

ارتباط پلی‌مورفیسم TLR^۹-rs352140 و سطوح سرمی پروتئین واکنشگر -c، اینترلوکین -۶ و IgG ضد-RBD با شانس ابتلا به سندرم کووید-۱۹ طولانی

زینب علوی تبار^۱، حامد فولادسرسشت^۲، آمنه جاوید^۳، انسیه ترکی^۴، مجید حسین‌زاده^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سندرم کووید-۱۹ طولانی (LCS (Long COVID-19 Syndrome) با علائم متنوع و طولانی، حداقل به مدت سه ماه پس از مرحله حاد کووید-۱۹، بروز می‌کند. هنوز علل و عوامل خطر مرتبط با LCS بخوبی مشخص نشده است. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط ویژگی‌های جمعیت‌شناختی، سابقه‌ی بستری، شاخص‌های آزمایشگاهی و پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی TLR^۹-rs352140 با شانس ابتلا به LCS بود.

روش‌ها: مشخصات جمعیت‌شناختی و سابقه‌ی بستری ۸۸ فرد مبتلا به LCS (گروه LCS+) و ۹۶ فرد بدون LCS (گروه LCS-) از مدارک پزشکی استخراج شد. روش الایزا به منظور ارزیابی سطوح سرمی اینترلوکین -۶ (IL-۶) و IgG ضد دومین متصل‌شونده به پذیرنده (anti-RBD IgG) و روش ARMS-PCR برای تعیین پلی‌مورفیسم TLR^۹-rs352140 بکار گرفته شد.

یافته‌ها: فراوانی افراد با سابقه‌ی ابتلا به کووید-۱۹ شدید و همچنین سطوح سرمی پروتئین واکنشگر -c (CRP) و IL-۶ در گروه LCS+ بطور معنی‌داری بیشتر از گروه LCS- بود (به ترتیب $P < 0.001$, $P = 0.005$, $P < 0.001$). علاوه بر آن، فراوانی بیشتری از ژنوتایپ TT و آلل T پلی‌مورفیسم TLR^۹-rs352140 در گروه LCS+ مشاهده شد (به ترتیب $P = 0.021$ و $P = 0.002$). در مقابل، سطح سرمی anti-RBD IgG و فراوانی ژنوتایپ CC و آلل C در گروه LCS+ کمتر از گروه LCS- بود (به ترتیب $P < 0.001$, $P = 0.010$ و $P = 0.002$). آزمون رگرسیون لجستیک چندگانه نشان داد که شانس ابتلا به LCS بطور معنی‌داری با سابقه‌ی ابتلا به کووید-۱۹ شدید، سطوح سرمی CRP و IL-۶ و همچنین با آلل T پلی‌مورفیسم TLR^۹-rs352140 مرتبط است (به ترتیب $P = 0.001$, $P = 0.003$, $P = 0.002$ و $P = 0.018$). در حالی که، سطح سرمی anti-RBD IgG و فراوانی آلل C در ارتباط با محافظت در برابر LCS بود (به ترتیب $P < 0.001$ و $P = 0.018$).

نتیجه‌گیری: سابقه‌ی ابتلا به کووید-۱۹ شدید، سطوح سرمی IL-۶ و CRP، و همچنین حضور آلل T پلی‌مورفیسم TLR^۹-rs352140 در ارتباط مستقیم با شانس ابتلا به LCS هستند.

واژگان کلیدی: کووید طولانی؛ گیرنده‌ی شبه Toll نوع ۹؛ پروتئین واکنشگر -c؛ اینترلوکین -۶

ارجاع: علوی تبار زینب، فولادسرسشت حامد، جاوید آمنه، ترکی انسیه، حسین‌زاده مجید. ارتباط پلی‌مورفیسم TLR^۹-rs352140 و سطوح سرمی پروتئین واکنشگر -c، اینترلوکین -۶ و IgG ضد-RBD با شانس ابتلا به سندرم کووید-۱۹ طولانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۱۴): ۴۷۰-۴۸۰.

مقدمه

علائم جدید حداقل سه ماه پس از عفونت اولیه با کروناویروس سندرم حاد تنفسی شدید-۲ (SARS-CoV-۲) که به مدت دو ماه ادامه دارند و با هیچ تشخیص دیگری قابل توضیح نیستند، تعریف شد (۱). برآوردهای جهانی نشان داد که ۳۴ درصد از بیماران کووید-۱۹

سندرم کووید-۱۹ طولانی (LCS (Long COVID-19 syndrome) در ابتدا با پایداری و عود مجدد علائم و یا ظهور علائم جدید بعد از مرحله حاد کووید-۱۹ شناسایی شد. متعاقباً، LCS با تداوم یا ظهور

- ۱- دانشجوی ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی فنی مهندسی و علوم، دانشگاه علم و هنر یزد، یزد، ایران
- ۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی فنی مهندسی و علوم، دانشگاه علم و هنر یزد، یزد، ایران
- ۴- کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۵- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: حامد فولادسرسشت: استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: Fouladseresht@med.mui.ac.ir

غیربستری و ۵۴ درصد از بیماران کووید-۱۹ بستری در بیمارستان، علائم طولانی مدت را پس از عبور از مرحله حاد تجربه می کنند (۲). طیف متنوع علائم در LCS نشان دهنده متاثر شدن بافت های متعدد در این بیماری است. با این حال، پاتوژن LCS به خوبی شناخته نشده است. فرضیه های متعددی در مورد مکانیسم های بیماری زایی LCS پیشنهاد شده است که می توان به پاسخ های ایمنی ضد ویروسی بی اثر پدیدار، که ممکن است منجر به علائم طولانی مدت ناشی از اثرات مستقیم سیتوپاتیک، التهاب مزمن و خود ایمنی شود، اشاره کرد (۳، ۴). با توجه به تعداد قابل توجهی از افراد مبتلا، مجموعه متنوعی از علائم و فنتیپ ها و عدم وجود دستورالعمل های درمانی و توانبخشی، LCS به عنوان یک چالش مهم بهداشت جهانی مطرح شده است. LCS نه تنها توانایی فرد برای از سرگیری زندگی و کار روزمره خود را کاهش می دهد، بلکه بار مراقبت های بهداشتی و خسارات اقتصادی ناشی از عوارض طولانی مدت کووید-۱۹ را افزایش می دهد. این مسائل نیاز به شناسایی عوامل تشخیصی و پیش آگهی برای LCS را برجسته می کند (۵). تحقیقات نشان داده است که عوامل متعددی از جمله جنسیت، سویه SARS-CoV-2، بیماری های همراه و واکسیناسیون کووید-۱۹ می توانند بر شانس ابتلا به LCS تأثیر بگذارند. به طور خاص، زن بودن و داشتن بیماری های همراه، ممکن است خطر ابتلا به LCS را افزایش دهد (۶). از سوی دیگر، افرادی که به طور کامل قبل از عفونت SARS-CoV-2 واکسینه شده اند و افرادی که به سویه Omicron آلوده شده اند ممکن است خطر کمتری برای ابتلا به LCS داشته باشند (۷). همچنین، اهداف بالقوه برای پیش بینی و تشخیص LCS ممکن است شامل اجزای سلولی و مولکولی سیستم ایمنی باشد که می تواند با پیشرفت عفونت SARS-CoV-2 و عوارض مزمن بعدی مرتبط باشد. شناسایی نشانگرهای مولکول از این جهت اهمیت بالایی دارد که بتوان افراد آسیب پذیر را هرچه سریعتر تشخیص داد و از عوارض شدید چندعضوی پیشگیری کرد (۸).

گیرنده های شبه TLR (Toll) به دلیل نقش حیاتی خود در تحریک پاسخ های ایمنی، احتمالاً شاخص های مولکولی مهمی در پیش بینی پیش آگهی بیماری های عفونی هستند. این مولکول ها شامل گروهی از پروتئین های بیان شده در سطح سلول بنام گیرنده های شناسایی کننده PAMP ها (PRRs) هستند که با شناسایی الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن ها (PAMPs)، پاسخ های ایمنی ذاتی و اکسایبی را تحریک می کنند (۹). TLR⁹ که به طور خاص توالی CpG در DNA عوامل بیگانه میکروبی را شناسایی می کند، به طور گسترده در سلول های اپی تلیالی ریه، سیستم بویایی، سیستم اسکلتی-عضلانی، سیستم عصبی، T، B، دندریتیک پلاسما سیتوئیدی، کشنده ی طبیعی، مونوسیت ها، ماکروفاژها، نوتروفیل ها، مگاکاریوسیت ها،

پلاکت ها بیان می شود (۸).

