



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Συσχετίσεις του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8* με την πρόγνωση ασθενών με COVID-19

Ασβεστοπούλου Ευαγγελία του Ιωάννη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ανοσολογία-Ανοσογενετική

Λάρισα, Ελλάδα Νοέμβριος 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE

MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

TITLE: Rs2043211 polymorphism and prognosis of COVID-19

By

Asvestopoulou Evangelia

Examining Committee:

- Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases
- Peteinaki Efthimia, Professor of Medical Biopathology & Clinical Microbiology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Immunology-Immunogenetics

Larissa, Greece November 2022

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
Γενικό μέρος.....	8
A. Εισαγωγή.....	9
A.1 SARS-CoV-2.....	9
A.1.1 Γενικές πληροφορίες.....	9
A.1.2 Προέλευση και Ανάπτυξη.....	9
A.1.3 Ανίχνευση ιού.....	12
A.1.3.1 Μοριακή μέθοδος.....	12
A.1.3.2 Ανίχνευση αντιγόνου.....	12
A.1.3.3 Ορολογική μέθοδος.....	13
A.1.4 Μετάδοση.....	13
A.1.5 Κλινικά χαρακτηριστικά-Συμπτωματολογία.....	13
A.1.6 Μηχανισμός ανοσιακής απάντησης στον SARS-CoV-2.....	14
A.2 Φλεγμονόσωμα.....	15
A.2.1 NLRP3.....	16
A.2.1.1 NLRP3 και COVID-19.....	18
A.3 CARD8.....	19
A.3.1 Ρόλος <i>CARD8</i>	20
A.3.2 Πολυμορφισμός rs2043211.....	21
B. Σκοπός.....	22
Ειδικό μέρος.....	23
A. Υλικά και Μέθοδοι	24
A.1 Άτομα που μελετήθηκαν.....	24
A.2 Μεθοδολογία.....	26
A.2.1 Απομόνωση DNA.....	26
A.2.2 PCR.....	27
A.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%.....	28
A.2.4 Πέψη.....	29
A.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 3%.....	30

A.2.6 Αλληλούχηση προϊόντων PCR.....	30
A.2.6.1 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	31
A.2.6.2 Αλληλούχηση.....	31
A.2.7 Βιοστατιστική ανάλυση.....	32
B. Αποτελέσματα.....	33
B.1 Επίδραση του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου <i>CARD8</i> στους ασθενείς της μελέτης..	33
B.2 Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου <i>CARD8</i> με τον κλινικό φαινότυπο ασθενών με Covid-19.....	33
Γ. Συζήτηση.....	40
Δ. Βιβλιογραφία	42

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021 υπό την επίβλεψη του κ. Σπελέτα Ματθαίου, Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής Π.Θ.

Ο κ. Σπελέτας είναι και το πρώτο άτομο που θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας. Πάντοτε ήταν πρόθυμος για συζήτηση και εύρεση λύσεων σε προβλήματα που προέκυπταν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Η γενικότερη στάση και αντιμετώπιση του και η αγάπη του για το συγκεκριμένο αντικείμενο δημιουργούσε ένα ευχάριστο και άνετο κλίμα.

Θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια κ. Πετεινάκη Ευθυμία και στον Καθηγητή, Μπόγδανο Δημήτρη, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην κ. Ραφτοπούλου Σοφία, η οποία με ανέλαβε από την αρχή και με καθοδηγούσε σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες μέχρι το τέλος της διπλωματικής μου. Ότι έμαθα σε εργαστηριακό πλαίσιο, οφείλεται πραγματικά στις γνώσεις που μου μετέδωσε αυτό τον ένα χρόνο. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας. Με την καλή τους διάθεση και όρεξη για αυτό που κάνουν συνεισέφεραν στη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος στο εργαστήριο.

Οφείλω να ευχαριστήσω τα κέντρα που βοήθησαν στην συλλογή των δειγμάτων. Αρχικά, το Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής Π.Θ., με διευθυντή τον Καθηγητή κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, που βοήθησε στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Η συνδρομή της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ ήταν πολύ αξιοσημείωτη. Επίσης, σημαντική ήταν η συμβολή των μελών του ΕΟΔΥ που συνέλεξαν και κατέγραψαν μέρος των δειγμάτων από ασθενείς του κρουαζιερόπλοιου «Ελευθέριος Βενιζέλος».

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ψυχολογική στήριξη και την συμπαράσταση τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεγαλύτερη πρόκληση των τελευταίων χρόνων ήταν η πανδημία από τον ιό SARS-CoV-2 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19). Η νόσος εκδηλώνεται σε ένα ευρύ φάσμα κλινικού φαινοτύπου, που περιλαμβάνει ασυμπτωματικούς ή με ήπια/μέτρια συμπτώματα ασθενείς, έως σοβαρή/κρίσιμη νόσο, που οδηγεί στο θάνατο. Κατά τη μόλυνση από τον SARS-CoV-2, ενεργοποιείται το φλεγμονόσωμα, από την παρουσία του ιού μέσα στα κύτταρα-ξενιστές, οπότε είναι σημαντική η αναζήτηση παραγόντων που επηρεάζουν τον φαινότυπο της νόσου. Στην παρούσα μελέτη, σε ασθενείς με νόσο COVID-19 διερευνήσαμε την ύπαρξη του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8*, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν σχετίζεται με την εκδήλωση βαριάς νόσου COVID-19 και εάν επηρεάζει την έκβασή της. Διακόσιοι εξήντα τέσσερις ασθενείς (180 άνδρες/84 γυναίκες, μέση ηλικία \pm SD: 42.8 \pm 18.4 χρόνια, διάμεση ηλικία 51,5 έτη, ηλικιακό εύρος 11-89 έτη) αναλύθηκαν για την παρουσία του πολυμορφισμού rs2043211 (c.304T >A) του γονιδίου *CARD8*. Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR-RFLP με τη χρήση του ενζύμου MboI. Διαπιστώθηκε ότι 103 ασθενείς ήταν άτομα αγρίου-τύπου (γονότυπος TT), 130 ετερόζυγοι (γονότυπος TA) και 31 ομόζυγοι (γονότυπος AA) (συχνότητα A αλληλομόρφου 36,4%). Βρέθηκε ότι ασθενείς με μεγαλύτερη ηλικία και υποκείμενες συννοσηρότητες σχετίζονται με την παρουσία πυρετού, την ανάγκη για νοσηλεία και την ανάπτυξη πνευμονίας. Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι η παρουσία του αλληλίου A (rs2043211) συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένη επίπτωση πυρετού. Στη βάση των ευρημάτων μας, ο πολυμορφισμός (c.304T>A) του γονιδίου *CARD8* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός προγνωστικός δείκτης ανάπτυξης πυρετού σε ασθενείς με Covid-19.

ABSTRACT

The biggest challenge of recent years has been the SARS-CoV-2 pandemic (Coronavirus Disease 2019, COVID-19). The disease manifests in a wide spectrum of clinical phenotype, including asymptomatic or mildly/moderately symptomatic patients to severe/critical disease, leading to death. Upon SARS-CoV-2 infection, the inflammasome is activated by the presence of the virus inside host cells, so the search for factors that influence the disease phenotype is important. In the present study, we investigated the presence of the polymorphism in the *CARD8* gene (rs2043211) in patients with COVID-19 disease, in order to determine whether it is associated with the onset of severe COVID-19 disease and whether it affects its outcome. Two hundred sixty four patients (180 men/84 women, age \pm SD: 42.8 ± 18.4 years, median age 51.5 years, age range 11-89 years) were analyzed for the presence of the polymorphism in the *CARD8* gene (rs2043211, T>A). The presence of the genetic polymorphism was detected by RCR-RFLP analysis by using the MboI enzyme. We ascertain 103 wild-type patients (TT genotype), 130 heterozygous (TA genotype) and 31 homozygous (AA genotype) (allele A frequency 36.4%). It is found that patients with older age and underlying comorbidities, were associated with the presence of fever, the need for hospitalization, and the development of pneumonia. Moreover, we found that the presence of A allele in the *CARD8* polymorphism (rs2043211) was significantly associated with an increased incidence of fever. Based on our research findings, the *CARD8* gene polymorphism (c.304T>A) can be used as a molecular predictor of fever development in Covid-19 patients.

Γενικό μέρος

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 SARS-CoV-2

Τον Δεκέμβριο του 2019 σημειώθηκε σημαντικός αριθμός κρουσμάτων με πνευμονία στην πόλη Wuhan της επαρχίας Χουμπέι στην Κίνα, χωρίς να έχει καθοριστεί η αιτία της ραγδαίας εμφάνισης αυτών. Αφού η κατάσταση χαρακτηρίστηκε κρίσιμη από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), βρέθηκε ότι η έξαρση της νόσου οφείλεται σε ένα νέο στέλεχος κορονοϊού, που ονομάστηκε SARS-CoV-2 και προκαλεί την νόσο Coronavirus Disease-2019 (COVID-19) (1). Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, μέχρι σήμερα, 611.630.657 άνθρωποι έχουν προσβληθεί από τον ιό και 6.507.962 έχουν χάσει τη ζωή τους.

Λόγω της εξάπλωσης του ιού σε όλο τον κόσμο, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χαρακτήρισε την κατάσταση ως πανδημία. Όλα τα παραπάνω, κέντρισαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και την ώθησαν να μελήτησει τον ιό, για την αντιμετώπιση της πανδημίας.

A.1.1 Γενικές Πληροφορίες

Οι κορονοϊοί ανήκουν στην οικογένεια Coronaviridae και χωρίζονται σε 4 διαφορετικές ομάδες: α-CoV, β-CoV, γ-CoV και δ-CoV. Οι δύο πρώτοι, α και β, προσβάλλουν θηλαστικά, και συγκεκριμένα οι β-CoV είναι γενετικά παρόμοιοι με τους ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Οι άλλες δύο ομάδες, γ-CoV και δ-CoV προσβάλλουν πτηνά (2,3).

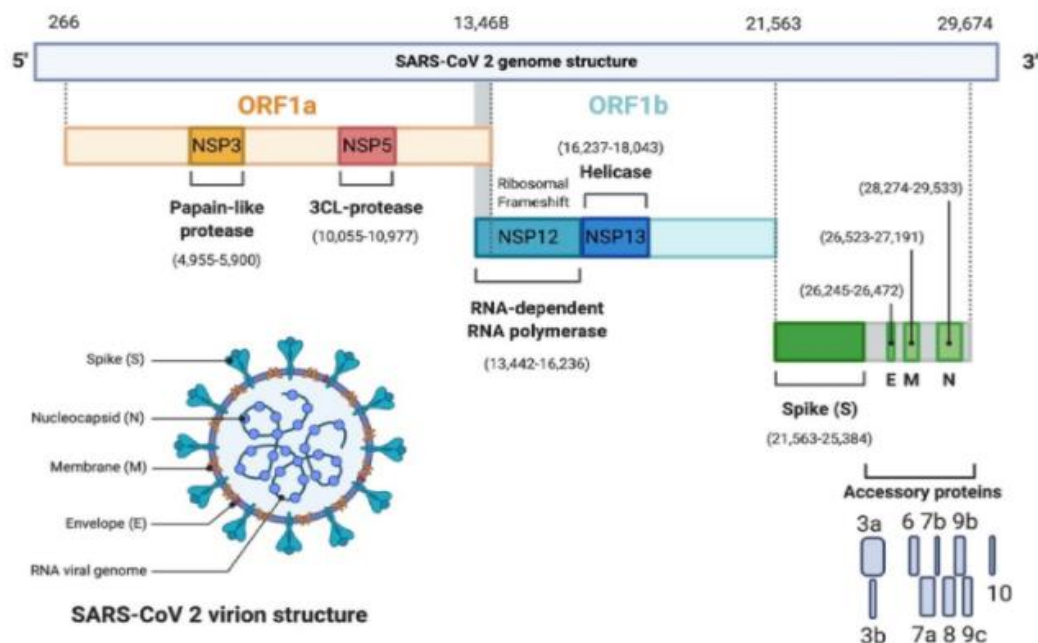
Ο SARS-CoV-2 ανήκει στους β-κορονοϊούς και προκαλεί σοβαρά προβλήματα στο αναπνευστικό σύστημα. Επίσης, έχει παρατηρηθεί η ομοιότητα του SARS-CoV-2 με τον SARS-CoV κατά 79,5% και με τον MERS-CoV (Middle Eastern Respiratory Virus) κατά 50% (2,3).

A.1.2 Προέλευση και Ανάπτυξη

Μελέτες έδειξαν ότι ο SARS-CoV-2 προέρχεται από νυχτερίδες, αφού το γονιδίωμα του παρουσιάζει υψηλή γενετική ομοιότητα με το γονιδίωμα του κορονοϊού νυχτερίδας (~96%), και πιο συγκεκριμένα με τον ιό των νυχτερίδων RaTG13 (4-6). Ειδικά, παρουσιάζει ομοιότητα στην νουκλεοτιδική αλληλουχία της πρωτεΐνης-ακίδας (πρωτεΐνη S, Spike), μια πρωτεΐνη που απαιτείται για την πρόσδεση του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, σε ποσοστό 93% (7,8). Παρόλα αυτά, η υψηλή ομοιότητα της περιοχής πρόσδεσης στην Spike πρωτεΐνη του SARS-CoV-2 με

αυτή του κορονοϊού των παγκολίνων, μπορεί να σημαίνει ότι οι παγκολίνοι αποτέλεσαν τους ενδιάμεσους ξενιστές στην μετάδοση του ιού (5,7).

