

Evaluation of two types of IFN-1 induced gene expression (ly6e and usp18) and its association with the severity of clinical symptoms in COVID-19 patients

Umoulbanin Alibakhshi¹, Sara Ghaffarpour², Mohammad Mehdi Naghizadeh³, Tooba Ghazanfari^{2*}

1. Department of immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
3. Non-communicable Diseases Research Center, Fasa University of Medical Science, Fasa, Iran

* Corresponding author e-mail: tghazanfari@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Covid-19 disease as a pandemic with high spreading power and a wide range of clinical symptoms and lack of definitive treatment is a challenge for mankind in recent years. The antiviral response of type 1 interferon against the SARS-COV-2 virus is one of the most important pathways of the innate immune system in dealing with this disease. The purpose of this study was to investigate the relationship between the expression of two genes, ly6e and usp18, with the severity of clinical symptoms in patients with covid-19.

Materials and Methods: Peripheral blood samples were prepared from patients and their DNA was extracted, then the expression of ly6e and usp18 genes was measured by real-time PCR method. cDNA samples were first amplified using specific primers. Data analysis was performed using chi-square, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. A significance level of 0.05 was considered.

Results: The expression of the ly6e gene was significantly ($p=0.008$) decreased in the hospitalized group compared to the control group. No significant difference was seen in the expression of the usp18 gene among the studied groups.

Conclusion: Proper expression of ly6e protein can be related to controlling the severity of clinical symptoms of covid-19 disease.

Keywords: Covid-19, Severity of clinical symptoms, Type one interferon, ly6e, usp18

Received: Aug 28, 2022

Revised: 18 Jan 2023

Accepted: Mar 12, 2023

How to cite this article: Alibakhshi U, Ghaffarpour S, Naghizadeh MM, Ghazanfari T. Evaluation of two type I IFN-induced genes (ly6e and usp18) gene expression and association with the severity of clinical symptoms in COVID-19 patients. *Daneshvar Medicine* 2023; 31(1):1-12. doi: 10.22070/DANESHMED.2023.16760.1268

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بررسی بیان دو مورد از ژن‌های القاشده توسط اینترفرون نوع یک (ly6e and usp18) و ارتباط آن با شدت علائم بالینی در بیماران مبتلا به کووید-۱۹

ام‌البین علی‌بخشی^۱، سارا غفارپور^۲، محمدمهدی نقی‌زاده^۳، طوبی غضنفری^{*۲}

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

Email: tghazanfari@yahoo.com

*نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

چکیده

مقدمه و هدف: بیماری کووید-۱۹ به عنوان یک همه‌گیری با قدرت گسترش بالا و طیف وسیع علائم بالینی و عدم درمان قطعی چالش پیش‌سال‌های اخیر بشر است. پاسخ ضد ویروسی اینترفرون نوع یک در برابر ویروس SARS-COV-2 از مهم‌ترین مسیرهای سیستم ایمنی ذاتی در مواجهه با این بیماری است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین بیان دو ژن ly6e و usp18، با شدت علائم بالینی در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ بود.

مواد و روش‌ها: نمونه خون محیطی از بیماران تهیه و DNA آن‌ها استخراج شد، سپس بیان ژن ly6e و usp18 به وسیله روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت. نمونه‌های cDNA در ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر داده شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های کای دو، کروسکال‌والیس و من‌ویتنی انجام شد. سطح معناداری 0.05 در نظر گرفته شد.

نتایج: بیان ژن ly6e به طور معناداری ($p=0.008$) در گروه بستری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. هیچ تفاوت معناداری در بیان ژن usp18 میان گروه‌های مورد مطالعه دیده نشد.

نتیجه‌گیری: بیان مناسبی از پروتئین ly6e می‌تواند با کنترل شدت علائم بالینی بیماری کووید-۱۹ ارتباط داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: کووید-۱۹، شدت علائم بالینی، اینترفرون نوع یک، ly6e، usp18.

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۰۶/۰۶

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸

پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱

مقدمه

در اواخر دسامبر سال ۲۰۱۹ یک مورد پنومونی ناشناس در شهر ووهان استان هوبی در چین گزارش شد (۱) که مشخصات بالینی آن بسیار شبیه به پنومونی ویروسی بود. سازمان بهداشت جهانی (WHO) این بیماری را COVID-19 و کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) آن را SARS-CoV-2 نام‌گذاری کرد و در کمتر از سه ماه به یک همه‌گیری در دنیا تبدیل شد (۴-۲).

شایع‌ترین علائم بالینی عفونت COVID-19 عبارت‌اند از: تب، سرفه و خستگی؛ اسهال و استفراغ که از این نظر، مشابه سایر کروناویروس‌ها با منشاء حیوانی است. سندرم دیسترس تنفسی حاد (Acute respiratory distress syndrome) یا به اختصار ARDS، حدوداً ۹ روز پس از شروع عفونت بروز می‌کند. این ویروس علاوه بر ریه به سایر بافت‌ها از جمله قلب، کلیه، کبد، چشم و سیستم عصبی آسیب می‌زند. برخی از افراد هیچ علامتی ندارند، یا فقط علائم خفیف دارند. اما در افراد دیگر، کووید-۱۹ می‌تواند منجر به مشکلات جدی مانند سینه پهلو، عدم دریافت اکسیژن کافی و حتی مرگ شود. این نشانه‌ها بیشتر در افرادی که مشکلات زمینه‌ای دیگری دارند، دیده می‌شود (۵،۶).

