



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ RS2569190
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CD14 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ COVID-19»**

ΑΛΕΞΙΟΥ ΣΤΑΜΑΤΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
AND BIOTECHNOLOGY
MASTER PROGRAM IN «TOXICOLOGY»



MASTER THESIS

**«STUDY OF RS2569190 POLYMORFISM
OF CD14 GENE IN PATIENTS WITH COVID-19 DISEASE»**

ALEXIOU STAMATIA
LARISA 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΤΘΑΙΟΣ ΣΠΕΛΕΤΑΣ: Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών
οργανισμών – Τοξικολογίας Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΑΣ: Επίκουρος Καθηγητής
Παθολογίας- Αιματολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας από το Φεβρουάριο του 2021 έως τον Οκτώβριο 2021 υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ματθαίου Σπελέτα τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος. Επιπλέον θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις πολύτιμες συμβουλές και τις γνώσεις που μου μετέδωσε καθώς και για τη συνεχή ενθάρρυνση και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Δημήτριο Κουρέτα και Γιαννακούλα Νικόλαο οι οποίοι δέχτηκαν να γίνουν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Σοφία Ραφτοπούλου για τη βοήθειά της, τις συμβουλές της και την άψογη συνεργασία μας. Οφείλω ένα ακόμη ευχαριστώ στην παρασκευάστρια του εργαστηρίου Αθανασία Φουσίκα καθώς και σε όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους καθώς και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε μεταξύ μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Covid-19 αποτελεί ένα νόσημα που άλλαξε την παγκόσμια ιστορία. Παρουσιάζει ποικίλη κλινική πορεία και πιθανολογείται ότι το γενετικό υπόστρωμα των ατόμων παίζει ρόλο σ' αυτό. Η πρωτεΐνη CD14 αποτελεί μόριο της έμφυτης ανοσίας καθώς είναι ένας υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων (PRR) με πολλές λειτουργίες όσον αφορά τη μικροβιακή αναγνώριση και σηματοδότηση και οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων προφλεγμονοδών κυτταροκινών και την ενεργοποίηση κυττάρων της ειδικής ανοσίας.

Ο πολυμορφισμός rs 2569190 εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου CD14 και έχει συσχετιστεί με ποικίλες κλινικές καταστάσεις όπως αυτοάνοσα νοσήματα (αρθρίτιδα, θυρεοειδίτιδα), την εμφάνιση αλλεργίας και άσθματος έως και καρκίνου. Επιπλέον, η παρουσία του πολυμορφισμού αυξάνει τον κίνδυνο για ασθένειες της καρδιάς όπως καρδιομυοπάθεια, έμφραγμα του μυοκαρδίου και καρδιοαγγειακά νοσήματα, καθώς και ασθένειες του ήπατος όπως αλκοολική νόσο και ανάπτυξη κίρρωσης καθώς και ατρησία των χοληφόρων. Επίσης ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με την κλινική σοβαρότητα καθώς και την ευαισθησία σε ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις όπως φυματίωση, χρόνια ηπατίτιδα C και μόλυνση από την αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs 2569190 με σκοπό την ανίχνευση πιθανών συσχετισμών με την κλινική εικόνα ασθενών με Covid-19. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 264 ασθενείς με επιβεβαιωμένη λοίμωξη Sars-Cov-2 με μέσο όρο ηλικίας τα 42,8 έτη εκ των οποίων οι 180 ήταν άνδρες και οι 84 γυναίκες. Οι ασθενείς παρουσίασαν ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (ασυμπτωματικοί έως βαρέως πάσχοντες, βαριά αναπνευστική ανεπάρκεια, θάνατος). Η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο PCR-RFLP με εκκινητές ειδικούς ως προς την αλληλουχία τμήματος του γονιδίου CD14. Από τους 264 ασθενείς οι 65 έφεραν τον πολυμορφισμό σε ομόζυγη κατάσταση, οι 131 σε ετερόζυγη ενώ οι 68 δεν έφεραν τη σημειακή μετάλλαξη σε κανένα από τα 2 αλληλόμορφα του γονιδίου.

Ο πολυμορφισμός δε συσχετίστηκε με την κλινική βαρύτητα του νοσήματος ωστόσο παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις όσον αφορά την εκδήλωση κόπωσης στην οποία δρα προστατευτικά και αγευσίας. Συμπερασματικά, ο πολυμορφισμός αυτός δε φάνηκε να έχει αξία όσον αφορά την πρόγνωση ασθενών με τη νόσο Covid-19.

Covid-19 is a disease that has changed world history. It exhibits as an infection with variable clinical manifestations and the genetic background probably has a key role. CD14 protein is a molecule of innate immunity which acts as a pattern recognition receptor (PRR) with many functions in microbial recognition and signaling. It also leads to the production of various proinflammatory cytokines and activates specific immune cells.

Rs 2569190 polymorphism is located in the promoter of the CD14 gene and has been associated with a variety of clinical conditions such as autoimmune diseases (arthritis, thyroiditis), development of allergies, asthma and cancer. In addition, the presence of the polymorphism increases the risk of heart conditions such as cardiomyopathy, myocardial infraction and cardiovascular disease, as well as liver disease such as alcoholism and development of cirrhosis as well as biliary atresia. This polymorphism has also been associated with clinical severity as well as susceptibility to viral and bacterial infections such as tuberculosis, chronic hepatitis C and respiratory syncytial virus (RSV) infection.

In this study, the functional polymorphism rs 2569190 has been studied in order to detect possible correlations with clinical symptoms of patients with Covid-19 disease. Specifically, 264 patients with confirmed Sars-Cov-2 infection (mean age 42.8 years, 180 men and 84 women) were studied. Patients presented a variety of clinical manifestations of the disease (asymptomatic to severely ill, severe respiratory failure, death). The analysis was performed by PCR-RFLP method with specifically designed primers. Among the 264 patients, 65 carried the polymorphism in a homozygous state, 131 in a heterozygous state, while 68 did not carry the point mutation in any of the 2 alleles of the gene.

The polymorphism was not correlated with the clinical severity of the disease. However, statistically significant correlations were observed regarding the fatigue and tastelessness. In conclusion, the polymorphism did not appear to have any value in the prognosis of patients with Covid-19 disease.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....	10-11
-------------------------	-------

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

A. Covid-19.....	13
-------------------------	-----------

A.1 Προέλευση SARS-COV 2 - Σύγκριση με τους ιούς SARS και MERS.....	14
---	----

A.2 Συμπτωματολογία και τρόποι μετάδοσης.....	15
---	----

A.3 Δομικά χαρακτηριστικά και οργάνωση του γενετικού υλικού.....	16-17
--	-------

A.4 Είσοδος του ιού στο κύτταρο.....	18
--------------------------------------	----

A.5 Κύκλος ζωής του ιού.....	19
------------------------------	----

A.6 Ανοσιακή απάντηση έναντι του SARS-COV 2.....	20-21
--	-------

A.7 Μονοπάτι σηματοδότησης των υποδοχέων TLR.....	22
---	----

B. CD14

B.1 Γενικές πληροφορίες.....	23-24
------------------------------	-------

B.2 Βιολογικές λειτουργίες.....	25-26
---------------------------------	-------

B.3 Συσχέτιση με ασθένειες.....	27
---------------------------------	----

B.4 Ρόλος στη νόσο covid-19.....	28
----------------------------------	----

B.5 Λειτουργικός πολυμορφισμός rs2569190.....	29-30
---	-------

Σκοπός.....	31
-------------	----

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A.1 Άτομα που μελετήθηκαν.....	33-34
--------------------------------	-------

A.2 Μεθοδολογία Έρευνας.....	35
------------------------------	----

A.3 Απομόνωση Ολικού DNA.....	35-36
-------------------------------	-------

A.4 Σχεδιασμός Εκκινητών.....	37
-------------------------------	----

A.5 PCR.....	38
--------------	----

A.6 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.....	39
---	----

A.7 Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση Hae III.....	40-41
---	-------

A.8 Στατιστική ανάλυση.....	41
-----------------------------	----

Β. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42-43
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44-46
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47-51

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

ACE	Angiotensin-Converting Enzyme	Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης
CD14	Cluster of Differentiation 14	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 14
Covid-19	Coronavirus disease 19	Νόσος από τον κορωναϊό 19
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern	Μοριακό μοτίβο που σχετίζεται με βλάβες
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor	Παράγοντας διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	Γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλη
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HMGB1	High mobility group protein 1	Ομάδα πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας
IFN	Interferon	Ιντερφερόνη
LPS	Lipopolysaccharides	Λιποπολυσακχαρίτης
ORF	Open Reading Frame	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	Πρωτεΐνη πρωταρχικής απόκρισης στη διαφοροποίηση σε μυελοειδή σειρά
NLR	NOD- Like Receptor	Υποδοχέας τύπου NOD
PAMP	Pattern-Associated Molecular Pattern	Μοριακό μοτίβο που σχετίζεται με παθογόνα
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης
PLC	Phospholipase C	Φωσφολιπάση C
PRR	Pattern Recognition Receptor	Υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων

RBD	Receptor-Binding Domain	Περιοχή πρόσδεσης υποδοχέα
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA
RLR	RIG-Like Receptor	Υποδοχέας τύπου RIG
RSV	Respiratory Syncytial virus	Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός
TLR	Toll-Like Receptor	Υποδοχέας τύπου Toll
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2	Διαμεμβρανική πρωτεάση Σερίνης 2
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α	Παράγοντας νέκρωσης όγκου α
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon- β	Επικράτεια TIR που περιέχει προσαρμογέα που επάγεται από την ιντερφερόνη β

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

A.COVID-19

Το Δεκέμβριο του 2019 στην πόλη Wuhan της Κίνας ξέσπασε επιδημία πνευμονίας αγνώστου αιτιολογίας. Πολύ σύντομα διαπιστώθηκε ότι για την επιδημία αυτή υπεύθυνο ήταν ένα νέο στέλεχος κορωναϊού που μέχρι τότε δεν είχε προσβάλλει τον άνθρωπο. Οι ανθρωπίνι κορωναϊοί έχουν ενοχοποιηθεί και για ακόμη 2 επιδημίες κατά το παρελθόν (2002-2003 επιδημία SARS και 2012 επιδημία MERS). Το νέο στέλεχος ονομάστηκε SARS-COV-2 και η νόσος που προκαλεί Covid-19. Η επιδημία αυτή εξαπλώθηκε και στις 11 Μαρτίου 2020 ο ΠΟΥ κήρυξε πανδημία. Έκτοτε οι ζωές όλων άλλαξαν και ένα μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας έστρεψε το ενδιαφέρον του στον ιό αυτό. Έως σήμερα έχουν προσβληθεί πάνω από 185 εκ. άνθρωποι ενώ το 2-3 % αυτών έχασε τη ζωή του.