Το γονιδίωμα του ιού είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας με μέγεθος 29.800 - 29.900 βάσεις (2,9). Στο γονιδίωμα περιλαμβάνονται 11 λειτουργικά ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (Open Reading Frames-ORFs), που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες ευθύνονται για τον πολλαπλασιασμό του ιού (10). Τέσσερις είναι οι βασικές δομικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του ιού, η πρωτεΐνη Spike, η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (N, Nucleocapsid), η διαμεμβρανική πρωτεΐνη (M, Membrane) και η πρωτεΐνη του φακέλου (E, Envelope) (Εικόνα 1) (3,10). Η πρωτεΐνη Spike μεσολαβεί για την προσκόλληση και τη σύντηξη μεταξύ του ιού και της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή (10).



Εικόνα 1 : Η δομή του SARS-CoV-2 και η αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιεί.

Από : Alanagreh L, Alzoughool F, Atoum M. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens*. 2020, 9(5):331.

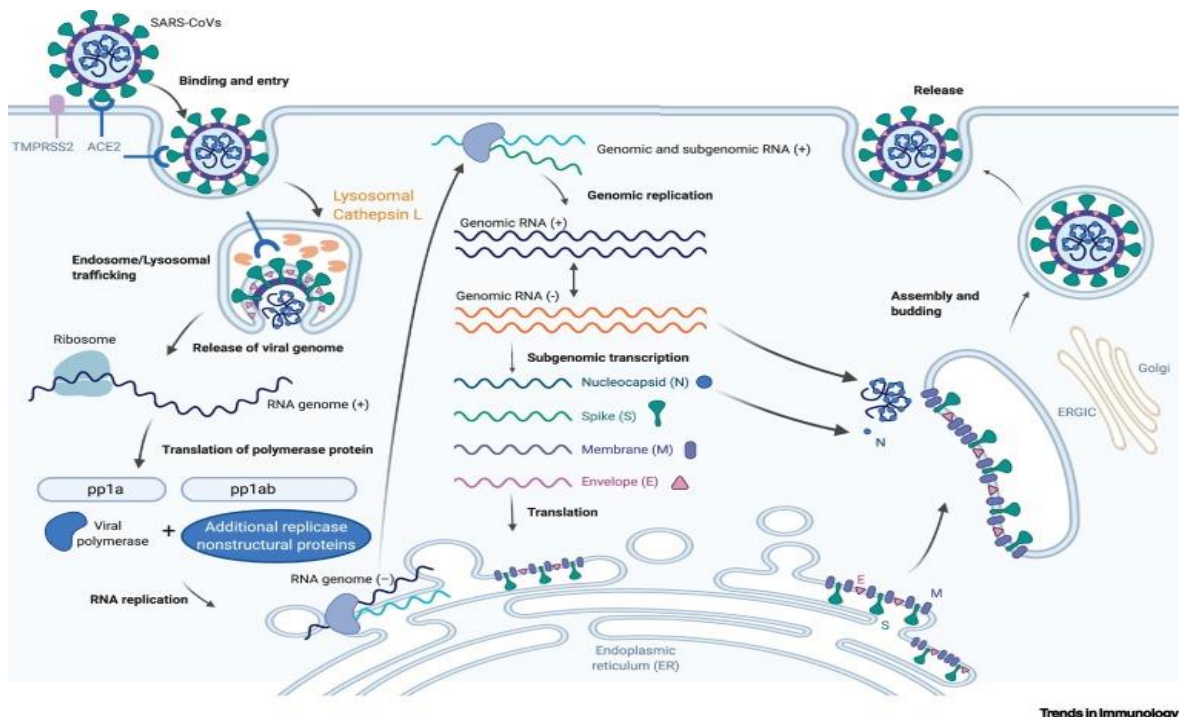
Πρωτεΐνη Spike

Η πρωτεΐνη Spike, με μέγεθος 180-200 kDa, προσδίδει το χαρακτηριστικό σχήμα της κορώνας. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία ευθύνεται για την πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή και αποτελείται από 2 υπομονάδες, τις S1 και S2 (1,8). Η υπομονάδα S1 εμπεριέχει την περιοχή δέσμευσης στον υποδοχέα (RBD, receptor-binding domain), μέσω της

οποίας ο ιός συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα-στόχο του. Ο υποδοχέας RBD της υπομονάδας S1 συνδέεται με τον κυτταρικό υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2, Angiotensin-converting enzyme 2) στην περιοχή της αμινοπεπτιδάσης N. Με αυτήν την σύνδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς σηματοδοτείται η έναρξη της μόλυνσης από τον ιό. Η υπομονάδα S2 είναι υπεύθυνη για τη σύντηξη της ιϊκής μεμβράνης με τη μεμβράνη του ξενιστή και τελικά την είσοδο του ιού στο κύτταρο (8).

Με την σύνδεση της πρωτεΐνης S με τον υποδοχέα ACE2, ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο, πυροδοτώντας την έναρξη της μόλυνσης. Πιο συγκεκριμένα, πρωτεάσες, όπως η διαμεμβρανική πρωτεάση της σερίνης 2 (transmembrane protease serine 2, TMPRSS2), προκαλούν τροποποιήσεις στην περιοχή S2 της πρωτεΐνης S, με αποτέλεσμα να απελευθερώνει την περιοχή RBD της υπομονάδας S1 και να εκτέθει το πεπτιδίο σύντηξης. Αυτό συνεπάγεται τη σύντηξη των μεμβρανών ιού και ξενιστή, και την μετέπειτα είσοδο του ιϊκού γονιδιώματος στο κύτταρο και την έναρξη του πολλαπλασιασμού του. Μέσω της δέσμησης της πρωτεΐνης N στο ιϊκό RNA, σχηματίζεται το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο και στη συνέχεια οδηγεί στο σχηματισμό ιϊκών σωματιδίων.

Αυτά τα σωματίδια μεταφέρονται κοντά στην κυτταρική επιφάνεια μέσω κυστιδίων και τέλος, εξωκυτταρώνονται (Εικόνα 2) (11).



Εικόνα 2 : Η είσοδος και ο πολλαπλασιασμός του SARS-CoV-2

Από : Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends Immunol. 2020, 41(12):1100-1115.

A.1.3 Ανίχνευση ιού

Τρεις είναι οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να ανιχνευθεί ο ιός στο ανθρώπινο σώμα. Αυτές είναι : η μοριακή μέθοδος, η ανίχνευση αντιγόνου και η ορολογική μέθοδος (12). Αν και όλες αυτές οι μέθοδοι αποσκοπούν στην αποτελεσματική ανίχνευση του ιού, διαφέρουν ως προς το επίπεδο αποτελεσματικότητας.

A.1.3.1 Μοριακή Μέθοδος

Η αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) είναι μια από τις πιο συχνές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ιού. Το δείγμα μπορεί να συλλεχθεί με ρινοφαρυγγικό ή στοματοφαρυγγικό στυλέο. Η μέθοδος RT-PCR συνδυάζει αντίστροφη μεταγραφή ριβονουκλεϊκού οξέος (cRNA) σε συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA). Αυτή η δοκιμή έχει αυστηρές εργαστηριακές προδιαγραφές και απαιτεί περισσότερο χρόνο από τις άλλες μεθόδους (13).

Ο ιός μπορεί να ανιχνευθεί 48 ώρες πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων και συνήθως όχι σε περισσότερο από 14 ημέρες. Επίσης, η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει ευαισθησία πάνω από 92% και εξειδίκευση πάνω από 95% (12).

A.1.3.2 Ανίχνευση Αντιγόνου

Η μέθοδος των διαγνωστικών τεστ ταχείας ανίχνευσης αντιγόνων (Rapid Tests) είναι εύκολη και απλή, γιατί στηρίζεται στη χρήση δοκιμών πλευρικής ροής (Lateral Flow Assay, LFA), που έχουν χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση και σε άλλες μολυσματικές ασθένειες παλαιότερα (12).

Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ενός kit, που περιλαμβάνει μια συσκευή με μια ταινία νιτρογλυκερίνης, εμποτισμένη με αντισώματα έναντι των ιικών πρωτεϊνών και δύο λωρίδες σταθερών αντισωμάτων, οι οποίες αλλάζουν χρώμα παρουσία του συζευγμένου αντιγόνου-στόχου στη μία και του συζευγμένου μάρτυρα στη δεύτερη. Το δείγμα που χρησιμοποιείται στο kit μπορεί να είναι ρινοφαρυγγικό επίχρισμα, στοματοφαρυγγικό επίχρισμα ή σάλιο και τοποθετείται στην ειδική θέση, αφού αναμειχθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα του kit.

Τα αποτελέσματα είναι πολύ γρήγορα με την συγκεκριμένη μέθοδο, αφού βλέπουμε την αλλαγή στο χρώμα των λωρίδων σε λιγότερο από 5 λεπτά. Η μέθοδος παρουσιάζει ευαισθησία πάνω από 80% και ειδικότητα πάνω από 97% (12).

A.1.3.3 Ορολογική Μέθοδος

Η τρίτη μέθοδος για την ανίχνευση του ιού περιλαμβάνει την ανίχνευση της παρουσίας IgG, IgM ή IgA έναντι των ιικών πρωτεϊνών και πραγματοποιείται κυρίως με την μέθοδο ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ή με μικροσωματιδιακή ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας (CMIA, Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) (12).

Η μέθοδος ELISA παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία, πάνω από 90%, αφού παρέλθουν 14 μέρες από την στιγμή που μολύνθηκε ο ασθενής. Επίσης, είναι ακόμα αμφίβολο κατά πόσο μειώνονται οι αποκρίσεις των αντισωμάτων με την πάροδο του χρόνου (12). Αν και η μέθοδος ELISA εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τις μεθόδους χημειοφωταύγειας, το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει με την ειδικότητα, αφού οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας εμφανίζουν υψηλότερες τιμές. Τέλος, οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ένας τρόπος διαλογής των αντισωμάτων IgG κατά του ιού SARS-CoV-2, ενώ η μέθοδος ELISA για την αξιολόγηση και παρακολούθηση ήδη επιβεβαιωμένων ασθενών με COVID-19 (14).

A.1.4 Μετάδοση

Η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο γίνεται μέσω της άμεσης επαφής μεταξύ τους, με τις επαφές με μεταφερόμενες μεταδόσεις αερολυμάτων στον αέρα, αλλά και μέσω ιατρικών διαδικασιών. Η εξάπλωση του ιού μπορεί να γίνει μέσω του βήχα, του φτερνίσματος, της εισπνοής σταγονιδίων ή με την επαφή με τους βλεννογόνους του στόματος, της μύτης και των ματιών. Επιπλέον, μετάδοση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της αναπνευστικής οδού, του σάλιου, των κοπράνων και των ούρων (10). Μετάδοση πιθανόν να πραγματοποιηθεί και μέσω του πλακούντα, από έγκυες μητέρες στα νεογνά τους, σε περίπτωση που αυτές έχουν προσβληθεί από τον ιό (1).

A.1.5 Κλινικά χαρακτηριστικά-Συμπτωματολογία

Σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί με τον ιό SARS-CoV-2, τα κλινικά χαρακτηριστικά ποικίλλουν από άτομο σε άτομο. Οι ασθενείς παρουσιάζουν ήπια έως σοβαρά συμπτώματα ή δεν παρουσιάζουν καθόλου συμπτώματα, ακόμα και αν ο ιός ανιχνεύεται στον οργανισμό τους και σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν στο θάνατο (11).

Τα συμπτώματα εκδηλώνονται εντός δύο ημερών έως δύο εβδομάδων μετά την έκθεση στον ιό. Τα κύρια συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, βήχα, δύσπνοια και κόπωση. Κάποια άλλα

συμπτώματα είναι η ρινόρροια, η παραγωγή πτυέλων, ο πονοκέφαλος, ο πονόλαιμος, η υποσμία και η υπογευσία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα άτομα μπορεί να εμφανίσουν σπάνια συμπτώματα, όπως διάρροια και έμετο. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις, τα άτομα μπορεί να χρειαστούν νοσηλεία, ακόμα και εισαγωγή στην μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Στα άτομα αυτά, η νόσος μπορεί να εξελιχθεί ταχύτατα και να προκαλέσει Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο (ARDS, Acute Respiratory Distress Syndrome), σηπτική καταπληξία, πολυοργανική ανεπάρκεια και δευτερογενείς λοιμώξεις, και έπειτα να οδηγήσει στο θάνατο σε σύντομο χρονικό διάστημα (15).

Τα συμπτώματα φαίνεται να σχετίζονται με την ηλικία των ασθενών, όπου όσο μεγαλύτερη η ηλικία τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα για σοβαρότερα συμπτώματα. Επίσης, ενώ οι νέοι και τα παιδιά είναι σπάνιο να εμφανίσουν σοβαρά συμπτώματα, σε μικρό ποσοστό (1-2%) μπορεί να εμφανίσουν σοβαρή νόσο (12).

