

مقاله پژوهشی

بررسی میزان بیان ژن IP-10 در خون محیطی در بیماران مبتلا به نوع شدید کرونا (Covid-19) در مقایسه با نوع ملایم و بهبود یافته از بیماری

ساناز پای کار^۱، نغمه بهرامی^{۲،۳}، رباب رفیعی طباطبایی^۱، عبدالرضا محمدنیا^۴

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
^۲ گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۳ مرکز تحقیقات جراحی فک و صورت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۴ مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): naghmehbahrami@gmail.com

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: ویروس SARS-CoV-2 یک ویروس محصور شده و متقارن با برآمدگی‌هایی روی غشای آن است که به آن شکل تاج می‌دهد. این ویروس دارای ژنوم RNA تک‌رشته‌ای مثبت است. سازمان بهداشت جهانی، بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ (COVID-19) را در ۱۱ مارس ۲۰۲۰، به دلیل توسعه فراگیر این بیماری، همه‌گیر اعلام کرد. در این تحقیق، بیان ژن IP-10 در خون محیطی بیماران نوع شدید کرونا در مقایسه با نوع ملایم و بهبود یافته از بیماری ارزیابی شده است. **مواد و روش‌ها:** خون محیطی از ۳۰ بیمار مبتلا به کرونا بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان مسیح دانشوری با عفونت شدید، ۳۰ بیمار بستری در بخش با عفونت خفیف و ۳۰ فرد بهبود یافته از بیماری در رده سنی ۷۰-۳۰ سال جمع‌آوری گردید. Real-time PCR به منظور بررسی بیان ژن IP-10 در نمونه‌ها، انجام شد. **نتایج:** در این مطالعه نشان داده شد که با کاهش شدت بیماری کرونا، بیان ژن IP-10 کاهش یافت و بنابراین نمی‌توان از این آزمایش در تشخیص و حتی پیگیری بیماری استفاده کرد. **نتیجه‌گیری:** ژن مورد بررسی برای پیش‌بینی شدت و پیش‌آگهی بیماری مناسب می‌باشد اما برای دستیابی به نتایج بهتر باید تعداد نمونه‌های بیشتری را بررسی نمود.

کلیدواژه‌ها: کووید-۱۹، بیومارکر، IP-10، بیان ژن.

مقدمه

طول همه‌گیری کووید-۱۹ ارائه می‌شود، علائم تنفسی است که شبیه به شیوع سارس و سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS) است. تقریباً ۸۰٪ افراد مبتلا علائم خفیف تا متوسط دارند. بقیه بیماران بیماری شدیدی دارند که نیاز به مراقبت بستری دارد [۴].

عفونت ویروسی معمولاً با علائمی شبیه آنفلوآنزا شروع شده و می‌تواند بدون علامت باشد یا ممکن است پیشرفت جزئی تا شدید داشته باشد [۱-۳]. علائم بالینی غالب، که توسط افراد آلوده در

ویروسی، سطوح IP-10 در ابتدا افزایش می‌یابد، اما همچنین به عنوان یک عامل آسیب حاد ریه با واسطه ایمنی، نشان می‌دهد که نقش کلیدی در پاسخ‌های طبیعی و غیرقابل تنظیم به SARS را دارد. IP-10 ممکن است مارکری برای پیشرفت بیماری کووید-۱۹ و هدفی برای جلوگیری از آسیب ریه باشد [۱۳، ۱۴]. در تحقیق حاضر بررسی میزان بیان ژن IP-10 در خون محیطی در بیماران مبتلا به نوع شدید کرونا (Covid-19) در مقایسه با نوع ملایم و بهبود یافته از بیماری انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق، در بیمارستان مسیح دانشوری انجام شد. جامعه آماری پژوهش شامل ۳۰ بیمار مبتلا به کرونا بستری در بخش مراقبت‌های ویژه با عفونت شدید، ۳۰ بیمار بستری در بخش با عفونت خفیف و ۳۰ فرد بهبود یافته از بیماری بود. لازم به ذکر است که نمونه‌های سه گروه، خون محیطی بود و بیماران در گروه‌های سنی یکسان با حداقل سن ۳۵ سال و حداکثر سن ۷۵ سال در نظر گرفته شدند. این مطالعه هیچ آسیب و ضرری به افراد مشارکت کننده وارد نکرد. استخراج RNA و سپس Real time PCR به منظور بررسی بیان ژن PD-1 در نمونه‌ها انجام گردید.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام Real-Time PCR