اینترفرون‌های نوع یک (TYPE I IFNs) خانواده بزرگی از سایتوکاین‌ها هستند که پاسخ ایمنی ذاتی اولیه به عفونت‌های ویروسی را میانجی‌گری می‌کنند. گیرنده اینترفرون نوع یک در سطح تمام سلول‌های هسته دار بیان می‌شود. این گیرنده‌ها در اتصال به اینترفرون نوع یک سیگنال‌هایی را به داخل سلول ارسال می‌کند که بیان چندین ژن متفاوت را القا می‌کند. محصولات پروتئینی این ژن‌ها در پاسخ ضد ویروس و تنظیم این پاسخ به روش‌های مختلف مشارکت دارند. با توجه به ماهیت ویروسی این بیماری بررسی نقش مسیر پاسخ ایمنی ضد

ویروسی از جمله اینترفرون تیپ یک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه به بررسی بیان دو مورد از ژن‌های القا شده توسط اینترفرون تیپ یک و ارتباط آن با شدت علائم بالینی می‌پردازیم (۱۰-۵).

گیرنده اینترفرون نوع یک در سطح تمام سلول‌های هسته دار بارز می‌شود. این گیرنده‌ها در اتصال به اینترفرون نوع یک سیگنال‌هایی را به داخل سلول ارسال می‌کند که بیان چندین ژن متفاوت را القا می‌کند. محصولات پروتئینی این ژن‌ها در پاسخ ضد ویروس و تنظیم این پاسخ به روش‌های مختلف مشارکت دارند. دو ژن LY6E و USP18 از جمله این ژن‌ها می‌باشند (۱۷، ۱۶، ۱۰).

آنتی‌ژن لنفوسیتی ۶ عضو خانواده E(LY6E) توسط ژنی با همین نام کد می‌شود. این پروتئین توسط لنگر گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) در سطح سلول قرار می‌گیرد. در ابتدا بیان این پروتئین در سطح سلول را مارکری برای شناسایی تیموسیت‌های بالغ از نابالغ می‌دانستند که در تکثیر و تمایز و فعال سازی سلول‌های T نقش دارد. امروزه می‌دانیم که این ژن در سلول‌ها و بافت‌های مختلفی بیان می‌شود. نقش این پروتئین در عفونت‌های ویروسی سال‌هاست که مورد مطالعه است. مطالعات اخیر در محیط *In vitro* نشان می‌دهد این پروتئین با ایجاد تغییراتی در ناحیه ی LIPID RAFT غشای سلولی که محل قرارگیری گیرنده‌ی کرونا ویروس‌ها (ACE2) می‌باشد می‌تواند الحاق ویروس به داخل سلول را محدود نماید (۲۰-۱۸). ژن USP18 پروتئینی را کد می‌کند که دودومین با عملکرد متفاوت برای آن شناخته شده است. این پروتئین با اتصال به زیرواحد ۲ از گیرنده اینترفرون نوع یک (IFNR2) از تشکیل صحیح کمپلکس گیرنده اینترفرون نوع یک (IFNRA1+IFNRA2) جلوگیری کرده و در نتیجه سیگنال‌رسانی این سایتوکاین را مهار می‌کند.

IR.NIMAD.REC.1399.041 انجام شد. استان‌های منتخب که به صورت غیر تصادفی و با توجه به میزان همکاری انتخاب شدند. در هر استان به صورت تصادفی بیماران بستری از لیست بیمارستان به مدت ۸ هفته (در بازه زمانی اردیبهشت تا شهریور ۱۳۹۹) انتخاب شدند. بیماران سرپایی نیز از طریق نمونه‌گیری در دسترس از بین مراجعه کنندگان انتخاب شدند. حجم نمونه شامل ۱۸۶ نفر (۴۰ نفر گروه کنترل و ۴۲ نفر گروه سرپایی و ۱۰۴ نفر گروه بستری که خود گروه بستری شامل ۴۳ نفر گروه متوسط و ۳۰ نفر گروه شدید و ۳۱ نفر گروه بحرانی) می‌باشد. در این مطالعه بیماران مبتلا به کووید-۱۹ بستری در بیمارستان که شامل بیماران متوسط با شرایط تنگی نفس، احساس درد و فشار در قفسه سینه با یا بدون تب ۳۸ درجه و بیشتر، SPO_2 بین ۹۰٪ تا ۹۳٪ و همچنین بیماران شدید و بحرانی که افراد در ICU و تحت مراقبت‌های ویژه، نارسایی تنفسی، $SPO_2 \leq 88\%$ ، شوک، نیازمند تهویه مکانیکی، نارسایی چند ارگانی می‌باشند وارد مطالعه شدند. نمونه خون محیطی بیماران جهت استخراج RNA ژنومی با استفاده از کیت شرکت All Gene از بیماران گرفته شد. پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن به وسیله دستگاه نانودراپ، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از RNA استخراج شده به عنوان الگو، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR انجام شد. طالع دقیق درمورد شرایط PCR و پرایمرها به طور خلاصه در جداول ۱ و ۲ ذکر شده است.

ISG15 یک پروتئین شبه یوبی کوئیتین است که در عفونت‌های ویروسی با اتصال (ISGylation) به پروتئین‌های دخیل در تکثیر و ترجمه ژنوم ویروس از تکثیر ویروس جلوگیری می‌کند. پروتئین حاصل از ژن USP18 این اتصال را شکسته (DeISGylation) و در نتیجه به تکثیر ویروس کمک می‌کند و از طرفی سبب افزایش فرم غیرکونزوگه پروتئین ISG15 می‌گردد (۲۵-۲۱).

