



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

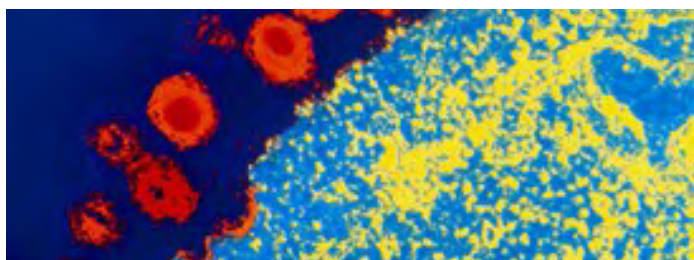


ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ
Διευθύντρια: Καθηγήτρια Δέσποινα Κυριάκου

Διδακτορική Διατριβή

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΕΡΠΗΤΟΪΩΝ ΣΕ
ΥΓΙΕΙΣ ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΤΑΓΓΙΖΟΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΣΤΟΝ
ΕΥΡΥΤΕΡΟ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ"**

ΥΠΟ
ΕΡΑΣΜΙΑ Χ. ΡΟΥΚΑ
ΒΙΟΛΟΓΟ



Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα, 2015

© 2015 Ερασμία Ρούκα

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των
απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Πηγή εικόνας εξωφύλλου: www.hhv-6foundation.org

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (3^η/12-11-2014 ΓΣΕΣ):

1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπουσα)

Δρ. Δέσποινα **Κυριάκου**
Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ασπασία **Τσέζου**
Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Μιχάλης **Αλεξανδράκης**
Καθηγητής Κλινικής Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Χριστίνα **Κατσιάρη**
Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας-Ρευματολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Χρήστος **Παπανδρέου**
Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Λάζαρος **Σακκάς**
Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ιωάννης **Στεφανίδης**
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής των Μεταγγίσεων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα Δέσποινα Κυριάκου για την ανάθεση του θέματος, την συνεχή καθοδήγηση και συμπαράσταση της. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τη καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, κα Ασπασία Τσέζου καθώς και τον καθηγητή Κλινικής Αιματολογίας, κο Μιχάλη Αλεξανδράκη για την συμβουλευτική καθοδήγηση και προθυμία τους να συζητήσουν οποιαδήποτε απορία ή θέμα προέκυπτε. Θερμές ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την επίκουρη καθηγήτρια Παθολογίας-Ρευματολογίας κα Χριστίνα Κατσιάρη, τον καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας, κο Χρήστο Παπανδρέου, τον καθηγητή Παθολογίας-Ρευματολογίας, κο Λάζαρο Σακκά καθώς και τον καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας, κο Ιωάννη Στεφανίδη για την προθυμία τους να συμμετέχουν στην κριτική ανάγνωση και την τελική κρίση της διδακτορικής μου διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Αχιλλέα Μανάφα, τεχνολόγο ιατρικών εργαστηρίων στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας για την διάθεση των δειγμάτων των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών.

Ερασμία Ρούκα

Στους γονείς μου

Στον αδερφό μου

Στον σύζυγο μου

Στους γιούς μου

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: ΡΟΥΚΑ
ΟΝΟΜΑ: ΕΡΑΣΜΙΑ
ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ: ΧΡΗΣΤΟΣ
ΜΗΤΡΩΝΥΜΟ: ΜΑΡΙΑΝΘΗ
ΗΜΕΡ. ΓΕΝ.: 29-04-1976
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝ.: ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ
ΟΙΚΟΓ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: ΕΓΓΑΜΗ
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ: ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ
ΟΔΟΣ: ΠΡΑΞΙΤΕΛΟΥΣ

ΑΡΙΘΜ.: 14
ΠΟΛΗ: ΑΜΠΕΛΩΝΑΣ ΛΑΡΙΣΑΣ
Τ.Κ.: 40400
ΝΟΜΟΣ: ΛΑΡΙΣΑΣ
ΤΗΛ.: 24920-32561
ΚΙΝΗΤΟ: 6977-690694
E-MAIL: eri.rouka@gmail.com

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΟΔΟΣ: Π.Γ.Ν.ΛΑΡΙΣΑΣ
ΜΕΖΟΥΡΛΟ-ΒΙΟΠΟΛΙΣ

ΑΡΙΘΜ.:
ΠΟΛΗ: ΛΑΡΙΣΑ
Τ.Κ.: 41110
ΝΟΜΟΣ: ΛΑΡΙΣΑΣ
ΤΗΛ.: 2413-502258

ΣΠΟΥΔΕΣ

ΠΤΥΧΙΟ 1^ο

ΙΔΡΥΜΑ

ΣΧΟΛΗ – ΤΜΗΜΑ
ΕΤΟΣ ΑΠΟΦΟΙΤΗΣΗΣ
ΒΑΘΜΟΣ ΠΤΥΧΙΟΥ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ
1999
8.3

ΠΤΥΧΙΟ 2^ο

ΙΔΡΥΜΑ
ΣΧΟΛΗ – ΤΜΗΜΑ

ΕΤΟΣ ΑΠΟΦΟΙΤΗΣΗΣ
ΒΑΘΜΟΣ ΠΤΥΧΙΟΥ

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣ/ΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ-ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
2005
7.83

14/12/09-22/3/10 Τρίμηνη Διαδικτυακή Εκπαίδευση-Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Πιστοποιητικό Επιμόρφωσης στο πρόγραμμα<Βασικές αρχές του καρκίνου από την Επιδημιολογία ως την Θεραπεία>

27/09/10-01/10/10 Imperial College London: Advances in haematology course

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

ΙΔΡΥΜΑ
ΣΧΟΛΗ – ΤΜΗΜΑ

ΕΤΟΣ ΑΠΟΦΟΙΤΗΣΗΣ
ΒΑΘΜΟΣ ΠΤΥΧΙΟΥ
ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ

2014
9.09
Διερεύνηση των συστατικών των στεγανών
συνδέσμων ως γονιδιακών βιοδεικτών στο
κακόηθες μεσοθηλίωμα μετά από έκθεση στον
αμίαντο
10

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΠΛΩΜ. ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΥΠΟΤΡΟΦΙΑ:

Απρίλιος 2014
European society of clinical virology
Workshop "Techniques in Clinical Virology"

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΓΛΩΣΣΑ
1. ΑΓΓΛΙΚΑ
2. ΓΑΛΛΙΚΑ

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ – ΕΠΙΠΕΔΟ
LOWER
CERTIFICAT DE LANGUE FRANCAIS

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Rouka E, Kyriakou D. Molecular epidemiology of human Herpesviruses types 1-6 and 8 among Greek blood donors.
Transfus Med. 2015. doi: 10.1111/tme.12202.

2. Mitrakas LP, Zachos IV, Tzortzis VP, Gravas SA, Rouka EC, Dimitropoulos KI, Vandonos GP, Karatzas AD, Melekios MD, Papavassiliou AG. Previous Bladder Cancer History in Patients with High-Risk, Non-muscle-invasive Bladder Cancer Correlates with Recurrence and Progression: Implications of Natural History.
Cancer Res Treat. 2014. doi: 10.4143/crt.2014.050

3. Klonizakis P, Tselios K, Sarantopoulos A, Gougourellas I, Rouka E, Onufriadou Z, Kapali P, Kyriakou D, Boura P. ADAMTS-13 metalloprotease abnormalities in systemic lupus erythematosus: is there a correlation with disease status?

Lupus. 2013. doi: 10.1177/0961203313477898.

4. Siapati EK, Rouka E, Kyriakou D, Vassilopoulos G. Neuroblastoma cells negative for CD44 possess tumor-initiating properties

Cell Oncol (Dordr). 2011. doi: 10.1007/s13402-011-0022-z

5. Siapati EK, Papadaki M, Kozaou Z, Rouka E, Michali E, Savvidou I, Gogos D, Kyriakou D, Anagnostopoulos NI, Vassilopoulos G. Proliferation and bone marrow engraftment of AML blasts is dependent on β -catenin signalling.

Br J Haematol. 2011. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08471.x..

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ, ΣΥΜΠΟΣΙΑ, ΗΜΕΡΙΔΕΣ

1. 20^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Προφορική ανακοίνωση <Προφίλ έκφρασης των γονιδίων της οδού του NFκΒ σε μυελοδυσπλαστικά και μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα με τεχνολογία pcr-arrays>Αίμα(ΗΑΕΜΑ),Volume12,supplement1,page:93

2. 20^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Προφορική ανακοίνωση <Μοριακή ανίχνευση των ερπητοϊών σε τυχαίο δείγμα αιμοδοτικού πληθυσμού της Κεντρικής Ελλάδας με αλυσιδωτή, σε πραγματικό χρόνο, αντίδραση της πολυμεράσης>Αίμα(ΗΑΕΜΑ),Volume 12,supplement 1,page:156

3. ASH 2008 <Association of ADAMTS 13 Activity with Gender in Normal Adult Cohort> Publication only, Blood,Volume 112 Issue 11,abs 4554

4. ASH 2009 < AML Survival and In Vivo Progression Is Dependent On β -Catenin Signaling.> Poster, Blood,Volume 114,Issue 22,abs 2398

5. ISBT 2010 <Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus prevalence and viral load in healthy blood donors of central Greece by quantitative real time polymerase chain reaction> Poster, Vox Sanguinis 2010,Volume 99,[suppl1]:316,abs 0609

6. ISBT 2011 <PCR detection of Herpesviruses types 1,2,3,6 and 8 in whole blood obtained from healthy blood donors of Central Greece> Poster, Vox Sanguinis 2011, Volume 101, [supp 1]:235, abs 387

7. FEBS 2013 <Computational transcriptomic analysis of claudins in malignant pleural mesothelioma reveals significant correlations in their gene expression patterns> Poster, Febs Journal 2013, Volume 280, Issue Supplement s1, abs SW06.W29–47

8. 25^ο Πανελλήνιο αιματολογικό συνέδριο <Επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων BIM και DOK1 από τον ιό EBV. Αναζήτηση νέων γονιδίων-στόχων του ιού με υπολογιστική ανάλυση >

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

ΤΜΗΜΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
ΛΑΡΙΣΑΣ
ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ ΤΕ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΠΕ

ΠΕΡΙΟΔΟΣ

14-06-2002 ΕΩΣ 05-05-2008
05-05-2008 ΕΩΣ ΣΗΜΕΡΑ

***"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΕΡΠΗΤΟΪΩΝ ΣΕ
ΥΓΙΕΙΣ ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΤΑΓΓΙΖΟΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΣΤΟΝ
ΕΥΡΥΤΕΡΟ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ"***

ΕΡΑΣΜΙΑ ΡΟΥΚΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Δέσποινα Κυριάκου**, Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπουσα)**,
2. **Δρ. Ασπασία Τσέζου**, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Μιχάλης Αλεξανδράκης**, Καθηγητής Κλινικής Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Πίνακας Περιεχομένων

Συντομογραφίες.....	15
Περίληψη.....	18
Abstract.....	21
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
Εισαγωγή.....	24
1. Ταξινόμηση των ανθρώπινων ερπητοϊών (HHVs).....	25
2. Δομή των ερπητοϊών.....	26
3. Οργάνωση του γονιδιώματος των ερπητοϊών.....	28
4. Κύκλος ζωής των ερπητοϊών.....	29
4.1 Λυτικός κύκλος.....	29
4.2 Λανθάνουσα μόλυνση.....	33
5. Παθογένεση και παθολογία των ερπητικών λοιμώξεων.....	42
5.1 Λοιμώξεις προκαλούμενες από ερπητοϊούς της α υπό- οικογένειας.....	43
5.2 Λοιμώξεις προκαλούμενες από ερπητοϊούς της β υπό- οικογένειας.....	45
5.3 Λοιμώξεις προκαλούμενες από ερπητοϊούς της γ υπό- οικογένειας.....	50

6. Εφαρμογές της συστημικής βιολογίας και βιοπληροφορικής στην κλινική ιολογία.....	55
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
1. Σκοπός.....	57
2. Υλικό της μελέτης.....	58
3. Μέθοδοι.....	60
3.1 Συλλογή φλεβικού αίματος.....	61
3.2 Απομόνωση του ολικού DNA.....	61
3.3 Ποσοτική, σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	66
3.4 Στατιστική ανάλυση.....	74
3.5 Υπολογιστική-Βιοπληροφορική ανάλυση.....	76
4. Αποτελέσματα.....	77
4.1 Ανίχνευση των ανθρώπινων ερπητοϊών στον υγιή πληθυσμό (N ₁).....	77
4.2 Ανίχνευση των ανθρώπινων ερπητοϊών στον πληθυσμό των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών (N ₂).....	84
4.3 Σύγκριση των δύο πληθυσμών ως προς την συχνότητα ανίχνευσης του EBV ή CMV DNA.....	89
4.4 Κατασκευή και λειτουργική ανάλυση του γονιδιακού δικτύου BIM. Αναγνώριση νέων γονιδίων-πιθανών στόχων του EBV.....	95
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	102
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	111

Συντομογραφίες

AD: Alzheimer's Disease, νόσος Alzheimer

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας

ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis, πλάγια μυατροφική σκλήρυνση

BCR: B-cell Receptor, υποδοχέας B κυττάρων

BIM: BCL2-like 11 (apoptosis facilitator), διαμεσολαβητής της απόπτωσης

BL: Burkitt Lymphoma, λέμφωμα Burkitt

CR2: Complement receptor 2, υποδοχέας συμπληρώματος 2

DNA: Deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

DR: Direct Repeats, οι ευθείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδιώματος των ερπητοϊών

EBERs: Epstein-Barr virus-encoded small RNAs, μικρά RNAs που κωδικοποιούνται από τον EBV

EBNAs: Epstein-Barr Nuclear Antigens, πυρηνικά αντιγόνα του EBV

EBV: Epstein-Barr virus, ιός Epstein-Barr

EGFR: Epidermal growth factor receptor, υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα αύξησης

gD: glycoprotein D, γλυκοπρωτεΐνη D

GVHD: Graft Versus Host Disease, νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή

HCF: Host Cell Factor, παράγοντας κυττάρου-ξενιστή

HCMV: Human Cytomegalovirus, ανθρώπινος Μεγαλοκυτταροϊός

HCV: Hepatitis C Virus, ιός της ηπατίτιδας C

HD: Huntington's Disease, νόσος του Huntington

HDACs: Histone Deacetylases, άποακετυλάσες των ιστονών

HHVs: Human Herpesviruses, ανθρώπινοι ερπητοϊοί

HIV: Human Immunodeficiency Virus, ιός ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου

HL: Hodgkin Lymphoma, λέμφωμα Hodgkin

HS: Heparan Sulfate,θειϊκή ηπαράνη

HSCs: Hematopoietic Stem Cells, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα

HSPG: Heparan Sulfate Proteoglycans, πρωτεογλυκάνες της θειϊκής ηπαράνης

HSV: Herpes Simplex Virus, έρπητας απλού τύπου

IE (genes): Immediate Early, πολύ πρώιμα γονίδια ή α γονίδια των ερπητοϊών, μεταγράφονται αμέσως μετά την είσοδο του ιϊκού DNA στον κυτταρικό πυρήνα

IR: Inverted Repeats, οι ανάστροφες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδιώματος των ερπητοϊών

KSHV: Kaposi Sarcoma Herpes Virus, ιός που σχετίζεται με το σάρκωμα Kaposi

LAT: Latency Associated Transcripts, τα μετάγραφα των ερπητοϊών που συσσωρεύονται στα κύτταρα του ξενιστή κατά τη λανθάνουσα μόλυνση

LMPs: Latent Membrane Proteins, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται από τον EBV κατά τη λανθάνουσα μόλυνση

MDBP: Major DNA Binding Protein, σημαντική πρωτεΐνη πρόσδεσης στο ιϊκό DNA, απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού DNA

MIEA: Major Immediate Early Antigen, πολύ πρώιμο αντιγόνο

MS: Multiple Sclerosis, σκλήρυνση κατά πλάκας

NGF: Nerve Growth Factor, αυξητικός παράγοντας νEURων

NHLs: Non-Hodgkin Lymphomas, μη Hodgkin λέμφωμα

NPC: Nasopharyngeal carcinoma, ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα

OR: Odds Ratio, λόγος πιθανοτήτων

ORF: Open Reading Frame, ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

PBL: Plasmablastic Lymphoma, πλασμαβλαστικό λέμφωμα

PCNSL: Primary Central Nervous System Lymphoma, πρωτοπαθές λέμφωμα κεντρικού νευρικού συστήματος

PD: Parkinson Disease, νόσος του Parkinson

PEL: Primary Effusion Lymphoma, πρωτοπαθές εξιδρωματικό λέμφωμα

PTLD: Post transplant lymphoproliferative disease, λεμφοϋπερπλαστική νόσος μετά από μεταμόσχευση

qRT-PCR: quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, ποσοτική, σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

RA: Rheumatoid Arthritis, ρευματοειδής αρθρίτιδα

RNA: Ribonucleic acid, ριβονουκλεϊνικό οξύ

SLE: Systemic Lupus Erythematosus, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

UL: Unique Long, οι μοναδικές μεγάλες αλληλουχίες του γονιδιώματος των ερπητοϊών

US: Unique Short, οι μοναδικές μικρές αλληλουχίες του γονιδιώματος των ερπητοϊών

VCA: Viral Capsid Antigen, ιϊκό καψιδικό αντιγόνο

VZV: Varicella Zoster Virus, ιός του έρπητα ζωστήρα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι ανθρώπινοι ερπητοϊοί (HHVs) είναι δίκλωνοι DNA ιοί, που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να λαθροβιούν στα κύτταρα του ξενιστή τους κυρίως μέσω μηχανισμών αποφυγής της ανοσιακής του απόκρισης. Τόσο οι πρωτοπαθείς όσο και οι δευτεροπαθείς HHV λοιμώξεις έχουν συσχετιστεί με μεγάλη νοσηρότητα και θνητότητα στους μη ανοσοϊκανούς ασθενείς. Παράλληλα οι HHVs τύπου 4 και 8 είναι γνωστοί για την ογκογονικότητά τους. Σκοπός: Ο σκοπός διεξαγωγής της παρούσας

μελέτης ήταν: 1. Η διερεύνηση του μοριακού επιπολασμού των HHVs1-6 και 8 σε πληθυσμιακό δείγμα Ελλήνων αιμοδοτών 2. Η διερεύνηση του μοριακού επιπολασμού των HHVs 4-5 σε πληθυσμιακό δείγμα Ελλήνων ασθενών με μεσογειακή αναιμία 3. Η σύγκριση των δύο πληθυσμών ως προς το ποσοστό μοριακής ανίχνευσης των HHVs 4-5 ώστε να διερευνηθεί η πιθανότητα μετάδοσης τους μέσω των μεταγγίσεων 4. Η συσχέτιση της μοριακής ανίχνευσης των HHVs με δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων και, 5. Η αναζήτηση και λειτουργική ανάλυση νέων γονιδίων-πιθανών στόχων του HHV-4. Υλικά και Μέθοδοι: Μελετήθηκε με τη μέθοδο της τυχαίας δειγματοληψίας πληθυσμός $N_1=401$ υγιών αιμοδοτών καθώς και πληθυσμός $N_2=76$ ασθενών με μεσογειακή αναιμία. Το DNA των HHVs αναζητήθηκε σε δείγματα ολικού αίματος. Για κάθε ιό χρησιμοποιήθηκε ειδική αντίδραση ενίσχυσης της γονιδιακής ακολουθίας με προτυποποιημένες εμπορικές δοκιμασίες. Για κάθε πληθυσμό υπολογίσθηκαν τα ποσοστά ανίχνευσης του γονιδιώματος των HHVs καθώς και η κατανομή τους ανά φύλο, ηλικία και οικογενειακή κατάσταση. Οι μέσες τιμές συνεχών μεταβλητών μεταξύ δύο ανεξάρτητων δειγμάτων συγκρίθηκαν μέσω του t-test. Για τον έλεγχο της σχέσης ποιοτικών μεταβλητών κατά ζεύγη χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ χ^2 . Για την εκτίμηση της πιθανότητας ανίχνευσης ή μη του γονιδιώματος με βάση την ύπαρξη όλων των ανεξάρτητων μεταβλητών, ποιοτικών και ποσοτικών, χρησιμοποιήθηκε η παλίνδρομη ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών. Για την ανεύρεση νέων γονιδίων-στόχων του HHV-4 κατασκευάστηκε το δίκτυο αλληλεπίδρασης του διαμεσολαβητή της απόπτωσης BIM που καταστέλλεται επιγενετικά από τον HHV-4 ενώ πραγματοποιήθηκε και ανάλυση της πιθανής λειτουργίας των εμπλεκόμενων στο δίκτυο γονιδίων με την εφαρμογή σύγχρονων εργαλείων βιοπληροφορικής. Αποτελέσματα: Τα ποσοστά ανίχνευσης (%) των HHVs 4-6 και 8 στον υγιή πληθυσμό ήταν 21.2, 0.25, 3.5 και 0.5 αντίστοιχα. Οι HHVs 1-3 δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα από τα 401 δείγματα του πληθυσμού N_1 . Τόσο σε μονοπαραγοντική όσο και σε πολυπαραγοντική ανάλυση διαπιστώθηκε ότι ο τόπος κατοικίας σχετίζεται με την πιθανότητα ανίχνευσης του HHV-4 DNA ($p=0.037$ και $p=0.025$ αντίστοιχα). Στους πάσχοντες, σε 14 από τα 76 εξεταζόμενα δείγματα ανιχνεύτηκε HHV-4 DNA (18.42%) ενώ HHV-5 DNA ανιχνεύτηκε σε ένα δείγμα (1.315%). Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στον μοριακό επιπολασμό του HHV-4 μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Δεν κρίθηκε σκόπιμη η σύγκριση του μοριακού επιπολασμού του HHV-5 λόγω της πολύ μικρής συχνότητας ανίχνευσης. Από την βιοπληροφορική ανάλυση βρέθηκε, ότι συνολικά 59 γονίδια συνθέτουν το ρυθμιστικό δίκτυο του BIM. Τα γονίδια αυτά όπως προέκυψε από την

οντολογική ανάλυση συμμετέχουν σε κυτταρικά μονοπάτια, που σχετίζονται με την καρκινογένεση, τις λοιμώξεις από άλλους μολυσματικούς παράγοντες όπως η φυματίωση και η τοξοπλάσμωση καθώς και με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση και η ασθένεια Huntington. Συμπεράσματα: Ο επιπολασμός του DNA των HHVs1-3 σε κύτταρα ολικού αίματος υγιών Ελλήνων αιμοδοτών είναι μηδενικός παρόμοια με τις αναφορές, που υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία για αντίστοιχους πληθυσμούς. Ομοίως, σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία ο επιπολασμός του DNA των HHVs 5 και 8 είναι εξαιρετικά μικρός. Ο μοριακός επιπολασμός του HHV-4 κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα ενώ του HHV-6 σε μικρότερα επίπεδα από αυτά που αναφέρονται διεθνώς. Η συχνότητα ανίχνευσης του HHV-4 στον πληθυσμό των ασθενών με μεσογειακή αναιμία δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτή των υγιών γεγονός που υποδηλώνει ότι η λευκαφαίρεση των προς μετάγγιση μονάδων αίματος παρέχει σημαντική προστασία από τη μετάδοση του ιού. Η βιοπληροφορική ανάλυση ανέδειξε νέα γονίδια-πιθανούς στόχους του HHV-4, που θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω για τον ρόλο τους στην παθογένεση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων.

ABSTRACT

Introduction: Human Herpesviruses (HHVs) are double-stranded DNA viruses that are characterized by the ability to persist for a life in the host cells mainly through mechanisms capable of avoiding immune responses. Both primary and secondary HHV s infections are associated with high morbidity and mortality in non immunocompetent patients. In addition, HHVs types 4 and 8 are known for their tumorigenicity. Aim: This study aimed: 1. To investigate the prevalence of HHVs types 1-6 and 8 in a population of Greek blood donors 2. To investigate the prevalence of HHVs types 4 and 5 in a

population of Greek patients with thalassemia 3. To compare the two populations with respect to the detection rate of HHVs 4-5 DNA. 4. To correlate HHVs molecular detection with the demographic and clinical features of the studied population and, 5. To identify and functionally analyze novel genes that could be targeted by HHV-4. Materials and Methods: By the method of random sampling, a population of $N_1 = 401$ healthy blood donors and a population of $N_2 = 76$ patients with thalassemia were studied. Whole blood DNA was extracted. Specific gene amplification reactions were used for each virus by standardized commercial assays. For each population the detection rates of HHVs genome were assessed and arranged into strata with respect to sex, age and marital status. The mean values of continuous variables between two independent samples were compared using t-test. The chi-square test was used to compare counts of categorical responses between two independent groups. To assess the likelihood of the presence or not of HHVs genome based on all independent variables, qualitative and quantitative, multiple logistic regression was used. To find new host genes, potential targets of HHV-4, the interaction network of the tumor suppressor BIM which is epigenetically silenced by HHV-4 was built and functionally analysed by using contemporary bioinformatics tools. Results: The detection rates (%) of HHVs 4-6 and 8 in healthy Greek blood donors was 21.2, 0.25, 3.5 and 0.5 respectively. HHVs 1-3 were not detected in any of the 401 samples of population N_1 . Residency was found to affect the probability of HHV-4 DNA detection both in univariate and multivariate analysis ($p=0.037$ and $p=0.025$ respectively). Regarding patients population, HHV-4 DNA was detected in 14 of the 76 samples (18.42%) while HHV-5 DNA was detected in one sample (1.315%). The molecular prevalence of HHV-4 did not differ between patients and controls in a statistically significant manner. It was not considered appropriate to compare the molecular prevalence of HHV-5 due to the very low frequency of detection. Fifty nine unique genes were found to compose the BIM regulatory network. Ontological analysis at the pathway level highlighted cancer, infectious diseases like tuberculosis and toxoplasmosis and neuropathies such as Alzheimer disease, Amyotrophic lateral sclerosis, Huntington disease and Parkinson disease. Conclusions: HHVs 1-3 DNA is undetectable in whole blood cells of healthy Greek blood donors similar to the existing reports in the literature for respective populations. In agreement with the international literature, the prevalence of HHVs 5 and 8 DNA is extremely small. The molecular prevalence of HHVs types 4 and 6 varies at similar and lower levels respectively to those reported internationally. No statistically significant difference was observed in the

frequency of detection of HHV-4 among the population of patients with thalassemia and the population of healthy subjects suggesting that the leukodepletion of blood units provides significant protection against the virus. Bioinformatics analysis revealed new genes-potential host targets of HHV-4 that should be further explored for their role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Οι ερπητοϊοί (herpesviruses), αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη οικογένεια DNA ιών με ευρύτατη διάδοση στα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Το οικογενειακό τους όνομα, Herpesviridae, προέρχεται από την αρχαία Ελληνική γλώσσα (herpein = to creep or crawl : κινούμαι αθόρυβα, έρπω) και αναφέρεται στην ικανότητα τους να διατηρούνται σε λανθάνουσα κατάσταση στα κύτταρα του ξενιστή τους και να υποτροπιάζουν συχνά. Η ασθένεια του έρπητα πρωτοπεριγράφεται από τον Ιπποκράτη ενώ βλάβες παρόμοιες με αυτές τις οποίες προκαλεί ο ιός του έρπητα ζωστήρα (Varicella Zoster Virus) αναφέρονται σε κείμενα του Κέλσιου του 2^{ου} μ.Χ αιώνα. Ο γενετικός έρπητας περιγράφεται για πρώτη φορά ως κλινική οντότητα τον 18^ο μ.Χ αιώνα στη Γαλλία του Λουδοβίκου XV [1]. Οι ερπητοϊοί συμμετέχουν στο μέταγονιδίωμα του παγκόσμιου πληθυσμού κατά 70-100%. Η ικανότητα τους να διασφαλίζουν την επιβίωση τους μέσω ελέγχου των κυτταρικών και ανοσολογικών λειτουργιών του ξενιστή τους οδήγησε στην συσχέτιση τους με αυτοάνοσα νοσήματα και διάφορες μορφές καρκίνου. Οι ερπητοϊοί έχουν συν-εξελιχθεί και τροποποιήσει το αμυντικό σύστημα του κυττάρου στόχου [2].

