



Research Article

Investigating the Relationship between C-159T Polymorphism in *CD14* Gene Promoter and Disease Severity in 2019 Corona Virus Patients

Arezoo Akmal¹, Khadije Shahrokhbabadi^{2*}, Hossein Dehghani³

¹ MSc, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

³ Assistant Professor, Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

***Corresponding author:** Khadije Shahrokhbabadi, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. E-mail: shahrokhbabady@yahoo.com

DOI: [10.32592/nkums.14.4.23](https://doi.org/10.32592/nkums.14.4.23)

How to Cite this Article:

Akmal A, Shahrokhbabadi Kh, Dehghani H. Investigating the Relationship between C-159T Polymorphism in *CD14* Gene Promoter and Disease Severity in 2019 Corona Virus Patients. J North Khorasan Univ Med Sci. 2022;14(4):23-29. DOI: [10.32592/nkums.14.4.23](https://doi.org/10.32592/nkums.14.4.23)

Received: 13 July 2022

Accepted: 29 November 2022

Keywords:

C-159T polymorphism
CD14 gene
Coronavirus

Abstract

Introduction: Considering the effectiveness of polymorphisms in the occurrence of respiratory diseases, it seems that these genetic variations in viral and microbial receptors can be effective in the occurrence and progression of the disease. The present study aimed to assess the relationship between the C-159T polymorphism in the *CD14* gene promoter and the severity of the disease in Covid-19 patients during 2020-2021.

Method: The subjects were randomly selected from subjects referred for polymerase chain reaction (PCR) and studied in five groups: healthy, outpatient, non-critically ill hospitalized, critically ill hospitalized, and deceased patients. The peripheral blood (3ml) was obtained from all patients and DNA was extracted. Thereafter, C-159T polymorphism in the *CD14* gene promoter was determined by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. The genotype frequency was determined in terms of heterozygosity, homozygosity, and mutant regarding polymorphism. The data were analyzed in SPSS software (version 21) ($P < 0.05$).

Results: The results pointed out that the most common C-159T polymorphism was the CT polymorphism, which was observed in 107 (51.0%) subjects and was significantly higher than other polymorphisms in all PCR⁻ and PCR⁺ participants. This difference was not significant for deceased people.

Conclusion: According to the results pointing out that the C-159T polymorphism is effective in causing the disease, as well as the significant relationship between the TT and CT genotypes with the coronavirus, the probability of developing the disease is higher in T allele carriers. Therefore, it is suggested that CT polymorphism in *CD14* gene promoter is considered an important prognosis in coronavirus disease.



بررسی ارتباط پلی مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14 در شدت بیماری در مبتلایان به کرونا ویروس ۲۰۱۹

آرزو اکملی^۱، خدیجه شاهرخ آبادی^{۲*}، حسین دهقانی^۳

^۱ کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
^۲ استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
^۳ استادیار ژنتیک پزشکی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
^{*} نویسنده مسئول: خدیجه شاهرخ آبادی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. ایمیل: shahrokhahady@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.14.4.23

چکیده مقدمه: با توجه به اینکه پلی مورفیسم‌ها در بروز بیماری‌های تنفسی مؤثر شناخته شده‌اند، به نظر می‌رسد که این تغییرات ژنتیکی در گیرنده‌های ویروسی و میکروبی در بروز و پیشرفت بیماری مؤثر باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط پلی مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14 با شدت بیماری در مبتلایان به کروناویروس ۲۰۱۹، طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ انجام شد.	تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸
روش کار: نمونه‌ها از بین مراجعه‌کنندگان برای انجام تست PCR به‌صورت تصادفی و در دسترس انتخاب شدند و در ۵ گروه افراد سالم، مبتلایان سرپایی، مبتلایان بستری غیربدهال، مبتلایان بستری بدحال و فوتی بررسی شدند. از تمامی افراد ۳ میلی‌لیتر خون محیطی تهیه و DNA استخراج شد. سپس، با انجام PCR-RFLP، پلی مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14 مشخص شد. فراوانی ژنوتیپی نمونه‌ها از نظر هتروزیگوتی، هموزیگوتی و موتانت در پلی مورفیسم تعیین شد. داده‌ها در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ با آزمون‌های آماری در سطح معناداری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.	واژگان کلیدی: پلی مورفیسم C-159T ژن CD14 کروناویروس
یافته‌ها: نتایج نشان داد بیشترین پلی مورفیسم C-159T در پروموتور ژن CD14، پلی مورفیسم CT بود که در ۱۰۷ نفر (۵۱ درصد) مشاهده شد و در تمامی افراد PCR⁺ و PCR⁺ به‌طور معناداری بیشتر از سایر پلی مورفیسم‌ها بود، اما در افراد فوت‌شده این تفاوت معنادار نبود. نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج که پلی مورفیسم C-159T در ایجاد بیماری مؤثر است و همچنین رابطه معنادار بین ژنوتیپ TT و CT با کروناویروس، احتمال ایجاد بیماری در کریرهای آلل T بیشتر است. لذا، پیشنهاد می‌شود پلی مورفیسم CT موجود در پروموتور ژن CD14 به‌عنوان یک پیش‌آگهی مهم در بیماری کروناویروس در نظر گرفته شود.	