مطالعات مختلفی نقش واریانت های ژنتیکی TLR⁹ در بیماری های عفونی-التهابی را نشان داده اند. در مطالعه ای، Zhang و همکارانش ژنوتیپ TT و آلل T از واریانت ژنتیکی rs352140-TLR⁹ را مرتبط با استعداد ابتلا و پیشرفت مننژیت باکتریایی معرفی کرده اند (۱۰).

در مطالعه ی دیگر شیوع بالاتری از ژنوتیپ TT rs352140-TLR⁹ در گروه افراد مبتلا به گاستریت مزمن نسبت به افراد سالم گزارش شد (۱۱). همچنین، آلل T در ارتباط با استعداد ابتلا و پیشرفت بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک (SLE) و دیابت نوع ۱ (T1D) گزارش شد (۱۲، ۱۳). بنابراین، به نظر می رسد این واریانت ژنتیکی به واسطه نقش مهمی که در استعداد ابتلا و پیشرفت بیماری های عفونی و عوارض التهابی ناشی از آن ها دارد، می تواند یکی از اهداف بالقوه برای تبدیل شدن به نشانگر مولکولی در LCS مورد توجه قرار گیرد. تا جایی که ما می دانیم، تاکنون مطالعه ای که ارتباط واریانت ژنتیکی rs352140-TLR⁹ و شانس ابتلا به LCS را بررسی کرده باشد، وجود ندارد. از این رو، هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط ویژگی های دموگرافیک، سابقه ی بستری، شاخص های آزمایشگاهی و پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs352140-TLR⁹ با شانس ابتلا به LCS بود.

روش ها

افراد مورد مطالعه

در این مطالعه ی مورد-شاهدی (Case-Control)، کلیه شرکت کنندگان از بین افراد بهبود یافته از کووید-۱۹ حاد که در فاصله تیرماه تا شهریورماه ۱۴۰۰ (اوج شیوع سویه Delta) به دلیل ابتلا به بیماری کووید-۱۹ به بیمارستان های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مراجعه کرده بودند و دارای پرونده ی پزشکی جامعی بودند، انتخاب شدند. اطلاعات جمعیت شناسی، مانند جنسیت، سن و شاخص توده ی بدنی، و همچنین سابقه ی بستری، از جمله شدت کووید-۱۹ در طول بستری، مدت اقامت در بیمارستان و بخش ICU و سابقه ی بیماری های زمینه ای، از پرونده ی پزشکی افراد استخراج شد. افرادی که بین ۳۰ تا ۶۵ سال سن داشتند، بیماری آنها با تست qPCR-RT و CT scan تأیید شده بود، شدت بیماری آنها بر اساس راهنمایی موقت (World Health Organization) WHO تعیین شده بود و فاقد هر گونه سابقه ی بیماری های زمینه ای بودند، واجد شرایط ورود به مطالعه ما بودند. همچنین، افرادی که هرگونه بیماری عفونی و یا واکسیناسیون در طول ۳ ماه گذشته را داشتند و افراد با سابقه اعتیاد به سیگار و مواد مخدر از مطالعه حذف شدند. بر اساس شیوع ۳۸ درصدی LSC (۱۴)،

استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شدند.

تعیین ژنوتیپ و آلل

ژنوتیپ و آلل پلی مورفیسم TLR⁹-rs352140 با بهره‌گیری از روش تقویت سیستم جهش مقاوم به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (ARMS-PCR) تعیین شد. مخلوط واکنش PCR با افزودن ۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲X (آمپلیکون، دانمارک)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (متابیون، آلمان)، ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰-۴۰ نانوگرم و ۱ میکرولیتر آب مقطر استریل در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر تنظیم شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده با نرم‌افزار Primer3 طراحی و توسط نرم‌افزارهای OligoAnalyzer (NCBI) و Primer-BLAST (NCBI) بررسی شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده شامل پرایمر مشترک (Fc): 5'-GAGCTGCTGGGACACTTG-3'؛ پرایمرهای اختصاصی آلل C (Rc): 5'-CACTCATTACGGAGCTAACG-3' و آلل T (Rt): 5'-CACTCATTACGGAGCTAACG-3'؛ و پرایمرهای کنترل داخلی Ef: 5'-TGACCTTCTGTAGCTGGGG-3' و Er: 5'-CAAGCCACCCCTTCTCTAAG-3 بود. محصولات تکثیر شده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ حاوی Safe stain (سیناکلون، ایران) آشکارسازی شدند. محصول PCR تقویت‌شده ژن rs352140-TLR⁹ و ژن اکتین (کنترل داخلی) به ترتیب ۱۷۱ و ۲۳۲ جفت‌باز را شامل می‌شدند (شکل ۱).

اندازه‌گیری سطوح سرمی IL-۶ و anti-RBD IgG

غلظت سرمی IL-۶ و anti-RBD IgG به ترتیب با استفاده از کیت‌های تجاری human IL-6 ELISA MAX (Biolegend، آمریکا) و Anti-RBD IgG ELISA Kit (پیشنازط، ایران) طبق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد و به صورت پیکوگرم بر میلی‌لیتر و بر میلی‌لیتر ارائه شده توسط شرکت سازنده بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری

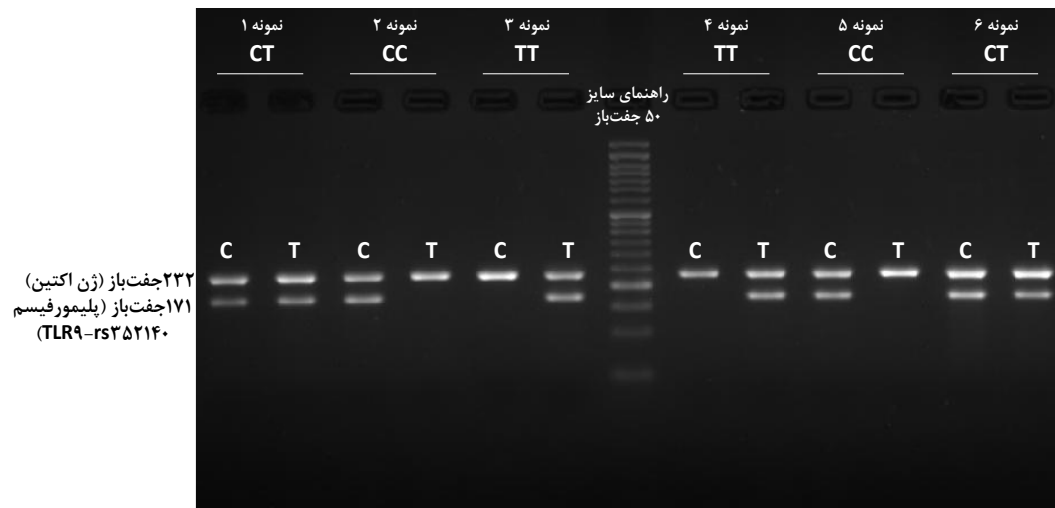
برای مقایسه‌ی متغیرهای کیفی بین گروه‌ها از آزمون‌های Chi-square استفاده شد و نتایج به صورت تعداد و درصد ارائه گردید. از آنجایی که آزمون Kolmogorov-Smirnov عدم توزیع نرمال داده‌ها را نشان داد، از آزمون Mann-Whitney U و Kruskal-Wallis به منظور ارزیابی تفاوت متغیرهای کمی، به ترتیب، بین دو و بیش از دو گروه استفاده گردید و نتایج بصورت میانه با محدوده‌ی بین چارک اول و سوم (IQR1-IQR3) گزارش شد. علاوه بر این، برای تخمین ارتباط بین متغیرها و شانس ابتلا به LCS، رگرسیون لجستیک چندگانه انجام شد. مقادیر $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) و ترسیم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad Prism استفاده شد.

