

## ارتباط پلی‌مورفیسم TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰ و سطوح سرمی پروتئین واکنشگر-c، اینترلوکین-۶ و IgG ضد-RBD با شانس ابتلا به سندرم کووید-۱۹ طولانی

زینب علوی تبار<sup>۱</sup>، حامد فولادسرسشت<sup>۲</sup>، آمنه جاوید<sup>۳</sup>، انسیه ترکی<sup>۴</sup>، مجید حسین‌زاده<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** سندروم کووید-۱۹ طولانی (LCS: Long COVID-19 Syndrome) با علائم متنوع و طولانی، حداقل به مدت سه‌ماه 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 TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰ 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 دومن متصل‌شونده به پذیرنده (anti-RBD IgG) و روش ARMS-PCR برای تعیین پلی‌مورفیسم TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰-TLR۹ 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 TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰ 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 TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰ 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 TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰ 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 TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰ 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.

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

### مقدمه

سندروم 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 مسؤول: 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 می‌کنند (۲). طیف متنوع علائم در LCS نشان‌دهنده متاثر شدن بافت‌های متعدد در این بیماری است. با این حال، پاتوژن LCS به‌خوبی شناخته نشده است. فرضیه‌های متعددی در مورد مکانیسم‌های بیماری‌زایی LCS پیشنهاد شده است که می‌توان به پاسخ‌های ایمنی ضدویروسی بی‌اثر پایدار، که ممکن است منجر به علائم طولانی مدت ناشی از اثرات مستقیم سیتوپاتیک، التهاب مزمن و خودایمنی شود، اشاره کرد (۳، ۴). با توجه به تعداد قابل توجهی از افراد مبتلا، مجموعه متنوعی از علائم و فنوتیپ‌ها و عدم وجود دستورالعمل‌های درمانی و توانبخشی، LCS به‌عنوان یک چالش مهم بهداشت جهانی مطرح شده است. LCS نه تنها توانایی فرد برای از سرگیری زندگی و کار روزمره خود را کاهش می‌دهد، بلکه بار مراقبت‌های بهداشتی و خسارات اقتصادی ناشی از عوارض طولانی مدت کووید-۱۹ را افزایش می‌دهد. این مسائل نیاز به شناسایی عوامل تشخیصی و پیش‌آگهی برای LCS را برجسته می‌کند (۵). تحقیقات نشان داده است که عوامل متعددی از جمله جنسیت، سویه SARS-CoV-2، بیماری‌های همراه و واکسیناسیون کووید-۱۹ می‌توانند بر شانس ابتلا به LCS تأثیر بگذارند. به‌طور خاص، زن بودن و داشتن بیماری‌های همراه، ممکن است خطر ابتلا به LCS را افزایش دهد (۶). از سوی دیگر، افرادی که به‌طور کامل قبل از عفونت SARS-CoV-2 واکسینه شده‌اند و افرادی که به سویه Omicron آلوده شده‌اند ممکن است خطر کمتری برای ابتلا به LCS داشته باشند (۷). همچنین، اهداف بالقوه برای پیش‌بینی و تشخیص LCS ممکن است شامل اجزای سلولی و مولکولی سیستم ایمنی باشد که می‌تواند با پیشرفت عفونت SARS-CoV-2 و عوارض مزمن بعدی مرتبط باشد. شناسایی نشانگرهای مولکول‌کل از این جهت اهمیت بالایی دارد که بتوان افراد آسیب‌پذیر را هرچه سریعتر تشخیص داد و از عوارض شدید چندعضوی پیشگیری کرد (۸).

گیرنده‌های شبه TLR (Toll) به دلیل نقش حیاتی خود در تحریک پاسخ‌های ایمنی، احتمالاً شاخص‌های مولکولی مهمی در پیش‌بینی پیش‌آگهی بیماری‌های عفونی هستند. این مولکول‌ها شامل گروهی از پروتئین‌های بیان‌شده در سطح سلول بنام گیرنده‌های شناسایی‌کننده PAMPها (PRRs) هستند که با شناسایی الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن‌ها (PAMPs)، پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی را تحریک می‌کنند (۴). TLR9 که به‌طور خاص توالی CpG در DNA عوامل بیگانه میکروبی را شناسایی می‌کند، به‌طور گسترده در سلول‌های اپی‌تلیالی ریه، سیستم بویایی، سیستم اسکلتی-عضلانی، سیستم عصبی، T، B، دندرتیک پلاسماستوتییدی، کشندهی طبیعی، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، مگاکاریوسیت‌ها،

پلاکت‌ها بیان می‌شود (۸).

