, δεδομένου ότι δεν αφορά την τελευταία βάση του. Στον πίνακα 10, παρουσιάζονται αναλυτικά οι ονομασίες, η νουκλεοτιδική σύσταση, το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης καθώς και το μήκος των 2 προϊόντων που ενισχύουν στις δύο περιοχές του γονιδίου *MBL2*.

Πίνακας 10: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών του πρώτου εξονίου και του υποκινητή στο γονίδιο MBL2. Υπογραμμισμένες φαίνονται οι βάσεις που αντικαταστάθηκαν ενώ σε παρένθεση οι βάσεις που τοποθετήθηκαν στην θέση τους, ώστε να δημιουργηθεί η αλληλουχία πέψης, παρουσία ή μη της παραλλαγής.

| Γενετική παραλλαγή | Εκκινητής | Αλληλουχία εκκινητή (5'-3') | Μήκος(bp) | Μήκος(bp) προϊόντος PCR |
|--------------------|-----------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Arg52Cys | Πρόσθιος | MBL1S | CATCAACggCTTCCCAgg <u>Δ</u> (g)Δ(C)A | 28 |
| Gly54Arg | | | AgA Tggg | 134 |
| Gly57Glu | Οπίσθιος | MBL1AS | gTCTCC TCA TAT CCC CAg gC' | 20 |
| -550G>C | Πρόσθιος | MBLF | GAAAATgCTTACCCAgg(A)CAAgCCT | 26 |
| -221G>C | Οπίσθιος | MBLR | TCATCTgTgCCTAgA CACCTg gC | 23 |

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μείγματος ήταν 30 μL και περιείχε το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη), 1,5 mM MgCl₂, 200 μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP), 50 pmol από κάθε εκκινητή, 1,0 U Taq-πολυμεράση και 100-200 ng DNA. Τα συστατικά των 2 μειγμάτων PCR, που αφορούν την ενίσχυση της περιοχής του πρώτου εξονίου και του υποκινητή, διαφέρουν μόνο ως προς την νουκλεοτιδική σύσταση των εκκινητών, όπως φαίνεται υπογραμμισμένο στον πίνακα 11.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου των 2 PCR αντιδράσεων. Οι συνθήκες των αντιδράσεων διεξήχθησαν σε 30 κύκλους και ήταν όμοιες και στις δυο περιπτώσεις (**Πίνακας 11**).

Πίνακας 11: Οι συνθήκες της PCR για την ανίχνευση των SNPs, Arg52Cys Gly54Arg και Gly57Glu στην περιοχή του πρώτου εξονίου και πολυμορφισμών -550G>C, -221G>C στην περιοχή του υποκινητή του MBL2.

| Γενετική παραλλαγή | | |
|--|-------------|----------|
| Στάδιο | Θερμοκρασία | Διάρκεια |
| Αρχική αποδιάταξη (First denaturation) | 94°C | 5min |
| Αποδιάταξη (Denaturation) | 94°C | 30sec |
| Υβριδισμός (Annealing) | 64°C | 30sec |
| Επέκταση (Extension) | 72°C | 30sec |
| Τελική επέκταση (Final Extension) | 72°C | 5min |
| Κύκλοι | 30 | |

Για την επίτευξη των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank), έτσι ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και φωτογραφήθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

3.3.1.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ SNPs ARG52CYS GLY57GLU ΚΑΙ GLY54ARG ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Η μελέτη των SNPs Arg52Cys, Gly54Arg και Gly57Glu στο γονίδιο MBL2, πραγματοποιήθηκε έπειτα από πέψη των προϊόντων PCR του πρώτου εξονίου με ένζυμο περιορισμού. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR με σκοπό την ανίχνευση της παραλλαγής στο κωδικό 52 (Arg52Cys), χρησιμοποιήθηκαν 2,5 U του ενζύμου Mwo I, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος NEbuffer 3, το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (New England Biolabs). Το συγκεκριμένο ένζυμο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το Mwo I γονίδιο από τον *Methanobacterium wolfeii*. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο η επώαση του μείγματος στους 37°C για τουλάχιστον 8 ώρες.

Για την ανίχνευση της Gly54Arg παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού Ban I, το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E.coli* που φέρει το Ban I γονίδιο, το οποίο προέρχεται από το Gram (+) βακτήριο *Bacillus aneurinoliticus*.

Ποσότητα 6μL προϊόντος PCR, αναμειχθηκε με 2,5 U του ενζύμου Ban I, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 4, το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (*New England Biolabs*), σε τελικό όγκο 15 μL. Ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 37°C για τουλάχιστον 8 ώρες σε υδατόλουτρο.

Αντίστοιχα, για την ανίχνευση της Gly57Glu παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού Mbo II, το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το *Mbo II* γονίδιο, το οποίο προέρχεται από το Gram (-) βακτήριο *Moraxella bovis*. Ποσότητα 6μL προϊόντος PCR, αναμειχθηκε με 2,5 U του ενζύμου *Mbo II*, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 4, το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (*New England Biolabs*) σε τελικό όγκο 15 μL. Ακολούθησε και σ' αυτήν την περίπτωση επώαση του μείγματος στους 37°C για τουλάχιστον 8 ώρες σε υδατόλουτρο. Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται τα προαναφερθέντα ένζυμα καθώς και οι συγκεκριμένες αλληλουχίες δίκλωνου DNA που αναγνωρίζουν και κατατέμνουν.

Πίνακας 12: Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των Arg52Cys, Gly54Arg και Gly57Glu παραλλαγών και η αλληλουχία που αυτά αναγνωρίζουν. Όπου R: A ή G, Y: C ή T, N: A, G, C ή T.

| Γενετική παραλλαγή | Ένζυμο | Αλληλουχία αναγνώρισης |
|--------------------|--------|---|
| Arg52Cys | Mwo I | 5'...GCNNNNNNNNGC...3' 3'...CGNNNNNNNCG...5' |
| Gly54Arg | Ban I | 5'...GGYRCC... 3'...CCRYGG... |
| Gly57Glu | Mbo II | 5'...GAAGA(N)□... 3'...CTTCT(N)□... |

Ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης και στις τρεις περιπτώσεις έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 3,0%. Αναλυτικά, επί απουσίας της παραλλαγής στο κωδικό 52, ανιχνεύονται δύο δέσμες προϊόντων PCR στα 109 και 25 bp μετά την ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος (προϊόν πρώτου εξονίου) που προκύπτουν από το αρχικό προϊόν. Αντίθετα, ανιχνεύεται μία δέσμη στα 134 bp μετά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος που προκύπτει στην περίπτωση ομόζυγου δείγματος (άπεπτο). Σε ετεροζυγώτες φορείς της μετάλλαξης ανιχνεύονται τρεις δέσμες στα 134, 109 και 25 bp.

Στο πήκτωμα, επί απουσίας της παραλλαγής στο κωδικό 54 παρατηρούνται δύο δέσμες μήκους 99 και 35 bp και αντιστοιχούν στο φυσιολογικό για την Gly54Arg δείγμα. Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανιχνεύονται τρεις δέσμες μήκους 134, 99 και 35 bp, ενώ σε ομόζυγο δείγμα για την εν λόγω παραλλαγή, δεν γίνεται κατάτμηση του αρχικού προϊόντος PCR και επομένως γίνεται ορατή μόνο η δέσμη μήκους 134 bp.

Όσον αφορά την παραλλαγή Gly57Glu, επί απουσίας της δεν παρατηρείται πέψη του αρχικού προϊόντος PCR. Σε περίπτωση ετερόζυγου δείγματος ανιχνεύονται 3 δέσμες, μία μήκους 134 bp, και άλλες δύο, που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης του πολυμορφικού αλληλίου μήκους 78 και 56 bp. Τέλος, σε περίπτωση ομόζυγου δείγματος για την Gly57Glu παρατηρούνται μόνο οι δέσμες μήκους 78 και 56 bp. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συχνότητα του αλληλίου C της προαναφερθείσας γενετικής παραλλαγής είναι της τάξεως 2% στους Ευρωπαίους και σε περίπτωση φυσιολογικού φορέα δεν παρατηρείται πέψη, η εύρεση δείγματος ετερόζυγου ή ομόζυγου ήταν δύσκολη. Για το λόγο αυτό αρχικά επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας θετικός της δραστηριότητας του ενζύμου, μια συγκεκριμένη γνωστή αλληλουχία (PCR προϊόν) του γονιδίου της φερροπορτίνης. Κατόπιν επώασης του εν λόγω προϊόντος με το ένζυμο, παρατηρήθηκε το αναμενόμενο προϊόν κατάτμησης, γεγονός που αποδεικνύει τη δραστηριότητα του ενζύμου περιορισμού *Mbo* II. Τελικά, έπειτα από την ανάλυση αρκετών δειγμάτων, ανιχνεύθηκε ετερόζυγος φορέας της παραλλαγής στο κωδικό 57, διαπιστωμένος και με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας της πέψης.

3.3.1.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ -550G>C, -221G>C ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Όσον αφορά την ανίχνευση των πολυμορφισμών στις θέσεις -550 και -221 του υποκινητή αλλά και τον καθορισμό του απλότυπου ως προς αυτές, τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *Btg* I και *Drd* I. Το ένζυμο περιορισμού *Btg* I, το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το *BtgI* γονίδιο και προέρχεται από το μικροοργανισμό *Bacillus thermoglucosidasius*, αναγνωρίζει τον πολυμορφισμό στη θέση -221. Αντίστοιχα το ένζυμο *Drd* I αναγνωρίζει αυτόν της θέσης -550 και προέρχεται από το μικροοργανισμό *Arthrobacter aurescens*. Τα παραπάνω ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 13. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 2,5 U του ενζύμου *Btg* I, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 3 και 10xBSA (*New England Biolabs*). Η χρησιμότητα της BSA

πρωτεΐνης έγκειται αφενός στην παρεμπόδιση της προσκόλλησης του ενζύμου στα σωληνάρια ή άλλες επιφάνειες (π.χ ρύγχη πιπετών), αφετέρου στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών της αντίδρασης. Αντίστοιχα για την πέψη 6 μL του προϊόντος PCR, στην περίπτωση του πολυμορφισμού -550G>C χρησιμοποιήθηκαν 2,5 U του ενζύμου Drd I, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 4 (*New England Biolabs*). Οι αντιδράσεις πέψης πραγματοποιήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις στους 37°C για τουλάχιστον 8 ώρες σε υδατόλουτρο.

Συγκεκριμένα, σε ένα δείγμα επί απουσίας του πολυμορφισμού -550G>C, το ένζυμο Drd I δεν αναγνωρίζει την αλληλουχία, οπότε ανιχνεύεται μόνο η δέσμη μήκους 410 bp (αρχικό προϊόν). Σε ένα ετερόζυγο δείγμα προκύπτουν τα προϊόντα πέψης μήκους 410, 388 και 22 bp, ενώ σε ομοζυγωτία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ανιχνεύονται οι δέσμες μήκους 388 και 22 bp. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό -221G>C επί απουσίας του και σ' αυτή την περίπτωση δεν παρατηρείται πέψη του αρχικού προϊόντος PCR. Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανιχνεύονται τρεις δέσμες μήκους 410 bp, 352 bp και 58bp ενώ σε ομοζυγωτία μόνο οι δέσμες 352 και 58 bp.

Στην περίπτωση διπλής ετεροζυγωτίας στους δύο εκ των ανώτερων πολυμορφισμών, για τον καθορισμό του γονότυπου που προκύπτει, χρησιμοποιήθηκε σε κοινό μείγμα πέψης τόσο το ένζυμο Btg I όσο και το Drd I, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Tin και σύν., [197]. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25 U του ενζύμου Btg I και 2,5 U του ενζύμου Drd I, σε ένα κοινό μείγμα, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 4 και 10xBSA (*New England Biolabs*).

Πίνακας 13: Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των -550G>C, και -221G>C παραλλαγών και η αλληλουχία που αυτά αναγνωρίζουν Όπου R: A ή G, Y: C ή T, N: A, G, C ή T.

| Γενετική παραλλαγή | Ένζυμο | Αλληλουχία αναγνώρισης |
|--------------------|--------|--|
| -550G>C | Drd I | 5'...GACNNNN \blacktriangle NGTC... 3'...CTGNN \blacktriangle NNNNCAG.... |
| -221G>C | Btg I | 5'... \blacktriangle CRYGG... 3'...GGYRCC \blacktriangle ... |

Συγκεκριμένα, ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 37°C για τουλάχιστον 8 ώρες σε υδατόλουτρο και έπειτα ανάλυση σε ηλεκτροφορητικό μέσο όπου ήταν και σ' αυτή την περίπτωση η πηκτή αгарόζης σε πυκνότητα 3%. Οι αναμενόμενες δέσμες ήταν

της τάξεως των 410, 388, 352 και 330 bp, ο συνδυασμός των οποίων καθόριζε το γονότυπο όσον αφορά τους εν λόγω πολυμορφισμούς, όπως φαίνεται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14: Αναμενόμενες δέσμες της PCR-RFLP ανάλυσης για τον καθορισμό του γονότυπου ως προς τις πολυμορφικές θέσεις -550 και -221 του γονιδίου MBL2.

| Γονότυπος | 410bp | 388bp | 352bp | 330bp |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| HX/HX | + | | | |
| LX/LX | | + | | |
| HY/HY | | | + | |
| LY/LY | | | | + |
| HX/LX | + | + | | |
| HX/HY | + | | + | |
| HX/LY | + | | | + |
| HY/LX | | + | + | |
| LX/LY | | + | | + |
| HY/LY | | | + | + |

3.3.2. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ ARG52CYS ΜΕ ASO-PCR

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, αναφορικά με τον καθορισμό της γενετικής παραλλαγής Arg52Cys, σε αρκετά δείγματα έγινε χρήση μιας ASO-PCR, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Steffansen και συν., [198]. Με την τεχνική αυτή, πραγματοποιούνται για κάθε δείγμα δύο αντιδράσεις PCR, σε κάθε μία από τις οποίες χρησιμοποιούνται δυο ζεύγη εκκινητών. Η τεχνική αυτή απαιτεί τη χρήση μεταλλαγμένων και φυσιολογικών ζευγών εκκινητών, οι οποίοι διαφέρουν κατά μια βάση στο 3' άκρο στο σημείο που εδράζεται ο πολυμορφισμός προς ανίχνευση. Η διαφορά της τελευταίας βάσης επομένως επιτρέπει την ενίσχυση τμήματος DNA, μόνο εφόσον υπάρχει απόλυτη συμπληρωματικότητα προς τον εκάστοτε εκκινητή. Ενώ οι προαναφερθέντες εκκινητές ενισχύουν ένα τμήμα DNA του γονιδίου *MBL2* που περιλαμβάνει τη θέση υπό εξέταση, ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών ενισχύει ένα μεγαλύτερο τμήμα DNA μήκους 431 ζευγών βάσεων του γονιδίου *HGH* ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας DNA. Το φυσιολογικό δείγμα που δεν φέρει την παραλλαγή (A αλλήλιο) θα ενισχυθεί με το μείγμα της πρώτης PCR που περιέχει τους εκκινητές με το φυσιολογικό αλλήλιο (A mix), δίνοντας προϊόν 268 ζευγών βάσεων, ενώ δεν θα δώσει προϊόν στην περίπτωση του μείγματος της δεύτερης PCR (D mix) που περιέχει τους εκκινητές με το μεταλλαγμένο αλλήλιο D. Στο δείγμα που φέρει την μετάλλαξη θα συμβεί το αντίθετο, ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας θα παρατηρηθεί και στις δυο αντιδράσεις προϊόν PCR. Τέλος, σε όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων, θα πρέπει να ανιχνευθεί το προϊόν PCR μήκους 431 ζευγών βάσεων του γονιδίου *HGH*, που αποτελεί εσωτερικό θετικό μάρτυρα DNA.

Στον πίνακα 15 παρουσιάζονται, ενδεικτικά, οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις 2 αλυσιδωτές αντιδράσεις (A και D) πολυμεράσης, το αντίστοιχο αλλήλιο που ενισχύουν αυτές καθώς και το μήκος των προϊόντων για κάθε δείγμα.

Πίνακας 15: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της γενετικής παραλλαγής Arg52Cys. Υπογραμμισμένες και τονισμένες φαίνονται οι βάσεις που σχεδιάστηκαν, έτσι ώστε να δημιουργηθεί η συμπληρωματική αλληλουχία και να ανιχνευθεί η παρουσία του SNP.

| Γενετική παραλλαγή | Εκκινητής | Αλληλίο | Αλληλουχία εκκινητή (5'-3') | Μήκος (bp) εκκινητή | Μήκος(bp) προϊόντος PCR |
|--------------------|-----------|---------|---|---------------------|-------------------------|
| Arg52Cys | Πρόσθιος | A | CTgCACCCAgATTgTAggACAgAg | 28 | 268 |
| | FA | | TCTCCCTTggTgCCATCAC _{g} | 20 | |
| | Οπίσθιος | D | CTgCACCCAgATTgTAggACAgAg | 28 | |
| | RA | | TCTCCCTTggTgCCATCAC _{A} | 20 | |
| | Πρόσθιος | A/D | TgCCTTCCCAACCATTCCCTTA | 22 | 431 |
| | FD | | CCACTCACggATTTCTgTTgTgTTTC | 26 | |
| | Οπίσθιος | | | | |
| | RC | | | | |

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μείγματος ήταν 30 μ L και περιείχε το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη), 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M από κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP), 50 pmoles από κάθε εκκινητή, 1,0 U Taq-πολυμεράση και 100-200 ng DNA.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου των 2 αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης. Οι συνθήκες των αντιδράσεων διεξήχθησαν σε δυο στάδια στους 30 κύκλους και ήταν όμοιες και στις δυο περιπτώσεις **(Πίνακας 16)**.

Πίνακας 16: Οι συνθήκες της ASO-PCR σε δυο στάδια για την ανίχνευση της Arg52Cys στην περιοχή του πρώτου εξονίου του MBL2.

| Στάδιο | Θερμοκρασία | Διάρκεια |
|---|-------------|----------|
| Αρχική αποδιάταξη (First denaturation) | 94°C | 5min |
| Αποδιάταξη (Denaturation) | 94°C | 20sec |
| Υβριδισμός (Annealing)/ Επέκταση (Extension) | 68°C | 20sec |
| Τελική επέκταση (Final Extension) | 68°C | 5min |
| Κύκλοι | | 30 |

Για την επίτευξη των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβανόταν ένα σωληνάριο μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank), έτσι ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων.

3.3.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της PCR καθώς και ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγιναν ορατοί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3%, επί παρουσίας ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE. Στο πήκτωμα προστέθηκε διάλυμα βρομιούχου αιθιδίου, σε συγκέντρωση 0,5 ng/ml, το οποίο αποτέλεσε την φθορίζουσα χρωστική. Το βρομιούχο αιθίδιο έχει τη δυνατότητα να διεισδύει ανάμεσα στις βάσεις του DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Σε κάθε ένα από τα δείγματα προστέθηκε ειδική χρωστική (loading dye) σε αναλογία 1/10 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (πχ, 10 μL δείγματος και 1 μL χρωστική), έτσι ώστε να διακρίνεται η μετανάστευση τους στο πήκτωμα. Στη συνέχεια το κάθε μείγμα τοποθετήθηκε στο πήκτωμα και μετακινούνταν από 40 έως 70 λεπτά αναλόγως την ανάλυση, στα 120 V και 400 mA. Για τον υπολογισμό του μεγέθους, τόσο των προϊόντων PCR όσο και προϊόντων πέψης, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών

βαρών ο E-Gel Low Range Ladder (100-2000bp). Η φωτογράφιση της πηκτής έγινε υπό υπεριώδες φως.

3.3.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, σχετικά με την παρουσία των γενετικών παραλλαγών που μελετήθηκαν έγινε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων, κατόπιν καθαρισμού των PCR προϊόντων, σε αρκετά από τα δείγματα. Χρησιμοποιήθηκαν τυχαία αλλά και επιλεγμένα δείγματα, τόσο θετικά, ως προς την παρουσία των εν λόγω παραλλαγών, όσο και αρνητικά. Πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη αλληλούχηση με τη χρήση του Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems) και του γενετικού αναλυτή αλληλουχίας βάσεων ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του QIAquick Purification kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινήτων, νουκλεοτιδίων, πολυμεράσης και αλάτων, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για ανάλυση αλληλουχίας βάσεων. Αναλυτικότερα: σε πρώτη φάση προστέθηκε σε κάθε προϊόν PCR, που προοριζόταν για καθαρισμό, διάλυμα (PBI buffer) σε ποσότητα τρεις φορές μεγαλύτερη από τον αρχικό όγκο του προϊόντος PCR. Στη συνέχεια, το μείγμα τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη (QIAquick column), η οποία περιέχει μεμβράνη, έτσι ώστε να γίνει προσρόφηση του DNA μέσω του διαλύματος PBI, το οποίο εξασφαλίζει την απαιτούμενη συγκέντρωση αλάτων και pH. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 10000 x g για ένα λεπτό και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, ακολούθησε πλύση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει αιθανόλη (PE buffer) και φυγοκέντρηση σε 10000 x g για ένα λεπτό. Ακολούθησε τρίτη φυγοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες, χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν αιθανόλης στα τοιχώματα της στήλης. Τέλος, η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1,5 mL, προστέθηκαν 35 µL διαλύματος εκχύλισης (EB buffer), παρέμεινε για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκε τελική φυγοκέντρηση στα 10000 x g για ένα λεπτό. Το καθαρισμένο δείγμα DNA αποθηκεύτηκε προσωρινά στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί για αλληλούχηση.