Προέλευση SARS-COV 2 - Σύγκριση με τους ιούς SARS-COV και MERS-COV

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια Coronaviridae και στο γένος Betacoronavirus (β). Φέρει ως γενετικό υλικό ένα μονόκλωνο RNA και για το λόγο αυτό έχει την ικανότητα να συσσωρεύει μεταλλάξεις και να εξελίσσεται ταχέως. Υπήρξαν διάφορες θεωρίες προέλευσης του. Από φυλογενετικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι ο ιός αυτός προήλθε από μία πηγή μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και ανιχνεύτηκε στον άνθρωπο σχετικά γρήγορα. Η επικρατέστερη άποψη σχετικά με την προέλευση του ιού είναι ότι η αρχική δεξαμενή του ήταν οι νυχτερίδες ωστόσο υπήρξε και ένας ενδιάμεσος ξενιστής μέχρι ο ιός να μολύνει τον άνθρωπο (Lu et al., 2020).

Στην ίδια οικογένεια με τον ιό SARS-COV 2 ανήκουν οι ιοί SARS-COV και MERS-COV και για το λόγο αυτό οι ιοί αυτοί εμφανίζουν κάποιες ομοιότητες. Επομένως η ήδη υπάρχουσα γνώση σχετικά με τους δύο συγγενείς ιούς θα μπορούσε να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε περισσότερα σχετικά με τη μοριακή βιολογία του νέου κορωναϊού. Ο SARS-COV 2 έχει παρόμοια δομή και παθογονικότητα με τον SARS ωστόσο διαφέρουν στην πολύ σημαντική δομική πρωτεΐνη S γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την υψηλότερη μολυσματικότητα του SARS-COV 2. Και οι 3 ιοί προκαλούν οξύ αναπνευστικό σύνδρομο και μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο, ωστόσο ο SARS-COV 2 είναι λιγότερο παθογόνος. Διαθέτουν ως γενετικό υλικό ένα μεγάλο μόριο RNA (+) και το γονιδίωμά τους διαθέτει γονίδια για 4-5 δομικές πρωτεΐνες. Οι SARS-COV και SARS-COV 2 χρησιμοποιούν τον ίδιο υποδοχέα (ACE2) για να εισέλθουν στα κύτταρα του ξενιστή, ενώ ο MERS-COV προσδέεται στον υποδοχέα DPP4. Ο ιός SARS-COV 2 εμφανίζει 79% γενετική ομοιότητα με τον SARS-COV και 50% με τον MERS-COV. Οι κωδικές περιοχές του SARS-COV 2 παρουσιάζουν παρόμοια γενετική οργάνωση με αυτές του SARS-COV και η περιοχή S1 (receptor binding domain) του SARS-COV 2 είναι αρκετά όμοια με αυτήν του SARS-COV (Rabaan et al., 2020).

Συμπτωματολογία και τρόποι μετάδοσης

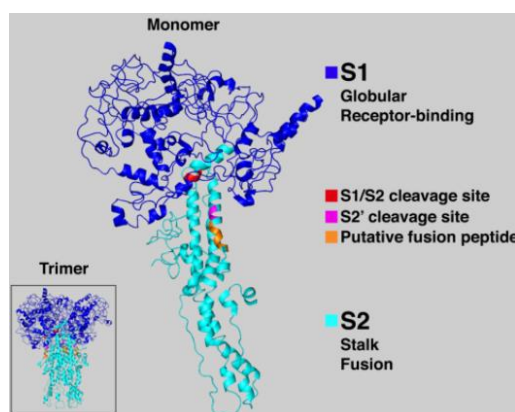
Η περίοδος επώασης του ιού εκτιμάται στις 5-6 ημέρες ενώ το 98% των ασθενών αναπτύσσει συμπτώματα σε διάστημα 11 ημερών από την έκθεση στον ιό. Η κλινική εικόνα των ασθενών ποικίλλει από ασυμπτωματικούς έως και ασθενείς που εμφανίζουν σοβαρά αναπνευστικά συμπτώματα και επιπλοκές. Τα πιο συχνά συμπτώματα των ασθενών είναι πυρετός, βήχας, κόπωση, δύσπνοια, ανορεξία, ανοσμία και μυαλγίες ενώ πιο σπάνια οι ασθενείς εμφανίζουν κεφαλαλγία, ρινόρροια, διάρροια, ναυτία, ζάλη και θωρακικό άλγος. Οι επιπλοκές της νόσου περιλαμβάνουν σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, σοβαρή λοίμωξη των πνευμόνων, νεφρική ανεπάρκεια, σήψη και σηπτικό σοκ ενώ κάποιοι απ' αυτούς οδηγούνται σε θάνατο (Thevarajan & Buising, Kirsty Cowie, 2020).

Όσον αφορά τον τρόπο μετάδοσης, ο ιός μεταδίδεται τόσο άμεσα (από άτομο σε άτομο) όσο και έμμεσα μέσω επαφής με μολυσμένα αντικείμενα. Η μετάδοση από μολυσμένα άτομα συμβαίνει μέσω αναπνευστικών σταγονιδίων όταν τα άτομα βήχουν, φτερνίζονται, ή μιλούν. Τα σταγονίδια συνήθως μπορούν να μεταφερθούν σε απόσταση έως και 2 μέτρα. Επίσης, ο ιός μπορεί να παραμένει σε επιφάνειες και να μεταδίδεται μέσω της επαφής του δέρματος με αυτές. Στη συνέχεια εισέρχεται στον οργανισμό μέσω του βλεννογόνου της μύτης, του στόματος ή των ματιών (Lotfi et al., 2020).

Δομικά χαρακτηριστικά και οργάνωση του γενετικού υλικού

Ο SARS-CoV 2 είναι ένας ιός ελικοειδούς συμμετρίας που περιβάλλεται από λιποειδικό περίβλημα. Το γονιδίωμα του αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA (+), περίπου 29,9 Kb και διαθέτει 13-15 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) περίπου 30.000 νουκλεοτιδίων το καθένα στα οποία εντοπίζονται διάφορα γονίδια που κωδικοποιούν τόσο για δομικές όσο και μη δομικές πρωτεΐνες. Οι μη δομικές πρωτεΐνες διαδραματίζουν πολλούς ρόλους στην αναπαραγωγή, στις διαδικασίες συναρμολόγησης του ιού καθώς επίσης και στην παθογένεση. Στις δομικές πρωτεΐνες του ιού ανήκουν οι:

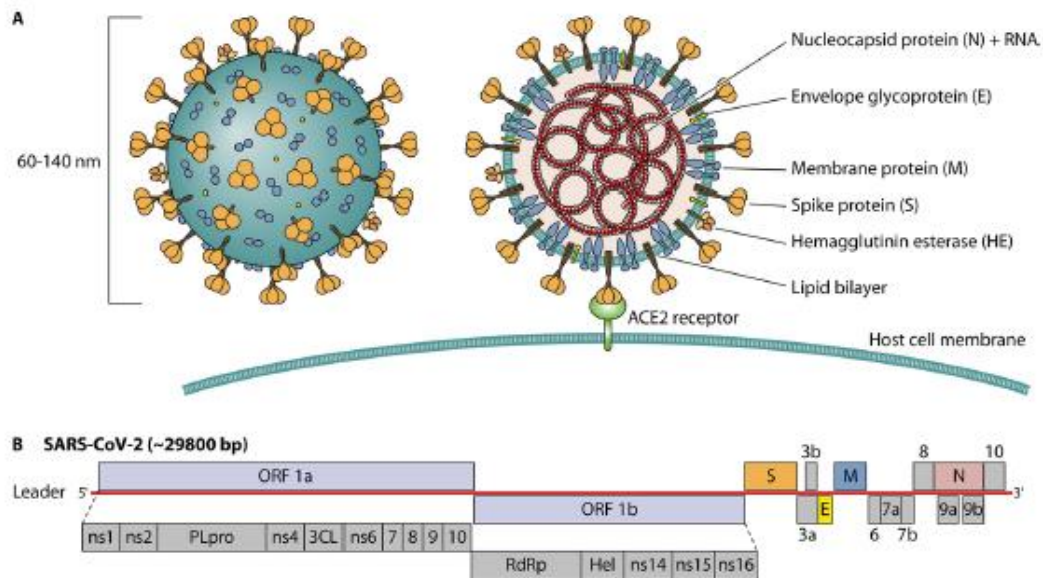
- **S (Spike):** Τριμερής γλυκοπρωτεΐνη που προσεκβάλλει του λιποειδικού περιβλήματος του ιού και είναι σημαντική για την παθογονικότητα του καθώς διαθέτει την περιοχή RBD (Receptor Binding Domain) μέσω της οποίας ο ιός αλληλεπιδρά και προσδένεται στα κύτταρα του ξενιστή. Κάθε μονομερές αποτελείται από 2 υπομονάδες τις S1 και S2. Η δομή της πρωτεΐνης παρουσιάζεται στη διπλανή εικόνα.



Εικόνα 1 Δομή της πρωτεΐνης Spike (Belouzard et al., 2012)

- **M (Membrane or Matrix):** Σχετίζεται με τη μολυσματικότητα του ιού καθώς αλληλεπιδρά τόσο με την πρωτεΐνη S όσο και με πρωτεΐνες της επιφάνειας των κυττάρων του ξενιστή.
- **E:** Δημιουργία του περιβλήματος του ιού.
- **N:** Σχηματισμός νουκλεοκαψιδίου.

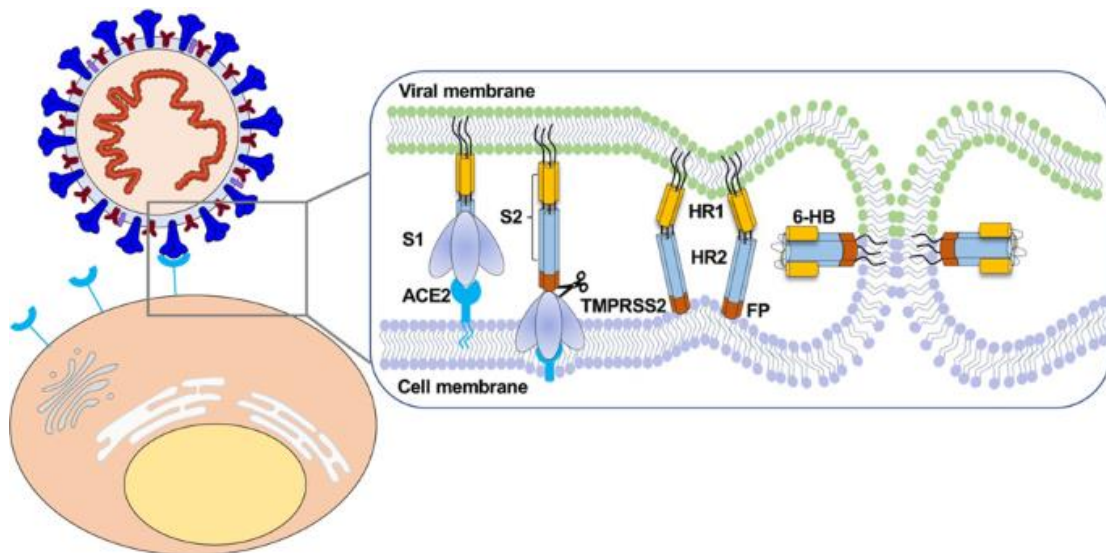
- **HE (Hemagglutinin-esterase):** Γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου που χρησιμεύει για την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή (Kumar et al., 2019; Naqvi et al., 2020) .