مطالعات مختلفی نقش واریانت‌های ژنتیکی TLR9 در بیماری‌های عفونی-التهابی را نشان داده‌اند. در مطالعه‌ای، Zhang و همکارانش ژنوتیپ TT و آلل T از واریانت ژنتیکی rs352140-TLR9 را مرتبط با استعداد ابتلا و پیشرفت مننژیت باکتریایی معرفی کرده‌اند (۱۰).

در مطالعه‌ی 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 می‌رسد این واریانت ژنتیکی به‌واسطه نقش مهمی که در استعداد ابتلا و پیشرفت بیماری‌های عفونی و عوارض التهابی ناشی از آن‌ها دارد، می‌تواند یکی از اهداف بالقوه برای تبدیل شدن به نشانگر مولکولی در LCS مورد توجه قرار گیرد. تا جایی که ما می‌دانیم، تاکنون مطالعه‌ای 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 ویژگی‌های دموگرافیک، سابقه‌ی بستری، شاخص‌های آزمایشگاهی و پلیمورفیسم تک‌نوکلئوتیدی rs352140-TLR9 با شانس ابتلا به LCS بود.

## روش‌ها

### افراد مورد مطالعه

در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی (Case-Control)، کلیه شرکت‌کنندگان از بین افراد بهبودیافته از کووید-۱۹ حاد که در فاصله تیرماه تا شهریورماه ۱۴۰۰ (اوج شیوع سویه Delta) به دلیل ابتلا به بیماری کووید-۱۹ به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مراجعه کرده بودند و دارای پرونده‌ی پزشکی جامعی بودند، انتخاب شدند. اطلاعات جمعیت‌شناسی، مانند جنسیت، سن و شاخص توده‌ی بدنی، و همچنین سابقه‌ی بستری، از جمله شدت کووید-۱۹ در طول بستری، مدت اقامت در بیمارستان و بخش ICU و سابقه‌ی بیماری‌های زمینه‌ای، از پرونده‌ی 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 سابقه‌ی بیماری‌های زمینه‌ای 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 سابقه‌ی 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 پلیمرز (ARMS-PCR) تعیین شد. مخلوط واکنش PCR با افزودن ۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲X (آپلیکون، 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 و Primer-BLAST (NCBI) بررسی شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده شامل پرایمر مشترک (Fc): 5'-GAGCTGCTGGGACACTTIG-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-6 و anti-RBD IgG

