




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

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: shahrokhaby@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.14.4.23

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۲
	تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸
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. روش کار: نمونه‌ها از بین مراجعه‌کنندگان برای انجام تست PCR به صورت 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. 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 ⁺ به طور معناداری بیشتر از سایر پلی مورفیسم‌ها بود، اما در افراد فوت شده 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 به عنوان یک پیش‌آگهی مهم در بیماری کروناویروس در نظر گرفته شود.	واژگان کلیدی: پلی مورفیسم C-159T ژن CD14 کروناویروس

مقدمه

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 به صورت پاندمی در سرتاسر 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 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 به راحتی منتشر نمی‌شدند. از طرف دیگر، کروناویروس از آنزیم تبدیل‌کننده آنزوتانسین ۲ (ACE2) به عنوان گیرنده برای ورود به سلول میزبان انسانی استفاده می‌کند. به این دلیل است که توانایی

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 به راحتی منتشر نمی‌شدند. از طرف دیگر، کروناویروس از آنزیم تبدیل‌کننده آنزوتانسین ۲ (ACE2) به عنوان گیرنده برای ورود به سلول میزبان انسانی استفاده می‌کند. به این دلیل است که توانایی

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 مراجعه کنندگان 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 تقسیم بندیها زیر نظر همکار بالینی انجام شد.

از تمامی افراد بررسی شده، پس از گرفتن رضایت آگاهانه، ۳ میلی لیتر 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 شرکت کنندگان در چک لیست ثبت شد. پس از پایان نمونه گیری، به منظور تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم، پلی مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن *CD14*، DNA تمام نمونهها با استفاده از کیت استخراج DNA، شرکت دنازیست آسیا (Denazisr 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 پلی مورفیسم C-159T در پروموتور *CD14* بیماران و افراد سالم انجام شد. سپس، با استفاده از آنزیم محدودالایتر 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 زمینه ساز بروز بیماری با علائم شدیدتر به شناسایی روند پاتوژنز و اتخاذ سیاستهای درمانی مناسب کمک می کند [۳]. مطالعات مختلفی تأثیر جهشها و پلی مورفیسمها را در بروز بیماریهای تنفسی نشان دادند که این پلی مورفیسمهای مختلف در گیرندههای ویروسی و میکروبی در بروز و پیشرفت بیماری مؤثر هستند [۹-۱۴]. منطقه ای خاص در کروموزوم ۵ (5q31-32) وجود دارد که شامل مجموعه ای از ژنهای سایتوکاین IL4، IL9، IL13 و GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) است که در تنظیم پاسخهای ایمنولوژی نقش مهمی ایفا می کنند [۱۲،۱۵].

از سوی دیگر، ژن مولد *CD14* نیز در جایگاه 5q31-32 قرار دارد و این جایگاه دو نوع پروتئین را کد می کند [۱۳]. پروتئین حاصل از ژن *CD14*، بخشی از دستگاه ایمنی ذاتی محسوب می شود و به دو شکل در بدن انسان مشاهده می شود. 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 لیپوپلی ساکارید و اندوتوکسینهای استنشاقی است. لیپوپلی ساکارید و بخشهایی از دیواره سلولی باکتریایی و ویروسی می توانند APCها (سلولهای عرضه کننده آنتی ژن) را از طریق sCD14 (soluble Cluster Differentiation 14) 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 می شود 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 می گذارد 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 پلی مورفیسم 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 می شود تغییرات ژنتیکی در *CD14*، به خصوص پلی مورفیسم 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 مطالعه ای در ایران که تأثیر پلی مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن *CD14* را با شدت بروز علائم بیماری کروناویروس بررسی کرده باشد، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم 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 $20/95 \pm 52/25$ 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 (TT و CC) 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) است که برای تجزیه و تحلیل الگوهای منحصربه‌فرد در قطعات DNA به‌منظور تمایز ژنتیکی بین افراد، توسط آنزیم‌های محدودالانرا 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 تعداد (درصد)	CT تعداد (درصد)	TT تعداد (درصد)	نتیجه آزمون Chi-Square	
				آماره آزمون	P
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*