Εικόνα 2 Δομικά και γενωμικά χαρακτηριστικά του ιού SARS-CoV (Detection, n.d.)

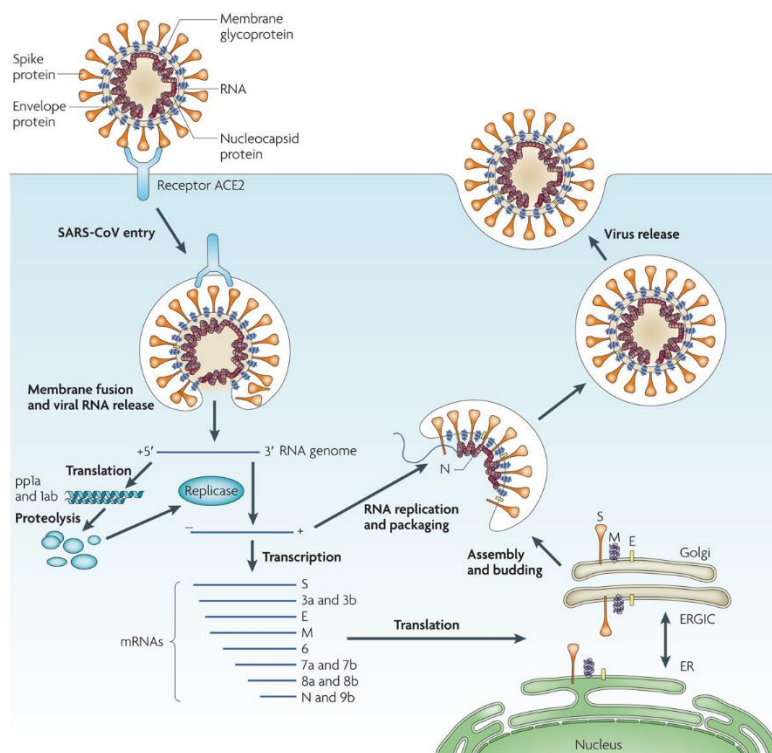
Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Η είσοδος του ιού στα κύτταρα του ξενιστή αποτελεί μία πολυσταδιακή διαδικασία για την οποία έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί. Πιο συγκεκριμένα απαραίτητο βήμα για την είσοδο αποτελεί η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης Spike του ιού με τον υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) του ξενιστή. Η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται μέσω της S1 περιοχής της πρωτεΐνης Spike και με τον τρόπο αυτό ο ιός προσκολλάται στα ανθρώπινα κύτταρα. Η σύνδεση ανάμεσα στον υποδοχέα και τον ιό διευκολύνεται από μία τύπου 2 διαμεμβρανική πρωτεάση (TMPRSS2) η οποία διασπά την S1 υπομονάδα και σταδιακά οι περιοχές HR1 και HR2 της S2 υπομονάδας προσεγγίζουν η μία την άλλη και σχηματίζουν μία δομή 6 ελίκων η οποία βοηθά στην ολοκλήρωση της σύντηξης του ιικού φακέλου και της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή και την απελευθέρωση του γενωμικού RNA (Εικόνα3) (Zhang et al., 2021). Ένας δεύτερος μηχανισμός που έχει προταθεί υποστηρίζει ότι μετά την αρχική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Spike με τον ACE2 ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκύττωσης και η πρωτεΐνη S καθώς και οι πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου διασπώνται στα λυσοσώματα (Bayati et al., 2021).



Εικόνα 3 Είσοδος του ιού στο κύτταρο (Zhang et al., 2021)

Κύκλος ζωής του ιού



Εικόνα 4 Κύκλος ζωής του SARS-CoV-2

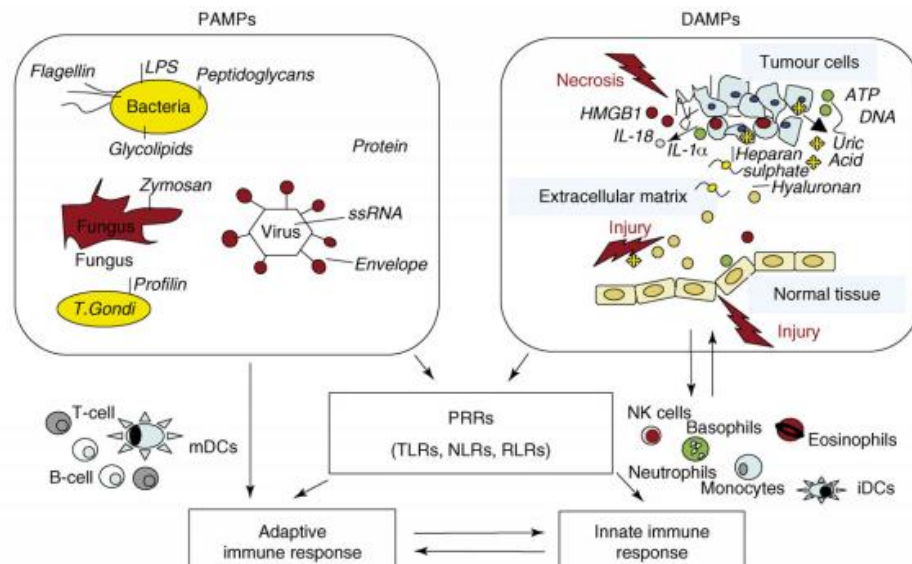
Στη διπλανή εικόνα συνοψίζεται ο κύκλος ζωής του ιού. Πιο αναλυτικά μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο του ξενιστή το γονιδίωμα του απελευθερώνεται και ο ιός χρησιμοποιεί τα ένζυμα του ξενιστή προκειμένου να συνθέσει τις πρωτεΐνες του και να αναπαραχθεί. Το sRNA (+) μεταφράζεται από

τα ριβοσώματα του ανθρώπινου κυττάρου με αποτέλεσμα την παραγωγή των πολυπρωτεϊνών pp1a και pp1ab οι οποίες στη συνέχεια διασπώνται με πρωτεόλυση. Μία από τις πρωτεΐνες που προκύπτουν από τη διάσπαση αυτή είναι και η ρεπλικάση από τη δράση της οποίας θα προκύψουν sRNAs (-). Κάποια από τα μόρια αυτά θα αποτελέσουν τη μήτρα για την παραγωγή μορίων γενωμικού RNA μέσω αντιγραφής ενώ κάποια άλλα θα μεταγραφούν και θα παραχθούν mRNAs από τα οποία θα προκύψουν οι δομικές πρωτεΐνες του ιού. Τα μόρια sRNA(+) στη συνέχεια πακετάρονται και μαζί με τις δομικές πρωτεΐνες συνθέτουν ένα νέο νουκλεοκαψίδιο και ο ιός απελευθερώνεται από το κύτταρο μέσω εξωκύτωσης (Du et al., 2009).

Ανοσιακή απάντηση έναντι του SARS-COV 2

Όταν ο ιός εισέλθει στα κύτταρά του ξενιστή έρχεται αντιμέτωπος με το ανοσοποιητικό του σύστημα που περιλαμβάνει ένα δίκτυο κυττάρων, ιστών και οργάνων. Ο οργανισμός διαθέτει υποδοχείς με τους οποίους αναγνωρίζει δομές παθογόνων και ειδικότερα για τους ιούς οι υποδοχείς αυτοί είναι ενδοκυτταρικοί (TLRs, NLRs, RLRs). Η αναγνώριση του ιού από το ανοσοποιητικό ξεκινά με την ανίχνευση δομών του από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs) των κυττάρων του ξενιστή. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται μονοπάτια μεταγωγής σήματος που οδηγούν σε έκφραση γονιδίων ιντερφερονών, κυτοκινών και χημειοκινών. Κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από τον SARS-Cov 2 κάποιοι ασθενείς αναπτύσσουν μία ανεξέλεγκτη ανοσολογική απάντηση που προκαλείται από την υπερενεργοποίηση των μακροφάγων και των μονοκυττάρων και στους ασθενείς αυτούς παρατηρείται το σύνδρομο υπερέκκρισης κυτταροκινών.

Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, αρχικά θα ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας οι οποίοι στη συνέχεια θα ενεργοποιήσουν τα κύτταρα της ειδικής ανοσίας με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων και την εξουδετέρωση του ιού. Μια πιθανή αλληλουχία περιλαμβάνει την αρχική μόλυνση των κυττάρων μέσω του υποδοχέα ACE2, προκαλώντας άμεση κυτταρική λύση. Τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή απελευθερώνουν κατεστραμμένες πρωτεΐνες, οξειδωμένο μιτοχονδριακό DNA, HMGB1 και άλλα ενδοκυτταρικά μόρια που ονομάζονται μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβες (DAMP). Τα μόρια αυτά καθώς και το ιικό RNA που ανήκει στην κατηγορία μοριακών προτύπων που σχετίζονται με παθογόνα (PAMP) αναγνωρίζονται ως σήματα κινδύνου από μια σειρά υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRR) σε μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και άλλα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας. Αυτό το βήμα αναγνώρισης οδηγεί σε ταχεία ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης που οδηγούν στην παραγωγή ενός καταρράκτη προφλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-1b, TNFα, IL-8, IL-6, GM-CSF και τύπου I ιντερφερονών.