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

### تجزیه و تحلیل آماری

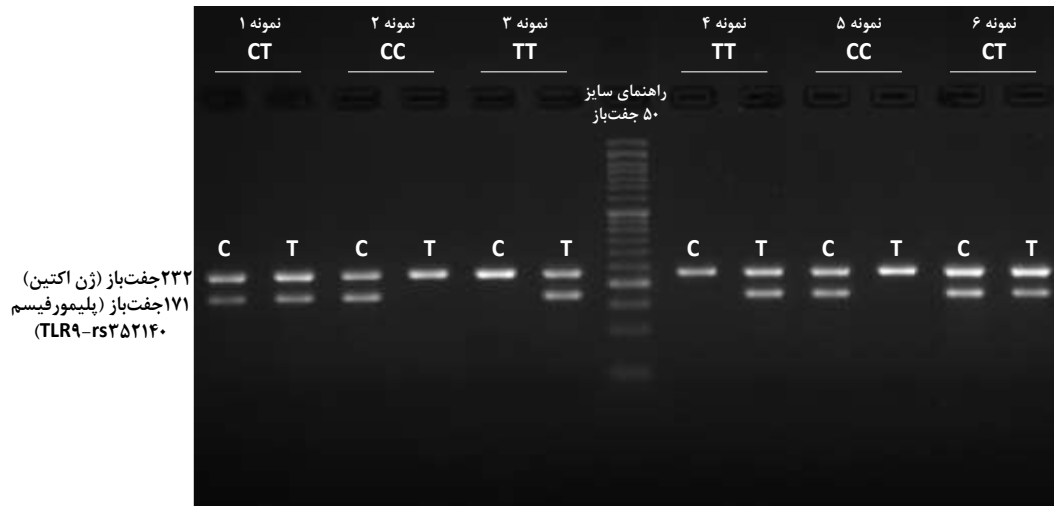
برای مقایسه‌ی متغیرهای کیفی بین گروه‌ها از آزمون‌های Chi-square استفاده شد و نتایج به صورت تعداد و درصد ارائه گردید. از آنجایی که آزمون Kolmogorov-Smirnov عدم توزیع نرمال داده‌ها را نشان داد، از آزمون Mann-Whitney U و Kruskal-Wallis به منظور ارزیابی تفاوت متغیرهای کمی، به ترتیب، بین دو و بیش از دو گروه 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 شناسن 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  $= 0/90 = Z_{\alpha/2}$ ،  $0/28 = Z_{\beta 90\%}$ ،  $p1 = 0/38$ ،  $p2 = 0/62$  و فرمول  $n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta 90\%})^2 \times (p1(1-p1) + p2(1-p2)) / (p1-p2)^2$  نمونه برای هر گروه  $n = 86$  محاسبه شد. در مجموع ۱۸۴ فرد، شامل ۸۸ فرد مبتلا به سندروم 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 (Centers for Disease Control) و خدمات بهداشت ملی (National Health Service) NHS، 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 ضدانعقادی تقسیم گردید. از دستگاه Mindray BC-6800 plus (چین) به منظور ارزیابی سلول‌های خونی، هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (HCT) بر اساس سایز، امپدانس الکتریکی و طیف‌سنجی استفاده شد. همچنین، به منظور ارزیابی سرعت رسوب گلوبول‌های قرمز (ESR)، زمان پروترومین (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 (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 ایتروکین IL-6 و IgG ضد دومن 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 پروتیناز 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 جفت‌باز ARMS-PCR به ترتیب برای ژن اکتین (باندای ردیف بالا) و پلی مورفیسم rs352140 ژن TLR9 (باندای 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 جفت‌باز استفاده شد.

۱/۹۷ (۵۲/۰۸) در برابر ۲/۳۳ (۰/۶۱-۳۴/۹۸) پیکوگرم بر میلی‌لیتر؛ ( $P < ۰/۰۰۱$ ) را داشتند (شکل ۲-ب). در مقابل، سطح پایین‌تری از anti-RBD IgG در گروه LCS+ (۵/۹۰-۱۸/۰۸) RU ۱۰/۷۵ بر میلی‌لیتر) نسبت به گروه LCS- (۳۱/۹۰-۷۷/۰۰) RU ۵۰/۳۰ بر میلی‌لیتر؛ ( $P < ۰/۰۰۱$ ) مشاهده شد (شکل ۲-ج).

#### فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی مورفیسم TLR9-rs352140

نتایج مطالعه ما نشان‌دهنده فراوانی بیشتر افراد با ژنوتایپ TT و آلل T در گروه LCS+ نسبت به گروه LCS- بود ( $P = ۰/۰۲۱$ ). در این راستا، افراد با ژنوتایپ TT، شانس بیشتری برای ابتلا به LCS+ داشتند. درحالی‌که، فراوانی افراد با ژنوتایپ CC و آلل C بطور معنی‌داری در این گروه کمتر بود ( $P = ۰/۰۱۰$ ) 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 ( $۵/۵۳$ - $۱/۴۰$ ) (۳/۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) نسبت به افراد با ژنوتایپ CC ( $۲/۳۰$ - $۱/۱۰$ ) (۱/۵۰ میلی‌گرم بر لیتر؛  $P = ۰/۰۰۲$ ) بطور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۲-الف). همچنین، افراد با ژنوتایپ TT سطح سرمی بالاتری از IL-6 ( $۹/۵۴$ - $۱۲۹/۴۰$ ) (۵۱/۰۹ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به افراد با ژنوتایپ CC ( $۰/۳۱$ - $۲۴/۶۷$ ) (۲/۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر؛  $P = ۰/۰۰۱$ ) و CT ( $۰/۷۰$ - $۶۲/۹۳$ ) (۴/۹۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر؛  $P = ۰/۰۴۴$ ) داشتند (شکل ۲-ب). در مقابل، سطح سرمی anti-RBD IgG در افراد دارای ژنوتایپ CC ( $۱۳/۶۰$ - $۶۸/۲۵$ ) RU ۳۹/۹۰ بر میلی‌لیتر)