توان = $Z^2 \alpha^2 / (p1(1-p1) + p2(1-p2)) / (p1-p2)^2$ ، $Z^2 \alpha^2 = 1/28$ ، $p1 = 38\%$ ، $p2 = 62\%$ و فرمول $n = (Z^2 \alpha^2 + Z^2 \beta^2) 2 \times (p1(1-p1) + p2(1-p2)) / (p1-p2)^2$ حجم نمونه برای هر گروه $n = 86$ محاسبه شد. در مجموع ۱۸۴ فرد شامل ۸۸ فرد مبتلا به سندرم کووید-۱۹ طولانی (گروه LCS+) و ۹۶ فرد سالم با سابقه‌ی ابتلا به کووید-۱۹ حاد (گروه LCS-) وارد مطالعه شدند.

بر اساس آخرین دستورالعمل ارائه شده توسط مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری (CDC (Centers for Disease Control) و خدمات بهداشت ملی (NHS (National Health Service)، شرکت‌کنندگانی که یک یا چند مورد از علائم کووید-۱۹ حاد را حداقل به مدت سه ماه از شروع علائم داشتند در گروه LCS+ قرار گرفتند. همچنین، افرادی که بعد از عبور از مرحله‌ی حاد بیماری علائم پایداری را گزارش نمی‌کردند در گروه LCS- گنجانده شدند. پس از اخذ رضایت آگاهانه، حدود ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی از هر فرد گرفته شد و در داخل لوله‌های CBC، ESR/PTT و فاقد ماده‌ی ضدانعقاد تقسیم گردید. از دستگاه Mindray BC-6800 plus (Mindray، چین) به منظور ارزیابی سلول‌های خونی، هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (HCT) بر اساس سائز، امپدانس الکتریکی و طیف‌سنجی استفاده شد. همچنین، به منظور ارزیابی سرعت رسوب گلوله‌های قرمز (ESR)، زمان پروترومبین (PT) و زمان ترومبوپلاستین نسبی (PTT) دستگاه‌های Caretium XC-A30 (CareTium، چین) و Hiperion 2204C (Hiperion، آلمان) بکار گرفته شد. از دستگاه Mindray BS-2000 (Mindray، چین) نیز برای ارزیابی سطوح پروتئین واکنشگر c-CRP (بر اساس روش ایمونوتوربیدومتری و کراتینین (Cr)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) بر اساس روش طیف‌سنجی استفاده شد. باقی‌مانده نمونه در لوله‌ی CBC به منظور استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت تا جهت تعیین ژنوتایپ و آلل‌های rs352140-TLR⁹ استفاده گردد. از باقی‌سرم جدا شده نیز جهت جداسازی سرم به منظور سنجش سطوح سرمی ایترلوکین-۶ (IL-۶) و IgG ضد دومین متصل‌شونده به پذیرنده (anti-RBD IgG) استفاده شد. لازم بذکر است که کلیه مراحل این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علم و هنر یزد تأیید و بررسی و با شناسه‌ی اخلاق IR.ACECR.JDM.REC.1402.034 به ثبت رسیده است.

استخراج DNA

DNA ژنومی با روش پروتئیناز K و با استفاده از کیت استخراج DNA (AddBio، کره‌جنوبی) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده از نمونه خون افراد استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از NanoDrop (Thermo Scientific، انگلستان) تعیین شد. نمونه‌های DNA با غلظت بالاتر از ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر قبل از



شکل ۱. محصولات ۲۳۲ و ۱۷۱ جفت باز ARMS-PCR به ترتیب برای ژن اکتین (باند های ردیف بالا) و پلی مورفیسم $rs352140$ ژن $TLR9$ (باند های ردیف پایین). از چپ به راست هر جفت چاهک مربوط به محصول ARMS-PCR یک نمونه است که علاوه بر پرایمرهای ژن اکتین، بعنوان کنترل داخلی، دارای پرایمرهای مشترک و هر یک از پرایمرهای اختصاصی آلل C (چاهک چپ) یا آلل T (چاهک راست)، جهت تعیین نوع آلل پلی مورفیسم $rs352140$ ژن $TLR9$ است. برای تعیین طول باندها از راهنمای سایز ۵۰ جفت باز استفاده شد.

(۱۳۳/۰۰-۱/۹۷) در برابر (۳۴/۹۸-۰/۶۱) $2/33$ پیکوگرم بر میلی لیتر؛ ($P < 0/001$) را داشتند (شکل ۲-ب). در مقابل، سطح پایین تری از anti-RBD IgG در گروه $LCS+$ (۱۸/۰۸-۵/۹۰) $10/75$ RU بر میلی لیتر) نسبت به گروه $LCS-$ (۷۷/۰۰-۳۱/۹۰) $50/30$ RU بر میلی لیتر؛ ($P < 0/001$) مشاهده شد (شکل ۲-ج).

فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی مورفیسم $TLR9-rs352140$

نتایج مطالعه ما نشان دهنده فراوانی بیشتر افراد با ژنوتایپ TT و آلل T در گروه $LCS+$ نسبت به گروه $LCS-$ بود ($P = 0/021$). در این راستا، افراد با ژنوتایپ TT، شانس بیشتری برای ابتلا به $LCS+$ داشتند. در حالی که، فراوانی افراد با ژنوتایپ CC و آلل C بطور معنی داری در این گروه کمتر بود ($P = 0/010$) و در ارتباط با شانس کمتر ابتلا به LCS بودند (جدول ۲).

سطح سرمی CRP، IL-6 و anti-RBD IgG بر اساس ژنوتایپ و آلل پلی مورفیسم $TLR9-rs352140$

بر اساس نتایج، سطح سرمی CRP در افراد با ژنوتایپ TT ($53-40$) $3/10$ میلی گرم بر لیتر) نسبت به افراد با ژنوتایپ CC ($30-10$) $2/1$ میلی گرم بر لیتر؛ ($P = 0/002$) بطور معنی داری بیشتر بود (شکل ۳-الف). همچنین، افراد با ژنوتایپ TT سطح سرمی بالاتری از IL-6 ($51/09$ (۱۲۹/۴۰-۹۰/۵۴) پیکوگرم بر میلی لیتر) نسبت به افراد با ژنوتایپ CC ($24/67-0/31$) $2/00$ پیکوگرم بر میلی لیتر؛ ($P = 0/001$) و CT ($62/93-0/70$) $4/90$ پیکوگرم بر میلی لیتر؛ ($P = 0/044$) داشتند (شکل ۳-ب). در مقابل، سطح سرمی anti-RBD IgG در افراد دارای ژنوتایپ CC ($39/90$ (۶۸/۲۵-۱۳/۶۰) RU بر میلی لیتر) نسبت به

یافته ها

اطلاعات جمعیت شناختی، سابقه بستی و آزمایشگاهی

در مجموع، ۴۳ مرد و ۴۵ زن با میانگین (چارک اول-سوم) سنی $39/00-55/25$ (۵۵/۲۵) $47/50$ سال در گروه $LCS+$ و ۵۵ مرد و ۴۱ زن با میانگین (چارک اول-سوم) سنی $37/25-58/00$ (۵۸/۰۰) $43/00$ سال در گروه $LCS-$ وارد مطالعه شدند. تفاوت معنی داری بین افراد دو گروه از نظر متغیر جنس و سن وجود نداشت (به ترتیب $P = 0/252$ و $P = 0/601$). با این حال، شاخص توده بدنی (BMI (Body Mass Index)، سابقه بستی در بیمارستان و بخش مراقبت های ویژه (ICU) در دوران حاد بیماری و همچنین فراوانی افراد با سابقه ابتلا به نوع شدید کووید-۱۹ حاد در گروه $LCS+$ بطور معنی داری بیشتر از گروه $LCS-$ بود (به ترتیب $P = 0/002$ ، $P < 0/001$ و $P < 0/001$). در ارتباط با پارامترهای آزمایشگاهی، گروه $LCS+$ در مقایسه با گروه $LCS-$ به طور قابل توجهی تعداد گلبول های سفید (WBC) و تعداد لنفوسیت بالاتری داشتند (به ترتیب $P = 0/016$ و $P < 0/001$). در مقابل، نسبت نوتروفیل به لنفوسیت (NLR) در گروه $LCS+$ به طور قابل توجهی کمتر بود ($P = 0/023$). تفاوت معنی داری بین دو گروه در هیچ یک از پارامترهای آزمایشگاهی دیگر مشاهده نشد (جدول ۱).