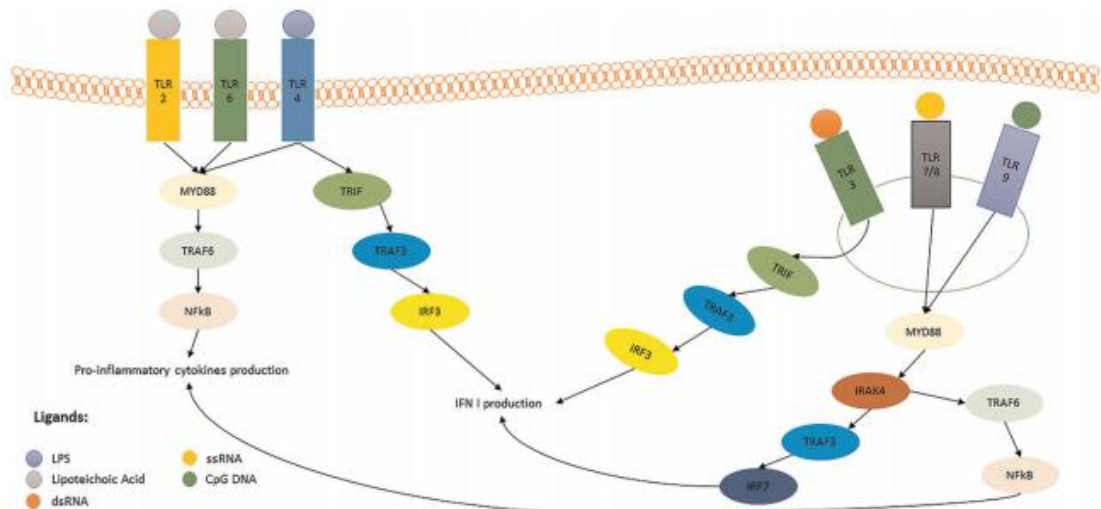


Εικόνα 5 Ενεργοποίηση μηχανισμών έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας (Rubartelli & Lotze, 2007)

Η αναγνώριση των PAMPs και DAMPs από PRRs σε κύτταρα του ξενιστή αποτελεί το πιο σημαντικό βήμα στην ενεργοποίηση και ενίσχυση των έμφυτων ανοσολογικών αντιδράσεων. Οι PRRs βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα που εμπλέκονται στις έμφυτες ανοσοαποκρίσεις συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων που προέρχονται από το αίμα, των μακροφάγων των πνευμόνων και των δενδριτικών κυττάρων. Ένα παράδειγμα υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων αποτελούν οι υποδοχείς τύπου Toll (TLR) οι οποίοι φαίνεται ότι σχετίζονται με την παθογένεια της νόσου Covid-19. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι οι TLRs 7 και 13 είναι υποδοχείς του ιού ενώ η πρωτεΐνη Spike αλληλεπιδρά στενά με τον TLR4 καθώς και με τους TLR3,7 και 8 (Martin et al., 2020).

Μονοπάτι σηματοδότησης των υποδοχέων TLR.

Οι υποδοχείς τύπου Toll αποτελούν μία ομάδα πρωτεϊνών με ρόλο κλειδί στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαθέτουν ένα κοινό μοτίβο επαναλήψεων πλούσιων σε λευκίνη στην εξωτερική τους επιφάνεια και μία ενδοκυτταρική επικράτεια TIR που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οδό μετάδοσης σήματος. Μπορεί να βρίσκονται είτε στην επιφάνεια των κυττάρων είτε ενδοκυτταρικά.



Εικόνα 6 Οδοί ενεργοποίησης ενδοκυττάρων και επιφανειακών TLRs

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6 η ενεργοποίηση είτε των ενδοκυττάρων είτε των επιφανειακών TLRs οδηγεί στην ενεργοποίηση 2 κύριων οδών σηματοδότησης. Το 1ο μονοπάτι αφορά την ενεργοποίηση του TRIF και την παραγωγή ιντερφερόνης 1 (IFN 1). Το 2ο μονοπάτι αποτελεί το κύριο μονοπάτι της φλεγμονής και αφορά την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κβ μέσω ενεργοποίησης του MYD88. Επομένως και τα 2 μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επάγονται από τη δράση των υποδοχέων αυτών σχετίζονται με την παραγωγή κυτταροκινών η οποία κάποιες φορές στους ασθενείς με τη νόσο covid-19 μπορεί να γίνει ανεξέλεγκτη και να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές (Khanmohammadi & Rezaei, 2021).

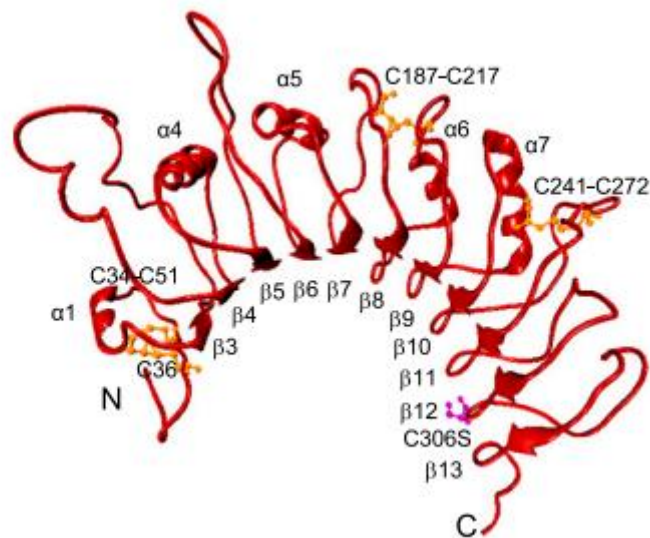
Γενικές πληροφορίες

Το μέγεθος της φλεγμονώδους απόκρισης που προκαλείται από τους TLRs ενισχύεται σημαντικά από βοηθητικές πρωτεΐνες όπως η CD14. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί συνυποδοχέα των TLRs και διευκολύνει την ενεργοποίησή τους. Το μόριο αυτό είναι ένας υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων (PRR) και ενισχύει την έμφυτη ανοσοαπόκριση σε μολύνσεις ευαισθητοποιώντας τα κύτταρα του ξενιστή σε μικροβιακά προϊόντα όπως το βακτηριακό πολυσακχαρίτη (LPS), λιποπρωτεΐνες, λιποτεichoϊκό οξύ κ.α.

Το CD14 ανήκει σε μία ευρύτερη κατηγορία CD (Clusters of Differentiation) που είναι μεμβρανικά μόρια που εντοπίζονται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων. Τα μόρια αυτά είναι κυρίως γλυκοπρωτεΐνες και αντανακλούν είτε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης είτε καταστάσεις ενεργοποίησης ή απενεργοποίησής τους. Τα αντιγόνα αυτά μπορούν να ανιχνευτούν με μονοκλωνικά αντισώματα. Το σύνολο των μονοκλωνικών αντισωμάτων που αντιδρούν με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο ομαδοποιούνται σε 1 CD. Διαφορετικοί συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορούν να προσδιορίσουν έναν κυτταρικό πληθυσμό. Τα μόρια αυτά έχουν ονομαστεί με βάση τη σειρά που ανακαλύφθηκαν και όχι με βάση τη διαφοροποίησή τους (Lionetto et al., 2020).

Το γονίδιο CD14 εκφράζεται σε κύτταρα της μυελικής σειράς κυρίως σε μονοκύτταρα και μακροφάγα καθώς και σε ουδετερόφιλα. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5q31.1 και έχει μήκος 375 αμινοξέα που προκύπτουν από ένα mRNA μήκους 1367 νουκλεοτιδίων. Το CD14 υπάρχει σε δύο διαφορετικές μορφές: μια μορφή αγκυροβολημένη στη μεμβράνη και μια διαλυτή (sCD14) μορφή. Η διαμεμβρανική μορφή είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 53-55 kDa, και αγκυροβολείται στην κυτταρική μεμβράνη με μια άγκυρα γλυκοσυλφωφατιδυλοσινοτόλης (GPI). Η sCD14 δημιουργείται όταν η διαμεμβρανική απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος (Cox, 2020).

Όσον αφορά τη δομή της πρωτεΐνης, η ακτινογραφία ακτίνων Χ αποκάλυψε ένα λυγισμένο σωληνοειδές σχήμα που σχηματίζεται από 10 επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη. Στην κυρτή πλευρά εντοπίζονται 5 α -έλικες ενώ στην κοίλη εντοπίζονται 11 β -αλυσίδες. Επίσης, στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης υπάρχει μία δομή σαν τσέπη η οποία πιθανώς δεσμεύει αλκυλιωμένα μόρια συμπεριλαμβανομένου του LPS (Kelley et al., 2013).

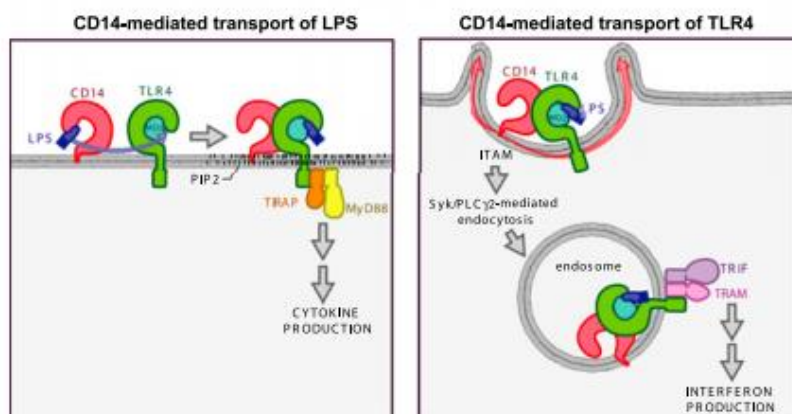


Εικόνα 7 Δομή της πρωτεΐνης CD14 (Kelley et al., 2013)