مقدمه

میزان بروز و مرگ‌ومیر ناشی از nCoV-2019 بسیار بیشتر از ویروس SARS-CoV و آنفلوآنزا A (H1N1) است [۵]. طرح کلی در این بیماری مشابه چیزی است که پیش از این طی ابتلا به گونه‌های ویروس SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) و MERS (Middle East Respiratory Syndrome) اتفاق افتاده بود و نشان‌دهنده این واقعیت است که گیرنده‌های ACE2 در بیماری‌زایی و ورود ویروس به سلول میزبان اهمیت دارند [۲، ۶]. مهم‌ترین دلیلی که سارس و مرس نتوانستند همچون کووید ۱۹، نتایج کشنده و ویران‌کننده داشته باشند، تا حد زیادی به این ویژگی مربوط بود که این دو ویروس به‌راحتی منتشر نمی‌شدند. از طرف دیگر، کروناویروس از آنزیم تبدیل‌کننده آنزوتانسین ۲ (ACE2) به‌عنوان گیرنده برای ورود به سلول میزبان انسانی استفاده می‌کند. به این دلیل است که توانایی

ویروس جدید کرونا که به آن SARS-CoV-2 یا nCoV-2019 گفته می‌شود، عامل بیماری کروناویروس یا کووید ۱۹ (Coronavirus Disease 2019) است که باعث ایجاد عفونت‌های حاد تنفسی و فیبروز بافت ریه می‌شود [۱]. این بیماری در اواخر سال ۲۰۱۹ در ووهان چین شروع شد و در حال حاضر به‌صورت پاندمی در سراسر جهان گسترش یافته است [۲]. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، nCoV-2019 بیشتر کشورهای جهان را آلوده کرده است و بیش از ۱/۵ میلیون نفر در اثر ابتلا به این ویروس جان خود را از دست داده‌اند [۳]. آمار در ایران نشان می‌دهد این ویروس با سرعت بسیار زیادی در حال گسترش است و تا تاریخ ۹ اکتبر ۲۰۲۲ (۱۷ مهرماه ۱۴۰۱)، ۷ میلیون و ۵۵۱ هزار و ۶۸۷ مورد ابتلا و بیش از ۱۴۴ هزار و ۴۸۶ مورد مرگ ناشی از ابتلا به این ویروس گزارش شده است [۴]. آمار جهانی در رابطه با بیماری کووید ۱۹ نشان می‌دهد

علائم بیماری کروناویروس برای اولین بار در ایران انجام شد.

روش کار

مطالعه حاضر از نوع مقطعی بود که روی مبتلایان به بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ استان خراسان جنوبی و طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام شد. معیارهای ورود به مطالعه در گروه کنترل شامل مبتلا نبودن به بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ و در گروه‌های دیگر شامل تأیید قطعی و آزمایشگاهی تست COVID-19-PCR بود. علاوه بر داشتن همه شرایط فوق، تمام نمونه‌های وارد شده در این مطالعه (مورد و شاهد)، در بازه سنی ۱۸ تا ۷۵ سال بودند. موارد ذیل شرایط خروج از مطالعه در نظر گرفته شدند: تمایل نداشتن به شرکت در مطالعه، افراد با جواب PCR منفی، افراد کمتر از ۱۸ سال و افرادی که ۲ هفته از زمان ابتلای آن‌ها گذشته بود.

نمونه‌ها از بین مراجعه‌کنندگان برای انجام تست PCR به صورت تصادفی انتخاب و در ۵ گروه بررسی شدند. گروه‌های مطالعه شامل ۱: گروه سالم کنترل (۴۵ نفر)، ۲: گروه بیماران مبتلا به بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ که علائم خفیفی داشتند و به صورت سرپایی بهبود یافتند (۵۰ نفر)، ۳: گروه بیماران مبتلا به بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ با علائم متوسط و سابقه بستری در بخش عفونی که بهبود یافتند (۵۰ نفر)، ۴: گروه بیماران مبتلا به بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ که علائم بسیار شدید و سابقه بستری در ICU داشتند و بهبود یافتند (۴۵ نفر) و ۵: گروه بیماران مبتلا به بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ که در اثر این ویروس جان خود را از دست دادند (۲۰ نفر). این تقسیم‌بندی‌ها زیر نظر همکار بالینی انجام شد.