1. Ταξινόμηση των ανθρώπινων ερπητοϊών (HHVs)

Από τα 100, γνωστά είδη ερπητοϊών, 8 έχουν αναγνωρισθεί ως παθογόνα για τον άνθρωπο και ταξινομούνται σε 3 υπο-οικογένειες με βάση την γενετική τους οργάνωση και ομολογία καθώς και τις βιολογικές τους ιδιότητες [3-4] (**Πίνακες 1 και 2**).

Πίνακας 1. Οι κοινοί κυτταρικοί τύποι, στους οποίους οι ανθρώπινοι ερπητοϊοί, ομαδοποιημένοι κατά οικογένεια, ξεκινούν μία παραγωγική-λυτική μόλυνση ή εγκαθιδρύουν μία λανθάνουσα κατάσταση. Πηγή: Penkert and Kalejta <i>Herpesviridae</i> 2011 2:3 , doi:10.1186/2042-4280-2-3			
Υπο-	ΙΟΣ	ΛΥΤΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ	ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ

οικογένεια			ΜΟΛΥΝΣΗ
α	HSV-1	Επιθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα	Νευρώνες
	HSV-2	Επιθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα	Νευρώνες
	VZV	Επιθηλιακά κύτταρα, κερατινοκύτταρα, Τ κύτταρα, μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά, κύτταρα Langerhans και μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC)	Νευρώνες
β	HCMV	Μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά, μαλακοί μύες, επιθηλιακά και ινοβλάστες	CD34+ πρόδρομα Αιμοποιητικά κύτταρα (HSC), Μονοκύτταρα
	HHV-6	T λεμφοκύτταρα	Πρόδρομα κύτταρα μυελού των οστών (BMP)
	HHV-7	T λεμφοκύτταρα	T λεμφοκύτταρα
γ	EBV	B λεμφοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα	B λεμφοκύτταρα
	KSHV	Λεμφοκύτταρα	B λεμφοκύτταρα

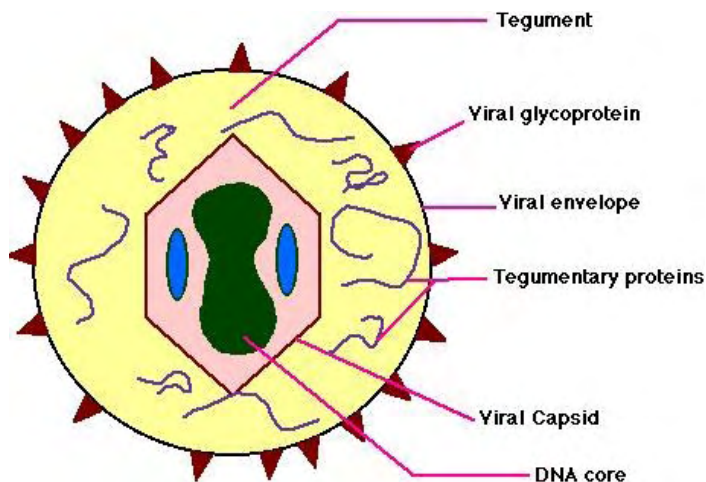
Πίνακας 2. Όνομα, υπο-οικογένεια και μέγεθος γενώματος των 8 ανθρώπινων ερπητοϊών. **Πηγή:** Straus S.E. Introduction to Herpesviridae. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. "Principles and practice of infectious diseases". Sixth edition. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone 2005

Herpesvirus	Όνομα	υπο-οικογένεια	Μέγεθος Γενώματος (kbp)
HHV-1	Herpes Simplex Virus-1	Άλφα	152
HHV-2	Herpes Simplex Virus-2	Άλφα	152
HHV-3	Varicella Zoster Virus	Άλφα	125
HHV-4	Epstein-Barr Virus	Γάμμα	172
HHV-5	Cytomegalovirus	Βήτα	229
HHV-6	Roseolovirus	Βήτα	165
HHV-7	-	Βήτα	145
HHV-8	Kaposi Sarcoma Herpes Virus	Γάμμα	165

2. Δομή των Ερπητοϊών

Το ιοσωμάτιο των ερπητοϊών συντίθεται από διακριτές μορφολογικά δομές [3]. Εξωτερικά, παρατηρείται ο φάκελος, μία λιπιδική διπλοστοιβάδα στην επιφάνεια της οποίας εξέχουν γλυκοπρωτεΐνες. Ο φάκελος είναι ευαίσθητος σε οξέα, απορρυπαντικά και οργανικούς διαλύτες, η δε καταστροφή του συνεπάγεται απώλεια της μολυσματικότητας του ιού. Ο φάκελος περιβάλλει το περίβλημα (tegument), μία δομή αποτελούμενη από πρωτεΐνες και ένζυμα απαραίτητα για

την παρεμπόδιση της ανοσοβιολογικής απόκρισης του ξενιστή και την διατήρηση της λανθάνουσας μόλυνσης. Ακολουθεί το καψίδιο, με διάμετρο 100-200nm, περιέχει 162 καψομερή και περικλείει το δίκλωνο, ευθύγραμμο, DNA [5]. Η δομή του ιοσωματίου παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1**.



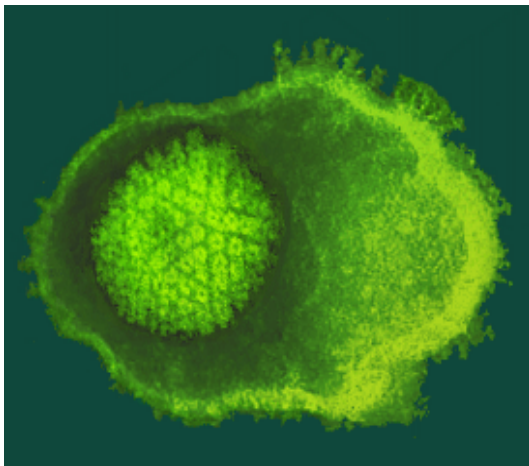
Εικόνα 1.Τυπική δομή ιοσωματίου ερπητοϊών.

Πηγή:

<http://biology.illinoisstate.edu/wanich/o/bsc361/lectures/24Herpesviridae.htm>

Αν ο φάκελος του ιού σπάσει και απομακρυνθεί από το καψίδιο, το ιοσωμάτιο

εμφανίζει χαρακτηριστική εικόνα 'τηγανητού αυγού' (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Αρνητική χρώση ιοσωματίου ερπητοϊού. Η μεμβράνη του ιού έχει αποκολληθεί από το καψίδιο.

Πηγή:

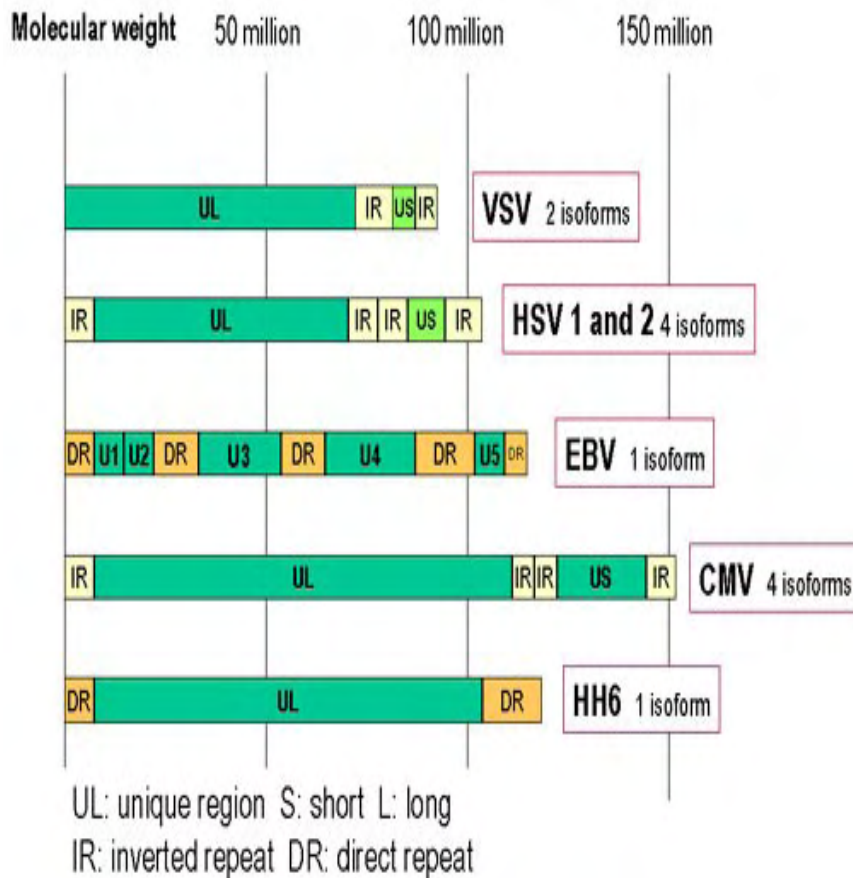
<http://www.microbiologybook.org/virol/herpes.htm>

3. Οργάνωση του γονιδιώματος των Ερπητοϊών

Το γονιδίωμα των Ερπητοϊών είναι δίκλωνο, ευθύγραμμο DNA με μέγεθος που κυμαίνεται από 125 (VZV) - 229 (CMV) kb pairs. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μοναδικών μεγάλων και μοναδικών μικρών περιοχών, στα άκρα των οποίων βρίσκονται ευθείες ή ανάστροφες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων (Repeats). Οι τελευταίες

ευνοούν την ανακατανομή (ανασυνδυασμό) του γενετικού υλικού με αποτέλεσμα στα μολυσμένα κύτταρα να απαντώνται συχνά ισομορφές του ίδιου ιού [6] (Εικόνα 3).

Εικόνα 3. Οργάνωση του γονιδιώματος των ερπητοϊών. Διακρίνονται οι μοναδικές μικρές και



μεγάλες περιοχές (US και UL αντίστοιχα) καθώς και οι ευθείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (DR) και οι ανάστροφες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (IR). **Πηγή:** <http://www.microbiologybook.org/virol/herpes.htm>

4. Κύκλος ζωής των Ερπητοϊών

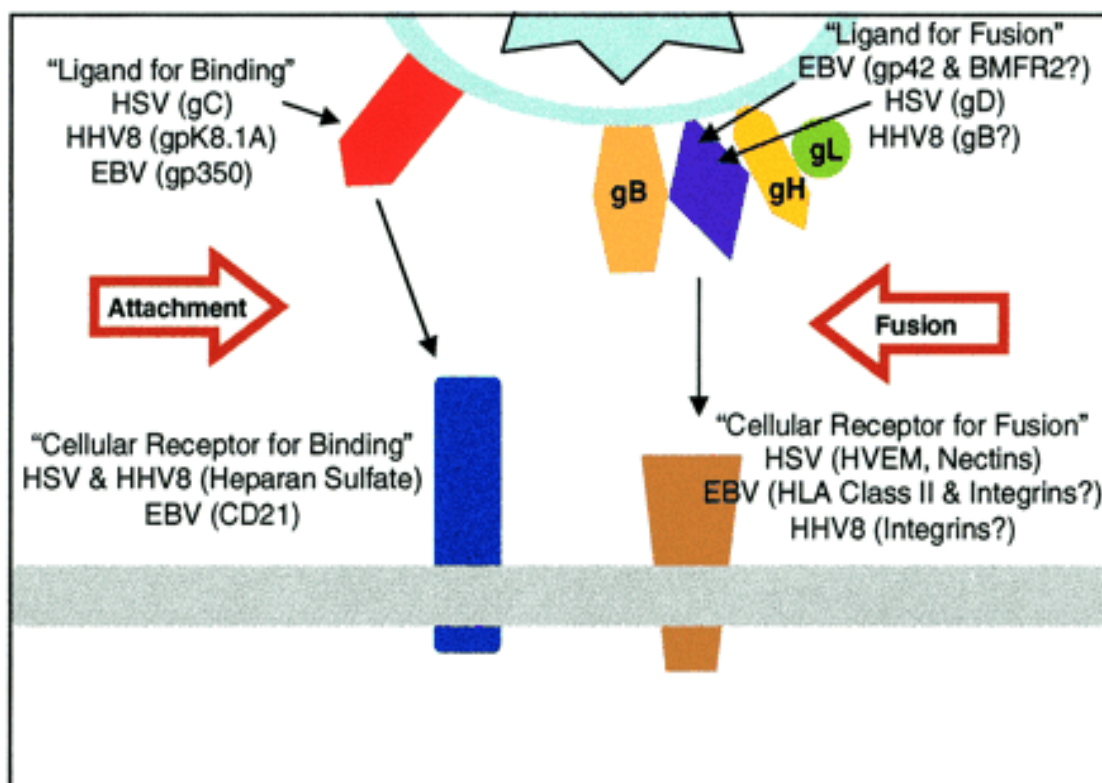
4.1 Λυτικός κύκλος (Productive, lytic infection)

Η αντιγραφή των ερπητοϊών περιλαμβάνει

τα ακόλουθα στάδια: **A.** Δέσμευση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια. Γλυκοπρωτείνες του ιικού φακέλου συνδέονται ειδικά σε συμπληρωματικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης [7-10] (Πίνακας 3), (Εικόνα 4).

Πίνακας 3. Η ποικιλία των ιικών γλυκοπρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με πρωτείνες της κυτταρικής επιφάνειας. Η αλληλεπίδραση αυτή ενεργοποιεί και ελέγχει τον μηχανισμό σύντηξης των δύο μεμβρανών. Πηγή: Βιβλιογραφικές αναφορές 7-10		
Ιός	Γλυκοπρωτείνες ιικού φακέλου	Κυτταρικός Υποδοχέας
HSV-1/2	gC	Heparan sulfate (HS)
	gB	Heparan sulfate (HS)
	gD	Nectin-1
		Herpesvirus mediator (HVEM)
VZV	gE	3-O-Sulfated-HS
CMV	gB	Receptor involved in cell Adhesion?
	gH	Epidermal growth factor receptor (EGFR)
HHV-6	gH/gL/gQ	Integrin αVβ3
		CD 46

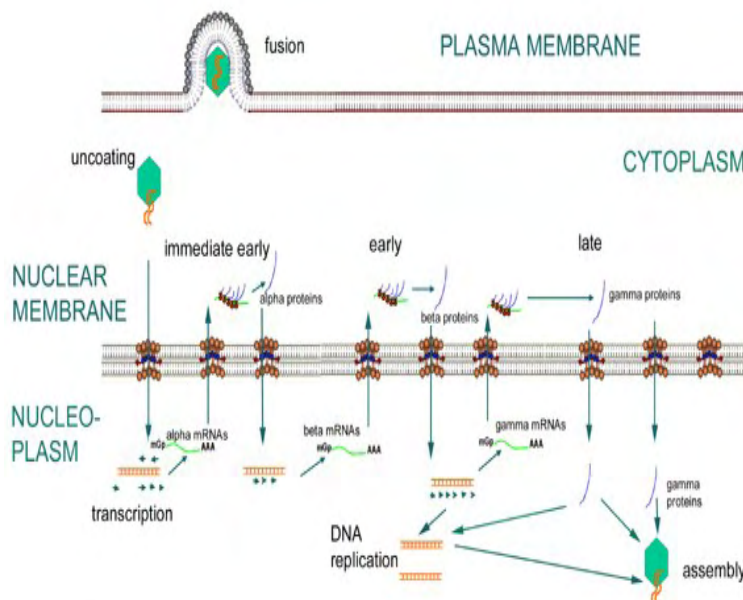
HHV-7	gB	HS
EBV	gp350/220	Complement receptor 2 (CR2:CD21)
	BMRF2	Integrin $\alpha 5 \beta 1$
	gp42	MHC II molecules
HHV-8	gB	Heparan sulphate proteoglycans (HSPG)
		Integrin $\alpha 3 \beta 1$
	K8.1	Heparan sulphate proteoglycans (HSPG)



Εικόνα 4. Τα ίικά και κυτταρικά μόρια που απαιτούνται για την αρχική επαφή και μετέπειτα είσοδο των α- /και γ- ερπητοϊών στα κύτταρα ξενιστές. Θα πρέπει να τονισθεί ότι η γλυκοπρωτεΐνη gp42 απαιτείται για την μόλυνση από EBV των Β λεμφοκυττάρων, όχι όμως και των επιθηλιακών κυττάρων γεγονός που πιστεύεται ότι παρέχει έναν ελκυστικό μηχανισμό ρύθμισης του EBV τροπισμού. Τα ισωμάτια που παράγονται στα Β-κύτταρα περιέχουν ελάχιστη gp42 (καθώς η τελευταία είναι στενά συνδεδεμένη με μόρια του MHC II) και δεν την χρειάζονται για να μολύνουν τα επιθήλια, ενώ τα ισωμάτια που απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα διαθέτουν άφθονη gp42 ώστε αποτελεσματικά να στοχεύσουν τα Β-κύτταρα. **Πηγή:** P.G. Spear and R. Longnecker. J Virol 2003; 77(19): 10179-10185

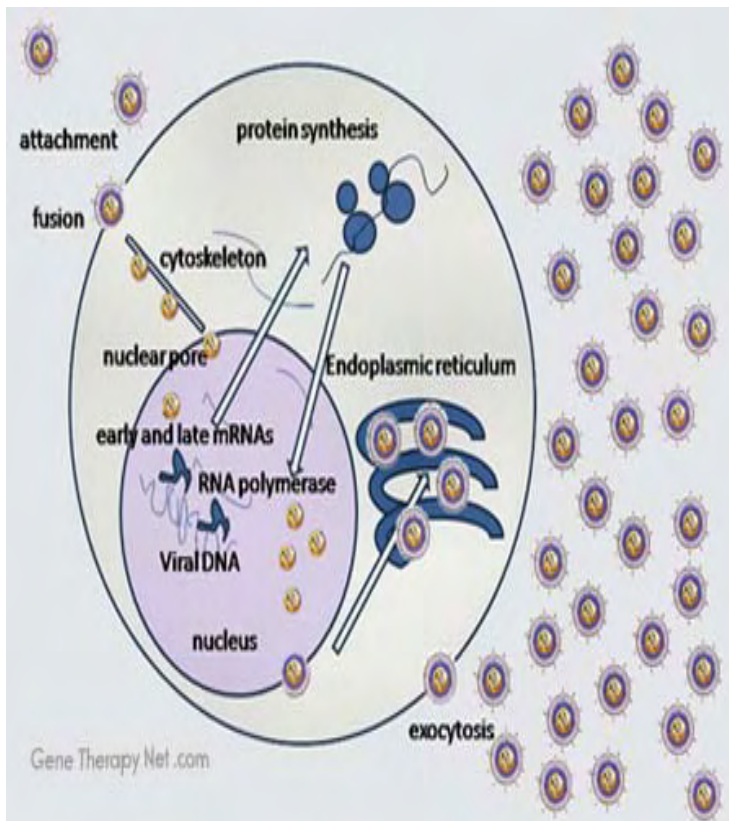
Κάθε ερπητοϊός ακολουθεί διαφορετικό μηχανισμό εισόδου και σύντηξης ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, που μολύνει [10]. Ο CMV για παράδειγμα

εισέρχεται στους ινοβλάστες με απευθείας σύντηξη της μεμβράνης του με την πλασματική μεμβράνη ενώ ενδοκυτώνεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Αντίθετα, ο EBV, εισέρχεται στα επιθηλιακά κύτταρα με άμεση σύντηξη ενώ ενδοκυτώνεται στα Β λεμφοκύτταρα. Σε κάθε περίπτωση, οι αρχικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιοσωματίων και κυττάρων πιθανά προκύπτουν μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων καθώς είναι ευαίσθητες στο χαμηλό pH, στην υψηλή συγκέντρωση αλάτων καθώς και σε ποικιλία πόλυανιόντων. Η επακόλουθη σύνδεση είναι υψηλής συγγένειας και στηρίζεται κυρίως σε υδροφοβικούς δεσμούς, των οποίων η δύναμη και ειδικότητα διέπεται πρωταρχικά από την διαμόρφωση της ιϊκής και κυτταρικής διεπαφής [7], [9]. **Β.** Είσοδος του νουκλεοκαψιδίου στο κυτταρόπλασμα και σύνδεση του στην πυρηνική μεμβράνη. Το ιϊκό DNA εισχωρεί στον κυτταρικό πυρήνα. **Γ.** Μεταγραφή του ιϊκού DNA. Απαιτείται η σύνθεση τριών κατηγοριών πρωτεϊνών προκειμένου να σχηματιστεί ο ώριμος ιός. Οι άλφα πρωτεΐνες (immediate early proteins) συμμετέχουν στην μεταγραφική ρύθμιση και στη σύνθεση των βήτα πρωτεϊνών. Οι άλφα πρωτεΐνες δεν ανευρίσκονται στο ώριμο ιοσωμάτιο. Οι βήτα πρωτεΐνες (early proteins) συμμετέχουν στην αντιγραφή του ιϊκού DNA. Σε αυτές περιλαμβάνονται η DNA πολυμεράση καθώς και μεταγραφικοί παράγοντες του ιού. Οι γάμμα πρωτεΐνες (late proteins) αποτελούν δομικά συστατικά του ιού και η σύνθεσή τους αρχίζει μετά την έναρξη της σύνθεσης του ιϊκού DNA (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Σύνθεση των άλφα (immediate early), βήτα (early) και γάμμα (late) πρωτεϊνών των ερπητοϊών. **Πηγή:** <http://www.microbiologybook.org/virol/herpes.htm>

Η μεταγραφή του DNA σε RNA πραγματοποιείται μέσα στον κυτταρικό πυρήνα με τη βοήθεια ενός κυτταρικού ενζύμου: της εξαρτώμενης από το DNA, RNA πολυμεράσης I. Ο μηχανισμός ωστόσο της μεταγραφής των ιικών γονιδίων ελέγχεται και από πρωτεΐνες του ίδιου του ιού. **Δ.** Σύνθεση του DNA. Οι ερπητοϊοί κωδικοποιούν τη δική τους, εξαρτώμενη από το DNA, DNA πολυμεράση καθώς και ένζυμα, όπως η κινάση της θυμιδίνης, που τους επιτρέπουν να αναπτύσσονται και σε μη διαιρούμενα κύτταρα. **Ε.** Συγκρότηση των νουκλεοκαψιδίων στον πυρήνα και έξοδος τους από το κύτταρο, διαμέσου της διπλής πυρηνικής μεμβράνης με εξωκύτωση [5] (**Εικόνα 6**).