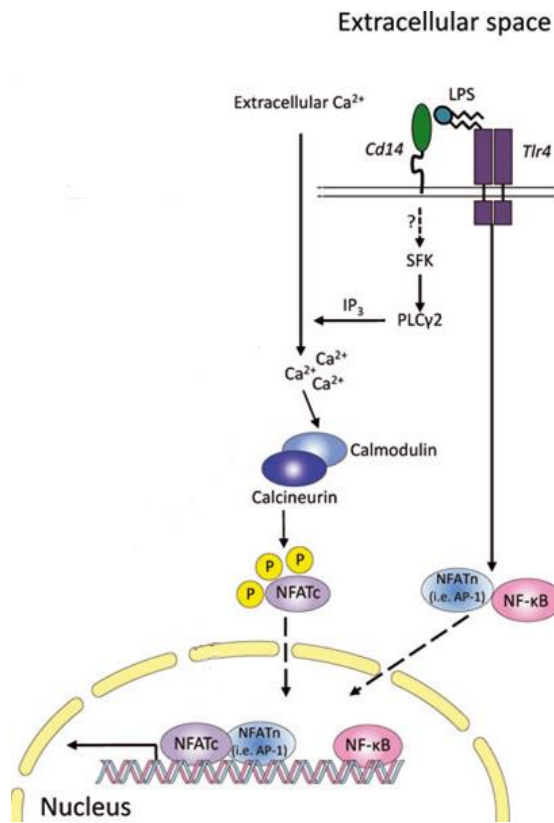
Βιολογικές Λειτουργίες

Το μόριο CD14 είναι ένας από τους πρώτους αναγνωρισμένους PRR (Pattern recognition receptor) και έχει πολλές λειτουργίες στη μικροβιακή αναγνώριση και σηματοδότηση. Βοηθά στην αναγνώριση προσδετών για τους TLR 1,2,3,4,6,7 και 9 που θα οδηγήσει στην παραγωγή διαφόρων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και την ενεργοποίηση κυττάρων της ειδικής ανοσίας. Η βασική λειτουργία του CD14 αφορά την πρόσδεση του LPS μέσω της περιοχής LBP. Το μόριο LPS είναι μία ενδοτοξίνη που εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια των Gram- βακτηρίων. Αν και το CD14 είναι ο κύριος υποδοχέας για την πρόσδεση του LPS είναι ανίκανο να προκαλέσει ενδοκυττάρια σηματοδότηση επειδή στερείται ενδοκυτταρικού τοιχώματος. Όσον αφορά την έναρξη της οδού σηματοδότησης που ενεργοποιείται ως απόκριση στο LPS συμβάλλει σ' αυτήν με τουλάχιστον 3 διαφορετικούς τρόπους. Διευκολύνει την αναγνώριση του LPS και την έναρξη του μονοπατιού που εξαρτάται από το MyD88, εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού TRIF καθώς και στην έναρξη του μονοπατιού calcium/NFAT.

Πιο αναλυτικά, αρχικά το μόριο LPS προσδένεται στο CD14 το οποίο το μεταφέρει στο σύμπλοκο TLR4/MD2. Στη συνέχεια το σήμα μεταφέρεται μέσω των πρωτεϊνών TRAP και MyD88 με σκοπό την ενεργοποίηση της έκφρασης κυτταροκινών και της φλεγμονής. Το δεύτερο μονοπάτι στο οποίο εμπλέκεται ο υποδοχέας (TRIF) οδηγεί σε έκφραση IFN. Ο υποδοχέας CD14 μεταφέρει τον TLR4 σε ενδοσώματα μέσω μίας διαδικασίας που μεσολαβείται από τις πρωτεΐνες Syk και PLCγ2 όπου η σηματοδότηση TRAM-TRIF μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση ιντερφερονών (Zanoni et al., 2011).



Εικόνα 8 Μοντέλο ενεργοποίησης του μονοπατιού TLR4 μέσω του CD14 (Zanoni et al., 2011)



Εικόνα 9 Οδός σηματοδότησης NFAT

Όσον αφορά το μονοπάτι NFAT ο υποδοχέας CD14 μετά την πρόσδεση του LPS στρατολογεί μέλη της οικογένειας κινασών SRc (SFK) με έναν μηχανισμό ο οποίος δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Στη συνέχεια μέσω του μονοπατιού μετάδοσης σήματος οδηγούμαστε σε αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και μετατόπιση των πρωτεϊνών NFATc στον πυρήνα. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και μεταγραφή γονιδίων της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας (π.χ. IL2, T-cell) (Zanoni & Granucci, 2012).

Επιπλέον το μόριο αυτό εμπλέκεται στην απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων από τα μακροφάγα. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η απελευθέρωση στην κυκλοφορία ενδοκυτταρικού υλικού από τα κύτταρα που πεθαίνουν η οποία θα προκαλούσε φλεγμονή και βλάβη στους ιστούς. Η ενεργοποίηση του CD14 οδηγεί σε απελευθέρωση κυτοκινών όπως IL-2, IL-18 και IFN-γ (Zanoni & Granucci, 2013).

Συσχέτιση με ασθένειες

Καθώς το μόριο CD14 είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του TLR4 και το μονοπάτι σηματοδότησης που επάγεται από αυτό, η δράση του σχετίζεται άμεσα με φλεγμονή οργάνων όπως οι πνεύμονες, το ήπαρ και το έντερο. Επίσης η δράση του έχει συσχετιστεί με αθηροσκλήρωση η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή του αρτηριακού τοιχώματος. Σημαντικός είναι ακόμη ο ρόλος του μορίου για την επαγωγή του καρκίνου καθώς και μεταβολικών νόσων. Έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλλει στη συσσώρευση λιπιδίων και την παχυσαρκία, στην αντίσταση στην ινσουλίνη καθώς και στο διαβήτη τύπου 2 (Wu et al., 2019).

Επιπλέον το μόριο αυτό έχει παρατηρηθεί ότι εμπλέκεται και στην παθογένεση της προσβολής από κάποιους ιούς. Οι Daniela Michlmayr et al. αναφέρουν στη μελέτη τους σε παιδιά στη Νικαράγουα ότι τα CD14+ μονοκύτταρα αποτελούν τον κύριο στόχο του ιού Zika (Michlmayr et al., 2017). Τα ευρήματα μίας άλλης έρευνας υποδηλώνουν ότι το μόριο CD14 μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση της λοίμωξης από τον HIV-1 επομένως ο προσδιορισμός των επιπέδων του sCD14 μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη της νόσου και την επιβίωση ασθενών που έχουν μολυνθεί με HIV-1 (Lien et al., 1998).

Ρόλος στη νόσο covid-19

Η νοσηρότητα καθώς και η θνητότητα λόγω της μόλυνσης από τον SARS-Cov2 σχετίζονται με την έντονη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και υπερφλεγμονή. Στη νόσο αυτή είναι χαρακτηριστικό το σύνδρομο υπερέκκρισης κυτταροκινών το οποίο οφείλεται στην ενεργοποίηση κυττάρων της φυσικής ανοσίας όπως τα μακροφάγα. Για το λόγο αυτό οι Emily R. Bowman et al. μέτρησαν τα επίπεδα βιοδεικτών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση μονοκυττάρων/μακροφάγων στον ορό ατόμων που νόσησαν. Ένας από τους δείκτες που μελετήθηκε, ήταν και τα επίπεδα του sCD14. Πιο συγκεκριμένα, μετρήθηκαν τα επίπεδα του δείκτη στον ορό μη μολυσμένων ατόμων καθώς και ατόμων με ήπια, μέτρια ή σοβαρή κλινική εικόνα. Τα επίπεδα βρέθηκε ότι ήταν αυξημένα στους ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα. Επιπλέον, τα επίπεδα ήταν υψηλότερα στον ορό ατόμων που νόσησαν βαριά και τελικά πέθαναν σε σχέση με τα άτομα που ανάρρωσαν ή με ασθενείς που εμφάνισαν πιο ήπια κλινική εικόνα. Ακόμη, τα επίπεδα του δείκτη μειώθηκαν με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς με μέτρια νόσο ενώ δεν παρατηρήθηκε η ίδια μείωση στους ασθενείς που πέθαναν.

Ωστόσο η μελέτη έχει κάποιους περιορισμούς. Οι ασθενείς με τη νόσο Covid-19 είχαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης διαβήτη και υπέρτασης ενώ οι ασθενείς με πιο σοβαρή κλινική εικόνα ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό άντρες. Επομένως περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών καθώς η εικόνα αυτή ίσως να μην αντικατοπτρίζει το σύνολο του πληθυσμού των ατόμων που νόσησαν.

Λειτουργικός πολυμορφισμός rs2569190

Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου CD14, αφορά την αντικατάσταση της θυμίνης (t) από κυτοσίνη (c) και έχει βρεθεί ότι ασκεί σημαντική επίδραση στην έκφραση του γονιδίου αυτού. Έχει πραγματοποιηθεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ερευνών που αφορούν τον πολυμορφισμό και έχει συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα ασθενειών. Συγκεκριμένα, η παρουσία του T αλληλίου αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων όπως αρθρίτιδα (Zhu et al., 2018) και αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (Jia et al., 2019). Στη μελέτη τους οι Tshela et al. αναφέρουν ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση αλλεργίας και άσθματος καθώς και καρκίνου του προστάτη σε άνδρες της Αφρικής (Hagor Kantarjian Guillermo Garcia-Manero Hui Yang, 2005). Επιπλέον, η παρουσία του αλληλίου 'T' αυξάνει τον κίνδυνο για ασθένειες της καρδιάς όπως καρδιομυοπάθεια (Costa et al., 2020), έμφραγμα του μυοκαρδίου (Zhao et al., 2019) και καρδιοαγγειακά νοσήματα (Xu et al., 2019). Όσον αφορά ασθένειες του ήπατος, έχει βρεθεί ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για αλκοολική νόσο του ήπατος και ανάπτυξη κίρρωσης (Järveläinen et al., 2001) καθώς και για ατρησία των χοληφόρων (Lin et al., 2018).

Οι Abhijit Pati et al. στην εργασία τους αναφέρουν ότι ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με την κλινική σοβαρότητα καθώς και την ευαισθησία σε ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις όπως φυματίωση, αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV) και χρόνια ηπατίτιδα C. Για το λόγο αυτό μελέτησαν το ρόλο του λειτουργικού πολυμορφισμού σε ασθενείς με τη νόσο covid-19. Το αλληλόμορφο 'T' καθώς και ο γονότυπος -TT συσχετίστηκαν με υψηλότερα επίπεδα sCD14 καθώς η παρουσία του πολυμορφισμού μεταβάλλει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων του γονιδίου. Επίσης από την ανάλυσή τους υπήρξε μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στο αλληλίο 'T', τη μόλυνση από τον SARS-Cov-2 καθώς και τη θνητότητα της νόσου. Ωστόσο στην έρευνα αυτή υπήρξαν κάποιοι περιορισμοί καθώς η ανάλυση αφορούσε μόνο ευρωπαίους. Επίσης, η επιδημιολογική ανάλυση βασίστηκε σε μελέτες παρατήρησης ενώ οι case-control είναι οι πλέον κατάλληλες για μελέτες γενετικής προδιάθεσης. Τέλος, στη συσχέτιση δε συνυπολογίστηκαν παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η συνοσυρότητα των ασθενών (Timm & Hagemann, 2020). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μίας άλλης έρευνας (Yuan et al., 2007)

όπου ο γονότυπος CD14-159 CC σχετίστηκε με σοβαρότερη κλινική εικόνα της μόλυνσης από τον ιό SARS-CoV.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η ανίχνευση του λειτουργικού πολυμορφισμού rs2569190 σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη λοίμωξη Covid-19, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός επηρεάζει την κλινική εικόνα καθώς και την πρόγνωση των ασθενών που έχουν μολυνθεί από τον ιό SARS-CoV 2.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Άτομα που μελετήθηκαν

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 264 ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας τα 42,8 έτη εκ των οποίων οι 180 ήταν άνδρες και οι 84 γυναίκες. Τα δείγματα των ασθενών δόθηκαν με τη συγκατάθεσή τους για μελέτη στο εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα δείγματα προήλθαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας καθώς και από το νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης.