مرحله استخراج RNA با استفاده از (qiagen Cat no.75144) RNeasy Midi Kit انجام شد. ارزیابی غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ سنجش شد. به منظور سنتز cDNA از RT-PCR Kit (Cat no RTPL12) Viva 2-steps استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی مارکر به کمک نرم افزار AlleleID6 طراحی و جهت ساخت سفارش داده شد. لازم به ذکر است که پرایمرها با توجه به مناسب‌ترین غلظت یافته شده در آزمایشات set up اولیه به کار برده شدند. همچنین، در این مطالعه از ژن رفرنس *18S rRNA* استفاده گردید.

انجام واکنش Real-time RT-PCR با استفاده از Hot Taq Eva Greenq, PCR Mix انجام گردید.

از اینرو، نقش بیومارکرها به عنوان امیدوار کننده‌ترین بخش در میان تمام تحقیقات غیرتهاجمی، برای متوقف کردن این بیماری همه‌گیر مخوف در اینجا مطرح می‌شود [۵].

در مطالعات متعدد نشان داده شده است که ویروس SARS-CoV-2 نه تنها بر دستگاه تنفسی، بلکه بر سایر سیستم‌ها و اندام‌ها، مانند قلب، کبد و دستگاه گوارش، تاثیر می‌گذارد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که چندین شاخص مهم بیوشیمیایی و هماتولوژیک در بیماران کووید-۱۹ تغییر می‌کند [۶، ۷].

این بیومارکرها ممکن است برای پیش‌بینی پیش آگهی و همچنین برای مدیریت درمان مفید باشند، به ویژه در موارد همراه با بیماری‌های همراه و/یا یک دوره بیماری شدید [۸].

در نهایت مولکول‌های جدید، از جمله microRNA (miRNA)، به عنوان بیومارکرها برای کووید-۱۹ ارزیابی شده‌اند [۹].

بر اساس شدت، کووید-۱۹ به سه نوع تقسیم می‌شود: خفیف، متوسط و شدید [۱۰].

نقش سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها در بیماری‌زایی و شدت آن بررسی شده است. این عوامل در بیماری‌زایی کووید-۱۹ دخیل هستند. اگر چه در بزرگسالان پاسخ سایتوکاین با شدت بیماری و پیش آگهی ضعیف مرتبط است، داده‌های مربوط به پاسخ التهابی به کووید-۱۹ در کودکان کم‌است [۱۱].

IP10، یک مارکر جدید (پروتئین القاشده با اینترفرون گاما ۱۰ کیلو دالتون، CXCL10) برای تشخیص فعال شدن سیستم ایمنی سلولی است. IP10 پروتئینی است که توسط مونوسیت‌ها و ماکروفاژها و همچنین در مقادیر کم توسط سلول‌های اندوتلیال پس از تماس با IFN- γ تولید می‌شود. از آن جایی که IP10 منحصرًا توسط اینترفرون‌ها القا می‌شود و در غلظت‌های بالاتر از خود اینترفرون‌ها در خون گردش می‌کند، این کموکاین یک مارکر ایده آل برای تعیین فعالیت بیولوژیکی IFN- γ و در نتیجه فعال‌سازی ایمنی سلولی T یا سلول‌های T است [۱۲].