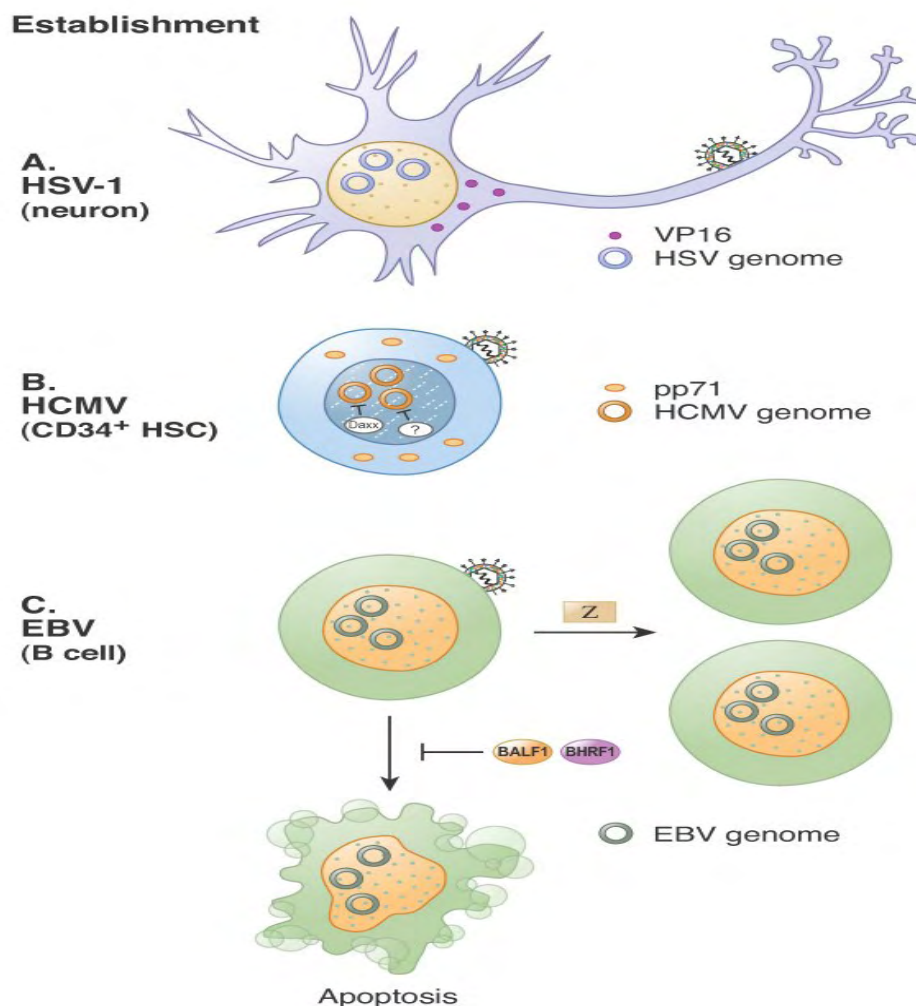


Εικόνα 6. Ο κύκλος ζωής του HSV-1. Διακρίνονται τα στάδια επαφής και σύντηξης του ιού με την κυτταρική μεμβράνη, εισόδου-μέσω του πυρηνικού πόρου-στον πυρήνα, σύνθεσης του ιικού DNA και εξόδου του ώριμου ιού από το κύτταρο με εξωκύτωση. **Πηγή:** http://en.wikipedia.org/wiki/File:HSV_replication.png

4.2 Λανθάνουσα μόλυνση (Latency)

Σε αντίθεση με την οξεία ιική μόλυνση, που είναι μία μη δυναμική διαδικασία, η χρόνια ιική λοίμωξη είναι μία διαδικασία σε δυναμική και λιγότερο η περισσότερο ασταθή ισορροπία [11]. Οι ιοί που στηρίζονται σε έναν ζωντανό αλλά χρονίως μολυσμένο ξενιστή, για την επιβίωση τους αναπτύσσουν μηχανισμούς αποφυγής της ανοσολογικής του απόκρισης. Ως λανθάνουσα περίοδος χαρακτηρίζεται η μοναδική μεταγραφική κατάσταση ενός

ιού κατά την οποία, ενώ το γένωμα του διατηρείται (είτε ως επίσωμα, δηλαδή κυκλικό εξωχρωμοσωματικό μόριο, είτε με ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα και κάθετη μεταβίβαση από γενιά σε γενιά), ο παραγωγικός, αναπαραγωγικός του κύκλος και επομένως η έκφραση των περισσότερων ή όλων των αντιγόνων του ‘σιωπά’, αλλά μπορεί κάτω από ορισμένες συνθήκες να επανενεργοποιηθεί [12]. Η φύση της λανθάνουσας περιόδου επηρεάζεται από τον ίδιο τον ιό, το κύτταρο που μολύνεται, και την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, διακρίνεται δε σε τρία στάδια, την εγκατάσταση (establishment), την διατήρηση (maintenance), και την επανενεργοποίηση (reactivation) [3]. Για τον έρπητα απλού τύπου 1 (HSV-1) και τον ανθρώπινο μεγαλοκυτταροϊό (HCMV), η καθιέρωση της λανθάνουσας περιόδου φαίνεται ότι είναι μία παραπλήσια διαδικασία. Τα ιικά πολύ πρώιμα γονίδια (Immediate Early: IE) δεν εκφράζονται λόγω μη εισόδου στον πυρήνα διαμεσολαβητών ενεργοποίησης (transactivators) του περιβλήματος. Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο ιών έγκειται στο ότι η αναστολή της έκφρασης των γονιδίων IE για τον HSV-1 προκύπτει από μη ενεργοποίηση του προαγωγέα τους ενώ για τον HCMV προκύπτει τόσο από καταστολή του προαγωγέα από κυτταρικούς παράγοντες όπως οι Daxx (Death-Domain Associated Protein) και HDACs (Histone Deacetylases) όσο και από έναν μη αναγνωρισμένο HDAC-ανεξάρτητο μηχανισμό. Το στάδιο της καθιέρωσης διαφέρει σημαντικά στον EBV ιό καθώς απαιτείται ιϊκή έκφραση των γονιδίων της α (πολύ πρώιμης) και β (πρώιμης) κλάσης (IE και E) για να ενισχυθεί η κυτταρική διαφοροποίηση και να ανασταλεί η απόπτωση. Μέχρι στιγμής δεν είναι ξεκάθαρο αν, και με ποιο τρόπο οι πρωτεΐνες του περιβλήματος ενεργοποιούν την γονιδιακή έκφραση [3] (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. Εγκατάσταση της ερπητικής μόλυνσης

HSV-1. Η μόλυνση ενός αισθητικού νευρώνα επιτρέπει την είσοδο στον πυρήνα του ιϊκού DNA όχι όμως και του διαμεσολαβητή ενεργοποίησης VP16 του περιβλήματος. Τα ιϊκά IE γονίδια σιωπούν.

Εικόνα 7 (συνέχεια)

HCMV. Η μόλυνση ενός CD 34⁺ πρόδρομου αιμοποιητικού κυττάρου επιτρέπει την είσοδο στον πυρήνα του ιϊκού DNA όχι όμως και του διαμεσολαβητή ενεργοποίησης pp71 του περιβλήματος. Τα ιϊκά IE γονίδια σιωπούν μέσω της Daxx και ενός μη αναγνωρισμένου HDAC-ανεξάρτητου μηχανισμού.

EBV. Η μόλυνση ενός B κυττάρου μνήμης επιτρέπει την είσοδο στον πυρήνα του ιϊκού DNA. Οι διαμεσολαβητές ενεργοποίησης του περιβλήματος του EBV δεν έχουν χαρακτηριστεί. Τουλάχιστον ένα IE γονίδιο (Z) και δύο E γονίδια (BALF1 και BHRF1) εκφράζονται. Το Z προάγει

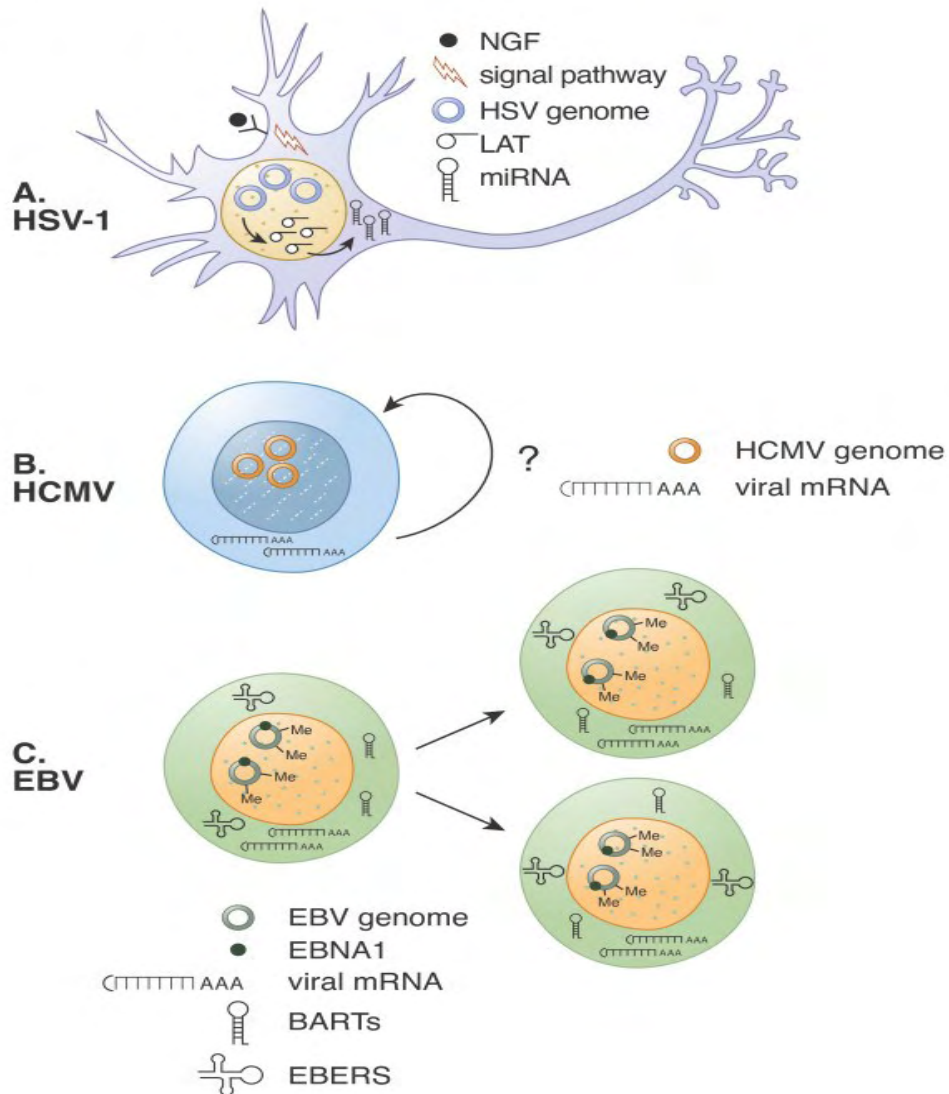
την διαφοροποίηση των B κυττάρων ενώ τα BALF1 και BHRF1 αναστέλλουν την απόπτωση, γεγονός απαραίτητα για την εγκατάσταση της λανθάνουσας φάσης.

Πηγή: Penkert and Kalejta., *Herpesviridae* 2011 2:3, doi:10.1186/2042-4280-2-3

Η διατήρηση της λανθάνουσας περιόδου διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ιών κάθε υπο-οικογένειας εάν και η συναρμολόγηση μίας κατασταλτικής αρχιτεκτονικά δομής της χρωματίνης στους προαγωγείς των γονιδίων της λυτικής φάσης αποτελεί έναν κοινό μηχανισμό ελέγχου. Σημαντικά μέτρα ελέγχου φαίνεται ότι είναι η διαμεσολαβούμενη από mi-RNA αποσιωποποίηση της έκφρασης των ΙΕ γονιδίων καθώς και η διαμεσολαβούμενη από τον παράγοντα αύξησης των νεύρων (NGF) Akt φωσφορύλιωση. Ο HCMV φαίνεται ότι εκφράζει μερικές πρωτεΐνες κατά τη φάση της διατήρησης. Τουλάχιστον μία από αυτές, η vIL10 περιορίζει τον ανοσολογικό εντοπισμό των μολυσμένων κυττάρων. Δεν είναι ξεκάθαρο αν τα κύτταρα αυτά διαιρούνται και έτσι δεν είναι γνωστό αν υπάρχουν ή απαιτούνται μηχανισμοί γονιδιακής αντιγραφής. Ο EBV εκφράζει αρκετά γονίδια κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου πολλά από τα οποία εξασφαλίζουν την κυτταρική επιβίωση και διαφοροποίηση. Επιπρόσθετα, το EBNA-1 προάγει την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος και την ισότιμη κατανομή του στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Τα περισσότερα γονίδια λυτικής φάσης παραμένουν σιωπηλά μέσω μεθυλίωσης του DNA σε περιοχές εντός του προαγωγέα τους (**Εικόνα 8**). Το τρίτο στάδιο της λανθάνουσας περιόδου έχει εκτενώς μελετηθεί στον HSV-1 όπου η de novo έκφραση της VP 16 πρωτεΐνης του περιβλήματος φαίνεται ότι αποτελεί το αρχικό βήμα επανενεργοποίησης. Ο EBV επίσης απαιτεί την de novo έκφραση του ΙΕ γονιδίου που κωδικοποιεί την Z πρωτεΐνη ωστόσο, το αν η απαιτούμενη (εξ) πρωτεΐνη (εξ) είναι ιϊκές, κυτταρικές ή και τα δύο δεν είναι γνωστό. Έτσι παραμένει υπό διερεύνηση το αν η επανενεργοποίηση του EBV και HCMV γενώματος πραγματοποιείται με de novo έκφραση των πρωτεϊνών του περιβλήματος. Είναι πάντως ενδιαφέρον το γεγονός ότι και οι τρεις προαναφερόμενοι ιοί (HSV-1, HCMV, EBV) κωδικοποιούν α-πρωτεΐνες (ICPO, IE1, και Z αντίστοιχα), που διασπούν τις πυρηνικές δομές PML-NBs (Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies) οι οποίες και καταστέλλουν την λυτική

αντιγραφή των DNA ογκογόνων ιών. Έτσι, οι μοριακοί μηχανισμοί επανενεργοποίησης παρότι ξεκινούν από διαφορετικά ερεθίσματα για κάθε ερπητοϊό, ίσως είναι πιο συντηρημένοι απ'ότι θεωρούσαμε ως σήμερα [3] (Εικόνα 9).

Maintenance



Εικόνα 8. Διατήρηση της ερπητικής μόλυνσης

Εικόνα 8 (συνέχεια)

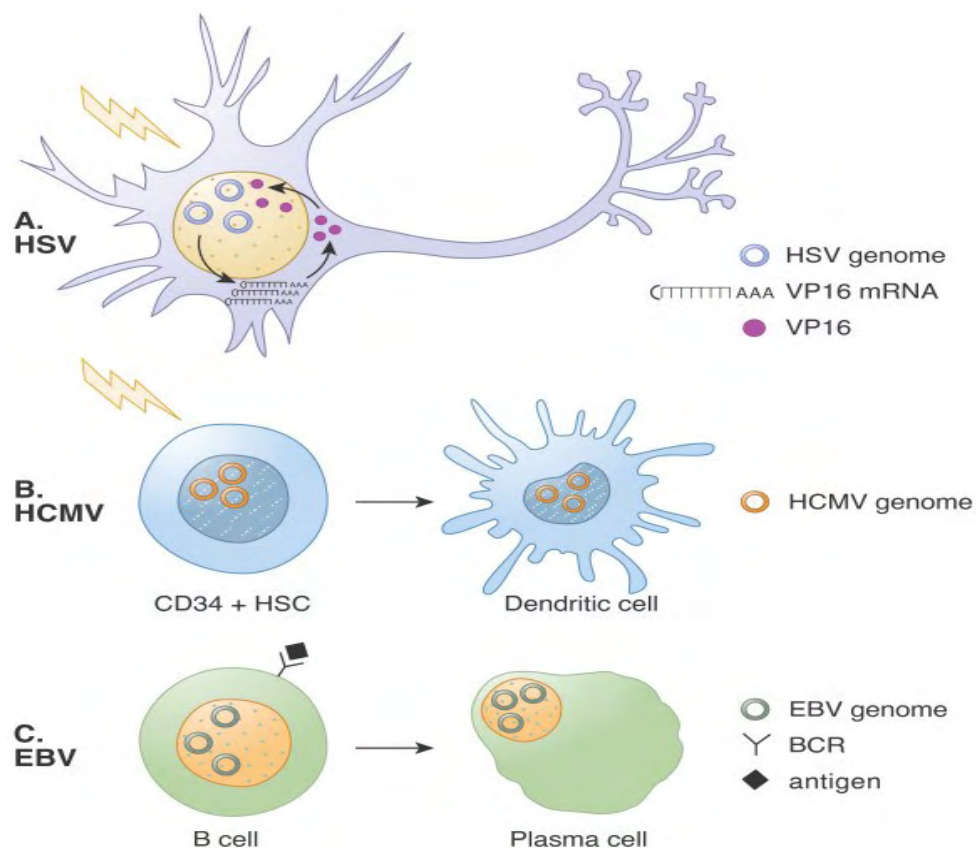
HSV-1. Τα σχετιζόμενα με την λανθάνουσα φάση μετάγραφα (LAT) κωδικοποιούν micro-RNAs (mi-RNA) που καταστέλλουν την έκφραση των ιικών IE πρωτεϊνών. Ο αυξητικός παράγοντας των νεύρων (NGF) επίσης συμβάλλει, με μεταγωγή σήματος, στη διατήρηση της λανθάνουσας φάσης.

HCMV. Η συμβολή των ιικών mRNAs/μεταγράφων που ανιχνεύονται κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου (CTLs, LUNA, UL138, US28, vIL10) δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Το αν τα μολυσμένα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα διαιρούνται ή αυτό-ανανεώνονται (βέλος με ερωτηματικό) δεν είναι γνωστό.

EBV. Η ιική EBNA 1 πρωτεΐνη προάγει την αντιγραφή στα διαιρούμενα Β κύτταρα. Διαφορετικοί τύποι της EBV λανθάνουσας περιόδου εκφράζουν και διαφορετικά γονίδια, των οποίων οι λειτουργίες είναι η προαγωγή της διαφοροποίησης, η αναστολή της απόπτωσης και η ανοσολογική διαφυγή. Τα EBER εμποδίζουν την διατήρηση της μεταφραστικής ικανότητας της πρωτεϊνικής κινάσης R ενώ τα BARTs μεταποιούνται σε mi-RNAs. Η μεθυλίωση του ιικού γενώματος εμποδίζει την έκφραση των γονιδίων της λυτικής φάσης.

Πηγή: Penkert and Kalejta., *Herpesviridae* 2011 2:3, doi:10.1186/2042-4280-2-3

Animation / Reactivation



Εικόνα 9. Επανενεργοποίηση της ερπητικής λοίμωξης

HSV-1. 'Στρεσογόνα' περιβαλλοντικά σήματα προκαλούν την *de novo* έκφραση της VP 16 και την μεταφορά της στον πυρήνα (πιθανά μέσω του HCF: Host Cell Factor 1) με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των ΙΕ γονιδίων.

HCMV. Διάφορα σήματα προκαλούν την διαφοροποίηση του CD 34+ πρόδρομου αιμοποιητικού κυττάρου σε δενδριτικό προάγοντας την επακόλουθη επανενεργοποίηση μέσω άγνωστων μοριακών μηχανισμών.

Εικόνα 9 (συνέχεια)

EBV. Η ενεργοποίηση, μέσω αντιγονικής διέγερσης, του BCR υποδοχέα, προκαλεί την διαφοροποίηση του B κυττάρου σε πλασματοκύτταρο προάγοντας την επακόλουθη επανενεργοποίηση μέσω άγνωστων μοριακών μηχανισμών.

Πηγή: Penkert and Kalejta., *Herpesviridae* 2011 2:3, doi:10.1186/2042-4280-2-3

Οι συνεχείς ανοσολογικές αντιδράσεις στη χρόνια ιϊκή λοίμωξη επιδρούν σημαντικά στη φυσική ανοσία μέσω της δράσης των κυτοκινών που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της χρόνιας διέγερσης των Τ κυττάρων και πιθανά και των ΝΚ. Αυτό ίσως είναι ιδιαίτερα σημαντικό για ιούς που εγκαθίστανται σε λεμφικούς ιστούς κατά τη διάρκεια της χρόνιας μόλυνσης καθώς οι παράπλευρες επιπτώσεις των κυτοκινών αναμένεται να έχουν ιδιαίτερη σημασία. Τα EBV-ειδικά Τ κύτταρα αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 20% των συνολικών CD8 Τ κυττάρων στις μη φλεγμαίνουσες αμυγδαλές των μακροχρόνιων EBV φορέων. Αυτή είναι μία ανατομική θέση, στην οποία διαπιστώνεται παρατεταμένη παρουσία του ιού και διέγερση των Τ κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη τα υψηλά ποσοστά χρόνιας μόλυνσης από ερπητοϊούς στον πληθυσμό και τις αποδείξεις για συνεχή διασπορά τους σε βλεννογόνους με επακόλουθο την αντιγονική έκφραση και την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, είναι λογικό να αναμένεται, ότι η παραγωγή στους βλεννογόνους, ισχυρών κυτοκινών είναι συχνή στους περισσότερους, υγιείς και ασυμπτωματικούς φορείς [11].

Θα πρέπει ωστόσο να τονισθεί και η θετική πλευρά της χρόνιας ιοφορίας. Η συνεξέλιξη των ερπητοϊών με τους ξενιστές τους για δεκάδες εκατομμύρια χρόνια φαίνεται, ότι έχει προσφέρει κάποια πλεονεκτήματα στους τελευταίους. Διαπιστώθηκε, ότι η έκφραση της ιντερφερόνης γ κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου προστατεύει συμβιωτικά τον ξενιστή από μόλυνση με τα βακτήρια *Listeria monocytogenes* και *Yersinia pestis*, που ευθύνονται για την πανώλη. Αυτό το παράδειγμα παρέχει και μία απόδειξη για το σημαντικό ανοσολογικό αποτέλεσμα της χρόνιας ιϊκής λοίμωξης στον καθορισμό των φυσικών ανοσολογικών αντιδράσεων [11].

5. Παθογένεση και παθολογία των ερπητικών λοιμώξεων

Οι HHVs μολύνσεις παρουσιάζουν μεγάλο επιπολασμό στον παγκόσμιο πληθυσμό και μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: σε αυτές, που εκδηλώνονται κλινικά κατά τη πρωτογενή μόλυνση και σε αυτές, που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του λανθάνοντος ιού. Η σημασία της κυτταρικά επαγόμενη ανοσίας στον έλεγχο της ιϊκής αντιγραφής

και στον περιορισμό της ενεργοποίησης του ιού *in vivo*, διαφαίνεται στη δραματική αύξηση της συχνότητας αλλά και σοβαρότητας των ερπητικών λοιμώξεων στους μη άνοσοϊκανούς ασθενείς [7]. Η μετάδοση των ερπητοϊών συνήθως προϋποθέτει στενή επαφή μεταξύ των ατόμων, όπως φιλή ή σεξουαλική επαφή ενώ συχνά ο φορέας είναι ασυμπτωματικός γεγονός, που αυξάνει τη πιθανότητα μετάδοσης.

5.1 Λοιμώξεις προκαλούμενες από ερπητοϊούς της α υπό-οικογένειας

5.1.1 Έρπητες απλού τύπου (HSVs)

Μεταξύ των HHVs, ο έρπητας απλού τύπου (HSV) παρουσιάζει το μεγαλύτερο φάσμα ξενιστών. Παρότι φυσιολογικά απομονώνεται μόνο από ανθρώπους, μπορεί πειραματικά να μολύνει ένα ευρύ φάσμα ζωικών ειδών ενώ ταυτόχρονα πολλοί τύποι κυττάρων σε καλλιέργειες μπορούν να υποστηρίξουν την αντιγραφή του. Η πιο συχνή εκδήλωση της μόλυνσης από HSV είναι οι βλέννογονοδερματικές βλάβες, που κυρίως παρατηρούνται στη περιοχή του στόματος, στον κερατοειδή χιτώνα καθώς και σε ιστούς του γεννητικού συστήματος [7]. Λιγότερο συχνά μπορεί να προκληθούν απειλητικές για τη ζωή ασθένειες που επηρεάζουν ζωτικά όργανα, όπως η εγκεφαλίτιδα τόσο σε υγιείς ενήλικες, όσο και σε βρέφη και ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Ο νεογνικός έρπητας εκτιμάται, ότι εμφανίζεται σε περίπου 1/5000 τοκετούς/χρονιά. Το νεογνό αδυνατεί να περιορίσει την αντιγραφή και διάδοση του HSV με αποτέλεσμα συχνά να αναπτύσσεται σοβαρή νόσος. Το ποσοστό θνησιμότητας αγγίζει το 50% χωρίς θεραπεία της νόσου ενώ φτάνει το 80% σε περίπτωση διάδοσης της νόσου και συμμετοχής πολλαπλών οργάνων, συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος [13]. Ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς, κυρίως λήπτες μοσχευμάτων καρδιάς, νεφρού και μυελού των οστών έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σοβαρής HSV λοίμωξης [13]. Παρότι τα δύο είδη του απλού έρπητα, HSV-1, -2 μπορούν να μολύνουν τους ίδιους τύπους κυττάρων σχετίζονται με διαφορετικά σύνολα ασθενειών: ο HSV-1 απομονώνεται στις περισσότερες περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας των ενηλίκων, κερατίτιδας και βλαβών του προσώπου ενώ ο HSV-

2 ευθύνεται κυρίως για νεογνικές ασθένειες, μηνιγγίτιδες σε ενήλικες και γεννητικές βλάβες [1], [7]. Αξίζει να αναφερθεί και η πιθανότητα, σε σποραδικά περιστατικά της νόσου Alzheimer, ο HSV-1 να δρα ως ο ενεργοποιητής του παθογενετικού καταρράκτη που πυροδοτεί την ασθένεια [1].