Οι ασθενείς κατατάχθηκαν σε 5 ομάδες σύμφωνα με τη σοβαρότητα της νόσου. Στην ομάδα 1 εντάχθηκαν ασυμπτωματικοί ασθενείς, στη 2 ασθενείς με ήπια νόσο, στην 3 ασθενείς με μέτρια νόσο που απαιτεί νοσηλεία, στην 4 ασθενείς με σοβαρή νόσο και πνευμονία ενώ στην ομάδα 5 ασθενείς με σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια που απαιτεί διασωλήνωση και μηχανικό αερισμό.

Η σοβαρότητα της νόσου Covid-19 σχετίζεται με την ύπαρξη υποκείμενων νοσημάτων. Για το λόγο αυτό για κάθε ομάδα από τις παραπάνω λήφθηκε υπόψιν η συνοσηρότητα με ασθένειες όπως η παχυσαρκία, η υπέρταση, χρόνια καρδιακή νόσος (κολπική μαρμαρυγή, καρδιακή ανεπάρκεια, αρρυθμίες, προσθετική βαλβίδα), χρόνια εγκεφαλοαγγειακή νόσος, χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις(ΧΑΠ, άσθμα, άπνοια ύπνου), δυσλιπιδαιμία, ΣΔ, υποθυρεοειδισμός, κακοήθειες και χρόνιες αναλογικές και/ή αιματολογικές. Περαιτέρω λεπτομέρειες σχετικά με τα υποκείμενα νοσήματα των ασθενών της κάθε ομάδας απεικονίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη*

Παράμετρος	Σύνολο	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4	Ομάδα 5	p#
No.	264	65	85	15	77	22	0
Φύλο (♂/♀)	180/84	44/21	58/27	9/6	55/22	14/8	0.902 (C)
Ηλικία (διάμεση ± SD), γ	42.8 ± 18.4	35.1 ± 13.7	30.9 ± 11.0	45.1 ± 16.9	56.4 ± 16.2	62.7 ± 13.4	<0.001 (K-W)
Συννοσηρότητα (n, %)	94, 35.6	6, 9.2	8, 9.4	5, 33.3	56, 72.7	19, 86.4	<0.001 (C)
Παχυσαρκία (n, %)	31, 11.7	0, 0	2, 2.4	2, 13.3	22, 28.6	5, 22.7	<0.001 (C)
Υπέρταση (n, %)	49, 18.6	1, 1.5	1, 1.2	2, 13.3	33, 42.8	12, 54.5	<0.001 (C)
Χρόνια καρδιακή νόσος* (n, %)	11, 4.2	0, 0	0, 0	0, 0	7, 9.1	4, 18.2	<0.001 (C)
Χρόνια εγκεφαλοαγγειακή νόσος** (n, %)	8, 3.0	0, 0	0, 0	1, 6.7	3, 3.9	4, 18.2	<0.001 (C)
Χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις*** (n, %)	20, 7.6	1, 1.5	1, 1.2	0, 0	11, 14.3	7, 31.8	<0.001 (C)
Δυσλιπιδαιμία (n, %)	19, 7.2	1, 1.5	0, 0	1, 6.7	14, 18.2	3, 13.6	<0.001 (C)
Σακχαρώδης διαβήτης (n, %)	21, 8.0	0, 0	2, 2.4	0, 0	14, 18.2	5, 22.7	<0.001 (C)
Υποθυρεοειδισμός (n, %)	12, 4.5	0, 0	2, 2.4	2, 13.3	6, 7.8	2, 9.1	0.047 (C)
Κακοήθειες (n, %)	6, 2.3	0, 0	2, 2.4	0, 0	2, 2.6	2, 9.1	0.163 (C)
Χρόνιες ανολογικές και/ή αιματολογικές νόσοι ^ (n, %)	6, 2.3	1, 1.5	0, 0	0, 0	3, 3.9	2, 9.1	0.092 (C)
Άλλα^^ (n, %)	16, 6.1	3, 4.6	0, 0	1, 6.7	11, 14.3	1, 4.5	0.005 (C)

*Υποσημείωση: Συντομογραφίες: SD, standard deviation: τυπική απόκλιση # Στατιστική ανάλυση: C, Chi-square – F, Η ακριβής δοκιμή του Fisher – K-W, Δοκιμή Kruskal Wallis – M-W , Mann-Whitney U test

Μεθοδολογία Έρευνας

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του πολυμορφισμού ήταν περιφερικό αίμα. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά απομονώθηκε DNA από το αίμα των ασθενών, στη συνέχεια σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου CD14 και πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τους ειδικούς εκκινητές. Ακολούθησε πέψη των προϊόντων της PCR και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού.

Απομόνωση Ολικού DNA

Για την απομόνωση του DNA έγινε χρήση του EXTRACTME GENOMIC DNA KIT (Blirt). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αναλύεται παρακάτω.

- Προσθήκη 200 µL περιφερικού αίματος σε σωληνάριο φυγοκέντρησης 1,5 ml.
- Προσθήκη 1mL RBCs lysis buffer και επώαση στον πάγκο μέχρι να λυθούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια.
- Φυγοκέντρηση στα 8600 g για 4 λεπτά.
- Απόρριψη του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 375 µl GL Buffer.
- Προσθήκη 10 µL Proteinase K.
- Επώαση στους 55 °C για 30 λεπτά.
- Απομάκρυνση του διαλύματος από τους 55 °C και προσθήκη 4 µL RNAase K.
- Επώαση στους 37 °C για 10 λεπτά.
- Αφαίρεση του διαλύματος από το υδατόλουτρο, προσθήκη 400 µL GL Buffer και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 2 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε στήλη και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 λεπτό.
- Μεταφορά της στήλης σε νέο collection tube και 2 διαδοχικές πλύσεις. Αρχικά προσθήκη 600 µL Wash Buffer 1 και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 30 δευτερόλεπτα και έπειτα προσθήκη 500 µL Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 30 δευτερόλεπτα.

- Απόρριψη του διαλύματος του collection tube και φυγοκέντρηση στα 16.000 g και 2 λεπτά.
- Απόρριψη του collection tube και μεταφορά της στήλης στο τελικό tube.
- Προσθήκη 100 μ L Elution Buffer και επώαση στον πάγκο για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 λεπτό.
- Αποθήκευση του DNA στους -20°C

Σχεδιασμός Εκκινήτων

Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται η αλληλουχία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου CD14 στο οποίο εντοπίζεται ο πολυμορφισμός.

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	
Εμπρόσθιος Εκκινήτης (F)	5' – GCC AAC AGA TGA GGT TCA CA -3
Οπίσθιος Εκκινήτης (R)	5' – GTT CGA CCC CAA GAC CCT AC-3'

Στην παρακάτω εικόνα με μπλέ χρώμα απεικονίζεται η θέση των εκκινήτων στο γονίδιο cd14 ενώ με κίτρινο χρώμα ο πολυμορφισμός που μελετήθηκε.

```
2461 cttttcttgaacctaattctaccccccttgggt gccaacagatgagggttcaca atctcttc 2520
2521 cacaaaacatgcagttaaatatctgaggatattcagggacttggatttggcaggaga 2580
2581 tcaacataaaccaagacaaggaagaagtcaagaaatgaatcaagtagattctctgggat 2640
2641 ataaggtagggggattggggggttgatagtgagagtatggactggcctaaggcactg 2700
2701 aggatcatccttttcccacaccaccagagaaggcttaggctcccagagtc aacagggcat 2760
2761 tcaccgcctggggcgctgagtcacaggaactgccaggagacacagaaccctagatgc 2820
2821 cctgcagaatccttccctgttacgg tccccctccctgaaacatccttccattgcaatatttc 2880
2881 caggaaaggaaggggctggctcggaggaagagaggtggggaggtgatcaggggtcacag 2940
2941 aggagggaaactgaatgacatcc caggattacataaactgtcagaggcagccgaagagttc 3000

3001 ACAAGTGTGAAGCCTGGAAGCCGGC GGGTGCCGCTGTGTAGGAAAGAA GCTAAAGCACTT 3060
3061 CCAGAGCCTGTCCGGAGCTCAGAGGTTCCGGAAGACTTATCGACC ATG 3107

3108 gtgagtgtaggggtcttggggtcgaac gcgtgccactcgggagccacaggggttgatggg 3167
3168 gcctcctagacctctgctctctccccag 3195
```

PCR

Στην παρούσα εργασία η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πολυμεράσης DFS. Σε tube της PCR προστέθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- 22 μ L Master Mix
- 6 μ L Polymerase Mix
- 2 μ L DNA

Η σύσταση των Master Mix και Polymerase Mix καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες.

Master Mix	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μ L)
H ₂ O	242.5
PCR Buffer 10x	50
dNTPs (2.5 mM)	40
MgCl ₂	7.5
5' Primer (50 pmol)	10
3' Primer (50 pmol)	10

Polymerase Mix	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μ L)
H ₂ O	50
DFS	2.2

Συνθήκες PCR		
Στάδιο	Θερμοκρασία (οC)	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94	2 min
Αποδιάταξη	94	30 sec
Υβριδισμός εκκινητών	60	30 sec
Επέκταση εκκινητών	72	30 sec
Τελική επέκταση	72	1 min
Κύκλοι	30	

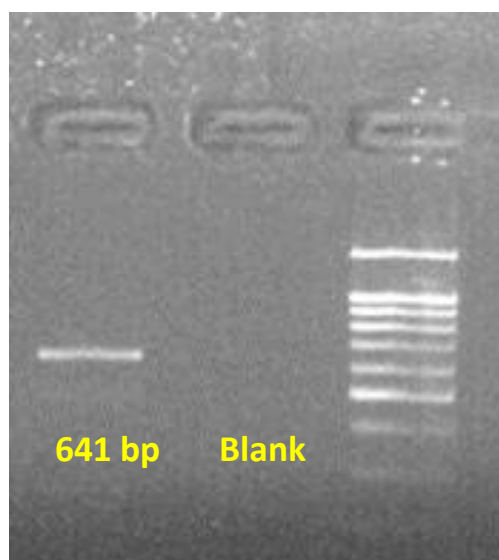
Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Η επιτυχία της PCR επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε γέλη αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Αρχικά παρασκευάστηκε η γέλη με προσθήκη 2 γραμμαρίων αγαρόζης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE. Για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων προστέθηκαν 0,5 ng/mL βρωμιούχου αιθιδίου στο πήκτωμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία χρωστική η οποία έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε δίκλωνο DNA και να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα DNA προστέθηκε διάλυμα χρωστικής (Loading buffer) με αναλογία 1/1 (5μL δείγματος και 5μL χρωστικής). Κάθε μείγμα μεταφέρθηκε στις οπές της γέλης και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V και 400 mA για 30 min.