پروتئین ISG15 تا زمانی که به صورت کونزوگه در داخل سلول حضور دارد دارای عملکرد ضد ویروسی است. اما این پروتئین در شکل غیر کونزوگه می‌تواند به خارج از سلول منتقل شده که در این حالت در کموتاکسی سلول نوتروفیل و پیشبرد التهاب نقش دارد. همچنین می‌تواند با اتصال به LFA1 در سطح سلول T و سلول دندریتیک و سلول کشنده طبیعی (NK) سبب افزایش اینترفرون گاما شود (۲۶-۲۹).

با توجه به اینکه بیشتر مطالعات درباره‌ی ژن LY6E و USP18 در رابطه با بیماری کووید-۱۹ در محیط In vitro انجام شده است در این مطالعه بیان ژن LY6E و USP18 در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ با شدت علائم بالینی مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه

این مطالعه با استفاده از نمونه‌های جمع آوری شده در طرح ملی بررسی جنبه‌های ایمونولوژیک کووید-۱۹ در استان‌های منتخب کشور به شماره اخلاق

جدول ۱. پرایمرهای ژن‌های LY6E و USP18 و Housekeeping

LY6E	
LY6E/F	5'-GGCATTGGGAATCTCGTGACA-3'
LY6E/R	5'-CCGCACTGAAATGACAGAAAG-3'
USP18	
USP18/F	5'-CTAAGATCCAGGAACGGAAATG-3'
USP18/R	5'-CGTAGATCCAGGAACGGAAATG-3'
β-actin	
β-actin/F	5'-GACCTCTATGCCAACACAGT-3'
β-actin/R	5'-AGTACTTGCCTCAGGAGGA-3'

جدول ۲. برنامه دمایی Real time-PCR

دوره	مدت زمان	دما
۱	۱۵ دقیقه	۹۵ °C
۴۰	۲۰ ثانیه	۹۵ °C
	۴۰ ثانیه	۶۰ °C

شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

تعداد و فراوانی شرکت کنندگان در این مطالعه در جدول ۳ به صورت تعداد و درصد ذکر شده است.

جدول ۳. درصد و فراوانی شرکت کنندگان در این مطالعه

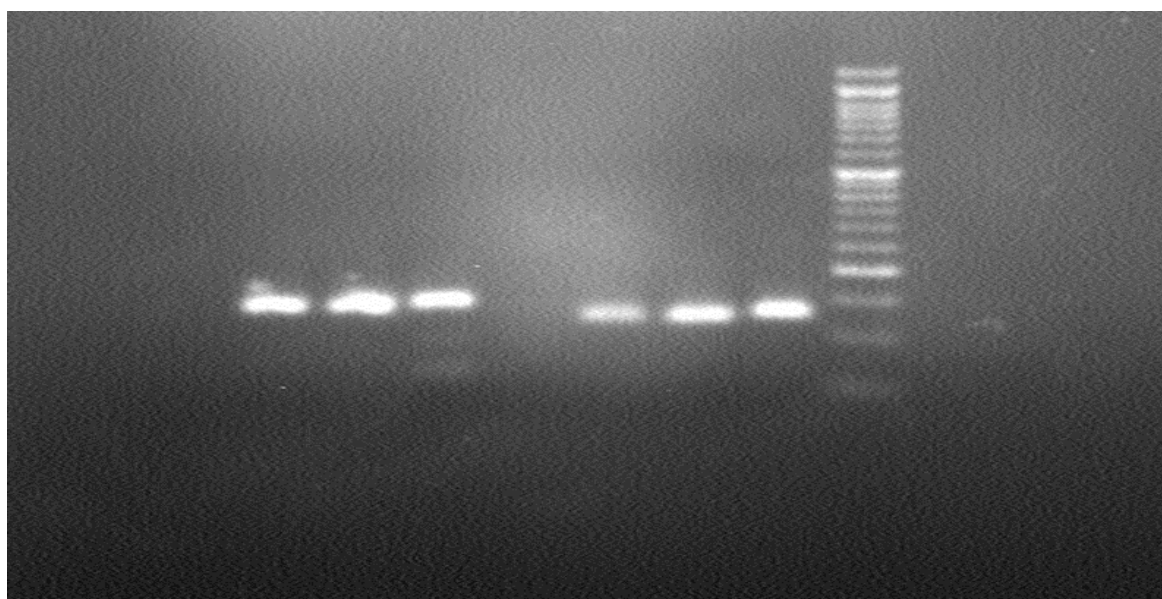
		Count	%	
Group	Control	40	21.5%	
	Outpatients	42	22.6%	
	Inpatients	104	55.9%	
COVID	Event	Alive	119	81.5%
		Expire	27	18.5%
Inpatients	ICU	No	43	41.3%
		Yes	61	58.7%
	Intubation	No	73	70.2%
		Yes	31	29.8%

چاهکهای بعد به ترتیب **LY6E** و **USP18** و در چاهک آخر کنترل منفی ریخته شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

یافته‌های دموگرافیک و نشانه‌ها بین گروه‌های مطالعه با استفاده از آزمون کای دو مقایسه شد. رابطه بین فولد چنج ژن‌های مورد بررسی در سه گروه ابتدا با استفاده از آزمون کروسکال-والیس آنالیز شد و پس از تایید معنی داری داده‌ها از آزمون من-ویتنی برای مقایسه دو به دو گروه‌ها استفاده شد و نتایج آزمون دوم گزارش شده است. کلیه محاسبات در محیط نرم افزار IBM SPSS 26 انجام

جهت اطمینان از تکثیر قطعه مناسب، روی یک محصول **RT-PCR** از هر ژن الکتروفورز انجام شد. نتایج حاکی از تکثیر قطعه مناسب بود. در چاهک اول **ladder** و در



شکل ۱. محصولات RT-PCR بر روی ژل

مقایسه فراوانی متغیرهای زمینه ای

جنسیت و سیگار کشیدن اختلاف معناداری در بین گروه‌ها نداشت.