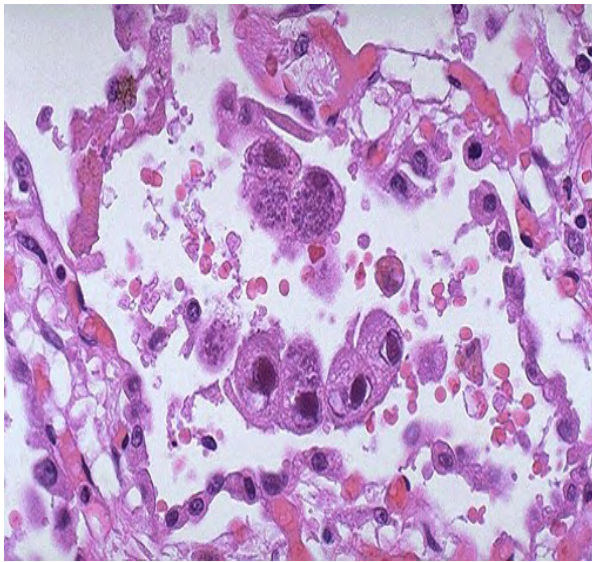
5.1.2 Ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 3 (VZV)

Ο VZV διαφέρει από τους HSV-1, -2 καθώς έχει ικανότητα αντιγραφής αποκλειστικά σε ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς γεγονός, που περιορίζει σημαντικά τις δυνατότητες μελέτης των βιολογικών και παθογενετικών του ιδιοτήτων [1]. Επιπλέον, μεταδίδεται με επιδημικό τρόπο-μέσω αερολυμάτων- και προκαλεί πρωτοπαθείς λοιμώξεις με συστηματικά και όχι τοπικά χαρακτηριστικά. Η ανεμοβλογιά είναι μία οξεία ιογενής νόσος, που εκδηλώνεται με γενικευμένες φλυκταινώδεις βλάβες του δέρματος και των βλεννογόνων μεμβρανών. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί απειλητική για τη ζωή εγκεφαλίτιδα [13]. Ενδομήτρια μόλυνση κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης οδηγεί σε βλάβες του δέρματος, του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα καθώς και σε μικροφθalmία (5). Στους ενήλικες, η ενεργοποίηση του VZV οδηγεί στον έρπητα ζωστήρα, μία κλινική κατάσταση, που εμφανίζεται ως περιορισμένο δερματικό εξάνθημα που συχνά προκαλεί οξύ πόνο [7]. Ποσοστό περίπου 30% των πασχόντων αναπτύσσει χρόνια νευροπαθητικό πόνο (μεθερπητική νευραλγία) [14]. Πρέπει να σημειωθεί, ότι ενώ όλα τα μέλη της α υπό-οικογένειας των HHVs εγκαθιδρύουν τη λανθάνουσα μόλυνση στους αισθητήριους νευρώνες, οι μηχανισμοί αλλά και η συχνότητα της ενεργοποίησης τους διαφέρουν. Οι υποτροπές της HSV-1, -2 λοίμωξης μειώνονται με την αύξηση της ηλικίας ενώ ο έρπητας ζωστήρας συνήθως εμφανίζεται μετά την ηλικία των 50 ετών η δε επίπτωση του αυξάνεται με την ηλικία και την επακόλουθη μείωση της κυτταρικής ανοσίας. Επιπλέον, στην ενεργοποίηση των HSVs-1, -2 εμπλέκεται συνήθως μόνο ένας ή ελάχιστοι νευρώνες, σε αντίθεση με την ενεργοποίηση του VZV στην οποία συμμετέχουν πολλαπλοί νευρώνες [14].

5.2 Λοιμώξεις προκαλούμενες από ερπητοϊούς της β υπό-οικογένειας

5.2.1 Ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 5 (CMV)

Ο μέγαλοκυτταροϊός ή κύτταρομεγαλοϊός (CMV) είναι ο μεγαλύτερος σε γενετικό περιεχόμενο από τους οκτώ HHVs και οφείλει την ονομασία του στην χαρακτηριστική- μικροσκοπικά -εικόνα των μεγαλοκυτταρικών εγκλείστων [13], [15] (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Διογκωμένα κύτταρα πνευμονικού ιστού, τυπικά CMV λοίμωξης. Διακρίνονται τα ενδοπυρηνικά έγκλειστα.

Πηγή:

<http://library.med.utah.edu/WebPath/INFEHTML/INFEC006.html>

Υπάρχουν τρία αναγνωρίσιμα κλινικά σύνδρομα της CMV λοίμωξης [15]:

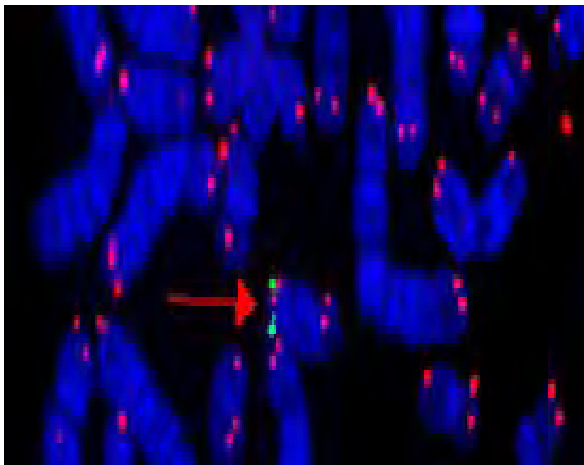
Η περιγεννητική νόσος και νόσος των μεγαλοκυτταρικών εγκλείστων, αποτελεί σύνδρομο που αποκτάται κατά την ενδομήτρια ζωή και χαρακτηρίζεται από ίκτερο, ηπατοσπληνομεγαλία, θρομβοπενία, πνευματική καθυστέρηση, κινητικές διαταραχές και πορφύρα. Η νόσος που αποκτάται κατά την νεογνική ηλικία είναι συχνά ασυμπτωματική με τις νευρολογικές εκδηλώσεις να παρουσιάζονται αργότερα στη ζωή [15]. Η συμβολή της εκ γενετής CMV λοίμωξης στην απώλεια της παιδικής ακοής είναι ιδιαίτερα σημαντική: Ποσοστό σχεδόν 20% των περιστατικών με αμφοτερόπλευρη, μέτρια ως βαριά απώλεια ακοής οφείλεται σε μόλυνση από CMV [16]. Η επίκτητη νόσος σε ανοσοεπαρκή άτομα είναι σύνδρομο παρόμοιο με τη λοιμώδη μονοπυρήνωση με απουσία ετερόφιλων αντισωμάτων και τραχηλικής λεμφαδενοπάθειας [15]. Διαρκεί 7-8 εβδομάδες και ακολουθεί συνήθως μία αυτόπεριοριζόμενη πορεία. Ωστόσο, στην ιατρική βιβλιογραφία υπάρχει σημαντικός αριθμός αναφορών για σοβαρές επιπλοκές της CMV λοίμωξης στους ανοσοϊκανούς ασθενείς, με πιο σημαντικές αυτές της γαστρεντερικής οδού (κολίτιδα, φλεγμονώδης νόσος του

εντέρου) και του κεντρικού νευρικού συστήματος (εγκεφαλίτιδα, μυελίτιδα, μηνιγγίτιδα) [17]. Σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς όπως οι λήπτες μοσχευμάτων και οι ασθενείς με σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) μπορεί να εμφανιστεί πνευμονία από CMV, CMV αμφιβληστροειδίτιδα, γαστρεντερική και ηπατοχολική CMV νόσος, και CMV νόσος του νευρικού συστήματος [15]. Υπολογίζεται, ότι το ποσοστό CMV λοίμωξης (είτε λόγω ενεργοποίησης του λανθάνοντος ιού είτε λόγω νέας μόλυνσης) στους λήπτες μοσχευμάτων και στους ασθενείς με AIDS αγγίζει το 60-90% και δεν ευθύνεται μόνο για επιπλοκές κατά την οξεία φάση της νόσου, με κυριότερη την απόρριψη του μοσχεύματος, αλλά και για μακροχρόνιες κλινικές καταστάσεις, όπως η σκλήρυνση των αγγείων στους λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων, η χρόνια νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD) στους λήπτες μοσχεύματος μυελού των οστών αλλά και τα δερματικά συμπτώματα στους HIV+ ασθενείς [18]. Επιπλέον, η πρωτογενής CMV λοίμωξη μπορεί να πυροδοτήσει αυτοάνοσα φαινόμενα, όπως οι αγγειϊτίδες και το σκληρόδερμα σε προηγουμένως υγιή και ασυμπτωματικά άτομα, και να επιταχύνει την εξέλιξη τους με επιδείνωση της φλεγμονής και αυτοάνοση καταστροφή των ιστών [19]. Στους λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων η τοπική ιϊκή αντιγραφή έχει συσχετιστεί με χρόνια περιαγγειακή φλεγμονή. Τα ανοσοπαθολογικά φαινόμενα, που αποδίδονται στον CMV συνεχίζουν να συσσωρεύονται γεγονός, που επιβεβαιώνει, ότι ο ιός έχει σημαντικές ανοσορρυθμιστικές ικανότητες [19].

5.2.2 Ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 6 (HHV-6)

Ο HHV-6 απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1986 από το περιφερικό αίμα ασθενών με AIDS και λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές [20-21]. Ωστόσο, παρά το γεγονός, ότι πέρασαν περισσότερα από 30 χρόνια από την ανακάλυψη του, οι παθογενετικοί μηχανισμοί και οι κλινικές συνέπειες της μόλυνσης, που επάγει έχουν μόνο εν μέρει διευκρινιστεί [22]. Ο υπότυπος B του ιού αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα του αιφνίδιου εξανθήματος της βρεφικής και αρχικής νηπιακής ηλικίας (roseola infantum) [21]. Παρόμοια με τους υπόλοιπους ερπητοϊούς, η παθογένεια του HHV-6 ενισχύεται σε μη ανοσοϊκανούς ξενιστές. Η

ενεργή HHV-6 λοίμωξη είναι κοινή σε λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων και μυελού των οστών και σύμφωνα με αναφορές περιστατικών μπορεί να προκαλέσει ασθένειες, όπως η εγκεφαλίτιδα και η καταστολή του μυελού των οστών. Επιπλέον, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις για αλληλεπίδραση του HHV-6 με τα υπόλοιπα μέλη της β υπο-οικογένειας, γεγονός, που θεωρείται, ότι αυξάνει την πιθανότητα ασθένειας από CMV και ευκαιριακών λοιμώξεων [20]. Ο ιός ενεργοποιείται συχνά μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων ενώ αντιφατικά είναι τα ευρήματα, που τον συνδέουν με τη σκλήρυνση κατά πλάκας [21]. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του HHV-6 αποτελεί η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του στα χρωμοσώματα [23-26], που πραγματοποιείται με ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ ιϊκών και χρωμοσωμικών τελομερικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών βάσεων συνηθέστερα των χρωμοσωμάτων 9q34.4, 17p13.3, 18q23, 19q13.4, και 22q13.3 [26] (**Εικόνα 11**). Σε υγιείς αιμοδότες βρέθηκε σε ποσοστό 0,8% εξαιρετικά υψηλό ιϊκό φορτίο του HHV-6 πιθανότατα εξαιτίας του φαινομένου της χρωμοσωμικής ενσωμάτωσης [26].



Εικόνα 11. Απεικόνιση με FISH της ενσωμάτωσης του HHV-6 (πράσινο χρώμα) στα τελομερή των χρωμοσωμάτων (κόκκινο χρώμα).

Πηγή: www.hhv-6foundation.org

οικογένειας

5.3 Λοιμώξεις προκαλούμενες από ερπητοϊούς της γ υπο-

5.3.1 Ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 4 (EBV)

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) ανακαλύφθηκε στο τέλος της δεκαετίας του '50 από τους Βρετανούς επιστήμονες M.A. Epstein και Y.M. Barr, οι οποίοι και εντόπισαν ιοσωμάτια του ιού σε κύτταρα προερχόμενα από λεμφαδένες παιδιών της υποσαχάριας Αφρικής, που έπασχαν από λέμφωμα. Το δείγμα στάλθηκε στους ερευνητές από τον Denis Burkitt κατά τη διάρκεια των μελετών του για το

Αφρικανικό λέμφωμα, στο οποίο και δόθηκε τελικά το όνομα του (λέμφωμα Burkitt) [27]. Ο EBV μεταδίδεται με το σάλιο και μολύνει τα επιθηλιακά κύτταρα του στοματοφάρυγγα. Η πρωτογενής λοίμωξη στα παιδιά είναι συνήθως ασυμπτωματική ενώ στους ενήλικες εκδηλώνεται κλινικά ως λοιμώδης μονοπυρήνωση. Τα ετερόφιλα αντισώματα είναι τυπικά της ασθένειας [13] και ιστορικά περιγράφηκαν για πρώτη φορά στην ορολογική αντίδραση επιβεβαίωσης της νόσου (αντίδραση Paul Bunnell- Donaldson) προκαλώντας τη συγκόλληση ερυθροκυττάρων προβάτου [28]. Ο EBV αποτελεί τον πρώτο ανθρώπινο ιό που αιτιολογικά συνδέθηκε με τον καρκίνο. Η ανίχνευση του σε πολλά νεοπλάσματα λεμφοειδούς και επιθηλιακής προέλευσης οδήγησε στην ταξινόμηση του ως καρκινογόνου παράγοντα από την IARC (International Agency for Research on Cancer) το 1997 [29]. Ο ιός έχει συσχετισθεί παθογενετικά με το λέμφωμα Burkitt (BL), το λέμφωμα Hodgkin (HL), τα εξωλεμφαδενικά περιφερικά και ρινικά T/NK λεμφώματα, το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα (NPC), τα λεμφοεπιθηλιακά καρκινώματα του στομάχου, των πνευμόνων και των σιελογόνων αδένων και τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα [27], [29-32]. Περίπου το 30% των HLs αποδεικνύονται θετικά για EBV σε ανοσοϊκανούς ασθενείς, το ποσοστό ωστόσο αυξάνεται επί εδάφους ανοσοανεπάρκειας [33]. Τα κακοήγη νοσήματα, που συνδέονται με τον EBV επί ανοσοκαταστολής είναι η λεμφοϋπερπλαστική νόσος μετά από μεταμόσχευση (PTLD), οι όγκοι μυών (λειομύωμα-λειομυοσάρκωμα) και το B-λέμφωμα τόσο σε παιδιά με συγγενή ανοσοανεπάρκεια όσο και σε HIV+ ασθενείς [27]. Στους τελευταίους, έχει διαπιστωθεί συσχέτιση του ιού με το πρωτοπαθές εξιδρωματικό λέμφωμα (PEL), το πρωτοπαθές λέμφωμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (PCNSL), και το πλάσμαβλαστικό λέμφωμα (PBL) [34]. Ο EBV έχει επίσης συνδεθεί με το αίμοφαγοκυτταρικό και το X-λέμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο [27]. Στις σχετιζόμενες με τον EBV νεοπλασίες, το γονιδίωμα του ιού, που διατηρείται ως επίσωμα στα καρκινικά κύτταρα, εκφράζει μικρό αριθμό γονιδίων, που κωδικοποιούν την παραγωγή των πρωτεϊνών της λαθροβίωσης [30], [35]. Ο EBV χρησιμοποιεί διαφορετικές μορφές λανθάνουσας μόλυνσης στους διάφορους τύπους όγκων γεγονός, που θεωρείται, ότι αντανακλά την πολύπλοκη *συναλλαγή*

του με το περιβάλλον του ξενιστή [35]. Ανάλογα με τα ιϊκά γονίδια που εκφράζονται κατά την εμμένουσα μόλυνση διακρίνονται τρεις βασικοί τύποι λαθροβίωσης. Ο τύπος 1 (latency I) χαρακτηρίζεται από την έκφραση αποκλειστικά του ιϊκού πυρηνικού αντιγόνου 1 (EBNA-1) και των δύο μικρών μη κωδικών RNAs (EBERs). Θεωρείται ότι αποτελεί το κατώτερο επίπεδο έκφρασης γονιδίων που θα μπορούσε να συντηρήσει το ιϊκό γονιδίωμα στο κύτταρο. Στον τύπο 2 (latency II) εκφράζονται επιπρόσθετα και οι δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες LMP-1, LMP-2. Τέλος στον τρίτο τύπο λαθροβίωσης (latency III) εκφράζονται και τα ιϊκά πυρηνικά αντιγόνα 2, 3 (EBNA-2, EBNA-3) [30], [34] (**Πίνακας 4**). Λόγω της ικανότητας του να μεταβάλλει την ανοσιακή απόκριση και ομοιόσταση του ξενιστή, ο EBV έχει επίσης συνδεθεί με αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (SLE), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) και η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) πιθανά μέσω αλληλεπίδρασης και με άλλους παράγοντες, γενετικούς και περιβαλλοντικούς [36]. Είναι χαρακτηριστικό, ότι τα EBER-1 και EBER-2 έχουν βρεθεί ως σύμπλοκα με την πρωτεΐνη La, που αποτελεί το αυτόαντιγόνο του συστηματικού ερυθηματώδη λύκου [37].

Πίνακας 4. Τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης του EBV στην παραγωγική και εμμένουσα λοίμωξη.

BL: Burkitt Lymphoma, HL: Hodgkin lymphoma

NPC: Καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα

PCNSL: Πρωτοπαθές λέμφωμα κεντρικού νευρικού συστήματος

PTLD: Λεμφοϋπερπλαστική νόσος μετά από μεταμόσχευση

Πηγή: Michelow P et al. Acta.Cytol., 2012:56(1):1-14

EBV γονίδια	Ενεργή λοίμωξη	Latency (I) BL	Latency (II) HL, NPC	Latency (III) PCNSL, PTLD
EBNA-1	+	+	+	+
EBNA-2	+	-	-	+
EBNA-3	+	-	-	+
LMP-1	+	-	+	+
LMP-2	+	-	+	+
EBER	+	+	+	+

5.3.2 Ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 8 (HHV-8)

Ο ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 8 (HHV-8) ή ερπητοϊός σχετιζόμενος με το σάρκωμα Kaposi (KSHV) απομονώθηκε το 1994 από νεοπλασματικά κύτταρα του σαρκώματος Kaposi , στο οποίο και οφείλει το όνομα του. Αποτελεί ωστόσο αρχαίο παθογόνο, που πιστεύεται, ότι διείσδυσε στους ανθρώπινους πληθυσμούς χιλιάδες χρόνια πριν [38], [39]. Επιδημιολογικά, η κατανομή του HHV-8 διαφέρει από αυτήν των άλλων ερπητοϊών. Ενώ στην πλειοψηφία των ενηλίκων διαπιστώνεται οροθετικότητα για τους HHVs 1-7 καθώς η λοίμωξη λαμβάνει χώρα κατά την παιδική (συνήθως) ηλικία, δεν παρατηρείται το αντίστοιχο εύρημα για τον HHV-8. Η κατανομή της οροθετικότητας ως προς τον HHV-8 ακολουθεί τα πρότυπα κατανομής συχνότητας των σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων και σχετίζεται με τη συχνότητα και το είδος της σεξουαλικής επαφής. Επιπλέον, ο επιπολασμός του ιού στον γενικό πληθυσμό συμβαδίζει με αυτόν του σαρκώματος. Είναι αρκετά μικρός στις Ηνωμένες

Πολιτείες (1.5%-7.4% σύμφωνα με πληθυσμιακή μελέτη που διεξήχθη στο διάστημα 1988-1994), λίγο μεγαλύτερος σε περιοχές με υψηλή συχνότητα κλασσικού KS, και ακόμη μεγαλύτερος σε περιοχές ενδημικού σαρκώματος (Κεντρική Αφρική) [38-39]. Πριν την εξάπλωση της επιδημίας του AIDS το Karosi ήταν σποραδική νόσος με σαφή γεωγραφική εντόπιση (Μεσόγειος, Καραϊβική, Αφρική) και προτίμηση σε φύλο (άντρες) και ηλικιακή ομάδα (άνω των 60 ετών). Ωστόσο, η επαγόμενη από τον HIV ανοσοανεπάρκεια και η ιατρογενής ανοσοκαταστολή οδήγησαν σε αύξηση της επίπτωσης του σαρκώματος Karosi καθώς και σε ταχύτερη-επιθετικότερη πορεία του [38]. Πέραν της εμπλοκής του στη παθογένεση του σαρκώματος Karosi, ο HHV-8 αποτελεί τεκμηριωμένο αιτιολογικό παράγοντα του πρωτοπαθούς εξιδρωματικού λεμφώματος (PEL). Τα PELs αντιπροσωπεύουν περίπου το 4% όλων των HIV+ μη Hodgkin λεμφωμάτων (NHLs) και στη πλειοψηφία τους ο HHV-8 συνυπάρχει με τον EBV [33]. Ο ιός του σαρκώματος Karosi έχει επιπλέον συσχετισθεί με την πολυκεντρική ασθένεια του Castleman ενώ διερευνάται και η συμμετοχή του στο πολλαπλό μυέλωμα και το άγγειοανοσοβλαστικό λέμφωμα, με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα [29], [38], [40].

6. Εφαρμογές της συστημικής βιολογίας και βιοπληροφορικής στην κλινική ιολογία.

Η εφαρμογή των πρόσφατων τεχνολογιών γενομικής, πρωτεομικής, επιγενομικής, μεταβολομικής κατά τη τελευταία δεκαετία άλλαξε σημαντικά το τοπίο της βιοϊατρικής έρευνας θέτοντας τα θεμέλια για την ανάπτυξη της βιολογίας συστημάτων και την ολιστική προσέγγιση των οργανισμών [41-42]. Σε συνδυασμό με τα σύγχρονα εργαλεία βιοπληροφορικής, οι νέες τεχνολογίες χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης των δυναμικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος παθογόνου-ξενιστή [43-44]. Η βιολογία συστημάτων έχει αλλάξει σημαντικά το τοπίο της κλινικής ιολογίας αφενός αναδεικνύοντας τον καθοριστικό ρόλο του ξενιστή στην ιϊκή παθογένεση αφετέρου προσφέροντας πρωτοφανείς δυνατότητες αποτελεσματικότερης διάγνωσης και θεραπείας ταυτοποιώντας κυτταρικές πρωτεΐνες, που θα

μπορούσαν να αποτελέσουν νέους αντί-ϊικούς στόχους [45-47]. Αυτή η προοπτική είναι ιδιαίτερα σημαντική για τους ανθρώπινους ερπητοϊούς καθώς πληθαίνουν οι ερευνητικές μελέτες αναφορικά με την εμφάνιση μεταλλαγμένων HHVs στελεχών ανθεκτικών στα διαθέσιμα φάρμακα [48-49].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός

Ο σκοπός διεξαγωγής της παρούσας μελέτης ήταν: 1. Η αναζήτηση του ποσοστού ανίχνευσης του γονιδιώματος των ανθρώπινων ερπητοϊών τύπου 1-6 και 8 (HHVs1-6, 8) σε δείγμα Ελλήνων αιμοδοτών προκειμένου να εκτιμηθεί ο επιπολασμός τους στον υγιή πληθυσμό 2. Η αναζήτηση του ποσοστού ανίχνευσης των ανθρώπινων ερπητοϊών τύπου 4 και 5 (HHVs 4-5) σε δείγμα Ελλήνων ασθενών με μεσογειακή αναιμία ώστε να εκτιμηθεί η κατανομή τους

στους πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς 3. Η σύγκριση των δύο πληθυσμών ως προς το ποσοστό μοριακής ανίχνευσης των HHVs 4-5 ώστε να διερευνηθεί η πιθανότητα μετάδοσης τους μέσω των μεταγγίσεων 4. Η συσχέτιση της μοριακής ανίχνευσης των HHVs με δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων και, 5. Η αναζήτηση και ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού της γονιδιακής οντολογίας νέων γονιδίων-πιθανών στόχων του ερπητοϊού τύπου 4.

2. Υλικό της μελέτης

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν: 1. Πληθυσμός μεγέθους $N_1=401$ αποτελούμενος από εθελοντές δότες αίματος, που προσήλθαν στο τμήμα Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος του 2009-Φεβρουάριος του 2011. Η επιλογή των μονάδων N_1 έγινε με τη μέθοδο της τυχαίας δειγματοληψίας. 2. Πληθυσμός μεγέθους $N_2=76$ αποτελούμενος από πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με μεσογειακή αναιμία και δρεπανοκυτταρική νόσο, που παρακολουθούνται στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η επιλογή των μονάδων N_2 έγινε με κριτήριο των αριθμό μεταγγίσεων ανά έτος (ίσος και ή μεγαλύτερος του 9). Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των δύο πληθυσμών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**. Ως πόλεις κατηγοριοποιήθηκαν περιοχές με πληθυσμό ίσο ή μεγαλύτερο των 30.000 κατοίκων σύμφωνα με την τελευταία απογραφή της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας το έτος 2011. Τα κλινικά χαρακτηριστικά, που συνεκτιμήθηκαν ήταν ως προς τον πληθυσμό N_1 , η παρουσία παθολογικών τιμών των ηπατικών δεικτών SGOT και/ή SGPT ($>$ από 50 IU/L) καθώς και η οροθετικότητα για τον ιό της ηπατίτιδας Α (HAV IgG +) ενώ για τον πληθυσμό N_2 καταγράφησαν, οι τιμές της φερριτίνης, ο αριθμός των μεταγγίσεων ανά έτος, τα επίπεδα των SGOT και SGPT και οι ορολογικοί δείκτες

αφενός της ηπατίτιδας C (αντισώματα HCV) αφετέρου των ερπητοϊών 4 και 5 (EBV VCA-G, CMV IgG).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	N ₁	N ₂
	ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ	ΠΟΛΥΜΕΤΑΓΓΙΖΟΜΕΝΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΜΕΓΕΘΟΣ	401	76
ΦΥΛΟ		
ΑΝΤΡΕΣ	325	34
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	76	42
ΔΙΑΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ	37	38
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ		
ΕΓΓΑΜΟΙ	227	26
ΑΓΑΜΟΙ	169	50
ΑΓΝΩΣΤΟ	5	
ΤΟΠΟΣ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ		
ΑΣΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	291	68
ΑΓΡΟΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	106	8
ΑΓΝΩΣΤΟ	4	
ΔΙΑΓΝΩΣΗ		
Β ΟΜΟΖΥΓΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ		73
ΜΙΚΡΟΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ		2
ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ		1

3. Μέθοδοι

Η μεθοδολογία της μελέτης περιελάμβανε:

→ τη συλλογή του φλεβικού αίματος

→ την απομόνωση του γενωμικού DNA

→ την ποσοτική και σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

(qRTpcr) – για κάθε ιό χρησιμοποιήθηκε ξεχωριστή, ειδική αντίδραση ενίσχυσης

γονιδιακής αλληλουχίας

→ την στατιστική ανάλυση

→ την υπολογιστική/βιοπληροφορική ανάλυση

3.1 Συλλογή φλεβικού αίματος

Η συλλογή του φλεβικού αίματος έγινε σε σωληνάρια γενικής αίματος κενού επαλειμμένα με αντιπηκτικό K₃EDTA συνολικού όγκου 2 ml.