از تمامی افراد بررسی‌شده، پس از گرفتن رضایت آگاهانه، ۳ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد. نمونه‌های خون در لوله حاوی ضدانعقاد EDTA ذخیره و تا زمان استخراج DNA و سایر تست‌های مولکولی، در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اطلاعات دموگرافیک و علائم بالینی شرکت‌کنندگان در چک‌لیست ثبت شد. پس از پایان نمونه‌گیری، به منظور تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم، پلی‌مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14، DNA تمام نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA، شرکت دنازیست آسیا (Denazistr Asia, Iran) استخراج شد. پس از استخراج DNA از خون حاوی EDTA، با استفاده از پرایمرهای پیشرو و پیرو (مطابق جدول ۱) و سایر مواد لازم برای واکنش PCR (طبق پروتکل شرکت Gene Direx و شرکت Sina clon)، تست PCR به منظور تعیین پلی‌مورفیسم C-159T در پروموتور CD14 بیماران و افراد سالم انجام شد. سپس، با استفاده از آنزیم محدودالایر AvaII (شرکت Thermo Fisher Scientific)، تست RFLP روی محصول PCR گذاشته شد و در نهایت با انجام تست الکتروفورز محصول RFLP روی ژل آگارز، ژنوتیپ تمام افراد از نظر

انتقال از فردی به فرد دیگر در کروناویروس بسیار افزایش یافته است [۷،۸].

شناسایی عوامل مؤثر در پیشرفت بیماری یا زمینه‌ساز بروز بیماری با علائم شدیدتر به شناسایی روند پاتوژنز و اتخاذ سیاست‌های درمانی مناسب کمک می‌کند [۳]. مطالعات مختلفی تأثیر جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌ها را در بروز بیماری‌های تنفسی نشان دادند که این پلی‌مورفیسم‌های مختلف در گیرنده‌های ویروسی و میکروبی در بروز و پیشرفت بیماری مؤثر هستند [۹-۱۴]. منطقه‌ای خاص در کروموزوم ۵ (5q31-32) وجود دارد که شامل مجموعه‌ای از ژن‌های سایتوکاین IL4، IL9، IL13 و GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) است که در تنظیم پاسخ‌های ایمنولوژی نقش مهمی ایفا می‌کنند [۱۲،۱۵].

از سوی دیگر، ژن مولد CD14 نیز در جایگاه 5q31-32 قرار دارد و این جایگاه دو نوع پروتئین را کد می‌کند [۱۳]. پروتئین حاصل از ژن CD14، بخشی از دستگاه ایمنی ذاتی محسوب می‌شود و به دو شکل در بدن انسان مشاهده می‌شود. یک فرم آن متصل به غشای سلول توسط یک پایه گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (mCD14) که روی سطح نوتروفیل‌ها، مونوسیت و ماکروفاژها قرار دارد و دیگری فرم محلول در سرم (sCD14) است [۱۴]. همچنین، CD14 یک گیرنده مهم برای لیپوپلی‌ساکارید و اندوتوکسین‌های استنشاقی است. لیپوپلی‌ساکارید و بخش‌هایی از دیواره سلولی باکتریایی و ویروسی می‌توانند APCها (سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن) را از طریق sCD14 (soluble Cluster Differentiation 14) در راستای تولید اینترلوکین‌ها تحریک کنند [۱۱]. مطالعات نشان داده است سطح بالایی از sCD14 در سرم یا تراکم زیادی از mCD14 باعث پاسخ‌های قوی در تولید اینترلوکین‌های مختلف توسط سلول‌های APC می‌شود که ایجاد سیگنال قوی آن‌ها باعث بلوغ Th1 خواهد شد [۱۳]. پیشنهاد شده است تغییر در سطح بیان ژن CD14 در نسبت Th1 به Th2 تأثیر می‌گذارد و در نتیجه بر پاسخ‌های التهابی و فنوتیپ التهاب مؤثر است [۱۴].

در سطح ژنتیکی انتقال نوکلئوتید C به T در موقعیت ۱۵۹ در منطقه پروموتور ژن CD14 شناخته شده است [۹]. این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی دارای عملکرد C-159T، با تغییر سطح بیان CD14 در بیماران با نقص‌های سیستم ایمنی در جمعیت‌های مختلف قومی در ارتباط است و تصور می‌شود تغییرات ژنتیکی در CD14، به خصوص پلی‌مورفیسم واقع در منطقه پروموتور، تأثیرات عملکردی را به دنبال داشته و تغییر در پاسخ‌های ایمنی افراد مبتلا به کروناویروس جدید را دربرداشته باشد [۱۳].

بنابراین، با توجه نبود مطالعه‌ای در ایران که تأثیر پلی‌مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14 را با شدت بروز علائم بیماری کروناویروس بررسی کرده باشد، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14 با شدت بروز

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد نیاز در واکنش (شرکت سازنده Metabion)

Forward	5' GTG CCA ACA GAT GAG GTT CAC 3'
Reverse	5' GCC TCT GAC AGT TTA TGT AAT 3'

یافته‌ها

در مطالعه حاضر در مجموع ۲۱۰ نفر شرکت کردند. میانگین سنی افراد شرکت‌کننده $52/25 \pm 20/95$ سال و میانگین شاخص توده بدنی آن‌ها $25/38 \pm 5/24$ کیلوگرم بر مجذور قد بود. ۱۰۹ نفر (۵۱/۹ درصد) از شرکت‌کنندگان مرد بودند، ۱۷۷ نفر (۸۴/۳ درصد) متاهل بودند، گروه خونی ۵۲ نفر (۲۴/۸ درصد) O+ بود و بیشترین پلی‌مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14، پلی‌مورفیسم CT بود که در ۱۰۷ نفر (۵۱ درصد) مشاهده شد.