3.4. ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (ENZYMELINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY, ELISA) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL

Η μέτρηση της λειτουργικής πρωτεΐνης MBL (ολιγομερική μορφή) στον ορό του αίματος, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA τύπου «sandwich». Ο συγκεκριμένος τύπος ανοσοπροσροφητικής δοκιμασίας βασίζεται στο γεγονός ότι καταρχάς το αντίσωμα προς διερεύνηση συνδέεται με το αντίστοιχο αντιγόνο στερεάς φάσης και έπειτα προστίθεται σ' αυτό το σύμπλοκο, δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι σεσημασμένο με κάποιο ένζυμο και ειδικό μόνο για την ολιγομερική μορφή της MBL. Τέλος, προστίθεται στο σύστημα το υπόστρωμα του ενζύμου, του οποίου σύνδεση με το ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του από ένα άχρωμο υπόστρωμα σε έγχρωμο προϊόν αντιδράσεως [199]. Η ένταση του χρώματος μετριέται φωτομετρικά και καθορίζει τη συγκέντρωση του αντισώματος προς ανάλυση.

Αναλυτικά το kit περιείχε μια πλάκα 96 κελιών, στα οποία ήταν δεσμευμένα αντιγόνα μανόζης (αντί-MBL) σε στερεά φάση. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη 100 μl δείγματος ορού από κάθε νεογνό και επώαση για 60 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη δεύτερου βιοτινιλυομένου αντισώματος MBL, το οποίο προσδέθηκε αποκλειστικά μόνο σε αντισώματα δεσμευμένα σε αντιγόνα της στερεάς φάσης (ολιγομερική μορφή MBL) και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το τέλος του χρόνου επώασης τα κελιά εκπλύθηκαν τρεις φορές και προστέθηκε σε αυτά υπόστρωμα ενζύμου HRP-με δεσμευμένη στρεπταβιδίνη για άλλα 60 λεπτά. Στο τελικό στάδιο προστέθηκε στα κελιά υπόστρωμα χρωμογόνου TMB, του οποίου η επώαση έγινε στο σκοτάδι και διακόπηκε μετά από 15 λεπτά, με την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού. Η καμπύλη αναφοράς περιελάμβανε τιμές από 0-40 μg/ml. Η κατώτερη ανιχνεύσιμη τιμή της συγκέντρωσης MBL ανέρχονταν στα 10 ng/ml, ενώ δείγματα που έφεραν συγκέντρωση μη προσδιορίσιμη (<10 ng/ml) θεωρήθηκε η τιμή συγκέντρωσής τους στα 10 ng/ml, στη στατιστική ανάλυση. Η φωτομέτρηση έγινε σε διάστημα χρόνου 30 λεπτών στα 450 nm, ενώ ο συνολικός χρόνος της συγκεκριμένης ανοσοενζυμικής διαδικασίας ανερχόταν περίπου στις 4 ώρες.

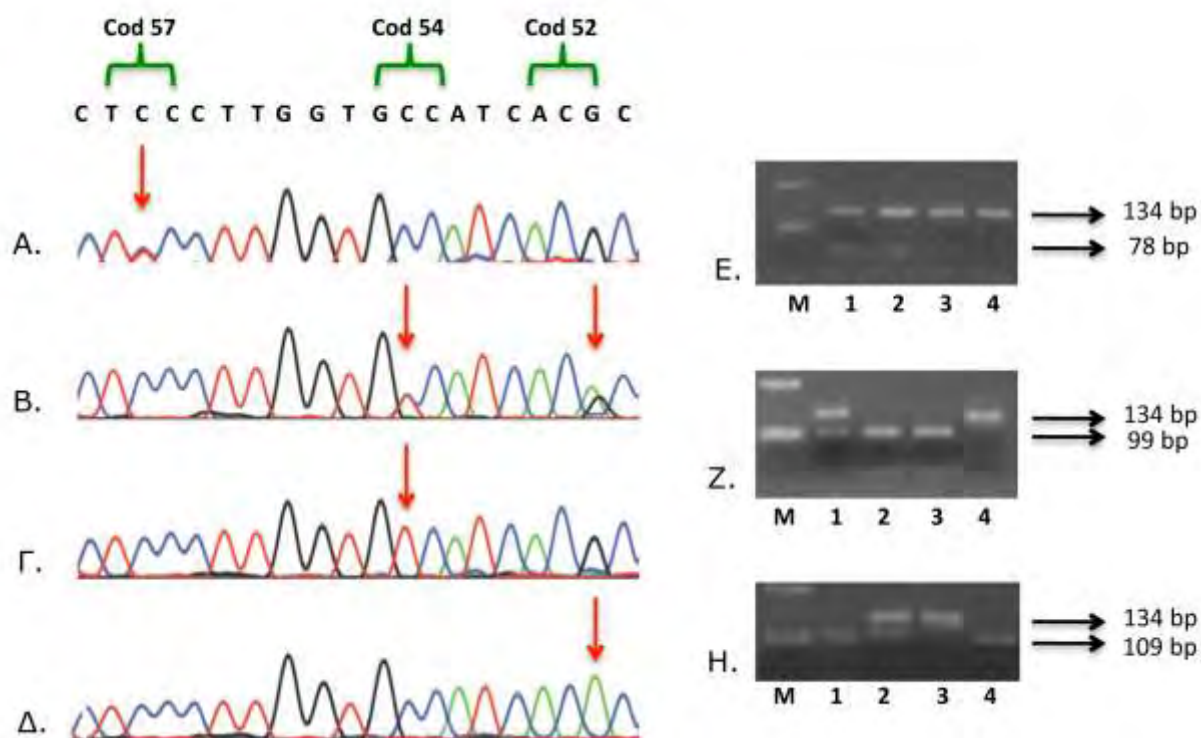
3.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS 17.0. Οι συγκρίσεις όσον αφορά τη συχνότητα ανάμεσα σε μεταβλητές κατηγορίας πραγματοποιήθηκαν με τον έλεγχο χ^2 . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος αναλογιών (odds ratio, OR) με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval, CI). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα σύνολα τιμών δεν ικανοποιούν κανονικές κατανομές, οι συγκρίσεις ανάμεσα σε κατηγορικές και συνεχείς μεταβλητές έγιναν με Mann-Whitney test μη παραμετρικό έλεγχο. Για να διερευνηθεί η υπόθεση της συσχέτισης μεταξύ MBL ανεπάρκειας με τον αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων ή και άλλων κλινικό-εργαστηριακών παραγόντων (μεταβλητές), έγινε χρήση της διωνυμικής συσχέτισης κατά Spearman και πολυπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης. Όλοι οι έλεγχοι θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικοί, σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

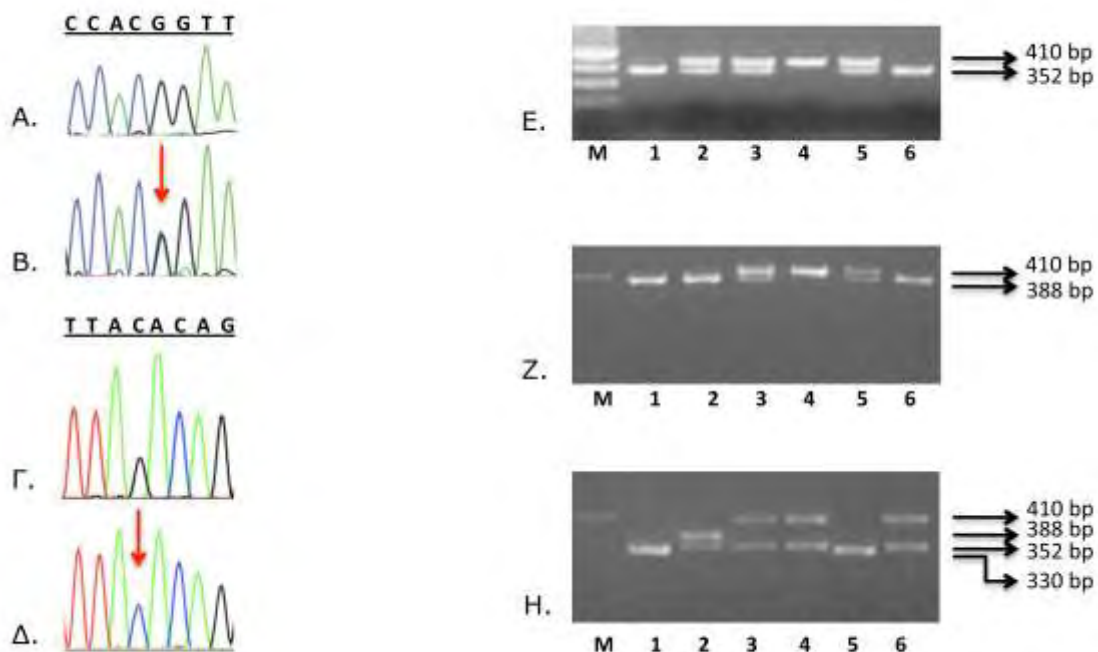
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Στις εικόνες 8 και 9 παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά από PCR-RFLP για την ανίχνευση των παραλλαγών που μελετήθηκαν αλλά και sequencing για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

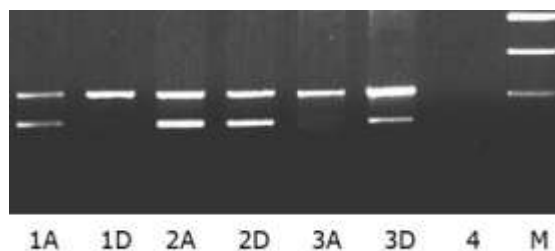


Εικόνα 8: **A.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων, στην περιοχή του πρώτου εξονίου στο γονίδιο MBL2. Δείγμα ετερόζυγο για τη παραλλαγή στο κωδίκιο 57 (Gly57Glu), γονότυπος A/C. **B.** Αντίστοιχο παράδειγμα δείγματος ετερόζυγου, τόσο για τη παραλλαγή στο κωδίκιο 52 (Arg52Cys) όσο και στο κωδίκιο 54 (Gly54Asp), γονότυπος D/B. **Γ.** Αντίστοιχο παράδειγμα δείγματος ομόζυγου για τη παραλλαγή στο κωδίκιο 54, γονότυπος B/B. **Δ.** Αντίστοιχο παράδειγμα, δείγματος ομόζυγου για τη παραλλαγή στο κωδίκιο 52 (Arg52Cys), γονότυπος D/D. **Ε.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με PCR-RFLP, για την ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδίκιο 57. M: μάρτυρας. Δείγματα 1-2: ετερόζυγα για τη Gly57Glu. Δείγμα 3-4: χωρίς τη Gly57Glu (φυσιολογικό). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 3%. **Z.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με PCR-RFLP, για την ανίχνευση της Gly54Asp. M: μάρτυρας. Δείγμα 1: ετερόζυγο για την Gly54Asp. Δείγματα 2 και 3: χωρίς τη Gly54Asp (φυσιολογικό). Δείγμα 4: ομόζυγο για την Gly54Asp. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 3%. **H.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με PCR-RFLP, για την ανίχνευση της Arg52Cys. Δείγματα 1 και 4: χωρίς τη Arg52Cys (φυσιολογικό). Δείγμα 2: ετερόζυγο για την Arg52Cys. Δείγμα 3: ομόζυγο για την Arg52Cys. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 3%.



Εικόνα 9: **A.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα *sequencing*, στην περιοχή του υποκινητή στο γονίδιο *MBL2*. Δείγμα ομόζυγο για τον πολυμορφισμό στη θέση -221bp, γονότυπος Υ/Υ. **B.** Αντίστοιχο παράδειγμα δείγματος ετερόζυγου, για τον πολυμορφισμό στη θέση -221, γονότυπος Χ/Υ. **Γ.** Αντίστοιχο παράδειγμα δείγματος ομόζυγου για τον πολυμορφισμό στη θέση -550, γονότυπος Λ/Λ. **Δ.** Αντίστοιχο παράδειγμα δείγματος, χωρίς τον πολυμορφισμό στη θέση -550, γονότυπος Η/Η. **Ε.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με *PCR-RFLP*, για την ανίχνευση του πολυμορφισμού στη θέση -221. Μ: μάρτυρας. Δείγματα 1 και 6: ομόζυγα για τον πολυμορφισμό στη θέση -221. Δείγματα 2, 3 και 5: ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό στη θέση -221. Δείγμα 4: χωρίς τον πολυμορφισμό στη θέση -221. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτική αγαρόζης 3%. **Ζ.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με *PCR-RFLP*, για την ανίχνευση του πολυμορφισμού στη θέση -550. Μ: μάρτυρας. Δείγματα 1, 2 και 6: ομόζυγα για τον πολυμορφισμό στη θέση -550. Δείγματα 3 και 5: ετερόζυγα για τον παραλλαγή στη θέση -550. Δείγμα 4: χωρίς τον πολυμορφισμό στη θέση -550. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτική αγαρόζης 3%. **Η.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με *PCR-RFLP*, για τον καθορισμό του γονότυπου ως προς τις γενετικές παραλλαγές στις θέσεις -550 και -221 του υποκινητή στο γονίδιο *MBL2*. Μ: μάρτυρας. Δείγματα 1 και 5: χωρίς τον πολυμορφισμό στη θέση -550 και ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό στη θέση -221, γονότυπος ΗΧ/ΗΥ. Δείγμα 3, 4 και 6: ομόζυγο τόσο για τον πολυμορφισμό στη θέση -550 όσο και στη θέση -221, γονότυπος ΛΥ/ΛΥ. Δείγμα 2: ετερόζυγο τόσο για τον πολυμορφισμό στη θέση -550 όσο και για τον πολυμορφισμό στη θέση -221, γονότυπος ΗΥ/ΛΧ. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτική αγαρόζης 3%.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, όσον αφορά τον καθορισμό της Arg52Cys, σε αρκετά δείγματα έγινε χρήση ASO-PCR, ενδεικτικά αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην εικόνα 10.



Εικόνα 10: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης μετά από ASO-PCR, για την ανίχνευση της Arg52Cys. Οι στήλες 1A-1D αντιστοιχούν σε δείγμα ίδιου ατόμου, χωρίς την παραλλαγή (φυσιολογικού). Οι στήλες 2A-2D αντιστοιχούν σε δείγμα ίδιου ατόμου, ετερόζυγου για την παραλλαγή, ενώ οι 3A-3D σε δείγμα ίδιου ατόμου, ομόζυγου για την παραλλαγή στο κωδικό 52 (Arg52Cys). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 2,5%.

4.1.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MBL2*

Στην παρούσα μελέτη, κατόπιν καθορισμού των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *MBL2*, διερευνήθηκε η συχνότητα των αλληλίων D, B και C για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Η συχνότητα των αλληλίων D, B και C στο σύνολο των 306 νεογνών ήταν 6, 20 και 0.3 % αντίστοιχα, όπου τη συνηθέστερη γενετική παραλλαγή αποτέλεσε η Gly54Arg (αλληλίο B). Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς του υποκινητή του *MBL2*, η συχνότητα των αλληλίων H και L ήταν 42.4 και 57.6 % αντίστοιχα, ενώ των αλληλίων X και Y ήταν 19.4 και 80.6 % αντίστοιχα. Ακολούθως, διερευνήθηκε εάν υπάρχουν διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης των παραπάνω αλληλίων αλλά και των απλοτύπων που προκύπτουν, στις δυο βασικές ομάδες νεογνών (NT/Μαιευτήριο).

Στον πίνακα 17 και στην εικόνα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης που αφορούν τη συχνότητα των αλληλίων κάθε παραλλαγής που ελέγχθηκε καθώς και των απλοτύπων που προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό των ανωτέρων γενετικών παραλλαγών με τους πολυμορφισμούς της περιοχής του υποκινητή, στις δυο βασικές ομάδες νεογνών (NT/Μαιευτήριο).

Πίνακας 17: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης της συχνότητας επίπτωσης των γενετικών παραλλαγών και απλοτύπων του γονιδίου *MBL2*, μεταξύ νεογνών του μαιευτηρίου και αυτών του NT.

| | Μαιευτήριο | NT | OR | P |
|--------------------------------|-------------------|-------------|------------------|----------|
| <i>MBL2</i> συχνότητα αλληλίων | | | | |
| Arg52Cys D αλλήλιο | 21 (6.8%) | 22 (7.1 %) | | 0.874 |
| Gly54Asp B αλλήλιο | 62 (20.3%) | 61 (19.9 %) | | 0.985 |
| Gly57Glu C αλλήλιο | 0 (0.0 %) | 3 (0.9 %) | | 0.083 |
| <i>MBL2</i> κατανομή απλότυπων | | | | |
| HYA | 105 (34.3 %) | 90 (29.4 %) | | 0.193 |
| LYA | 64 (20.9 %) | 70 (22.8 %) | | 0.558 |
| LXA | 50 (16.3 %) | 51 (16.6 %) | | 0.942 |
| LYB | 56 (18.3 %) | 48 (15.6%) | | 0.389 |
| HYD | 21 (6.8 %) | 19 (6.2 %) | | 0.744 |
| LYC | 0 (0.0 %) | 3 (0.9 %) | | 0.083 |
| Σπάνια (HXA,HYB,LXB) | 10 (3.2 %) | 25 (8.1%) | 2.63 (1.24-5.58) | 0.009 |

Πιο συγκεκριμένα, 43 νεογνά του NT και 46 νεογνά του μαιευτηρίου ήταν ετεροζυγότες φορείς της παραλλαγής στο κωδικό 54 (A/B), η οποία αποτελεί τη συνηθέστερη γενετική παραλλαγή του *MBL2* σε Ευρωπαίους [91]. Επιπρόσθετα, 8 νεογνά του NT και 5 νεογνά του μαιευτηρίου παρουσίασαν σε ομόζυγη κατάσταση το αλλήλιο B (B/B). Όσον αφορά την παραλλαγή στο κωδικό 52, 14 νεογνά του NT και 15 νεογνά του μαιευτηρίου ήταν ετεροζυγότες φορείς της εν λόγω παραλλαγής (A/D). Αντίστοιχα μόνο τρία νεογνά του NT ήταν ομόζυγα (D/D), ενώ κανένα από τα νεογνά του μαιευτηρίου δεν έφερε την συγκεκριμένη παραλλαγή σε ομοζυγοτία. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε δύο περιπτώσεις νεογνών του NT και έξι νεογνών του μαιευτηρίου, παρατηρήθηκε διπλή ετεροζυγοτία των παραπάνω SNPs, αποτέλεσμα το οποίο επιβεβαιώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις με sequencing.

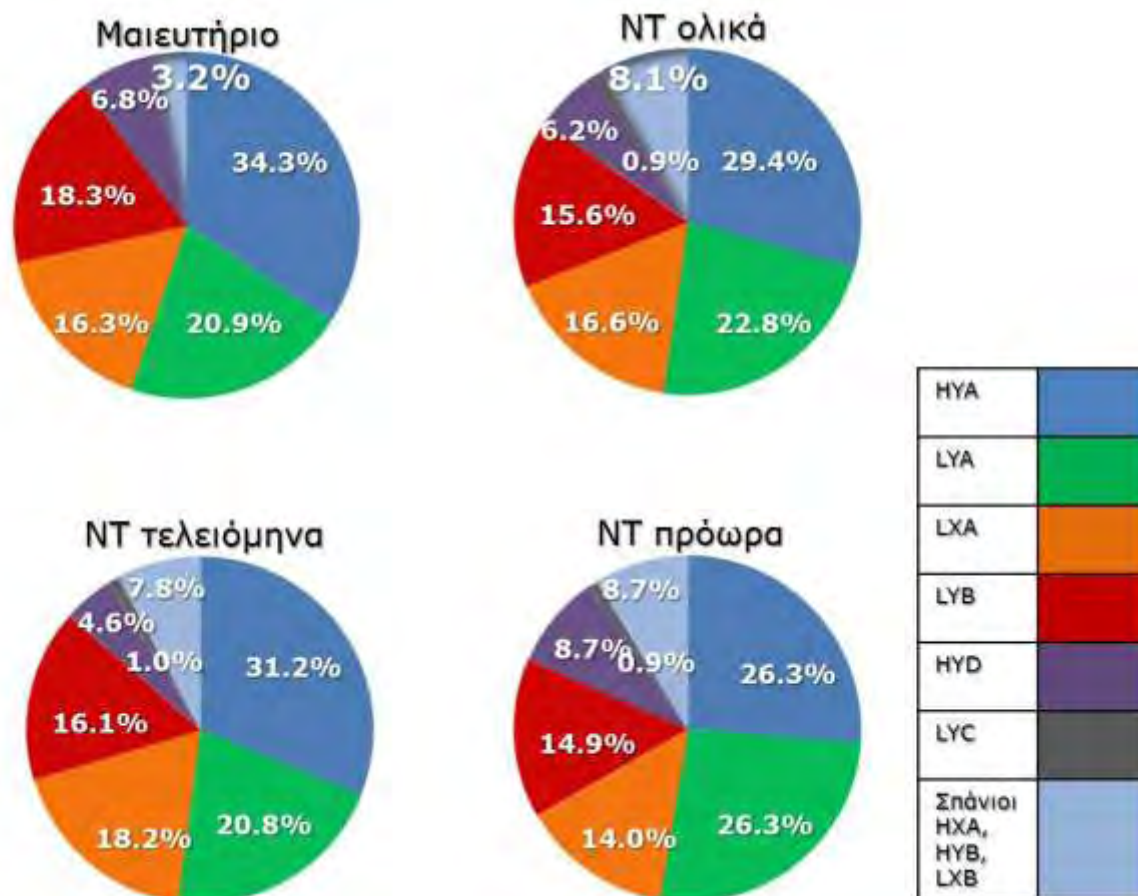
Λαμβάνοντας υπόψη τη χαμηλή συχνότητα επίπτωσης της παραλλαγής στο κωδικό 57 σε Καυκάσιους, στη δική μας μελέτη εντοπίστηκαν μόνο τρία νεογνά στην ομάδα ελέγχου (NT), τα οποία ήταν ετερόζυγα της συγκεκριμένης παραλλαγής (A/C). Κανένα νεογνό δεν έφερε σε ομόζυγη κατάσταση το αλλήλιο C.