3.2 Απομόνωση του ολικού DNA

Η απομόνωση του γενετικού υλικού έγινε στο αυτοματοποιημένο σύστημα Magtration 12 GC (Precision System Science Co., Ltd, Chiba, Japan), το οποίο βασίζεται στην τεχνολογία μαγνητικού διαχωρισμού των νουκλεϊνικών οξέων και επιτρέπει τον ταυτόχρονο χειρισμό έως και 12 δειγμάτων ανά εφαρμογή (**Εικόνες 12-13**). Η διαδικασία περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

→ Τοποθέτηση της κάρτας προγραμματισμού IC του Magtration-MagaZorb DNA Common Kit-200 N protocol στην υποδεικνυόμενη θέση του συστήματος Magtration 12 GC.

→ Τοποθέτηση στις σχάρες (racks) του συστήματος των προγεμισμένων με αντιδραστήρια μικροσωλήνων (Reagent pre-filled Cartridges), που περιέχουν:

- Πρωτεϊνάση K, που αποτελεί ένζυμο υδρόλυσης των πεπτιδίων
- Διάλυμα λύσης των κυττάρων (Lysis Buffer)
- Διάλυμα δέσμευσης (Binding Buffer)
- Εναιώρημα μαγνητικών σωματιδίων (Magnetic Particles Suspension)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1 (Tris-HCl, με pH 8.0)
- Διάλυμα πλύσης των ρυγχών (Tip Wash)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (Απεσταγμένο νερό, dH₂O)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer)

→ Τοποθέτηση σωληναρίου και ρύγχους στη κενή θέση 2 του συστήματος καθώς και ανοιχτών, αποστειρωμένων και ελεύθερων από ένζυμα υδρόλυσης των νουκλεϊνικών οξέων, σωληναρίων μικροφυγοκέντρου (DNAse- RNAse free microcentrifuge tubes) των 1.5 ml στις κενές θέσεις 1 (θέση σωληναρίου έκλουσης του DNA) και 4 (θέση τοποθέτησης του αρχικού δείγματος)

→ Έγχυση 200μl ολικού αίματος στο μικροσωληνάριο της θέσης 4

→ Επιβεβαίωση της σωστής τοποθέτησης όλων των αντιδραστηρίων και δειγμάτων στις προβλεπόμενες θέσεις

→ Επιλογή της εντολής 'Εναρξη' στον πίνακα λειτουργίας και των οδηγιών που ακολούθησαν

→ Επιλογή της εντολής για τελικό όγκο έκλουσης 100μl DNA

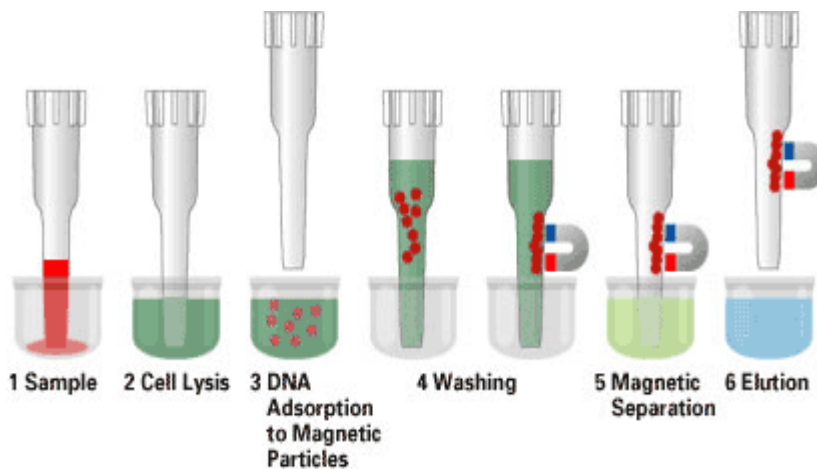
→ Συλλογή των σωληναρίων έκλουσης του DNA μετά από 40 λεπτά λειτουργίας του συστήματος



Εικόνα 12. Το αυτοματοποιημένο σύστημα εξαγωγής νουκλεϊνικών οξέων Magtration 12 GC.

Πηγή:

<http://biotronhealthcare.com/lifescience/Magtration-System-12GC.jpg>



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων απομόνωσης του γενωμικού DNA μέσω της τεχνολογίας των μαγνητών.

Πηγή: <http://www.gibthai.com/userfiles/image/Product2008/PSS/Pss3.jpg>

1. Δείγμα (στη παρούσα μελέτη 200μl ολικού αίματος)
2. Λύση των κυττάρων

3. Προσρόφηση του DNA στα μαγνητικά σωματίδια
4. Πλύση
5. Μαγνητικός διαχωρισμός
6. Έκλυση

Ακολούθησε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) των υδατικών διαλυμάτων DNA (1/100 αραιωμένα διαλύματα DNA) σε μήκη κύματος 260 και 280 nm μετά από την τοποθέτησή τους σε κυψελίδα χαλαζία. Οι μέθοδοι ανίχνευσης-ποσοτικοποίησης βασίζονται στην απορρόφηση στην περιοχή UV των βάσεων των νουκλεϊνικών οξέων. Τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν ισχυρά στα 260 nm και λιγότερο ισχυρά στα 280 nm, (ισχύει το αντίθετο για τα μόρια των πρωτεϊνών). Τιμή οπτικής πυκνότητας στα 260nm ίσης με τη μονάδα αναλογεί σε συγκέντρωση DNA ίση με 50μg/ml. Η συγκέντρωση του DNA στα διαλύματα υπολογίστηκε βάσει του μαθηματικού τύπου:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (σε } \mu\text{g /ml)} = \text{αραίωση} \times 50 \times \text{OD}_{260}$$

Η καθαρότητα των παρασκευασμάτων DNA προσδιορίστηκε μέσω του λόγου:
 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$

Πειραματικά, ο λόγος A260/A280 καθαρών διαλυμάτων DNA κυμαίνεται μεταξύ 1.8 και 2.0. Μικρότερες ή μεγαλύτερες τιμές υποδηλώνουν την πρόσμιξη με πρωτεΐνες ή RNA, αντίστοιχα [50].

Εν συνεχεία έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% (E-Gel Agarose Gels, Invitrogen, Carlsbad, California). Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να μετακινείται, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, στον θετικό πόλο λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού του σκελετού. Αναμείχθηκαν 10 μl κάθε δείγματος με 3 μl χρωστικής (100mM EDTA,

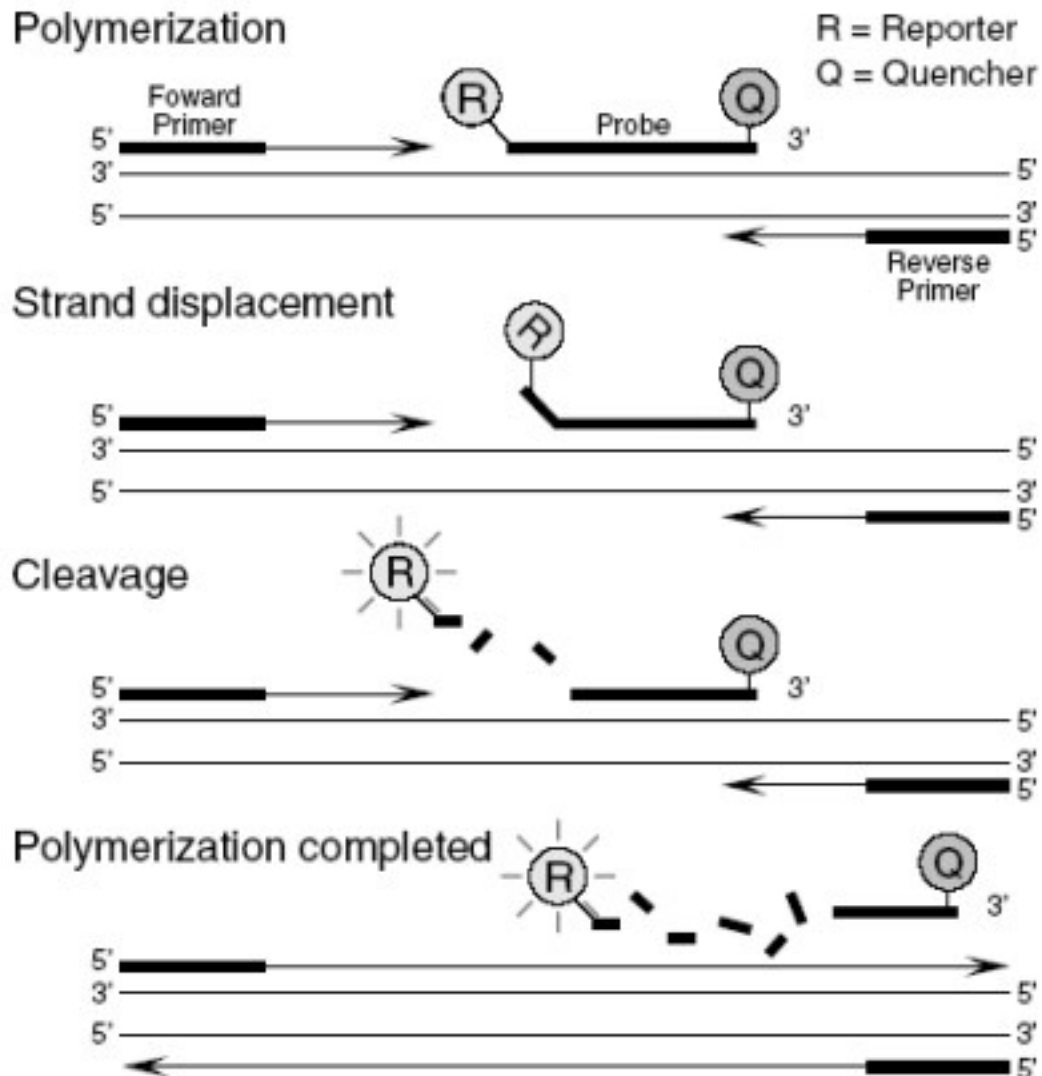
20% w/v φυκόλη και 1% μπλε βρωμοφαινόλη) και τοποθετήθηκαν με πιπέτα στα πηγαδάκια της πηκτής αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε 20 λεπτά και πραγματοποιήθηκε στη συσκευή E-Gel PowerBase Invitrogen, Carlsbad, California μετά από προθέρμανση της για 15 λεπτά. Ακολούθως, κάθε πηκτή τοποθετήθηκε σε υπεριώδες φως 220 nm (Ultraviolet, UV) της συσκευής MiniBis Pro/DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalem, Israel, προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA μέσω του έντονου φθορισμού της χρωστικής κατά την έκθεση της στην υπεριώδη ακτινοβολία. Ακολούθησε φωτογράφιση των πηκτωμάτων και αποθήκευση.

3.3 Ποσοτική, σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Η ποσοτική, σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qRT-PCR), βασίζεται στην ενεργότητα 5' νουκλεάσης της Taq πολυμεράσης και στη σύνδεση του προϊόντος PCR με φθοριόχρωμα σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η τελευταία πραγματοποιείται σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή που φέρει ανιχνευτή φθορισμού και συνδέεται με υπολογιστικό σύστημα που διαθέτει το κατάλληλο πρόγραμμα. Η ένταση φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης και προσδιορίζεται σε κάθε της κύκλο. Ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά έναν ορισμένο ουδό μετάβασης καλείται κύκλος μετάπτωσης (Threshold cycle, CT) και αντιστοιχεί στην ποσότητα της αλληλουχίας στόχου [51].

Για την τεχνική της qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε η προτυποποιημένη εμπορική δοκιμασία Q-PCR Alert™ (Nanogen Advanced Diagnostics S.r.l, Assago, MI, Italy) που χρησιμοποιεί την τεχνολογία των Minor Groove Binders (MGB) και βασίζεται στη χημεία των ανιχνευτών υδρόλυσης TaqMan. Οι τελευταίοι είναι συζευγμένοι στο ένα τους άκρο με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (στη παρούσα μελέτη, FAM ή VIC) και στο άλλο με έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος. Κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου, η 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης υδrolύει τον ανιχνευτή υδρόλυσης με αποτέλεσμα τον

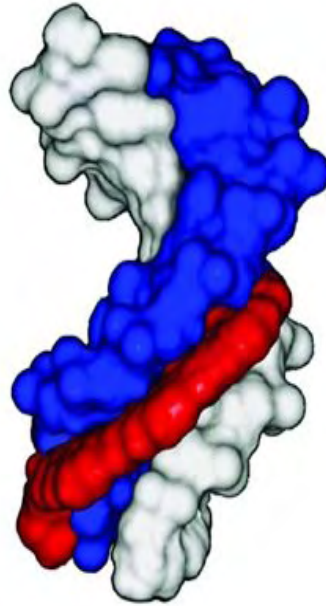
διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς από τον καταστολέα του και την ανίχνευση του φθορισμού (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14. Ανιχνευτής υδρόλυσης Taqman. Ο ανιχνευτής είναι συζευγμένος στο ένα του άκρο με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (Reporter) και στο άλλο με έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (Quencher). Καθώς εξελίσσεται η αντίδραση και ενισχύεται η αλληλουχία στόχος, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αποσπάται από το φθορισμόχρωμα αναφοράς που με τη σειρά του απομακρύνεται από τον καταστολέα του και εκπέμπει φθορισμό.

Πηγή: www.dkfz.de/gpcf/uploads/pics/Taqman_probes

Τα MGB είναι αντιβιοτικά μόρια που δεσμεύονται στη μικρή αύλακα του DNA μέσω υδρογονικών δεσμών ή υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων (**Εικόνα 15**). Η σύνδεση τους στο 5' ή 3' άκρο των ανιχνευτών υδρόλυσης επιτρέπει τον ισχυρότερο υβριδισμό των τελευταίων με τις συμπληρωματικές ακολουθίες των εκκινητών.



Εικόνα 15. Τα MGB (με κόκκινο χρώμα), αναδιπλωμένα γύρω από τη μικρή αύλακα της δίκλωνης έλικας του DNA. **Πηγή:** www.genengnews.com/gen-articles/assay-optimizing-rt-pcr-for-pathogen-detection/2024/

Στην παρούσα μελέτη, για κάθε ερπητοϊό πραγματοποιήθηκε διαφορετική αντίδραση ενίσχυσης γονιδιακής αλληλουχίας με εκκινητές ειδικούς για συγκεκριμένα γονίδια στόχους (**Πίνακας 6**) και αναλυτική ευαισθησία που επέτρεπε την ανίχνευση 10 ιϊκών αντιγράφων/αντίδραση με εξαίρεση τον CMV για τον οποίο η ευαισθησία ισοδυναμούσε με 17 ιϊκά αντίγραφα/αντίδραση. Ως γονίδιο αναφοράς (εσωτερικός μάρτυρας) για τον έλεγχο της παρουσίας ανασταλτών χρησιμοποιήθηκε αυτό της β-σφαιρίνης με εκκινητές και ανιχνευτές ειδικούς για τον προαγωγέα και την 5'αμετάφραστη περιοχή (5'UTR).

<p>Πίνακας 6. Οι περιοχές των γονιδίων που ενισχύθηκαν στις δοκιμασίες qRT-PCR για την ανίχνευση των 7 ερπητοϊών (gpD: glycoprotein D, MDBP: major DNA binding protein, EBNA-1: EBV nuclear antigen 1, MIEA: major immediate early antigen,</p>
--

ORF: open reading frame)	
Ερπητοϊός	Περιοχή-Στόχος
HHV-1 (HSV-1)	gpD
HHV-2 (HSV-2)	gpD
HHV-3 (VZV)	MDBP
HHV-4 (EBV)	EBNA-1
HHV-5 (CMV)	MIEA
HHV-6	ORF 13R
HHV-8 (KSHV)	Capside protein

Για την προετοιμασία του μίγματος της qRT-PCR προστέθηκαν σε 340 μl του σωληναρίου AMPLIMASTER, 100 μl από το μίγμα εκκινητών AMPLIMIX και 100 μl από το μίγμα ανιχνευτών AMPLIBROBE. Η σύσταση καθενός από τα προαναφερόμενα αντιδραστήρια παρουσιάζεται στον **Πίνακα 7**.

Πίνακας 7. Η χημική σύνθεση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του τελικού μίγματος της qRT-PCR			
Συστατικό	Περιγραφή	Σύνθεση	Ποσότητα
Amplimix	Μίγμα των ειδικών για κάθε ιό εκκινητών	Ολιγονουκλεοτίδια, Τρις-υδροχλωτικό, Γλυκερόλη, TRIS base, Triton X-100	100μl
Ampliprobe	Μίγμα των ειδικών για κάθε ιό ανιχνευτών υδρόλυσης συζευγμένων με τα φθορισμοχρώματα FAM/MGB (ανιχνευτές ιικού γονιδιώματος) και VIC/MGB (ανιχνευτές γονιδίου αναφοράς)	Φθορίζοντα Ολιγονουκλεοτίδια, Τρις-υδροχλωτικό, Γλυκερόλη, TRIS base, Triton X-100	100μl
Amplimaster	Μίγμα αντιδραστηρίων απαραίτητων για την εκτέλεση κάθε αντίδρασης	Γλυκερόλη, Χλωριούχο μαγνήσιο, Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, Ουρακίλη Ν-γλυκοσιδάση, Taq DNA πολυμεράση, ROX, TRIS base, Τρις-υδροχλωτικό	340μl

Το τελικό μίγμα της qRT-PCR αναδεύτηκε σε χαμηλή ταχύτητα για 5 sec. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση (short spin, 10 sec).

Σε κάθε ένα από τα μικροσωληνάρια της qRT-PCR τοποθετήθηκαν 20 μl του τελικού μίγματος και 5 μl DNA. Στον αρνητικό μάρτυρα της αντίδρασης τοποθετήθηκαν 5 μl αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού αντί του DNA ενώ για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (standard curve) χρησιμοποιήθηκαν 5 μl γνωστών αραιώσεων πλασμιδιακού DNA (10^2 - 10^5) που περιείχαν για κάθε ιό την ενισχυμένη ακολουθία στόχο.

Οι μικροσωληνίσκοι κλείστηκαν αεροστεγώς και τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή Corbett Rotor-Gene 3000. Ο προγραμματισμός της αντίδρασης περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

→ Decontamination 50°C, 2 λεπτά

→ Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation) 95°C, 10 λεπτά

→ Ενίσχυση (Amplification), 45 κύκλοι

95°C, 15 δευτερόλεπτα

60°C, 60 δευτερόλεπτα

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας οι ουδοί μετάβασης (Threshold) τέθηκαν χειροκίνητα στη τιμή 0.1 για το γονίδιο-στόχο κάθε ερπητοϊού και 0.05 για το γονίδιο μάρτυρα.

Τα κριτήρια που έπρεπε να πληρούνται για να γίνουν αποδεκτές οι δοκιμασίες των αντιδράσεων ήταν: 1. Ο κύκλος μετάπτωσης για το γονίδιο της β σφαιρίνης να είναι ίσος ή μικρότερος του 35 όταν το γονιδίωμα των ερπητοϊών είναι μη ανιχνεύσιμο, 2. Ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient, R²) της πρότυπης καμπύλης να παίρνει τιμές μεταξύ 0.990 και 1.000 και 3. Να μην υπάρχει επιμόλυνση του αρνητικού μάρτυρα.

Οι δυνατοί συνδυασμοί των αποτελεσμάτων και η ερμηνεία τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR με βάση τους κύκλους μετάπτωσης Ct			
Ανιχνευτής υδρόλυσης FAM	Ανιχνευτής υδρόλυσης VIC	Δείγμα	Γονίδιο-Στόχος
Μη Ανιχνεύσιμο σήμα	Ct>35	ακατάλληλο	-
	Ct<35	κατάλληλο	Μη ανιχνεύσιμο
Ανιχνεύσιμο σήμα	Ct>35 (σε δείγματα με πολύ υψηλό ιικό φορτίο)	κατάλληλο	Ανιχνεύσιμο
	Ct<35	κατάλληλο	Ανιχνεύσιμο

Σε δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά στο όριο της ανιχνευσιμότητας, η δοκιμασία επαναλήφθηκε και αξιολογήθηκε ως θετική όταν έδινε το ίδιο αποτέλεσμα (θετική καμπύλη ενίσχυσης). Η ποσότητα των ιικών αντιγράφων/αντίδραση στη περίπτωση αυτή χαρακτηριζόταν ως μικρότερη του 10. Αντίθετα, σε δείγματα με πολύ υψηλό ιικό φορτίο, εκτός του ορίου της πρότυπης καμπύλης, η ποσότητα αξιολογήθηκε ως μεγαλύτερη των 1.000.000 αντιγράφων/αντίδραση σύμφωνα και με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Για την αναγωγή των αποτελεσμάτων σε αντίγραφα ανά ml ολικού αίματος, πολλαπλασιάστηκε η ποσότητα των αντιγράφων/αντίδραση επί του 100 καθώς τα 5μl του DNA της αντίδρασης προέκυψαν από 100 μl elution που με τη σειρά του προέκυψε από 200 μl ολικού αίματος.

3.4 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

- Συλλογή και καταγραφή όλων των παρατηρήσεων (observations)
- Αντιστοίχιση τους (ταυτοποίηση) στο όνομα κάθε συμμετέχοντος στη μελέτη

→ Κωδικοποίηση των παρατηρήσεων

→ Εισαγωγή τους στο στατιστικό πρόγραμμα SPSS 19.0 (IBM Statistics)

Για κάθε πληθυσμό υπολογίσθηκαν τα ποσοστά ανίχνευσης του γονιδιώματος των HHVs καθώς και η κατανομή τους ανά φύλο, ηλικία και οικογενειακή κατάσταση. Οι μέσες τιμές συνεχών μεταβλητών μεταξύ δύο ανεξάρτητων δειγμάτων συγκρίθηκαν μέσω του t-test. Για τον έλεγχο της σχέσης ποιοτικών δυαδικών μεταβλητών διατάξιμων σε πίνακες συνάφειας χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ χ^2 . Για την εκτίμηση της πιθανότητας παρουσίας ή όχι του γονιδιώματος με βάση την ύπαρξη όλων των ανεξάρτητων μεταβλητών, ποιοτικών και ποσοτικών χρησιμοποιήθηκε η παλίνδρομη ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών που περιγράφεται από το παρακάτω μοντέλο:

$$\text{logit} (p=\text{πιθανότητα ανίχνευσης του DNA των HHVs})= b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3+\dots$$

όπου x_1, x_2, x_3 οι ανεξάρτητες μεταβλητές και b_1, b_2, b_3 οι συντελεστές που εκτιμούν τον βαθμό επίδρασης κάθε μεταβλητής στην πιθανότητα εμφάνισης της έκβασης. Με βάση αυτούς τους συντελεστές υπολογίζονται και οι λόγοι αναλογιών (odds ratio).

$$OR_{x_v}=e^{b_v}$$

Για την σύγκριση των δύο πληθυσμών ως προς τα ποσοστά ανίχνευσης του EBV ή CMV DNA σε σχέση με τους δημογραφικούς προσδιοριστές (τόπος κατοικίας, φύλο και οικογενειακή κατάσταση) χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ χ^2 . Η στάθμη σημαντικότητας καθορίστηκε στη τιμή $p=0.05$.

3.5 Υπολογιστική-Βιοπληροφορική ανάλυση

Για την ανεύρεση νέων γονιδίων-πιθανών στόχων του EBV, κατασκευάστηκε το δίκτυο γονιδιακής αλληλεπίδρασης του διαμεσολαβητή της απόπτωσης BIM (BCL2-Like 11) καθώς το συγκεκριμένο γονίδιο έχει βρεθεί ότι καταστέλλεται επιγενετικά από τον ανθρώπινο ερπητοϊό τύπου 4 [52-54]. Χρησιμοποιήθηκαν οι

ακόλουθες βάσεις δεδομένων: Biogrid: <http://thebiogrid.org/>, String: <http://string-db.org/> και GeneMania: <http://www.genemania.org/>. Οι παραπάνω πλατφόρμες αποτελούν 'αποθήκες' γνωστών αλλά και προβλεπόμενων γενετικών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων καθώς και σηματοδοτικών οδών [55-57]. Για την περιγραφή των ανακτημένων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική βάση GeneCards (<http://www.genecards.org/>) που παρέχει συνοπτικές γονιδιωματικές πληροφορίες για όλα τα γνωστά ανθρώπινα γονίδια [58]. Οι συσχετιστές του BIM που ταυτοποιήθηκαν και στις τρεις προαναφερόμενες βάσεις εισήχθησαν ως μία λίστα στα λογισμικά GeneCodis: <http://genecodis.cnb.csic.es/> και Panther: <http://pantherdb.org/> προκειμένου να υποβληθούν σε περαιτέρω ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού της γονιδιακής οντολογίας σε επίπεδο κυτταρικής σηματοδότησης [59-60]. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στις 09-01-2015.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανίχνευση των ανθρώπινων ερπητοϊών στον υγιή πληθυσμό (N₁)

Τα ποσοστά ανίχνευσης του γονιδιώματος των 7 HHVs στο δείγμα του αιμοδοτικού πληθυσμού N₁ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**.

Πίνακας 9. Τα ποσοστά ανίχνευσης (%) του DNA των 7 υπό μελέτη ερπητοϊών στον υγιή αιμοδοτικό πληθυσμό							
	HSV-1	HSV-2	VZV	CMV	HHV-8	HHV-6	EBV
Μέγεθος πληθυσμού	401	401	401	401	401	401	401
Θετικά δείγματα	0	0	0	1	2	14	85
Ποσοστό ανίχνευσης %	0	0	0	0,25	0,5	3,5	21,2

Το εύρος των ιικών αντιγράφων/ml ολικού αίματος κυμαινόταν από <1000-5600 για τον EBV και <1000-3400 για τα 13 θετικά δείγματα του HHV-6 ενώ υπήρξε και ένα δείγμα με πολύ υψηλό ιικό φορτίο του HHV-6, ισοδύναμο με

1.580.400copies/ml. Η ποσότητα των ιικών αντιγράφων στο θετικό για CMV DNA δείγμα καθώς και στα δύο θετικά για HHV-8 DNA δείγματα ήταν 2000copies/ml. Οι κατανομές συχνότητας των 7 HHVs ανά φύλο, ηλικιακή ομάδα, τόπο διαμονής και οικογενειακή κατάσταση παρουσιάζονται στον **Πίνακα 10**.

