

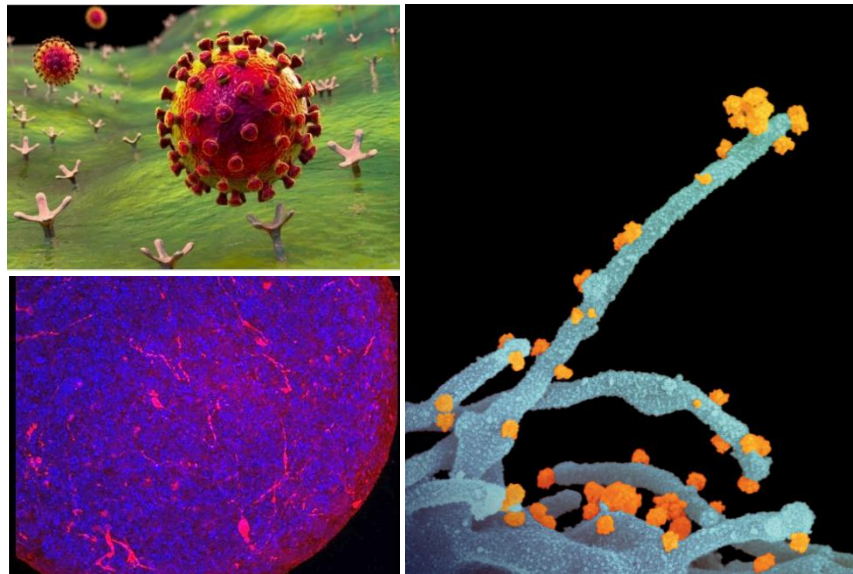


Σχολή Επιστημών Υγείας

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

Μια συλλογική εργασία των φοιτητών του 4<sup>ου</sup> έτους που επέλεξαν το μάθημα *ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ* το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020



*Πως οι Επιστήμονες Εντόπισαν την Αχίλλειο Πτέρνα του Νέου Κορωνοϊού SARS-CoV-2*

Συγγραφείς:

Ασμέτης Πέτρος, Δελή Μαριάννα, Κυριαζή Δέσποινα, Κουτεντάκη Γεωργία, Λαχανόπουλος Αριστοτέλης, Λέντζαρης Παναγιώτης, Νότη Δέσποινα, Νίκου Βασιλική, Παλιάγκα Αικατερίνη, Πιπεράκης Αρτέμιος, Σαλαμώτας Ηλίας, Σωματάκης Στέφανος, Τάντης-Ταπεινός Δημήτρης, Τζήμα Χρυσούλα, Τζιαβάρας Κωνσταντίνος, Τσιούρης Αλέξανδρος, Φιρογλάνη Μοσχή-Μαριάνθη, Χρηστοφή Κυράνια-Κάαρινα

Υπό την Επιμέλεια της Διδάσκουσας, κ. Κυριακής Παπαγεωργίου

Συντονιστής: Αναπληρωτής Καθηγητής του ΤΒΕΤ, κ. Θεολόγος Μιχαηλίδης

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

## ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

### *Εικόνες εξωφύλλου:*

**Πάνω αριστερά:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της πρόσδεσης σωματιδίων του ιού SARS-CoV-2 στους υποδοχείς ACE-2 σε ένα ανθρώπινο κύτταρο: το αρχικό στάδιο της ασθένειας COVID-19.

**Πηγή:** Robertson S. 2020. ACE inhibition in kidney could influence pathogenesis of SARS-CoV-2. Posted in: Medical Research News | Disease/Infection News. Φωτογραφία: Kateryna Kon / Shutterstock.

**Κάτω αριστερά:** Ο ιός SARS-CoV-2 μπορεί να μολύνει νευρικά κύτταρα και να πολλαπλασιαστεί μέσα σε αυτά. «Μini εγκέφαλος» κατασκευασμένος στο εργαστήριο με μεθόδους Γενετικής Μηχανικής από ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα. Αυτή η σφαίρα έχει μέγεθος σχεδόν το 1/3 του χιλιοστού και αποτελείται από 30.000 κύτταρα περίπου. Οι πυρήνες των κυττάρων είναι μπλε και ο ιός SARS-CoV-2 έχει χρωματιστεί κόκκινος. Είναι φανερό ότι ένας μικρός πληθυσμός κυττάρων του εγκέφαλου μπορεί να περιέχει έναν μεγάλο αριθμό ιικών σωματιδίων.