#### یافته‌ها

##### اطلاعات جمعیت‌شناختی، سابقه بستی و آزمایشگاهی

در مجموع، ۴۳ مرد و ۴۵ زن با میانگین (چارک اول-سوم) سنی (۵۵/۲۵-۳۹/۰۰) ۴۷/۵۰ سال در گروه LCS+ و ۵۵ مرد و ۴۱ زن با میانگین (چارک اول-سوم) سنی (۳۷/۲۵-۵۸/۰۰) ۴۳/۰۰ سال در گروه LCS- وارد مطالعه شدند. تفاوت معنی‌داری بین افراد دو گروه از نظر متغیر جنس و سن وجود نداشت (به ترتیب  $P = ۰/۲۵۲$  و  $P = ۰/۶۰۱$ ). با این حال، شاخص توده‌ی بدنی (BMI (Body Mass Index)) سابقه‌ی بستی در بیمارستان و بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) در دوران حاد بیماری و همچنین فراوانی افراد با سابقه‌ی ابتلا به نوع شدید کووید-۱۹ حاد در گروه LCS+ بطور معنی‌داری بیشتر از گروه LCS- بود (به ترتیب  $P = ۰/۰۰۲$ ،  $P < ۰/۰۰۱$  و  $P < ۰/۰۰۱$ ). در ارتباط با پارامترهای آزمایشگاهی، گروه LCS+ در مقایسه با گروه LCS- به طور قابل توجهی تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و تعداد لنفوسیت بالاتری داشتند (به ترتیب  $P = ۰/۰۱۶$  و  $P < ۰/۰۰۱$ ). در مقابل، نسبت نوتروفیل به لنفوسیت (NLR) در گروه LCS+ به طور قابل توجهی کمتر بود ( $P = ۰/۰۲۳$ ). تفاوت معنی‌داری 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+ ( $۱/۳۳$ - $۵/۲۵$ ) ۲/۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) بطور معنی‌داری بالاتر از گروه LCS- ( $۱/۱۰$ - $۳/۱۸$ ) ۱/۸۰ میلی‌گرم بر لیتر؛  $P = ۰/۰۰۵$ ) بود (شکل ۲-الف). همچنین، گروه LCS+ در مقایسه با گروه کنترل سطوح بالاتری از IL-6 ( $۱۳۳/۰۰$ -

T (۹/۱۰-۴۱/۱۰) RU ۱۹/۹۰ بر میلی لیتر؛  $P=0/001$  بالاتر بود.

#### مدل سازی رگرسیون لجستیک چندگانه برای LCS

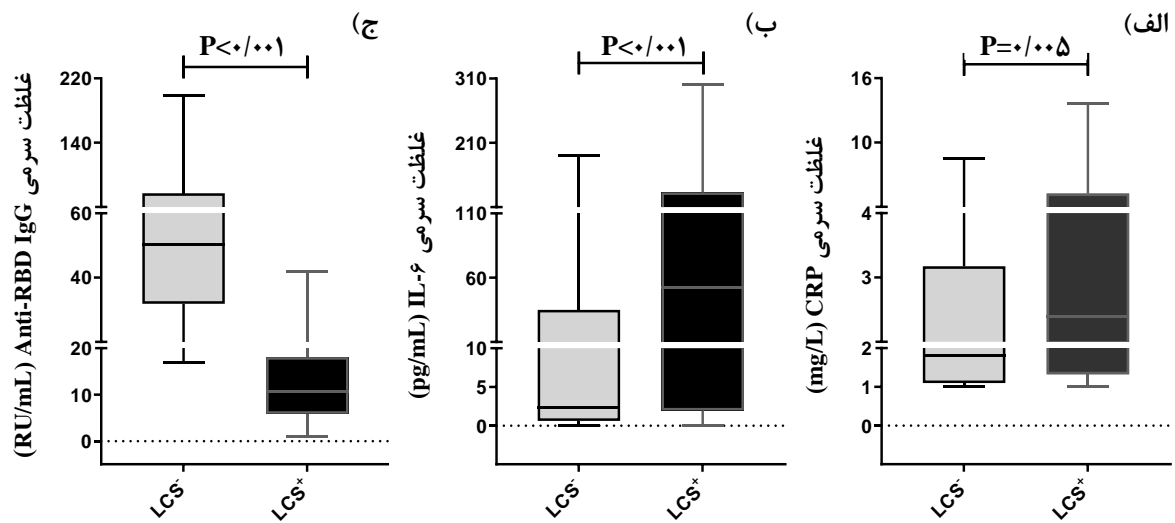
آزمون رگرسیون لجستیک چندگانه با هدف بررسی رابطه‌ی بین متغیرها و شانسی ابتلا به LCS انجام شد. بعد از تعدیل اثر مهم‌ترین متغیرها شامل BMI، WBC، CRP، anti-RBD IgG، IL-6، TLR9-rs352140، آنتی‌های پلی‌مورفیسم TLR9-rs352140 و سابقه ابتلا به نوع شدید کووید-۱۹، شانسی ابتلا به کووید-۱۹ طولانی همچنان با متغیرهای BMI، WBC، CRP، anti-RBD IgG، IL-6، آنتی‌های پلی‌مورفیسم TLR9-rs352140 و سابقه مبتلا شدن به نوع شدید کووید-۱۹ بطور معنی‌داری در ارتباط بود (برای همه  $P < 0/05$ ).