Ένα από τα ερωτήματα που εξετάστηκαν επιπρόσθετα στην παρούσα μελέτη ήταν, εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ προωρότητας και MBL ανεπάρκειας στα νεογνά. Για το λόγο αυτό, η ομάδα ελέγχου (NT), όπως προαναφέρθηκε, χωρίστηκε σε δύο υποομάδες, ανάλογα με την ηλικία κύησης, και ελέγχθηκε η διαφορά της συχνότητας εμφάνισης των αλληλίων, απλοτύπων καθώς και των γονοτύπων μεταξύ των δύο υποομάδων. Η πρώτη

υποομάδα περιλάμβανε τελειόμηνα νεογνά, ενώ η δεύτερη πρόωρα νεογνά, με ηλικία κύησης μικρότερη ή ίση των 36 εβδομάδων. Στον πίνακα 18 καθώς και στην εικόνα 11, παρουσιάζονται οι συχνότητες των αλληλίων κάθε παραλλαγής καθώς και των απλοτύπων στις δύο υποομάδες της ομάδας ελέγχου (NT) σε ανάλυση χ^2 .

Πίνακας 18: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης της επίπτωσης των γενετικών παραλλαγών και απλοτύπων του γονιδίου MBL2, μεταξύ τελειόμηνων και πρόωρων νεογμών του NT.

| | Τελειόμηνα | Πρόωρα | P |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------|
| <i>MBL2 συχνότητα αλληλίων</i> | | | |
| Arg52Cys D αλλήλιο | 11 (5.7%) | 11 (9.6 %) | 0.199 |
| Gly54Asp B αλλήλιο | 39 (20.3%) | 22 (19,3 %) | 0.977 |
| Gly57Glu C αλλήλιο | 2 (1.0 %) | 1 (0.9 %) | 0.562 |
| <i>MBL2 κατανομή Απλότυπων</i> | | | |
| HAY | 60 (31.2 %) | 30 (26.3 %) | 0.360 |
| LYA | 40 (20.8 %) | 30 (26.3 %) | 0.270 |
| LXA | 35 (18.2 %) | 16 (14.0 %) | 0.341 |
| LYB | 31 (16.1 %) | 17 (14.9%) | 0.774 |
| HYD | 9 (4.6 %) | 10 (8.7 %) | 0.152 |
| LYC | 2 (0.1 %) | 1 (0.1 %) | 0.888 |
| Σπάνια (HXA,HYB,LXB) | 15 (7.8 %) | 10 (8.7%) | 0.767 |



Εικόνα 11: Κυκλικά γραφίσματα, όπου διακρίνονται οι ποσοστιαίες συχνότητες των απλοτύπων στις διάφορες ομάδες και υποομάδες νεογνών.

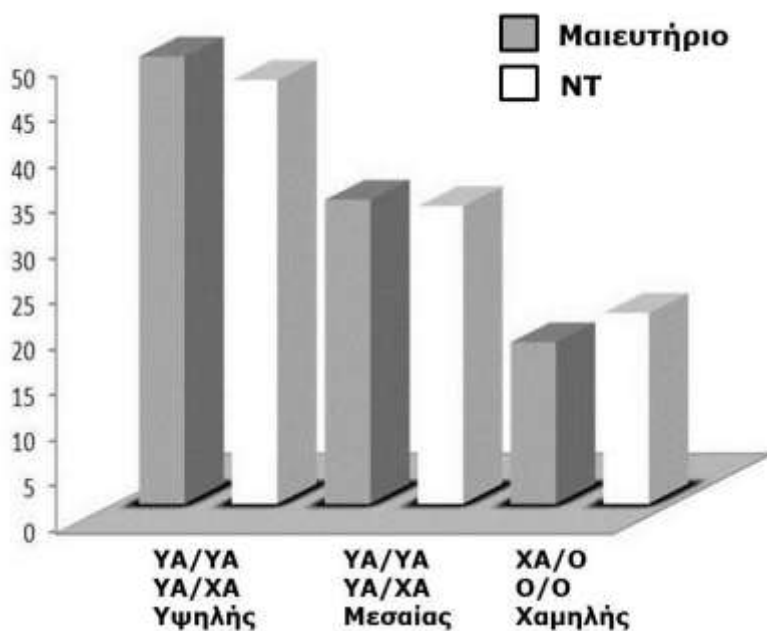
Κατά την σύγκριση της συχνότητας επίπτωσης των ανωτέρω γενετικών παραλλαγών μεταξύ της ομάδας ελέγχου (NT) και των υγιών μαρτύρων (μαιευτήριο), δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο, έπειτα από τον καθορισμό των αντίστοιχων απλοτύπων αλλά και τη σύγκριση των συχνοτήτων που εμφανίζονται στις δύο βασικές κατηγορίες νεογνών προς εξέταση, διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα σπάνιων απλοτύπων (HXA, HYB, LXB) που σχετίζονται με χαμηλές συγκεντρώσεις της MBL, στα νεογνά του NT ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των νεογνών του μαιευτηρίου (8.1% έναντι 3.2% OD: 2.63, 95%CI: 1.24-5.58, $p=0.009$).

Στη δεύτερη περίπτωση, κατά τον ίδιο τρόπο, έγινε σύγκριση των συχνοτήτων του κάθε αλληλίου αλλά και των απλοτύπων που προκύπτουν στις δύο υποομάδες νεογνών της NT. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας χ^2 , δε διαπιστώθηκε διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης αλληλίων και απλοτύπων μεταξύ τελειόμνηνων και πρόωρων νεογνών του NT.

Οι γονότυποι που προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό των γενετικών παραλλαγών του πρώτου εξονίου (αλληλία, D, B και C) και του πολυμορφισμού -221G>C (αλληλία, X και Y) σχετίζονται με υψηλή, μεσαία και πολύ χαμηλή συγκέντρωση της MBL. Πιο συγκεκριμένα, προκύπτουν 6 γονότυποι (YA/YA, YA/XA, XA/XA, YA/O, XA/O και O/O) οι οποίοι συγκροτούν 3 βασικές κατηγορίες γονοτύπων υψηλής, μεσαίας και πολύ χαμηλής συγκέντρωσης. Η τρίτη κατηγορία, που αποτελείται από τους γονότυπους XA/O και O/O, σχετίζεται με πολύ χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης και ορίζει γονοτυπικά την MBL ανεπάρκεια όπως προαναφέρθηκε. Στην παρούσα μελέτη έγινε για πρώτη φορά στην Ελλάδα, καταγραφή της συχνότητας της MBL ανεπάρκειας γονοτυπικά και μελετήθηκε εάν προκύπτουν διαφορές στη συχνότητα επίπτωσης των 6 γονοτύπων και των τριών κατηγοριών τους μεταξύ των δύο βασικών ομάδων νεογνών, του NT και των νεογνών του μαιευτηρίου. Η συχνότητα της MBL ανεπάρκειας στον Ελληνικό πληθυσμό ανέρχονταν σε ποσοστό 19.3 % στο σύνολο των νεογνών, σχετικά υψηλή, συγκριτικά με άλλες μελέτες σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης [68]. Στον πίνακα 19 φαίνεται η κατανομή των νεογνών, που συμμετείχαν στη μελέτη, στις δύο βασικές ομάδες, σύμφωνα με το γονότυπό τους, ως προς τις προαναφερθείσες γενετικές παραλλαγές καθώς και οι λόγοι αναλογιών με τις αντίστοιχες στάθμες σημαντικότητας σε ανάλυση χ^2 . Στο ιστόγραμμα της εικόνας 12 αντίστοιχα, διακρίνονται οι συχνότητες των τριών βασικών κατηγοριών γονοτύπων στις δύο βασικές ομάδες νεογνών.

Πίνακας 19: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης της συχνότητας επίπτωσης μεμονωμένων γονοτύπων αλλά και των τριών κατηγοριών γονοτύπων έκφρασης (υψηλής, μεσαίας και χαμηλής), μεταξύ νεογνών του μαιευτηρίου και αυτών του ΝΤ.

| Γονότυπος | ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟ | | ΝΤ | | OR, 95%CI | P |
|----------------|------------|------|----|------|------------------|-------|
| | N | % | n | % | | |
| ΥΑ/ΥΑ | 48 | 31.3 | 46 | 30 | 1.06 (0.65-1.72) | 0.804 |
| ΥΑ/ΧΑ | 27 | 17.6 | 25 | 16.3 | 1.09 (0.60-1.99) | 0.761 |
| ΧΑ/ΧΑ | 6 | 3.9 | 9 | 5.8 | 0.65 (0.22-1.88) | 0.427 |
| ΥΑ/Ο | 45 | 29.4 | 41 | 26.7 | 1.13 (0.69-1.87) | 0.611 |
| ΧΑ/Ο | 16 | 10.4 | 18 | 11.7 | 0.87 (0.42-1.78) | 0.716 |
| Ο/Ο | 11 | 7.1 | 14 | 9.1 | 0.76 (0.33-1.75) | 0.531 |
| ΥΨΗΛΗΣ | | | | | | |
| ΥΑ/ΥΑ,ΥΑ/ΧΑ | 75 | 49 | 71 | 46.4 | 1.11 (0.71-1.74) | 0.647 |
| ΜΕΣΑΙΑΣ | | | | | | |
| ΧΑ/ΧΑ,ΥΑ/Ο | 51 | 33.3 | 50 | 32.6 | 1.04 (0.64-1.67) | 0.872 |
| ΧΑΜΗΛΗΣ | | | | | | |
| ΧΑ/Ο,Ο/Ο | 27 | 17.7 | 32 | 20.9 | 0.81 (0.46-1.43) | 0.469 |



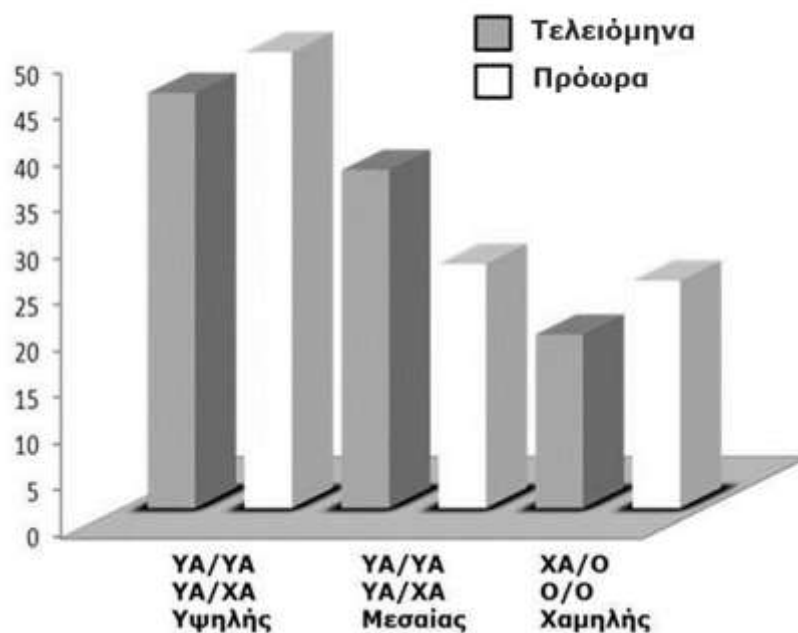
Εικόνα 12 : Η επί τοις % απεικόνιση της συχνότητας των τριών βασικών κατηγοριών γονοτύπων έκφρασης (υψηλής, μεσαίας και χαμηλής αντίστοιχης συγκέντρωσης) των νεογνών του ΝΤ και του μαιευτηρίου.

Στο ίδιο πλαίσιο μελετήθηκε η πιθανή διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των παραπάνω γονοτύπων στις δυο υποομάδες του ΝΤ, τελειόμηνων και πρόωρων νεογνών.

Στον πίνακα 20 παρουσιάζονται οι συχνότητες των γονοτύπων σε κάθε υποομάδα καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης χ^2 . Στο ιστόγραμμα της εικόνας 13 διακρίνονται οι συχνότητες των τριών βασικών κατηγοριών γονοτύπων στις δύο υποομάδες νεογνών του NT.

Πίνακας 20: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης της συχνότητας επίπτωσης μεμονωμένων γονοτύπων αλλά και των τριών κατηγοριών γονοτύπων έκφρασης (υψηλής, μεσαίας και χαμηλής) μεταξύ τελειόμηνων και πρόωρων νεογνών του NT.

| Γονότυπος | ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΑ | | ΠΡΩΩΡΑ | | OR, 95% CI | P |
|--------------|------------|------|--------|------|------------------|-------|
| | N | % | n | % | | |
| YA/YA | 27 | 28.1 | 19 | 33.3 | 0.78 (0.38-1.58) | 0.497 |
| YA/XA | 16 | 16.6 | 9 | 15.7 | 1.06 (0.13-2.61) | 0.887 |
| XA/XA | 7 | 7.2 | 2 | 3.5 | 2.16 (0.43-10.7) | 0.336 |
| YA/O | 28 | 29.1 | 13 | 22.8 | 1.29 (0.60-2.78) | 0.509 |
| XA/O | 12 | 12.5 | 6 | 10.5 | 1.21 (0.42-3.43) | 0.714 |
| O/O | 6 | 6.2 | 8 | 14 | 0.41 (0.13-1.24) | 0.106 |
| ΥΨΗΛΗΣ | | | | | | |
| YA/YA, YA/XA | 43 | 44.7 | 28 | 49.1 | 0.84 (0.43-1.62) | 0.603 |
| ΜΕΣΑΙΑΣ | | | | | | |
| XA/XA, YA/O | 35 | 36.4 | 15 | 26.3 | 1.61 (0.78-2.31) | 0.196 |
| ΧΑΜΗΛΗΣ | | | | | | |
| XA/O, O/O | 18 | 18.7 | 14 | 24.5 | 0.71 (0.32-1.56) | 0.393 |



Εικόνα 13: Η επί τοις % απεικόνιση της συχνότητας των τριών βασικών κατηγοριών γονοτύπων έκφρασης του γονιδίου MBL2 (υψηλής, μεσαίας και χαμηλής αντίστοιχης συγκέντρωσης), των πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών του NT.

Στην πρώτη περίπτωση που έγινε σύγκριση της συχνότητας των 6 μεμονωμένων γονοτύπων μεταξύ των νεογνών του NT και αυτών του μαιευτηρίου, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, γεγονός που καταδεικνύει, ότι η κατανομή των συγκεκριμένων γονοτύπων στην ομάδα του NT (ασθενών) ακολουθεί το πρότυπο της ομάδας των νεογνών του μαιευτηρίου (υγιών μαρτύρων). Είναι επίσης αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στην περίπτωση σύγκρισης της συχνότητας μεταξύ της κατηγορίας γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια (XA/O και O/O), διαπιστώθηκε οι τελευταίοι να εμφανίζονται πιο συχνά στην ομάδα των νεογνών του NT σε σχέση με τα νεογνά του μαιευτηρίου, χωρίς όμως η διαφορά της εμφάνισης τους να είναι στατιστικά σημαντική (20.9 % έναντι 17.7 %, $p > 0.05$).

Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και στην περίπτωση σύγκρισης της συχνότητας επίπτωσης των 6 γονοτύπων και των τριών κατηγοριών τους μεταξύ των δυο υποομάδων του NT. Αξίζει να αναφερθεί ότι περίπου ένα στα τέσσερα πρόωρα νεογνά του NT παρουσίασε γονοτυπική MBL ανεπάρκεια, ωστόσο η διαφορά της συχνότητας επίπτωσής της, δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα αντίστοιχα τελειόμηνα ($p > 0.05$). Τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω αναλύσεων θα συζητηθούν παρακάτω.

Λαμβάνοντας υπόψη στην ανάλυση και τον πολυμορφισμό -550G>C (αλληλία H και L), από τον ανασυνδυασμό μεταξύ των τριών SNPs του πρώτου εξονίου με τους δυο πολυμορφισμούς της περιοχής του υποκινητή, ανιχνεύτηκαν 9 απλότυποι, οι οποίοι δημιούργησαν 34 ξεχωριστούς γονότυπους, στο σύνολο όλων των νεογνών. Στον πίνακα 21 κατανέμονται τα νεογνά του NT και του μαιευτηρίου ανάλογα με τους γονότυπους που φέρουν και διακρίνονται οι διαφορές της συχνότητας των γονοτύπων μεταξύ των ομάδων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η σύγκριση διεξήχθη μόνο στην περίπτωση γονοτύπων οι οποίοι εμφανίστηκαν και στις δυο υποομάδες.

Πίνακας 21: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης της συχνότητας επίπτωσης των γονοτύπων μεταξύ νεογνών του μαιευτηρίου και του ΝΤ.

| Γονότυπος | ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟ | | ΝΤ | | OR (95% CI) | P |
|---------------|------------|------|----|------|------------------|--------------|
| | n | % | n | % | | |
| ΥΑ/ΥΑ | | | | | | |
| ΗΥΑ/ΗΥΑ | 12 | 7.8 | 10 | 6.5 | 1.21 (0.51-2.91) | 0.659 |
| ΛΥΑ/ΛΥΑ | 6 | 3.9 | 7 | 4.5 | 0.85 (0.28-2.89) | 0.777 |
| ΗΥΑ/ΛΥΑ | 30 | 19.6 | 29 | 18.9 | 1.04 (0.59-1.84) | 0.885 |
| ΥΑ/ΧΑ | | | | | | |
| ΛΧΑ/ΛΥΑ | 9 | 5.8 | 12 | 7.8 | 0.73 (0.31-1.71) | 0.498 |
| ΗΥΑ/ΛΧΑ | 15 | 9.8 | 12 | 7.8 | 1.27 (0.57-2.82) | 0.545 |
| Σπάνια | 3 | | 1 | | | |
| ΧΑ/ΧΑ | | | | | | |
| ΛΧΑ/ΛΧΑ | 5 | 3.2 | 5 | 3.2 | 1.00 (0.28-3.52) | 1.000 |
| Σπάνια | 1 | 0.6 | 4 | 2.6 | | |
| ΥΑ/Ο | | | | | | |
| ΗΥΑ/ΗΥΔ | 4 | 2.6 | 3 | 1.9 | 1.34 (0.29-6.11) | 0.702 |
| ΗΥΔ/ΛΥΑ | 4 | 2.6 | 7 | 4.5 | 0.56 (0.16-1.95) | 0.357 |
| ΛΥΑ/ΛΥΒ | 9 | 5.8 | 7 | 4.5 | 1.30 (0.47-3.59) | 0.608 |
| ΗΥΑ/ΛΥΒ | 26 | 16.9 | 20 | 13.0 | 1.36 (0.72-2.52) | 0.337 |
| Σπάνια | 2 | 1.3 | 4 | 2.6 | 0.49 (0.08-2.73) | 0.410 |
| ΧΑ/Ο | | | | | | |
| ΛΧΑ/ΛΥΒ | 8 | 5.2 | 11 | 7.1 | 0.71 (0.27-1.82) | 0.477 |
| ΗΥΔ/ΛΧΑ | 7 | 4.5 | 2 | 1.3 | 3.62 (0.74-17.7) | 0.091 |
| Σπάνια | 1 | 0.6 | 5 | 3.2 | | |
| Ο/Ο | | | | | | |
| ΛΥΒ/ΛΥΒ | 3 | 1.9 | 3 | 1.9 | 1.00 (0.19-5.03) | 1.000 |
| ΗΥΔ/ΛΥΒ | 6 | 3.9 | 2 | 1.3 | 3.08 (0.61-15.5) | 0.152 |
| Σπάνια | 2 | 1.3 | 9 | 5.8 | 0.21 (0.45-4.99) | 0.032 |

Ομοίως, στην ομάδα ελέγχου μεταξύ πρόωρων και τελειόμηγων νεογνών του ΝΤ μελετήθηκαν οι πιθανές διαφορές της συχνότητας επίπτωσης των παραπάνω γονοτύπων μεταξύ των δύο υποομάδων του ΝΤ, όπως φαίνεται στον πίνακα 22.