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد پلی‌مورفیسم CT به‌طور معناداری در تمام افراد PCR، بیماران سرپایی، بستری غیربدحال و بستری بدحال بیشتر از سایر پلی‌مورفیسم‌ها (CC و TT) بود، اما در گروه فوتی‌ها تفاوت انواع پلی‌مورفیسم معنادار نبود.

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد بین متغیرهای جنسیت، سابقه بیماری، وضعیت تأهل و گروه خونی با نوع پلی‌مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14 ارتباط معناداری وجود ندارد.

هموزیگوتی، هتروزیگوتی و جهش، در خصوص پلی‌مورفیسم مذکور مشخص شدند. پلی‌مورفیسم قطعات طولی محدودشونده یا آزمایشی RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) روشی است که برای تجزیه و تحلیل الگوهای منحصربه‌فرد در قطعات DNA به‌منظور تمایز ژنتیکی بین افراد، توسط آنزیم‌های محدودالتر انجام می‌شود.

داده‌ها پس از جمع‌آوری در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ تجزیه و تحلیل شدند. برای توصیف متغیرهای کمی از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی و برای توصیف متغیرهای کیفی از جداول فراوانی و نمودارهای مناسب استفاده شد. به‌منظور تحلیل اطلاعات، ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی و مشخص شد متغیرهای وزن در تمامی گروه‌های مطالعه و متغیر قد در گروه PCR منفی و بستری غیر بدحال و همچنین متغیر BMI در گروه سرپایی و فوتی توزیع نرمال ندارند. به‌منظور مقایسه و بررسی تفاوت متغیرها در گروه‌های مطالعه از آزمون تحلیل واریانس و کای اسکور استفاده شد. برای تمام فرضیه‌ها $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

جدول ۲. بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14 در گروه‌های مختلف

متغیر	CC	CT	TT	نتیجه آزمون Chi-Square	P
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	آماره آزمون	
PCR	۱۶ (۳۵/۶)	۲۵ (۵۵/۶)	۴ (۸/۸)	۱۴/۸۰	*۰/۰۰۱
سرپایی	۲۰ (۴۰/۰)	۲۴ (۴۸/۰)	۶ (۱۲/۰)	۱۰/۷۲	*۰/۰۰۵
بستری غیر بدحال	۲۰ (۴۰/۰)	۲۴ (۴۸/۰)	۶ (۱۲/۰)	۱۰/۷۲	*۰/۰۰۵
بستری بدحال	۱۰ (۲۲/۲)	۲۵ (۵۵/۶)	۱۰ (۲۲/۲)	۱۰/۰۰	*۰/۰۰۷
فوتی	۲ (۱۰/۰)	۹ (۴۵/۰)	۹ (۴۵/۰)	۴/۹۰	۰/۰۸۶

جدول ۳. بررسی ارتباط متغیرهای کیفی با فراوانی پلی‌مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14

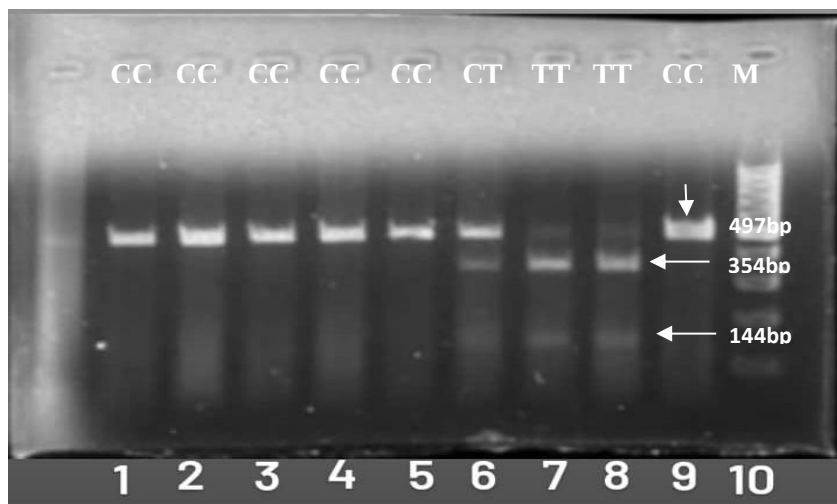
متغیر	CC	CT	TT	نتیجه آزمون Chi-Square	P
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	آماره آزمون	
جنسیت	مرد	۲۹ (۴۲/۶)	۵۵ (۵۱/۴)	۱۷ (۴۸/۶)	۱/۲۸
	زن	۳۹ (۵۷/۴)	۵۲ (۴۸/۶)	۱۸ (۵۱/۴)	
سابقه بیماری	خیر	۴۴ (۶۴/۷)	۵۶ (۵۲/۳)	۱۸ (۵۱/۴)	۲/۹۷
	بلی	۲۴ (۳۵/۳)	۵۱ (۴۷/۷)	۱۷ (۴۸/۶)	
وضعیت تأهل	مجرد	۸ (۲۴/۴)	۲۰ (۲۲/۰)	۵ (۱۰/۰)	۱/۵۷
	متاهل	۶۰ (۸۸/۲)	۸۷ (۸۱/۳)	۳۰ (۸۵/۷)	
گروه خونی	A+	۱۶ (۲۳/۵)	۲۱ (۱۹/۶)	۹ (۲۵/۷)	۵/۸۶
	A-	۸ (۱۱/۸)	۱۰ (۹/۳)	۳ (۸/۶)	
	B+	۱۰ (۱۴/۷)	۲۳ (۲۱/۵)	۵ (۱۴/۳)	
	B-	۱ (۱/۵)	۳ (۲/۸)	۱ (۲/۹)	
	AB+	۱۳ (۱۹/۱)	۱۴ (۱۳/۱)	۵ (۱۴/۳)	
	AB-	۱ (۱/۵)	۳ (۲/۸)	۲ (۵/۷)	
	O+	۱۵ (۲۲/۱)	۲۸ (۲۶/۲)	۹ (۲۵/۷)	
	O-	۴ (۵/۹)	۵ (۴/۷)	۱ (۲/۹)	