فراوانی متغیرهای زمینه ای در گروه‌های مطالعه به صورت درصد و تعداد در جدول ۴ مقایسه شدند. در میان بیماری‌های زمینه ای دیابت، فشارخون و بیماری‌های قلبی، دیابت به صورت معناداری در گروه بستری فراوانی بیشتری نسبت به دو گروه سرپایی و کنترل داشت. فراوانی

جدول ۴. مقایسه فراوانی متغیرهای زمینه ای

		Group						P-value Chi square
		Control		Outpatients		Inpatients		
		Count	%	Count	%	Count	%	
sex	Female	18	45.0%	25	59.5%	47	45.2%	0.260
	Male	22	55.0%	17	40.5%	57	54.8%	
HTN	No	35	87.5%	37	88.1%	69	66.3%	0.003
	Yes	5	12.5%	5	11.9%	35	33.7%	
DM	No	35	87.5%	34	81.0%	73	70.2%	0.066
	Yes	5	12.5%	8	19.0%	31	29.8%	
Heart D	No	40	100.0%	41	97.6%	102	98.1%	0.646
	Yes	0	0.0%	1	2.4%	2	1.9%	
Smoking	No	39	97.5%	40	95.2%	97	93.3%	0.590
	Yes	1	2.5%	2	4.8%	7	6.7%	

مقایسه سن شرکت کنندگان در گروه‌ها

اختلاف معناداری بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد.

سن شرکت کنندگان در گروه‌های مطالعه در جدول ۵ مقایسه شد.

جدول ۵. مقایسه سن شرکت کنندگان در گروه‌ها

	Group							P-value
	Control		Outpatients		Inpatients			
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
age	49.5	13.0	46.7	12.9	52.6	14.7	0.580	

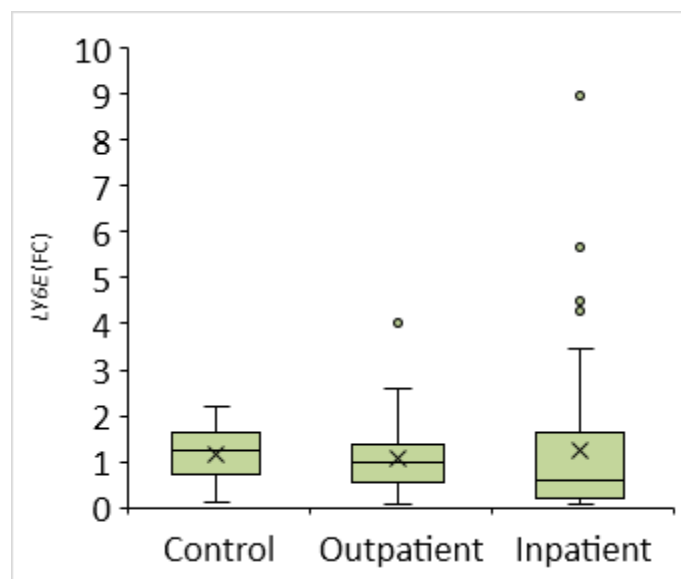
مقایسه میزان بیان ly6e در گروه‌های مطالعه

رسیده است. این مقایسه را می‌توانید در جدول ۶ مشاهده کنید. نمودار ۱ ارتباط بیان ژن ly6e را به ترتیب با بستری و سرپایی بودن نشان می‌دهند که بر اساس نتایج آنالیز بیان این ژن فقط بین گروه‌های بستری و کنترل معنادار است.

مقایسه fold change ژن ly6e در گروه‌های کنترل، بستری و سرپایی نشان می‌دهد که میانه یک ترند رو به پایین به ترتیب گروه‌های ذکر شده دارد که هر چقدر شدت علائم بالینی افزایش می‌یابد این میانه کاهش می‌یابد و این کاهش بین گروه بستری و کنترل به سطح معنادار

جدول ۶. مقایسه ی fold change بیان ly6e در گروه‌های مطالعه

		ly6e					P-value	
		Mean	SD	Median	Q1	Q3		
		COVID	Control	1.176	0.523	1.254		0.741
COVID	COVID	1.197	1.436	0.710	0.212	1.450		
Group	Control	1.176	0.523	1.254	0.741	1.604	0.116	
	Outpatients	1.056	0.787	0.975	0.561	1.342		
COVID	Inpatients	1.254	1.626	0.583	0.189	1.630	0.008	
	Event	Alive	1.147	1.247	0.762	0.221		1.445
COVID	Event	Expire	1.417	2.093	0.508	0.163	2.335	0.511
	ICU	No	1.026	1.355	0.438	0.186	1.311	
Inpatients	ICU	Yes	1.415	1.786	0.608	0.191	2.424	0.426
	Intubation	No	1.170	1.374	0.691	0.201	1.615	
		Intubation	Yes	1.452	2.119	0.409	0.163	2.335