نسبت به افراد با ژنوتایپ TT (۶/۰۵-۳۶/۹۸) RU ۱۸/۹۰ بر میلی لیتر؛  $P = 0/007$  بطور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۳-ج). بر این اساس، CRP در افراد دارای آلل T (۱/۳۰-۴/۵۰) میلی گرم بر لیتر) بطور معنی‌داری بالاتر از افراد دارای آلل C (۱/۲۰-۳/۰۰) میلی گرم بر لیتر؛  $P < 0/001$  بود. این نتایج در مورد IL-6 نیز صدق می‌کرد. به طوری که، در افراد دارای آلل T (۰/۹۳-۷۸/۶۳) میلی‌گرم بر میلی لیتر، سطح سرمی IL-6 نسبت به افراد دارای آلل C (۰/۶۴-۷۹/۵۵) میکروگرم بر میلی لیتر؛  $P = 0/022$  بالاتر ارزیابی شد. در مقابل، سطح anti-RBD IgG در افراد دارای آلل C (۱۴/۹۰-۵۹/۸۰) 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) میانگین (چارک اول-سوم)	LCS+ (۸۸ نفر) تعداد (درصد) میانگین (چارک اول-سوم)	P
خصوصیات	جنسیت: تعداد	زن ۴۱ (۴۲/۷۰)	زن ۴۵ (۵۱/۱۰)	0/۲۵۲
	مرد	۵۵ (۵۷/۳۰)	۴۳ (۴۸/۹۰)	
جمعیت‌شناختی	سن؛ سال	۴۳/۰۰ (۳۷/۲۵-۵۸/۰۰)	۴۷/۵۰ (۳۹/۰۰-۵۵/۲۵)	0/۶۰۱
	شاخص توده‌بدنی (BMI)؛ کیلوگرم بر مترمربع	۲۵/۹۵ (۲۴/۱۴-۲۸/۲۹)	۲۸/۴۸ (۲۶/۴۹-۳۰/۸۱)	0/۰۰۲ *
تاریخچه‌ی بستری	تعداد روزهای بستری؛ روز	۰/۰۰ (۰/۰۰-۶/۰۰)	۸/۵۰ (۶/۰۰-۱۳/۰۰)	<0/001 *
	اقامت در بخش مراقبت ویژه	۴ (۴/۲۰)	۲۱ (۲۳/۹۰)	<0/001 *
کووید-۱۹	شدت کووید-۱۹ حاد	۹۲ (۹۵/۸۰)	۶۷ (۷۶/۱۰)	
	شدت کووید-۱۹ حاد غیر شدید	۱۱ (۱۱/۵۰)	۴۹ (۵۵/۷۰)	<0/001 *
یافته‌های آزمایشگاهی	تعداد گلبول سفید (WBC)؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۶/۳۶ (۵/۸۰-۷/۳۶)	۶/۹۹ (۵/۹۵-۷/۹۷)	0/016 *