Επιπλέον, η νόσος σε συνδυασμό με υποκείμενα νοσήματα μπορεί να οδηγήσει σε πιο σοβαρά συμπτώματα. Ασθένειες όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η καρδιαγγειακή νόσος, ο σακχαρώδης διαβήτης (τύπου 2), η παχυσαρκία, η χρόνια νεφρική νόσος, η δρεπανοκυτταρική νόσος και ο καρκίνος επιβαρύνουν την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Έτσι, στα ηλικιωμένα άτομα παρουσιάζονται υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, και ακόμα μεγαλύτερα ποσοστά σε αυτά τα άτομα που πάσχουν από κάποιο υποκείμενο νόσημα (11).

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

Καθώς ο ιός εισβάλλει στο κύτταρο, πυροδοτούνται διάφορες αντιδράσεις του ανοσιακού συστήματος, περιλαμβάνοντας τους μηχανισμούς φυσικής και χυμικής ανοσίας (16). Στα πρωταρχικά στάδια της λοίμωξης, ο ιός προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, μέσω της επικράτειας RBD της S γλυκοπρωτεΐνης του. Το ACE2 αναγνωρίζεται και συνδέεται ειδικά με την επικράτεια RBD. Το ACE2 χρησιμοποιείται από τον ιό ως κύριος υποδοχέας εισόδου (17). Η δέσμευση του ιού στον υποδοχέα του (ACE2) είναι απαραίτητη για την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, χωρίς όμως να είναι αρκετή για την πρόσβαση του στο κυτταρόπλασμα. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση της ιϊκής πρωτεΐνης S από τις διάφορες πρωτεάσες του ξενιστή, συνήθως από τη TMPRSS2, την καθεψίνη L (ενδοσωμική πρωτεάση) και τη φουρίνη (furin) και αποτελεί μια διαδικασία θεμελιώδους σημασίας για το στάδιο της σύντηξης (18). Η πρωτεόλυση λαμβάνει χώρα σε δύο θέσεις: στη θέση S1/S2, ώστε οι υπομονάδες S1 και S2 να διαχωριστούν και στη θέση S2', ώστε να αποκαλυφθεί το πεπτίδιο σύντηξης (19). Έπειτα, το πεπτίδιο σύντηξης εντίθεται στη μεμβράνη του κυττάρου του ξενιστή,

με αποτέλεσμα να αλλάζει η διαμόρφωση του, να συνδυάζονται η κυτταρική μεμβράνη με τη μεμβράνη του ιϊκού περιβλήματος και τέλος, να απελευθερώνεται το ιϊκό γονιδίωμα στο κυτταρόπλασμα (20).

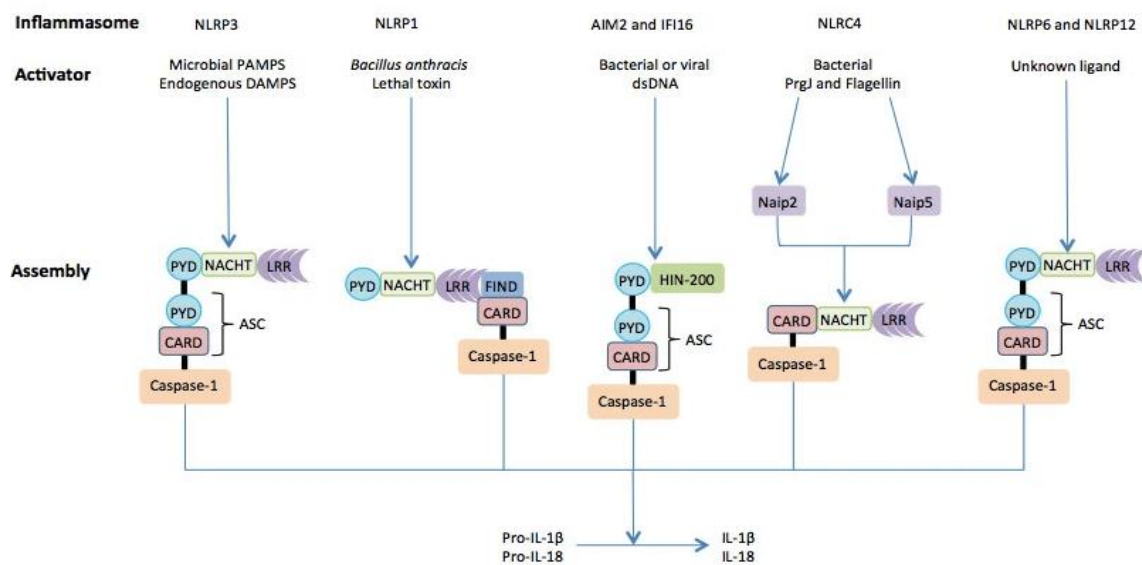
Ακολουθεί η μετάφραση του ιϊκού RNA από τα ριβοσώματα του κυττάρου-ξενιστή. Το ιϊκό γονιδίωμα περιέχει μια καλύπτρα στο 5' άκρο και μία πολύ(A) ουρά στο 3' άκρο του, που του επιτρέπουν την άμεση μετάφραση του και να λειτουργεί ως μόριο αγγελιαφόρου RNA (mRNA, messenger RNA). Τα ORF1a και ORF1b κωδικοποιούν δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πολυπρωτεΐνες, τις pp1a και pp1b, οι οποίες διασπώνται από ιϊκές πρωτεάσες, κωδικοποιούμενες από το ORF1a, για να παράγουν 16 δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το σύμπλεγμα RNA ρεπλικάσης-μεταγραφάσης (RTC, replicase transcriptase complex). Η σύνθεση ιϊκού RNA οδηγεί στην παραγωγή τόσο τα γονιδιωματικά, όσο και τα υπογονιδιωματικά RNA, τα οποία σχηματίζονται με τη δράση της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase), μέσω ενδιάμεσων αλυσίδων RNA αρνητικής πολικότητας (-RNA, negative-sense RNA). Τα μόρια υπογενωμικού RNA λειτουργούν ως μόρια mRNA για τις δομικές πρωτεΐνες S, N, M και E, καθώς και για διάφορες πρωτεΐνες που υποβοηθούν την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή (20).

Οι δομικές πρωτεΐνες S, M και E μεταφράζονται και εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER, Endoplasmic Reticulum), ενώ στο κυτταρόπλασμα το ιϊκό γονιδίωμα αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες N και πακετάρεται σε νουκλεοκαψίδια. Έπειτα, τα ιϊκά νουκλεοκαψίδια συνδέονται με τις δομικές πρωτεΐνες S, M και E, που βρίσκονται στις μεμβράνες του ενδιάμεσου διαμερίσματος ERGIC(ER-Golgi intermediate compartment) και σχηματίζουν τα ώριμα ιοσωμάτια. Τα νέα ιοσωμάτια μεταφέρονται στην επιφάνεια του μολυσμένου κύτταρα με κυστίδια και απελευθερώνονται με εξοκυττάρωση, με αποτέλεσμα να είναι ικανά να μολύνουν νέα κύτταρα (20).

A.2 ΦΛΕΓΜΟΝΟΣΩΜΑ

Τα φλεγμονοσώματα αποτελούν σύμπλοκα του έμφυτου ανοσιακού συστήματος, τα οποία ενεργοποιούνται κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή, με την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 (21, 22). Ο όρος χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός συμπλόκου υψηλού μοριακού βάρους, που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα διεγερμένων ανοσοκυττάρων. Μέχρι σήμερα, έχει επιβεβαιωθεί ότι πέντε πρωτεΐνες συναρμολογούν φλεγμονοσώματα, που ανάλογα με τη δομή τους, διαχωρίζονται στους υποδοχείς τύπου NOD (Nucleotide-binding domain-like receptors-NLRs) και περιλαμβάνουν τα μέλη της οικογένειας NLRP1, NLRP3 και NLRC4, τους

υποδοχείς ALRs, που αποτελούν πρωτεΐνες που απουσιάζουν στο μελάνωμα 2 (AIM2) (Absent in melanoma 2-like receptors) και στην πυρίνη (23). Η αναγνώριση του φλεγμονώδους συνδέτη έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του αισθητήρα, τον ολιγομερισμό και τη στρατολόγηση μιας πρωτεΐνης προσαρμογέα γνωστής ως ASC, η οποία αποτελείται από δύο περιοχές: την περιοχή PYD και την περιοχή στρατολόγησης κασπάσης (Caspase-associated recruitment domain, CARD) (23). Αυτές οι δύο περιοχές βοηθούν στην σύνδεση του αισθητήρα του φλεγμονοσώματος με την κασπάση-1 (23). Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων οδηγεί σε σχηματισμό του φλεγμονοσώματος, στην κατ' επέκταση έκκριση των IL-1 β και IL-18 και τέλος στην πυρόπτωση, μια λυτική μορφή κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 3) (24). Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος είναι αυτός, του φλεγμονοσώματος NLRP3.



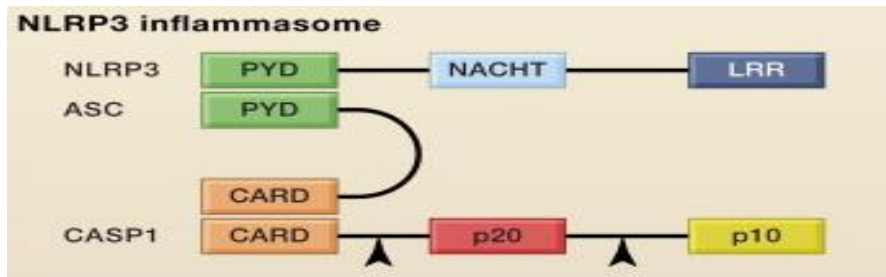
Εικόνα 3 : Ενεργοποίηση διαφορετικών τύπων φλεγμονοσωμάτων

Από : Turner, C.M., Arulkumaran, N., Singer, M. et al. Is the inflammasome a potential therapeutic target in renal disease?. BMC Nephrol. 2014, 15:21.

A.2.1 NLRP3

Το NLRP3 φλεγμονόσωμα ανήκει στην οικογένεια των NLRs και αποτελεί ένα τριμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Αυτό το σύμπλοκο περιλαμβάνει το αμινο-τελικό άκρο που αποτελείται από μια περιοχή πυρίνης (PYD), την περιοχή NACHT, η οποία είναι μία περιοχή πρόσδεσης και ολιγομερισμού νουκλεοτιδίων και μια καρβοξυ-τελική περιοχή LRR (Leucine-rich repeat), η οποία είναι απαραίτητη για την αυτορύθμιση. Η περιοχή NACHT επιτρέπει την ενεργοποίηση του συμπλέγματος σηματοδότησης, μέσω ολιγομερισμού εξαρτώμενου από ATP. Η διαδικασία

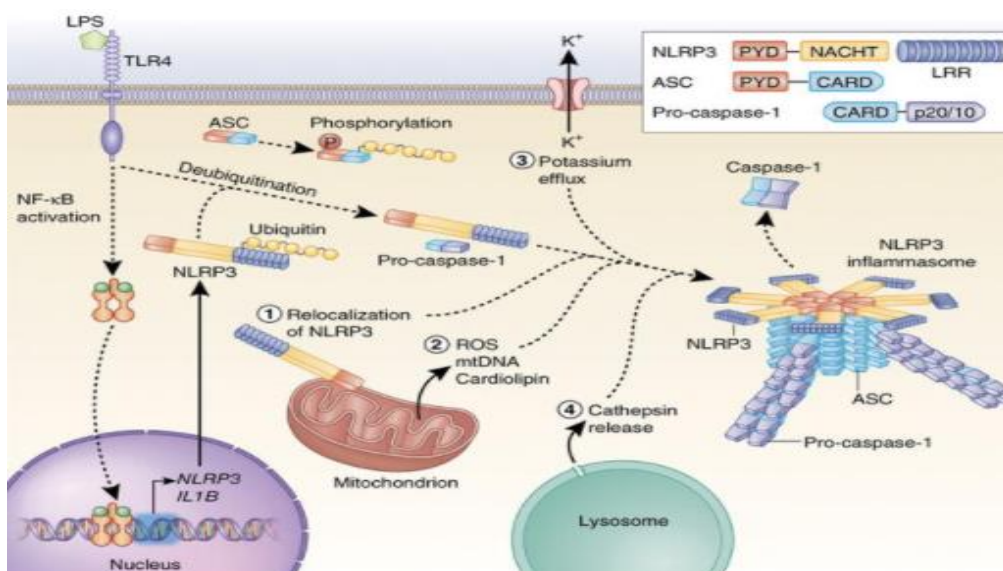
συναρμολόγησης του φλεγμονοσώματος πυροδοτείται από την αλληλεπίδραση της περιοχής πυρίνης του NLRP3 με την αντίστοιχη του ASC (Εικόνα 4) (22).



Εικόνα 4: Τα δομικά στοιχεία του NLRP3 φλεγμονοσώματος.

Από : Kate Schroder, Jurg Tschopp, *The Inflammasomes*, Cell, 2010, 140:6:821-832.