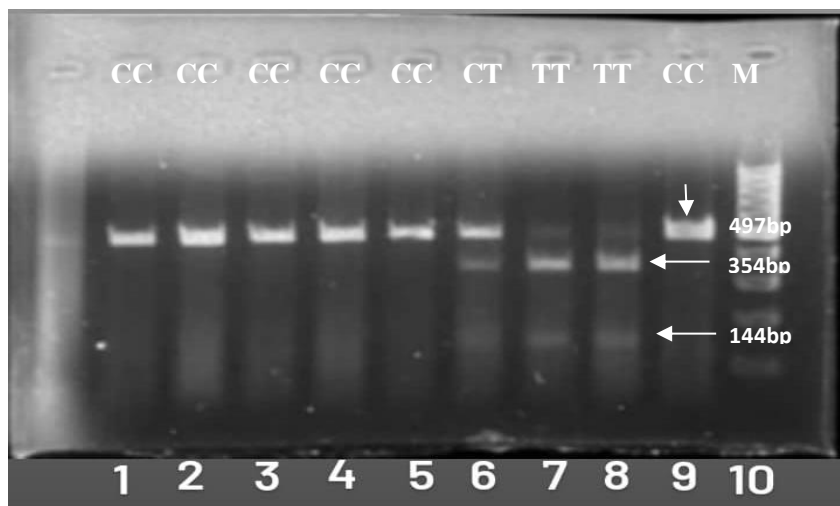
متغیر	CC تعداد (درصد)	CT تعداد (درصد)	TT تعداد (درصد)	نتیجه آزمون Chi-Square		
				آماره آزمون	P	
جنسیت	مرد	۲۹ (۴۲/۶)	۵۵ (۵۱/۴)	۱۷ (۴۸/۶)	۱/۲۸	۰/۵۲۷
	زن	۳۹ (۵۷/۴)	۵۲ (۴۸/۶)	۱۸ (۵۱/۴)		
سابقه بیماری	خیر	۴۴ (۶۴/۷)	۵۶ (۵۲/۳)	۱۸ (۵۱/۴)	۲/۹۷	۰/۲۲
	بلی	۲۴ (۳۵/۳)	۵۱ (۴۷/۷)	۱۷ (۴۸/۶)		
وضعیت تأهل	مجرد	۸ (۲۴/۴)	۲۰ (۲۲/۰)	۵ (۱۰/۰)	۱/۵۷	۰/۴۵
	متاهل	۶۰ (۸۸/۲)	۸۷ (۸۱/۳)	۳۰ (۸۵/۷)		
گروه خونی	A+	۱۶ (۲۳/۵)	۲۱ (۱۹/۶)	۹ (۲۵/۷)	۵/۸۶	۰/۹۷
	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	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	۰/۹۲		
قد (سانتی متر)	۱۶۸/۴۷ ± ۸/۷۳	۱۶۷/۸۹ ± ۹/۱۲	۱۶۷/۷۴ ± ۸/۳۸	۰/۱۱	۰/۸۹		
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	۲۵/۰۰ ± ۵/۱۹	۲۵/۵۵ ± ۴/۳۵	۲۵/۶۱ ± ۷/۴۷	۰/۲۶	۰/۷۶		

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.

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



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

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 هنگ‌کنگ 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 هیپاتیت C مزمن [۲۱] بررسی و تأیید شده است.

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 شرکت‌کنندگان 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

عمیق‌تری بر Ige نام در کودکان مبتلا به آسم آتوپیک دارد [۱۲]. Han و همکاران (۲۰۱۰) پلی‌مورفیسم عملکردی C-159T را در ناحیه پروموتور ژن *CD14* بررسی کردند که با افزایش بیان ژن و فنوتیپ‌های آتوپیک در جمعیت‌های قومی مختلف همراه است. آن‌ها ارتباط بین پلی‌مورفیسم 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 هموزیگوت‌های TT در بیماران بزرگسال مبتلا به رینیت آلرژیک در میان جمعیت چین شایع‌تر است [۹]. Zhang و همکاران (۲۰۱۱) ارتباط بین پلی‌مورفیسم C-159T در ژن *CD14* و خطر ابتلا به آسم را با روش متآنالیز بررسی کردند. در مجموع، ۱۷ مطالعه مورد-شاهدی در این متآنالیز گنجانده شد. نتایج نشان داد هیچ ارتباطی بین این پلی‌مورفیسم و خطر آسم در آنالیزهای ترکیبی وجود ندارد. در تجزیه‌وتحلیل زیرگروه‌ها بر اساس سن، قومیت و وضعیت آتوپیک، هیچ ارتباط قابل توجهی از خطرات آسم در گروه‌های سنی، گروه‌های قومی و گروه‌های 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 متآنالیز نشان داد *CD14* یک ژن کاندید برای حساسیت به آسم آتوپیک است. پلی‌مورفیسم C-159T ممکن است یک عامل محافظتی برای آسم آتوپیک در آسیایی‌ها و کودکان باشد [۱۴]. برای تأیید این ارتباط مطالعات بیشتری نیاز است.