Πίνακας 10. Οι κατανομές συχνότητας του γονιδιώματος των HHVs ανά φύλο, οικογενειακή κατάσταση, τόπο κατοικίας και ηλικιακή ομάδα.					
Χαρακτηριστικά	Μέγεθος δείγματος	HHV6 +	HHV8 +	EBV +	CMV +
Φύλο	401				
Άντρες	325	10	1	72	1
Γυναίκες	76	4	1	13	0
Οικογενειακή κατάσταση	396				
Έγγαμοι	227	9	2	52	1
Άγαμοι	169	5	0	33	0
Τόπος κατοικίας	397				
Αστικό κέντρο	291	9	2	54	1
Αγροτική περιοχή	106	5	0	30	0
Ηλικιακή ομάδα	391				
1 (18-27)	62	1	0	10	0
2 (28-37)	152	4	0	29	0
3 (38-47)	112	7	2	32	1
4 (48-57)	60	2	0	12	0
5 (58-67)	5	0	0	1	0

Σε μονοπαραγοντική ανάλυση δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της ανίχνευσης των HHVs και των προσδιοριστών: ηλικία, παθολογική ηπατική βιοχημεία, φύλο, παρουσία HAV IgG αντισωμάτων και οικογενειακή κατάσταση. Από την εφαρμογή της παλινδρομής ανάλυσης πολλαπλών μεταβλητών προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση (**Πίνακας 11**) :

$\text{logit (p=πιθανότητα ανίχνευσης του DNA των ερπητοϊών)} = -1,896 + 0.013 * \text{ηλικία} - 0.170 * \text{ηπατικά_ένζυμα} + 0.538 * \text{τόπος_κατοικίας} - 0.171 * \text{φύλο} - 0.220 * \text{HAV_IgG} + 0.176 * \text{οικογενειακή_κατάσταση}$

Πίνακας 11. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της παλινδρομής ανάλυσης πολλαπλών μεταβλητών στον πληθυσμό N₁ για το σύνολο των HHVs (B: ο συντελεστής που υποδεικνύει τον βαθμό επίδρασης κάθε μεταβλητής στην πιθανότητα ανίχνευσης του γονιδιώματος των HHVs, Sig: η τιμή του p, Exp(B): ο λόγος αναλογιών OR, C.I: το διάστημα εμπιστοσύνης, Constant: ο συντελεστής b₀)

Μεταβλητή	B	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
				Lower	Upper
Ηλικία	,013	,428	1,013	,980	1,048
Ηπατικά_Ενζυμα	-,170	,542	,844	,489	1,457
Τόπος_κατοικίας	,538	,038*	1,713	1,030	2,847
Φύλο	-,171	,585	,843	,457	1,557
HAV	-,220	,468	,803	,444	1,452
Οικογενειακή_κατάσταση	,176	,544	1,193	,675	2,108
Constant	-1,896	,020	,150		

* σε μονοπαραγοντική ανάλυση η αντίστοιχη τιμή του p ήταν ίση με 0.062

Ο τόπος κατοικίας, όπως προέκυψε από τη πολυπαραγοντική ανάλυση, επιδρά με στατιστικά σημαντικό τρόπο στην πιθανότητα ανίχνευσης του γονιδιώματος των HHVs ($p=0.038$). Υπολογίσθηκε η πιθανότητα ανίχνευσης του γονιδιώματος για της κατοίκους των αστικών και αγροτικών περιοχών:

$$ODDS_{\text{αγροτική_περιοχή}} = e^{b_0 + bx} = 0.44044$$

(όπου $x=2$ σύμφωνα με τη κωδικοποίηση των παρατηρήσεων)

$$ODDS_{\text{αστική_περιοχή}} = e^{b_0 + bx} = 0.2571$$

(όπου $x=1$, σύμφωνα με τη κωδικοποίηση των παρατηρήσεων)

Ο λόγος αναλογιών είναι

$$OR = 0.44044 / 0.2571 = 1.713 \text{ (όπως φαίνεται και στον Πίνακα 11)}$$

Ως εκ τούτου οι κάτοικοι των αγροτικών περιοχών έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να βρεθούν θετικοί για HHVs DNA, σε σχέση με τους κατοίκους των πόλεων.

Λόγω του παραπάνω αποτελέσματος εκτιμήθηκε περαιτέρω η επίδραση του τόπου κατοικίας αλλά και των υπολοίπων μεταβλητών στην πιθανότητα

ανίχνευσης του HHV-6 DNA και του EBV DNA, ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα των υποαναλύσεων συνοψίζονται στους **Πίνακες 12-13**.

Πίνακας 12. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της πολύνδρομης ανάλυσης πολλαπλών μεταβλητών στον πληθυσμό N ₁ για τον HHV-6 (B: ο συντελεστής που υποδεικνύει τον βαθμό επίδρασης κάθε μεταβλητής στην πιθανότητα ανίχνευσης του γονιδιώματος του HHV-6, Sig: η τιμή του p, Exp(B): ο λόγος αναλογιών OR, C.I.: το διάστημα εμπιστοσύνης, Constant: ο συντελεστής b ₀)					
	B	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
				Lower	Upper
Ηλικία	,033	,390	1,033	,959	1,114
Ηπατικά_Ένζυμα	,860	,135	2,363	,766	7,292
Τόπος_κατοικίας	,328	,574	1,388	,443	4,344
Φύλο	,672	,285	1,958	,571	6,715
HAV	-,369	,595	,692	,177	2,698
Οικογενειακή_κατάσταση	,014	,983	1,014	,271	3,792
Constant	-6,494	,001	,002		

Πίνακας 13. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της παλινδρομής ανάλυσης πολλαπλών μεταβλητών στον πληθυσμό N ₁ για τον EBV (B: ο συντελεστής που υποδεικνύει τον βαθμό επίδρασης κάθε μεταβλητής στην πιθανότητα ανίχνευσης του γονιδιώματος του EBV, Sig: η τιμή του p, Exp(B): ο λόγος αναλογιών OR, C.I: το διάστημα εμπιστοσύνης, Constant: ο συντελεστής b ₀)					
	B	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
				Lower	Upper
Ηλικία	,017	,339	1,017	,982	1,053
Ηπατικά_Ένζυμα	-,191	,514	,826	,465	1,467
Τόπος_κατοικίας	,604	,025*	1,829	1,078	3,104
Φύλο	-,378	,270	,685	,351	1,340
HAV	-,222	,485	,801	,429	1,494
Οικογενειακή_κατάσταση	,181	,554	1,198	,659	2,179
Constant	-2,035	,018	,131		
* σε μονοπαραγοντική ανάλυση η αντίστοιχη τιμή του p βρέθηκε ίση με 0.037					

Όπως φαίνεται στους παραπάνω πίνακες, ο τόπος κατοικίας δεν επιδρά με στατιστικά σημαντικό τρόπο στην πιθανότητα ανίχνευσης του HHV-6 DNA, επηρεάζει όμως την πιθανότητα ανίχνευσης του EBV DNA. Κατά αντιστοιχία με το σύνολο των HHVs, υπολογίστηκε η πιθανότητα ανίχνευσης του EBV γονιδιώματος στους κατοίκους των αστικών και αγροτικών περιοχών:

$$ODDS_{\text{αγροτική_περιοχή}} = e^{b_0 + b_1x} = 0.4373$$

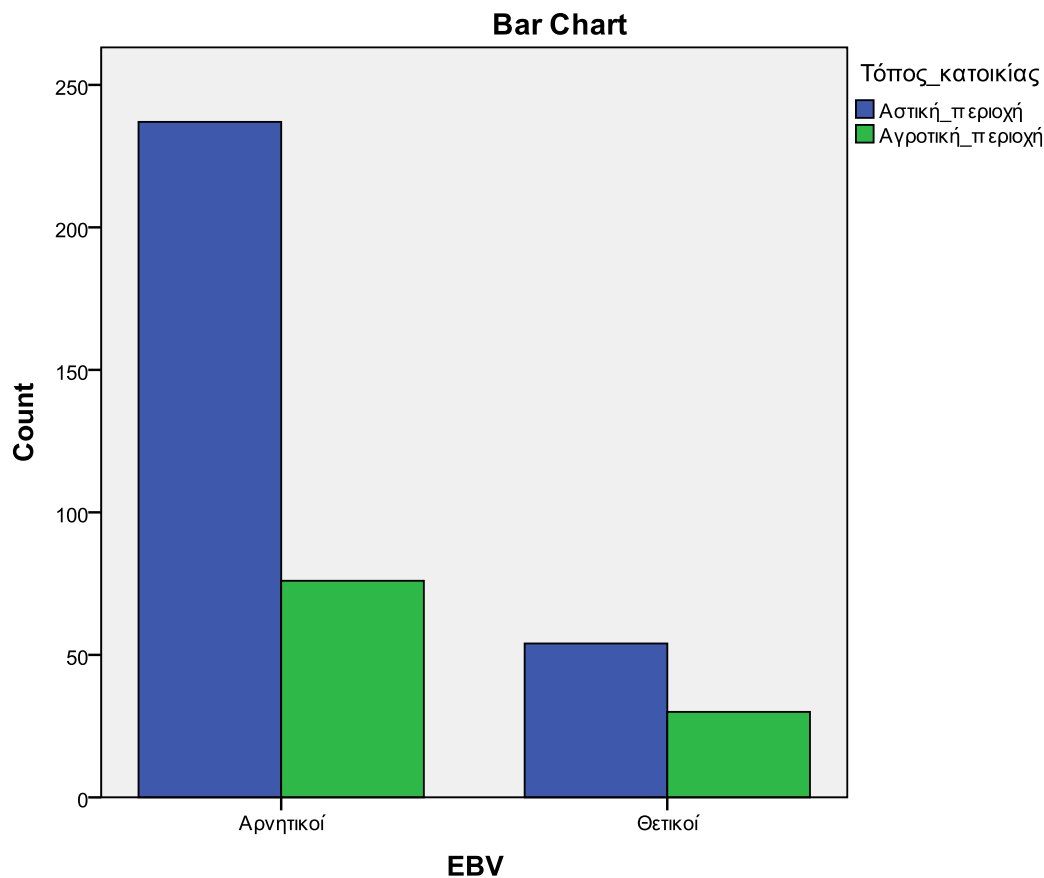
(όπου $x=2$ σύμφωνα με τη κωδικοποίηση των παρατηρήσεων)

$$ODDS_{\text{αστική_περιοχή}} = e^{b_0 + b_1x} = 0.2390$$

(όπου $x=1$, σύμφωνα με τη κωδικοποίηση των παρατηρήσεων)

Ο λόγος αναλογιών είναι:

$$OR = 0.4373 / 0.2390 = 1.829 \text{ (Πίνακας 13, Διάγραμμα 1)}$$



Διάγραμμα 1. Η κατανομή συχνότητας της μεταβλητής ‘τόπος κατοικίας’ μεταξύ αρνητικών και θετικών για EBV DNA δειγμάτων

4.2 Ανίχνευση των ανθρώπινων ερπητοϊών στον πληθυσμό των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών (N₂)

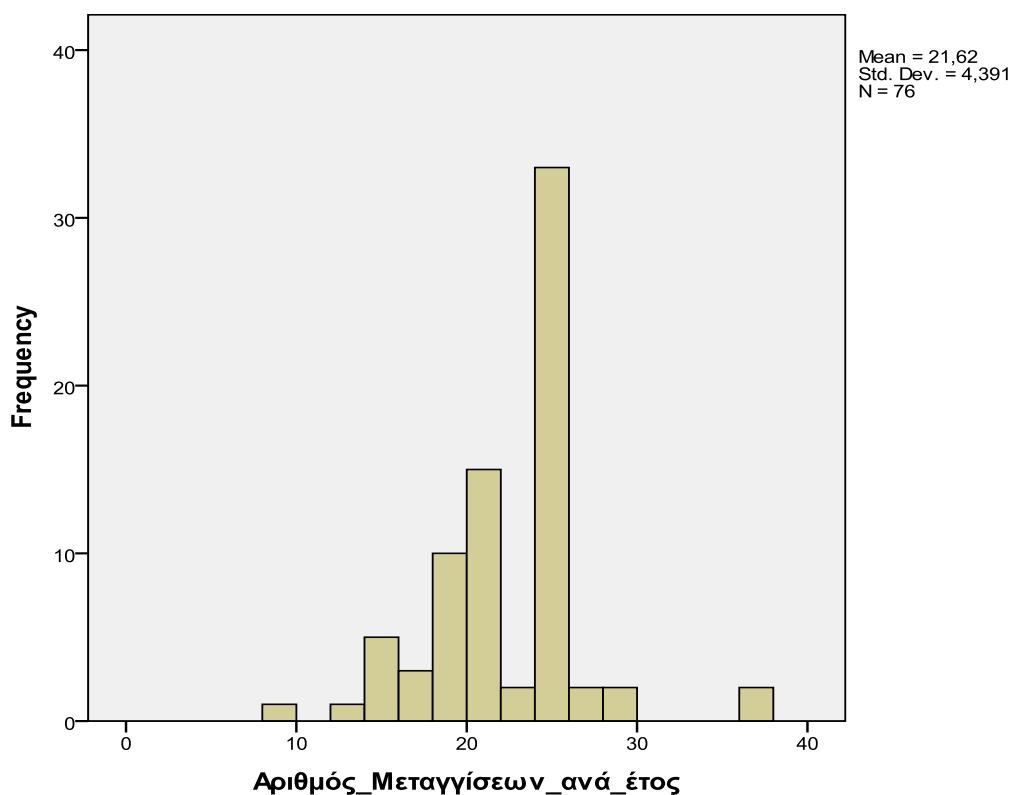
Τα περιγραφικά στατιστικά μέτρα των κλινικών χαρακτηριστικών των μονάδων του πληθυσμού N₂ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 14**. Η κατανομή συχνότητας του αριθμού των μεταγγίσεων ανά έτος στον πληθυσμό N₂ απεικονίζεται στο **Διάγραμμα 2**.

Πίνακας 14. Τα περιγραφικά στατιστικά μέτρα των κλινικών δεδομένων του πληθυσμού των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών

Μέγεθος πληθυσμού N=76	Ετήσιος αριθμός μεταγγίσεων	Τιμές Φερριτίνης (ng/ml)	SGOT (IU/L)	SGPT (IU/L)
Μέση τιμή	21,62	2076,40	28,13	30,89
Διάμεσος	24,00	1272,00	23,00	22,00
Τυπική απόκλιση	4,391	2386,444	24,576	26,345
Μικρότερη τιμή	9	52	7	5
Μεγαλύτερη τιμή	36	10487	214	184

Σε 14 από τα 76 εξεταζόμενα δείγματα ανιχνεύτηκε EBV DNA (18.42%) ενώ CMV DNA ανιχνεύτηκε σε ένα μόνο δείγμα (1.315%). Οι κατανομές συχνότητας των HCV, CMV IgG και EBV VCA-G αντισωμάτων μεταξύ θετικών και αρνητικών για EBV ή CMV DNA δειγμάτων εμφανίζονται στον **Πίνακα 15**.

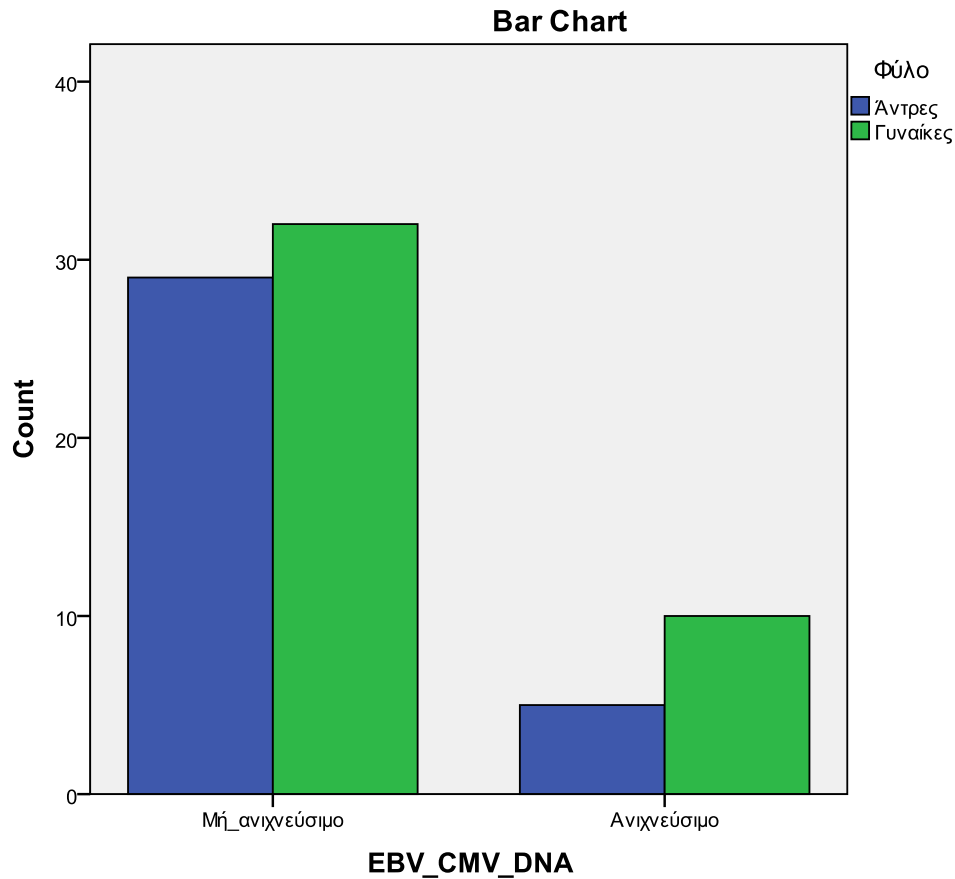
Πίνακας 15. Οι κατανομές συχνότητας των HCV, CMV IgG και EBV VCA-G αντισωμάτων μεταξύ των δειγμάτων με ανιχνεύσιμο και μη ανιχνεύσιμο EBV ή CMV DNA. Δεν υπήρξαν διαθέσιμα ορολογικά δεδομένα για όλους τους συμμετέχοντες.			
EBV ή CMV DNA	HCV	CMV IgG	EBV VCA-G
Ανιχνεύσιμο	6	8	9
Μη ανιχνεύσιμο	19	45	46



Διάγραμμα 2. Η κατανομή συχνότητας της μεταβλητής ‘αριθμός μεταγγίσεων ανά έτος’ στον πληθυσμό των ασθενών με μεσογειακή αναιμία και δρεπανοκυτταρική νόσο (Mean= μέση τιμή, Std.Dev= τυπική απόκλιση)

Τόσο σε μονοπαραγοντική όσο και σε πολυπαραγοντική ανάλυση δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της ανίχνευσης του DNA των ιών EBV ή CMV και των προσδιοριστών: φύλο, ηλικία, οικογενειακή κατάσταση, αριθμός μεταγγίσεων ανά έτος, παρουσία HCV, CMVlgG και EBV-VCAG αντισωμάτων. Ωστόσο, από την εφαρμογή της παλίνδρομης ανάλυσης πολλαπλών μεταβλητών παρατηρήθηκε μεγαλύτερη πιθανότητα ανίχνευσης του ιϊκού DNA στις γυναίκες, χωρίς ωστόσο στατιστική σημαντικότητα ($p=0.070$, OR: 7.71, 95%CI 0.843-70.502)

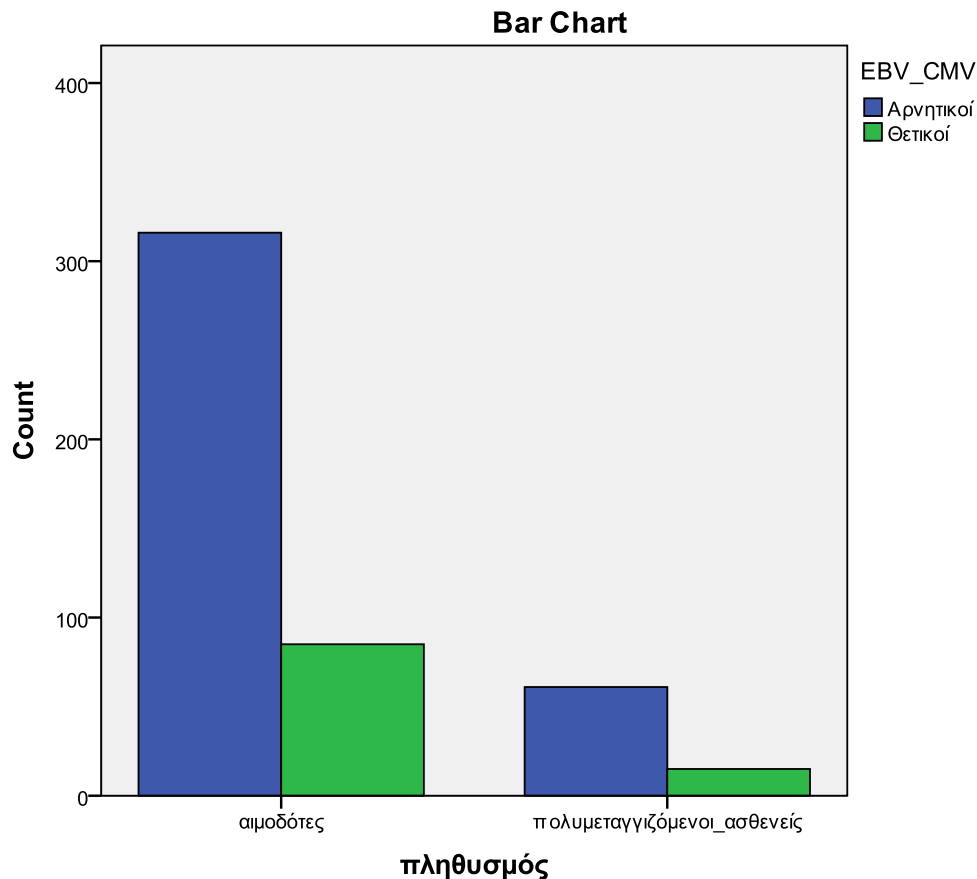
Στο **Διάγραμμα 3** απεικονίζεται η κατανομή συχνότητας του φύλου μεταξύ των EBV ή CMV DNA αρνητικών και EBV ή CMV DNA θετικών ασθενών.



Διάγραμμα 3. Η κατανομή συχνότητας της μεταβλητής ‘φύλο’ μεταξύ πολυμεταγγιζόμενων ασθενών με ανιχνεύσιμο και μη ανιχνεύσιμο EBV ή CMV DNA.

4.3 Σύγκριση των πληθυσμών N_1 και N_2 ως προς την πιθανότητα ανίχνευσης του EBV ή CMV DNA

Οι κατανομές συχνότητας των EBV ή CMV DNA θετικών και αρνητικών δειγμάτων ανά πληθυσμό μελέτης παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 4**.

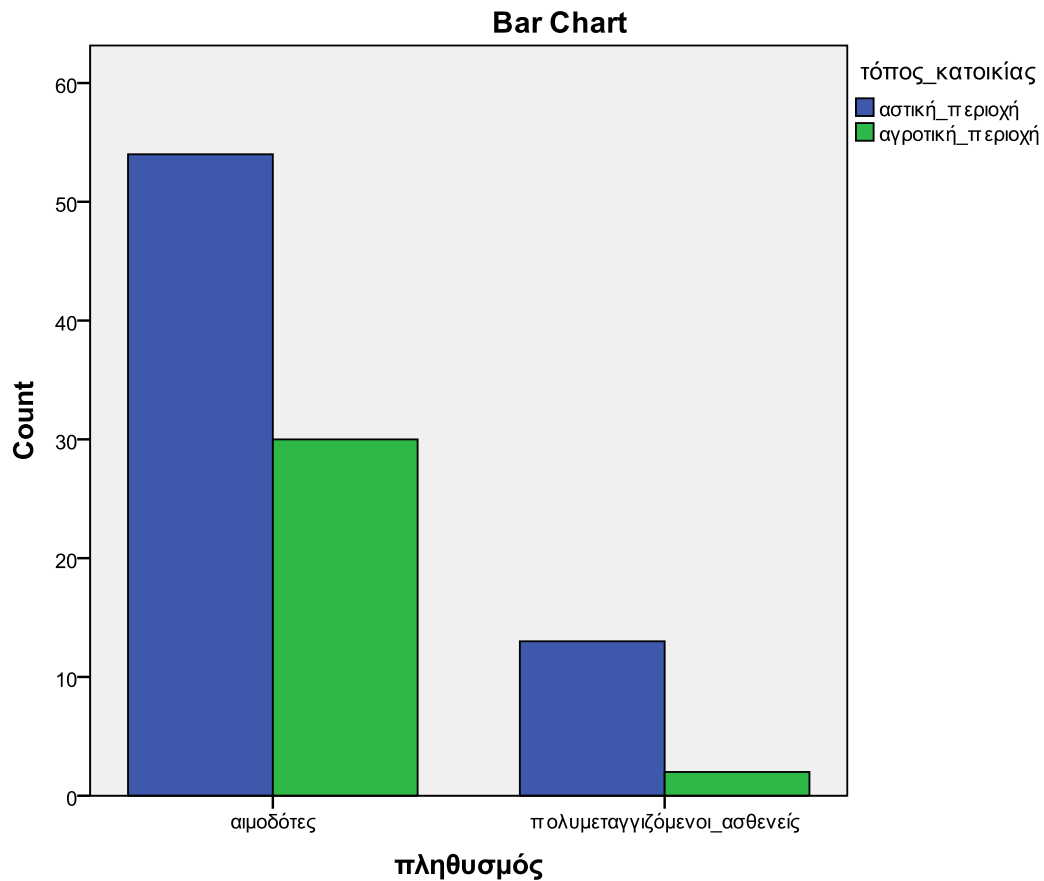


Διάγραμμα 4. Οι κατανομές συχνότητας των EBV ή CMV DNA θετικών και αρνητικών δειγμάτων στον πληθυσμό των υγιών αιμοδοτών (N_1) και στον πληθυσμό των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών με μεσογειακή αναιμία και δρεπανοκυτταρική νόσο (N_2).