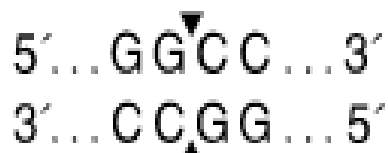
Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100 bp DNA Ladder. Τέλος, έγινε φωτογράφιση της γέλης υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNO. MO31308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems) ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.

Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης ήταν 641 bp.



Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση Hae III

Μετά την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου CD14 μέσω της PCR ακολούθησε πέψη με το ένζυμο περιορισμού Hae III για την ανίχνευση της ύπαρξης του πολυμορφισμού στα δείγματα των ασθενών.



Θέση κοπής ενζύμου

Το ένζυμο αυτό όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός (t) κόβει το προϊόν της PCR σε 1 σημείο. Σε ασθενείς στους οποίους δεν εντοπίζεται ο πολυμορφισμός το ένζυμο κόβει σε 2 σημεία. Επομένως παρατηρούνται 3 ζώνες (289, 196 και 156 bp) στην ηλεκτροφόρηση σε ασθενείς αγρίου τύπου, 2 ζώνες (445 και 196 bp) σε ασθενείς ομόζυγους ως προς τον πολυμορφισμό (TT) και 4 ζώνες (445, 289, 196 και 156 bp) σε ετερόζυγους (CT) ως προς τον πολυμορφισμό ασθενείς.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων καθώς και τις συνθήκες της αντίδρασης, παρουσιάζονται παρακάτω.

Enzyme mix	
Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
H ₂ O	150
Cutsmart	30
Hae III	5

Τα δείγματα επώστηκαν στους 37 °C overnight.

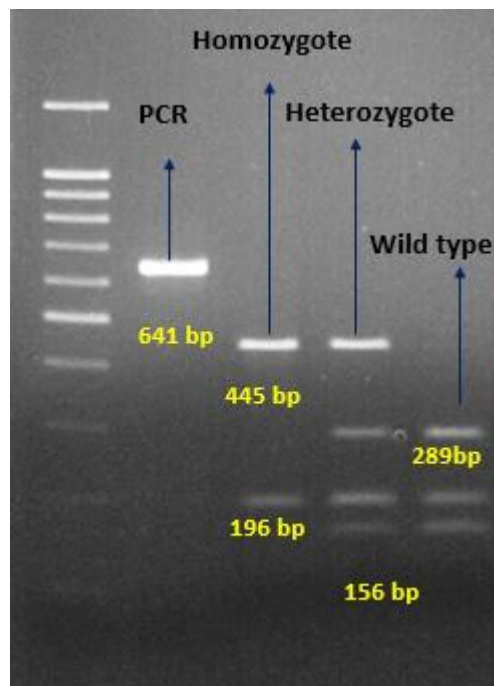
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε γέλη αгарόζης 2% η οποία παρασκευάστηκε με τη διαδικασία που αναλύθηκε ανωτέρω. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα DNA προστέθηκε διάλυμα χρωστικής (Loading buffer) με αναλογία 1/3 (5μL δείγματος και 15μL χρωστικής). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V και 400 mA για 30 min.

Στατιστική ανάλυση

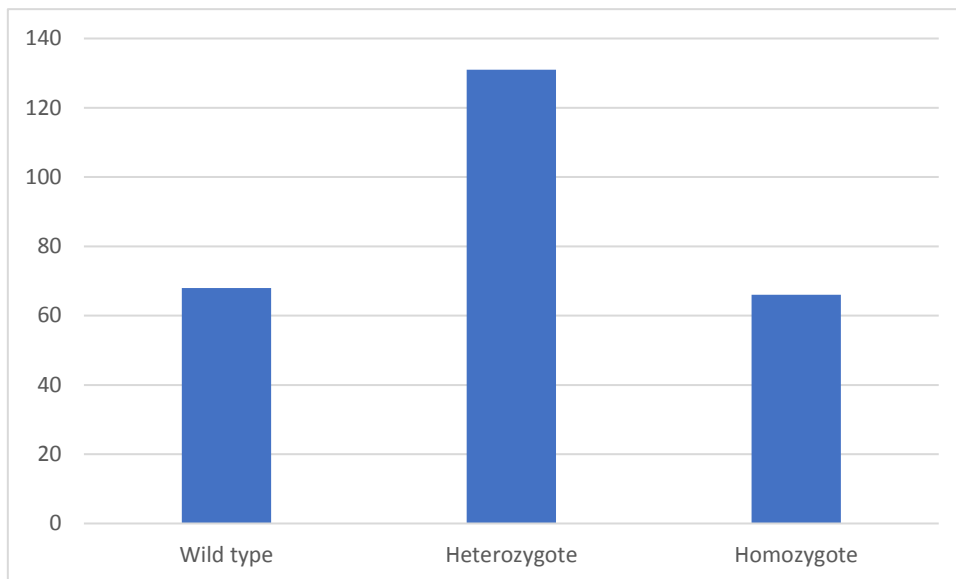
Η βιοστατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος Wizard και της δοκιμασίας χ^2 (Chi-square). Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε σε επίπεδο $p < 0.05$. Οι κατανομές των γονοτύπων ελέγχθηκαν για απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλα τα άτομα που μελετήθηκαν, ελέγχθηκαν για την παρουσία του πολυμορφισμού. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ενδεικτικά παρουσίασε την εξής εικόνα:



Από τους 264 ασθενείς οι 65 ήταν ομόζυγοι, οι 131 ετερόζυγοι ενώ οι 68 δεν έφεραν τη σημειακή μετάλλαξη σε κανένα από τα 2 αλληλόμορφα του γονιδίου.



Παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις όσον αφορά την εκδήλωση κόπωσης ($p=0,027$) για την οποία ο πολυμορφισμός δρα προστατευτικά καθώς και αγευσίας ($p=0,037$). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την κλινική σοβαρότητα του νοσήματος.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος Covid-19 εμφανίστηκε στην πόλη Wuhan στα τέλη Δεκεμβρίου 2019 και αποτελεί ένα νόσημα που άλλαξε την παγκόσμια ιστορία. Μέχρι σήμερα έχουν προσβληθεί πάνω από 185 εκ. άνθρωποι ενώ το ποσοστό θνητότητας ανέρχεται στο 2-3%. Η συμπτωματολογία των ασθενών ποικίλλει από ασυμπτωματικούς έως ασθενείς με βαριά αναπνευστική ανεπάρκεια ακόμη και θάνατο. Τα συμπτώματα που αναφέρουν συχνότερα οι ασθενείς είναι βήχας, κόπωση, ανορεξία, πυρετός, μυαλγίες, δύσπνοια, ανοσμία και αγευσία. Κάποιες από τις πιο σοβαρές επιπλοκές της νόσου αποτελούν το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, η σοβαρή λοίμωξη των πνευμόνων και το σηπτικό σοκ.

Η νόσος αυτή οφείλεται στον ιό SARS-CoV 2 ο οποίος μεταδίδεται τόσο άμεσα μέσω αναπνευστικών σταγονιδίων όσο και έμμεσα από την επαφή με μολυσμένα αντικείμενα. Ο ιός αυτός φέρει ως γενετικό υλικό ένα μονόκλωνο RNA (+) και για το λόγο αυτό έχει την ικανότητα να εξελίσσεται ταχέως. Το μέγεθος του γονιδιώματος είναι περίπου 29,9 Kb και κωδικοποιεί τόσο για δομικές όσο και για μη δομικές πρωτεΐνες. Μία από τις πιο σημαντικές δομικές πρωτεΐνες του ιού είναι η πρωτεΐνη Spike (S) η οποία διαθέτει μία περιοχή μέσω της οποίας ο ιός έχει την ικανότητα να προσδένεται στα κύτταρα του ξενιστή.

Ο ιός μετά την είσοδο του στον ξενιστή, έρχεται αντιμέτωπος με το ανοσοποιητικό του σύστημα που περιλαμβάνει ένα δίκτυο κυττάρων, ιστών και οργάνων. Αρχικά ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας οι οποίοι στη συνέχεια θα ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς της ειδικής ανοσίας. Κατά τη διαδικασία αυτή ενεργοποιούνται μονοπάτια μεταγωγής σήματος που οδηγούν στην ενεργοποίηση γονιδίων ιντερφερονών, κυτοκινών και χημειοκινών. Στους ασθενείς με τη νόσο Covid-19 χαρακτηριστικό είναι το σύνδρομο υπερέκκρισης κυτταροκινών το οποίο προκαλείται από μία ανεξέλεγκτη ανοσολογική απάντηση λόγω υπερενεργοποίησης μακροφάγων και μονοκυττάρων.

Το πιο σημαντικό βήμα για την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης έναντι του ιού αποτελεί η αναγνώριση του απο υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs). Μία κατηγορία υποδοχέων η οποία αλληλεπιδρά με τον ιό SARS-Cov 2 αποτελούν οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) η ενεργοποίηση των οποίων οδηγεί στην

παραγωγή προφλεγμονοδών κυτταροκινών μέσω 2 διαφορετικών οδών σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών ενισχύεται σημαντικά από βοηθητικές πρωτεΐνες. Μία απ' αυτές είναι η πρωτεΐνη CD14 η οποία αποτελεί υποδοχέα αναγνώρισης προτύπων (PRR) και ενισχύει την έμφυτη ανοσοαπόκριση ευαισθητοποιώντας τα κύτταρα του ξενιστή σε μικροβιακά προϊόντα όπως το βακτηριακό πολυσακχαρίτη LPS. Το γονίδιο CD14 εκφράζεται σε κύτταρα της μυελικής σειράς και κυρίως σε μονοκύτταρα και μακροφάγα καθώς και σε ουδετερόφιλα.