نمودار ۱. مقایسه بیان ژن ly6e در سه گروه کنترل، بستری و سرپایی

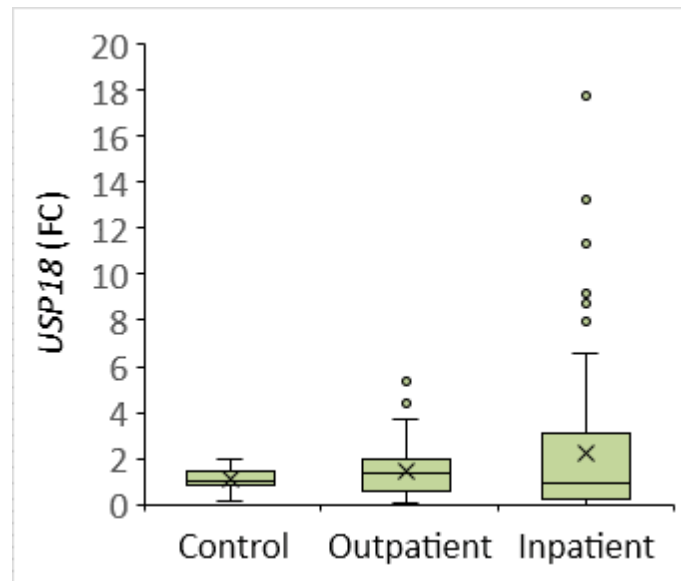
مقایسه میزان بیان usp18 در گروه‌های مطالعه

ارتباط بیان ژن usp18 را با بستری و سرپایی بودن نشان می‌دهند.

مقایسه ی fold change ژن usp18 در گروه‌های کنترل، بستری و سرپایی تفاوت معناداری نشان نداد. این مقایسه را در جدول ۷ و نمودار ۲ مشاهده می‌کنید که

جدول ۷. مقایسه fold change بیان usp18 در گروه‌های مطالعه

		usp18			P-value	
		Mean	SD	Median		
COVID	Control	1.116	0.472	1.020	0.919	
	COVID	1.869	2.571	1.031		
Group	Control	1.116	0.472	1.020	0.374	
	Outpatients	1.484	1.212	1.323		
	Inpatients	2.028	2.946	0.921		
COVID	Event	Alive	1.765	2.420	1.031	0.954
		Expire	2.345	3.182	0.938	
Inpatients	ICU	No	1.728	3.004	0.689	0.284
		Yes	2.247	2.909	1.284	
	Intubation	No	1.854	2.700	0.950	0.892
		Yes	2.446	3.480	0.630	



نمودار ۲. مقایسه بیان ژن usp18 در سه گروه کنترل، بستری و سرپایی

بحث

عفونت شدید سندرم تنفسی حاد ویروس کرونا ۲ (SARS-CoV-2) که باعث بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ (COVID-19) می‌شود، با طیف گسترده‌ای از بیماری شامل ناقل بدون علامت، بیماری خفیف تا شدید دستگاه تنفسی فوقانی مشخص می‌شود که می‌تواند به سندرم زجر تنفسی حاد تبدیل شود. شدت بیماری به سویه ویروس بستگی دارد و عوامل خطر میزبان مانند سن و جنس مذکر شناسایی شده است. علاوه بر این، یک پاسخ ایمنی بیش از حد در بیمارانی که طوفان سایتوکاین مرتبط با سندرم دیسترس تنفسی حاد را نشان می‌دهند، شناسایی شده است. بیماری کووید-۱۹ به عنوان یک همه‌گیری با سرعت انتقال بالا و طیف وسیعی از علائم بالینی خسارات جانی و اقتصادی چشم‌گیری در پی دارد. در حال حاضر دارو و درمان قطعی برای این بیماری وجود نداشته و تنها با تزریق واکسن سعی در کاهش شدت بیماری افراد می‌گردد. با این وجود بررسی‌های به عمل آمده نشان می‌دهد خاطره و ایمنی پس از واکسن نیز محدود بوده و از طرفی با وجود جهش‌های متعدد در ژنوم ویروس SARS-CoV-2 این اثر بخشی محدودتر نیز می‌گردد. با توجه به ماهیت ویروسی عامل این بیماری پاسخ‌های ضد

ویروسی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. مهم‌ترین پاسخ ضد ویروسی پاسخ اینترفرون نوع یک می‌باشد که بازوی مهم سیستم ایمنی ذاتی در پاسخ به عفونت‌های ویروسی است (۳۵-۳۰).

اینترفرون نوع I به دو روش اتوکراین و پاراکراین برای القای بیان ژن‌های مختلف تحریک‌شده با اینترفرون (ISGs) که فعالیت‌های ضد ویروسی را به سلول‌های میزبان می‌دهند، عمل می‌کند. بسیاری از گونه‌های ویروس‌ها، از جمله SARS-CoV-2، مکانیسم‌هایی برای فرار از عملکرد ضد ویروسی IFN-I ایجاد کرده‌اند. مطابق با این، یک مطالعه اولیه در مورد عفونت SARS-CoV-2 نشان داد که پاسخ‌های IFN-I محدود است، در حالی که بیان کموکاین‌های مختلف و IL-6 هنگام تجزیه و تحلیل رونوشت‌های برونش‌های آلوده به SARS-CoV-2 افزایش یافته است. یک مطالعه جدیدتر که خون محیطی بیماران مبتلا به کووید-۱۹ با شدت متفاوت را مورد بررسی قرار داد، همچنین گزارش داد که پاسخ IFN-I در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ شدید یا بحرانی بسیار مختل می‌شود (۳۶).