**Πηγή:** Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT), Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health.

**Δεξιά:** Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, κυττάρων Vero E6, διαμολυσμένων με τον ιό SARS-CoV-2. Ο κορωνοϊός υποχρεώνει τα κύτταρα να σχηματίζουν προεκβολές σαν φιλοπόδια (γαλάζιο) οι οποίες περιβάλλονται από ιικά σωματίδια (πορτοκαλί). Μέσω αυτών των δομών μολύνει αποτελεσματικά τα γειτονικά κύτταρα, μετατρέποντάς τα σε νέα εργοστάσια παραγωγής ιών.

**Πηγή:** Bouhaddou et al. 2020. The Global Phosphorylation Landscape of SARSCoV-2 Infection. *Cell*, **182**: 685-712.e19.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I. Ενότητα 1: Η σχέση του ιού SARS-CoV-2 με τον ξενιστή του.....</b>	<b>2</b>
1. <b>Ασμέτης Πέτρος:</b> Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή στα χρόνια πανδημίας.....	3
2. <b>Κυριαζή Δέσποινα:</b> Η ανάλυση κυτοκινών στο πλάσμα των ασθενών 2019-nCoV ως εναλλακτική λύση για τη διάγνωση του ιού.....	6
3. <b>Νίκου Βασιλική:</b> Η κατανόηση μηχανισμών εισόδου του SARS-CoV-2 στον ξενιστή μπορεί να οδηγήσει στην αποτελεσματική αντιμετώπισή του.....	10
4. <b>Σαλαμώτας Ηλίας:</b> Ο μηχανισμός μόλυνσης του SARS-CoV-2 και η μοριακή μηχανή που την καθιστά δυνατή.....	14
5. <b>Σωματάκης Στέφανος:</b> SARS-CoV-2: Ο πανταχού παρών ιός που λατρεύει τις κοινωνικές επαφές.....	18
6. <b>Τάντης-Ταπεινός Δημήτρης:</b> Μηχανισμός εισόδου στα κύτταρα στόχους στο αναπνευστικό σύστημα του νέου Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 και αναπάντεχες θεραπευτικές προοπτικές.....	22
7. <b>Τζήμα Χρυσούλα:</b> Χρειάζονται προληπτικά μέτρα ή δεν χρειάζονται, ιδού η απορία.....	26
<b>II. Ενότητα 2: Τα διαγνωστικά εργαλεία που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2.....</b>	<b>29</b>
1. <b>Κουτεντάκη Γεωργία:</b> Πως ένα χαμηλού κόστους πρωτόκολλο μπορεί να οδηγήσει στην ασφαλή ανίχνευση του SARS-COV-2.....	30
2. <b>Λέντζαρης Παναγιώτης:</b> Αντιμετώπιση της πανδημίας - Αποτελεσματική διάγνωση κρουσμάτων κορωνοϊού.....	34
3. <b>Νότη Δέσποινα:</b> Μοριακή διάγνωση στην πρώτη γραμμή ενάντια στον κορωνοϊό.....	38
4. <b>Πιπεράκης Αρτέμιος:</b> Ανιχνεύοντας τα Όπλα του Εχθρού.....	42