Πίνακας 22: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης της συχνότητας επίπτωσης των γονοτύπων μεταξύ τελειόμηνων και πρόωρων νεογνών του NT.

| Γονότυπος | ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΑ | | ΠΡΟΩΡΑ | | OR (95% CI) | P |
|---------------|------------|------|--------|------|------------------|-------|
| | N | % | n | % | | |
| YA/YA | | | | | | |
| HYA/HYA | 6 | 6.2 | 4 | 7.1 | 0.88 (0.23-3.27) | 0.853 |
| LYA/LYA | 4 | 4.1 | 3 | 5.2 | 0.78 (0.17-3.62) | 0.754 |
| HYA/LYA | 17 | 17.7 | 12 | 21.0 | 0.81 (0.35-1.84) | 0.611 |
| YA/XA | | | | | | |
| LXA/LYA | 6 | 6.2 | 6 | 10.5 | 0.56 (0.17-1.84) | 0.341 |
| HYA/LXA | 9 | 9.3 | 3 | 5.2 | 1.86 (0.48-7.18) | 0.360 |
| XA/XA | | | | | | |
| LXA/LXA | 4 | 4.1 | 1 | 1.7 | 2.43 (0.26-22.3) | 0.417 |
| YA/O | | | | | | |
| HYA/HYD | 2 | 2.01 | 1 | 1.7 | 1.19 (0.11-13.4) | 0.887 |
| HYD/LYA | 4 | 4.1 | 3 | 5.2 | 0.78 (0.17-3.62) | 0.754 |
| LYA/LYB | 5 | 5.2 | 2 | 3.5 | 1.51 (0.20-8.05) | 0.627 |
| HYA/LYB | 15 | 15.4 | 5 | 8.7 | 1.79 (0.61-5.28) | 0.282 |
| Σπάνια | 2 | 2.01 | 2 | 3.5 | 0.58 (0.09-4.27) | 0.593 |
| XA/O | | | | | | |
| LXA/LYB | 7 | 7.2 | 4 | 7.1 | 1.04 (0.29-3.72) | 0.949 |
| HYD/LXA | 1 | 1.04 | 1 | 1.7 | 0.58 (0.39-9.61) | 0.707 |
| Σπάνια | 4 | 4.1 | 1 | 1.7 | 2.43 (0.26-22.3) | 0.417 |
| O/O | | | | | | |
| LYB/LYB | 1 | 1.04 | 2 | 3.5 | 0.29 (0.02-3.26) | 0.287 |
| Σπάνια | 5 | 5.2 | 4 | 7.1 | 0.71 (0.19-2.77) | 0.625 |

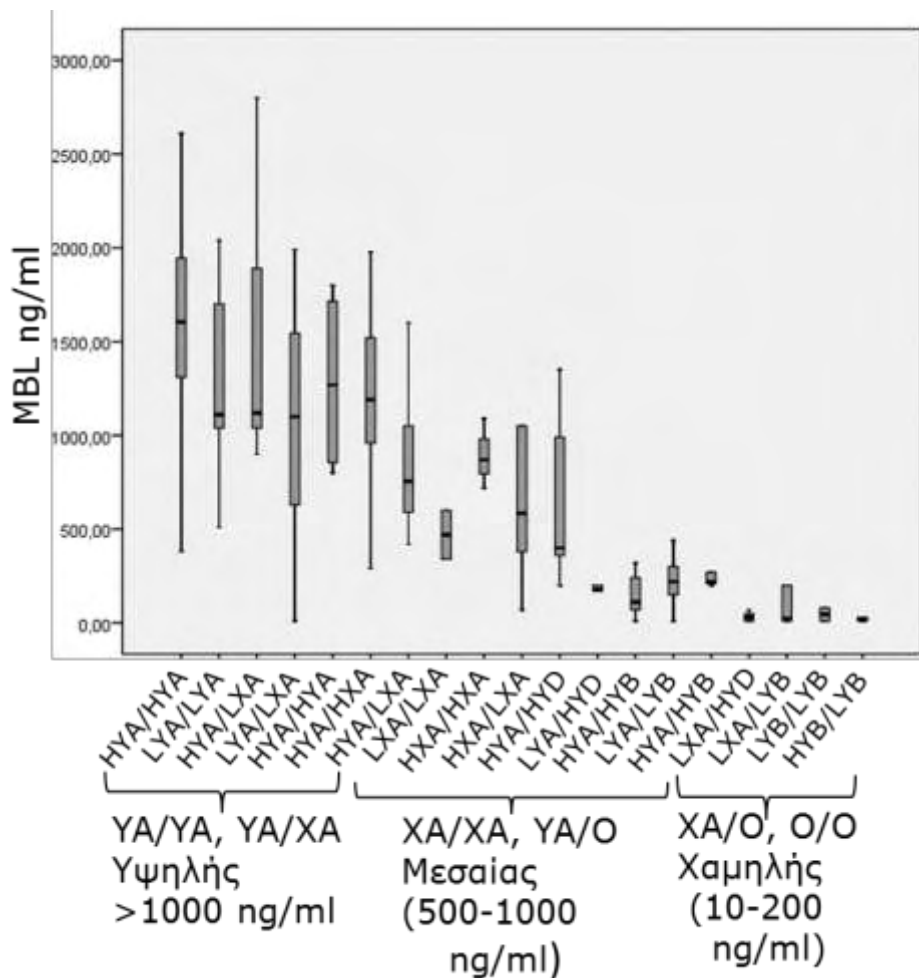
Με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής διαφοράς στη συχνότητα εμφάνισης των παραπάνω γονοτύπων μεταξύ των νεογνών του NT και των υγιών νεογνών του μαιευτηρίου, όπως και στον πληθυσμό της ομάδας ελέγχου μεταξύ τελειόμηνων και πρόωρων νεογνών, χρησιμοποιήθηκε και σ' αυτήν την περίπτωση η στατιστική επεξεργασία χ^2 . Κατά τη σύγκριση δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, εκτός από την περίπτωση σπάνιων γονοτύπων που εμφανίστηκαν συχνότερα στην ομάδα νεογνών του NT συγκριτικά με αυτών του μαιευτηρίου (5.8% έναντι 1.3%, $p=0.032$).

4.2. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

4.2.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL ΜΕ ELISA

Όπως προαναφέρθηκε, από τον ανασυνδυασμό των γενετικών παραλλαγών του πρώτου εξονίου με τον πολυμορφισμό -221G>C (αλληλία, X και Y) προκύπτουν 6 γονότυποι, οι οποίοι συγκροτούν 3 βασικές κατηγορίες γονοτύπων που σχετίζονται με υψηλή, μεσαία και πολύ χαμηλή συγκέντρωση της MBL. Η τρίτη κατηγορία, που αποτελείται από τους γονότυπους XA/O και O/O, ορίζει γονοτυπικά την MBL ανεπάρκεια. Ένα από τα βασικά ερωτήματα που εξετάστηκαν σε πρώτη φάση στην παρούσα μελέτη ήταν, εάν η συγκέντρωση της κυκλοφορούσας πρωτεΐνης MBL καθορίζεται από τον γονότυπο του κάθε νεογνού, που προκύπτει από τις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *MBL2*. Όπως διακρίνεται στο παρακάτω διάγραμμα πλαισίου, διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ γονοτύπων και επιπέδων συγκέντρωσης της MBL, στο σύνολο των 306 νεογνών. Τα επίπεδα της MBL σε νεογνά που έφεραν τους γονότυπους YA/YA και YA/XA (υψηλής συγκέντρωσης) ανευρίσκονταν σε τιμές άνω των 1000 ng/ml, όταν αυτά που έφεραν τους XA/XA, YA/O (μεσαίας) είχαν τιμές κάτω των 1000 ng/ml, ενώ τα νεογνά με γονοτυπική MBL ανεπάρκεια (XA/O, O/O) παρουσίασαν συγκεντρώσεις MBL σε επίπεδα ανεπάρκειας, σχεδόν μη ανιχνεύσιμα (**Εικόνα 14**).

Με έλεγχο Mann-Whitney, παρατηρήθηκε ότι τα νεογνά του μαιευτηρίου εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL συγκριτικά με αυτών του NT στο σύνολο, ανεξαρτήτως γονοτύπου. Πιο συγκεκριμένα, η μέση τιμή των φυσιολογικών νεογνών ήταν στα 922 ng/ml [διάμεσος 870 ng/ml, εύρος:10-4110], υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των νεογνών του NT όπου ανέρχονταν στα 772 ng/ml [διάμεσος 590 ng/ml, εύρος:10-3000], με στάθμη σημαντικότητας, $p=0.048$. Το παραπάνω εύρημα ίσως αποδίδεται κυρίως στο γεγονός ότι η ομάδα των νεογνών του NT περιλαμβάνει και πρόωρα νεογνά, τα οποία παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα λειτουργικής πρωτεΐνης MBL ανεξάρτητα του γονοτύπου που φέρουν.



Εικόνα 14: Διάγραμμα πλαισίου όπου διακρίνονται οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης MBL σε 306 νεογνά του μαιευτηρίου και του NT, με βάση των γονότυπο που φέρουν.

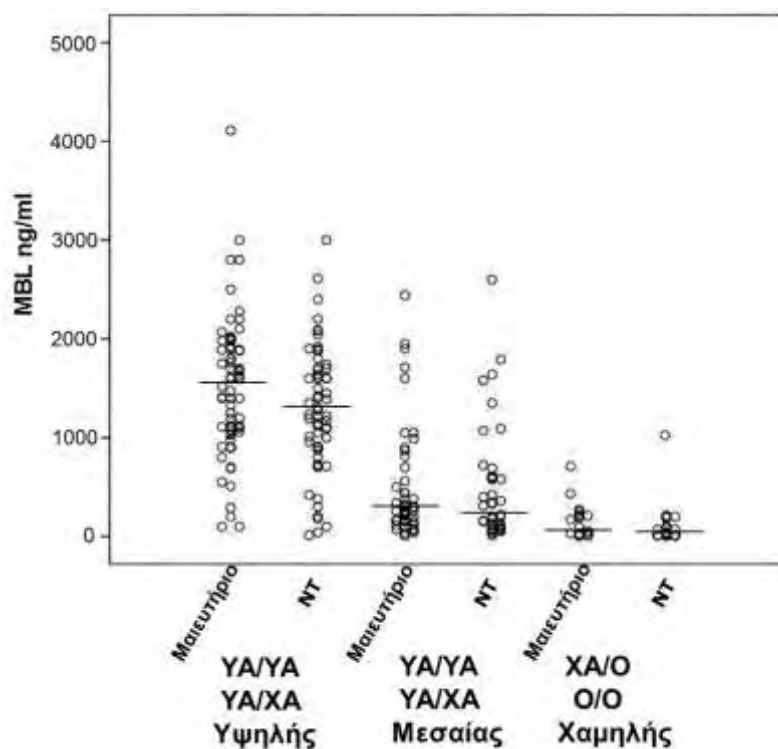
Επιπρόσθετα, η διαφορά ήταν πιο αισθητή κατά τον έλεγχο της ίδιας παραμέτρου μεταξύ πρόωρων νεογνών του NT και νεογνών του μαιευτηρίου, όπου η μέση τιμή της συγκέντρωσης της MBL στα πρόωρα νεογνά, ανέρχονταν στα 667 ng/ml [διάμεσος 320 ng/ml, εύρος: 10-2200] αισθητά χαμηλότερη από τα νεογνά του μαιευτηρίου, όπου η μέση τιμή ανέρχονταν στα 922 ng/ml [διάμεσος 870 ng/ml, εύρος: 10-4110], με στάθμη σημαντικότητας, $p=0.032$. Παρόλα αυτά, συγκρίνοντας τα επίπεδα συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL μεταξύ πρόωρων νεογνών του NT και τελειόμηνων νεογνών, συμπεριλαμβανομένων αυτών του NT και του μαιευτηρίου, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά [διάμεσος, εύρος: 320, 10-2200 ng/mL έναντι 710 ng/mL, 10-4110, $p=0.067$).

Σε δεύτερη φάση, για να διερευνηθεί περαιτέρω αν ο γονότυπος *MBL2* είναι αντιπροσωπευτικός της συγκέντρωσης MBL, μελετήθηκε εάν προκύπτουν στατιστικά

σημαντικές διαφορές στα επίπεδα τιμών της MBL μεταξύ νεογνών του NT(ομάδα ελέγχου) και μαιευτηρίου (ομάδα φυσιολογικών μαρτύρων) που φέρουν τον ίδιο γονότυπο ή κατηγορία γονοτύπων. Στον πίνακα 23 διακρίνεται η κατανομή των νεογνών στις δύο βασικές ομάδες με βάση τον γονότυπο τους, που προκύπτει από τον ανασυνδυασμό των γενετικών παραλλαγών που προαναφέραμε, καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις της MBL που ανιχνεύτηκαν σε ομάδα νεογνών που φέρει τον ίδιο γονότυπο. Επιπρόσθετα, αναφέρονται και οι 3 βασικές κατηγορίες γονοτύπων που σχετίζονται με υψηλή, μεσαία και πολύ χαμηλή συγκέντρωση MBL. Τα αποτελέσματα φαίνονται και σε διάγραμμα διασποράς στην εικόνα 15.

Πίνακας 23: Επίπτωση γονοτύπων του γονιδίου MBL2 και αποτελέσματα σύγκρισης των αντίστοιχων επιπέδων συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL, μεταξύ των νεογνών του μαιευτηρίου και των νεογνών του NT, που φέρουν τον ίδιο γονότυπο.

| Γονότυπος | ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟ | | NT | | P |
|-------------------------|------------|---------------------------------|----|---------------------------------|-------|
| | N | Διάμεσος ng/ml (εύρος τιμών) | N | Διάμεσος ng/ml (εύρος τιμών) | |
| YA/YA | 48 | 1680 (100-4110) | 46 | 1405 (100-3000) | 0.155 |
| YA/XA | 27 | 1200 (200-1990) | 25 | 1100 (10-2080) | 0.404 |
| XA/XA | 6 | 885 (700-1600) | 9 | 600 (340-1790) | 0.077 |
| YA/O | 45 | 250 (10-2440) | 41 | 160 (10-2600) | 0.161 |
| XA/O | 16 | 100 (10-430) | 18 | 30 (10-1000) | 0.085 |
| O/O | 11 | 10 (10-190) | 14 | 10 (10-200) | 0.830 |
| MBL κατηγορίες έκφρασης | | | | | |
| ΥΨΗΛΗΣ | | | | | |
| YA/YA, YA/XA | 75 | 1560 (100-4110) | 71 | 1280 (10-3000) | 0.105 |
| ΜΕΣΑΙΑΣ | | | | | |
| XA/XA, YA/O | 51 | 260 (10-2440) | 50 | 220 (10-2600) | 0.418 |
| ΧΑΜΗΛΗΣ | | | | | |
| XA/O, O/O | 27 | 30 (10-430) | 32 | 10 (10-1000) | 0.174 |



Εικόνα 15 : Διάγραμμα διασποράς όπου διακρίνονται οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης MBL σε νεογνά του μαιευτηρίου και του NT, σύμφωνα με τις κατηγορίες υψηλής, μεσαίας και χαμηλής έκφρασης γονοτύπων. Διακρίνονται οι διάμεσοι ($p < 0,001$ μεταξύ των κατηγοριών).

Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, αν και τα νεογνά του μαιευτηρίου παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με αυτά του NT με τον ίδιο γονότυπο, ωστόσο στατιστικά η διαφορά δεν ήταν σημαντική σε όλες τις συγκρίσεις. Ομοίως, συγκρίνοντας τις διαφορές των επιπέδων συγκέντρωσης μεταξύ των δύο ομάδων που φέρουν τις ίδιες κατηγορίες γονοτύπων (υψηλής, μεσαίας και χαμηλής) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

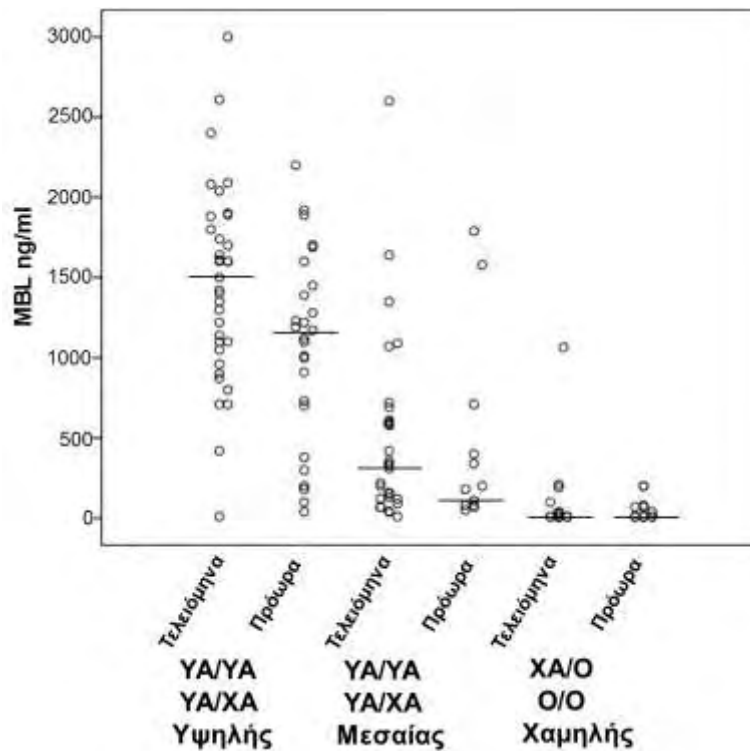
Να σημειωθεί όμως, ότι αναλύοντας τη διαφορά στη συγκέντρωση της MBL μεταξύ των τριών κατηγοριών γονοτύπων έκφρασης (υψηλής, μεσαίας και χαμηλής) σε κάθε ομάδα νεογνών, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις συγκρίσεις ($p < 0.001$). Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, τόσο στην ομάδα νεογνών του NT όσο και σ' αυτήν του μαιευτηρίου, οι τιμές της MBL στα νεογνά που έφεραν τους γονότυπους YA/YA και YA/XA (υψηλής συγκέντρωσης), ανευρίσκονταν σε επίπεδα άνω των 1000 ng/ml, όταν σ' αυτά που έφεραν τους XA/XA, YA/O (μεσαίας) σε επίπεδα κάτω των 1000 ng/ml, ενώ στα νεογνά με γονοτυπική MBL ανεπάρκεια (XA/O, O/O) η συγκέντρωση της MBL, ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη. Η συγκεκριμένη παρατήρηση ενισχύει την άποψη, ότι

ο γονότυπος μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικός των επιπέδων συγκέντρωσης της MBL και θα συζητηθεί παρακάτω.

Στο ίδιο πλαίσιο μελετήθηκαν οι διαφορές σε επίπεδο συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL μεταξύ των δύο υποομάδων του NT (πρόωρα και τελειόμηνα) που έφεραν τον ίδιο γονότυπο. Στον πίνακα 24 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν με βάση τον γονότυπο, στις δύο υποομάδες νεογνών καθώς και τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας, έτσι ώστε να ελεγχθεί η διαφορά της συνεχούς μεταβλητής (συγκέντρωσης) στις επιμέρους υποομάδες.

Πίνακας 24: Επίπτωση γονοτύπων του γονιδίου MBL2 και αποτελέσματα σύγκρισης των αντίστοιχων επιπέδων συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL, μεταξύ των δύο υποομάδων νεογνών του NT, τελειόμηνων και πρόωρων, που φέρουν τον ίδιο γονότυπο.

| Γονότυπος | ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΑ | | ΠΡΟΩΡΑ | | P |
|-------------------------|------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------------|
| | N | Διάμεσος ng/ml (εύρος τιμών) | N | Διάμεσος ng/ml (εύρος τιμών) | |
| YA/YA | 27 | 1610 (420-3000) | 19 | 1180 (100-2200) | 0.025 |
| YA/XA | 16 | 1200 (10-2080) | 9 | 1055 (40-1690) | 0.260 |
| XA/XA | 7 | 600 (420-1090) | 2 | 1065 (340-1790) | 1.000 |
| YA/O | 28 | 160 (10-2600) | 13 | 145 (50-1580) | 0.777 |
| XA/O | 12 | 30 (10-1000) | 6 | 55 (10-200) | 0.642 |
| O/O | 6 | 10 (10-190) | 8 | 10 (10-200) | 0.843 |
| MBL κατηγορίες έκφρασης | | | | | |
| ΥΨΗΛΗΣ | | | | | |
| YA/YA, YA/XA | 43 | 1500 (10-3000) | 28 | 1145 (40-2200) | 0.028 |
| ΜΕΣΑΙΑΣ | | | | | |
| XA/XA, YA/O | 35 | 265 (10-2600) | 15 | 190 (50-1790) | 0.642 |
| ΧΑΜΗΛΗΣ | | | | | |
| XA/O, O/O | 18 | 10 (10-1000) | 14 | 10 (10-200) | 0.843 |



Εικόνα 16: Διάγραμμα διασποράς όπου διακρίνονται οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης MBL στις δύο υποομάδες νεογνών, τελειόμηνων και πρόωρων αντίστοιχα, σύμφωνα με τις κατηγορίες υψηλής, μεσαίας και χαμηλής έκφρασης γονοτύπων. Διακρίνονται οι διάμεσοι ($p < 0,001$ μεταξύ των κατηγοριών).

Αν και τα επίπεδα συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL στα πρόωρα νεογνά του NT ήταν χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά των τελειόμηνων του NT, που έφεραν τους ίδιους γονότυπους, ωστόσο μόνο στην περίπτωση νεογνών που έφεραν τον γονότυπο YA/YA, η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.025$). Επιπρόσθετα κατά τη σύγκριση των παραπάνω επιπέδων μεταξύ των δύο υποομάδων που φέρουν τις τρεις κατηγορίες γονοτύπων έκφρασης, βρέθηκε ότι τα τελειόμηνα νεογνά του NT με γονοτύπους YA/YA και YA/XA (υψηλής συγκέντρωσης), παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα της MBL απ' ό,τι τα αντίστοιχα πρόωρα [1500 ng/ml έναντι 1145 ng/ml, αντίστοιχα ($p=0.029$)]. Και σ' αυτήν την περίπτωση, αναλύοντας τη διαφορά στη συγκέντρωση της MBL μεταξύ των τριών κατηγοριών γονοτύπων έκφρασης (υψηλής, μεσαίας και χαμηλής) σε κάθε υποομάδα νεογνών του NT, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις συγκρίσεις, όπως φαίνεται στην εικόνα 16 σε διάγραμμα διασποράς ($p < 0.001$).

Λαμβάνοντας υπόψη στην ανάλυση, τον πολυμορφισμό -550 G>C (αλληλία H και L), όπως προαναφέρθηκε, προέκυψαν 34 ξεχωριστοί γονότυποι στο σύνολο όλων των νεογνών. Κατά τον ίδιο τρόπο με την προηγούμενη ανάλυση μελετήθηκε η διαφορά των επιπέδων συγκέντρωσης της MBL μεταξύ νεογνών του NT με αυτών του μαιευτηρίου

που φέρουν τον ίδιο γονότυπο. Στον πίνακα 25 κατανέμονται τα νεογνά του NT και μαιευτηρίου ανάλογα με τους γονότυπους που φέρουν, όπου διακρίνονται οι διαφορές των συγκεντρώσεων, με τις αντίστοιχες στάθμες σημαντικότητας μεταξύ των ομάδων. Περαιτέρω διερεύνηση έγινε και στα νεογνά του NT μεταξύ τελειόμηνων και πρόωρων, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 26. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η σύγκριση διεξήχθη μόνο στην περίπτωση νεογνών με κοινούς γονότυπους στις δυο υποομάδες.