پروتئین ly6e و usp18 از جمله مولکول‌هایی هستند که تحت تاثیر اینترفرون نوع یک بیان آن‌ها افزایش می‌یابد و

نتیجه باعث کاهش لود ویروس در سلول می‌گردد. Xuesen Zhao و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه خود دریافتند که بین دو رده سلولی C3A و HepG2 به طور قابل توجهی سلول‌های C3A نسبت به ورود ویروس کرونا انسانی HCOV-OC43 به داخل سلول آسیب‌پذیرتر هستند. در بررسی‌های بیشتر سه ژن LY6E, ADAP2, GILT که ارتباط آن‌ها با تداخل ورود ویروس مطرح بود با تکنیک QRT-PCR بیانشان سنجیده شد و به طور قابل توجهی بیان بالایی در رده سلولی مقاوم یعنی HepG2 نسبت به رده سلولی آسیب‌پذیر داشتند. با بررسی بیشتر مشخص شد بیان اکتوییک LY6E در سلول‌های HEK 293 ورود HCOV-OC43 به داخل سلول را مهار می‌کند. از طرفی تحریک بیان این ژن در سلول C3A سبب مقاومت سلول نسبت به ورود سلول می‌گردد و مهار بیان ژن LY6E در رده سلولی HepG2 سبب آسیب‌پذیری این سلول به ورود ویروس می‌شود (۳۹).

Mar و همکاران که در سال ۲۰۱۸ تاثیر بیان LY6E را در فیبروبلاست‌های فاقد STAT1 در مواجهه با طیفی از ویروس‌ها از جمله *Flaviviridae* (yellow fever virus (YFV), dengue virus (DENV), و چندین ویروس دیگر مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه نشان داده شد بیان LY6E فقط ورود دسته خاصی از ویروس‌های پوشش دار RNA ویروس را مهار می‌کند. علاوه بر این با توجه به اینکه فیبروبلاست‌ها فاقد STAT1 هستند بنابراین LY6E نه از طرق بهبود سیگنال‌رسانی اینترفرون بلکه با عملکرد تداخلی در ورود ویروس نقش خود را ایفا می‌کند (۴۰).

نتایج مطالعات انجام شده در مورد بیان ژن LY6E با نتیجه حاصل از مطالعات ما هم سویی دارد. بیشتر مطالعات در مورد ژن USP18 مربوط به داده کاوی حاصل از تکنیک microarray و بررسی پروفایل ژنی بیماران کووید-۱۹ و غیر کووید-۱۹ می‌شود که همان طور که

در برخی مطالعات بیان متفاوت این پروتئین‌ها و ارتباط آن با شدت بیماری‌های ویروسی بررسی شده است. از جمله مطالعاتی که نتایج مطابق با این مطالعه را داشتند می‌توان به مطالعه‌ی آقای Stephanie pfaender و همکاران در سال ۲۰۲۰ اشاره کرد که در مطالعه‌ی خود نشان دادند که LY6E می‌تواند ورود کرونا ویروس‌ها از جمله SARS-COV, SARS-COV2 و MERS-COV را به داخل سلول از طریق تداخل در اتصال پروتئین SPIKE و گیرنده آن ACE2 محدود کند. در این مطالعه موش‌هایی که ژن LY6E در آن‌ها Knockout شده بود نسبت به ورود ویروس آسیب‌پذیرتر و پاتوژن‌ز بیماری در آن‌ها شدیدتر بود. این مطالعه مشابه با مطالعه ما از تکنیک Real-time PCR استفاده شده بود. نتایج این مطالعه با نتیجه حاصل از بررسی ما در مورد ارتباط بیان این ژن با شدت علائم بالینی مطابقت دارد (۳۷).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۲۱ توسط Masood و همکاران انجام شد با ورود ۲۱ فرد در گروه کنترل و ۱۸ نفر گروه Asymptomatic و ۱۱ نفر گروه symptomatic توسط تکنیک microarray به بررسی بیان ژن‌های مرتبط با اینترفرون نوع یک پرداخته و اعلام کردند که ly6e و usp18 بیان بالاتری در گروه غیرکووید نسبت به گروه symptomatic دارد که در مورد ژن اول با نتیجه مطالعه ما تطابق دارد اما در مورد ژن دوم مطالعه ما ارتباط معناداری را نشان نداد. تعداد نمونه‌ها و تقسیم بندی دقیق افراد در هر گروه در مطالعه ما ویژگی برتری است که می‌تواند یکی از دلایل این نتیجه متفاوت باشد. تفاوت در تکنیک نیز سبب افزایش هزینه‌ها و در نتیجه کاهش تعداد نمونه می‌شود که خود نتایج متفاوتی را رقم می‌زند (۳۸).

برخی مطالعات در مورد بیان ژن ly6e در محیط کشت صورت گرفته است که به بررسی عملکرد مداخله‌ای این پروتئین در ورود ویروس SARS-COV-2 می‌شود و در

با توجه به ماهیت متفاوت ویروس و طراحی متفاوت مطالعه نتیجه مطالعه ما با نتایج این مطالعات ذکر شده هم سویی خاصی را نشان نمی دهد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه در بررسی بازوی سیستم ایمنی ذاتی در بیماری کووید-۱۹ به این صورت بود که با افزایش وخامت بیماری بیان ژن *Iy6e* یک روند رو به کاهش در تمام گروه‌ها دارد و این کاهش به طور معنادار بین گروه بستری (متوسط) و گروه کنترل برقرار است. در این مطالعه بیان ژن *usp18* با شدت بیماری در هیچ گروهی معنادار نیست.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با استفاده از نمونه‌های جمع آوری شده در طرح ملی بررسی جنبه‌های ایمونولوژیک کووید-۱۹ در استان‌های منتخب کشور به شماره اخلاق IR.NIMAD.REC.1399.041 انجام شد.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

گفته شد به دلیل افزایش هزینه‌ها در این تکنیک اغلب از تعداد نمونه‌های کمی استفاده می شود که سبب نتایج متفاوتی با نتیجه مطالعه ما می گردد (۴۱).