سطح سرمی CRP، IL-6 و Anti-RBD IgG

سطح سرمی CRP در گروه $LCS+$ ($5/25-1/33$) $2/40$ میلی گرم بر لیتر) بطور معنی داری بالاتر از گروه $LCS-$ ($3/18-1/10$) $1/80$ میلی گرم بر لیتر؛ ($P = 0/005$) بود (شکل ۲-الف). همچنین، گروه $LCS+$ در مقایسه با گروه کنترل سطوح بالاتری از IL-6 ($52/08$)

T (۹/۵۰-۱/۱۰) RU ۱۹/۹۰ بر میلی لیتر؛ $P = ۰/۰۰۱$ بالاتر بود.

مدل سازی رگرسیون لجستیک چندگانه برای LCS

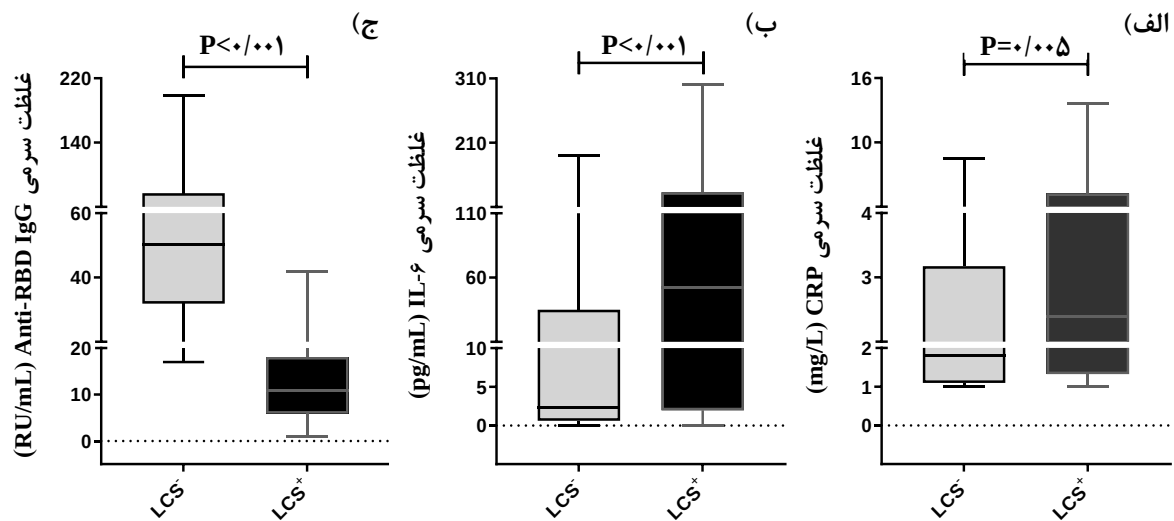
آزمون رگرسیون لجستیک چندگانه با هدف بررسی رابطه‌ی بین متغیرها و شانس ابتلا به LCS انجام شد. بعد از تعدیل اثر مهم‌ترین متغیرها شامل BMI، WBC، CRP، IL-6، anti-RBD IgG، آلف‌های پلی مورفیسم TLR^۹-rs352140 و سابقه ابتلا به نوع شدید کووید-۱۹، شانس ابتلا به کووید-۱۹ طولانی همچنان با متغیرهای BMI، WBC، CRP، IL-6، anti-RBD IgG، آلف پلی مورفیسم TLR^۹-rs352140 و سابقه مبتلا شدن به نوع شدید کووید-۱۹ بطور معنی‌داری در ارتباط بود (برای همه $P < ۰/۰۵$).

افراد با ژنوتایپ TT (۳۶/۹۸-۶/۰۵) RU ۱۸/۹۰ بر میلی لیتر؛ $P = ۰/۰۰۷$ بطور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۳-ج). بر این اساس، سطح سرمی CRP در افراد دارای آلل T (۴/۵۰-۱/۳۰) $P = ۲/۲۰$ میلی گرم بر لیتر) بطور معنی‌داری بالاتر از افراد دارای آلل C (۳/۰۰-۱/۲۰) $P = ۱/۷۰$ میلی گرم بر لیتر؛ $P < ۰/۰۰۱$ بود. این نتایج در مورد IL-6 نیز صدق می‌کرد. به طوری که، در افراد دارای آلل T (۷۸/۶۳-۰/۹۳) $P = ۱۳/۸۱$ پیکوگرم بر میلی لیتر)، سطح سرمی IL-6 نسبت به افراد دارای آلل C (۷۹/۵۵-۰/۶۴) $P = ۳/۰۹$ پیکوگرم بر میلی لیتر؛ $P = ۰/۰۲۲$ بالاتر ارزیابی شد. در مقابل، سطح anti-RBD IgG در افراد دارای آلل C (۸۰-۹۰) $P = ۳۲/۵۰$ (۵۹/۱۴ RU بر میلی لیتر) نسبت به افراد دارای آلل

جدول ۱. مقایسه‌ی اطلاعات جمعیت‌شناختی، سابقه‌ی بستری و آزمایشگاهی دو گروه LCS+ و LCS-