جدول ۴. بررسی ارتباط متغیرهای کمی و فراوانی پلی مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14

متغیر	CC		CT		TT		نتیجه آزمون ANOVA	
	میانگین ± انحراف معیار		میانگین ± انحراف معیار		میانگین ± انحراف معیار		آماره آزمون	P
سن (سال)	۵۰/۳۵ ± ۱۹/۸۸		۵۰/۹۳ ± ۲۱/۴۵		۶۰/۰۰ ± ۲۰/۲۷		۲/۹۳	۰/۰۵۵
وزن (کیلوگرم)	۷۱/۲۶ ± ۱۷/۴۸		۷۲/۲۸ ± ۱۵/۱۶		۷۱/۹۴ ± ۲۰/۶۸		۰/۰۷۵	۰/۰۹۲
قد (سانتی متر)	۱۶۸/۴۷ ± ۸/۷۳		۱۶۷/۸۹ ± ۹/۱۲		۱۶۷/۷۴ ± ۸/۳۸		۰/۱۱	۰/۰۸۹
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	۲۵/۰۰ ± ۵/۱۹		۲۵/۵۵ ± ۴/۳۵		۲۵/۶۱ ± ۷/۴۷		۰/۲۶	۰/۰۷۶

نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد ارتباط معناداری بین متغیرهای سن، وزن، قد و شاخص توده بدنی با انواع پلی مورفیسم وجود ندارد. محصول PCR تهیه شده پس از مواجهه با آنزیم AvaII در صورت بروز پلی مورفیسم C>T، برش داده شده و به دو قسمت تقسیم می‌شود. بنابراین، در تصویر ژل الکتروفورز (شکل ۱) دو باند با وزن‌های مولکولی ۳۵۴ bp و ۱۴۴ bp مشاهده می‌شود که نشانگر وجود ژنوتیپ TT به صورت هموزیگوت موتانت است. در صورتی که پلی مورفیسمی در نمونه مطالعه شده نباشد، آنزیم AvaII قادر به شناسایی جایگاهی در محصول PCR و برش آن نیست و محصول با

وزن مولکولی ۴۹۷ bp و ژنوتیپ فرد به صورت CC است که نوع آن هموزیگوت غیرموتانت است. بنابراین، در تصویر ژل الکتروفورز یک باند مشاهده می‌شود. در صورتی که از نظر پلی مورفیسم، نمونه مطالعه شده هتروزیگوت باشد، برخی از محصولات PCR حامل پلی مورفیسم و برخی دیگر عاری از آن هستند. پس در تصویر ژل الکتروفورز سه باند با وزن مولکولی ۴۹۷ bp، ۳۵۴ bp و ۱۴۴ bp مشاهده خواهد شد. با توجه به توضیحات فوق، در شکل ۱، ستون ۱ تا ۵ ژنوتیپ CC، ستون ۶ ژنوتیپ CT، ستون ۷ و ۸ ژنوتیپ TT و ستون ۹ ژنوتیپ CC هستند.



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز بعضی از نمونه‌ها در دستگاه ژل نگار

ستون ۱۰ مارکر (Ladder 100bp)، ستون ۱ تا ۵ و ستون ۹ ژنوتیپ CC، ستون ۶ ژنوتیپ CT، ستون ۷ و ۸ ژنوتیپ TT

بحث

در مطالعه حاضر بیشترین پلی مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن CD14، پلی مورفیسم CT بود که در ۱۰۷ نفر (۵۱ درصد) از شرکت کنندگان مشاهده شد و در تمامی افراد PCR⁺ و PCR⁻ به طور معناداری بیشتر از سایر پلی مورفیسم‌ها بود، اما در افراد فوت شده این تفاوت معنادار نبود. در مطالعه مشابهی Bowman و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده کردند که افراد مبتلا به عفونت SARS-CoV-2 سطوح قابل توجه بالاتری از sCD14 را در مقایسه با افراد سالم داشتند. علاوه بر این، بیماران مبتلا به کووید ۱۹ که فوت کرده بودند، سطوح بالاتری از sCD14 را نسبت به بیماران بهبودیافته خفیف، متوسط و شدید داشتند [۱۶]. همچنین، در مطالعه مشابه دیگری Yuan و

همکاران (۲۰۰۷) به مقایسه ژنوتیپ پلی مورفیسم CD14 افراد مبتلا به SARS شدید با اهداکنندگان خون پرداختند. آن‌ها مشاهده کردند ژنوتیپ CC با مستعد شدن ابتلا به SARS شدید در جمعیت هنگ کنگ همراه بوده است [۱۷].