Πίνακας 25: Επίπτωση γονοτύπων του γονιδίου *MBL2* και αποτελέσματα σύγκρισης των αντίστοιχων επιπέδων συγκέντρωσης της πρωτεΐνης *MBL*, μεταξύ των νεογνών του μαιευτηρίου και των νεογνών του NT, που φέρουν τον ίδιο γονότυπο.

| Γονότυπος | ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟ | | NT | | P |
|-----------|------------|---------------------------------|-----------|---------------------------------|--------------|
| | N(%) | Διάμεσος ng/ml (εύρος τιμών) | N(%) | Διάμεσος ng/ml (εύρος τιμών) | |
| HYA/HYA | 12 (7.8) | 1835 (100-3000) | 10 (6.5) | 1450 (380-2610) | 0.119 |
| LYA/LYA | 6 (3.9) | 1085 (510-2020) | 7 (4.5) | 1700 (1000-2400) | 0.439 |
| HYA/LYA | 30 (19.6) | 1700 (10-4110) | 29 (18.9) | 1390 (100-3000) | 0.171 |
| LXA/LYA | 9 (5.8) | 1200 (20-1990) | 12 (7.8) | 920 (10-1690) | 0.191 |
| LXA/LXA | 5 (3.2) | 900 (700-1600) | 5 (3.2) | 590 (420-1790) | 0.117 |
| HXA/HYA | 3 (1.9) | 1630 (910-1800) | 1 (0.6) | 800 (800-800) | 0.180 |
| HYA/LXA | 15 (9.8) | 1190 (290-1980) | 12 (7.8) | 1280 (870-2080) | 0.586 |
| HYA/HYD | 4 (2.6) | 805 (380-2440) | 3 (1.9) | 340 (70-610) | 0.355 |
| HYD/LYA | 4 (2.6) | 440 (240-990) | 7 (4.5) | 555 (200-1350) | 0.670 |
| HYD/LXA | 7 (4.5) | 220 (180-430) | 2 (1.3) | 205 (200-210) | 0.186 |
| HYA/HYB | 2 (1.3) | 115 (60-170) | 4 (2.6) | 200 (180-330) | 0.083 |
| LYA/LYB | 9 (5.8) | 110 (10-1710) | 7 (4.5) | 100 (10-1640) | 0.953 |
| HYA/LYB | 26 (16.9) | 255 (10-2200) | 20 (13.0) | 125 (40-2600) | 0.030 |
| LXA/LYB | 8 (5.2) | 30 (10-200) | 11 (7.1) | 30 (10-1600) | 0.546 |
| LYB/LYB | 3 (1.9) | 10 (10-190) | 3 (1.9) | 10 (10-200) | 0.796 |
| HYD/LYB | 6 (3.9) | 10 (10-10) | 2 (1.3) | 10 (10-10) | 1.000 |

Πίνακας 26: Επίπτωση γονοτύπων του γονιδίου MBL2 και αποτελέσματα σύγκρισης των αντίστοιχων επιπέδων συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL, μεταξύ των δύο υποομάδων νεογνών του NT, τελειόμηνων και πρόωρων, που φέρουν τον ίδιο γονότυπο.

| Γονότυπος | ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΑ | | ΠΡΩΩΡΑ | | P |
|-----------|------------|---------------------------------|-----------|---------------------------------|--------------|
| | N (%) | Διάμεσος ng/ml (εύρος τιμών) | N (%) | Διάμεσος ng/ml (εύρος τιμών) | |
| HYA/HYA | 6 (6.2) | 1600 (1400-2610) | 4 (7.1) | 1170 (380-1450) | 0.027 |
| LYA/LYA | 4 (4.1) | 2040 (2000-2100) | 3 (5.2) | 1350 (1000-1700) | 0.221 |
| HYA/LYA | 17 (17.7) | 1610 (420-3000) | 12 (21.0) | 1180 (10-2200) | 0.180 |
| LXA/LYA | 6 (6.2) | 1020 (10-1420) | 6 (10.5) | 915 (40-1690) | 1.000 |
| LXA/LXA | 4 (4.1) | 585 (420-690) | 1 (1.7) | 1790 (1790-1790) | 0.157 |
| HYA/LXA | 9 (9.3) | 1350 (1350-2080) | 3 (5.2) | 1145 (1010-1280) | 0.480 |
| HXA/HXA | 1 (1.04) | 600 (600-600) | 1 (1.7) | 340 (340-340) | 0.317 |
| HYD/LYA | 4 (4.1) | 1070 (360-1350) | 3 (5.2) | 400 (200-710) | 0.275 |
| HYD/LXA | 1 (1.04) | 210 (210-210) | 1 (1.7) | 200 (200-200) | 0.317 |
| HYA/HYB | 2 (2.01) | 265 (200-330) | 1 (1.7) | 180 (180-180) | 0.221 |
| LYA/LYB | 5 (5.2) | 80 (10-1640) | 2 (3.5) | 845 (110-1580) | 0.235 |
| HYA/LYB | 15 (15.4) | 155 (40-2600) | 5 (8.7) | 75 (50-80) | 0.112 |
| LXA/LYB | 7 (7.2) | 10 (10-1000) | 4 (7.1) | 55 (10-70) | 0.232 |
| LYB/LYB | 1 (1.04) | 10 (10-10) | 2 (3.5) | 105 (10-200) | 0.480 |
| HYD/LYD | 1 (1.04) | 10 (10-10) | 1 (1.7) | 10 (10-10) | 1.000 |

Αναλυτικά διαπιστώθηκε ότι τα φυσιολογικά νεογνά του μαιευτηρίου, που έφεραν το γονότυπο HYA/LYB, παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα της MBL στο σύνολο τους απ' ό,τι τα νεογνά του NT με το ίδιο γενετικό προφίλ ($p=0.03$). Στα υπόλοιπα νεογνά, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα συγκέντρωσης MBL μεταξύ των δύο βασικών ομάδων με κοινό γονότυπο.

Τέλος, όσον αφορά τις δυο υποομάδες του NT, διαπιστώθηκε διαφορά στην συγκέντρωση μόνο μεταξύ νεογνών που έφεραν τον γονότυπο HYA/HYA, όπου τα τελειόμηνα νεογνά που έφεραν τον εν λόγω γονότυπο παρουσίασαν εμφανώς, υψηλότερα επίπεδα MBL σε σχέση με τα πρόωρα του ίδιο γενετικού προφίλ στο σύνολο (διάμεσος 1600 ng/ml έναντι 1170 ng/ml, $p=0.027$).

4.3. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αφού δόθηκαν οι απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα, διερευνήθηκε εάν η MBL ανεπάρκεια γονοτυπικά και ορολογικά οριζόμενη, σχετίζεται με την επίπτωση περιγεννητικών λοιμώξεων ή με άλλους παράγοντες νεογνικής νοσηρότητας. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία της διωνυμικής συσχέτισης κατά Spearman αλλά και η πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα 27.

Πίνακας 27: Συσχετίσεις ανάμεσα στις μεταβλητές, *p*

| | MBL2 γονότυπος XA/O, O/O | Λοιμώ- ξεις | Τρόπος τοκετού | Περιγε- ννητικό stress | Ίκτερος | Σπασμοί | ΣΑΔ | Πρωωρό- τητα |
|--|--------------------------------|------------------|-------------------|------------------------------|------------------|--------------|------------------|-----------------|
| Λοιμώξεις | 0.534 | - | 0.317 | 0.634 | 0.158 | 0.083 | 0.001 | 0.093 |
| Διαπιστωμένη σήψη σε καλλιέργεια | 0.816 | - | 0.043 | 0.365 | 0.026 | 0.617 | 0.005 | 0.006 |
| MBL2 γονότυπος XA/O, O/O | - | 0.534 | 0.055 | 0.840 | 0.174 | 0.380 | 0.055 | 0.337 |
| MBL ≤150 ng/ml | <0.001 | 0.913 | 0.121 | 0.760 | 0.015 | 0.786 | 0.001 | 0.130 |
| MBL ≤700 ng/ml | <0.001 | 0.875 | 0.053 | 0.371 | 0.173 | 0.022 | 0.007 | 0.657 |
| Είδος νοσηλείας NT/ ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟ | 0.470 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.003 | <0.001 | 0.001 |
| Ιστορικό μητέρας | 0.225 | 0.004 | 0.020 | 0.553 | 0.016 | 0.303 | 0.001 | 0.001 |

Αναφορικά με τα επίπεδα συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης MBL, κάτω από τα οποία θεωρούνται τα άτομα MBL ανεπαρκή, δεν υπάρχει ομοφωνία στις διάφορες μελέτες, ενός συγκεκριμένου επιπέδου τιμών [30, 193, 195]. Παρόλα αυτά στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ανεπαρκή, τα νεογνά που έφεραν συγκεντρώσεις MBL κάτω από δυο επίπεδα τιμών, 150 και 700 ng/ml, αντίστοιχα, και κατ'επέκταση δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστές μεταβλητές κατηγορίας. Αναφορικά με τα παραπάνω επίπεδα τιμών αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά στα νεογνά, θετική συσχέτιση μεταξύ της λειτουργικής MBL ανεπάρκειας και επίπτωσης ΣΑΔ ($p=0.001$, $r=0.189$ και $p=0.007$, $r=0.159$, αντίστοιχα). Πιο αναλυτικά, τα νεογνά που παρουσίασαν επίπεδα συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης MBL χαμηλότερα από 150 ng/ml εμφάνισαν 2.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εκδηλώσουν ΣΑΔ σε σχέση με τα νεογνά που εμφάνισαν επίπεδα υψηλότερα του συγκεκριμένου επιπέδου τιμών (OR: 2.46, 95%CI: 1.40-4.33, $p=0.001$). Παρόμοια, τα νεογνά που εμφάνισαν επίπεδα συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL χαμηλότερα από 700 ng/ml, είχαν δύο φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας (OR: 2.04, 95%CI: 1.20-3.45, $p=0.007$). Επιπρόσθετα, αναδείχθηκε συσχέτιση μεταξύ των νεογνών που έφεραν τους γονότυπους XA/O και O/O, χαρακτηριστικών της MBL ανεπάρκειας και εμφάνισης ΣΑΔ ($r=0.109$, $p=0.055$) με περίπου δύο φορές αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης στα εν λόγω νεογνά, ωστόσο η διαφορά, οριακά δεν ήταν στατιστική σημαντική (OR: 1.77, 95%CI: 0.98-3.18). Κατά τη στατιστική επεξεργασία με πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση, διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μόνο στην περίπτωση νεογνών που παρουσίασαν επίπεδα της

συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL χαμηλότερα από 150 ng/ml και ανάπτυξης ΣΑΔ (OR: 2.31, 95%CI: 1.10-4.83, $p=0.025$). Επομένως, στα νεογνά του NT, η ανεπάρκεια της MBL αποτέλεσε ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη του συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, οι μεταβλητές που συσχετιζόνταν με το ΣΑΔ ανεξάρτητα με τις τιμές της MBL ήταν η προωρότητα (OR: 10.21, 95%CI: 4.46-23.36, $p<0.001$), οι σπασμοί (OR: 21.89, 95%CI: 1.80-266.15, $p=0.015$) και το περιγεννητικό stress (OR: 7.08, 95%CI: 2.26-22.17, $p=0.001$).

Από την άλλη πλευρά, δεν προέκυψε συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια με την εμφάνιση λοιμώξεων, αλλά ούτε και με σήψη διαπιστωμένη σε καλλιέργεια ή μη. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στην περίπτωση συσχέτισης μεταξύ των νεογνών που ορολογικά παρουσίαζαν συγκεντρώσεις MBL σε επίπεδα ανεπάρκειας (≤ 170 ng/ml ή ≤ 700 ng/ml) και λοιμώξεων ή σήψης ($p>0,05$).

Τέλος ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε η θετική συσχέτιση μεταξύ νεογνών που γεννήθηκαν με καισαρική τομή και γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια, αν και το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ήταν στα όρια στατιστικής σημαντικότητας (OR: 1.75, 95%CI: 0.98-3.10, $p=0.055$).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια εντείνεται το ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό του ρόλου της πρωτεΐνης MBL στην ανθρώπινη υγεία και στην ανάπτυξη λοιμώξεων. Αν και πλήθος μελετών σε ενήλικες, δείχνουν ότι η MBL ανεπάρκεια φαίνεται να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης σε διάφορα νοσήματα, ωστόσο η επίδρασή της στους ασθενείς δεν είναι μέχρι σήμερα αποσαφηνισμένη λόγω των αντικρουόμενων ευρημάτων. Παρόλα αυτά, πιστεύεται ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *MBL2* αποτελούν έναν αξιόπιστο δείκτη ευπάθειας στις λοιμώξεις στην περίπτωση συνυπάρχουσας ανοσιακής βλάβης ή σε άτομα που υφίστανται ανοσοκαταστολή έπειτα από χημειοθεραπεία ή μεταμόσχευση. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη MBL συμμετέχει ενεργά στην άμυνα του οργανισμού κατά την νεογνική ηλικία, λιγοστές είναι οι μελέτες, αναφορικά με τη σημασία των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *MBL2* που την κωδικοποιεί στην ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων και περιγεννητικής νοσηρότητας. Η παρουσία των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *MBL2*, σε συνάρτηση με τη χαμηλή της συγκέντρωση στον ορό και τον πιθανώς αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης σε διάφορα νοσήματα από τη νεογνική ηλικία, την καθιστά σημαντική τόσο για την πρόληψη όσο και για τον σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Με βάση τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε με σκοπό να αναδείξει την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της MBL ανεπάρκειας, γενετικά και ορολογικά οριζόμενης, με την επίπτωση νεογνικής νοσηρότητας.

Στην παρούσα μελέτη, αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά σε νεογνά, θετική συσχέτιση μεταξύ της λειτουργικής MBL ανεπάρκειας και εμφάνισης συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας, γεγονός που αποτέλεσε το πιο ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας διατριβής. Τα αποτελέσματά μας συνέβαλαν περαιτέρω στην ενίσχυση της άποψης ότι θα πρέπει να θεωρούνται MBL ανεπαρκή, τα νεογνά που φέρουν τιμές κάτω από τα 150 ng/ml. Οι Frakking και συν., μελετώντας υγιή παιδιά και ενήλικες πρότειναν ως κατώτερη τιμή MBL επάρκειας, αυτή των 200 ng/ml [200]. Ωστόσο, οι ίδιοι ερευνητές σε προηγούμενες μελέτες, είχαν ορίσει ως επίπεδο τιμών ανεπάρκειας της πρωτεΐνης MBL την τιμή 700 ng/ml [30, 201]. Λαμβάνοντας υπόψη, ότι τα επίπεδα της MBL στα νεογνά είναι χαμηλότερα συγκριτικά με ενήλικες και εξαρτώνται επιπρόσθετα από την εβδομάδα κύησης, στην παρούσα μελέτη θεωρήσαμε MBL ανεπαρκή, τα νεογνά που έφεραν συγκεντρώσεις κάτω από δυο επίπεδα τιμών, στα 150 και 700 ng/ml, αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώσαμε ότι τα πρόωρα νεογνά εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης MBL συγκριτικά με τα αντίστοιχα τελειόμηνα, σε όλες τις κατηγορίες

γονοτύπων έκφρασης, αποτέλεσμα που ενισχύει την άποψη ότι η προωρότητα σχετίζεται με χαμηλή συγκέντρωση MBL, όπως έχει ειδη περιγραφεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες [193, 196, 201]. Ωστόσο, αποκαλύφθηκε σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ότι μόνο τα νεογνά που παρουσίασαν επίπεδα συγκέντρωσης MBL χαμηλότερα των 150 ng/ml, είχαν αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας στο NT. Επομένως, με βάση την παραπάνω παρατήρηση, ενισχύουμε την άποψη ότι η συγκεκριμένη τιμή μπορεί να θεωρηθεί κλινικά πολύ σημαντική στα νεογνά, όπου μια απλή μέτρηση των επιπέδων της πρωτεΐνης MBL, ίσως μπορεί να συμβάλει στην κατάδειξη νεογνών με αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης ΣΑΔ.

Είναι γνωστό ότι σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη Συνδρόμου Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ΣΑΔ) στα νεογνά, παίζει η αλλοιωμένη βιοχημική σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant) των πνευμόνων ο οποίος αποτελείται από ένα πολύπλοκο μείγμα λιπιδίων και ειδικών πρωτεϊνών που καλύπτει την κυψελιδική επιφάνεια των πνευμόνων [202, 203]. Θεραπεία με χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε νεογνά με ΣΑΔ [203]. Αν και δεν έχουν περιγραφεί μελέτες, οι οποίες συνέδεσαν την MBL ανεπάρκεια με το νεογνικό σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, ωστόσο πρόσφατη μελέτη έχει αναδείξει θετική συσχέτιση μεταξύ ενηλικών με οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (acute respiratory distress syndrome, ARDS) και MBL ανεπάρκειας [204]. Πιο ειδικά οι Gong και συν., παρατήρησαν ότι ομοζυγωτία στον πολυμορφισμό του κωδικίου 54 (B/B), σχετίζεται με ARDS, ανεξαρτήτως παρουσίας βακτηριακής λοίμωξης ή σηπτικού σοκ [204]. Η παραπάνω μελέτη βρίσκεται σε συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα, όπου διαπιστώσαμε ότι νεογνά με MBL λειτουργική ανεπάρκεια παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης ΣΑΔ, χωρίς απαραίτητα τη συνύπαρξη νεογνικής λοίμωξης. Ο μηχανισμός κατά των οποίου η πρωτεΐνη MBL συμμετέχει στο αμυντικό σύστημα των πνευμόνων για την καίρια αντιμετώπιση των διαφόρων βλαπτικών παραγόντων δεν είναι γνωστός. Παρόλα αυτά, διάφορες ερμηνείες μπορούν να δοθούν, αναφορικά με τον ρόλο της στο ανοσιακό σύστημα του πνεύμονα, που αφορούν κυρίως αντιφλεγμονώδεις διαδικασίες [187, 205]. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της πρωτεΐνης MBL έχουν αποκαλυφθεί, βάση κάποιων παρατηρήσεων, όπου ανεπάρκεια της έχει συσχετισθεί με την πρόοδο αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα [180].

Εστιάζοντας, ειδικότερα στην ανάπτυξη ΣΑΔ, κάποιοι επιπρόσθετοι μηχανισμοί θα πρέπει να ληφθούν υπόψη. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη MBL και κάποιες επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες όπως τις SP-A1, SP-A2 και SP-D, επιδεικνύουν υψηλή νουκλεοτιδική ομολογία και ανευρίσκονται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 10,

υπαινίσσοντας ότι ίσως προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο [206]. Επιπρόσθετα, παρόμοια με τις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *MBL2*, διάφορες μελέτες αποδεικνύουν ότι πολυμορφισμοί των γονιδίων *SFTPA1*, *SFTPA2* και *SFTPD* (γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες SP-A1, SP-A2 και SP-D αντίστοιχα) φαίνεται να σχετίζονται με διάφορα πνευμονικά νοσήματα όπως η φυματίωση, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας [207, 208, 209]. Επομένως, είναι πιθανό ότι η αυξημένη επίπτωση ΣΑΔ στα νεογνά με MBL ανεπάρκεια που παρατηρήσαμε, ίσως να οφείλεται στην συνύπαρξη SNPs γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα, με αυτών του γονιδίου *MBL2*, τα οποία βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους. Μια άλλη ερμηνεία, μπορεί να είναι η πιθανή άμεση επίδραση της πρωτεΐνης MBL στους πνεύμονες. Η εν λόγω υπόθεση, βασίζεται κυρίως στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη MBL μοιράζεται όμοιους υποδοχείς με τις SP-A1, SP-A2 και SP-D, όπως η καλρεκτικουλίνη, το C1qRr, ο υποδοχέας του SP-A και το CD91, καθώς και κοινές λειτουργίες [210, 211, 212]. Σε αυτό το πλαίσιο, είναι αξιοσημείωτο ότι η πρόσληψη κεκαθαρμένης πρωτεΐνης MBL πριν από δέκα χρόνια σε ασθενή με κυστική ίνωση, MBL ανεπάρκεια και βρογχοπνευμονική λοίμωξη, είχε ως αποτέλεσμα την θεαματική βελτίωση της λειτουργίας των πνευμόνων αλλά και σταθεροποίησης της κλινικής εικόνας του ασθενή [205]. Παρά ταύτα, ο ρόλος της πρωτεΐνης MBL στην λειτουργία και ομοιοστάση του πνεύμονα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

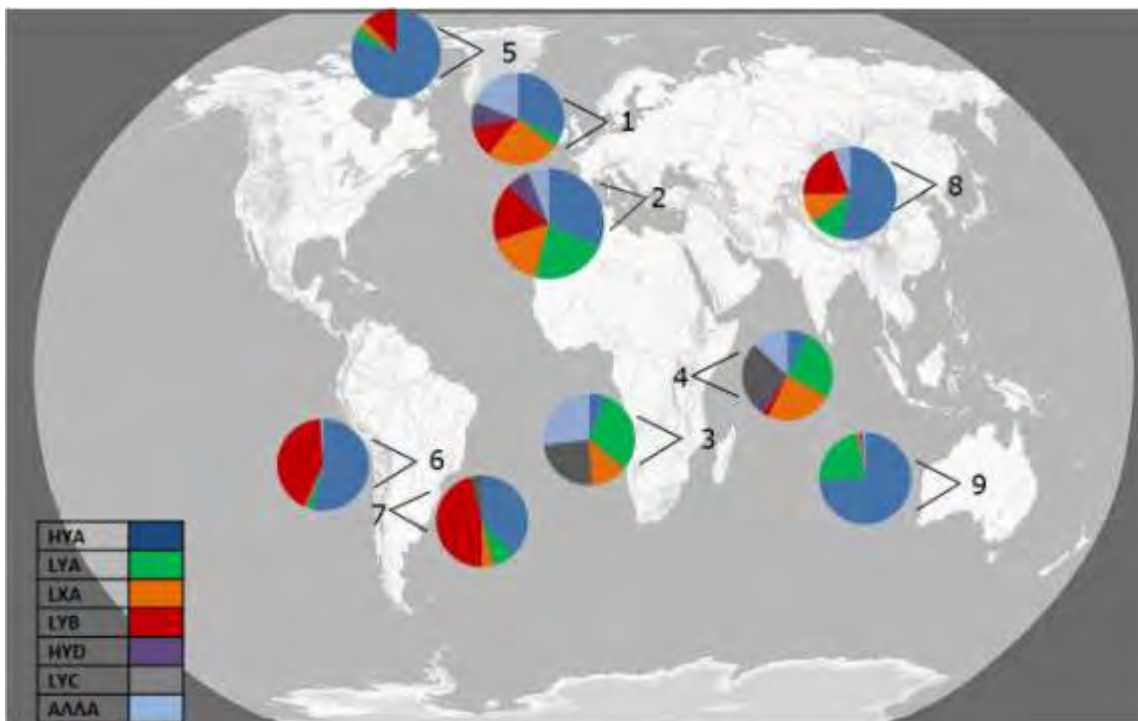
Αναφορικά με το ερώτημα που τέθηκε, εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της MBL ανεπάρκειας (λειτουργικής και γονοτυπικής) και επίπτωσης περιγεννητικών λοιμώξεων, δεν διαπιστώσαμε τέτοιου είδους συσχέτιση. Παρόμοια αποτελέσματα με τα δικά μας αναφέρονται από δυο μελέτες. Ωστόσο κρίνεται δύσκολο να συγκριθούν με τη δική μας, λόγω του ότι, δεν όρισαν γονοτυπικά την MBL ανεπάρκεια με τους γονότυπους ΧΑ/Ο και Ο/Ο, και ακόμα δεν προσδιόρισαν τη συγκέντρωση MBL αλλά μόνο τους γονότυπους *MBL2* [192, 196]. Τρεις μελέτες είναι αντίθετες με τα δικά μας ευρήματα, καθώς διαπιστώνουν ότι η MBL ανεπάρκεια, φαίνεται να σχετίζεται με την επίπτωση περιγεννητικών λοιμώξεων αλλά και νεογνικής πρώιμης σήψης [30, 193, 195]. Ωστόσο θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η σύγκριση της παρούσας μελέτης με τις παραπάνω, περιορίζεται και σε αυτήν την περίπτωση λόγω της έλλειψης ενός κοινού ορισμού της MBL ανεπάρκειας (λειτουργικής και γονοτυπικής) αλλά και των διαφορών που προκύπτουν μεταξύ των μελετών, αναφορικά με το ποσοστό νεογνών που εμφάνισαν λοιμώξεις. Αναλυτικότερα, στη μελέτη των de Benedetti και συν., θεωρήθηκαν MBL ανεπαρκή τα νεογνά, αποκλειστικά βάση των ορολογικών ευρημάτων, χωρίς όμως τον