یزدانی و همکاران (۲۰۱۲) ارتباط بین پلی‌مورفیسم 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 پاتوژن NP و در بروز آسم نقش داشته باشد [۱۳]. با توجه به ارتباط پلی‌مورفیسم C-159T با سطح بیان ژن *CD14* پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده سطح سرمی *CD14* (sCD14) نیز بررسی شود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم C-159T در پروموتور ژن *CD14* با شدت بروز علائم بیماری کروناویروس انجام شد. نتایج نشان داد بیشترین پلی‌مورفیسم C-159T مربوط به پلی‌مورفیسم CT به مقدار ۵۱ درصد است که در تمام گروه‌های مطالعه شده به جز گروه فوتی معنادار بود. مطالعات ژنتیکی نه تنها در تعیین استعداد ابتلا به یک بیماری خاص اهمیت دارند، بلکه در روشن‌تر شدن بیولوژی و پاتوژن بیماری نیز بسیار سودمند و کمک‌کننده هستند. آگاهی بیشتر ما از این مکانیسم‌ها در بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ منجر به شکل‌گیری راهکارهای درمانی جدید، ساخت واکسن‌های مؤثر و پیشبرد اهداف کنترل اپیدمی کروناویروس می‌شود و از بروز مجدد بیماری و گسترش آن جلوگیری می‌کند.

در بعضی مطالعات ارتباط پلی‌مورفیسم *CD14* با واکنش‌های 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 فنوتیپ‌های 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 هموزیگوت‌های آلل C، ۱۱ برابر افزایش می‌دهد [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 آن‌ها افزایش یافته است که این موضوع مولکول‌های التهابی را تشدید می‌کند و در نهایت ممکن است به پیش‌آگهی ضعیف بیماران منجر شود [۱۸].

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد پلی‌مورفیسم C-159T موجود در پروموتور ژن *CD14* با شدت بروز علائم بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ مرتبط است. مطابق نتایج جدول ۲، پلی‌مورفیسم CT به‌طور معناداری در تمام افراد PCR، بیماران سرپایی، بستری غیربده‌حال و بستری بده‌حال بیشتر از پلی‌مورفیسم‌های CC و TT است، اما در گروه فوتی‌ها تفاوت انواع پلی‌مورفیسم معنادار نبود ($P < 0.05$). طبق مطالعات انجام‌شده واریانت‌های ژنی ممکن است تولید پروتئین، عملکرد و حساسیت فرد را به بیماری تغییر دهند؛ بنابراین، ممکن است در پاتوژن بیماری‌ها نقش داشته باشند [۲۴]. احتمالاً نقش عملکردی پلی‌مورفیسم *CD14*-159 تغییر پاسخ التهابی در افراد است؛ زیرا *CD14*-159 بر سطوح سرمی *CD14* (sCD14) تأثیر می‌گذارد و سطوح بالای sCD14 در حامل‌های *CD14*-159TT در مقایسه با حامل‌های CC-159 یافت می‌شود [۲۵].

طی دو دهه گذشته، مطالعات متعددی روی پلی‌مورفیسم ژن *CD14* انجام شده است. لیان و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند پلی‌مورفیسم C به T در موقعیت ۱۵۹ از *CD14* با سطح Ige تام سرم همراه است. آتوپیک که به‌عنوان وجود حداقل یک Ige اختصاصی آلرژن در سرم تعریف می‌شود، در ۲۲۰ بیمار (۸۵ درصد) و در ۴۱ بیمار کنترل (۴۵ درصد) یافت شد. سطح سرمی sCD14 به‌طور معنی‌داری با ژنوتیپ‌های *CD14*-159 مرتبط بود. افراد آتوپیک با ژنوتیپ CC در *CD14*-159 بیشترین سطح سرمی Ige تام را در مقایسه با ژنوتیپ‌های 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 ژن‌های *CD14* و *TLR4* را بر فنوتیپ‌های آسم در تعداد زیادی از کودکان مبتلا به آسم بررسی کردند. ۶۱۳ کودک مبتلا به آسم در جایگاه‌های *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 هم‌غالب تفاوت معنی‌داری داشت. این بدان معنی است که نوع پروموتور *CD14*-C159T بر سطوح Ige تام تأثیر می‌گذارد. همچنین، نشان می‌دهد آلل T تأثیر

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 Invest 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: 10.1128/01.00100-07 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.