بررسی توسط تکنیک *Real-time PCR* در مطالعات ویروسی دیگری غیر از کووید نیز مطرح است برای مثال در مطالعه‌ی *Yujia Li* و همکاران که در سال ۲۰۲۰ ژن *USP18 wild type* و *USP18 C64S* که فرم جهش یافته (پروتئین ان فاقد خاصیت کاتالیتیکی است) این ژن است را توسط پلاسمید به داخل سلول *HEPAD38* منتقل کردند. افزایش بیان هر دو فرم ژن *HBV DNA* را در مایع رویی کشت سلول افزایش داد. از طرفی خاموش کردن ژن *USP18* سبب کاهش محصولات این ویروس گردید (۴۲).

Friedrich و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند بیان بالای *USP18* در ماکروفاژهای *CD169+* از عوامل مهم برای حفظ تکثیر ویروس و داشتن یک پاسخ ایمنی موثر پس از تزریق تنها یک دوز واکسن ابولا می باشد. موش‌های فاقد ژن *USP18* پاسخ ذاتی و اکتسابی کاهش یافته ای داشتند (۴۳).

منابع

1. Worobey M, Levy JI, Malpica Serrano L, Crits-Christoph A, Pekar JE, Goldstein SA, et al. The Huanan Seafood Wholesale Market in Wuhan was the early epicenter of the COVID-19 pandemic. *Science* 2022;377(6609):951-9.
2. Struyf T, Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Leeflang MM, et al. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2022(5).
3. Van Kessel SA, Olde Hartman TC, Lucassen PL, van Jaarsveld CH. Post-acute and long-COVID-19 symptoms in patients with mild diseases: a systematic review. *Family Practice* 2022;39(1):159-67.
4. Whitaker M, Elliott J, Chadeau-Hyam M, Riley S, Darzi A, Cooke G, et al. Persistent COVID-19 symptoms in a community study of 606,434 people in England. *Nature Communications* 2022;13(1):1-10.
5. Kim AW, Nyengerai T, Mendenhall E. Evaluating the mental health impacts of the COVID-19 pandemic: Perceived risk of COVID-19 infection and childhood trauma predict adult depressive symptoms in urban South Africa. *Psychological Medicine* 2022;52(8):1587-99.
6. Paul AK, Hossain MK, Mahboob T, Nissapatorn V, Wilairatana P, Jahan R, et al. Does oxidative stress management help alleviation of COVID-19 symptoms in patients experiencing diabetes? *Nutrients* 2022;14(2):321.
7. Galbraith MD, Kinning KT, Sullivan KD, Araya P, Smith KP, Granrath RE, et al. Specialized interferon action in COVID-19. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2022;119(11):e2116730119.
8. Nagaoka K, Kawasuji H, Murai Y, Kaneda M, Ueno A, Miyajima Y, et al. Circulating Type I Interferon Levels in the Early Phase of

- COVID-19 Are Associated With the Development of Respiratory Failure. *Frontiers in Immunology* 2022;13.
9. Sodeifian F, Nikfarjam M, Kian N, Mohamed K, Rezaei N. The role of type I interferon in the treatment of COVID-19. *Journal of Medical Virology* 2022;94(1):63-81.
 10. Soltani-Zangbar MS, Parhizkar F, Ghaedi E, Tarbiat A, Motavalli R, Alizadegan A, et al. A comprehensive evaluation of the immune system response and type-I Interferon signaling pathway in hospitalized COVID-19 patients. *Cell Communication and Signaling* 2022;20(1):1-15.
 11. Aquino A, Paschoalin VMF, Tessaro LLG, Raymundo-Pereira PA, Conte-Junior CA. Updating the use of nano-biosensors as promising devices for the diagnosis of coronavirus family members: A systematic review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2022;114608.
 12. Bajkó N, Fülöp Z, Pércsi KN. Changes in the innovation-and marketing-habits of family SMEs in the foodstuffs industry, caused by the coronavirus pandemic in Hungary. *Sustainability* 2022;14(5):2914.
 13. Castro VM, Rosand J, Giacino JT, McCoy TH, Perlis RH. Case-control study of neuropsychiatric symptoms in electronic health records following COVID-19 hospitalization in 2 academic health systems. *Molecular Psychiatry* 2022:1-6.
 14. Thye AY-K, Law JW-F, Tan LT-H, Pusparajah P, Ser H-L, Thurairajasingam S, et al. Psychological symptoms in COVID-19 patients: insights into pathophysiology and risk factors of long COVID-19. *Biology* 2022;11(1):61.
 15. Sneller MC, Liang CJ, Marques AR, Chung JY, Shanbhag SM, Fontana JR, et al. A longitudinal study of COVID-19 sequelae and immunity: baseline findings. *Annals of Internal Medicine* 2022 ;175(7):969-979. doi: 10.7326/M21-4905.
 16. Frasca F, Scordio M, Santinelli L, Gabriele L, Gandini O, Criniti A, et al. Anti-IFN- α / ω neutralizing antibodies from COVID-19 patients correlate with downregulation of IFN response and laboratory biomarkers of disease severity. *European Journal of Immunology* 2022;52(7):1120-1128. doi: 10.1002/eji.202249824.
 17. Khanmohammadi S, Rezaei N, Khazaei M, Shirkani A. A case of autosomal recessive interferon alpha/beta receptor alpha chain (IFNAR1) deficiency with severe COVID-19. *Journal of Clinical Immunology* 2022;42(1):19-24.
 18. Li T, Liu W, Wang C, Wang M, Hui W, Lu J, et al. Multidimension Analysis of the Prognostic Value, Immune Regulatory Function, and ceRNA Network of LY6E in Individuals with Colorectal Cancer. *Journal of Immunology Research* 2022.
 19. Zhang Q, Jia Y, Pan P, Zhang X, Jia Y, Zhu P, et al. α 5-nAChR associated with LY6E modulates cell migration via TGF- β 1/Smad signaling in non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2022;43(4):393-404.
 20. Martin AM, Roach M, Jones LA, Thorpe D, Coleman RA, Allman C, et al. Single-cell gene expression links SARS-CoV-2 infection and gut serotonin. *Gut* 2022.
 21. Zhao X, Zheng S, Chen D, Zheng M, Li X, Li G, et al. LY6E restricts entry of human coronaviruses, including currently pandemic SARS-CoV-2. *Journal of Virology* 2020;94(18):e00562-20.
 22. Martin-Fernandez M, Buta S, Le Voyer T, Li Z, Dynesen LT, Vuillier F, et al. A partial form of inherited human USP18 deficiency underlies infection and inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 2022;219(4):e20211273.
 23. Oki N, Yamada S, Tanaka T, Fukui H, Hatakeyama S, Okumura F. Curcumin partly prevents ISG15 activation via ubiquitin-activating enzyme E1-like protein and decreases ISGylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2022; 625:94-101.
 24. Vere G, Alam MR, Farrar S, Kealy R, Kessler BM, O'Brien DP, et al. Targeting the Ubiquitylation and ISGylation Machinery for the Treatment of COVID-19. *Biomolecules* 2022;12(2):300.
 25. Wang F, Yao Y, Wu Y, Lu Y. USP18 alleviates neurotoxicity induced by sevoflurane via AKT and NF- κ B pathways. *Molecular & Cellular Toxicology* 2022:1-8.
 26. Mirzalieva O, Juncker M, Schwartzburg J, Desai S. ISG15 and ISGylation in Human Diseases. *Cells* 2022;11(3):538.
 27. Tang J, Tang A, Jia N, Du H, Liu C, Zhu J, et al. Free ISG15 Inhibits the Replication of Peste des Petits Ruminants Virus by Breaking the Interaction of Nucleoprotein and Phosphoprotein. *Microbiology Spectrum* 2022:e01031-22.
 28. Wang T, Li C, Wang M, Zhang J, Zheng Q, Liang L, et al. Expedient Synthesis of Ubiquitin-like Protein ISG15 Tools Through Chemo-Enzymatic Ligation Catalyzed by a Viral Protease Lbpro. *Angewandte Chemie* 2022 ;61(40):e202206205. doi: 10.1002/anie.202206205.
 29. Waqas SFuH, Sohail A, Nguyen AHH, Usman A, Ludwig T, Wegner A, et al. ISG15 deficiency features a complex cellular phenotype that responds to treatment with itaconate and derivatives. *Clinical and Translational Medicine* 2022;12(7):e931.
 30. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). *Statpearls [internet]* 2022; PMID: 32150360.
 31. Chandel V, Sharma PP, Raj S, Choudhari R, Rathi B, Kumar D. Structure-based drug repurposing for targeting Nsp9 replicase and spike proteins of severe acute respiratory