شواهد به طور خاص به IP-10 به عنوان مارکر پیشرفت بیماری کرونا ویروس در سال ۲۰۱۹ اشاره می‌کند که سطوح بالایی از مرگ و میر را حفظ می‌کند. در مدل‌های مختلف عفونت

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

	IP-10	18S rRNA
Forward primer	GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC	GTAACCCGTTGAACCCATT
Length	23	20
Reverse primer	GTCCATCCTTGAAGCACTGCA	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
Length	22	20
product length	134	152
دمای مطلوب Annealing	59	56

پس از انجام محاسبات نشان داده شد که میزان بیان این مارکر در افراد بیمار با عفونت شدید ۲/۹۴ برابر افراد سالم و در افراد بیمار با عفونت ملایم ۱/۶۸ برابر افراد سالم محاسبه گردید (نمودار ۲).

بحث

سازمان بهداشت جهانی، بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ (COVID-19) را در ۱۱ مارس ۲۰۲۰، به دلیل توسعه فراگیر این بیماری، همه‌گیر اعلام کرد [۱۵]. پس از توالی‌یابی ژنوم ویروس، توسط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها، ویروس به عنوان سندرم حاد تنفسی کرونا- ۲ (SARS-CoV-2) نام‌گذاری شد [۱۶].

عفونت ویروسی معمولاً با علائمی شبیه آنفلوآنزا شروع شده و می‌تواند بدون علامت باشد یا ممکن است پیشرفت جزئی تا شدید داشته باشد [۳، ۱].

علائم بالینی غالب، که توسط افراد آلوده در طول همه‌گیری کووید- ۱۹ ارائه می‌شود، علائم تنفسی است که شبیه به شیوع سارس و سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS) است. تقریباً ۸۰٪ افراد مبتلا علائم خفیف تا متوسط دارند. بقیه بیماران بیماری شدیدی دارند که نیاز به مراقبت بستری دارد [۴].

با ارزیابی سطح اینبی و مارکرها می‌توان زمان عفونت را مشخص، وضعیت بیمار را ارزیابی و اندام آسیب‌دیده را تعیین کرد [۱۷].

Jøntvedt Jørgensen و همکاران در سال ۲۰۲۰ در نروژ نشان دادند که سطوح IP-10 پلاسما با نارسایی تنفسی (R F) در بیماران مبتلا به کووید- ۱۹ شدید ارتباط دارد و می‌تواند به عنوان بیومارکر برای شناسایی بیماران در معرض خطر R F شدید

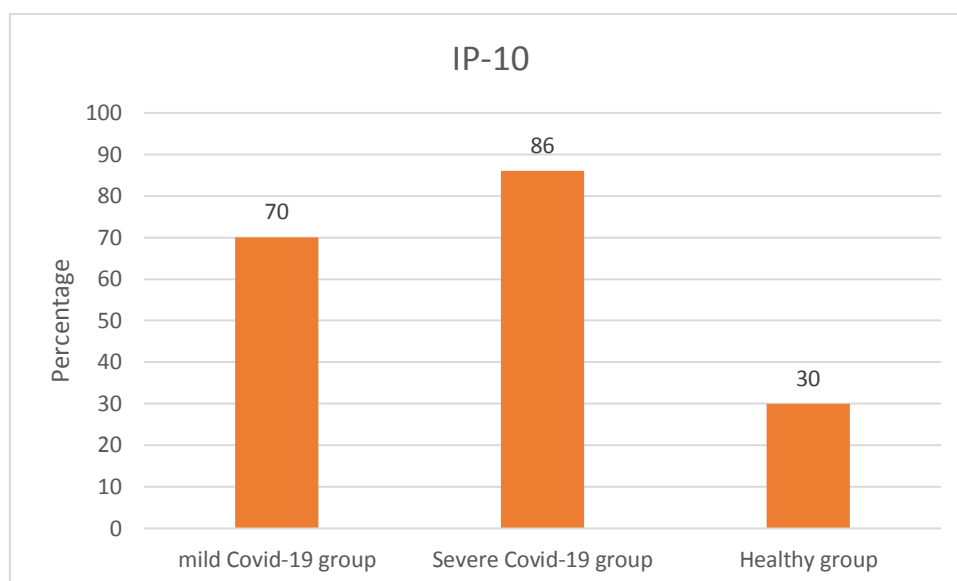
شرایط دمایی و زمانی به ترتیب: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۶ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۲۵ ثانیه (برای ۳۵ سیکل) و تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