	تعداد گلبول قرمز (RBC)؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۵/۱۸ (۴/۸۸-۵/۶۳)	۵/۱۵ (۴/۸۴-۵/۵۰)	0/۵۶۸
یافته‌های آزمایشگاهی	هموگلوبین (Hb)؛ گرم بر دسی لیتر	۱۴/۶۵ (۱۳/۴۲-۱۵/۶۷)	۱۴/۲۵ (۱۳/۵۰-۱۵/۷۰)	0/۸۳۷
	هماتوکریت (HCT)؛ درصد	۴۴/۸۵ (۴۱/۴۲-۴۷/۳۷)	۴۳/۵۵ (۴۰/۲۲-۴۷/۰۷)	0/۱۷۱
یافته‌های آزمایشگاهی	تعداد پلاکت؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۲۹۰/۵۰ (۲۵۹/۲۵-۳۳۱/۵۰)	۳۱۹/۰۰ (۲۵۳/۰۰-۳۶۱/۷۵)	0/۱۲۹
	تعداد نوتروفیل؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۳/۷۲ (۳/۲۵-۴/۳۸)	۴/۰۰ (۳/۲۷-۴/۷۵)	0/۲۰۸
یافته‌های آزمایشگاهی	تعداد لنفوسیت؛ تعداد $\times 10^3$ میکرولیتر	۲/۰۱ (۱/۷۹-۲/۴۸)	۲/۳۷ (۱/۹۵-۳/۰۲)	<0/001 *
	نسبت تعداد نوتروفیل به لنفوسیت (NLR)	۱/۷۷ (۱/۴۴-۲/۱۲)	۱/۶۰ (۱/۲۵-۲/۱۱)	0/023 *
یافته‌های آزمایشگاهی	سرعت رسوب گلبول قرمز (ESR)؛ میلی‌متر بر ساعت	۷/۰۰ (۴/۰۰-۱۱/۰۰)	۹/۰۰ (۴/۰۰-۱۳/۰۰)	0/۳۳۱
	لاکتات دهیدروژناز (LDH)؛ واحد بر لیتر	۳۲۷/۰۰ (۲۹۱/۰۰-۳۸۷/۰۰)	۳۳۲/۰۰ (۲۹۱/۰۰-۴۲۵/۰۰)	0/۴۸۷
یافته‌های آزمایشگاهی	کراتینین (Cr)؛ میلی‌گرم بر دسی لیتر	۱/۰۴ (۰/۹۰-۱/۱۷)	۱/۰۶ (۰/۹۱-۱/۱۹)	0/۷۷۵
	آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)؛ واحد بر لیتر	۲۰/۰۰ (۱۸/۰۰-۲۴/۰۰)	۲۱/۰۰ (۱۹/۰۰-۲۴/۰۰)	0/۴۳۳
یافته‌های آزمایشگاهی	آلانین آمینوترانسفراز (ALT)؛ واحد بر لیتر	۲۲/۰۰ (۱۹/۲۵-۲۹/۰۰)	۲۰/۵۰ (۱۶/۰۰-۲۶/۷۵)	0/۲۸۵
	زمان پروترومبین (PT)؛ ثانیه	۱۳/۰۰ (۱۳/۰۰-۱۳/۰۰)	۱۳/۰۰ (۱۳/۰۰-۱۳/۰۰)	0/۷۰۶
یافته‌های آزمایشگاهی	زمان ترومبوپلاستین نسبی (PTT)؛ ثانیه	۳۰/۶۰ (۲۹/۳۷-۳۲/۷۷)	۳۱/۰۵ (۲۹/۲۲-۳۳/۰۰)	0/۹۸۵