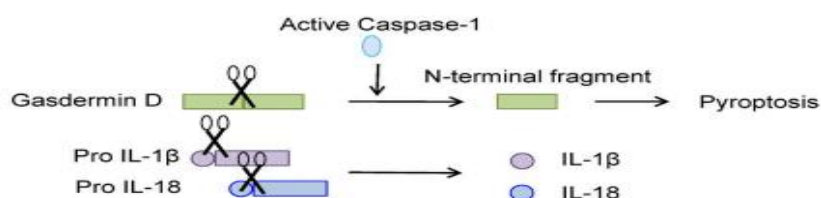
Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 διαμεσολαβείται από μία διαδικασία που αποτελείται από δύο βήματα: την προετοιμασία της ενεργοποίησης και τελικά την ενεργοποίηση. Το πρώτο βήμα προκαλείται από PRRs με την ενεργοποίηση του NF-κB και την επαγωγή της έκφρασης των NLRP3, pro-IL-1β και pro-IL-18 (25). Σε κατάσταση ηρεμίας, η ενεργοποίηση του NLRP3 με ολιγομερισμό εξασθενεί από το *CARD8*. Επίσης, το NLRP3 επάγει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που αφορούν το φλεγμονόσωμα (ουβικουιλίνωση, φωσφορυλίωση, σουμοϋλίωση) και το σταθεροποιεί σε μια κατάσταση καταστολής, έτοιμο να δεχτεί το σήμα που θα το ενεργοποιήσει (26). Έπειτα, είναι σε θέση να ενεργοποιηθεί μέσω των νουκλειϊκών οξέων ή μέσω των σημάτων κινδύνου, όπως το ATP (Εικόνα 5) (27).



Εικόνα 5 : Μηχανισμός ενεργοποίησης φλεγμονοσώματος NLRP3

Από : Guo H, Callaway JB, Ting JP. *Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics*. Nat Med. 2015, (7):677-87.

Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος οδηγεί σε μια ξεχωριστή μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται πυρόπτωση και χαρακτηρίζεται από κυτταρική λύση, απελευθέρωση ενδοκυτταρικών συστατικών και φλεγμονώδη απόκριση (28). Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω της διάσπασης της γασδερίνης D (Gasdermin D-GSDMD) από την κασπάση-1 και οδηγεί σε μια σειρά γεγονότων μέσα στο κύτταρο, που περιλαμβάνει διόγκωση του κυτταροπλάσματος, ρήξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και αποσταθεροποίηση του πυρήνα με απελευθέρωση κυτταροπλασματικών συστατικών στον εξωκυτταρικό χώρο. Η GSDMD αποτελεί άμεσο στόχο της κασπάσης-1 και είναι απαραίτητη για την πυρόπτωση και την απελευθέρωση της IL-1 β μετά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Η GSDMD περιέχει στο άμινο-τελικό άκρο μία περιοχή κυτταρικού θανάτου, η οποία εκτίθεται μετά τη διάσπαση από την κασπάση. Τέλος, μέσω της πυρόπτωσης, επάγεται η έκκριση των IL-1 β και IL-18 (25) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 : Η ενεργοποίηση της κασπάσης-1, με αποτέλεσμα την πρωτεόλυση των τελεστών της.

Από: Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol.* 2016, 213(6):617-29.

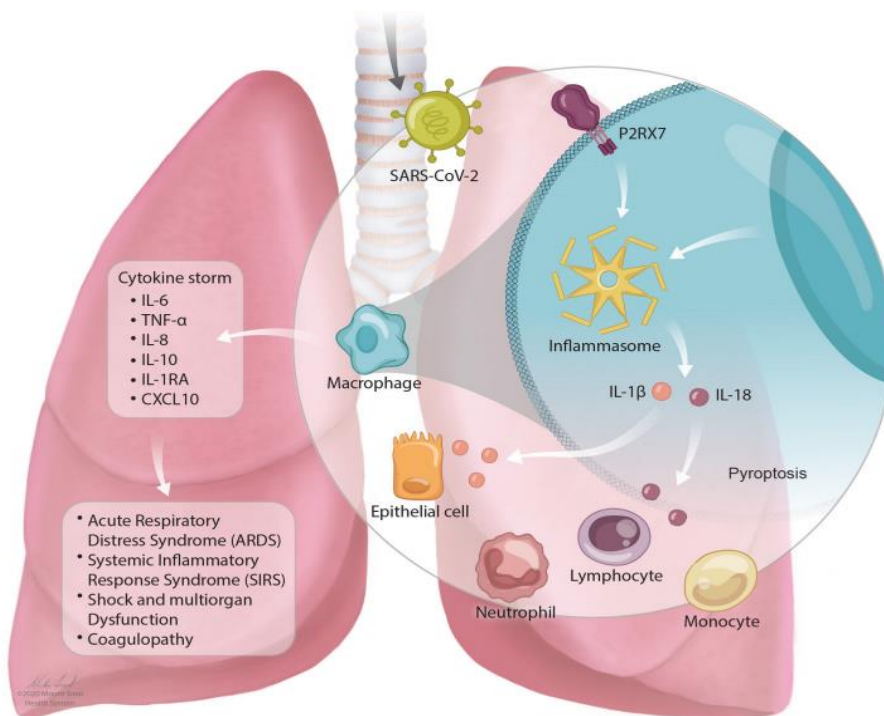
A.2.1.1. NLRP3 και COVID-19

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το φλεγμονοσώμα NLRP3 και η IL-1 β επάγουν τη φλεγμονή κατά τη διάρκεια πνευμονικής βλάβης. Οι ασθενείς με ARDS στο βρογχοκυψελιδικό υγρό ή στο πλάσμα τους εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα IL-1 β και σοβαρότερα κλινικά αποτελέσματα σε σχέση με τους υγιείς. Επίσης, σε ασθενείς με ARDS λόγω λοιμώξεων από τον MERS-CoV και SARS-CoV, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα IL-1 β , IL-6 και IL-8. Σε ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού, όπως η γρίπη, σε ασθενείς με πνευμονική βλάβη, έχουν ανιχνευθεί υψηλά επίπεδα IL-1 β στο βρογχοκυψελιδικό υγρό και το πλάσμα. Επομένως, η IL-1 β έχει κομβικό ρόλο στην οξεία πνευμονική βλάβη με αναπνευστικές ιογενείς λοιμώξεις (29).

Η ανοσολογική απόκριση στην λοίμωξη έναντι του SARS-CoV-2 πραγματοποιείται από φλεγμονώδη κυψελιδικά και μονοκυτταρικά μακροφάγα, τα οποία ενεργοποιούνται από PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) και DAMPs (damage-associated molecular patterns).

Στη συνέχεια, τα μακροφάγα εκκρίνουν TNF- α και IL-1 β , τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη γεγονότων που προκαλεί φλεγμονή αμέσως μετά τη μόλυνση. Μετά την έκκριση αυτών των κυτταροκινών, προκαλείται κυτταρικός θάνατος, παραγωγή PAMPs και DAMPs και εκτεταμένη ενεργοποίηση του NLRP3, δημιουργώντας έτσι έναν καταρράκτη θετικής ανάδρασης φλεγμονωδών κυτταροκινών (29).

Επίσης, όπως έχει αποδειχθεί από τη συσχέτιση με τους προηγούμενους κορωνοϊούς, η πρώιμη εμπλοκή των NLRs παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσική ανοσολογική απόκριση έναντι αυτών των ιών. Οι NLRs εμπλέκονται στην ανίχνευση διαταραχών ενδοκυτταρικής ομοιόστασης ή σημάτων κινδύνου, που φαίνεται από τα υψηλά επίπεδα IL-1 β και IL-18 και από την υπερρύθμιση των γονιδίων της IL-1 στους πνεύμονες. Η κασπάση-1 διασπά και ενεργοποιεί την IL-1 β και την IL-18 και προκαλεί πυρόπτωση (30) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7 : Η συμμετοχή του NLRP3 φλεγμονοσώματος στη φλεγμονή του πνευμονικού ιστού μετά από SARS-CoV-2 λοίμωξη.

Από: Freeman TL, Swartz TH. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front Immunol.* 2020, 11: 1518.

A.3 CARD8

Το γονίδιο *CARD8* (Caspase-associated recruitment domain-containing protein 8), που εδράζεται στο χρωμόσωμα 19 στους ανθρώπους, ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών CARD και αποτελείται από περιοχές συναρμολόγησης κασπασών.

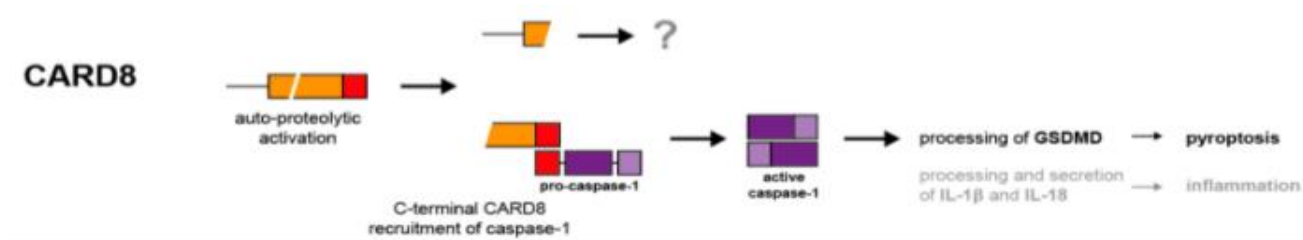
Η πρωτεΐνη CARD8 εμπλέκεται σε οδούς που οδηγούν στην ενεργοποίηση κασπασών ή του NF-κΒ. Η πρωτεΐνη CARD8 δρα ως μόριο προσαρμογέας που ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση του NF-κΒ, την έκκριση της IL-1β που εξαρτάται από την κασπάση 1 και τελικά, την απόπτωση (31).

Το γονίδιο *CARD8* εκφράζεται σε μια ποικιλία ιστών όπως ο εγκέφαλος, τα αιμοφόρα αγγεία, η σπλήνα, οι μύες, το στρώμα της επιδερμίδας και τα θύλακες των τριχών του δέρματος (32).

Τα σήματα που δημιουργούνται από τους παθογόνους ιούς, ελευθερώνουν το N-τερματικό τμήμα της πρωτεΐνης CARD8, που αποτελείται από μία μη δομημένη περιοχή μήκους 160 αμινοξέων και είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της, από το πρωτεάσωμα και απελευθερώνουν το διασπασμένο C-τερματικό τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο πολυμερίζεται για να ξεκινήσει το σχηματισμό του φλεγμονοσώματος. Μετά τη δημιουργία του στρατολογείται απευθείας η προ κασπάση-1 (proCASP1) ανεξάρτητα από το PYCARD/ASC και προωθεί την ενεργοποίηση της κασπάσης (CASP1), η οποία στη συνέχεια διασπά και ενεργοποιεί τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1 β και IL-18 και GSDMD, οδηγώντας τελικά σε πυρόπτωση (33).

A.3.1 Ρόλος *CARD8*

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης CARD8 είναι ελάχιστα κατανοητή. Η προκασπάση-1 υφίσταται αυτοπρωτεόλυση και κατ' επέκταση ενεργοποίηση, χωρίς τη συμμετοχή του ASC. Επίσης, η ενεργοποίηση της κασπάσης-1 που προκαλείται από CARD8 προκαλεί κυρίως πυρόπτωση με διάσπαση του GSDMD (34).



Εικόνα 8 : Μηχανισμός ενεργοποίησης *CARD8*

Από: Fenini Gabriele, Tugay Karakaya, Paulina Hennig, Michela Di Filippo, and Hans-Dietmar Beer. The NLRP1 Inflammasome in Human Skin and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21, no. 13: 4788.

Η πρωτεΐνη CARD8 χρησιμεύει ως “συναγερμός”, για να σηματοδοτήσει την ενεργοποίηση μιας οδού αποικοδόμησης για διαταραγμένες και λανθασμένα “διπλωμένες” πρωτεΐνες (34). Η

CARD8 έχει ρόλο φλεγμονώδους αισθητήρα, ο οποίος διαμεσολαβεί για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος ως απάντηση σε διάφορα σήματα που σχετίζονται με παθογόνα, οδηγώντας σε επακόλουθη πυρόπτωση των CD4+ κυττάρων (35-37).

Η πρωτεΐνη CARD8 λειτουργεί επίσης ως αρνητικός ρυθμιστής του φλεγμονώδους NLRP3, αφού όταν υπάρχει η αλληλεπίδραση NLRP3-CARD8, παρατηρείται μειωμένη έκκριση στα επίπεδα της IL-1β (38).

Επιπλέον, η CARD8 παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της επιλογής των T-κυττάρων ή της ομοιοστάσης. Αν και η απόπτωση είναι το προεπιλεγμένο πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου στην επιλογή των κυττάρων T στον θύμο αδένα, καθώς και στη διατήρηση των ομοιοστατικών επιπέδων των T κυττάρων στην περιφέρεια, είναι σημαντικό ότι η πυρόπτωση που επάγεται από την CARD8 παίζει επίσης ρόλο σε αυτές τις διαδικασίες (36).