متغیر	گروه	LCS- (۹۶ نفر) تعداد (درصد) میان (چارک اول-سوم)	LCS+ (۸۸ نفر) تعداد (درصد) میان (چارک اول-سوم)	P
خصوصیات	جنسیت: تعداد	زن ۴۱ (۴۲/۷۰)	زن ۴۵ (۵۱/۱۰)	۰/۲۵۲
	مرد	۵۵ (۵۷/۳۰)	۴۳ (۴۸/۹۰)	
جمعیت‌شناختی	سن؛ سال	۴۳/۰۰ (۳۷/۲۵-۵۸/۰۰)	۴۷/۵۰ (۳۹/۰۰-۵۵/۲۵)	۰/۶۰۱
	شاخص توده‌بدنی (BMI)؛ کیلوگرم بر مترمربع	۲۵/۹۵ (۲۴/۱۴-۲۸/۲۹)	۲۸/۴۸ (۲۶/۴۹-۳۰/۸۱)	۰/۰۰۲ *
تاریخچه‌ی بستری	تعداد روزهای بستری؛ روز	۰/۰۰ (۰/۰۰-۶/۰۰)	۸/۵۰ (۶/۰۰-۱۳/۰۰)	<۰/۰۰۱ *
	اقامت در بخش مراقبت ویژه	بله ۴ (۴/۲۰)	۲۱ (۲۳/۹۰)	<۰/۰۰۱ *
در طول فاز حاد	خیر	۹۲ (۹۵/۸۰)	۶۷ (۷۶/۱۰)	
	شدید	۱۱ (۱۱/۵۰)	۴۹ (۵۵/۷۰)	<۰/۰۰۱ *
شدت کووید-۱۹ حاد	غیر شدید	۸۵ (۸۸/۵۰)	۳۹ (۴۴/۳۰)	
	تعداد گلبول سفید (WBC)؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۶/۳۶ (۵/۸۰-۷/۳۶)	۶/۹۹ (۵/۹۵-۷/۹۷)	۰/۰۱۶ *
تعداد گلبول قرمز (RBC)؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	تعداد گلبول قرمز (RBC)؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۵/۱۸ (۴/۸۸-۵/۶۳)	۵/۱۵ (۴/۸۴-۵/۵۰)	۰/۵۶۸
	هموگلوبین (Hb)؛ گرم بر دسی لیتر	۱۴/۶۵ (۱۳/۴۲-۱۵/۶۷)	۱۴/۲۵ (۱۳/۵۰-۱۵/۷۰)	۰/۸۳۷
هماتوکریت (HCT)؛ درصد	تعداد پلاکت؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۴۴/۸۵ (۴۱/۴۲-۴۷/۳۷)	۴۳/۵۵ (۴۰/۲۲-۴۷/۰۷)	۰/۱۷۱
	تعداد نوتروفیل؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۲۹۰/۵۰ (۲۵۹/۲۵-۳۳۱/۵۰)	۳۱۹/۰۰ (۲۵۳/۰۰-۳۶۱/۷۵)	۰/۱۲۹
تعداد لنفوسیت؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	تعداد نوتروفیل؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۳/۷۲ (۳/۲۵-۴/۳۸)	۴/۰۰ (۳/۲۷-۴/۷۵)	۰/۲۰۸
	نسبت تعداد نوتروفیل به لنفوسیت (NLR)	۲/۰۱ (۱/۷۹-۲/۴۸)	۲/۳۷ (۱/۹۵-۳/۰۲)	<۰/۰۰۱ *
سرعت رسوب گلبول قرمز (ESR)؛ میلیمتر بر ساعت	نسبت تعداد نوتروفیل به لنفوسیت (NLR)	۱/۷۷ (۱/۴۴-۲/۱۲)	۱/۶۰ (۱/۲۵-۲/۱۱)	۰/۰۲۳ *
	سرعت رسوب گلبول قرمز (ESR)؛ میلیمتر بر ساعت	۷/۰۰ (۴/۰۰-۱۱/۰۰)	۹/۰۰ (۴/۰۰-۱۳/۰۰)	۰/۳۳۱
لاکتات دهیدروژناز (LDH)؛ واحد بر لیتر	لاکتات دهیدروژناز (LDH)؛ واحد بر لیتر	۳۲۷/۰۰ (۲۹۱/۰۰-۳۸۷/۰۰)	۳۳۲/۰۰ (۲۹۱/۰۰-۴۲۵/۰۰)	۰/۴۸۷
	کراتینین (Cr)؛ میلی گرم بر دسی لیتر	۱/۰۴ (۰/۹۰-۱/۱۷)	۱/۰۶ (۰/۹۱-۱/۱۹)	۰/۷۷۵
آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)؛ واحد بر لیتر	آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)؛ واحد بر لیتر	۲۰/۰۰ (۱۸/۰۰-۲۴/۰۰)	۲۱/۰۰ (۱۹/۰۰-۲۴/۰۰)	۰/۴۳۳
	آلانین آمینوترانسفراز (ALT)؛ واحد بر لیتر	۲۲/۰۰ (۱۶/۲۵-۲۹/۰۰)	۲۰/۵۰ (۱۶/۰۰-۲۶/۷۵)	۰/۲۸۵
زمان پروترومبین (PT)؛ ثانیه	زمان پروترومبین (PT)؛ ثانیه	۱۳/۰۰ (۱۳/۰۰-۱۳/۰۰)	۱۳/۰۰ (۱۳/۰۰-۱۳/۰۰)	۰/۷۰۶
	زمان ترومبوپلاستین نسبی (PTT)؛ ثانیه	۳۰/۶۰ (۲۹/۳۷-۳۲/۷۷)	۳۱/۰۵ (۲۹/۲۲-۳۳/۰۰)	۰/۹۸۵

ALT: Alanine Transaminase, AST: Aspartate Transaminase, Cr: Creatinine, ESR: Erythrocyte Sedimentation Rate, Hb: Hemoglobin, HCT: Hematocrit, Long COVID-19 Syndrome: LCS, Neutrophil/Lymphocyte Ratio: NLR, Lactate Dehydrogenase: LDH, (سندرم کووید-۱۹ طولانی), PTT: Partial Thromboplastin Time, Prothrombin Time: PT, White Blood Cells: WBC, Red Blood Cells: RBC, * نشان‌دهنده $P < ۰/۰۵$.

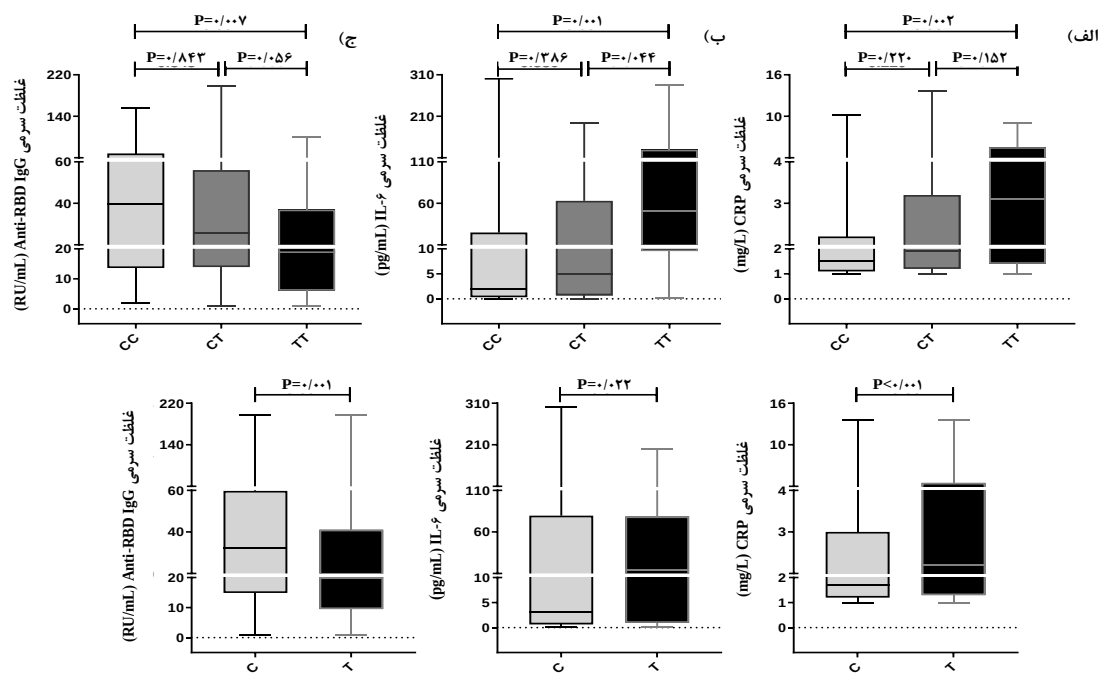


شکل ۲. مقایسه‌ی سطوح سرمی (الف) CRP، (ب) IL-۶ و (ج) anti-RBD IgG بین دو گروه LCS- و LCS+

جدول ۲. فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی مورفیسم TLR⁴-rs352140 در گروه‌های LCS- و LCS+

TLR ⁴ -rs352140	LCS- (۹۶ نفر) تعداد (درصد)	LCS+ (۸۸ نفر) تعداد (درصد)	P	OR (95% CI)
CC	۳۱ (۳۲/۲۹)	۱۴ (۱۵/۹۱)	۰/۰۱۰ °	۰/۴۴ (۰/۱۹-۰/۹۸)
CT	۴۲ (۴۳/۷۵)	۳۹ (۴۴/۳۲)	۰/۹۳۸	۱/۰۲ (۰/۵۷-۱/۸۳)
TT	۲۳ (۲۳/۹۶)	۳۵ (۳۹/۷۷)	۰/۰۲۱ °	۲/۱۰ (۱/۱۱-۳/۹۵)
C	۱۰۴ (۵۴/۱۷)	۶۷ (۳۸/۰۷)	۰/۰۰۲ °	۱/۹۲ (۱/۲۷-۲/۹۲)
T	۸۸ (۴۵/۸۳)	۱۰۹ (۶۱/۹۳)		

CI: Confidence Interval (بازه اطمینان), OR: Odds Ratio (نسبت شانس), LCS: Long COVID-19 Syndrome (سندرم کووید-۱۹ طولانی), TLR: Toll Like Receptor (گیرنده شبه toll), * : نشان‌دهنده‌ی $P < 0.05$.