ALT: Alanine Transaminase, AST: Aspartate Transaminase, Cr: Creatinine, ESR: Erythrocyte Sedimentation Rate, Hb: Hemoglobin, HCT: Hematocrit, LCS: Long COVID-19 Syndrome (سندرم کووید-۱۹ طولانی)، LDH: Lactate Dehydrogenase, NLR: Neutrophil/Lymphocyte Ratio, PTT: Prothrombin Time, PT: Partial Thromboplastin Time, RBC: Red Blood Cells, WBC: White Blood Cells, \* نشان‌دهنده  $P < 0/05$ .

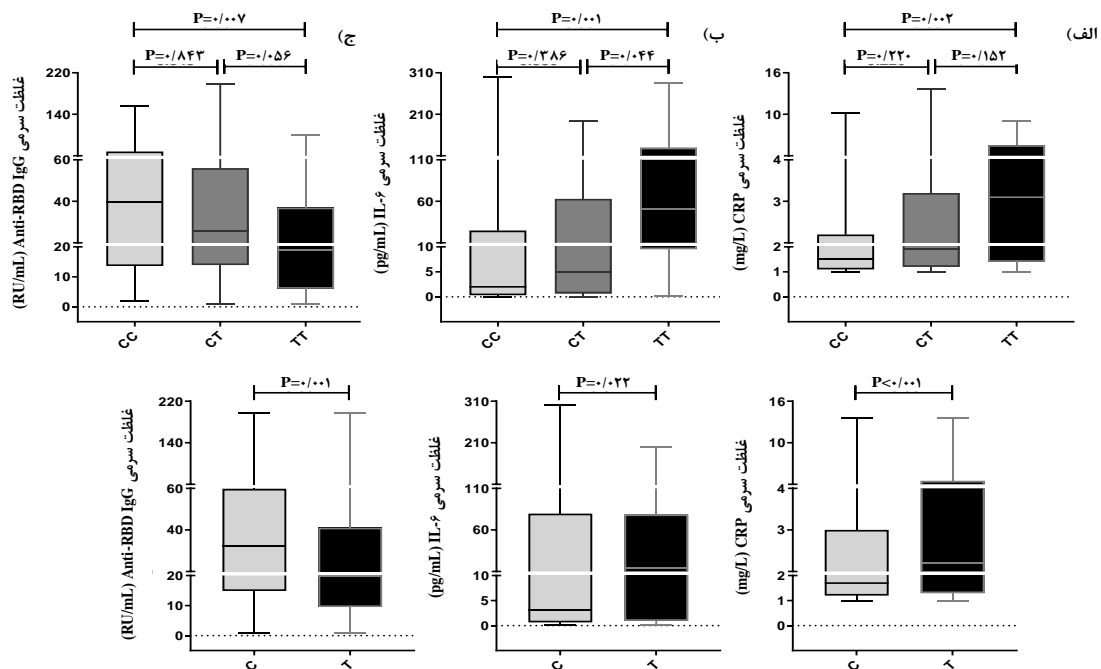


شکل ۲. مقایسه‌ی سطوح سرمی (الف) CRP، (ب) IL-۶ و (ج) anti-RBD IgG بین دو گروه LCS+ و LCS-

جدول ۲. فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی مورفیسم TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰ در گروه‌های LCS+ و LCS-

OR (95%CI)	P	LCS+ (۸۸ نفر) تعداد (درصد)	LCS- (۹۶ نفر) تعداد (درصد)	TLR۹-rs۳۵۲۱۴۰	
۰/۴۴ (۰/۱۹-۰/۹۸)	۰/۱۰*	۱۴ (۱۵/۹۱)	۳۱ (۳۲/۲۹)	CC	ژنوتایپ
۱/۰۲ (۰/۵۷-۱/۸۳)	۰/۹۳۸	۳۹ (۴۴/۳۲)	۴۲ (۴۳/۷۵)	CT	
۲/۱۰ (۱/۱۱-۳/۹۵)	۰/۰۲۱*	۳۵ (۳۹/۷۷)	۲۳ (۲۳/۹۶)	TT	
۱/۹۲ (۱/۲۷-۲/۹۲)	۰/۰۰۲*	۶۷ (۳۸/۰۷)	۱۰۴ (۵۴/۱۷)	C	آلل
		۱۰۹ (۶۱/۹۳)	۸۸ (۴۵/۸۳)	T	

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



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 ۰۲۱۴۰-rs352140 TLR9؛ درصد	۰/۵۱	۰/۲۱	۵/۶۱	۱	* ۰/۰۱۸	۱/۶۶ (۱/۰۹-۲/۵۲)

C- CRP. Confidence Interval. CI. Body Mass Index: BMI. Anti-Receptor Binding Domain Immunoglobulin G: Anti-RBD IgG. Long COVID-19 Syndrome: LCS. Interleukin-6: IL-6. Reactive Protein. Neutrophil/Lymphocyte Ratio: NLR. 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 مراقبت‌های ویژه داشتند را نشان دادند (۱۸). این عوارض و علائم پایدار ممکن است ناشی از پاسخ‌های التهابی سیستمیک و مزمن باشد که ناشی از طوفان‌های سایتوکاینی ناشی از کووید-۱۹ شدید و آسیب‌های ناشی از اقدامات پزشکی مورد نیاز مانند لوله‌گذاری و تجویز کورتیکواستروئیدها باشد.