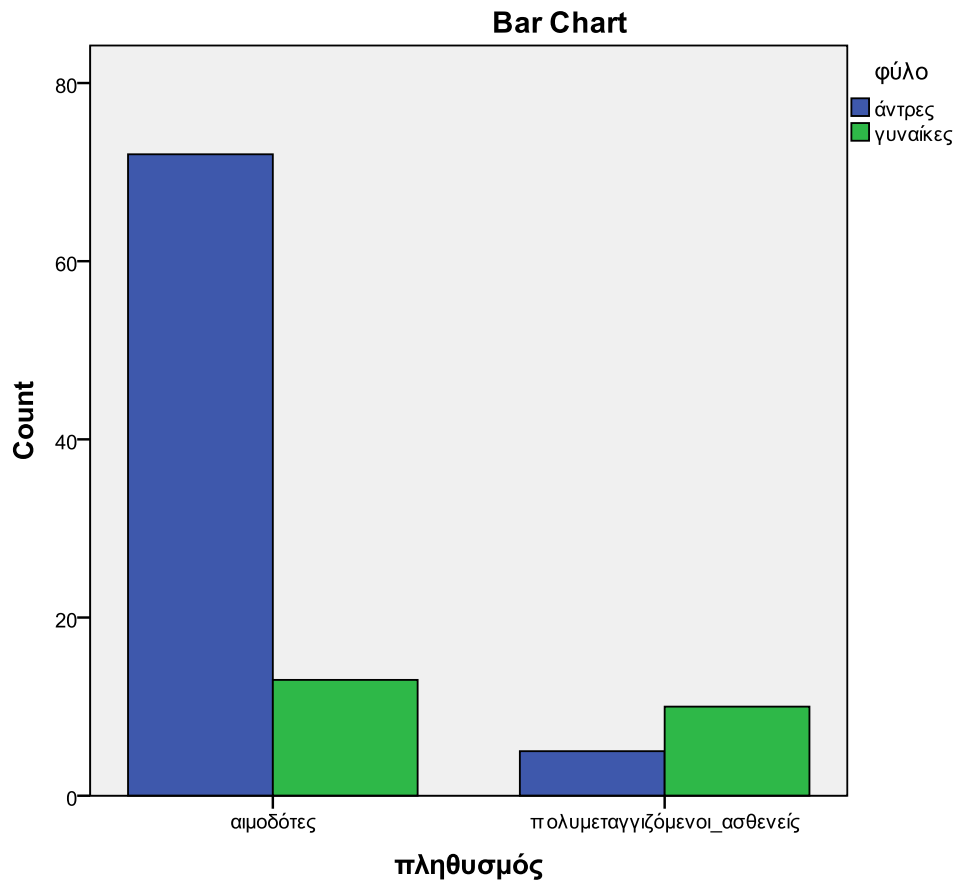
Τα ποσοστά ανίχνευσης του EBV DNA δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο υπο μελέτη πληθυσμών ($p=0.584$, OR: 0.839, 95%CI 0.448-1.572). Θεωρήθηκε μη σκόπιμη η σύγκριση του μοριακού επιπολασμού του CMV καθώς σε κάθε πληθυσμό ανιχνεύτηκε μόνο ένα CMV DNA θετικό δείγμα. Οι κατανομές συχνότητας των μεταβλητών 'τόπος κατοικίας', 'φύλο' και 'οικογενειακή κατάσταση' στα θετικά για EBV ή CMV DNA δείγματα αιμοδοτών καθώς και στα θετικά για EBV ή CMV DNA δείγματα πολυμεταγγιζόμενων ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 14** και στα **Διαγράμματα 5-7**.

Πίνακας 14. Οι κατανομές συχνότητας των μεταβλητών 'τόπος κατοικίας', 'φύλο' και 'οικογενειακή κατάσταση' στα θετικά για EBV ή CMV DNA δείγματα αιμοδοτών και στα θετικά για EBV ή CMV DNA δείγματα πολυμεταγγιζόμενων ασθενών (δεν υπήρξαν διαθέσιμα δεδομένα αναφορικά με τον τόπο κατοικίας ενός θετικού αιμοδότη).

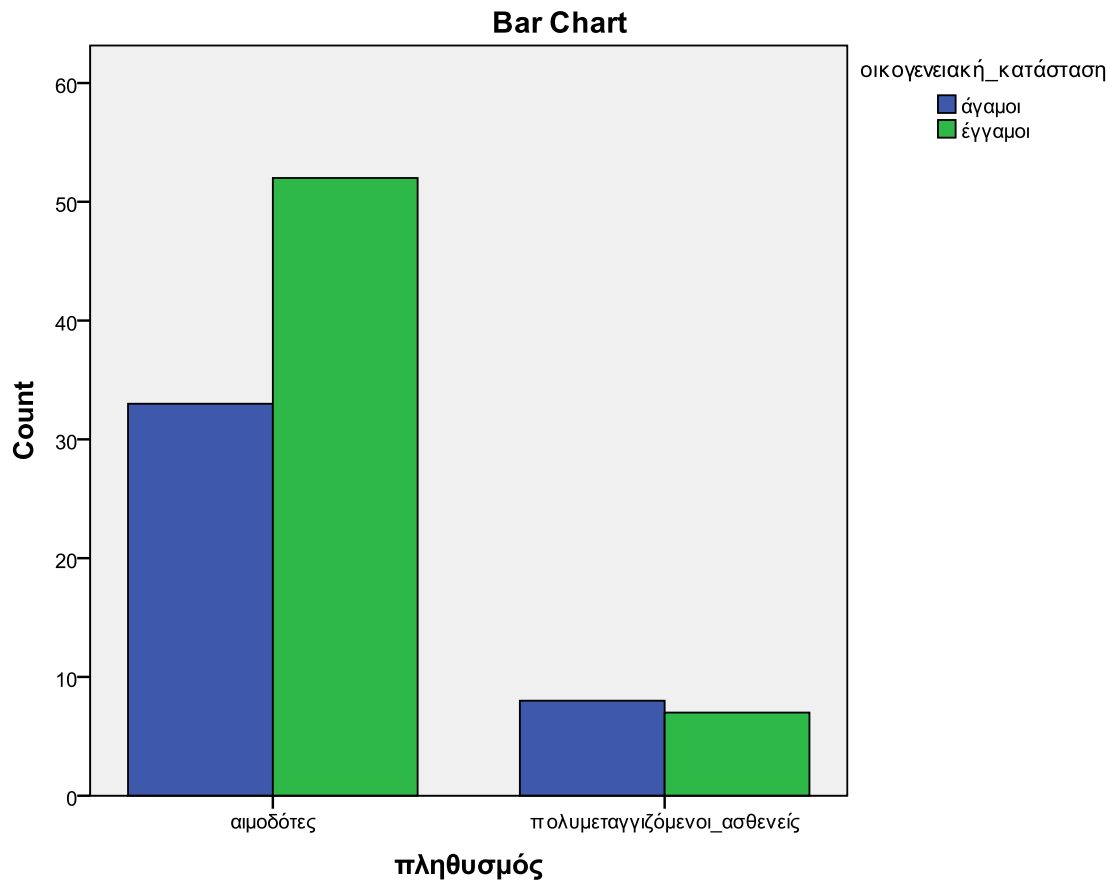
Πληθυσμός	Τόπος Κατοικίας		Φύλο		Οικογενειακή Κατάσταση	
	Αστική Περιοχή	Αγροτική Περιοχή	Άντρες	Γυναίκες	Έγγαμοι	Άγαμοι
Αιμοδότες	55	30	73	13	53	33
Πολυμεταγγιζόμενοι ασθενείς	13	2	5	10	7	8
Τιμή p	0.093		< 0.0001		0.276	



Διάγραμμα 5. Η κατανομή συχνότητας της μεταβλητής ‘τόπος κατοικίας’ στους θετικούς για EBV ή CMV DNA αιμοδότες και στους θετικούς για EBV ή CMV DNA πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς.



Διάγραμμα 6. Η κατανομή συχνότητας της μεταβλητής ‘φύλο’ στα θετικά για EBV ή CMV DNA δείγματα ανά πληθυσμό μελέτης.



Διάγραμμα 7. Η κατανομή συχνότητας της μεταβλητής ‘οικογενειακή κατάσταση’ στα θετικά για EBV ή CMV DNA δείγματα αιμοδοτών και στα θετικά για EBV ή CMV DNA δείγματα πολυμεταγγιζόμενων ασθενών.

4.4 Κατασκευή και λειτουργική ανάλυση του γονιδιακού δικτύου BIM. Αναγνώριση νέων γονιδίων-πιθανών στόχων του EBV.

Πενήντα εννιά (59) συνολικά γονίδια βρέθηκε ότι συνθέτουν το δίκτυο αλληλεπίδρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου BIM (**Πίνακας 15**).

Πίνακας 15. Το γονιδιακό δίκτυο BIM όπως προέκυψε μετά από διερεύνηση των βάσεων Biogrid, String και GeneMania. Το πρόσημο + υποδηλώνει τη παρουσία ενός γονιδίου στην αντίστοιχη βάση δεδομένων.				
Ταυτότητα Γονιδίου	Περιγραφή του γονιδίου στην ηλεκτρονική βάση Gene Cards	Biogrid	String	Gene Mania
MCL1	myeloid cell leukemia 1	+	+	+
UBC	ubiquitin C	+	+	
BCL2L1	BCL2-like 1	+	+	+
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	+	+	+
DYNLL1	dynein, light chain, LC8-type 1	+	+	+
BTRC	beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase	+		
CUL2	cullin 2	+		
BCL2L2	BCL2-like 2	+	+	+
GNB2L1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	+		
BAG3	BCL2-associated athanogene 3	+		
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	+		
CISH	cytokine inducible SH2-containing protein	+		+
YWHAB	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta	+		
AURKA	aurora kinase A	+		
BCL2A1	BCL2-related protein A1	+		+
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	+	+	+
APP	amyloid beta (A4) precursor protein	+		
ATP6V1G1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1	+		
FGL1	fibrinogen-like 1	+		
VDAC1	voltage-dependent anion channel 1	+		
FEM1C	fem-1 homolog c (C. elegans)	+		
AURKB	aurora kinase B	+		
RIOK3	RIO kinase 3	+		

FBXW11	F-box and WD repeat domain containing 11	+		
CD302	CD302 molecule	+		+
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1	+		
UBQLN2	ubiquilin 2	+		
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	+	+	
TRIM2	tripartite motif containing 2	+		+
HSPA4	heat shock 70kDa protein 4	+		
BTK	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	+		
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase	+		
TCEB2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (18kDa, elongin B)	+		
GTF2I	general transcription factor Iii	+		
DYNLL2	dynein, light chain, LC8-type 2	+		
HDAC2	histone deacetylase 2	+		
EDNRA	endothelin receptor type A	+		
RHPN2	rhophilin, Rho GTPase binding protein 2	+		
BAX	BCL2-associated X protein	+	+	+
MAGEA11	melanoma antigen family A, 11	+		
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)	+		
ANKLE2	ankyrin repeat and LEM domain containing 2	+		
ATP2A3	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	+		
FOXO3	forkhead box O3		+	+
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9		+	+
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase		+	+
JUN	jun proto-oncogene		+	
FOXO1	forkhead box O1		+	
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral		+	

	oncogene homolog			
SIRT1	sirtuin 1		+	
BAG1	BCL2-associated athanogene		+	+
MTOR	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)		+	
FOXP2	forkhead box P2		+	
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1		+	
GIMAP5	GTPase, IMAP family member 5			+
DYNLRB2	dynein, light chain, roadblock-type 2			+
BAD	BCL2-associated agonist of cell death			+
MAPK10	mitogen-activated protein kinase 10			+
BNC1	basonuclin 1			+

Επτά (7) συσχετιστές του BIM (οι MCL1, BCL2L1, BCL2, DYNLL1, BCL2L2, MAPK8, BAX) εμφανίστηκαν και στις τρεις βάσεις δεδομένων και υποβλήθηκαν περαιτέρω σε οντολογική ανάλυση στο επίπεδο των κυτταρικών μονοπατιών. Επιλέχθηκαν μόνο τα κοινά γονίδια ώστε να αυξηθεί το επίπεδο εμπιστοσύνης της λειτουργικής ανάλυσης. Τρεις κύριες κατηγορίες μονοπατιών αποκαλύφθηκαν: 1. Κυτταρικές οδοί που σχετίζονται με τον καρκίνο (συμπεριλαμβανομένων της απόπτωσης και της αγγειογένεσης). 2. Κυτταρικές οδοί που σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως η νόσος του Alzheimer (AD), η νόσος του Parkinson (PD), η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση (ALS), η ασθένεια Huntington (HD) και 3. οδοί που σχετίζονται με άλλες μολυσματικές ασθένειες όπως η φυματίωση και τοξοπλάσμωση (**Πίνακας 16**).

Πίνακας 16. Λειτουργική-Οντολογική ανάλυση, σε επίπεδο κυτταρικών οδών του γονιδιακού δικτύου BIM		
Βάση Δεδομένων	Αριθμός γονιδίων ανά όρο γονιδιακής οντολογίας	Όροι γονιδιακής οντολογίας αναφορικά με τα κυτταρικά μονοπάτια
GeneCodis	4	Pathways in cancer
	3	Tuberculosis
	3	Protein processing in Endoplasmic Reticulum
	3	Toxoplasmosis
	3	Neurotrophin signaling pathway
	3	Apoptosis

	3	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
	3	Colorectal cancer
	2	Small cell lung cancer
	2	Pancreatic cancer
	2	Focal adhesion
	1	Hepatitis C
	1	Insulin signaling pathway
	1	Adipocytokine signaling pathway
	1	JAK-STAT signaling pathway
	1	NOD-like receptor signaling pathway
	1	Huntington's disease
	1	Fc epsilon RI signaling pathway
	1	GnRH signaling pathway
	1	Toll-like receptor signaling pathway
	1	RIG-I-like receptor signaling pathway
	1	Wnt signaling pathway
	1	p53 signaling pathway
	1	Type II diabetes mellitus
	1	Prostate cancer
	1	Vasopressin-regulated water reabsorption
	1	Progesterone-mediated oocyte maturation
	1	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection
	1	Chagas disease (American trypanosomiasis)
	1	Osteoclast differentiation
	1	ErbB signaling pathway
	1	Chronic myeloid leukemia
	1	Prion diseases
	1	Shigellosis
Panther		
	6	Apoptosis signaling pathway
	2	Huntington disease
	2	Oxidative stress response

	1	Alzheimer disease-Amyloid secretase pathway
	1	B cell activation
	1	FAS signaling pathway
	1	Gonadotropin releasing hormone receptor pathway
	1	Angiogenesis
	1	Integrin signaling pathway
	1	Interferon gamma signaling pathway
	1	PDGF signaling pathway
	1	Parkinson disease
	1	Ras pathway
	1	T cell activation
	1	TGF-beta signaling pathway
	1	Toll receptor signaling pathway
	1	p53 pathway

Συζήτηση

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της ποσοτικής, σε πραγματικό χρόνο αντίδρασης της πολυμεράσης για την ανίχνευση του γονιδιώματος των HHVs σε υγιείς εθελοντές δότες αίματος και σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με μεσογειακή αναιμία και δρεπανοκυτταρική νόσο. Η τεχνολογία αυτή θεωρήθηκε η πλέον ευαίσθητη για την ανίχνευση μικρού αριθμού ιϊκών αντιγράφων ανά κύτταρο. Για την παρούσα μελέτη η ευαισθησία των μεθόδων ανίχνευσης θεωρείται σημαντική δεδομένου ότι μελετήθηκε η πιθανή μετάδοση των ιών αυτών μέσω των μεταγγίσεων. Επίσης επιλέχθηκε να γίνει ανίχνευση του ιϊκού νουκλεϊνικού οξέως σε ολικό αίμα δεδομένου, ότι οι ιοί αυτοί είναι ενδοκυττάριοι και δύσκολα ανιχνεύονται στον ορό ή στο πλάσμα κατά τη λανθάνουσα φάση. Βέβαια η ανίχνευση του ιού σε κύτταρα (κατ' εξοχήν του HHV-6 αλλά και του HHV-4) μπορεί να σημαίνει παρουσία ενσωματωμένου ιού στο γονιδίωμα των κυττάρων, πράγμα το οποίο δεν είναι γνωστό αν σχετίζεται με μετάδοση νόσου [25]. Ωστόσο, η παρουσία

ενσωματωμένου ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου μπορεί κάτω από ορισμένες συνθήκες να οδηγήσει σε επανενεργοποίηση της λοίμωξης [25-26] και δεδομένου, ότι σε ανοσοκατεσταλμένους τα μεταγγιζόμενα ξένα κύτταρα διαφεύγουν της ανοσολογικής απάντησης του δέκτη, η μετάγγιση μολυσμένων κυττάρων από τον δότη μπορεί να οδηγήσει σε μελλοντική λοίμωξη στον δέκτη [26].

Μέχρι στιγμής ελάχιστη προσοχή έχει δοθεί στα μέλη της α-υπο οικογένειας των *Herpesviridae* πιθανά λόγω του τροπισμού τους αποκλειστικά για τα νευρικά κύτταρα. Έχει αναφερθεί όμως στο παρελθόν ανίχνευση ακολουθιών του έρπητα απλού τύπου (HSV) σε κύτταρα αίματος και μυελού των οστών [61]. Πιο πρόσφατα προτάθηκε ότι η HSV DNA ιαίμια είναι πιθανή αλλά φαίνεται να περιορίζεται στη πρωτολοίμωξη και όχι στην επανενεργοποίηση [62]. Σε αυτή τη μελέτη, το γονιδίωμα των α-ερπητοϊών δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα περιφερικού αίματος των υγιών αιμοδοτών γεγονός που υποδεικνύει ότι η πιθανότητα μετάδοσης των HSVs1-2 καθώς και του VZV μέσω του αίματος είναι μάλλον μικρή. Ομοίως, σε διεθνή μελέτη αναφέρονται μηδενικά ποσοστά ανίχνευσης του γονιδιώματος των τριών ερπητοϊών της α υπό-οικογένειας σε υγιείς αιμοδότες [63].

Σε ότι αφορά στον CMV, η ανίχνευση του γονιδιώματος του σε υγιείς αιμοδότες είναι πολύ μικρή [63-65]. Στη παρούσα μελέτη το ποσοστό ανίχνευσης του CMV ήταν 0.25%. Απαιτούνται περισσότερες έρευνες πάνω στο φαινόμενο της επανενεργοποίησης του CMV προκειμένου να καθοριστεί η συχνότητα και εποχικότητα του αλλά και η σύνδεση του με τη μεταδιδόμενη μέσω της μετάγγισης CMV λοίμωξης [66].

Σε αυτή τη μελέτη το γονιδίωμα του HHV-8 ανιχνεύτηκε σε 2 από τα 401 δείγματα αίματος. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι ο επιπολασμός του HHV-8 DNA στους Έλληνες αιμοδότες είναι εξαιρετικά μικρός αν και σε παλαιότερη Ελληνική μελέτη από τους Zavos και συνεργάτες αναφέρονται ποσοστά ανίχνευσης 9,6% σε HIV αρνητικούς συμμετέχοντες χωρίς σάρκωμα Kaposi [67]. Ωστόσο τρεις διεθνείς μελέτες αναφέρουν μηδενικά ποσοστά ανίχνευσης του HHV-8 DNA σε υγιείς αιμοδότες [63], [68-69].

Σε ότι αφορά στον HHV-6, το γονιδίωμα του ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 3,5% των εθελοντών δοτών. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα στη διεθνή βιβλιογραφία είναι εξαιρετικά αντικρουόμενα, κυμαινόμενα μεταξύ 5.4%-90%. [63], [70-77]. Η ασυμφωνία αυτή έχει αποδοθεί σε διαφορές που σχετίζονται με το μέγεθος του πληθυσμού, τη γεωγραφική του εντόπιση, τη ποσότητα του DNA της αντίδρασης και την ευαισθησία της PCR. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες, με μεγαλύτερα δειγματοληπτικά μεγέθη προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα υψηλότερα ποσοστά ανίχνευσης του HHV-6 γονιδιώματος οφείλονται σε μεγαλύτερο επιπολασμό της HHV-6 λοίμωξης σε κάποιες περιοχές, σε σχέση με άλλες ή σε τεχνικούς-εργαστηριακούς παράγοντες. Σε ορισμένες μελέτες αναφέρονται δείγματα με πολύ υψηλό ιικό φορτίο του ίδιου ιού ($>6 \log_{10}$ copies/ml) παρόμοια με ένα δείγμα της παρούσας μελέτης [63,78]. Πιθανά, οι μεγάλοι αριθμοί αντιγράφων του HHV-6 να οφείλονται στο φαινόμενο της χρωμοσωμικής ενσωμάτωσης του ιού χωρίς ωστόσο να μπορεί να αποκλειστεί και η πιθανότητα πρωτολοίμωξης ή επανενεργοποίησης. Μέχρι τώρα δεν έχει καθιερωθεί διεθνώς ο αριθμός των ιικών αντιγράφων που θα αντιπροσωπεύει το διαγνωστικό όριο ανάμεσα στην εμμένουσα και την οξεία λοίμωξη. Τα 1000 copies/ml ολικού αίματος έχουν αναφερθεί ως η γκρίζα ζώνη διαχωρισμού των δύο σταδίων της HHV-6 μόλυνσης [79]. Αναμφίβολα, η ύπαρξη υγιών-ασυμπτωματικών φορέων, με μεγάλο αριθμό αντιγράφων του ιού στο περιφερικό τους αίμα που δεν μπορούν να αναγνωριστούν και άρα να αποκλειστούν ως αιμοδότες κατά την επιλογή των εθελοντών δοτών αίματος, εγείρει ερωτήματα αναφορικά με την ασφάλεια των μεταγγίσεων.

Το EBV DNA ανιχνεύτηκε σε 85 από τα 401 εξεταζόμενα δείγματα του αιμοδοτικού πληθυσμού (21,2%). Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ποσοστά ανίχνευσης ακολουθιών του EBV γενώματος κυμαινόμενα από 8%-76% [63], [80-82]. Όπως και στη περίπτωση του HHV-6, αυτή η διακύμανση πιθανά αντανάκλα διαφορές που σχετίζονται με γεωγραφικά ή τοπογραφικά χαρακτηριστικά. Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του τόπου όπως και τα διάφορα προσωπικά ή χρονικά χαρακτηριστικά έχουν αξιοποιηθεί για την διαμόρφωση υποθέσεων που αφορούν την αιτιολογία κάποιων νοσημάτων [83]. Στη παρούσα μελέτη, η

ανίχνευση του EBV DNA συσχετίστηκε με τον τόπο κατοικίας καθώς διαπιστώθηκε τόσο σε μονοπαραγοντική όσο και σε πολυπαραγοντική ανάλυση, στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη συχνότητα ανίχνευσης του γονιδιώματος στους κατοίκους των αγροτικών περιοχών. Οι αστικό-αγροτικές διαφορές στα Ελληνικά δεδομένα δεν διαφέρουν ουσιαστικά από τις αντίστοιχες διαφορές σε άλλες χώρες του κόσμου. Χαρακτηριστική είναι η υπεροχή θνησιμότητας από τις περισσότερες αιτίες στον αστικό πληθυσμό, με εξαίρεση το σύνολο των λοιμωδών νοσημάτων αλλά και τους καρκίνους στομάχου και δέρματος για την Ελλάδα [83]. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες, προκειμένου να διερευνηθεί η σταθερότητα και ειδικότητα της συσχέτισης του τόπου με την ανίχνευση του γονιδιώματος των HHVs. Αναφορικά με τα ποσοστά ανίχνευσης του γονιδιώματος των HHVs 4-5 στους ασθενείς με μεσογειακή αναιμία και δρεπανοκυτταρική νόσο, δεν αναφέρονται στη σύγχρονη βιβλιογραφία μελέτες που να διερευνούν τον μοριακό επιπολασμό των δύο ιών στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Μέχρι και τις αρχές της δεκαετίας του 1990, η CMV λοίμωξη συνεισέφερε σημαντικά στην νοσηρότητα μεταξύ των θαλασσαιμικών ασθενών [84-87]. Πιο πρόσφατα, σε προοπτική μελέτη δεκαπενταετίας που διεξήχθη στο κέντρο θαλασσαιμίας της Αντάλια στη Τουρκία, εκτιμήθηκε ότι η επίπτωση των CMV IgM αντισωμάτων είναι ίση με 2% [88]. Η μείωση του ποσοστού της μεταδιδόμενης μέσω των μεταγγίσεων CMV λοίμωξης στις Δυτικές χώρες αποδίδεται αφενός στην αυξανόμενη χρήση λευκαφαιρεμένων προϊόντων αίματος [87, 89-90] αφετέρου στα αυστηρότερα κριτήρια επιλογής δοτών και στην ανάπτυξη και εφαρμογή νέων τεχνολογιών που ενισχύουν την ποιότητα του προσφερόμενου αίματος [91-92]. Παρόλο που υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα αναφορικά με τον υπολειπόμενο κίνδυνο της μεταδιδόμενης από μετάγγιση CMV λοίμωξης μετά από λευκαφαίρεση [93-95], τόσο ο επιπολασμός όσο και η συγκέντρωση του CMV DNA στο περιφερικό αίμα είναι υψηλότερα σε πρόσφατα οροθετικούς αιμοδότες, ως εκ τούτου ο πιο σημαντικός στόχος οποιασδήποτε στρατηγικής μετάγγισης θεωρείται η αποφυγή της χρήσης προϊόντων αίματος από αυτούς τους δότες [96-98]. Η χρήση αίματος και παραγώγων αίματος από CMV ορό-αρνητικούς δότες έχει διαπιστωθεί ότι είναι

πιο αποτελεσματική από τη λευκαφαίρεση στην πρόληψη της από μετάγγιση μεταδιδόμενης CMV λοίμωξης [94]. Ωστόσο, δεν εξαλείφει πλήρως τον κίνδυνο μετάδοσης [99]. Επιπλέον, καθώς η CMV οροθετικότητα αγγίζει το 50-100% ανάλογα με τις γεωγραφικές και κοινωνικό-οικονομικές συνθήκες, η διαθεσιμότητα CMV ορό-αρνητικών προϊόντων αίματος είναι προφανώς περιορισμένη [99]. Τα ανοσοαιματολογικά χαρακτηριστικά των προϊόντων αίματος καθώς και ποικίλα πρωτόκολλα μετάγγισης (συστηματική ακτινοβόληση, λευκαφαίρεση, CMV ορο-αρνητικότητα, κ.α) έχουν καθοριστεί και αναλυθεί εκτενώς στην βιβλιογραφία για συγκεκριμένες κατηγορίες ασθενών, κυρίως μεταμοσχευθέντων [100-101]. Αντιθέτως, αναφορικά με τους πάσχοντες από μεσογειακή αναιμία επισημαίνεται η αναγκαιότητα θέσπισης ενός ενιαίου, βασισμένου σε αποδείξεις πρωτοκόλλου μετάγγισης [102-103].