شکل ۳. سطوح سرمی (الف) CRP، (ب) IL-۶ و (ج) anti-RBD IgG بین ژنوتایپ‌های TT، CT و CC و آلل‌های C و T

جدول ۳. رگرسیون لجستیک چندگانه به منظور بررسی ارتباط بین متغیرها و شانس ابتلا به LCS

متغیر	B	S.E.	Wald	df	P	OR (95% C.I.)
شدت کووید-۱۹ حاد	۱/۹۸	۰/۵۹	۱۱/۱۶	۱	* ۰/۰۰۱	۷/۲۲ (۲/۲۶-۲۳/۰۰)
شاخص توده بدنی (BMI)؛ کیلوگرم بر مترمربع	۰/۱۳	۰/۰۶	۵/۴۹	۱	* ۰/۰۱۹	۱/۱۴ (۱/۰۲-۱/۲۸)
تعداد گلبول سفید (WBC)؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۰/۳۲	۰/۱۳	۶/۱۷	۱	* ۰/۰۱۳	۱/۳۸ (۱/۰۷-۱/۷۸)
نسبت تعداد نوتروفیل به لنفوسیت (NLR)	-۰/۶۱	۰/۴۷	۱/۷۱	۱	۰/۱۹۳	۰/۵۴ (۰/۲۲-۱/۳۶)
پروتئین واکنشگر C-CRP)؛ میلی گرم بر لیتر	۰/۲۰	۰/۰۷	۸/۶۴	۱	* ۰/۰۰۳	۱/۲۳ (۱/۰۷-۱/۴۱)
اینترلوکین-۶ (IL-6)؛ پیکوگرم بر میلی لیتر	۰/۰۱	۰/۰۰۳	۹/۴۱	۱	* ۰/۰۰۲	۱/۰۱ (۱/۰۰-۱/۰۲)
IgG ضد RBD (Anti-RBD IgG)؛ RU بر میلی لیتر	-۰/۱۶	۰/۰۳	۳۹/۶۵	۱	* <۰/۰۰۱	۰/۸۶ (۰/۸۱-۰/۹۰)
آل ال C/T TLR ⁹ -rs352140؛ درصد	۰/۵۱	۰/۲۱	۵/۶۱	۱	* ۰/۰۱۸	۱/۶۶ (۱/۰۹-۲/۵۲)

Anti-RBD IgG: Anti-Receptor Binding Domain Immunoglobulin G، BMI: Body Mass Index، CI: Confidence Interval (بازه اطمینان)، CRP: C-
 Reactive Protein، IL-6: Interleukin-6، LCS: Long COVID-19 Syndrome (سندرم کووید-۱۹ طولانی)، NLR: Neutrophil/Lymphocyte Ratio، OR: Odds Ratio (نسبت شانس)، TLR: Toll Like Receptor (گیرنده شبه Toll)، WBC: White Blood Cells، * نشان دهنده $P < ۰/۰۵$.

بیشتری برای ابتلا به LCS در دوران بعد از مرحله حاد بیماری داشتند. در این راستا، مطالعات آسیب بافتی طولانی مدت و علائم پایدار بیشتری را در افرادی که نیازمند بستری طولانی مدت در بیمارستان و بخش مراقبت های ویژه داشتند را نشان دادند (۱۸). این عوارض و علائم پایدار ممکن است ناشی از پاسخ های التهابی سیستمیک و مزمن باشد که ناشی از طوفان های سایتوکاینی ناشی از کووید-۱۹ شدید و آسیب های ناشی از اقدامات پزشکی مورد نیاز مانند لوله گذاری و تجویز کورتیکواستروئیدها باشد.

استفاده ی بیش از حد از کورتیکواستروئیدها در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ شدید نیز می تواند منجر به ایجاد عفونت های فرصت طلب ثانویه شود که باعث پاسخ های التهابی پایدار می شوند (۱۹). التهاب پایدار در LCS همچنین ممکن است به دلیل تداوم آنتی ژن های SARS-۲ CoV- در بافت ها، واکنش های خودواکنشگر، و شکست سیستم ایمنی فرد در بازگشت به هموستاز اولیه باشد (۲۰، ۲۱). تولید بیش از حد سیتوکین های التهاب آور با تحریک آپوپتوز، فعالیت سمیت سلولی و اختلال در کنترل خروج لکوسیت ها از بافت های لنفاوی، آسیب بافتی را تشدید کند و به طور خاص، IL-۶ تمایز سلول های CD4+ T بکر به سلول های Th۱۷ را تقویت می کند و تمایز Treg را مهار می کند، که منجر به اختلال تحمل ایمنی و ایجاد التهاب مزمن می شود (۲۲، ۲۳). TNF- α با القای بیان IL-۶ این فرایند را بیشتر تشدید می کند (۲۲). در راستای این نتایج، مطالعه ما نشان داد که سطوح بالای IL-۶ و CRP با شانس بیشتر ابتلا به LCS در ارتباط بودند. به طوری که به ازای هر واحد افزایش در CRP و IL-۶ به ترتیب ۰/۲۳ و ۰/۰۱ برابر شانس ابتلا به LCS افزایش می یابد. در مقابل، به ازای هر واحد افزایش در anti-RBD IgG شانس ابتلا به LCS به میزان ۰/۱۵ برابر کاهش می یابد.

ویژگی های ژنتیکی خاص در افراد جامعه از دیگر عوامل مؤثر در تعیین استعداد ابتلا یا پیشرفت بیماری های مختلف است (۲۴-۲۶). در

به طوری که متغیرهای BMI، WBC، CRP، IL-۶، آل ال TLR⁹-rs352140 و سابقه ابتلا به نوع شدید کووید-۱۹ با افزایش شانس ابتلا به کووید-۱۹ طولانی در ارتباط بودند. در حالی که، Anti-RBD IgG و آل ال C TLR⁹-rs352140 اثر محافظتی بسزایی در برابر ابتلا به LCS داشتند (جدول ۳).

بحث

مطالعه ی ما ارتباط احتمالی بین خصوصیات جمعیت شناختی، سابقه ی بستری در دوران ابتلا به کووید-۱۹ حاد، شاخص های آزمایشگاهی و فراوانی ژنوتیپ و آلل های TLR⁹-rs352140 و شانس ابتلا به LCS را بررسی کرد. بخشی از نتایج این مطالعه نشان داد که به ازای افزایش هر واحد BMI شانس ابتلا به LCS به میزان ۰/۱۴ واحد افزایش می یابد. در این رابطه، یافته های قبلی چاقی را به عنوان یک عامل خطر مهم برای بهبودی کامل عوارض افراد بهبود یافته از کووید-۱۹ حاد عنوان کرده اند. نشان داده شده است که افراد با BMI بالاتر از ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع در معرض خطر نسبی عوارض طولانی مدت کووید-۱۹ هستند (۱۵). به نظر می رسد نقص در عملکرد میتوکندری و تولید گونه های اکسیژن فعال ناشی از هایپرگلیسمی که منجر به تولید واسطه های التهاب آور مانند لپتین، CRP، TNF- α و IL-۶ می شود، محتمل ترین مکانیسم پیشنهادی در این رابطه باشد. این واسطه های التهابی می توانند پاسخ ایمنی را به سمت التهاب مزمن و بی اثر در برابر عفونت منحرف کنند که منجر به اختلال عملکرد سلولی و آسیب بافت می شود و افراد چاق را در برابر تداوم ویروسی و عفونت های ثانویه آسیب پذیرتر می کند (۱۶، ۱۷).