یافته‌ها

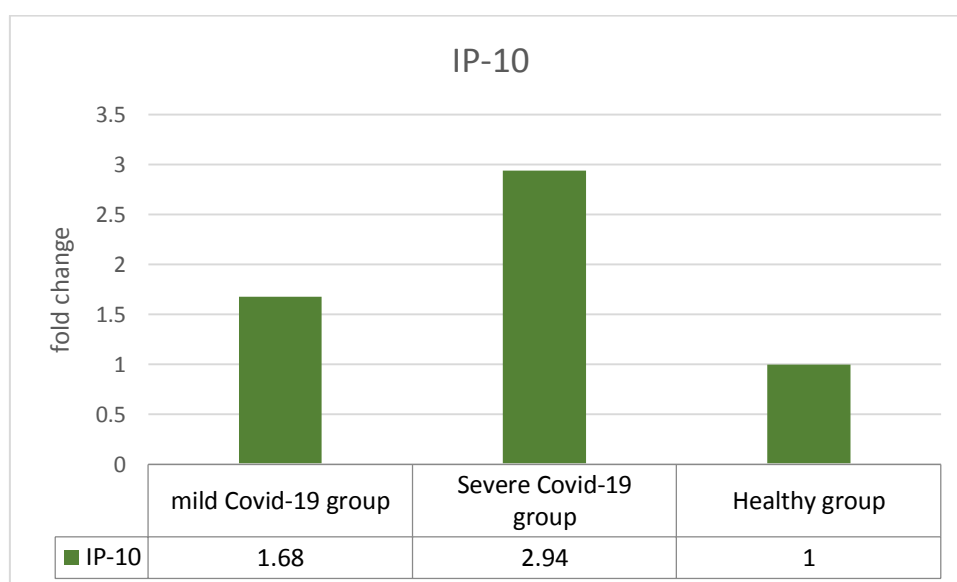
در این مطالعه تعداد ۳۰ فرد بستری در بخش مراقبت‌های ویژه با عفونت شدید، ۳۰ فرد بستری در بخش با عفونت خفیف و ۳۰ فرد بهبود یافته از بیماری بودند. گروه‌ها با استفاده از آزمون t از نظر میانگین سنی مقایسه شدند و از نظر میانگین سنی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که فاکتور سن در گروه‌های مورد مطالعه اشکالی ایجاد نمی‌کند.

بیومارکر IP-10 در گروه بیماران با عفونت شدید در ۲۶ نفر از ۳۰ نفر مثبت بود (۸۶٪). میزان مثبت بودن این بیومارکر در گروه بیماران با عفونت خفیف ۲۱ نفر از ۳۰ نفر بود (۷۰٪). همچنین میزان مثبت بودن این بیومارکر در گروه افراد بهبود یافته از بیماری ۹ نفر از ۳۰ نفر بود (۳۰٪) (نمودار ۱). مقایسه آماری میزان مثبت شدن این بیومارکر در گروه بیماران با عفونت شدید و گروه بیماران با عفونت خفیف و گروه افراد بهبود یافته از بیماری توسط آزمون T-test صورت پذیرفت که نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار بین این سه گروه مورد مطالعه بود (P-value < 0.001).

جهت محاسبه تفاوت بیان بیومارکر مورد نظر، ابتدا Ct هر نمونه، تعیین گردید. میزان تفاوت بیان بیومارکر بین نمونه‌ی آزمایش در مقابل کنترل اندازه‌گیری شد، این کار با روش $\Delta\Delta Ct$ بین دو گروه صورت گرفت.