برخلاف مطالعه حاضر، Pati و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی ارتباط پلی مورفیسم CD14 و عفونت و مرگومیر ناشی از کروناویروس ۲۰۱۹ در کشورهای اروپایی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که بر اساس معیارهای تعادل هاردی واینبرگ (HWE)، آلل T پلی مورفیسم CD14 با مستعد شدن ابتلا به عفونت SARS-CoV-2 و مرگومیر ناشی از آن مرتبط است [۱۸]. در مطالعات دیگری ارتباط موتانت هموزیگوت (TT) پلی مورفیسم CD14 با حساسیت به عفونت‌های ویروسی و میکروبی و شدت بالینی مانند بیماری سل [۱۹]، ویروس سنسشیال تنفسی [۲۰] و هپاتیت C مزمن [۲۱] بررسی و تأیید شده است.

در بعضی مطالعات ارتباط پلی مورفیسم *CD14* با واکنش های آلرژیک و آسم نیز بررسی شده است؛ برای مثال، در مطالعه Martinez و همکاران (۲۰۰۷) نتایج حاکی از آن بود که آلل C یک عامل خطر برای فنوتیپ های آلرژیک در سطوح پایین مواجهه است، در حالی که آلل T یک عامل خطر در سطوح بالای مواجهه است [۲۲]. در بررسی دیگری Takeuchi و همکاران (۲۰۰۸) نیز به این نتیجه رسیدند که ژنوتیپ TT خطر آسم را در مواجهه با سطح زیاد آندوتوکسین در مقایسه با هموزیگوت های آلل C، ۱۱ برابر افزایش می دهد [۲۳]. مکانیسم دقیق چگونگی حساسیت آلل مینور (T) به عفونت SARS-CoV-2 ناشناخته است. افراد آلوده به SARS-CoV-2 که آلل مینور (T) دارند، احتمالاً سطح *sCD14* آن ها افزایش یافته است که این موضوع مولکول های التهابی را تشدید می کند و در نهایت ممکن است به پیش آگهی ضعیف بیماران منجر شود [۱۸].

یافته های مطالعه حاضر نشان داد پلی مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن *CD14* با شدت بروز علائم بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ مرتبط است. مطابق نتایج جدول ۲، پلی مورفیسم CT به طور معناداری در تمام افراد PCR+ بیماران سرپایی، بستری غیربدحال و بستری بدحال بیشتر از پلی مورفیسم های CC و TT است، اما در گروه فوتی ها تفاوت انواع پلی مورفیسم معنادار نبود ($P < 0.05$). طبق مطالعات انجام شده واریانت های ژنی ممکن است تولید پروتئین، عملکرد و حساسیت فرد را به بیماری تغییر دهند؛ بنابراین، ممکن است در پاتوژنز بیماری ها نقش داشته باشند [۲۴]. احتمالاً نقش عملکردی پلی مورفیسم *CD14*-159 تغییر پاسخ التهابی در افراد است؛ زیرا *CD14*-159 بر سطوح سرمی *CD14* (*sCD14*) تأثیر می گذارد و سطوح بالای *sCD14* در حامل های *CD14*-159TT در مقایسه با حامل های CC-159 یافت می شود [۲۵].

طی دو دهه گذشته، مطالعات متعددی روی پلی مورفیسم ژن *CD14* انجام شده است. لیان و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند پلی مورفیسم C به T در موقعیت ۱۵۹ از *CD14* با سطح IgE تام سرم همراه است. آتویی که به عنوان وجود حداقل یک IgE اختصاصی آلرژن در سرم تعریف می شود، در ۲۲۰ بیمار (۸۵ درصد) و در ۴۱ بیمار کنترل (۴۵ درصد) یافت شد. سطح سرمی *sCD14* به طور معنی داری با ژنوتیپ های *CD14*-159 مرتبط بود. افراد آتوپیک با ژنوتیپ CC در *CD14*-159 بیشترین سطح سرمی IgE تام را در مقایسه با ژنوتیپ های CT و TT داشتند. نسبت بیشتری از افراد با ژنوتیپ CC غلظت IgE تام سرم را افزایش دادند. نتایج نشان داد C-159T *CD14* با غلظت IgE تام سرم در کودکان آتوپیک مرتبط است [۱۱]. در سال ۲۰۰۵، Sackesen و همکاران تأثیر انواع ژنتیکی ژن های *CD14* و *TLR4* را بر فنوتیپ های آسم در تعداد زیادی از کودکان مبتلا به آسم بررسی کردند. ۶۱۳ کودک مبتلا به آسم در جایگاه های *CD14*-C159T، *TLR4*-A896G و *TLR4*-C1196T تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج نشان داد بین کودکان مبتلا به آسم آتوپیک، سطح IgE تام در بین سه ژنوتیپ در مدل هم غالب تفاوت معنی داری داشت. این بدان معنی است که نوع پروموتور *CD14*-C159T بر سطوح IgE تام تأثیر می گذارد. همچنین، نشان می دهد آلل T تأثیر