A.3.2 Πολυμορφισμός rs2043211

Ο πολυμορφισμός rs2043211 (c.304T>A) είναι ένας μη συνώνυμος πολυμορφισμός (Single-nucleotide polymorphism, SNP), που εντοπίζεται στο εξόνιο 5 και εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13.33. Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση μιας θυμίνης από μια αδενίνη στη συγκεκριμένη πολυμορφική θέση του γονιδίου *CARD8* οδηγεί στην παραγωγή μιας κολοβωμένης πρωτεΐνης, αφού εισάγεται ένα κωδικόνιο λήξης στο κωδικόνιο 10 (Cys10Stop) (39).

Επίσης, μελέτη έχει δείξει ότι ο πολυμορφισμός rs2043211 ευθύνεται για την αλλαγή που παρατηρείται στην διαμόρφωση των ισομορφών του *CARD8*. Τα άτομα με γονότυπο AA εμφανίζουν την ισομορφή T48, ενώ τα άτομα με γονότυπο TT εκφράζουν μία διαφοροποιημένη μορφή της T48, στην οποία τα πρώτα 25 αμινοξέα του N-τελικού άκρου της T48 αντικαθίστανται από 20 εναλλακτικά αμινοξέα (38).

Το αλληλόμορφο T φαίνεται πως έχει προστατευτικό ρόλο κατά του διαβήτη και έναντι της διαβητικής νεφροπάθειας (Diabetic Nephropathy -DN) σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Type 2 Diabetes Mellitus- T2DM) και ανεξάρτητα από το φύλο (40).

B. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος είναι μια από τις κύριες αιτίες που οδηγούν σε αυξημένη έκκριση κυτταροκινών που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια του COVID-19, προκαλώντας σοβαρή ασθένεια, και το *CARD8* παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8* σε ασθενείς που προσβλήθηκαν από τον SARS-CoV-2 και η συσχέτιση με την εμφάνιση και την σοβαρότητα των συμπτωμάτων, καθώς και την έκβαση της νόσου.

Ειδικό μέρος

A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A.1 Άτομα που μελετήθηκαν

Στη συγκεκριμένη μελέτη, έλαβαν μέρος διακόσια εξήντα τέσσερα (264) άτομα τα οποία είχαν προσβληθεί από τον SARS-CoV 2. Αποτελούνταν από 180 άνδρες και 84 γυναίκες, με μέση ηλικία \pm SD: 42.8 ± 18.4 χρόνια. Η διάμεση ηλικία των συμμετεχόντων ήταν τα 51,5 έτη, ενώ το ηλικιακό εύρος κυμαίνονταν από τα 11 έως τα 89 έτη. Η ομάδα των ασθενών αποτελούνταν από 152 Έλληνες, 62 Τούρκους, 16 Ουκρανούς, 15 Ινδονησιανούς, 6 Ουζμπέκους, 3 Μολδαβούς, 3 Αμερικάνους, 2 Κουβανούς και 1 αθηνή από καθεμία από τις ακόλουθες χώρες: Αλβανία, Βουλγαρία, Γερμανία, Κιργιστάν και Λευκορωσία.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις (4) ομάδες, ανάλογα με τη σοβαρότητα της ασθένειας. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε ασυμπτωματικούς ή με ήπια συμπτώματα ασθενείς (150, 56,82%), όπως βήχα, πόνο στο στήθος, δύσπνοια, ανοσμία, αγευσία, πεπτικά συμπτώματα, κεφαλαλγία και/ή μυαλγία. Η δεύτερη ομάδα εμφάνιζε μέτρια νόσο που απαιτούσε νοσηλεία (15, 5,68%) και σε αυτήν περιλαμβάνονταν νοσηλευόμενοι συμπτωματικοί ασθενείς χωρίς ανάγκη για οξυγονοθεραπεία ή οξυγόνο με μάσκα. Η τρίτη ομάδα περιλάμβανε άτομα με σοβαρή νόσο που εμφάνισαν πνευμονία (77, 29,16%) και χρειάζονταν οξυγόνο. Η τέταρτη και τελευταία ομάδα περιείχε ασθενείς που εμφάνιζαν κρίσιμη νόσο (22, 8,33%) και απαιτούσαν διασωλήνωση και μηχανικό αερισμό. Από τους 264 ασθενείς, οι 4 (1,5%) πέθαναν τελικά.

Ελήφθη γραπτή ενημερωμένη συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (αρ. 2115).

Πίνακας 1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Παράμετρος	Σύνολο	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	p [#]
No.	264	150	15	77	22	
Φύλο (♂/♀)	180/84	102/48	9/6	55/22	14/8	0.789
Ηλικία (διάμεση ± SD), y	42.8 ± 18.4	32.7 ± 12.4	45.1 ± 16.9	56.4 ± 16.2	62.7 ± 13.4	<0.001
Συννοσηρότητα (n, %)	94, 35.6	14, 9.33	5, 33.3	56, 72.7	19, 86.4	<0.001
Παχυσαρκία (n, %)	31, 11.7	2, 1.33	2, 13.3	22, 28.6	5, 22.7	<0.001
Υπέρταση (n, %)	49, 18.6	2, 1.33	2, 13.3	33, 42.8	12, 54.5	<0.001
Χρόνια Καρδιακή Νόσος (n, %)	11, 4.2	0, 0	0, 0	7, 9.1	4, 18.2	<0.001
Χρόνια εγκεφαλοαγγειακή νόσος** (%)	8, 3.0	0, 0	1, 6.7	3, 3.9	4, 18.2	<0.001
Χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις*** (n, %)	20, 7.6	2, 1.33	0, 0	11, 14.3	7, 31.8	<0.001
Δυσλιπιδαιμία (n, %)	19, 7.2	1, 0.66	1, 6.7	14, 18.2	3, 13.6	<0.001
Σακχαρώδης Διαβήτης (n, %)	21, 8.0	2, 1.33	0, 0	14, 18.2	5, 22.7	<0.001
Υποθυρεοειδισμός (n, %)	12, 4.5	2, 1.33	2, 13.3	6, 7.8	2, 9.1	0.027
Κακοήθειες(n, %)	6, 2.3	2, 1.33	0, 0	2, 2.6	2, 9.1	0.134
Υπερπλασία προστάτη (n, % στους άντρες)	6, 3.3	0,0	0, 0	4, 7.2	2, 14.3	0.009
Χρόνιες ηπατικές/νεφρικές παθήσεις (n, %)	6, 2.3	1, 0.66	0, 0	5, 6.5	0, 0	0.032
Χρόνιες ανοσολογικές και/ή αιματολογικές νόσοι ^ (n, %)	6, 2.3	1, 0.66	0, 0	3, 3.9	2, 9.1	0.055
Άλλα^^ (n, %)	16 (6.1)	3, 2.0	1, 6.7	11, 14.3	1, 4.5	0.004

Συντομογραφίες: SD, standard deviation: τυπική απόκλιση

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

** συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας φλεβικής νόσου

*** χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, άσθμα, άπνοια ύπνου

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

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

A.2 Μεθοδολογία

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, ολικό περιφερικό αίμα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

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

A.2.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος τα οποία συλλέχθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το EXTRACTME GENOMIC DNA EM13 KIT, που διατίθεται στο εμπόριο από την εταιρία Blirt. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η προτεινόμενη από τον κατασκευαστή με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

1. Τοποθέτηση 200μL περιφερικού αίματος σε eppendorf των 1,5mL.
2. Στη συνέχεια, προσθήκη 1000μL διαλύματος λύσης ερυθροκυττάρων ((RBC Lysis Buffer, BioLegend, Inc., San Diego, CA) και επώαση για 5 λεπτά στον πάγκο, προκειμένου να λυθούν τα ερυθροκύτταρα.
3. Φυγοκέντρηση στα 8.600 g για 4 λεπτά.
4. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος με την προσθήκη 375μL δεύτερου λυτικού διαλύματος GL (GL Buffer, Blirt).
5. Ύστερα, προσθήκη 10μL Πρωτεΐνάσης K.
6. Επώαση στους 55°C για 30 λεπτά.
7. Μετά την προσθήκη 4μL RNAάσης A, δεύτερη επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
8. Μετά το πέρας των επώσεων, αφαίρεση του διαλύματος από το υδατόλουτρο, προσθήκη 400μL διαλύματος GB (GB Buffer, Blirt) και ανάδευση.
9. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 2 λεπτά.
10. Στη συνέχεια, μεταφορά του υπερκείμενου σε ειδική στήλη συλλογής υγρού (collection tube).
11. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό και έπειτα, δύο πλύσεις με 600μL διαλύματος GW1 (GW1 Buffer, Blirt) και 500μL GW2 (GW2 Buffer, Blirt) αντίστοιχα και φυγοκεντρήσεις

στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα μετά από κάθε πλύση και μία τελική φυγοκέντρηση στα 16.000g για 2 λεπτά.

12. Τέλος, προσθήκη 100μL διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer, Blirt) στη στήλη, η οποία προηγουμένως είχε τοποθετηθεί σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 1,5mL, όπου μετά από επώαση στον πάγκο για 5 λεπτά, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό.

13. Το γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε (3-10 μg) αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

A.2.2 Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου CARD8

Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs2043211 ενισχύθηκε ένα τμήμα DNA του γονιδίου CARD8, μεγέθους 475 bp. Η ενίσχυση του τμήματος DNA πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction). Για τη μελέτη του γονιδίου CARD8 σχεδιάστηκαν εκκινητές, οι οποίοι φαίνονται στον πίνακα 2, με σκοπό την ενίσχυση τμήματος του εξονίου 5, με τη βοήθεια του βιοπληροφορικού εργαλείου BLAST και του λογισμικού Oligo V.6.

Πίνακας 1 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR

Primer	Sequence
Forward	5'- AAGAGCAGCATATAGTGGGAAA -3'
Reverse	5'- TGAGTTCGATGAAAAACACCC -3'

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 30 μL, εκ των οποίων 2 μL αντιστοιχούσαν στο προς ενίσχυση γονιδιωματικό DNA (περίπου 100-200 ng). Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 3,1 μL ρυθμιστικού διαλύματος 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0), 2,4 μL ισομοριακού μίγματος των δεοξυριβονουκλεοτιδίων dATP, dTTP, dCTP, και dGTP, 0,5 μL διαλύματος χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂ 100mM), 0,6 μL διαλύματος κάθε εκκινητή (50pmol/L) και 0,25 μL DFS-Taq DNA πολυμεράσης (BIORON GmbH, Romerberg, Germany). Η αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή Veriti® Thermal Cycler, Applied Biosystems, κάτω από τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 3. Η αλληλουχία του προϊόντος της PCR και οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών παρουσιάζονται στην εικόνα 9.

Πίνακας 2. Συνθήκες PCR του πειράματος

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
First Denaturation (Αρχική αποδιάταξη)	94°C	2 min	1
Denaturation (Αποδιάταξη)	94°C	30 sec	30
Annealing (Υβριδισμός)	57°C	30 sec	
Extension (Επιμήκυνση)	72°C	30 sec	
Final extension (Τελική επιμήκυνση)	72°C	1 min	1

```
aagagcagcatatagtgggaaa cagagagccagttaaatttaacataatgagatgtaagaaagagtcatgg  
gagtcctgagaggtgagatggagtcgttagggcctgaggaatgacttccctaagataaaaatattgagtcctat  
ggctattaacataaaaatcttccctgcacagcctatgctatcatcaggcacctaccttatattcatagtaaaa  
attctgttgttgttttccagGGTATACAGGGAGCTACCCTGTGTTTCTGAGACCCCTTTGTGACATCTCACA  
TTTTTCCAAGAAGATGATGAGACAGAGGCAGAGCCATTATTGTTCCGTGCTGTTCCCTGAGTGTCAACTAT  
CTGGGGGGGACATTCCCAGgtaagaaaagctattccggttgaaaaactattggacgctgtgtctcaatatca  
cagaggaacatgagaattagaggaatttgggtgtttttcatcgaactca
```

Εικόνα 9. Αλληλουχία γονιδίου με τον πολυμορφισμό rs2043211

Στην εικόνα επισημαίνονται οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών (σε κίτρινο πλαίσιο), και η θέση του πολυμορφισμού rs2043211 (με έντονο κόκκινο χρώμα)

A.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2%

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

Η γέλη αραρόζης δημιουργήθηκε με 2,0 gr αραρόζης και 100mL ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE, στο οποίο προστέθηκαν 5μL διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (τελική συγκέντρωση 10ng/mL), το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στο μόριο του DNA και να φθορίζει όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 5μL προϊόντος PCR και 5μL διάλυμα φόρτωσης (Formaldehyde Load Dye, Ambion, UK), που επιτρέπει τη σταθεροποίηση του δείγματος στη γέλη.

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

Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Israel) και οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap. Το προϊόν της PCR παρείχε μια ζώνη DNA,

μεγέθους 475 bp. Για τον έλεγχο της παρουσίας επιμολύνσεων στο μίγμα της αντίδρασης, σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένα τυφλό δείγμα, χωρίς γονικό υλικό.

A.2.4 Πέψη

Για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού στο εκάστοτε δείγμα πραγματοποιήθηκε επώαση με περιοριστικό ένζυμο. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το MboI με αλληλουχία κοπής 5'-GATC/CTAG-3'.