- syndrome coronavirus 2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2022;40(1):249-62.
32. Hui DS, Zumla A. Advances in the epidemiology, clinical features, diagnosis, clinical management and prevention of coronavirus disease 2019. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2022;28(3):166-73.
 33. Wang W, Peng X, Jin Y, Pan JA, Guo D. Reverse genetics systems for SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology* 2022 ;94(7):3017-3031. doi: 10.1002/jmv.27738.
 34. Zhou P, Yuan M, Song G, Beutler N, Shaabani N, Huang D, et al. A human antibody reveals a conserved site on beta-coronavirus spike proteins and confers protection against SARS-CoV-2 infection. *Science Translational Medicine* 2022;14(637):eabi9215.
 35. Zhai S-L, Sun M-F, Zhang J-F, Zheng C, Liao M. Spillover infection of common animal coronaviruses to humans. *The Lancet Microbe* 2022;3(11):e808. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00198-7.
 36. Wagh PW, Raut R, Kumbhalkar S, Kanojiya DR. Structure Of Coronavirus. *ECS Transactions* 2022;107(1):17297.
 37. Forni D, Cagliani R, Pontremoli C, Clerici M, Sironi M. The substitution spectra of coronavirus genomes. *Briefings in Bioinformatics* 2022;23(1):bbab382.
 38. Sathipati SY, Shukla SK, Ho S-Y. Tracking the amino acid changes of spike proteins across diverse host species of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Iscience* 2022;25(1):103560.
 39. Guo Z, Zhang C, Zhang C, Cui H, Chen Z, Jiang X, et al. SARS-CoV-2-related pangolin coronavirus exhibits similar infection characteristics to SARS-CoV-2 and direct contact transmissibility in hamsters. *Iscience* 2022;25(6):104350.
 40. Rouaud F, Méan I, Citi S. The ACE2 Receptor for Coronavirus Entry Is Localized at Apical Cell—Cell Junctions of Epithelial Cells. *Cells* 2022;11(4):627.
 41. Villafañe L, Vaulet LG, Viere FM, Klepp LI, Forrellad MA, Bigi MM, et al. Development and evaluation of a low cost IgG ELISA test based in RBD protein for COVID-19. *Journal of Immunological Methods* 2022;500:113182.
 42. Yang Q-Y, Yang Y-L, Tang Y-X, Qin P, Wang G, Xie J-Y, et al. Bile acids promote the caveolae-associated entry of swine acute diarrhea syndrome coronavirus in porcine intestinal enteroids. *PLoS Pathogens* 2022;18(6):e1010620.
 43. Zhao X, Zheng S, Chen D, Zheng M, Li X, Li G, et al. LY6E restricts entry of human coronaviruses, including currently pandemic SARS-CoV-2. *Journal of Virology* 2020;94(18):e00562-20.