عمیق تری بر IgE تام در کودکان مبتلا به آسم آتوپیک دارد [۱۲]. Han و همکاران (۲۰۱۰) پلی مورفیسم عملکردی C-159T را در ناحیه پروموتور ژن *CD14* بررسی کردند که با افزایش بیان ژن و فنوتیپ های آتوپیک در جمعیت های قومی مختلف همراه است. آن ها ارتباط بین پلی مورفیسم C-159T را در پروموتور ژن *CD14* و سطح IgE تام سرم در بیماران بزرگسال چینی مبتلا به رینیت آلرژیک ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که هموزیگوت های TT در بیماران بزرگسال مبتلا به رینیت آلرژیک در میان جمعیت چین شایع تر است [۹]. Zhang و همکاران (۲۰۱۱) ارتباط بین پلی مورفیسم C-159T در ژن *CD14* و خطر ابتلا به آسم را با روش متاآنالیز بررسی کردند. در مجموع، ۱۷ مطالعه مورد-شاهدی در این متاآنالیز گنجانده شد. نتایج نشان داد هیچ ارتباطی بین این پلی مورفیسم و خطر آسم در آنالیزهای ترکیبی وجود ندارد. در تجزیه و تحلیل زیرگروه ها بر اساس سن، قومیت و وضعیت آتوپیک، هیچ ارتباط قابل توجهی از خطرات آسم در گروه های سنی، گروه های قومی و گروه های آتوپیک برای مقایسه TC+TT در مقابل CC به دست نیامد. برای جمعیت آتوپیک، کاهش قابل توجه خطرات آسم آتوپیک در میان جمعیت آسیایی و جمعیت کودکان مشاهده شد. این متاآنالیز نشان داد *CD14* یک ژن کاندید برای حساسیت به آسم آتوپیک است. پلی مورفیسم C-159T ممکن است یک عامل محافظتی برای آسم آتوپیک در آسیایی ها و کودکان باشد [۱۴]. برای تأیید این ارتباط مطالعات بیشتری نیاز است.

یزدانی و همکاران (۲۰۱۲) ارتباط بین پلی مورفیسم C-159T را در ژن *CD14* بیماران مبتلا به NP (پولیپ بینی) و گروه شاهد بررسی کردند. نتایج ارتباط معنادار بین C-159T و NP را نشان داد. بیماران با ژنوتیپ CC در موقعیت ۱۵۹ از ناحیه پروموتور *CD14* خطر ابتلا به آسم را افزایش دادند. در عین حال، ارتباطی بین توزیع C-159T و سطح ایمونوگلوبولین E سرم یافت نشد. شاید نوعی تنوع ژنتیکی در پروموتور *CD14* در پاتوژنز NP و در بروز آسم نقش داشته باشد [۱۳]. با توجه به ارتباط پلی مورفیسم C-159T با سطح بیان ژن *CD14* پیشنهاد می شود در مطالعات آینده سطح سرمی *CD14* (*sCD14*) نیز بررسی شود.

نتیجه گیری

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر پلی مورفیسم C-159T در پروموتور ژن *CD14* با شدت بروز علائم بیماری کروناویروس انجام شد. نتایج نشان داد بیشترین پلی مورفیسم C-159T مربوط به پلی مورفیسم CT به مقدار ۵۱ درصد است که در تمام گروه های مطالعه شده به جز گروه فوتی معنادار بود. مطالعات ژنتیکی نه تنها در تعیین استعداد ابتلا به یک بیماری خاص اهمیت دارند، بلکه در روشن تر شدن بیولوژی و پاتوژنز بیماری نیز بسیار سودمند و کمک کننده هستند. آگاهی بیشتر ما از این مکانیسم ها در بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ منجر به شکل گیری راهکارهای درمانی جدید، ساخت واکسن های مؤثر و پیشبرد اهداف کنترل اپیدمی کروناویروس می شود و از بروز مجدد بیماری و گسترش آن جلوگیری می کند.

سپاسگزاری

آزمایشگاهی بیمارستان شهدا قائن تشکر و قدردانی می‌شود. این مقاله از پایان‌نامه تصویب شده در دانشکده علوم پایه با کد اخلاق IR.IAU. MSHD.REC.1401.019 گرفته شده است.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافع ندارند.