استفاده‌ی بیش از حد از کورتیکواستروئیدها در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ شدید نیز می‌تواند منجر به ایجاد عفونت‌های فرصت طلب ثانویه شود که باعث پاسخ‌های التهابی پایدار می‌شوند (۱۹). التهاب پایدار در LCS همچنین ممکن است بدلیل تداوم آنتی ژن‌های SARS-CoV-2 در بافت‌ها، واکنش‌های خودواکنشگر، و شکست سیستم ایمنی فرد در بازگشت به هموستاز اولیه باشد (۲۰، ۲۱). تولید بیش از حد سیتوکین‌های التهاب‌آور با تحریک آپوپتوز، فعالیت سمیت سلولی و اختلال در کنترل خروج لکوسیت‌ها از بافت‌های لنفاوی، آسیب بافتی را تشدید کند. به طور خاص، IL-6 تمایز سلول‌های CD4+ T بکر به سلول‌های Th17 را تقویت می‌کند و تمایز Treg را مهار می‌کند، که منجر به اختلال تحمل ایمنی و ایجاد التهاب مزمن می‌شود (۲۲، ۲۳). TNF- $\alpha$  با القای بیان IL-6 این فرایند را بیشتر تشدید می‌کند (۲۲). در راستای این نتایج، مطالعه ما نشان داد که سطوح بالای IL-6 و CRP با شانس بیشتر ابتلا به LCS در ارتباط بودند. به طوری که به ازای هر واحد افزایش در IL-6 و CRP به ترتیب ۰/۲۳ و ۰/۰۱ برابر شانس ابتلا به LCS افزایش می‌یابد. در مقابل، به ازای هر واحد افزایش در anti-RBD IgG شانس ابتلا به LCS به میزان ۰/۱۵ برابر کاهش می‌یابد.

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

به طوری که متغیرهای BMI، WBC، CRP، IL-6، 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

مطالعه‌ی ما ارتباط احتمالی بین خصوصیات جمعیت‌شناختی، سابقه‌ی بستری در دوران ابتلا به کووید-۱۹ حاد، شاخص‌های آزمایشگاهی و فراوانی ژنوتایپ و آل‌های 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 می‌یابد. در این رابطه، یافته‌های قبلی چاقی را به عنوان یک عامل خطر مهم برای بهبودی کامل عوارض افراد بهبودیافته از کووید-۱۹ حاد عنوان کرده‌اند. 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 می‌رسد نقص در عملکرد میتوکندری و تولید گونه‌های اکسیژن فعال ناشی از هایپرگلیسمی که منجر به تولید واسطه‌های التهاب‌آور مانند لپتین، CRP، TNF- $\alpha$  و IL-6 می‌شود، محتمل‌ترین مکانیسم پیشنهادی در این رابطه باشد. این واسطه‌های التهابی می‌توانند پاسخ ایمنی را به سمت التهاب مزمن و بی‌اثر در برابر عفونت منحرف کنند که منجر به اختلال عملکرد سلولی و آسیب بافت می‌شود و افراد چاق را در برابر تداوم ویروسی و عفونت‌های ثانویه آسیب‌پذیرتر می‌کند (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 سابقه‌ی 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 بررسی شده 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 به‌طور 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 rs352140-TLR9 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-2 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-6/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

1. Kerzhner O, Berla E, Har- Even M, Ratmansky 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.
2. 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.
3. 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 KF, 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. Klötting 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, Khazae 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, Łukaszyk 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 Alavitabar<sup>1</sup>, Hamed Fouladseresht<sup>2</sup>, Amaneh Javid<sup>3</sup>,  
Ensiye Torki<sup>4</sup>, Majid Hosseinzadeh<sup>5</sup>

### 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