καθορισμό ενός συγκεκριμένου επιπέδου τιμών ανεπάρκειας και χωρίς να έχει γίνει γενετική ανάλυση του γονιδίου *MBL2* [193]. Στις άλλες δυο μελέτες τα νεογνά θεωρήθηκαν MBL ανεπαρκή όταν παρουσίασαν τιμές χαμηλότερες από τα 700 και 150 ng/ml αλλά και τους γονότυπους ΧΑ/Ο και Ο/Ο σε συμφωνία με τους δικούς μας ορισμούς της MBL ανεπάρκειας. Ωστόσο διέφεραν από τη δική μας μελέτη, λόγω του ότι το ποσοστό των νεογνών που εμφάνισε λοιμώξεις στις δυο παραπάνω μελέτες ήταν σημαντικά υψηλότερο, συγκριτικά με τη δική μας [30, 195]. Είναι επομένως απαραίτητο να τονιστεί ότι στην δική μας μελέτη το χαμηλό ποσοστό νεογνών που εμφάνισαν λοιμώξεις, ενδέχεται να αποτέλεσε παράγοντα επηρεασμού των τελικών αποτελεσμάτων μας και δεν επέτρεψε να επιβεβαιωθεί με ισχυρή στατιστικά σημαντικότητα η διαφαινόμενη σημασία της MBL ανεπάρκειας στην ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων.

Ένα από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ήταν η θετική συσχέτιση μεταξύ νεογνών, των οποίων οι μητέρες υποβλήθηκαν σε καισαρική τομή, με τους γονότυπους που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια, αν και η παραπάνω συσχέτιση, οριακά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα καταδεικνύει την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης, προκειμένου να αποκαλυφθεί πιθανόν συνυπάρχουσα συσχέτιση μεταξύ μητρικής και νεογνικής MBL ανεπάρκειας με την καισαρική τομή ή με άλλες επιπλοκές κατά την κύηση.

Στην παρούσα μελέτη έγινε για πρώτη φορά καταγραφή στην Ελλάδα της συχνότητας των ποικίλων αλληλίων D, B και C, όπου τη συνηθέστερη γενετική παραλλαγή αποτέλεσε η Gly54Arg (αλληλίο B), ενώ την πιο σπάνια αποτέλεσε η Gly57Glu (αλληλίο C). Οι συχνότητες που εμφανίστηκαν τα ποικίλα αλληλία του *MBL2* στην παρούσα μελέτη φαίνεται να διαφέρουν σε σχέση με άλλες μελέτες σε ενήλικες Ευρωπαϊκής προέλευσης [92, 97]. Αντίστοιχα στα νεογνά, μόνο μια ήταν η μελέτη στην οποία αναφέρονται συχνότητες μεμονωμένων αλληλίων και διεξήχθη στην Ολλανδία [109]. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα του αλληλίου B φαίνεται να είναι υψηλότερη στον ελληνικό πληθυσμό σε σχέση με τους Ολλανδούς, ενώ στην περίπτωση του αλληλίου C είναι σημαντικά χαμηλότερη στον δικό μας πληθυσμό.

Στο ίδιο πλαίσιο προχωρήσαμε στον καθορισμό των αντίστοιχων απλοτύπων *MBL2* που προκύπτουν, όπου φάνηκε ότι οι συχνότητες των απλοτύπων διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με άλλες μελέτες σε άτομα διαφορετικής εθνικής προελεύσεως, γεγονός που αντικατοπτρίζει τις χρονολογίες εύρεσης τους, την ιστορία των μεταναστεύσεων καθώς και την επίδραση της περιβαλλοντικής πίεσης της φυσικής επιλογής, που ασκείται στο ανθρώπινο γονιδίωμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 17.



Εικόνα 17: Κατανομή των έξι πιο συχνών απλοτύπων, σε διάφορους αυτόχθονες πληθυσμούς. Τα δεδομένα, όσον αναφορά τις συχνότητες των απλοτύπων, ελήφθησαν από δημοσιευμένες μελέτες και την παρούσα μελέτη: **1.** Από την Ευρώπη, Δανία [98]: **2.** Ευρώπη, Ελλάδα [213]: **3.** Αφρική, Μοζαμβίκη [95]: **4.** Αφρική, Κένυα [97]: **5.** Εσκιμώος [98]: **6.** Αργεντινή, Ινδιάνοι [96]: **7.** Νότια Αμερική, Μαπούτσε [96] **8.** Ασία, Κορέα [47]: **9.** Αυστραλία [101]. Μεταξύ των απλοτύπων που προκύπτουν από τα ποικίλα αλληλίου του πρώτου εξονίου, ο απλότυπος LYC, φαίνεται να εμφανίζεται αποκλειστικά στην Αφρική, ο HYD αποκλειστικά σε Ευρωπαίους ενώ ο LYB εξαπλώνεται από τους Ευρωπαίους μέχρι την Αμερική και Ασία, κυρίως λόγω μεταναστεύσεων. Η Αυστραλία δεν παρουσιάζει κανένα από τους τρεις προαναφερόμενους απλότυπους.

Ακολουθώντας προβήκαμε στη σύγκριση των συχνοτήτων που εμφανίζονται στις δύο βασικές κατηγορίες νεογνών προς εξέταση αλλά και στις δύο υποομάδες των νεογνών του NT. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα σπάνιων απλοτύπων στα νεογνά του NT ήταν υψηλότερη, συγκρίνοντας την με αυτήν των νεογνών του μαιευτηρίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι ελάχιστες οι μελέτες οι οποίες καθόρισαν τους απλότυπους ως προς τις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *MBL2* σε νεογνά. Οι συγκεκριμένες μελέτες, όπως και άλλες που διεξήχθησαν πάνω σε ενήλικες, φαίνεται να συμφωνούν με τα δικά μας αποτελέσματα, αναφορικά με τη συχνότητα επίπτωσης των πιο συχνών απλοτύπων σε Ευρωπαίους με μικρές ωστόσο αποκλίσεις [109, 195].

Σε μία απ' αυτές τέθηκε το ερώτημα εάν υπάρχει διαφορά στη συχνότητα απλοτύπων μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών και διαπιστώθηκε ότι ο απλότυπος HYD εμφανίστηκε πιο συχνά στα πρόωρα νεογνά σε σχέση με τα τελειόμηνα

[109]. Στη δική μας περίπτωση, εν αντιθέσει, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά καμία σημαντική διαφορά στην επίπτωση απλοτύπων μεταξύ των τελειόμηνων και πρόωρων νεογνών.

Καθώς οι γονότυποι που προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό των γενετικών παραλλαγών του πρώτου εξονίου (αλληλία, D, B και C) και του πολυμορφισμού -221G>C (αλληλία, X και Y), συγκροτούν τρεις κατηγορίες γονοτύπων που σχετίζονται με υψηλή, μεσαία και πολύ χαμηλή συγκέντρωση MBL, μελετήθηκε η μεταξύ τους διαφορά ως προς την επίπτωση τους στις δύο βασικές ομάδες, αλλά και μεταξύ των δύο υποομάδων του NT. Η τρίτη κατηγορία που αποτελείται από τους γονότυπους ΧΑ/Ο και Ο/Ο, ορίζει γονοτυπικά την MBL ανεπάρκεια και για πρώτη φορά στην Ελλάδα έγινε καταγραφή της συχνότητάς της. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συχνότητα της MBL γονοτυπικής ανεπάρκειας στον Ελληνικό πληθυσμό ήταν σχετικά υψηλή σε σχέση με άλλους πληθυσμούς Ευρωπαϊκής προέλευσης, γεγονός που βάσει μεταγενέστερων μελετών ίσως να έχει προστατευτικό ρόλο σε διάφορες ασθένειες όπως φυματίωση, λειψμανίωση και δρεπανοκυτταρική αναιμία [214].

Οι συχνότητες με τις οποίες εντοπίστηκαν οι τρεις κατηγορίες γονοτύπων μεταξύ νεογνών του μαιευτηρίου και αυτών του NT δεν διέφεραν στατιστικά. Παρόμοιο αποτέλεσμα διαπιστώθηκε συγκρίνοντας τα πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά του NT. Πιο συγκεκριμένα, στην κατηγορία γονοτύπων που χαρακτηρίζει την MBL ανεπάρκεια (ΧΑ/Ο και Ο/Ο) διαπιστώθηκε υψηλότερη εμφάνιση των εν λόγω γονοτύπων στην ομάδα των ασθενών, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα. Αντίστοιχα, αν και τα πρόωρα νεογνά του NT παρουσίασαν υψηλότερη συχνότητα γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια, με την επίπτωσή τους να ανέρχεται σε ένα στα τέσσερα νεογνά, ωστόσο η διαφορά στην επίπτωσή τους με τα αντίστοιχα τελειόμηνα, δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το αποτέλεσμα της μελέτης μας, όσον αφορά τη σύγκριση επίπτωσης γονοτύπων μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών, φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με δύο μελέτες, στις οποίες βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ προωρότητας και της κατηγορίας γονοτύπων που χαρακτηρίζει την MBL ανεπάρκεια [109, 196]. Ωστόσο στις παραπάνω μελέτες, στους γονότυπους που συγκροτούσαν την MBL ανεπάρκεια, περιλήφθη και ο γονότυπος ΧΑ/ΧΑ εκτός από των ΧΑ/Ο και Ο/Ο. Από την άλλη, παρόμοιο αποτέλεσμα με το δικό μας, δημοσιεύτηκε από δυο μελέτες, στις οποίες φάνηκε να μην υπάρχει διαφορά στην επίπτωση γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια, μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών [195, 201].

Ένα άλλο ζήτημα που απασχόλησε την παρούσα μελέτη ήταν, εάν ο γονότυπος που φέρει κάθε νεογνό είναι αντιπροσωπευτικός της συγκέντρωσης MBL. Σύμφωνα με τα

αποτελέσματα μας, διαπιστώσαμε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ γονότυπου *MBL2* και επιπέδων συγκέντρωσης της MBL στο σύνολο των 306 νεογνών. Αξίζει να σημειώσουμε ότι τα νεογνά που έφεραν γονότυπους που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια παρουσίασαν συχνά συγκεντρώσεις μη ανιχνεύσιμες. Επιπρόσθετα, μελετώντας τη διαφορά στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης MBL μεταξύ των τριών κατηγοριών γονοτύπων έκφρασης (υψηλής, μεσαίας και χαμηλής) σε κάθε ομάδα και υποομάδα νεογνών, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις συγκρίσεις ($p < 0.001$).

Για να διερευνηθεί περαιτέρω αν ο γονότυπος *MBL2* είναι αντιπροσωπευτικός της συγκέντρωσης MBL, προβήκαμε στη σύγκριση των επιπέδων συγκέντρωσης της μεταξύ των ομάδων και υποομάδων νεογνών που φέρουν τον ίδιο γονότυπο. Αν και παρατηρήσαμε υψηλότερη συγκέντρωση στα νεογνά του μαιευτηρίου σε σύγκριση με τα νεογνά του ίδιου γενετικού προφίλ του NT, ωστόσο η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε όλες τις συγκρίσεις. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν οι διαφορές που προκύπτουν σε επίπεδο συγκέντρωσης της MBL μεταξύ των δύο υποομάδων του NT (πρόωρων και τελειόμηνων) που έφεραν τον ίδιο γονότυπο. Διαπιστώθηκε, ότι τα επίπεδα συγκέντρωσης της πρωτεΐνης MBL στα πρόωρα νεογνά ήταν χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά των τελειόμηνων του NT που έφεραν τους ίδιους γονότυπους, ωστόσο μόνο στην περίπτωση νεογνών που έφεραν τον γονότυπο YA/YA ή κατηγορία γονοτύπων υψηλής συγκέντρωσης (YA/YA, YA/XA) η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική. Το συγκεκριμένο γεγονός είναι προφανές ότι οφείλεται στην προωρότητα.

Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις ενισχύουν την άποψη, ότι ο γονότυπος μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικός της συγκέντρωσης MBL και στα νεογνά. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις νεογνών με ίδιο γονότυπο που μπορεί να διαφέρουν σε επίπεδο συγκέντρωσης MBL σημαντικά. Γι' αυτόν το λόγο επιβάλλεται να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες, με κύριο αυτόν της προωρότητας, όσο αφορά τη σχέση γονοτύπου και φαινοτύπου της πρωτεΐνης MBL.

Ανάλογη μελέτη στην οποία έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων μεταξύ τελειόμηνων και πρόωρων νεογνών του NT που φέρουν τον ίδιο γονότυπο, ήταν μόνο αυτή των Frakking και συν., το 2006. Αν και στη συγκεκριμένη μελέτη τα άτομα που έλαβαν μέρος ήταν λιγότερα, ωστόσο τα αποτελέσματα της συγκλίνουν με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, κυρίως όσον αφορά τη σημασία της προωρότητας, στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης MBL [201].

Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα μελέτη λήφθηκε υπόψη και ο πολυμορφισμός -550G>C (αλληλία H και L) και καθορίστηκαν 34 ξεχωριστοί γονότυποι στο σύνολο

όλων των νεογνών, πολλοί εκ των οποίων εμφανίστηκαν και στις δύο υποομάδες νεογνών. Στους εν λόγω γονότυπους, πέραν της διερεύνησης της πιθανής διαφοράς συχνοτήτων στην επίπτωσή τους στις δύο βασικές ομάδες νεογνών, μελετήθηκε και η διαφορά σε επίπεδο συγκέντρωσης της MBL μεταξύ νεογνών του NT με αυτών του μαιευτηρίου, που φέρουν τον ίδιο γονότυπο. Ακολούθως και οι δύο υποομάδες νεογνών του NT, υποβλήθηκαν σε περαιτέρω σύγκριση, όπως προαναφέρθηκε.

Αναλυτικά, διαπιστώθηκε ότι τα φυσιολογικά νεογνά του μαιευτηρίου που έφεραν το γονότυπο HYA/LYB, παρουσίασαν πιο υψηλή συγκέντρωση MBL, απ' ότι τα νεογνά του NT με το ίδιο γενετικό προφίλ. Στα υπόλοιπα νεογνά δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο βασικών ομάδων του ίδιου γονοτύπου. Τέλος, στις δυο υποομάδες του NT, αν και διαπιστώθηκε διαφορά στη συγκέντρωση της MBL σε όλες τις συγκρίσεις, ωστόσο μόνο στη σύγκριση της συγκέντρωσης μεταξύ των νεογνών που έφεραν το γονότυπο HYA/HYA παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, όπου η συγκέντρωση ήταν εμφανώς υψηλότερη στο σύνολο των τελειόμηνων νεογνών σε σχέση με τα πρόωρα. Είναι τέλος απαραίτητο να τονιστεί ότι υπήρχαν περιπτώσεις, όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές αποκλίσεις στην συγκέντρωση μεταξύ νεογνών της ίδιας ομάδας ή υποομάδας που έφεραν τον ίδιο γονότυπο.

Η μοναδική μελέτη σε νεογνά, όπου καθορίστηκαν οι παραπάνω γονότυποι, αφού λήφθηκαν υπόψη οι γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *MBL2*, που περιλάμβαναν και τον πολυμορφισμό -550G>C και πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες μετρήσεις της συγκέντρωσης, ήταν των Swiertzko και συν., το 2008 στην Πολωνία [195]. Η συγκεκριμένη μελέτη διαφέρει ως προς τον σχεδιασμό της με τη δική μας, διότι δεν κατηγοριοποιεί τα νεογνά με βάση το είδος νοσηλείας. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας στο σύνολο των νεογνών βρίσκονται σε συμφωνία με τη συγκεκριμένη μελέτη όσον αφορά τα επίπεδα συγκέντρωσης της MBL σε κάθε ομάδα νεογνών με έναν συγκεκριμένο γονότυπο, με μικρές αμελητέες αποκλίσεις. Σημαντικό όμως είναι το γεγονός, ότι παρόμοια διαπιστώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις στα επίπεδα της MBL από 10 μέχρι 2200 ng/ml σε νεογνά που έφεραν τον ίδιο γονότυπο, όπως τον HYA/HYA και τον HYA/LYA, ενισχύοντας έτσι την εκτίμηση ότι ο γονότυπος δεν μπορεί να καθορίσει εξ'ολοκλήρου τα επίπεδα της πρωτεΐνης MBL στα νεογνά, και θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν και άλλοι παράγοντες με κύριο την προωρότητα.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με βασικό σκοπό να αναδείξει την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της MBL ανεπάρκειας, γονοτυπικά και ορολογικά οριζόμενης, με την επίπτωση περιγεννητικών λοιμώξεων καθώς και με τον αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας των νεογνών του NT. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, αποκαλύφθηκε ότι τα νεογνά με λειτουργική MBL ανεπάρκεια εμφάνισαν αυξημένο κίνδυνο συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας, αν και δεν παρατηρήθηκε σ' αυτά αυξημένη συχνότητα περιγεννητικών λοιμώξεων.

Παράλληλα, κρίθηκε απαραίτητο να συγκριθεί η συχνότητα επίπτωσης των γενετικών παραλλαγών, απλοτύπων και γονοτύπων του γονιδίου *MBL2* μεταξύ των δυο βασικών ομάδων νεογνών καθώς και των δύο υποομάδων του NT, όπου διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα των σπάνιων απλοτύπων που χαρακτηρίζονται από χαμηλές τιμές MBL στον ορό στα νεογνά του NT ήταν πιο υψηλή, συγκρίνοντας την με αυτήν των νεογνών του μαιευτηρίου.

Επίσης, ένα άλλο ζήτημα που απασχόλησε τη μελέτη ήταν, εάν ο γονότυπος *MBL2* που φέρει κάθε νεογνό ήταν αντιπροσωπευτικός της συγκέντρωσης MBL. Αν και δεν διαπιστώσαμε σε όλες τις περιπτώσεις, διαφορές στα επίπεδα συγκέντρωσης της MBL μεταξύ των ομάδων και υποομάδων νεογνών που φέρουν τον ίδιο γονότυπο, ωστόσο παρατηρήσαμε ότι τα πρόωρα νεογνά παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα MBL συγκριτικά με τα τελειόμηνα νεογνά του ίδιου γενετικού προφίλ και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική σε ορισμένες περιπτώσεις γονοτύπων.

Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις ενισχύουν την άποψη, ότι ο γονότυπος μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικός της συγκέντρωσης MBL και στα νεογνά, ωστόσο φαίνεται να υπάρχουν περιπτώσεις νεογνών με ίδιο γονότυπο που μπορεί να διαφέρουν σε επίπεδο συγκέντρωσης MBL σημαντικά.

Τέλος, τα αποτελέσματά μας συνέβαλαν στον καθορισμό ενός συγκεκριμένου επιπέδου τιμών αναφορικά με την MBL πρωτεΐνη, κάτω από την οποία τα νεογνά θα μπορούν να θεωρηθούν MBL ανεπαρκή. Επίσης μας δείχνουν ότι μια απλή μέτρηση των επιπέδων της πρωτεΐνης MBL στον ορό κατά την εισαγωγή των νεογνών στο NT, ίσως μπορεί να βοηθήσει την εύρεση ομάδας νεογνών με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας, ανεξάρτητα από την παρουσία λοίμωξης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ Η πρωτεΐνη MBL, ως βασικός παράγοντας της φυσικής ανοσίας, παίζει σημαντικό ρόλο στα νεογνά στα οποία οι μηχανισμοί της ειδικής ανοσίας, δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως. Η MBL ανεπάρκεια, γονοτυπικά και φαινοτυπικά διαπιστωμένη, έχει συνδεθεί με αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων στη βρεφική ηλικία, αλλά και την ενήλικη ζωή. Στα νεογνά, ελάχιστες είναι οι μελέτες, όπου διερευνήθηκε η επίδραση της MBL ανεπάρκειας στην ανάπτυξη περιγεννητικών λοιμώξεων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια ή και αντίστοιχων χαμηλών επιπέδων της πρωτεΐνης MBL με την επίπτωση περιγεννητικών λοιμώξεων και νοσηρότητας στο NT. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η σχέση μεταξύ MBL ανεπάρκειας με την προωρότητα ή με άλλες μεταβλητές.