نمودار ۱- درصد مثبت بودن IP-10 در گروه بیماران مبتلا به کرونا با عفونت شدید و گروه بیماران با عفونت خفیف و گروه بهبود یافته از بیماری



نمودار ۲- تفاوت بیان ژن IP-10 در بیماران با عفونت شدید و بیماران با عفونت خفیف و بهبود یافته

دادند که IP-10 بیومارکر عالی برای پیش‌بینی پیشرفت و شدت کووید-۱۹ است.

Önal و همکاران در سال ۲۰۲۲ در ترکیه، بیومارکرهای تشخیصی و پیش‌آگهی بیماری کرونا در کودکان را بررسی کردند. سطوح IP-10 به طور قابل توجهی در بیماران کووید-۱۹ بالاتر بود. افزایش سطح IP-10 در کودکان مبتلا به کووید-۱۹ شاخصی برای تشخیص زودهنگام و پیش‌بینی کننده شدت بیماری است [۲۱]. Tufa در سال ۲۰۲۲ در آفریقا بیان کرد که در مقایسه با افراد سالم، بیماران مبتلا به کووید-۱۹ سطوح

و به عنوان هدفی برای بهبود استراتژی‌های درمانی مورد بررسی قرار گیرد [۱۸]. Yang و همکاران در سال ۲۰۲۰ در چین بررسی و نتیجه‌گیری کردند که سطوح IP-10 پلاسما با شدت کووید-۱۹ مرتبط است و پیشرفت بیماری را پیش‌بینی می‌کند [۱۹].

Chen و همکاران در سال ۲۰۲۰ در چین، IP-10 را به عنوان بیومارکر مرتبط با شدت بیماری کووید-۱۹ بررسی کردند. سطح سرمی IP-10 در بیماران بدحال، بالاتر از بیماران شدید بود [۲۰]. Haroun و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مصر نشان

- [10] Azoulay E, De Waele J, Ferrer R, et al. International variation in the management of severe COVID-19 patients. *Critical care*. 2020; 24(1): 1-7.
- [11] Doulati MA, Doulati M. The value of D-Dimer as a biomarker in assessing disease severity and mortality in patients with Covid-19, a review study. *Laboratory & Diagnosis*. 2020; 12(49): 41-45.
- [12] Colaneri M, Bogliolo L, Valsecchi P, et al. Tocilizumab for treatment of severe COVID-19 patients: preliminary results from SMAteo COvid19 REgistry (SMACORE). *Microorganisms*. 2020; 8(5): 695.
- [13] Ichikawa A, Kuba K, Morita M, et al. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013; 187(1): 65-77.
- [14] Tsai A, Diawara O, Nahass RG, Brunetti L. Impact of tocilizumab administration on mortality in severe COVID-19. *Scientific reports*. 2020; 10(1): 19131.
- [15] Filipović N, editor Artificial intelligence and finite element methods in modeling of COVID-19. *Mathematics for Human Flourishing in the Time of COVID-19 and Post COVID-19: Proceedings of the Workshop held at the Faculty of Mechanical Engineering, University of Niš, Niš, 21 of October 2020*; 2023: Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- [16] Dos Santos WG. Natural history of COVID-19 and current knowledge on treatment therapeutic options. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020; 129: 110493.
- [17] Codina H, Vieitez I, Gutierrez-Valencia A, et al. Elevated anti-SARS-CoV-2 antibodies and IL-6, IL-8, MIP-1 β , early predictors of severe COVID-19. *Microorganisms*. 2021; 9(11): 2259.
- [18] Jøntvedt Jørgensen M, Holter JC, Christensen EE, et al. Increased interleukin-6 and macrophage chemoattractant protein-1 are associated with respiratory failure in COVID-19. *Scientific reports*. 2020; 10(1): 21697.
- [19] Yang Y, Shen C, Li J, et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020; 146(1): 119-127. e114.
- [20] Chen Y, Wang J, Liu C, et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Molecular Medicine*. 2020; 26: 1-12.
- [21] Önal P, Kılınç AA, Aygün FD, et al. Diagnostic and prognostic biomarkers of coronavirus disease 2019 in children. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2022; 68(2): fmac003.
- بالاتری از IP-10 را نشان دادند [۲۲]. بنابراین، نتایج پژوهش‌های ذکر شده با نتایج پژوهش حاضر همسو بود.
- به طور کلی در پژوهش حاضر نتیجه گرفته شد که در بیماری کرونا با کاهش حدت بیماری، بیان بیومارکر IP-10 کاهش می‌یابد. بنابراین به عنوان بیومارکر مناسب جهت تشخیص و درمان بیماری مطرح و می‌توان از آن در تشخیص بیماری و درمان بهره برد البته مطالعات تکمیلی توصیه می‌گردد.