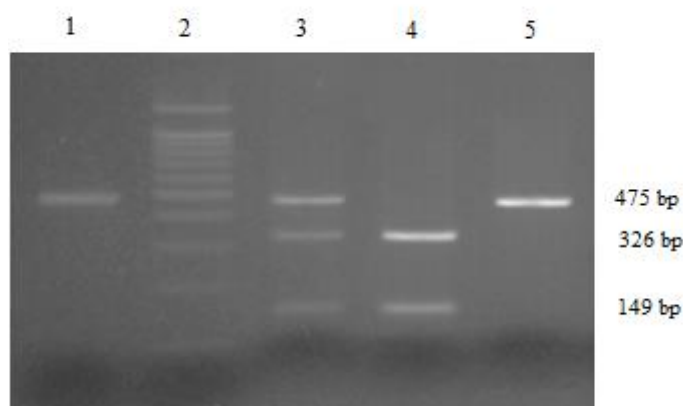
Εικόνα 10. Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού MboI

Για κάθε πέψη χρησιμοποιήθηκαν 6μL δείγματος PCR και 9μL του διαλύματος, με σύσταση 150μL H₂O, 30μL 10X Tango Buffer και 5μL του ενζύμου MboI.

Η επώαση έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 4 ώρες.

Το ένζυμο διασπά το τμήμα του DNA και δημιουργεί θραύσματα μεγέθους 149, 326 και 475 bp.

Τα αποτελέσματα της πέψης των προϊόντων της PCR με το περιοριστικό ένζυμο MboI φαίνονται στην Εικόνα 11 :



Εικόνα 11. Απεικόνιση αποτελεσμάτων πέψης με το περιοριστικό ένζυμο MboI.

Προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *CARD8* (διαδρομή 1), μάρτυρας μεγέθους DNA (διαδρομή 2), και θραύσματα DNA που λαμβάνονται μετά από πέψη του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου

CARD8 για ετερόζυγα (διαδρομή 3), ομόζυγα (διαδρομή 4) και αγρίου τύπου άτομα (διαδρομή 5) για τον εν λόγω πολυμορφισμό.

Όταν στην πολυμορφική θέση rs2043211 του γονιδίου *CARD8* υπάρχει θυμίνη (αντί αδενίνης), το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *CARD8* δεν εμπεριέχει καμία θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού MboI (GATC, Εικόνα 10) και, κατά συνέπεια, δεν κόβεται. Αντιθέτως, όταν στην παραπάνω πολυμορφική θέση υπάρχει αδενίνη, το ένζυμο περιορισμού κόβει το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *CARD8* σε μία θέση και λαμβάνονται δύο θραύσματα DNA, μεγέθους 326 και 149 bp. Επομένως, μετά την πέψη των προϊόντων της PCR, προκύπτουν δύο θραύσματα DNA (μεγέθους 326 και 149 bp) για τα ομόζυγα άτομα (γονότυπος AA) και τρία θραύσματα (μεγέθους 475, 326 και 149 bp) για τα ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό άτομα (γονότυπος TA). Στην περίπτωση ατόμων αγρίου τύπου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, δηλαδή άτομα που φέρουν δύο αντίγραφα του αλληλομόρφου T (γονότυπος TT), λαμβάνεται μια ζώνη DNA (μεγέθους 475 bp) κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης, η οποία αντιστοιχεί στο άκοπο προϊόν της PCR. Μια χαρακτηριστική εικόνα των προϊόντων που προκύπτουν, μετά την πέψη του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *CARD8*, σε καθεμιά από τις τρεις προηγούμενες περιπτώσεις δίνεται στην εικόνα 11.

A.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 3%

Μετά την πέψη ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 3% (3 γραμμάρια αγαρόζης και 100mL ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE, στο οποίο προστέθηκαν 5μL διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου). Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 15μL δείγματος και 5μL διάλυμα φόρτωσης (Formaldehyde Load Dye, Ambion, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V και 400mA για 30 λεπτά. Έτσι, ήταν εύκολη η απεικόνιση της ύπαρξης ή όχι του πολυμορφισμού σε κάθε δείγμα.

A.2.6 Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Τέλος, για περιορισμένο αριθμό δειγμάτων, προς την βεβαίωση των RFLP, έγινε καθαρισμός των προϊόντων της PCR με σκοπό την απομάκρυνση των εκκινητών, του ενζύμου και των αλάτων.

A.2.6.1 Καθαρισμός προϊόντων PCR

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

1. Αρχικά, προσθήκη 50μL Binding Buffer που περιέχει ισοπροπανόλη στο φιαλίδιο με το προϊόν της PCR.
2. Στη συνέχεια, μεταφορά του δείγματος σε ειδική στήλη (Purelink PCR Purification Kit).
3. Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης.
4. Έπειτα, πλύση με προσθήκη 700μL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer).
5. Μία ακόμη φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του διαλύματος της φυγοκέντρησης.
6. Δεύτερη πλύση με προσθήκη 700μL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer).
7. Ακολούθως, φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και μία δεύτερη φυγοκέντρηση στα 11.000g για 3 λεπτά για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από τη στήλη.
8. Τέλος, απόρριψη του διαλύματος της φυγοκέντρησης και μεταφορά της στήλης στο τελικό φιαλίδιο των 1,5mL. Σε αυτό, προσθήκη 30μL διαλύματος έκλουσης και μετά από επώαση 1 λεπτού, φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό.

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

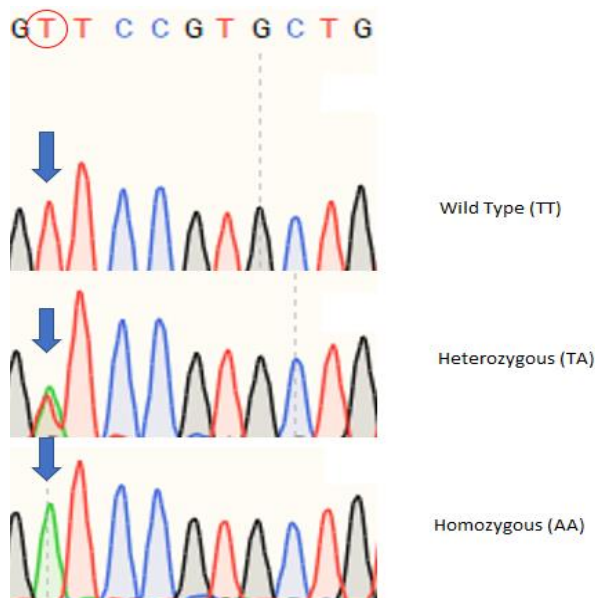
Το καθαρισμένο προϊόν αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την ανάλυση.

A.2.6.2 Αλληλούχηση

Η αλληλούχηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με την τυποποιημένη μέθοδο SANGER. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν με χρήση του ABI Prism BigDye (v1.1) και αναλύθηκαν με το ABI 3100 Sequencer. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Reverse 5'-TGAGTTCGATGAAAAACACCC -3' και η σύγκριση έγινε με την αλληλουχία ENST00000391898 του γονιδίου του *CARD8* της βάσης Ensemble.

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

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger που πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πέψης φαίνονται στην Εικόνα 12:



Εικόνα 12. Χρωματογραφήματα από δείγματα ασθενών με γονότυπο TT, TA και AA.

Στο πρώτο χρωματογράφημα για τον αγρίου τύπου φαινότυπο (γονότυπος TT) υπάρχει μία επικρατούσα κορυφή που αντιστοιχεί σε νουκλεοτίδιο θυμίνης (κόκκινο χρώμα). Στο χρωματογράφημα του ετερόζυγου ως προς τον πολυμορφισμό φαινοτύπου (γονότυπος TA), συνυπάρχουν δύο κορυφές που αντιστοιχούν η μία στο νουκλεοτίδιο θυμίνης (κόκκινο χρώμα), που υπάρχει φυσιολογικά στο γονίδιο και η άλλη στο νουκλεοτίδιο αδενίνης (πράσινο χρώμα), που υποδεικνύει την ύπαρξη του πολυμορφισμού. Στο τελευταίο χρωματογράφημα του ομόζυγου ως προς τον πολυμορφισμό φαινοτύπου (γονότυπος AA), φαίνεται μόνο μία κορυφή που αντιστοιχεί σε νουκλεοτίδιο αδενίνης (πράσινο χρώμα).

A.2.7 Βιοστατιστική ανάλυση

Η βιοστατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 (Chi-square), και η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε για $p < 0.05$. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με SPSS (έκδοση 26.0).

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

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B.1 Επίδραση του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου CARD8 στους ασθενείς της μελέτης

Από την μελέτη που έγινε προέκυψε ότι από τους 264 ασθενείς, οι 103 ήταν άτομα αγρίου-τύπου (γονότυπος TT), οι 130 ετερόζυγοι (γονότυπος TA) και οι 31 ομόζυγοι (γονότυπος AA) (Πίνακας 4). Οι παρατηρούμενες γονοτυπικές συχνότητες στον υπό μελέτη πληθυσμό ικανοποιούν τις προϋποθέσεις της ισορροπίας Hardy-Weinberg ($p=0,298$). Η συχνότητα του A αλληλομόρφου βρέθηκε ίση με 36,4%.

Πίνακας 4. Συχνότητα γονοτύπων (TT, TA, AA)

	Total (No, %)	Group (a) (No, %)	Group (b) (No, %)	Group (c) (No, %)	Group (d) (No, %)
No patients	264	150	15	77	22
Wild Type (TT)	103, 39.02	54, 36.0	3, 20.0	31, 40.3	15, 68.2
Heterozygous (TA)	130, 49.24	79, 52.7	10, 66.7	36, 46.8	5, 22.7
Homozygous (AA)	31, 11.74	17, 11.3	2, 13.3	10, 13.0	2, 9.1
Heterozygous (TA), Homozygous (AA)	161, 60.98	96, 64.0	12, 80.0	46, 59.7	7, 31.8

B.2 Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου CARD8 με τον κλινικό φαινότυπο ασθενών με Covid-19

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 και στον Πίνακα 5, η μεγαλύτερη ηλικία και οι υποκείμενες συννοσηρότητες επηρέασαν σημαντικά τον φαινότυπο των ασθενών με COVID-19. Είναι ενδιαφέρον ότι μεταξύ των παραγόντων συννοσηρότητας, η παρουσία παχυσαρκίας, υπέρτασης, χρόνιων αναπνευστικών παθήσεων, χρόνιας καρδιακής νόσου, σακχαρώδη διαβήτη, υπερπλασίας του προστάτη και νόσου του θυρεοειδούς συσχετίστηκαν σημαντικά με χειρότερο φαινότυπο COVID-19 (Πίνακας 1,5).

Πίνακας 5. Συσχέτιση της πνευμονίας με κλινικές παραμέτρους στους ασθενείς της μελέτης.

	Πνευμονία		Univariate analysis		
	Yes (n105)	No (n158)	<i>p</i> [#]	Odds Ratio (OR)	Relative Risk (RR)
Φύλο (♂/♀)	72/33	107/51	0.88	1.04 (0.61-1.77)	1.02 (0.74-1.41)
Ηλικία (διάμεση ± SD), y	57, 22	30, 14	<0.001		
Συννοσηρότητα (n, %)	78, 74.3	16, 10.1	<0.001	25.64 (13.02-50.47)	5.19 (3.63-7.43)
Παχυσαρκία (n, %)	29, 27.6	2, 1.3	<0.001	29.76 (6.92-128.01)	2.86 (2.32-3.51)
Υπέρταση (n, %)	45, 42.9	4, 2.5	<0.001	28.87 (9.95-83.78)	3.28 (2.6-4.12)
Χρόνια Καρδιακή Νόσος (n, %)	11, 10.5	0,0	<0.001	-	2.68 (2.28-3.15)
Χρόνια εγκεφαλοαγγειακή νόσος** (%)	8, 7.6	0,0	0.001	-	2.63 (2.25-3.07)
Χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις*** (n, %)	18, 17.1	2, 1.3	<0.001	16.14 (3.66-71.19)	2.54 (2.01-3.14)
Δυσλιπιδαιμία (n, %)	17, 16.2	2, 1.3	<0.001	15.07 (3.4-66.74)	2.48 (1.98-3.11)
Σακχαρώδης Διαβήτης (n, %)	19, 18.1	2, 1.3	<0.001	17.23 (3.92-75.75)	2.55 (2.04-3.17)
Υποθυρεοειδισμός (n, %)	9, 8.6	3, 1.9	0.015	4.84 (1.28-18.33)	1.96 (1.36-2.81)
Κακοήθειες(n, %)	4, 3.8	2, 1.3	0.221	3.09 (0.56-17.18)	1.7 (0.17-1.71)
Υπερπλασία προστάτη (n, % στους άντρες)	6, 8.3	0,0	0.004	-	2.62 (2.17-3.17)
Χρόνιες ηπατικές/νεφρικές παθήσεις (n, %)	5, 4.8	1, 0.6	0.039	7.85 (0.9-68,18)	2.14 (1.45-3.16)
Χρόνιες ανοσολογικές και/ή αιματολογικές νόσοι ^ (n, %)	5, 4.8	1, 0.6	0.039	7.85 (0.9-68,18)	2.14 (1.45-3.16)
Άλλα^ (n, %)	13, 12.4	3, 1.9	0.001	7.3 (2.02-26.3)	2.18 (1.64-2.9)

Επιπλέον, η μεγαλύτερη ηλικία και η συννοσηρότητα (συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων υποκείμενων ασθενειών) προδιαθέτουν σημαντικά τους ασθενείς στην ανάπτυξη πνευμονίας (Πίνακας 5). Οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου ήταν παρόμοιοι με αυτούς που οδηγούσαν σε ανάγκη για νοσηλεία (Πίνακας 8).