از تمامی همکاران در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و دانشگاه علوم پزشکی بیرجند تشکر و قدردانی می‌کنیم؛ خصوصاً از آقای هادی زارع مرزونی، کارشناس ارشد ایمنولوژی دانشکده پرستاری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند و آقای محمدرضا زحمت‌کش، کارشناس علوم

References

- Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;**55**(3):105924. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105924 PMID: 32081636
- Zu ZY, Jiang MD, Xu PP, Chen W, Ni QQ, Lu GM, et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Perspective from China. *Radiology*. 2020;**296**(2):15-25. DOI: 10.1148/radiol.2020200490 PMID: 32083985
- Saavedra JM. Angiotensin Receptor Blockers and 2019-nCoV. *Pharmacol Res*. 2020;**156**:104832. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104832 PMID: 32304747
- WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Situation dashboard. 2022. Available from: <https://covid19.who.int/>
- Marzouni HZ, Dashtgard A, Hamounpeyma E. Ascending and Descending of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Galen Med J*. 2020;**9**:1880. DOI: 10.31661/gmj.v9i0.1880
- Zhang H, Li HB, Lyu JR, Lei XM, Li W, Wu G, et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis*. 2020;**96**:19-24. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.04.027 PMID: 32311451
- Zhu Z, Lian X, Su X, Wu W, Marraro GA, Zeng Y. From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. *Respiratory Res*. 2020;**21**(224):1-14. DOI: 10.1186/s12931-020-01479-w PMID: 32854739
- Petrosillo N, Viceconte G, Ergonul O, Ippolito G, Petersen E. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin Microbiol Infect*. 2020;**26**(6):729-734. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.03.026 PMID: 32234451
- Han D, She W, Zhang L. Association of the CD14 gene polymorphism C-159T with allergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2010;**24**(1):1-3. DOI: 10.2500/ajra.2010.24.3411 PMID: 20109306
- Hou Y, Zhao J, Martin W, Kallianpur A, Chung MK, Jehi L, et al. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. *BMC Med*. 2020;**18**(1):1-8. DOI: 10.1186/s12916-020-01673-z
- Leung TF, Tang NL, Sung YM, Li AM, Wong GW, Chan IH, et al. The C-159T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003;**14**(4):255-260. DOI: 10.1034/j.1399-3038.2003.00048.x PMID: 12911501
- Sackesen C, Karaaslan C, Keskin O, Tokol N, Tahan F, Civelek E, et al. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy*. 2005;**60**(12):1485-1492. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00874.x PMID: 16266379
- Yazdani N, Amoli M, Naraghi M, Mersaghian A, Firouzi F, Sayyahpour F, et al. Association between the functional polymorphism C-159T in the CD14 promoter gene and nasal polyposis: potential role in asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;**22**(6):406-411. PMID: 23101184
- Zhang Y, Tain C, Zhang J, Li X, Wan H, He C, et al. The -159C/T polymorphism in the CD14 gene and the risk of asthma: a meta-analysis. *Immunogenetics*. 2011;**63**(1):23-32.
- Blumenthal MN. The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;**5**(2):141-145. DOI: 10.1097/01.all.0000162306.12728.c2 PMID: 15764904
- Bowman ER, Cameron CMA, Avery A, Gabriel J, Kettelhut A, Hecker M, et al. Levels of soluble CD14 and tumor necrosis factor receptors 1 and 2 may be predictive of death in severe coronavirus disease 2019. *J Infect Dis*. 2021;**223**(5):805-810. DOI: 10.1093/infdis/jiaa744 PMID: 33249506
- Yuan FF, Boehm I, Chan PK, Marks K, Tang JW, Hui DS, et al. High prevalence of the CD14-159CC genotype in patients infected with severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;**14**(12):1644-1645. DOI: 10.1128/CVI.00100-07 PMID: 17913858
- Pati A, Padhi S, Panda D, Suvankar S, Panda A. A CD14 polymorphism (C-159T rs2569190) is associated with SARS-CoV-2 infection and mortality in the European population. *J Infect Dis*. 2021;**224**(5):921-922. DOI: 10.1093/infdis/jiab180 PMID: 33822099
- Zhao J, Lin G, Zhang W, Ge M, Zhang Y. Contribution of CD14-159C/T polymorphism to tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Disease*. 2013;**17**(11):1472-1478. DOI: 10.5588/ijtld.13.0264 PMID: 24125453
- Goutak M, Haidopoulou K, Pappa S, Tsakipjdis P, Frydas E, Eboriadou M, et al. The role of TLR4 and CD14 polymorphisms in the pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis in greek infants. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;**27**(4):563-572. DOI: 10.1177/039463201402700412 PMID: 25572736
- Meiler C, Mühlbauer M, Johann M, Hartmann A, Schnabl B, Wodarz N, et al. Different effects of a CD14 gene polymorphism on disease outcome in patients with alcoholic liver disease and chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 2005;**11**(38):6031-6037.
- Martinez FD. CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;**4**(3):221-225. DOI: 10.1513/pats.200702-035AW PMID: 17607003
- Takeuchi F, Nakae N, Kobayashi N, Kuwata S, Murayama T, Kawasugi K, et al. Genetic contribution of the CD14-159C/T dimorphism in the promoter region in Japanese RA. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;**26**(2):337-339. PMID: 18565258
- Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun*. 2012;**80**(10): 3343-3359. DOI: 10.1128/IAI.00443-12 PMID: 22825450
- Baldini M, Carla Lohman I, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD, et al. A Polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immuno-globulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;**20**(5):976-983.