Ολοκληρώνοντας τη συζήτηση αναφορικά με τον μοριακό επιπολασμό των HHVs 4-5 σε υγιείς αιμοδότες και πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς, θα πρέπει να αναφερθούν δύο περιορισμοί: καθώς η πιθανολογούμενη (και παρατηρούμενη) συχνότητα του CMV DNA είναι μικρή, κρίνεται απαραίτητη η αύξηση του αριθμού των παρατηρήσεων (δειγματοληπτικού μεγέθους) προκειμένου να διασφαλιστεί η στατιστική εγκυρότητα [83]. Επιπλέον, καθώς η κατανομή συχνότητας της μεταβλητής 'φύλο' δεν είναι ισότιμη στους δύο πληθυσμούς, τα αποτελέσματα αναφορικά με το φύλο χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης και ερμηνείας.

Σε ότι αφορά στα ευρήματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης, καθώς ο EBV είναι γνωστός ογκογόνος ιός, που σχετίζεται με το 1% των καρκίνων παγκοσμίως [104] δεν προκαλεί έκπληξη η πρόβλεψη, ότι το ρυθμιστικό δίκτυου του γονιδίου BIM, που αποτελεί γνωστό κυτταρικό στόχο του ιού, σχετίζεται με οδούς μεταβίβασης σήματος που συμμετέχουν στην καρκινογένεση, όπως η αγγειογένεση. Το κύριο εύρημα της οντολογικής ανάλυσης είναι η ένδειξη, ότι ορισμένοι από τους συσχετιστές του BIM συμμετέχουν σε κυτταρικά μονοπάτια, που σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η AD, η PD, η ALS και η HD. Σε τέτοιου τύπου ασθένειες, αρκετές μελέτες έχουν υπογραμμίσει τη σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος και της φλεγμονής του νευρικού ιστού [105]. Έχει προταθεί, ότι η προσαρμοστική ανοσοαπόκριση έναντι του EBV,

πυροδοτεί την διαδικασία της PD [106]. Σε πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ένα υψηλό επίπεδο αντιστοιχίας οκταπεπτιδίων μεταξύ επτά ιών (συμπεριλαμβανομένου και του EBV) και ανθρώπινων εγκεφαλικών αντιγόνων, που όταν μεταβληθούν σχετίζονται ειδικά με τις ασθένειες ALS, PD και HD [107]. Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα, που προκύπτει από την ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού της γονιδιακής οντολογίας είναι η πρόβλεψη, ότι το γονιδιακό δίκτυο του BIM σχετίζεται και με άλλους μολυσματικούς παράγοντες. Η συνεργατική συνεισφορά του HIV, της ελονοσίας και του EBV στις κακοήθειες του λεμφικού ιστού έχει εδραιωθεί ως επιστημονική γνώση ενώ η δυνατότητα συνέργειας μεταξύ EBV και ελικοβακτηριδίου του πυλωρού στην παθογένεια των γαστρικών καρκινωμάτων βρίσκεται επί του παρόντος υπό διερεύνηση [108]. Οποιαδήποτε πιθανή σύνδεση του EBV με τις άλλες μολυσματικές ασθένειες, που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 16** πρέπει να διερευνηθεί σε επίπεδο κλινικής έρευνας.

Συμπεράσματα

1. Ο επιπολασμός του DNA των HHVs 1-3 σε κύτταρα ολικού αίματος υγιών Ελλήνων αιμοδοτών είναι μηδενικός παρόμοια με τις αναφορές, που υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία για αντίστοιχους πληθυσμούς.
2. Ομοίως, σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία ο επιπολασμός του DNA των HHVs 5 και 8 σε υγιείς αιμοδότες είναι εξαιρετικά μικρός.

3. Ο μοριακός επιπολασμός των HHVs-4 και 6 στον υγιή αιμοδοτικό πληθυσμό κυμαίνεται σε επίπεδα παρόμοια και μικρότερα αντίστοιχα από αυτά, που αναφέρονται διεθνώς.
4. Η συχνότητα ανίχνευσης του HHV-4 στον πληθυσμό των ασθενών με μεσογειακή αναιμία δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτή των υγιών γηγενών, που υποδηλώνει, ότι η λευκαφαίρεση των προς μετάγγιση μονάδων αίματος παρέχει σημαντική προστασία από τη μετάδοση του ιού.
5. Η βιοπληροφορική ανάλυση ανέδειξε νέα γονίδια-πιθανούς στόχους του HHV-4, που θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω για τον ρόλο τους στην παθογένεση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων.

Βιβλιογραφία

- [1] **Steiner I., Kennedy P.G., Pachner A.R.** “The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella zoster”, *Lancet.Neurol.*, 2007:6(11):1015-1025
- [2] **Dzabic M., Hendricks R., Munz C., et al.** “Welcome to Herpesviridae-a new premier virology journal”, *Herpesviridae.*, 2010:1(1):1
- [3] **Penkert R.R., Kalejta R.F.** “Tegument protein control of latent herpesvirus establishment and animation”, *Herpesviridae.*, 2011:2(1):3
- [4] **Straus S.E.** Introduction to Herpesviridae. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. “*Principles and practice of infectious diseases*”. Sixth edition. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone 2005.
- [5] **Hunt R.** Virology Chapter 11 Herpes viruses.
Πηγή: <http://www.microbiologybook.org/virol/herpes.htm>
- [6] **Davison A.J.** “Comparative analysis of the genomes”. Chapter 2. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Edited by Ann Arvin, Gabriella Campadelli-Fiume, Edward Mocarski, Patrick S. Moore, Bernard

Roizman, Richard Whitley, and Koichi Yamanishi. Cambridge University Press. 2007

[7] **Shukla D., Spear P.G.** “Herpes viruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry”, *J.Clin.Invest.*, 2001:108:503-510

[8] **Spear P.G, Longnecker R.** “Herpesvirus entry: an update”, *J.Virol.*, 2003:77:10179-10185

[9] **Tang H., Mori Y.** “Human Herpesvirus-6 entry into host cells”, *Future.Microbiol.*, 2010:5(7):1015-1023

[10] **Krummenacher C., Carfi A., Eisenberg R.J., Cohen GH.** “Entry of Herpesviruses into cells: The Enigma Variations”. In: *Viral entry into host cells*. Edited by Stefan Pohlmann and Graham Simmons. Landes Bioscience 2007.

[11] **Virgin H.W., Wherry E.J., Ahmed R.** “Redefining Chronic Viral infection”, *Cell.*, 2009:138

[12] **Sinclair J.** “Human Cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage”, *J.Clin.Virol.*, 2008:41:180-185

[13] **Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A.** Chapter 33. “Herpesviruses” In : *Jawetz, Melnick and Adelberg’s Medical Microbiology*. 23rd ed. New York: Lange Medical Brooks/McGraw-Hill, Medical Pub.Division, c2004

[14] **Kinchington P.R., Leger A.J., Guedon J.M. et al.** “Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave”, *Herpesviridae.*, 2012:3(1):5

[15] **Παπαθανασίου Α.** “Λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό”.

Πηγή:www.ioanninamed.gr/el/topics/42-infectious-diseases/232-cytomegalovirus.html

[16] **Cannon M.J.** “Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness”, *J.Clin.Virol.*, 2009:46(4):6-10

[17] **Rafailidis P.I., Mourtzoukou E.G., Varbobitis I.C. et al.** “Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review”, *Virol.J.*, 2008:5:47

[18] **Soderberg-Naucle C.** “HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer”, *J.Clin.Virol.*, 2008:41(3):218-223

- [19] **Varani S., Landini M.P.** "Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences", *Herpesviridae.*, 2011:2(1):6
- [20] **Clark D.A, Griffiths P.D.** "Human Herpesvirus 6: Relevance of infection in the immunocompromised host", *Br.J.Haematol.*, 2003:120(3):384-395
- [21] **Mori Y.** "Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism", *Cell. Microbiol.*, 2009:11(7):1001-1006
- [22] **Lusso P.** "HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape", *J.Clin.Virol.*, 2006:37(1):4-10
- [23] **Luppi M., Barozzi P., Morris C.M. et al.** "Integration of human herpesvirus 6 genome in human chromosomes", *Lancet.*, 1998:352(9141):1707-1708
- [24] **Luppi M., Barozzi P., Bosco R. et al.** "Human Herpesvirus 6 Latency Characterized by High Viral Load: Chromosomal Integration in Many, but Not All, Cells", *J. Infect. Dis.*, 2006:194(7):1020-1021
- [25] **Morissette G., Flamand L.** "Herpesviruses and Chromosomal Integration", *J. Virol.*, 2010:82(23):12100-12109
- [26] **Arbuckle J.H., Medveczky P.G.** "The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration", *Microbes.Infect.*, 2011:13 (8-9):731-741
- [27] **Γιαννάκη-Ψινάκη M., Κίτρα-Ρούσσου B.** "Ο ιός Epstein-Barr και ο ρόλος του στις μεταμοσχεύσεις,
Εφαρμοσμένη.Κλινική.Μικροβιολογία.και.Εργαστηριακή Διαγνωστική.,
2011:16(4):209-214
- [28] **Ζάγκλης A.** "Ψευδή αποτελέσματα ραδιοανοσοπροσδιορισμών οφειλόμενα στην ύπαρξη αντισωμάτων", *Αρχεία.Ελληνικής.Ιατρικής.*, 2003: 20(2):214-226
- [29] **Taylor G.S., Blackbourn D.J.** "Infectious agents in human cancers: Lessons in immunity and immunomodulation from gammaherpesviruses EBV and KSHV", *Cancer.Lett.*, 2011:305(2):263-278
- [30] **Καρανικιώτης X.** "Μοριακό και ανοσοβιολογικό υπόστρωμα της λοίμωξης από τον ιό Epstein-Barr και η σημασία του στην καρκινογένεση του ρινοφάρυγγα", *Βήμα.Κλινικής.Ογκολογίας.*, 2003:2(3/4):227-234

- [31] **Μπατιστάνου Α., Γιαννάτος Δ., Στεφάνου Δ., Δήμου Σ., Αγκάντη Ν.Ι.** “Κλινική και ανοσοϊστοχημική μελέτη του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα σε Έλληνες ασθενείς”, *Αρχεία.Παθολογικής. Ανατομικής.*, 2003:17(3):100-108
- [32] **Fox C.P, Shannon-Lowe C., Rowe M.** “Deciphering the role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of T and NK cell lymphoproliferations”, *Herpesviridae* 2011:2:8
- [33] **Cesarman E.** “Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients”, *Cancer.Lett.*, 2011:305(2):163-174
- [34] **Michelow P., Wright C., Pantanowitz L.** “A Review of the Cytomorphology of Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies”, *Acta.Cytol.*, 2012:56(1):1-14
- [35] **Κοτταρίδης Σ.Δ.** Κεφάλαιο 2.” Ίική Καρκινογένεση”.
- Πηγή: <http://www.onco.gr/documents/Kotaridis.pdf>
- [36] **Chen M.R.** “Epstein-Barr virus, the immune system, and associated diseases”, *Front.Microbiol.*, 2011:2:5
- [37] **Gromminger S., Mautner J., Bornkamm G.W.** “Burkitt lymphoma: the role of Epstein-Barr virus revisited”, *Br.J.Haematol.*, 2012:156(6):719-729
- [38] **Παπαρίζος Β., Μουρτζούκου Ε., Κατσάμπας Α.** “Ανθρώπινος ερπητοϊός 8 (HHV-8) και ογκογένεση”, *Ελληνική. Επιθεώρηση. Δερματολογίας. Αφροδισιολογίας.*, 2006:17(1):13-22
- [39] **American Association of Blood Banks.** Appendix 2. Human Herpesvirus-8
Πηγή:<http://www.aabb.org/resources/bct/eid/Documents/99s.pdf>
- [40] **Carbone A., Gloghini A.** “KSHV/HHV8-associated lymphomas”, *Br.J.Haematol.*, 2007:140(1):13-24
- [41] **Gomez-Cabrero, D., Abugessaisa, I., Maier, D. et al.** “Data Integration in the era of omics:current and future challenges”, *BMC.Systems.Biology.*, 2014:8(2):11
- [42] **Chen, R., Snyder, M.** “Systems biology: personalized medicine for the future?”, *Curr.Opin.Pharmacol.*, 2012:12(5):623-628
- [43] **Tan, S.L., Ganji, G., Paeper, B. et al.** “Systems biology and the host response to viral infection”, *Nat.Biotechnol.*, 2007:25(12):1383-1389

- [44] **Aderem, A., Adkins, J.N., Ansong, C. et al.** “A Systems biology Approach to infectious disease Research: Innovating the Pathogen-Host Research Paradigm”, *MBio.*, 2011:2(1):e00325-10
- [45] **Law, G.L., Korth, M.J., Benecke, A.G. et al.** “Systems Virology: Host-directed approaches to viral pathogenesis and drug targeting”, *Nat.Rev.Microbiol.*, 2013:11(7):455-466
- [46] **Meyniel-Schicklin, L., de Chassey, B., Andre, P. et al.** “Viruses and Interactomes in Translation”, *Mol.Cell.Proteomics.*, 2012:11(7):M111.014738
- [47] **de Chassey, B., Meyniel-Schicklin, L., Vonderscher, J. et al.** “Virus-host interactomics: new insights and opportunities for antiviral drug discovery”, *Genome.Med.*, 2014:6(11):115
- [48] **Baldanti, F., Lurain, N., Gerna, G.** “Clinical and biologic aspects of human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs”, *Hum.Immunol.*, 2004:65(5):403-409
- [49] **Piret, J., Boivin, G.** “Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus”, *Rev.Med.Virol.*, 2014:24(3):186-218
- [50] **Ιωάννου-Αμαραντίδου, Π.** “Βιοαναλυτικές τεχνικές”. Πηγή: <http://www.chem.uoa.gr/courses/Bioanalytical/IOANNOU-BIOANALYTIKES2012.pdf>
- [51] **Μπέλεση, Χ.** “Ποσοτική σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real Time Quantitative PCR, RQ-PCR)”. Στο: Λαουτάρης Ν, Μπελέση Χ. *Στοιχεία Μοριακής Βιολογίας Μοριακής Αιματολογίας*. Εκδόσεις Τεχνόγραμμα. Αθήνα 2005
- [52] **Anderton, E., Yee, J., Smith, P. et al.** “Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumor-suppressor BIM: clues to the pathogenesis of Burkitt’s lymphoma”, *Oncogene.*, 2008:27(4):421-433
- [53] **Paschos, K., Smith, P., Anderton, E. et al.** “Epstein-Barr Virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumor suppressor gene BIM”, *Plos.Pathog.*, 2009:5:e1000492

- [54] **Paschos, K., Parker, G.A., Watanatanasup E. et al.** "BIM promoter directly targeted by EBNA3C in polycomb-mediated repression by EBV", *Nucleic.Acids.Res.*, 2012:40(15):7233-7246
- [55] **Chatr-Aryamontri, A., Breitkreutz, S. Heinicke, S. et al.** "The Biogrid interaction database: 2013 update", *Nucleic.Acids.Res.*, 2013:41:816-823
- [56] **Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M. et al.** "The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored", *Nucleic.Acids.Res.*, 2011:39:561-568
- [57] **Zuberi, K., Franz, M., Rodriquez, H. et al.** "GeneMania prediction server 2013 update", *Nucleic.Acids.Res.*, 2013:41:115-122
- [58] **Safran, M., Chalifa-Caspi, V., Shmueli, O. et al.** "Human Gene-Centric Databases at the Weizmann Institute of Science: GeneCards, UDB, CroW 21 and HORDE", *Nucleic.Acids.Res.*, 2003:31(1):142-146
- [59] **Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vasquez, M. et al.** "Gene Codis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information", *Nucleic.Acids.Res.*, 2009:37:317-322
- [60] **Mi, H., Muruganujan, A., Thomas, P.D.** "Panther in 2013: modeling the evolution of gene function and other gene attributes in the context of phylogenetic trees", *Nucleic.Acids.Res.*, 2013:41:377-386
- [61] **Cantin, E., Chen, J., Gaidulis, L. et al.** "Detection of herpes simplex virus DNA sequences in human blood and bone marrow cells", *J.Med.Virol.*, 1994:42(3):279-286
- [62] **Juhl, D., Mosel, C., Nawroth, F. et al.** "Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: implications for transfusion medicine?", *Transf.Med.*, 2010:20(1):38-47
- [63] **Hudnall, S.D, Chen, T., Allison, P. et al.** "Herpes virus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction", *Transfusion.*, 2008:48(6):1180-1187
- [64] **Furui, Y., Satake, M., Hoshi, Y. et al.** "Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors", *Transfusion.*, 2013:53(10):2190-2197

- [65] **Roback, J.D., Drew, W.L., Laycock, M.E. et al.** "CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays", *Transfusion.*, 2003:43(3):314-321
- [66] **Preiksaitis, J.K.** "Prevention of transfusion acquired CMV infection: is there a role for NAT?", *Transfusion.*, 2003:43(3):302-305
- [67] **Zavos, G., Gazouli, M., Papaconstantinou, I. et al.** "Prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequences in human immunodeficiency virus-negative individuals without Kaposi's sarcoma in Greece", *In Vivo.*, 2005:19(4):729-732
- [68] **Hudnall, S.D., Chen, T., Rady, P. et al.** "Human herpesvirus 8 seroprevalence and viral load in healthy adult blood donors", *Transfusion.*, 2003:43(1):85-90
- [69] **Qu, L., Jenkins, F., Triulzi, D.J.** "Human herpesvirus 8 genomes and seroprevalence in United States blood donors", *Transfusion.*, 2010:50(5):1050-1056
- [70] **Gopal, M.R., Thomson, B.J., Fox, J. et al.** "Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives", *Lancet.*, 1990:335(8705):1598-1599
- [71] **Jarrett, R.F., Clark, D.A., Josephs, S.F. et al.** "Detection of human herpesvirus-6 DNA in peripheral blood and saliva", *J.Med.Virol.*, 1990:32(1):73-76
- [72] **Cone, R.W., Huang, M.L., Ashley, R. et al.** "Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals", *J.Clin.Microbiol.*, 1993:31(5):1262-1267
- [73] **Cuende, J.I., Ruiz, J., Civeira, M.P. et al.** "High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals detected by nested-PCR", *J. Med.Virol.*, 1994:43(2):115-118
- [74] **Di Luca, D., Dolcetti, R., Mirandola, P. et al.** 'A survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders', *J. Infect.Dis.*, 1994:170(1):211-215
- [75] **Wilborn, F., Schmidt, C.A., Zimmerman, R. et al.** "Detection of herpesvirus type 6 by polymerase chain reaction in blood donors: random tests and prospective longitudinal studies", *Br.J.Haematol.*, 1994:88(1):187-192
- [76] **Luppi, M., Barozzi, P., Marasca, R. et al.** "Human herpesvirus-6 (HHV-6) in blood donors", *Br.J.Haematol.*, 1995:89(4):943-945

- [77] **Kozireva, S., Nemceva, G., Danilane, I. et al.** "Prevalence of blood-borne viral infections (cytomegalovirus, human herpesvirus-6, human herpesvirus-7, human herpesvirus-8, human T-cell lymphotropic virus-I/II, human retrovirus-5) among blood donors in Latvia", *Ann.Hematol.*, 2001:80(11):669-673
- [78] **Leong, H.N., Tuke, P.W., Tedder, R.S. et al.** "The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors", *J.Med.Virol.*, 2007:79(1):45-51
- [79] **Agut, H.** "Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections", *J.Clin.Virol.*, 2011:52(3):164-171
- [80] **Compston, L.I., Sarkobie, F., Li, C. et al.** "Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of latent and persistent viral genomes in cellular or plasma blood fractions", *J.Virol.Methods.*, 2008:151(1):47-54
- [81] **Correa, R.M., Fellner, M.D., Alonio, L.V. et al.** "Epstein-barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene", *J.Med.Virol.*, 2004:73(4):583-588
- [82] **Nishiwaki, M., Fujimuro, M., Teishikata, Y. et al.** "Epidemiology of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infections in peripheral blood leukocytes revealed by a multiplex PCR assay", *J.Med.Virol.*, 2006:78(12):1635-1642
- [83] **Τριχόπουλος, Δ.** "Γενική και Κλινική Επιδημιολογία" Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου. Αθήνα. 2002.
- [84] **Germenis, A., Politis, C.** "Thalassemic patients are at high risk for transfusion-transmitted cytomegalovirus infections", *Acta.Haematol.*, 1989:82(2):57-60
- [85] **Nigro, G., Lionetti, P., Digilio, G. et al.** "Viral infections in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia major: the predominant role of cytomegalovirus", *Transfusion.*, 1990:30(9):808-813
- [86] **Ergazaki, M., Xinarianos, G., Giannoudis A. et al.** "Detection of human cytomegalovirus and Epstein-barr-virus by the polymerase chain reaction in patients with beta-thalassemia", *Oncol.Rep.*, 1994:1(4):813-816
- [87] **Prati, D.** "Benefits and Complications of Regular Blood Transfusion in Patients with Beta-Thalassaemia major", *Vox.Sang.*, 2000:79(3):129-137

- [88] **Canatan, D.** "The Thalassemia center of Antalya State Hospital:15 years of experience (1994-2008)", *J.Pediatr.Hematol.Oncol.*, 2013:35(1):24-27
- [89] **Shanthala, Devi A.M., Gaikhonlungpou, K.G.** "Leukodepletion status of blood products and transfusion reactions in thalassemic patients", *J.Appl.Hematol.*, 2014:5:29-31
- [90] **Blajchman, M.A.** "The clinical benefits of the leukoreduction of blood products", *J. Trauma.*, 2006:60(6):83-90
- [91] **Green, L., Allard, S., Cardigan R.** "Modern banking, collection, compatibility testing and storage of blood and blood components", *Anaesthesia.*, 2015:70(1):3-9
- [92] **Snyder, E.L., Stramer, S.L., Benjamin R.J.** "The safety of the Blood supply-Time to raise the bar", *N.Engl.J.Med.*, 2015: Apr 22 [Epub ahead of print]
- [93] **Nichols, W.G., Price, T.H., Cooley, L. et al.** "Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection after receipt of leukoreduced blood products", *Blood.*, 2003:101(10):4195-4200
- [94] **Vamvakas, E.C.** "Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis", *Transfus.Med.Rev.*, 2005:19(3):181-199
- [95] **Seed, C.R., Wong, J., Polizzotto, M.N. et al.** "The residual risk of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection associated with leukodepleted blood components", *Vox.Sang.*, 2015: Apr 8. doi: 10.1111/vox.12250 [Epub ahead of print]
- [96] **Ziemann, M., Krueger, S., Maier, A.B. et al.** "High prevalence of cytomegalovirus DNA in plasma samples of blood donors in connection with seroconversion", *Transfusion.*, 2007:47(11):1972-1983
- [97] **Ziemann, M., Heuft, H.G., Frank, K. et al.** "Window period donations during primary cytomegalovirus infection and risk of transfusion-transmitted infections", *Transfusion.*, 2013:53(5):1088-1094
- [98] **Ziemann, M., Hennig, H.** "Prevention of Transfusion-Transmitted Cytomegalovirus infections: which is the optimal strategy?", *Transfus.Med.Hemother.*, 2014:41(1):40-44
- [99] **Mazeron, M.C.** "Leukocyte depletion and infection by cytomegalovirus", *Transfus. Clin.Biol.*, 2000:7(1):31-35

- [100] **Bardiaux, L., Assari, S., Babinet, J. et al.** "Transfusion protocols in hematopoietic stem cell allogeneic transplantation", *Transfus.Clin.Biol.*, 2007:14(1):94-99
- [101] **Treleaven, J., Gennery, A., Marsh, J. et al.** "Guidelines on the use of irradiated blood components prepared by the British Committee for Standards in Haematology blood transfusion task force", *Br.J.Haematol.*, 2011:152(1):35-51
- [102] **Vichinsky, E., Neumayr, L., Trimble, S. et al.** "Transfusion complications in thalassemia patients: a report from the Centers for Disease Control and Prevention", *Transfusion.*, 2014:54(4):972-981
- [103] **Goss, C., Giardina, P., Degtyaryova, D. et al.** "Red blood cell transfusions for thalassemia: results of a survey assessing current practice and proposal of evidence-based guidelines", *Transfusion.*, 2014:54(7):1773-1781
- [104] **Houldcroft, C.J., Kellam, P.** "Host genetics of Epstein-Barr virus infection, latency and disease", *Rev.Med.Virol.*, 2015:25(2):71-84
- [105] **Ellrichmann, G., Reick, C., Saft, C. et al.** "The role of the immune system in Huntington's Disease", *Clin.Dev.Immunol.*, 2013:541259
- [106] **Woulfe, J.M., Gray, M.T., Gray, D.A. et al.** "Hypothesis: A role for EBV-induced molecular mimicry in Parkinson's disease", *Parkinsonism.Relat.Disord.*, 2014:20(7): 685-694
- [107] **Lucchese, G., Kanduc, D.** "Single amino acid repeats connect viruses to neurodegeneration", *Curr.Drug.Discov.Technol.*, 2014:11(3):214-219
- [108] **Rickinson, A.B.** "Co-infections, inflammation and oncogenesis: Future directions for EBV research", *Semin.Cancer.Biol.*, 2014:26: 99-115