همچنین، این پژوهش ارتباط بین شدت کووید-۱۹ در مرحله حاد بیماری و شانس ایجاد LCS در دوران بعد از آن را نشان داد. طوریکه افراد با سابقه ی ابتلا به نوع شدید کووید-۱۹ حاد به میزان ۷/۲ برابر شانس

در سایر مطالعات نیز پیشرفت LCS با افزایش CRP و IL-6 و کاهش anti-RBD IgG در ارتباط بوده است (۳۲-۳۴). مطالعه‌ی ما محدودیت‌هایی داشت که لازم است در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرند. یکی از محدودیت‌ها، عدم وجود معیارهای مشخص برای تشخیص LCS بود که به‌طور بالقوه بر دقت طبقه‌بندی افراد به گروه‌های LCS+ و LCS- اثرگذار بود. علاوه بر این، حجم نمونه کوچک، چالش‌هایی را ایجاد کرد که ممکن است بر نتایج تأثیر گذاشته باشد. همچنین، ناهمگونی ژنتیکی در جمعیت ممکن است بر شیوع LCS و از همه مهمتر فراوانی یا عملکرد پلی مورفیسم بررسی‌شده تأثیرگذار باشد. از طرف دیگر، تنها یک پلی مورفیسم خاص در مطالعه ما مورد ارزیابی قرار گرفت و اثرات تعاملی سایر پلی مورفیسم‌ها در نظر گرفته نشد که می‌تواند بر تفسیر نتایج اثرگذار باشد. کمبود مطالعات مشابه، توانایی ما را برای مقایسه‌ی بیشتر نتایج محدود کرد. علاوه بر این، مطالعه ما از یک طرح مورد-شاهدی پیروی می‌کرد که فقط شرکت‌کنندگان را در یک نقطه زمانی ارزیابی می‌نمود. بنابراین، توصیه می‌کنیم مطالعات طولی در مقیاس بزرگتر و در جمعیت‌های قومی مختلف انجام شود تا تغییرات در علائم و سطح نشانگرهای التهابی در بیماران بهبودیافته از کووید-۱۹ را در طول زمان بررسی کند.

نتیجه‌گیری

سابقه‌ی ابتلا به کووید-۱۹ شدید، BMI، WBC، سطح سرمی IL-6 و CRP و همچنین حضور آلل T پلی مورفیسم TLR⁹-rs352140 در ارتباط با افزایش شانس ابتلا به LCS هستند. درحالی‌که، سطح سرمی anti-RBD IgG و آلل C پلی مورفیسم TLR⁹-rs352140 احتمالاً منجر به حفاظت در برابر ابتلا به LCS می‌شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی سرکار خانم زینب علوی تبار در مقطع کارشناسی ارشد رشته ژنتیک با کد ۱۷۶۱۲۷۸ می‌باشد که در دانشگاه علم و هنر یزد، تصویب شد و با حمایت مالی شخص دانشجو به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات خانم صدقی و خانم نامداری تقدیر و تشکر می‌شود.

مطالعه ما نیز مشخص شد که ژنوتیپ T/T و آلل T از rs352140-TLR⁹ به طور قابل توجهی با افزایش شانس ابتلا به LCS مرتبط است. در همین راستا، در یکی از معدود مطالعات پیشین به بررسی فراوانی ژنوتایپ‌های پلی مورفیسم TLR⁹-rs352140 در افراد مبتلا به انواع کووید-۱۹ حاد پرداخته‌اند. در این مطالعه نشان داده شده است که ژنوتایپ‌های CT و TT به ترتیب با نوع شدید و ملایم کووید-۱۹ در ارتباط هستند (۲۷).

تا جایی که ما می‌دانیم، هیچ مطالعه‌ای به بررسی ارتباط این پلی مورفیسم و عوارض طولانی‌مدت بعد از مرحله‌ی حاد بیماری نپرداخته است. گرچه مطالعات مختلفی ارتباط پلی مورفیسم TLR⁹-rs352140 با سایر بیماری‌های عفونی-التهابی را بررسی کرده‌اند. در یک مطالعه Zhang و همکاران، ژنوتایپ TT و آلل T از پلی مورفیسم TLR⁹-rs352140 را مرتبط با استعداد ابتلا و پیشرفت مننژیت باکتریایی معرفی کرده‌اند (۱۰).

در مطالعه‌ی دیگر شیوع بالایی از ژنوتایپ TT TLR⁹-rs352140 در گروه افراد مبتلا به گاستریت مزمن نسبت به افراد سالم گزارش شد (۱۱). همچنین، آلل T در ارتباط با استعداد ابتلا و پیشرفت بیماری SLE و T1D معرفی شده است (۱۲، ۱۳). در توجیه نتایج باید در نظر داشت که TLR⁹ در محفظه داخل سلولی به عنوان گیرنده توالی CpG باکتریایی و ویروسی عمل می‌کند (۲۸). از این‌رو، تشدید التهاب بیش از حد ناشی از SARS-CoV-۲ ممکن است ناشی از فعال‌سازی TLR⁹ باشد که یک نیروی محرکه آرام اما قدرتمند است (۸). موارد متعددی از پلی مورفیسم ژن TLR⁹ وجود دارد که منجر به افزایش عملکرد پروتئین آن می‌شود. این فرایند باعث فعال شدن سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و همچنین پاسخ‌های سیستم ایمنی می‌شود که با بروز بالاتر عوارض التهابی با واسطه ایمنی مرتبط است (۲۹، ۳۰). در این راستا، مشخص شده است تقویت سیگنالینگ IL-۶-TLR⁹ توسط پلی مورفیسم‌های خاص در پاسخ به تحریک CpG منجر به تحریک و تکثیر سلول‌های B می‌شود (۳۱). در مطالعه‌ی ما نیز به نظر می‌رسد وجود ژنوتایپ TT و آلل T در پلی مورفیسم TLR⁹-rs352140 با سطوح بالاتری از CRP و IL-6 و سطوح کمتری از anti-RBD IgG همراه است که ممکن است، مرتبط با پاک‌سازی ضعیف‌تر ویروس و آنتی‌ژن‌های آن و بدنبال آن افزایش پاسخ‌های التهابی و در نهایت شانس ابتلا به LCS باشد.

References

- Kerzhner O, Berla E, Har-Even M, Ratmanskyy M, Goor-Aryeh I. Consistency of inconsistency in long-COVID-19 pain symptoms persistency: A systematic review and meta-analysis. *Pain Practice* 2024; 24(1): 120-59.
- Chen C, Hauptert SR, Zimmermann L, Shi X, Fritsche LG, Mukherjee B. Global prevalence of post-coronavirus disease 2019 (COVID-19) condition or long COVID: a meta-analysis and systematic review. *J Infect Dis* 2022; 226(9): 1593-607.
- Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond)* 2021; 53(10): 737-54.