Πίνακας 6. Συχνότητα γονοτύπων (TT, TA, AA) του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8* με την ανάπτυξη πνευμονίας στους ασθενείς της μελέτης.

	Πνευμονία			
	Yes		No	
Αγρίου Τύπου (TT)	46	43.8%	57	36.1%
Ετερόζυγοι (TA)	47	44.8%	82	51.9%
Ομόζυγοι (AA)	12	11.4%	19	12%

Πίνακας 7. Συσχέτιση της πνευμονίας με τον πολυμορφισμό rs2043211 του γονιδίου *CARD8* στους ασθενείς της μελέτης.

	Πνευμονία		Univariate analysis		
	Yes	No	<i>p</i> #	Odds Ratio (OR)	Relative Risk (RR)
Αγρίου Τύπου (TT)	46	57	Reference Group		
Ετερόζυγοι (TA)	47	82	0.20	0.71 (0.41-1.2)	0.81 (0.6-1.11)
Ομόζυγοι (AA)	12	19	0.558	0.78 (0.34-1.78)	0.87 (0.53-1.42)
Ετερόζυγοι (AT), Ομόζυγοι (AA)	59	101	0.208	0.72 (0.44-1.99)	0.83 (0.61-1.11)

Ως ομάδα ελέγχου σε όλες τις συσχετίσεις του Πίνακα 7 ορίστηκαν τα αγρίου τύπου άτομα, τα οποία ήταν 46 αυτά που είχαν αναπτύξει πνευμονία και 57 αυτά που δεν εμφάνισαν. Στην πρώτη συσχέτιση συμμετείχαν αγρίου τύπου και ετερόζυγα άτομα. Στη δεύτερη συσχέτιση συμμετείχαν αγρίου τύπου και ομόζυγα άτομα. Στη τρίτη συσχέτιση συμμετείχαν αγρίου τύπου άτομα και ως ενιαίο γκρουπ, ετερόζυγα με ομόζυγα άτομα.

Πίνακας 8. Συσχέτιση κλινικών παραμέτρων με την ανάγκη νοσηλείας στους ασθενείς της μελέτης.

	Νοσηλεία		Univariate analysis		
	Yes (n119)	No (n145)	<i>p</i> [#]	Odds Ratio (OR)	Relative Risk (RR)
Φύλο (♂/♀)	80/39	100/45	0.763	0.92 (0.55-1.55)	0.98 (0.83-1.15)
Ηλικία (διάμεση ± SD), y	56, 26	30, 13	<0.001		
Συννοσηρότητα (n, %)	83 , 69.7	11, 7.6	<0.001	28.09 (13.55-58.2)	4.17 (3.09-5.62)
Παχυσαρκία (n, %)	30, 25.2	1, 0.7	<0.001	48.54 (6.5-362.2)	2.53 (2.13-3.02)
Υπέρταση (n, %)	47, 39.5	2, 1.4	<0.001	46,67 (11,02-197.61)	2.86 (2.35-3.49)
Χρόνια Καρδιακή Νόσος (n, %)	11, 9.2	0,0	<0.001	-	2.34 (2.03-2.7)
Χρόνια εγκεφαλοαγγειακή νόσος** (%)	8, 6.7	0,0	0.001	-	2.3 (2.0-2.65)
Χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις*** (n, %)	19, 16	1, 0.7	<0.001	27.36 (3.6-207,7)	2.32 (1.93-2.78)
Δυσλιπιδαιμία (n, %)	18, 15.1	1, 0.7	<0.001	25.66 (3.37-195.34)	2.3 (1.91-2.76)
Σακχαρώδης Διαβήτης (n, %)	19, 16	2, 1.4	<0.001	13.58 (3.09-59.63)	2.2 (1.79-2.7)
Υποθυρεοειδισμός (n, %)	10, 8.4	2, 1.4	0.007	6.56 (1.4-30.55)	1.93 (1.44-2.57)
Κακοήθειες(n, %)	4, 3.4	2, 1.4	0.414	2.49 (0.45-13.82)	1.5 (0.84-2.68)
Υπερπλασία προστάτη (n, % στους άντρες)	6, 7.5	0,0	0.007	-	2.35 (1.98-2.79)
Χρόνιες ηπατικές/νεφρικές παθήσεις (n, %)	6, 5	0, 0	0,008	-	2.28 (1.99-2.62)
Χρόνιες ανοσολογικές και/ή αιματολογικές νόσοι ^ (n, %)	5, 4.2	1, 0.7	0.094	6.31 (072-54.82)	1.88 (1.29-2.77)
Άλλα^^ (n, %)	15, 12.6	1, 0.7	<0.001	20.77 (2.7-159.71)	2.36 (1.84-2.71)

Πίνακας 9. Συχνότητα γονοτύπων (TT, TA, AA) του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8* με την ανάγκη νοσηλείας στους ασθενείς της μελέτης.

	Νοσηλεία			
	Yes		No	
Αγρίου Τύπου (TT)	52	43.7%	51	35.2%
Ετερόζυγοι (TA)	53	44.5%	77	53.1%
Ομόζυγοι (AA)	14	11.8%	17	11.7%

Πίνακας 10. Συσχέτιση πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8* με την ανάγκη νοσηλείας στους ασθενείς της μελέτης.

	Νοσηλεία		Univariate analysis		
	Yes	No	<i>p</i> #	Odds Ratio (OR)	Relative Risk (RR)
Αγρίου Τύπου (TT)	52	51	Reference Group		
Ετερόζυγοι (TA)	53	77	0.139	0,67 (0.4-1.14)	0.8 (0.61-1.07)
Ομόζυγοι (AA)	14	17	0.603	0.80 (0.36-1.80)	0.89 (0.58-1.38)
Ετερόζυγοι (AT), Ομόζυγοι (AA)	67	94	0.158	0.70 (0.42-1.15)	0.82 (0.63-1.07)

Ως ομάδα ελέγχου σε όλες τις συσχετίσεις του Πίνακα 10 ορίστηκαν τα αγρίου τύπου άτομα, τα οποία ήταν 52 αυτά που είχαν ανάγκη για νοσηλεία και 51 αυτά που δεν χρειάστηκαν. Οι συσχετίσεις έγιναν ομοίως με αυτές του πίνακα 7.

Πίνακας 11. Συσχέτιση του πυρετού με κλινικές παραμέτρους στους ασθενείς της μελέτης.

	Πυρετός		Univariate analysis		
	Yes 120	No 144	<i>p</i> [#]	Odds Ratio (OR)	Relative Risk (RR)
Φύλο (♂/♀)	87/33	93/51	0.169	1.45 (0.85-2.45)	1.23 (0.91-1.67)
Ηλικία (διάμεση ± SD), y	53.5, 31	32, 17	<0.001		
Συννοσηρότητα (n, %)	69, 57.5	25, 17.4	<0.001	6.44 (3.67-11.31)	2.45 (1.89-3.17)
Παχυσαρκία (n, %)	27, 22.5	4, 2.8	<0.001	10.16 (3.44-29.99)	2.18 (1.77-2.69)
Υπέρταση (n, %)	42, 35.0	7, 4.9	<0.001	10.54 (4.51-24.58)	2.36 (1.91-2.91)
Χρόνια Καρδιακή Νόσος (n, %)	8, 6.7	3, 2.1	0,118	3.36 (0.87-12.95)	1.64 (1.11-2.42)
Χρόνια εγκεφαλοαγγειακή νόσος** (%)	7, 5.8	1, 0.7	0.025	8.86 (1.07-73.05)	1.98 (1.47-2.66)
Χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις*** (n, %)	18, 15.0	2, 1.4	<0.001	12.53 (2.84-55.2)	2.15 (1.75-2.65)
Δυσλιπιδαιμία (n, %)	14, 11.7	5, 3.5	0,010	3.67 (1.28-10.51)	1.7 (1.26-2.31)
Σακχαρώδης Διαβήτης (n, %)	14, 11.7	7, 4.9	0,042	2.58 (1.0-6.63)	1.53 (1.09-2.13)
Υποθυρεοειδισμός (n, %)	8, 6.7	4, 2.8	0.149	2.5 (0.73-8.52)	1.5 (0.98-2.29)
Κακοήθειες(n, %)	3, 2.5	3, 2.1	1.0	1.2 (0.24-6.08)	1.1 (0.49-2,48)
Υπερπλασία προστάτη (n, % στους άντρες)	5, 5.7	1, 1.1	0.108	5.61 (0.64-49.01)	1.77 (1.19-2.61)
Χρόνιες ηπατικές/νεφρικές παθήσεις (n, %)	4, 3.3	2, 1.4	0.416	2.45 (0.44-13.6)	1.48 (0.83-2.65)
Χρόνιες ανοσολογικές και/ή αιματολογικές νόσοι ^ (n, %)	3, 2.5	3, 2.1	1.0	1.2 (0.24-6.08)	1.1 (0.49-2.48)
Άλλα^^ (n, %)	13, 10.8	3, 2.1	0.004	5.71 (1.59-20.54)	1.88 (1.43-2.48)

Οι ασθενείς με παχυσαρκία, υπέρταση, χρόνια εγκεφαλοαγγειακή νόσο, χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις, δυσλιπιδαιμία ή σακχαρώδη διαβήτη συσχετίστηκαν σημαντικά με χειρότερο φαινότυπο COVID-19 (Πίνακας 11). Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι η παρουσία του αλληλομόρφου A (rs2043211) και τα ετερόζυγα άτομα (γονότυπος TA) συσχετίστηκαν σημαντικά με προστασία στην εμφάνιση πυρετού(Πίνακας 13).

Πίνακας 12. Συχνότητα γονοτύπων (TT, TA, AA) του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8* με την ανάπτυξη πυρετού στους ασθενείς της μελέτης.

	Πυρετός			
	Yes		No	
Αγρίου Τύπου (TT)	58	48.3%	45	31.2%
Ετερόζυγοι (TA)	48	40%	82	57%
Ομόζυγοι (AA)	14	11.7%	17	11.8%

Πίνακας 13. Συσχέτιση του πυρετού με τον πολυμορφισμό rs2043211 του γονιδίου *CARD8* στους ασθενείς της μελέτης.

	Πυρετός		Univariate analysis		
	Yes	No	<i>p</i> #	Odds Ratio (OR)	Relative Risk (RR)
Αγρίου Τύπου (TT)	58	45	Reference Group		
Ετερόζυγοι (TA)	48	82	0.003	0.45 (0.27-0.77)	0.66 (0.50-0.87)
Ομόζυγοι (AA)	14	17	0.275	0.64 (0.29-1.43)	0.80 (0.53-1.23)
Ετερόζυγοι (AT), Ομόζυγοι (AA)	62	99	0.005	0.49 (0.29-0.80)	0.69 (0.53-0.87)

Ως ομάδα ελέγχου σε όλες τις συσχετίσεις του Πίνακα 13 ορίστηκαν τα αγρίου τύπου άτομα, τα οποία ήταν 58 αυτά που εμφάνισαν πυρετό και 45 αυτά που δεν εμφάνισαν. Οι συσχετίσεις έγιναν ομοίως με αυτές του πίνακα 7.

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση του λειτουργικού πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8*, ενός πολυμορφισμού με ιδιαίτερη σημασία σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο διαβήτης, με την εκδήλωση συμπτωμάτων και την πρόγνωση της ασθένειας σε 4 ομάδες νοσούντων ποικίλης σοβαρότητας νόσου. Αρκετοί παράγοντες, όπως το φύλο, η ηλικία, οι υποκείμενες συννοσηρότητες, συμπεριλαμβανομένης της σοβαρής παχυσαρκίας, του σακχαρώδη διαβήτη, της χρόνιας καρδιακής και αναπνευστικής νόσου και πρόσθετων χρόνιων διαταραχών - επηρέασαν σημαντικά τον φαινότυπο της λοίμωξης SARS-CoV-2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με την παρουσία του συμπτώματος του πυρετού.

Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με μεγαλύτερη ηλικία, αλλά και εκείνοι με υποκείμενες συννοσηρότητες, συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας, του σακχαρώδους διαβήτη και των χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο σοβαρής ασθένειας ως αποτέλεσμα του COVID-19 (41-43). Επιπλέον, οι ηλικιωμένους ασθενείς, με παραπάνω από 2 υποκείμενα νοσήματα και χαμηλή λειτουργία ανοσοποιητικού συστήματος είναι δύσκολο να ανταποκριθούν ικανοποιητικά σε επιβλαβείς ξένους εισβολείς (όπως ο SARS-CoV-2) και είναι πιο επιρρεπείς σε επιπλοκές της νόσου (44).