ΥΛΙΚΟ Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 153 υγιή νεογνά και από 153 νεογνά του Νεογνολογικού Τμήματος. Ακολούθως, η ομάδα των νεογνών του NT υποδιαιρέθηκε σε δύο υποομάδες με βάση την προωρότητα (96 τελειόμηνα και 57 πρόωρα νεογνά). Για όλα τα δείγματα καθορίστηκαν οι γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *MBL2*, ενώ καθορίστηκε και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης MBL στον ορό.

ΜΕΘΟΔΟΙ Η μέτρηση της λειτουργικής πρωτεΐνης MBL στον ορό του αίματος, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοπροσοφορική μέθοδο ELISA. Η ανίχνευση των *MBL2* γονοτύπων, αναφορικά με τις γενετικές παραλλαγές στα κωδίκια 52, 54 και 57 του πρώτου εξωνίου και των πολυμορφισμών στις θέσεις -550 και -221 του υποκινητή, έγινε με πρωτόκολλο PCR-RFLP. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων. Στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση του λογισμικού SPSS 17.0.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των νεογνών του NT με αυτών του μαιευτηρίου, όσον αφορά τις γενετικές παραλλαγές του πρώτου εξωνίου. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των δυο υποομάδων των νεογνών του NT (τελειόμηνων και πρόωρων). Ωστόσο, οι σπάνιοι απλότυποι HYB, LXB και HXA παρατηρήθηκαν συχνότερα στην ομάδα των νεογνών του NT, συγκριτικά με τα νεογνά του μαιευτηρίου ($p=0.009$). Αν και οι γονότυποι που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια (XA/O και O/O) εμφανίστηκαν με υψηλότερη συχνότητα στην υποομάδα των πρόωρων νεογνών, συγκριτικά με τα τελειόμηνα, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (24.5% έναντι 18.7%, $p=0.393$). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης MBL ήταν σημαντικά πιο χαμηλά στα πρόωρα νεογνά, σε σχέση με τα τελειόμηνα [μέση τιμή +/-SD: 667 ng/ml έναντι 922 ng/ml, $p=0.032$]. Επιπρόσθετα,

δεν προέκυψε συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων που χαρακτηρίζουν την MBL ανεπάρκεια και των αντίστοιχων χαμηλών επιπέδων της πρωτεΐνης MBL με την επίπτωση περιγεννητικών λοιμώξεων. Παρόλα αυτά, διαπιστώθηκε ότι τα νεογνά που παρουσίασαν επίπεδα συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης MBL χαμηλότερα από 150 ng/ml αντιμετώπιζαν περίπου δυο φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εκδηλώσουν σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας σε σχέση με τα νεογνά που εμφάνιζαν επίπεδα μεγαλύτερα του συγκεκριμένου επιπέδου τιμών (OR:2.31, 95%CI:1.10-4.83, p=0.025). Άλλοι παράγοντες κινδύνου συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας, αποτέλεσαν η προωρότητα (OR:10.21, 95%CI:4.46-23.36, p<0.001) και οι σπασμοί (OR:21.89, 95%CI:1.80-266.148, p=0.015).ή και το περιγεννητικό stress (OR:7.08, 95%CI:2.26-22.17, p=0.001).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Ο γονότυπος *MBL2* δεν μπορεί να θεωρηθεί αποκλειστικά αντιπροσωπευτικός των επιπέδων της πρωτεΐνης MBL στα νεογνά, διότι τα επίπεδα της εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες, με κύριο την προωρότητα. Επιπρόσθετα, σπάνιοι απλότυποι εμφανίζονται συχνότερα σε νεογνά που χρήζουν νοσηλείας στο ΝΤ, ενώ νεογνά με MBL ανεπάρκεια παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο αναπνευστικής δυσχέρειας, αν και δεν παρατηρείται σε αυτά αυξημένη συχνότητα περιγεννητικών λοιμώξεων. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας αποκαλύπτουν ότι μια απλή μέτρηση των επιπέδων της πρωτεΐνης MBL, ίσως μπορεί να συμβάλει στην κατάδειξη νεογνών με αυξημένο κίνδυνο επίπτωσης ΣΑΔ.

ABSTRACT

Mannose binding lectin (MBL) and perinatal infections

Georgios Iordanakis

Department of Immunology - Histocompatibility

School of Medicine – University of Thessaly

(Director: Prof. A.E. Germenis)

OBJECTIVE Mannose-binding lectin plays a key role in neonate innate immunity, since the adaptive immunity is still immature. MBL deficiency has been associated with an increased incidence of infections in infants and adults. To date, considering that a few studies have investigated the role of MBL deficiency in neonates, its contribution to the incidence of perinatal infections is still inconclusive. The aim of this study was to investigate the relationship between *MBL2* genotypes, along with MBL serum levels with the occurrence of perinatal infections and neonate morbidity.

MATERIALS & METHODS Blood samples were collected from 153 healthy neonates and 153 neonates of the Neonatal Internal Care Unit (NICU). In addition the group of NICU neonates was subdivided in two subgroups, according to the prematurity (96 term and 57 preterm). Serum MBL levels were measured by enzyme-linked immunoassorbant assay (ELISA). The detection of *MBL2* genotypes (mutations at codons 52, 54 and 57 of the exon 1 and the polymorphisms in the position -550 and -221 into promoter) were performed by a PCR-RFLP protocol. The results were conformed by direct sequencing. Statistical analysis was performed using the SPSS (v17.0) software. **RESULTS** The allele frequency of MBL mutations was not differed between patients (ICU) and controls. Moreover, no difference was observed between the subgroups of ICU neonates. Interestingly, the rare haplotypes HYB, LXB and HXA were found in a higher frequency in ICU neonates and the difference was significant ($p=0.009$). Furthermore, carriers of MBL deficient genotypes (XA/O, O/O) were more frequent in the subgroup of the premature neonates in comparison with the term neonates; however, the difference was not significant (24.5% versus 18.7%, $p=0.393$). Serum MBL levels were significantly lower in preterm ICU neonates compared to term ones [mean +/-SD: 667ng/ml vs 922ng/ml, $p=0.032$]. Moreover, no significant correlations were found between MBL deficiency (functional and/or genotypic) and the incidence of perinatal infections ($p>0.05$) and prematurity ($p>0.05$). However, functional MBL deficiency, defined as MBL levels lower than 150

ng/ml, was positively correlated with with an approximately 2-fold increased risk to respiratory distress syndrome (OR:2.31, 95%CI:1.10-4.83, p=0.025). Other independent risk factors for RDS were the prematurity (OR:10.21, 95%CI: 4.46-23.36, p<0.001) and the emergence of seizures (OR:21.89, 95%CI: 1.80-266.14, p=0.015) or perinatal stress (OR:7.08, 95%CI: 2.26-22.17, p=0.001) after delivery. **CONCLUSIONS** *MBL2* genotype did not exclusively determine MBL serum levels in neonates, since MBL levels are affected by additional factors, as prematurity. Moreover, rare *MBL2* haplotypes are more frequent in ICU neonates, while neonates with MBL deficiency display a higher incidence of respiratory distress. On the other hand, the presence of MBL deficiency was not correlated with the frequency and the type of perinatal infections. In conclusion, our results indicate that a simple measurement of serum MBL levels on admission may help to identify neonates at high risk of developing RDS in the NICU.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Lawn JE, Cousens S, Bhutta ZA, Darmstadt GL, Martines J, Paul V, Knippenberg R, Fogstad H, Shetty P, Horton R. Why are 4 million newborn babies dying each year? *Lancet* 2004, 364:399-401.
- 2 Wynn JL, Neu J, Moldawer LL, Levy O. Potential of immunomodulatory agents for prevention and treatment of neonatal sepsis *J Perinatol* 2009, 29:79-88.
- 3 Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, Blimkie D, Thommai F, Wang XY, Lavoie PM, Furlong J, Fortuno ES 3rd, Hajjar AM, Hawkins NR, Self SG, Wilson CB. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults *J Immunol* 2009, 183:7150-7160.
- 4 Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates *Nat Rev Immunol* 2007, 7:379-390.
- 5 Visscher MO, Narendran V, Pickens WL, LaRuffa AA, Meinzen-Derr J, Allen K, Hoath SB. Vernix caseosa in neonatal adaptation *J Perinatol* 2005, 25:440-446.
- 6 Rutter N. Clinical consequences of an immature barrier *Semin Neonatol* 2000, 5:281-287.
- 7 Wynn JL, Levy O. Role of Innate Host Defenses in Susceptibility to Early Onset Neonatal Sepsis *Clin Perinatol* 2010, 37:307-337.
- 8 Martin CR, Walker WA. Probiotics: role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterocolitis *Semin Perinatol* 2008, 32:127-137.
- 9 Palazzi D, Klein J, Baker C. Bacterial Sepsis and Meningitis. In: Remington; Klein; Wilson; Baker, editors. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 6th ed. Elsevier Saunders; Philadelphia:2006.
- 10 Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, McCray PB Jr. Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung *J Immunol* 2005, 174:1608-1615.
- 11 Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848 *J Immunol* 2004, 173:4627-4634.
- 12 Willems F, Vollstedt S, Suter M. Phenotype and function of neonatal DC *Eur J Immunol* 2009, 39:26-35.
- 13 Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M, Suter EE, Valentini P, Kalish LA, Levy O. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo *Pediatr Res* 2006, 60:205-209.
- 14 Hallwirth U, Pomberger G, Zaknun D, Szepfalusi Z, Horcher E, Pollak A, Roth E, Spittler A. Monocyte phagocytosis as a reliable parameter for predicting early-onset sepsis in very low birthweight infants *Early Hum Dev* 2002, 67:1-9.
- 15 Jones CA, Holloway JA, Warner JO. Phenotype of fetal monocytes and B lymphocytes during the third trimester of pregnancy *J Reprod Immunol* 2002, 56:45-60.
- 16 Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns *Clin Immunol* 2006, 118:137-144.
- 17 Urlichs F, Speer CP. Neutrophil function in preterm and term infants *Neo Reviews* 2004, 5:417-430.
- 18 Weinschenk NP, Farina A, Bianchi DW. Premature infants respond to early-onset and late-onset sepsis with leukocyte activation *J Pediatr* 2000, 137:345-350.
- 19 Engle WA, McGuire WA, Schreiner RL, Yu PL. Neutrophil storage pool depletion in neonates with sepsis and neutropenia *J Pediatr* 1988, 113:747-749.

-
- 20 Levy O, Martin S, Eichenwald E, Ganz T, Valore E, Carroll SF, Lee K, Goldmann D, Thorne GM. Impaired innate immunity in the newborn: Newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein *Pediatrics* 1999, 104:1327-1333.
- 21 McEvoy LT, Zakem-Cloud H, Tosi MF. Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age *Blood* 1996, 87:3929-3933.
- 22 Buhner C, Graulich J, Stibenz D, Dudenhausen JW, Obladen M. L-selectin is down-regulated in umbilical cord blood granulocytes and monocytes of newborn infants with acute bacterial infection *Pediatr Res* 1994, 36:799-804.
- 23 Levy O, Martin S, Eichenwald E, Ganz T, Valore E, Carroll SF, Lee K, Goldmann D, Thorne GM. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein *Pediatrics* 1999, 104:1327-1333.
- 24 Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Borregaard N. Granules and secretory vesicles in human neonatal neutrophils *Pediatr Res* 1996, 40:120-129.
- 25 Drossou V, Kanakoudi F, Diamanti E, Tzimouli V, Konstantinidis T, Germenis A, Kremenopoulos G, Katsougiannopoulos V. Concentrations of main serum opsonins in early infancy *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995, 72:172-175.
- 26 Notarangelo LD, Chirico G, Chiara A, Colombo A, Rondini G, Plebani A, Martini A, Ugazio AG. Activity of classical and alternative pathways of complement in preterm and small for gestational age infants *Pediatr Res* 1984, 18:281-285.
- 27 Lassiter HA, Watson SW, Seifring ML, Tanner JE. Complement factor 9 deficiency in serum of human neonates *J Infect Dis* 1992, 166:53-57.
- 28 Zilow EP, Hauck W, Linderkamp O, Zilow G. Alternative pathway activation of the complement system in preterm infants with early onset infection *Pediatr Res* 1997, 41:334-339.
- 29 Zilow G, Zilow EP, Burger R, Linderkamp O. Complement activation in newborn infants with early onset infection *Pediatr Res* 1993, 34:199-203.
- 30 Frakking FNJ, Brouwer N, van Eijkelenburg NKA, Kuijpers TW, Offringa M, Dolman KM. Low mannose binding lectin (MBL) levels in neonates with pneumonia and sepsis *Clin Exp Immunol* 2007, 150:255-262.
- 31 Dzwonek AB, Neth OW, Thiébaud R, Gulczynska E, Chilton M, Hellwig T, Bajaj-Elliott M, Hawdon J, Klein NJ. The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates *Pediatr Res* 63:680-685.
- 32 Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004, 89:229-235.
- 33 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis *N Engl J Med* 2003, 348:138-115.
- 34 Wynn JL, Scumpia PO, Delano MJ, O'Malley KA, Ungaro R, Abouhamze A, Moldawer KL. Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis *Shock* 2007, 28:675-683.
- 35 Wynn JL, Scumpia PO, Winfield RD, Delano MJ, Kelly-Scumpia K, Barker T, Ungaro R, Levy O, Moldawer LL. Defective innate immunity predisposes murine neonates to poor sepsis outcome but is reversed by TLR agonists *Blood* 2008, 112:1750-1758.
- 36 Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, Prusa AR, Hayde M, Herkner K, Pollak A, Spittler A, Forster-Waldl E. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling *J Infect Dis* 2007, 195:296-302.
- 37 Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees *N Engl J Med* 1988, 12: 727-732.

-
- 38 Burgner D, Levin M. Genetic susceptibility to infectious diseases *Pediatr Infect Dis J* 2003, 22: 1-6.
- 39 Strunk T, Burgner D. Genetic susceptibility to neonatal infection *Curr Opin Infect Dis* 2006, 19: 259-263.
- 40 Bessler H, Osovsky M, Sirota L. Association between IL-1ra gene polymorphism and premature delivery *Biol Neonate* 2004, 85: 179-183.
- 41 Kalish RB, Vardhana S, Gupta M, Perni SC, Witkin SS. Interleukin-4 and -10 gene polymorphisms and spontaneous preterm birth in multifetal gestations *Am J Obstet Gynecol* 2004, 190: 702-706.
- 42 Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population *Pediatric Res* 2002, 52: 373-376.
43. Hartel Ch, Finas D, Ahrens P, Kattner E, Schaible T, Muller D, Segerer H, Albrecht K, Moller J, Diedrich K, Gopel W. polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery *Mol Hum Reprod* 2004, 10: 911-915.
- 44 Macones GA, Parry S, Elkousy M, Clothier B, Ural SH, Strauss JF. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth *Am J Obstet Gynecol* 2004, 190: 1504-1508.
- 45 Harding D, Dhamrait S, Millar A, Humphries S, Marlow N, Whitelaw A, Montgomery H. Is interleukin-6 -174 genotype associated with the development of septicemia in preterm infants? *Pediatrics* 2003, 112: 800-803.
- 46 Schluter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, Van Aken H, Assmann G, Berendes E. Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis *Crit Care Med* 2002, 30: 32-37.
- 47 Moore S, Ide M, Randhawa M, Walker JJ, Reid JG, Simpson NA. An investigation into the association among preterm birth, cytokine gene polymorphisms and periodontal disease *BJOG* 2004, 111: 125-132.
- 48 Kilpinen S, Hulkkonen J, Wang XY, Hurme M. The promoter polymorphism of the interleukin-6 gene regulates interleukin-6 production in neonate but not in adults *Eur Cytokine Net* 2001, 12: 62-68.
- 49 Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor- α gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease *J Infect Dis* 1996, 174: 878-880.
- 50 Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, Onderdonk A, Tuomala R, Norwitz E, Witkin SS. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant woman *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004, 116: 152-156.
- 51 LeVan TD, Guerra S, Klimecki W, Vasquez MM, Lohman IC, Martinez FD, Halonen M, Wright AL. The impact of CD14 polymorphisms on the development of soluble CD14 levels during infancy *Genes Immun* 2006, 7: 77-80.
- 52 Kiechl S, Lorenz E, Reindi M. Toll-like receptor-4 polymorphisms and atherogenesis *N Engl J Med* 2002, 347: 185-192.
- 53 Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock *Arch Intern Med* 2002, 162: 1028-1032.
- 54 Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, Beutler B. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 6075-6080.
- 55 Miller M.E, Seals J.A, Kaye R, Levitsky L.C. A familiar plasma-associated defect of phagocytosis: new cause of recurrent bacterial infection *Lancet* 1968, 2: 60-63.

-
- 56 Richardson V.F, Larcher V.F, Price J.F. A common congenital immunodeficiency predisposing to infection and atopy in infancy *Arch.Dis.Child* 1983, 58:799-802.
- 57 Robinson D, Phillips NC, Winchester B. Affinity chromatography of human liver alpha-D-mannosidase *FEBS Lett* 1975 53:110-112.
- 58 Kawasaki T, Etoh R, Yamashina I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver *Biochem Biophys Res Commun* 1978, 81:1018-1024.
- 59 Wild J, Robinson D, Winchester B. Isolation of mannose-binding proteins from human and rat liver *Biochem J* 1983, 210:167-174.
- 60 Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N. Serum lectin with known structure activates complement through the classic pathway *J Biol Chem* 1987, 262:7451-7454.
- 61 Super M, Lu J, Thiel S, Levinsky R.J, Turner M.W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation *Lancet* 1989, 2:1236-1239.
- 62 Kilpatrick D.C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications *Biochimica Biophysica Acta* 2002, 1572:401-413.
- 63 Turner MW. The role of mannose-binding-lectin in health and disease *Mol.Immunol* 2003, 40:423-429.
- 64 Weis WI, Drickamer K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein *Structure* 1994, 2:1227-1240.
- 65 Sheriffs, Chang CY, Ezekowitz RA. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil *Nat Struct Biol* 1994, 1:789-794.
- 66 Hansen S, Holmskov U. Structural aspects of collectins and receptors for collectins *Immunobiology* 1998, 199:165-189
- 67 Lu J, Thiel S, Wiederman H, Timpl R, Reid K.B.M. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2 C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without the involvement of C1q *J Immunol* 1990, 144:2287-2294.
- 68 Turner M.W. Mannose-binding protein: the pluripotent molecule of the innate immune system *Immunol.Today* 1996, 17:532-540.
- 69 Kawasaki T. Structure and biology of mannan-binding protein, MBP, an important component of innate immunity *Biochim Biophys Acta* 1999, 1473:186-195.
- 70 Peterson S.V, Thiel S, Jensenius J.C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association *Mol Immunol* 2001, 38:133-149.
- 71 Eddie Ip W K, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart L. Mannose-binding lectin and innate immunity *Immunological Reviews* 2009, 230:9-21.
- 72 Drickamer K. Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions *Nat Struct Biol*, 1995 2:437-439.
- 73 Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein for human serum *J Biochem* 1983, 94:937.
- 74 Iobst ST, Wormald MR, Weis WI, Dwek RA, Drickamer K. Binding of sugar ligands to Ca (+2)-dependent animal lectins. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR *J Biol Chem* 1994, 269:505-511.
- 75 Janeway CA Jr. Travers P, Walport M, Sholmchik M. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease (5 edition) *Garland Publishing* 2001, 35-91.
- 76 Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease *J Exp Med* 1992, 176:1497-1502.
- 77 Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement *Nature* 1997: 386:506-510.
- 78 Takahashi M, Endo Y, Fujita T, Matsushita M. A truncated form of mannose-binding

-
- lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway *Int Immunol* 1999, 11:859-863.
- 79 Tenner AJ, Robinson SL, Ezekowitz RA. Mannose-binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor *Immunity* 1995, 3:485-493.
- 80 Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. Complement receptor 1/ CD35 is a receptor for mannan-binding lectin *J Exp Med* 2000, 192:1797-1808.
- 81 Malhotra R, Thiel S, Roid K B, Sim R B. Human leucocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains *J Exp Med* 1990, 172:955-959.
- 82 Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells *J Exp Med* 2001, 194:781-795.
- 83 Chaka W, Verheul AF, Valshnav VV. Induction of TNF-alpha in human peripheral blood mononuclear cells by the mannoprotein of *Cryptococcus neoformans* involves human mannose binding protein *J Immunol* 1997, 159:2979-2985.
- 84 Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein *Biochem J* 1989, 262:763-771.
85. Sastry R, Herman GA, Day L, Deignan E, Bruns G, Morton CC. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10 *J Exp Med* 1989, 170:1175-1189.
- 86 Guo N, Mogues T, Weremowicz S, Morton CC, Sastry KN. The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10 *Mamm Genome* 1998, 9:246-249.
- 87 Sastry R, Wang JS, Brown DC, Ezekowitz RA, Tauber AI, Sastry KN. Characterization of murine mannose-binding protein genes Mbl1 and Mbl2 reveals features common to other collectin genes *Mamm Genome* 1995, 6:103-110.
- 88 White RA, Dowler LL, Adkinson LR, Ezekowitz RA, Sastry KN. The murine mannose-binding protein genes (Mbl1 and Mbl2) localize to chromosomes 14 and 19 *Mamm Genome* 1994, 5:807-809.
- 89 Naito H, Ikeda A, Hasegawa K, Oka S, Uemura K, Kawasaki N. Characterization of human serum mannose-binding protein promoter *Biochem J* 1999, 126:1004-1012.
- 90 Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW. Molecular basis of opsonic defect of opsonic defect in immunodeficient children *Lancet* 1991, 337:1569-1570.
- 91 Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, functions, genetics and disease associations *Rev Immunogenet* 2000, 2:305-322.
- 92 Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z *Biochem.Soc.Trans* 2008, 36:1461-1466.
- 93 Lipscombe RJ, Sumija M, Hill AV, Lau YL, Levinnsky RJ, Summerfield JA, Turner MW. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene *Human Mol. Genet* 1992, 1:709-715.
- 94 Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein *Immunogenetics* 1994, 40:37-44.
- 95 Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Ryder LP. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein *J Immunol* 1995, 155:3013-3020.