4. Torki E, Gharezade A, Doroudchi M, Sheikhi S, Mansury D, Sullman MJ, et al. The kinetics of inhibitory immune checkpoints during and post-COVID-19: the knowns and unknowns. *Clin Exp Med* 2023; 23(7): 3299-319.
5. Torki E, Hoseininasab F, Moradi M, Sami R, Sullman MJ, Fouladseresht H. The demographic, laboratory and genetic factors associated with long COVID-19 syndrome: a case-control study. *Clin Exp Med* 2024; 24(1): 1.
6. Perumal R, Shunmugam L, Naidoo K, Abdool Karim SS, Wilkins D, Garzino-Demo A, et al. Long COVID: a review and proposed visualization of the complexity of long COVID. *Front Immunol* 2023; 14: 1117464.
7. Notarte KI, Catahay JA, Velasco JV, Pastrana A, Ver AT, Pangilinan FC, et al. Impact of COVID-19 vaccination on the risk of developing long-COVID and on existing long-COVID symptoms: A systematic review. *EClinicalMedicine* 2022; 53.
8. Bezemer GF, Garssen J. TLR9 and COVID-19: a multidisciplinary theory of a multifaceted therapeutic target. *Front Pharmacol* 2021; 11: 601685.
9. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30(1): 16-34.
10. Zhang P, Zhang N, Liu L, Zheng K, Zhu L, Zhu J, et al. Polymorphisms of toll-like receptors 2 and 9 and severity and prognosis of bacterial meningitis in Chinese children. *Sci Rep* 2017; 7: 42796.
11. Eed EM, Hawash YA, Khalifa AS, Alsharif KE, Alghamdi SA, Almalki AA, et al. Association of toll-like receptors 2, 4, 9 and 10 genes polymorphisms and *Helicobacter pylori*-related gastric diseases in Saudi patients. *Indian J Med Microbiol* 2020; 38(1): 94-100.
12. Bashir MA, Afzal N, Hamid H, Kashif M, Niaz A, Jahan S. Analysis of single nucleotide polymorphisms encompassing toll like receptor (TLR)-7 (rs179008) and (TLR)-9 (rs352140) in systemic lupus erythematosus patients. *Adv Life Sci* 2021; 8(2): 103-7.
13. Wang Y, Xia Y, Chen Y, Xu L, Sun X, Li J, et al. Association analysis between the TLR9 gene polymorphism rs352140 and type 1 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023; 14: 1030736.
14. O'Mahoney LL, Routen A, Gillies C, Ekezie W, Welford A, Zhang A, et al. The prevalence and long-term health effects of Long Covid among hospitalised and non-hospitalised populations: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine* 2023; 55: 101762.
15. Vimercati L, De Maria L, Quarato M, Caputi A, Gesualdo L, Migliore G, et al. Association between long COVID and overweight/obesity. *J Clin Med* 2021; 10: 4143.
16. Klöting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 2014; 15(4): 277-87.
17. Xiang M, Wu X, Jing H, Novakovic VA, Shi J. The intersection of obesity and (long) COVID-19: Hypoxia, thrombotic inflammation, and vascular endothelial injury. *Front Cardiovasc Med* 2023; 10: 1062491.
18. Cervia C, Zurbuchen Y, Taeschler P, Ballouz T, Menges D, Hasler S, et al. Immunoglobulin signature predicts risk of post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Commun* 2022; 13(1): 446.
19. Asadi-Pooya AA, Akbari A, Emami A, Lotfi M, Rostamihosseinkhani M, Nemati H, et al. Risk factors associated with long COVID syndrome: a retrospective study. *Iran J Med Sci* 2021; 46(6): 428-36.
20. Newell KL, Waickman AT. Inflammation, immunity, and antigen persistence in post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection. *Curr Opin Immunol* 2022; 77: 102228.
21. Proal AD, VanElzakker MB. Long COVID or post-acute sequelae of COVID-19 (PASC): an overview of biological factors that may contribute to persistent symptoms. *Front Microbiol* 2021; 12: 698169.
22. Birra D, Benucci M, Landolfi L, Merchionda A, Loi G, Amato P, et al. COVID 19: a clue from innate immunity. *Immunol Res* 2020; 68(3): 161-8.
23. Tang L, Yin Z, Hu Y, Mei H. Controlling cytokine storm is vital in COVID-19. *Front Immunol* 2020; 11: 570993.
24. Fouladseresht H, Khazaei S, Javad Zibaenezhad M, Hossein Nikoo M, Khosropanah S, Doroudchi M. Association of ABCA1 haplotypes with coronary artery disease. *Lab Med* 2020; 51(2): 157-68.
25. Rayati Damavandi A, Zolfaghari Baghadorani P, Kardideh B, Fouladseresht H, Golabi M, Ghezelbash B, et al. The Association of Programmed Death 1 Gene Polymorphisms of PD1. 3 G/A and PD1. 5 C/T with Risk of COVID-19 in an Iranian Population: A Case-Control Study. *Viral Immunol* 2022; 35: 483-90.
26. Fouladseresht H, Safa A, Khosropanah S, Doroudchi M. Increased frequency of HLA-A*02 in patients with atherosclerosis is associated with VZV seropositivity. *Arch Physiol Biochem* 2021; 127(4): 351-8.
27. Ashchina LA BN, Bolgova AI, Levashova OA, Lesina ON. Prognostic significance of TLR3 and TLR9 gene polymorphism in assessing the severity of COVID-19. *Journal Infectology* 2024;16(1): 47-55.
28. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85(2): 85-95.
29. Alhabibi AM, Hassan AS, Abd Elbaky NM, Eid HA, Khalifa MAAA, Wahab MA, et al. Impact of toll-like receptor 2 and 9 gene polymorphisms on COVID-19: susceptibility, severity, and thrombosis. *J Inflamm Res* 2023; 16: 665-75.
30. Ng MTH, Van't Hof R, Crockett JC, Hope ME, Berry S, Thomson J, et al. Increase in NF-κB binding affinity of the variant C allele of the Toll-like receptor 9-1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease. *Infect Immun* 2010; 78(3): 1345-52.
31. Carvalho A, Osorio NS, Saraiva M, Cunha C, Almeida AJ, Teixeira-Coelho M, et al. The C allele of rs5743836 polymorphism in the human TLR9 promoter links IL-6 and TLR9 up-regulation and confers increased B-cell proliferation. *PLoS One* 2011; 6(11): e28256.
32. Liu B, Shi Y, Zhang W, Li R, He Z, Yang X, et al. Recovered COVID-19 patients with recurrent viral

- RNA exhibit lower levels of anti-RBD antibodies. *Cell Mol Immunol* 2020; 17(10): 1098-100.
33. Wolszczak-Biedrzycka B, Dorf J, Milewska A, Łukaszuk M, Naumnik W, Kosidło JW, et al. The diagnostic value of inflammatory markers (CRP, IL6, CRP/IL6, CRP/L, LCR) for assessing the severity of COVID-19 symptoms based on the MEWS and predicting the risk of mortality. *J Inflamm Res* 2023; 16: 2173-88.
34. Fouladseresht H, Ghamar Talepoor A, Farjadian S, Khosropanah S, Doroudchi M. Anti-varicella Zoster Virus IgG and hsCRP Levels Correlate with Progression of Coronary Artery Atherosclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2019; 18(5): 543-53.

Association of TLR9-rs352140 Polymorphism and Serum Levels of CRP, IL-6, and Anti-RBD IgG with the Chance of Developing Long COVID-19 Syndrome

Zeynab Alavitabar¹, Hamed Fouladseresht², Amaneh Javid³,
Ensiye Torki⁴, Majid Hosseinzadeh⁵

Original Article

Abstract

Background: Long COVID-19 syndrome (LCS) is characterized by a wide array of symptoms persisting for at least three months after the acute phase of COVID-19. The etiology and risk factors associated with LCS remain poorly understood. This study aimed to investigate the relationship between demographic characteristics, hospitalization history, laboratory parameters, and the TLR9-rs352140 single-nucleotide polymorphism in relation to the risk of developing LCS.

Methods: We collected demographic and hospitalization data from medical records of 88 individuals with LCS (LCS+ group) and 96 without LCS (LCS- group). Serum levels of interleukin-6 (IL-6) and anti-receptor binding domain IgG (anti-RBD IgG) were measured using ELISA, and the TLR9-rs352140 polymorphism was genotyped via ARMS-PCR.

Findings: The LCS+ group showed a significantly higher prevalence of severe COVID-19 history, along with elevated serum levels of C-reactive protein (CRP) and IL-6, compared to the LCS- group ($P < 0.001$, $P = 0.005$, and $P < 0.001$; respectively). Furthermore, the TT genotype and T allele of the TLR9-rs352140 polymorphism were more common in the LCS+ group ($P = 0.021$ and $P = 0.002$; respectively). Conversely, the serum level of anti-RBD IgG and the frequency of the CC genotype and C allele were lower ($P < 0.001$, $P = 0.010$, and $P = 0.002$; respectively). Multivariate logistic regression analysis indicated that a history of severe COVID-19, higher CRP and IL-6 levels, and the T allele of TLR9-rs352140 were significantly associated with an increased risk of LCS ($P = 0.001$, $P = 0.003$, $P = 0.002$, and $P = 0.018$; respectively). While, higher anti-RBD IgG levels and the C allele were linked to a reduced risk of LCS ($P < 0.001$ and $P < 0.018$; respectively).

Conclusion: A history of severe COVID-19, higher serum IL-6 and CRP levels, and the T allele of the TLR9-rs352140 polymorphism are positively correlated with the risk of developing LCS.

Keywords: Long COVID; Toll-Like Receptor 9; C-Reactive Protein; Interleukin-6

Citation: Alavitabar Z, Fouladseresht H, Javid A, Torki E, Hosseinzadeh M. Association of TLR9-rs352140 Polymorphism and Serum Levels of CRP, IL-6, and Anti-RBD IgG with the Chance of Developing Long COVID-19 Syndrome. J Isfahan Med Sch 2025; 43(814): 470-80.

1- Genetics Student, Department of biological sciences, Faculty of Engineering and Science, Science and Art university of Yazd, Yazd, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

3- Assistant Professor, Department of biological sciences, Faculty of Engineering and Science, Science and Art university of Yazd, Yazd, Iran.

4- MSc, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

5- Assistant Professor, Department of Genetic and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Hamed Fouladseresht, Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: Fouladseresht@med.mui.ac.ir