Έχει παρουσιαστεί, σε πολλές μελέτες, ότι ο πολυμορφισμός rs2043211 του γονιδίου *CARD8* συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ή/και προστασία έναντι διάφορων ασθενειών, όπως η καρδιαγγειακή νόσο, η αθηροσκληρωτική στεφανιαία νόσος και φλεγμονώδεις νόσοι, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (45-47). Στην συγκεκριμένη μελέτη, είναι εμφανές ότι διάφοροι παράγοντες συννοσηρότητας συσχετίζονται σημαντικά με χειρότερο φαινότυπο COVID-19. Ακόμη πολλές από αυτές τις συννοσηρότητες, σχετίζονται με τόσο βαριά εξέλιξη της νόσου, που οδηγούν στην ανάπτυξη πνευμονίας και κρίνουν απαραίτητη την ανάγκη για νοσηλεία.

Επιπλέον, έχει γίνει γνωστό ότι τα φλεγμονοσώματα συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της νόσου COVID-19 και πιθανώς να αποτελούν δείκτη σοβαρότητας της νόσου και πιθανό θεραπευτικό στόχο για τον SARS-CoV-2, αφού ενεργοποιούνται έντονα σε νοσηλευμένα άτομα που μολύνονται από τον ιό (48). Ασθενείς με μειωμένη ανοσοποιητική ικανότητα μπορεί να υποδείξουν μια απορυθμισμένη φλεγμονώδη δραστηριότητα του φλεγμονοσώματος NLRP3, που οδηγεί σε σοβαρή έκβαση της νόσου COVID-19 (49).

Μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Βραζιλία, σε ασθενείς που προσβλήθηκαν από τον ιό SARS-CoV-2, συσχετίστηκε η έκβαση της νόσου σε συνδυασμό με διάφορους

πολυμορφισμούς που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3, συμπεριλαμβανομένου του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8*. Η μελέτη έγινε σε ασθενείς που χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων που εμφάνισαν, ενώ στη συγκεκριμένη χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες. Επίσης, η πλειοψηφία των ασθενών της μελέτης ανήκε στην κατηγορία που εμφάνιζε σοβαρή εμφάνιση της νόσου. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι, ασθενείς με γονότυπο TA και αυτοί που είναι φορείς του αλληλομόρφου T συσχετίστηκαν με την προστασία έναντι της σοβαρότητας της νόσου (50). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, δείχνουν ότι ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο A και οι ασθενείς με γονότυπο TA εμφανίζουν προστασία στην εμφάνιση του πυρετού, όταν έχουν προσβληθεί από τον SARS-CoV-2.

Επιπλέον, όπως αναφέρεται, τα αυξημένα ποσοστά έκκρισης IL-1β στο πλάσμα σχετίζονται με την εκδήλωση πυρετού (51). Επομένως, συμφωνεί με τα ευρήματα της μελέτης μας που υποδηλώνουν την συσχέτιση του συμπτώματος του πυρετού με την ύπαρξη του υπολειπόμενου αλληλομόρφου.

Σε μελέτη που έγινε σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό και συγκεκριμένα σε άτομα από Γερμανία, Ολλανδία και Ουγγαρία, που έπασχαν από τη νόσο του Crohn, μια νόσος που προκαλείται από χρόνια φλεγμονή, δεν φαίνεται να σχετίζεται με τον πολυμορφισμό (52). Ωστόσο, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη έχει αποδειχθεί ότι το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο μπορεί να προσφέρει προστατευτικό ρόλο στους ασθενείς με αυτή τη νόσο (53).

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθούν διάφοροι περιορισμοί που διαπιστώθηκαν στην παρούσα έρευνα. Αρχικά, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σχετικά μικρό αριθμό δείγματος. Πιθανώς, απαιτείται μελέτη μεγάλου αριθμού ασθενών για την επιβεβαίωση των ευρημάτων, όπως επίσης και η μελέτη και άλλων πολυμορφισμών ανοσογονιδίων που μπορεί να επηρεάσουν τη βαρύτητα και την πρόγνωση της νόσου.

Α. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021, 10: 587269.
2. Yesudhas, D., Srivastava, A. & Gromiha, M.M. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection* 49. 2021, 199–213.
3. Guo, YR., Cao, QD., Hong, ZS. et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Med Res* 2020, 7:11.
4. Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell.* 2021, 184(19):4848-4856.
5. Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020, 26: 450–452.
6. Lytras Spyros, Xia Wei, Hughes Joseph, Jiang Xiaowei, Robertson David L. The animal origin of SARS-CoV-2. *Science.* 2021, 968-970.
7. Malaiyan, J, Arumugam, S, Mohan, K, Gomathi Radhakrishnan, G. An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues. *J Med Virol.* 2021, 93: 499– 505.
8. Huang, Y., Yang, C., Xu, Xf. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin.* 2020, 41: 1141–1149.
9. Li DD, Li QH. SARS-CoV-2: vaccines in the pandemic era. *Mil Med Res.* 2021, 8(1):1-15
10. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate Medical Journal.* 2020, 96:753-758.
11. Oliveira Daniela S., Medeiros Nayara I., Gomes Juliana A.S. Immune response in COVID-19: What do we currently know?. *Microbial Pathogenesis.* 2020, Volume 148.
12. Marks M, O'Hara G, Houlihan C, Bell L, Heightman M, Hart N. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Encyclopedia of Respiratory Medicine.* 2022, 231–42.
13. Alsharif W., Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review, *Radiography,* 2021, Volume 27, Issue 2, Pages 682-687.

14. Speletas Matthaios, Kyritsi Maria A., Vontas Alexandros, Theodoridou Aikaterini, Chrysanthidis Theofilos, Hatzianastasiou Sophia, Petinaki Efthimia, Hadjichristodoulou Christos. Evaluation of Two Chemiluminescent and Three ELISA Immunoassays for the Detection of SARS-CoV-2 IgG Antibodies: Implications for Disease Diagnosis and Patients' Management. *Frontiers in Immunology*. 2020, Volume 11.
15. Alturki SO, Alturki SO, Connors J, Cusimano G, Kutzler MA, Izmirly AM, et al. The 2020 Pandemic: Current SARS-CoV-2 Vaccine Development. *Front Immunol*. 2020, 11:1-13.
16. Kumar Samudrala P, Kumar P, Choudhary K, Thakur N, Wadekar GS, Dayaramani R, Agrawal M, Alexander A. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *Eur J Pharmacol*. 2020, 883:173375
17. Perico L, Benigni A, Casiraghi F, Ng LFP, Renia L, Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol*. 2021, 17(1):46-64.
18. Almejdi AM, Khoder G, Alchakee AS, Alsayyid AT, Sarg NH, Soliman SSM. SARSCoV-2 spike protein: pathogenesis, vaccines, and potential therapies. *Infection*. 2021, 49(5):855-76.
19. Kaddoura M, AlIbrahim M, Hijazi G, Soudani N, Audi A, Alkalamouni H, et al. COVID-19 Therapeutic Options Under Investigation. *Front Pharmacol*. 2020, 11:1-24.
20. Frederiksen LSF, Zhang Y, Foged C, Thakur A. The Long Road Toward COVID-19 Herd Immunity: Vaccine Platform Technologies and Mass Immunization Strategies. *Front Immunol*. 2020, 11:1-26.
21. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015,(7):677-87.
22. Schroder Kate, Tschopp Jurg. The Inflammasomes. *Cell*. 2010, Volume 140, Issue 6, Pages 821-832.
23. Broz, P., Dixit, V. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016, 16:407-420.
24. Turner, C.M., Arulkumaran, N., Singer, M. et al. Is the inflammasome a potential therapeutic target in renal disease?. *BMC Nephrol*. 2014 15:21.
25. Zhao Chunyuan, Zhao Wei. NLRP3 Inflammasome—A Key Player in Antiviral Responses. *Frontiers in Immunology*. 2020, Vol.11, p.211.
26. Berg DFvd, Velde AAT. Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated. *Front Immunol*. 2020, 11:1580.

27. Jacobs, S.R. and Damania, B. NLRs, inflammasomes, and viral infection. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012, 92: 469-477.
28. Deepika Sharma, Thirumala-Devi Kanneganti. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*. 2016, 213 (6): 617–629.
29. Freeman TL, Swartz TH. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front Immunol*. 2020, 11: 1518.
30. Jamilloux Yvan, Henry Thomas, Belot Alexandre, Viel Sébastien, Fauter Maxime, El Jammal Thomas, Walzer Thierry, François Bruno, Sève Pascal. Should we stimulate or suppress immune responses in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions. *Autoimmunity Reviews*. 2020, 19:7.
31. Ito, S., Hara, Y. & Kubota, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther*. 2014, 16:R52.
32. Paramel, G.V., Karadimou G., Eremo, A.G. et al. Expression of CARD8 in human atherosclerosis and its regulation of inflammatory proteins in human endothelial cells. *Sci Rep*. 2020, 10:19108.
33. Chui AJ, Griswold AR, Taabazuing CY, et al. Activation of the CARD8 Inflammasome Requires a Disordered Region. *Cell Rep*. 2020, 33(2):108264.
34. Fenini G, Karakaya T, Hennig P, Di Filippo M, Beer HD. The NLRP1 Inflammasome in Human Skin and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2020, 21(13):4788.
35. Razmara, Marjaneh et al. CARD-8 Protein, a New CARD Family Member That Regulates Caspase-1 Activation and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277:16:13952 – 13958.
36. Linder A, Bauernfried S, Cheng Y, et al. CARD8 inflammasome activation triggers pyroptosis in human T cells. *EMBO J*. 2020, 39(19):e105071.
37. Wang Q, Gao H, Clark KM, et al. CARD8 is an inflammasome sensor for HIV-1 protease activity. *Science*. 2021, 371(6535):eabe1707.
38. Ito, S., Hara, Y. & Kubota, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther*. 2014, 16:R52.
39. Xu H, Li B. Relationship of CARD8 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Ankylosing Spondylitis: A Case-Control Study. *Med Sci Monit*. 2020, 26:e916935.
40. Tsetsos F., Roumeliotis A., Tsekmekidou X., Alexouda S., Roumeliotis S., Theodoridis M., Thodis E., Panagoutsos S., Papanas N., Papazoglou D., Kotsa K., Yovos J. G., Maltezos E.,

Passadakís P., Paschou P., & Georgitsi M. Genetic variation in CARD8, a gene coding for an NLRP3 inflammasome-associated protein, alters the genetic risk for diabetic nephropathy in the context of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 2020, 17(6):1479164120970892.

41. Chakinala RC, Shah CD, Rakholiya JH, et al. COVID-19 Outcomes Amongst Patients With Pre-existing Cardiovascular Disease and Hypertension. *Cureus*. 2021, 13(2):e13420.

42. Li Y, Ashcroft T, Chung A, et al. Risk factors for poor outcomes in hospitalised COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2021, 11:10001.

43. Longmore DK, Miller JE, Bekkering S, et al. Diabetes and Overweight/Obesity Are Independent, Nonadditive Risk Factors for In-Hospital Severity of COVID-19: An International, Multicenter Retrospective Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2021, 44(6):1281-1290.

44. Cheng S, Zhao Y, Wang F, Chen Y, Kaminga AC, Xu H. Comorbidities' potential impacts on severe and non-severe patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021, 100(12):e24971.

45. Huijuan Huang , Qi Bi , Heng Wei , Beibei Luo , Yan He. Association between caspase recruitment domain-containing protein 8 rs2043211 polymorphism and cardiovascular disease susceptibility: A systematic review and meta-analysis. *Anatol J Cardiol*. 2018, 20: 70-76

46. Paramel G. V., Folkersen L., Strawbridge R. J. et al. "CARD8 gene encoding a protein of innate immunity is expressed in human atherosclerosis and associated with markers of inflammation. *Clinical Science*. 2013, 125:401–407.

47. Juan Liu, Yan-Yan Liu, Jie Liu, Bao-Zhu Li, Han Cen, Wang-Dong Xu, Rui-Xue Leng, Hai-Feng Pan & Dong-Qing Ye. Association between CARD8 rs2043211 Polymorphism and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis, *Immunological Investigations*. 2015, 44:3, 253-264.

48. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med*. 2021, 218(3):e20201707.

49. Van den Berg Daan F., Te Velde Anje A., Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated. *Frontiers in Immunology*. 2020, Volume 11.

50. De Sá NBR, Neira-Goulart M, Ribeiro-Alves M, et al. Inflammasome Genetic Variants Are Associated with Protection to Clinical Severity of COVID-19 among Patients from Rio de Janeiro, Brazil. *Biomed Res Int*. 2022, 2022:9082455.

51. Lee JK, Kim SH, Lewis EC, Azam T, Reznikov LL, Dinarello CA. Differences in signaling pathways by IL-1beta and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101(23):8815-8820.

52. Büning C, Schmidt HH, Molnár T, et al. No association of the CARD8 (TUCAN) c.30T>A (p.C10X) variant with Crohn's disease: a study in 3 independent European cohorts. *Inflamm Bowel Dis.* 2008, 14(3):332-337.
53. Zhang ZT, Ma XJ, Zong Y, Du XM, Hu JH, Lu GC. Is the CARD8 rs2043211 polymorphism associated with susceptibility to Crohn's disease? A meta-analysis. *Autoimmunity.* 2015, 48(8):524-531.