-
- 96 Madsen HO, Satz ML, Hogh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America *America J Immunol* 1998, 161: 3169-3175.
- 97 Garred P, Thiel S, Madsen HO, Ryder LP, Jensenius JC, Svejgaard A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations *Clin Exp Immunol* 1992, 90: 517-521.
- 98 Garred P, Madsen HO, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Thiel S, Hey S. Diallelic polymorphism may explain variations of blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans *Eur J Immunogenetics* 1992, 19: 403-412.
- 99 Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants *Genes and Immunity* 2006, 7: 85-94.
- 100 Juliger S, Kreamsner PG, Alpers MP, Reeder JC, Kun JFC. Restricted polymorphisms of the mannose-binding lectin gene in a population of Papua New Guinea *Mutation Research* 2002, 505: 87-91.
- 101 Turner MW, Dinan J, Heatley S. Restricted polymorphism of the mannose-binding gene of indigenous Australian *Hum Mol Genet* 2000, 9: 1481-1486.
- 102 Kilpatrick DC, Liston WA, Midgley PC. Mannan-binding protein in human umbilical cord blood *Nat Immun* 1996, 15: 234-240.
- 103 Minchinton RM, Dean MM, Clark TR. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels, and function in an Australian blood donor population *Scand J Immunol* 2002, 56: 630-641.
- 104 Crosdale DJ, Ollier WE, Thomson W. Mannose-binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids *Eur J Immunogenet* 2000, 27: 111-117.
- 105 Lee SG, Yum JS, Moon HM, Kim HJ, Yang YJ, Kim HL. Analysis of mannose-binding lectin 2(MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population *Mol Immunol* 2005, 42: 969-977.
- 106 Israaels J, Frakking FNJ, Kremer LCN, Offringa M, Kuijpers TW, van de Wetering MD. Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review *Arch Dis Fetal Neonatal Ed* 2010, doi:10.1136/adc.2009.172122.
- 107 Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during the acute phase response *Clin Exp Immunology* 1992, 90: 31-35.
- 108 Arai T, Tabona P, Summerfield JA. Human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone, and heat-shock proteins *Q C Med* 1993, 86: 575-582.
- 109 Bodamer OA, Mitterer G, Maurer W, Pollak A, Mueller MW, Schmidt WM. Evidence for an association between mannose-binding lectin 2(MBL2) gene polymorphisms and pre-term birth *Genet Med* 2006, 8: 518-524.
- 110 Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM. A second serine protease associated with mannan-binding protein that activates complement *Nature* 1997, 386: 506.
- 111 Dahl MR, Thiel S, Matsushita M. Masp-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway *Immunity* 2001, 15: 127.
- 112 Stover CM, Thiel S, Thelen M. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene *J Immunol* 1999, 163: 3481.
- 113 Sorensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine protease, characteristics and disease associations *Springer Semin Immun* 2005, 27: 299-319.
- 114 Stover CM, Endo Y, Takahashi M. The human gene for mannan-binding-lectin-associated serine protease-2 (MASP-2), the effector component of the lectin route of complement activation, is part of tightly linked gene cluster on chromosome 1q36.2-3 *Genes Immun* 2001, 2: 119.

-
- 115 Gregory LA, Thielens NM, Arlaud GJ. X-ray structure of the Ca⁺⁺ binding interaction domain of C1s. Insights into the assembly, of the C1 complex of complement *J Biol Chem* 2003, 278:32157-32164.
- 116 Endo Y, Sato T, Matsushita M. Exon structure of the gene encoding the human mannose-binding-protein-associated serine protease light chain: comparison with complement C1r and C1s genes *Int Immunol* 1996, 8:1355-1358.
- 117 Vorup-Jensen T, Petersen SV, Hansen AG, Poulsen K, Schwaeble W, Sim RB, Reid KB, Davis SJ, Thiel S, Jensenius JC. Distinct Pathways of Mannan-Binding Lectin (MBL) and C1-Complex Autoactivation Revealed by Reconstitution of MBL with Recombinant MBL-Associated Serine Protease-2 *J Immunol* 2000, 165:2093-2100.
- 118 Wallis R. Interaction of mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway *Immunobiology* 2007, 212:289-299.
- 119 Rossi V, Cseh S, Bally I, Thielens NM, Jensenius JC, Arlaud GJ. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2 *J Biol Chem* 2001, 276:40880-40887.
- 120 Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease *J Immunol* 2000, 165:2637-2642.
- 121 Moller-Kristensen M, Thiel S, Sjolholm A, Matsushita M, Jensenius JC. Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway *Int Immunol* 2007, 19:141-149.
- 122 Cortesio CL, Jiang W. Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5 *Arch Biochem Biophys* 2006, 449:164-170.
- 123 Teillet F, Lacroix M, Thiel S, Weilguny D, Agger T, Arlaud GJ, Thielens NM. Identification of the site of human mannan-binding lectin involved in the interaction with its partner serine protease, the essential role of Lys 55 *J Immunol* 2007, 178:5710-5716.
- 124 Thielens NM, Cseh S, Thiel S, Vorup-Jensen T, Rossi V, Jensenius JC, Arlaud GJ. Interaction properties of human mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 and -2, MBL-associated protein 19 and MBL *J Immunol* 2001, 166:5068-5077.
- 125 Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. Masp-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway *Immunity* 2001, 15:127-133.
- 126 Neth O, Jack DL, Johnson M. Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus* *J Immunol* 2002, 169:4430-4436.
- 127 Kilpatrick DC: Mannan-binding protein and its role in innate immunity *Transfus Med* 2002, 12:335-351.
- 128 Eisen DP, Minchinton RM: Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases *Clin Infect Dis* 2003, 37:1496-1505.
- 129 Summerfield JA: Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy *Biochem Soc Trans* 2003, 31:770-773.
- 130 Davies EJ, The LS, Ord J: A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythromatosus in Spanish populations *J Rheumatol* 1997, 24:485-488.
- 131 Aittoniemi J, Baer M, Soppi E, Vosikari T, Miettinen A. Mannan-binding lectin deficiency and contaminant immunodefects *Arch Dis Child* 1998, 78:245-248.
- 132 Nuytinck L, Shapiro F. Mannose-binding lectin: laying the stepping stones from clinical research to personalized medicine: an overview *Personalized Med* 2004, 1:35-52.
- 133 Hoal-Van Helden EG, Epstein J, Victor TC: Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis *Pediatr Res* 1999, 45:459-464.
- 134 Soborg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, Kok-Jensen A, Garred O. Mannose-

-
- binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis *J Infect Dis* 2003, 188:777-782.
- 135 Santos LK, Costa CH, Krieger H. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis *Infect Immun* 2001, 69:5212-5215.
- 136 Garred P, Stram J, Quist L. Association of Mannose-binding lectin polymorphisms with Sepsis and Fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome *The journal of infectious diseases* 2003: 188:1394-1398.
- 137 Madsen H.O, Videm A. Association of mannose-binding lectin deficiency with severe atherosclerosis *Lancet* 1998: 352:956-960.
- 138 Rajagpalan R, Salvi VP, Jensenius JC, Ramal N. New insights on the structural/functional properties of recombinant human mannan-binding lectin and its variants *Immunology Letters* 2009, 123:114-124.
- 139 Neth O, Jack DL, Dodds A, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition *Infect Immun* 2000, 68:688-693.
- 140 Van Emmerik LC, Kuijper EJ, Fljen CA, Dankert J, Thiel S. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis *Clin Exp Immunol* 1994, 97:411-416.
- 141 Davies J, Neth O, Alton E, Klein N, Turner M. Differential binding of mannose binding lectin in respiratory pathogens in cystic fibrosis *Lancet* 2000, 355:1885-1886.
- 142 Swanson AF, Ezekowitz RA, Lee A, Kuo CC. Human mannose binding protein inhibits infection of HeLa cells by Chlamydia trachomatis *Infect Immun* 1998, 66:1607-1612.
- 143 Fisher PB, Eriksen S, Thiel S, Jensenius JC, Mogensen SC. Mannan-binding protein and bovine conglutinin mediate enhancement of herpes simplex virus type 2 infection in mice *Scand J Immunol* 1994, 39:439-445.
- 144 Kelly P, Jack DL, Naeem A, Mandanda B, Pollok RC, Klein NJ, Turner MW, Farthing MJ. Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against Cryptosporidium parvum in AIDS *Gastroenterology* 2000, 119:1236-1242.
- 145 Klabunde J, Uhlemann AC, Tebo AH. Recognition of Plasmodium falciparum proteins by mannan-binding lectin, a component of the human Innate Immune system *Parasitol Res* 2002, 88:113-117.
- 146 Kahl SJ, Wleklinski M, Ezekowitz RA, Coder D, Aruffo A. The major surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi amastigotes are ligands of the human serum mannose binding protein *Infect Immun* 1996, 64:2649-2556.
- 147 Jack DL, Read RC, Tenner AJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B *J Infect Dis* 2001, 184:1152-1162.
- 148 de Vries FP, van De Ende A, van Putten JP, Dankert J. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens *Infect Immun* 1996, 64:2998-3006.
- 149 Hibberd ML, Sumija M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease Meningococcal Research Group *Lancet* 1999, 353:1049-1053.
- 150 Garred P, Michaelsen TE, Bjune G, Thiel S, Svejgaard A. A low serum concentration of mannan-binding protein is not associated with serogroup B or C meningococcal disease *Scand J Immunol* 1993, 37:468-470.
- 151 Garred P, Madsen HO, Svejgaard A, Michaelsen TE. Mannose-binding lectin and meningococcal disease *Lancet* 1999, 354:336.
- 152 Roy S, Knox K, Segal S. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study *Lancet* 2002, 359:1569-1573.
- 153 Kronborg G, Weis N, Madsen HO. Variant mannose-binding lectin alleles are not associated with susceptibility to or outcome of invasive pneumococcal infection in

-
- randomly included patients *J Infect Dis* 2002, 185: 1517-1520.
- 154 Endeman H, Herpers BL, de Jony BAW, Voorn GP, Crutters JC, van Velzen-Blud H, Biesma DH. Mannose-Binding Lectin Genotypes in Susceptibility to Community-Acquired Pneumonia *CHEST* 2008, 134: 1135-1140.
- 155 Madsen H.O, Videm A. Association of mannose-binding lectin deficiency with severe atherosclerosis *Lancet* 1998, 352: 956-960.
- 156 Nagy A, Kozma GT, Keszei M, Treszi A, Falus A, Szalai C. The development of asthma in children infected with Chlamydia pneumoniae is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin *J Allergy Clin Immunol* 2003, 112: 729-734.
- 157 Cross CE, Bancroft GJ. Ingestion of acapsular Cryptococcus neoformans occurs via mannose and β -glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form *Infect Immun* 1995, 63: 2604-2611.
- 158 Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis *Immunol Rev* 2001, 180: 86-99.
- 159 Ip WK, Lau YL. Role of mannose-binding lectin in the innate defense against Candida Albicans enhancement of complement activation, but lack of opsonic function, in phagocytosis by human dendritic cells. *J Infect. Dis* 2004, 190: 632-640.
- 160 Crosdale DJ, Poulton KV, Ollier WE, Thomson W, Denning DW. Mannose-binding lectin gene polymorphisms as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergillosis *J Infect Dis* 2001, 184: 653-656.
- 161 Saifuddin M, Hart ML, Gewurz H, Zhang Y, Spear GT. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 *J Gen Virol* 2000, 81: 949-955.
- 162 Garred P, Madsen HO, Balsev U. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin *Lancet* 1997, 349: 236-240.
- 163 Garred P, Richter C, Andersen AB. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics *Scand J Immunol* 1997, 46: 204-208.
- 164 Nielsen SL, Andersen PL, Kock C, Kensenius JC, Thiel S. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody positive patients *Clin Exp Immunol* 1995, 100: 219-222.
- 165 Kniphoff da Silva G, Guimaraes R, Matteri RS, Lazzaretti RK, Sprinz E, Kuhmmer R, Brandao L, Crivella S. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infections in Southern Brazilians patients *AIDS* 2011, 25: 411-418.
- 166 Amoroso A, Berrino M, Boniotto M. Polymorphism at codon 54 of mannose-binding protein influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children *AIDS* 1999, 13: 863-864.
- 167 Yuen MF, Lau CS, Lau YL. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection *Hepatology* 1999, 29: 1248-1251.
- 168 Thomas HC, Foster GR, Sumija M. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection *Lancet* 1996, 348: 1417-1419.
- 169 Hohler T, Wunschel M, Gerken G. No association between mannose-binding lectin alleles and susceptibility to chronic hepatitis B infection in German patients *Exp Clin Immunogenet* 1998, 15: 130-133.
- 170 Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection *Scand J Gastroenterol* 2000, 35: 960-965.
- 171 Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Association of mannose binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients *J Hepatol* 1998, 29: 695-700.
- 172 Halla MC, Carmo RF, Vasconcelos LRC, Pareira LB, Moura P, Siqueira ERF, Pereira LMB, Cavalanti MSM. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with

-
- the variants alleles of MBL2 gene in Brazilians population *Human Immunology* 2010, 71:883-887.
- 173 Jacobson S, Madsen HO, Klarlund M, Jensen T, Skjudt H, Jensen KE, Svejgaard A, Garred P. The influence of mannose binding polymorphism on disease outcome in early polyarthritis *J Rheumatol* 2001, 28:935-942.
- 174 Ip WK, Lau YL, Chan SY, Mok CC, Chan D, Tong KK, Lau CS. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in Southern Chinese *Arthritis Rheum* 2000, 43:1679-1687.
- 175 Gupta B, Agrawal C, Raghar SK, Das SK, Das RH, Charutredi VP, Das HR. Association of mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphisms with rheumatoid arthritis in an Indian cohort of case-control samples *J Human Genet* 2005, 50:583-591.
- 176 Kilpatrick DC. Mannan-binding protein in sera positive for rheumatoid factor *Br J Rheumatol* 1998, 36:207-209.
- 177 Stanworth SJ, Donn RP, Hassal A, Dawes P, Ollier W, Snowden N. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis *Br J Rheumatol* 1998, 37:186-188.
- 178 van de Geijn FE, Hazes JMW, Geleijns K, Emonts M, Jacobs BC, Dufour-van den Goorbergh, Dolhain JEM. Mannose-binding lectin polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis-confirmation in two large cohorts *Rheumatology* 2008, 47:1168-1171.
- 179 Garred P, Madsen HO, Marquart H, Hansen TM, Sorensen SF, Peterson J, Volck B, Svejgaard A, Graudal NA, Rudd PM, Dwek RA, Sim RB, Andersen V. Two edged role of mannose-binding lectin in rheumatoid arthritis:a cross sectional study *J Rheumatol* 2000, 27:26-34
- 180 Graudal NA, Madsen HO, Tarp U, Svejgaard A, Jurik AG, Graudal HK, Garred P. The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1999, 43:515-521.
- 181 Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus *Lupus* 1995, 4:425-437.
- 182 Davies EJ, Snowden N, Hillarby MC, Carthy D, Grennan DM, Thomson W, Ollier WER. Mannose-binding lectin gene polymorphism in systematic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 1995, 38:110-114.
- 183 Jakab L, Laki J, Sallai K, Temesszentandras GY, Pozsonyi T, Kalabay L, Varga L, Gombos T, Blasko B, Biro A, Madsen HO, Radics j, Gergely P, Fust G, Czirjak L, Garred P, Fekete B. Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene *Clinical Immunology* 2007, 125:230-236.
- 184 Garcia RC, Brandao LAC, Coelh AVC, Guimaraes RL, Pancoto JAT, Segat L, Donadi EA, Filho JLL, Crovella S. Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in Southern Brazilians *Human Immunology* 2011, 72:516-521.
- 185 Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population- based cohort of systemic lupus erythematosus patients *Genes Immun* 2001, 2:442-450.
- 186 Bultink IEM, Hamman D, Seelen MA, Hart MH, Dijkmans BAC, Daha MR, Voskuyl AE. Deficiency of functional mannose-binding lectin is not associated with infections in patients with systemic lupus erythematosus *Arthritis Research* 2006, 8:6.
- 187 Garred P, Pressler T, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis *J Chim Invest* 1999, 104:431-437.
- 188 Davies JC, Turner MW, Klein N. Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles *Eur Respir J* 2004, 24:798-804.
- 189 Best LG, Davidson M, North KE. Prospective analysis of mannose-binding lectin genotypes

-
- and coronary artery disease in American Indians: the Strong Heart Study *Circulation* 2004, 109:471-475.
- 190 Hegele RA, Ban MR, Anderson CM, Spence JD. Infection susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area *J Invest Med* 2000, 48:198-202.
- 191 Ytting H, Jensenius JC, Christensen IJ, Thiel S, Nielsen HJ. Increased activity of the mannan-binding lectin complement activation in patients with colorectal cancer *Scand J Gastroenterol* 2004, 39:674-679.
- 192 Ahrens P, Kattner E, Kohler B. Genetic Factors in Neonatology Study Group. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants *Pediatr Res* 2004, 55:652-656.
- 193 de Benedetti F, Auriti C, D'Urbano LE. Low serum levels of mannose binding lectin are a risk factor for neonatal sepsis *Pediatr Res* 2007, 61:325-328.
- 194 Hilgendorff A, Heidinger K, Pfeiffer A. Association of polymorphisms in the mannose-binding lectin gene and pulmonary morbidity in preterm infants *Genes Immun* 2007, 8:671-677.
- 195 Swiertzko AS, Atkinson APM, Cedzynski M, MacDonald SL, Szala A, Domzalska-Popadiuk I, Borwoska-Klos M, Jopek A, Szczapa J, Matsushita M, Szemraj J, Turner ML, Kilpatrick DC. Two factors of the lectin pathway of complement, L-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates *Mol Immunol* 2009, 46:551-558.
- 196 van der Zwet WC, Catsburg A, van Elburg RM, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. Mannose-binding lectin (MBL) genotype in relation to risk of nosocomial infection in pre-term neonates in the neonatal intensive care unit *Clin Microbiol Infect* 2008, 14:130-135.
- 197 Tin S, Lee L, Thumboo J. PCR RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human Mannose Binding Lectin (MBL 2) gene. *J Immunol Methods* 2005, 303:148-151.
- 198 Steffansen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers *J Immunol Methods* 2000, 241:33-42.
- 199 Kuby J. "Immunology", 3rd Edition *W.H. Freeman & Co, New York* 1997,156-158.
- 200 Frakking FNJ, Brouwer N, Dolman KM, van Woensel JB, Caron HN, Kuijpers TW, van de Wetering MD. Mannose-binding lectin (MBL) as prognostic factor in paediatric oncology patients *Clin Exp Immunol* 2011, 165:51-59.
- 201 Frakking FNJ, Brouwer N, Zweers D, Merkus MP, Kuijpers TW, Offringa M, Dolman KM. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates *Clin Exp Immunol* 2006, 145:5-12.
- 202 Chroneos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL. Pulmonary surfactant: An immunological perspective *Cell Physiol Biochem* 2010, 25:13-26.
- 203 Halliday HL. Surfactants: past, present and future *J Perinatol* 2008, 28:547-556.
- 204 Gong MN, Zhou W, Williams PL, Thompson BT, Pothier L, Christiani DC. Polymorphisms in the mannose binding lectin-2 gene and acute respiratory distress syndrome *Crit Care Med* 2007, 35:48-56.
- 205 Garred P, Pressler T, Lanng S, Madsen HO, Moser C, Laursen I, Balstrup F, Koch C, Koch C. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease *Pediatr Pulmonol* 2002, 33:201-207.
- 206 Seaton BA, Crouch EC, McCormack FX, Head JF, Hartshorn KL, Mendelsohn R. Review: Structural determinants of pattern recognition by lung collectins *Innate Immun* 2010, 16:143-150.

-
- 207 El Saleeby CM, Li R, Somes GW, Dahmer MK, Quasney MW, DeVincenzo JP. Surfactant protein A2 polymorphisms and disease severity in a respiratory syncytial virus-infected population *J Pediatric* 2010, 156:409-414.
- 208 Floros J, Fan R, Matthews A, DiAngelo S, Luo J, Nielsen H, Dunn M, Gewolb IH, Koppe J, van Sonderen L, Farri-Kostopoulos L, Tzaki **M, Rămet M, Merrill J**. Family-based transmission disequilibrium test (TDT) and case-control association studies reveal surfactant protein A (SP-A) susceptibility alleles for respiratory distress syndrome (RDS) and possible race differences *Clin Genet* 2001, 60:178-187.
- 209 Floros J, Lin HM, Garcia A, **Salazar MA, Guo X, DiAngelo S, Montañó M, Luo J, Pardo A**, Selman M. Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population *J Infect Dis* 2000, 182:1473-1478.
- 210 Eggleton P, Reid KBM. Lung surfactant proteins involved in innate immunity *Current Opin Immunol* 1999, 11:28-33.
- 211 Duus K, Thielens NM, Lacroix M, Tacnet P, Frachet P, Holmskov U, Houen G. CD91 interacts with mannan-binding lectin (MBL) through the MBL-associated serine protease-binding site *FEBS* 2010, 277:4956-4964.
- 212 Palaniyar N, Nadesalingam J, Clark H, Shih MJ, Dodds AW, Reid KBM. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immunity pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin *J Biol Chem* 2004, 279:32728-32736.
- 213 G. Iordanakis, A. Gounaris, K. Konstantinidi, E. Tsitsami, A.E. Germenis, and M. **Speletas**, "Mannose-binding lectin (MBL) deficiency in neonates as a predisposing factor to respiratory distress syndrome," *Genetics in Medicine*, in press.
- 214 Smithson A, Perello R, Aibar J, Espinosa G, Tassies D, Freire C, Castro P, Suarez B, Lozano F, Nicolas JM. Genotypes coding for low serum levels of mannose-binding lectin are underrepresented among individuals suffering from noninfectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Vaccine Immunol*, 2010 17:447-453.