Ο πολυμορφισμός rs2569190 εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου CD14 και αφορά την αντικατάσταση της θυμίνης (t) από κυτοσίνη (c). Έχει συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες όπως αυτοάνοσα νοσήματα (αρθρίτιδα, θυρεοειδίτιδα κ.α.), νόσους της καρδιάς (καρδιομυοπάθεια, έμφραγμα του μυοκαρδίου) και του ήπατος (αλκοολική νόσος και ανάπτυξη κίρρωσης, ατρησίας των χοληφόρων κ.α.). Επίσης βιβλιογραφικά αναφέρεται η συσχέτισή του με ιικές και βακτηριακές λοιμώξεις όπως φυματίωση, αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV) και χρόνια ηπατίτιδα C. Πρόσφατη έρευνα (Abhijit Pati et al) αναφέρει ότι το αλληλόμορφο 'T' καθώς και ο γονότυπος - TT συσχετίστηκαν με υψηλότερα επίπεδα sCD14 καθώς και ότι υπάρχει μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στο αλληλόμορφο 'T', τη μόλυνση από τον SARS-Cov-2 και τη θνητότητα της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όπου η ύπαρξη του πολυμορφισμού δε συσχετίστηκε με σοβαρότερη κλινική εικόνα της νόσου.

Πιο αναλυτικά, στην εργασία αυτή συμμετείχαν 264 ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας τα 42,8 έτη εκ των οποίων οι 180 ήταν άνδρες και οι 84 γυναίκες. Οι ασθενείς κατατάχθηκαν σε 5 ομάδες σύμφωνα με τη σοβαρότητα της νόσου καθώς και τη συνοσυρότητα με ασθένειες όπως η παχυσαρκία, χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις κ.α. Όλα τα άτομα που μελετήθηκαν, ελέγχθηκαν για την παρουσία του πολυμορφισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενετικού υλικού από περιφερικό αίμα των ασθενών, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου CD14 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τους εκκινητές. Τέλος έγινε πέψη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης και φωτογράφιση της γέλης υπό υπεριώδες φως (UV). Από τους 264 ασθενείς οι 65 ήταν ομόζυγοι, οι 131 ετερόζυγοι

ενώ οι 68 δεν έφεραν τη σημειακή μετάλλαξη σε κανένα από τα 2 αλληλόμορφα του γονιδίου.

Ο πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί βιβλιογραφικά με καρδιαγγειακά νοσήματα. Συγκεκριμένα, οι Xu et al. αναφέρουν ότι ο πολυμορφισμός αυτός συμβάλλει σημαντικά στην ευαισθησία και την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου (CVD) και ιδιαίτερα στον πληθυσμό της Ανατολικής Ασίας και τον υπότυπο CHD (Coronary Heart Disease). Στην ίδια εργασία επίσης αναφέρεται ότι παρατηρήθηκε μία πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού με τον υπότυπο AMI (Acute Myocardial Infarction) της CVD. Επιπλέον, οι Costa et al. αναφέρουν ότι ο πολυμορφισμός σχετίζεται με ευαισθησία στην ανάπτυξη καρδιομυοπάθειας Chagas η οποία πιθανώς συνδέεται με το φλεγμονώδες προφίλ των μονοκυττάρων CD14. Ο ρόλος του πολυμορφισμού στην εμφάνιση νοσημάτων της καρδιάς μελετήθηκε επίσης και στην εργασία των Zhao et al. οι οποίοι παρατήρησαν αυξημένη ευαισθησία για εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ασιατικούς πληθυσμούς όχι όμως σε καυκάσιους. Η συσχέτιση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε στη μελέτη μας καθώς δεν υπήρξε στατιστική σημαντικότητα.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις όσον αφορά την εκδήλωση κόπωσης στην οποία ο πολυμορφισμός δρα προστατευτικά καθώς και αγευσίας. Στη βιβλιογραφία δεν έχουν αναφερθεί παρόμοια ευρήματα.

Συμπερασματικά, ο πολυμορφισμός αυτός δε φάνηκε να έχει αξία όσον αφορά την πρόγνωση ασθενών με τη νόσο Covid-19.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bayati A., Kumar R., Francis V., & McPherson P. S. (2021). SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100306. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100306>
2. Belouzard S., Millet J. K., Licitra B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011–1033. <https://doi.org/10.3390/v4061011>
3. Costa G. C., Rocha M. O., Souza P. E. A. , Melo D. F. S., Moreira P. R., Gollob K. J., Nunes M., & Dutra W. O. (2020). CD14 genotype and functional dichotomy of CD14+ and CD14- cells are associated with activated immune response and development of Chagas dilated cardiomyopathy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e200110. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200110>
4. Cox G. (2020). Further Reading. *How to Be Good*, 343–347. <https://doi.org/10.5040/9781350068407.0006>
5. Tali S.H.S., LeBlanc J.L., Sadiq Z., Oyewunmi O.D., Camargo C., Nikpour B., Armanfard N., Sagan S.M. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*. (2021) 34: e00228-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00228-20>.
6. Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng B. J., & Jiang S. (2009). The spike protein of SARS-CoV - A target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 226–236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>
7. T. Mason, L. Ricks-Santi, W. Chen, V. Apprey, J. Joykutty, C. Ahaghotu, R. Kittles, G. Bonney, G. M. Dunston. Association of CD14 Variant With Prostate Cancer in African American Men. NIH Public Access. 2010 February 15; 70(3): 262–269. doi:10.1002/pros.21060
8. Järveläinen H. A., Orpana A., Perola M., Savolainen V. T., Karhunen P. J., & Lindros K. O. (2001). Promoter polymorphism of the CD14 endotoxin receptor gene as a risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*, 33(5), 1148–1153. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.24236>

9. Jia X., Wang B., Yao Q., Li Q., & Zhang J. (2019). Variations in CD14 gene are associated with autoimmune thyroid diseases in the Chinese population. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00811>
10. Kelley S. L., Lukk T., Nair S. K., & Tapping R. I. (2013). The Crystal Structure of Human Soluble CD14 Reveals a Bent Solenoid with a Hydrophobic Amino-Terminal Pocket. *The Journal of Immunology*, *190*(3), 1304–1311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202446>
11. Khanmohammadi S., & Rezaei N. (2021). Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *Journal of Medical Virology*, *93*(5), 2735–2739. <https://doi.org/10.1002/jmv.26826>
12. Kumar S., Nyodu R., Maurya V. K., & Saxena S. K. (2019). *Morphology , Genome Organization , Replication , and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*. *2*, 23–31.
13. Lien E., Aukrust P., Sundan A., Müller F., Frøland S. S., & Espevik T. (1998). Elevated Levels of Serum-Soluble CD14 in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Infection: Correlation to Disease Progression and Clinical Events. *Blood*, *92*(6), 2084–2092. <https://doi.org/10.1182/blood.v92.6.2084>
14. Lin Z., Xie X., Lin H., Fu M., Su L., Tong Y., Chen H., Wang H., Zhao J., Xia H., Zhang Y., & Zhang R. (2018). Epistatic Association of CD14 and NOTCH2 Genetic Polymorphisms with Biliary Atresia in a Southern Chinese Population. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *13*(December), 590–595. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.10.006>
15. Lionetto F., Pappadà S., Buccoliero G., Maffezzoli A., Marszałek Z., Sroka R., Stencel M., Buser Y. M., Grouve W. J. B., Vrugink E., Sacchetti F., Akkerman R., Rudolf R., Mitschang P., Neitzel M., Xu X., Qiu J., Cheng J., Dhondt, M. C. (2020). CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ndteint.2014.07.001>
16. Lotfi M., Hamblin M. R., & Rezaei N. (2020). COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clinica Chimica Acta*, *508*(May), 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.044>

17. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Tan W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

18. Martin T. R., Wurfel M. M., Zanoni I., & Ulevitch R. (2020). Targeting innate immunity by blocking CD14: Novel approach to control inflammation and organ dysfunction in COVID-19 illness. *EBioMedicine*, 57, 102836. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102836>

19. Michlmayr D., Andrade P., Gonzalez K., Balmaseda A., & Harris E. (2017). CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nature Microbiology*, 2(11), 1462–1470. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0>

20. Naqvi A. A. T., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I. K., Singh A., Atif S. M., Hariprasad G., Hasan G. M., & Hassan M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *BBA Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878> Received

21. Rabaan A. A., Al-ahmed S. H., Haque S., Sah R., Tiwari R., Malik Y. S., Dhama K., Yatoo M. I., & Bonilla-aldana D. K. (2020). *a comparative overview*. 2002, 174–184.

22. Thevarajan I., & Buising Kirsty Cowie B. (2020). Clinical presentation and management of COVID-19 | The Medical Journal of Australia. *Medical Journal Of Australia*, April, 14.

23. Abhijit Pati, Sunali Padhi, Debarchan Panda, Subham Suvankar and Aditya K Panda. A cluster of differentiation 14 (CD14) polymorphism (C-159T rs2569190) is associated with SARS-CoV-2 infection and mortality in the

European population. Oxford University Press.
<https://academic.oup.com/jid/advancearticle/doi/10.1093/infdis/jiab180/6209441>

24. Wu, Z., Zhang, Z., Lei, Z., & Lei, P. (2019). CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 48(June), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.06.003>
25. Xu J., Liu K. , Ying Z. M., Zhu, X., Zhao P., Bai W. Y., Qiu M., Zhang, X., & Zheng, H. (2019). Effect of CD14 polymorphisms on the risk of cardiovascular disease: Evidence from a meta-analysis. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1018-3>
26. Yuan F., Boehm I., Chan P. K. , Marks K., Tang J. W., Hui D. S. C., Sung J. J. Y., Dyer W. B., Geczy A. F., & Sullivan J. S. (2007). High prevalence of the CD14-159CC genotype in patients infected with severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(12), 1644–1645. <https://doi.org/10.1128/CVI.00100-07>
27. Zanoni I., & Granucci F. (2012). Regulation and dysregulation of innate immunity by NFAT signaling downstream of pattern recognition receptors (PRRs). *European Journal of Immunology*, 42(8), 1924–1931. <https://doi.org/10.1002/eji.201242580>
28. Zanoni I., & Granucci F. (2013). Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(JUL), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00032>
29. Zanoni I., Ostuni R., Marek L. R., Barresi S., Barbalat R., Barton G. M., Granucci F., & Kagan J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. *Cell*, 147(4), 868–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051>
30. Zhang Q., Xiang R., Huo S., Zhou Y., Jiang S., Wang Q., & Yu F. (2021). Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1).

<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>

31. Zhao E., Wang C., Xie H., Du Y., & Zhang Y. (2019). Association between the CD14-260C>T gene polymorphism and susceptibility to myocardial infarction: Evidence from case-control studies. *International Journal of Immunogenetics*, 46(6), 419–426. <https://doi.org/10.1111/iji.12445>
32. Zhu W., Deng Y., & Zhou X. (2018). Multiple Membrane Transporters and Some Immune Regulatory Genes are Major Genetic Factors to Gout. *The Open Rheumatology Journal*, 12(1), 94–113. <https://doi.org/10.2174/1874312901812010094>