منابع

- [1] Aktas G. A comprehensive review on rational and effective treatment strategies against an invisible enemy; SARS Cov-2 infection. *Experimental Biomedical Research*. 2020; 3(4): 293-311.
- [2] Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nature medicine*. 2020; 26(7): 1017-1032.
- [3] Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nature medicine*. 2020; 26(10): 1623-1635.
- [4] Frater JL, Zini G, d'Onofrio G, Rogers HJ. COVID-19 and the clinical hematology laboratory. *International journal of laboratory hematology*. 2020; 42: 11-18.
- [5] Kelly MS, Valle CW, Fernandes ND, et al. Multisystem inflammatory syndrome in children: cardiac biomarker profiles and echocardiographic findings in the acute and recovery phases. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2020; 33(10): 1288-1290.
- [6] Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clinical chemistry and laboratory medicine (CCLM)*. 2020; 58(7): 1131-1134.
- [7] Deng X, Liu B, Li J, et al. Blood biochemical characteristics of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systemic review and meta-analysis. *Clinical chemistry and laboratory medicine (CCLM)*. 2020; 58(8): 1172-1181.
- [8] Thompson S, Bohn MK, Mancini N, et al. IFCC interim guidelines on biochemical/hematological monitoring of COVID-19 patients. *Clinical chemistry and laboratory medicine (CCLM)*. 2020; 58(12): 2009-2016.
- [9] Fani M, Zandi M, Ebrahimi S, Soltani S, Abbasi S. The role of miRNAs in COVID-19 disease. *Future Virology*. 2021; 16(4): 301-306.

[22] Tufa A, Gebremariam TH, Manyazewal T, et al. Inflammatory mediators profile in patients hospitalized with COVID-19 :A comparative

study. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13: 964179.

Investigating the level of IP-10 gene expression in the peripheral blood of patients with severe type of corona virus (Covid-19) compared to the mild and recovered type of the disease

Paikar S.¹, Bahrami N.^{2,3*}, Rafiei Tabatabai R.¹, Mohamadnia A.⁴

¹ Department of Microbiology, School of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Craniomaxillofacial Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Chronic Respiratory Diseases Research Center, NRITLD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* (Corresponding author): naghmehbahrami@gmail.com

Received: November 2023

Accepted: December 2023

Abstract

Introduction: SARS-CoV-2 is an enveloped, symmetrical virus with ridges on its membrane that give it a crown shape. The virus has a positive single-stranded RNA genome. The World Health Organization declared the coronavirus disease 2019 (COVID-19) a pandemic on March 11, 2020, due to the widespread development of the disease. In this research, the expression of IP-10 gene in the peripheral blood of patients with severe type of corona was evaluated in comparison with the mild and improved type of the disease.

Methods: Peripheral blood was collected from 30 patients with severe infection, 30 patients with mild infection, and 30 recovered from the disease in the age group of 30-70 years. Real-time PCR was performed to check the expression of IP-10 gene in the samples.

Results: In this study, it was shown that the expression of the IP-10 gene decreased as the severity of the corona disease decreased, and therefore, this test can be used in the diagnosis and even follow-up of the disease.

Discussion: The studied gene is suitable for predicting the severity and prognosis of the disease, but to obtain better results, more samples should be examined.

Keywords: Covid-19, biomarker, IP-10, gene expression.