<b>III. Ενότητα 3: Οι μηχανισμοί στους οποίους στηρίζονται καινοτόμα (ή/και παλιά) φάρμακα καθώς και εμβόλια για την αντιμετώπιση του Covid-19.....</b>	<b>45</b>
<b>1. Δελή Μαριάννα: Η Αντιϊκή Δράση της Ιντερφερόνης-α.....</b>	<b>46</b>
<b>2. Λαχανόπουλος Αριστοτέλης: Η ρεμδεσιβίρη φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη πιθανή λύση στο πρόβλημα του COVID-19.....</b>	<b>49</b>
<b>3. Παλιάγκα Αικατερίνη: Πώς ο μηχανισμός προσκόλλησης του SARS-CoV-2 στα κύτταρα ξενιστές μπορεί να παρεμποδιστεί από την χλωροκίνη και την υδροξυχλωροκίνη.....</b>	<b>53</b>
<b>4. Τζιαβάρας Κωνσταντίνος: Πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2: Αίτιο της έντονης μολυσματικότητάς του και πιθανός θεραπευτικός στόχος.....</b>	<b>57</b>
<b>5. Τσιούρης Αλέξανδρος: Ο SARS-CoV-2 μολύνει άμεσα αγγειακά και νεφρικά οργανοειδή και το ανθρώπινο διαλυτό ένζυμο ACE2 μπορεί να τον περιορίσει.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Φιρογλάνη Μοσχή-Μαριάνθη: Ανάπτυξη ανώδυνων εμβολίων κατά του SARS-CoV-2 : ένας πολλά υποσχόμενος σύμμαχος έναντι της πανδημίας.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Χρηστοφή Κυράνια-Κάαρινα: «Pan-coronavirus» αναστολέας: Θα μπορούσε να είναι μία λύση στην αντιμετώπιση του SARS-CoV-2 όπως και άλλων όμοιων κορονοϊών;.....</b>	<b>67</b>

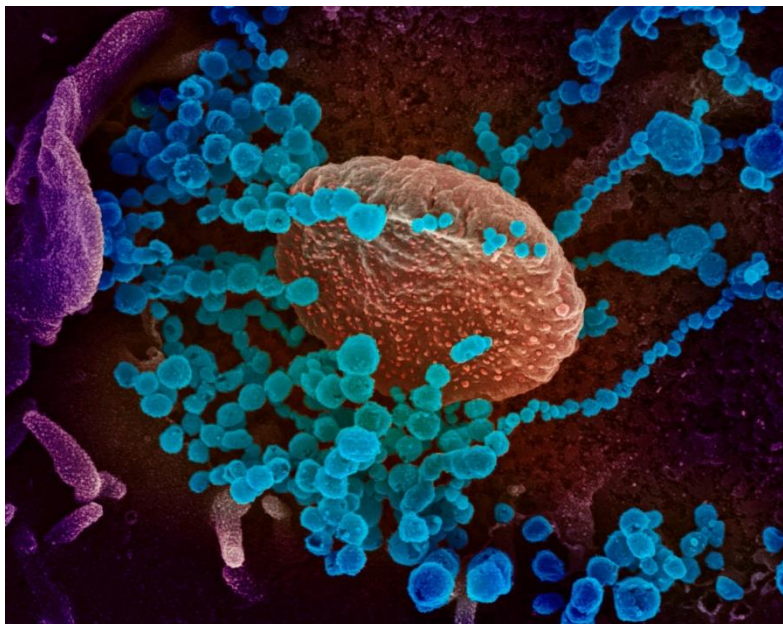


## **Ενότητα 1: Η σχέση του ιού SARS-CoV-2 με τον ξενιστή του**

## Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή στα χρόνια πανδημίας

Από τον Ασμέτη Πέτρο  
(AM: 1828)

Από τον Δεκέμβρη του 2019, ολόκληρη η ανθρωπότητα βρίσκεται σε επιφυλακή, μετά την εμφάνιση ενός νέου ιού, της οικογένειας των κορονοϊών, του SARS-CoV-2. Αμέσως, επιστήμονες ξεκίνησαν εντατικές έρευνες, προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί εισόδου του στον οργανισμό, αλλά και οι επιπτώσεις στην υγεία. Για την διαδικασία αυτή, βρέθηκε υπεύθυνος ο υποδοχέας ACE2, σε συνδυασμό με την δράση της TMPRSS2, που συμβάλλει στον σχηματισμό του πρωτεϊνικού περιβλήματος του ιού. Οι πρωτεΐνες αυτές αρχικά εντοπίστηκαν στα κυψελιδικά κύτταρα (AT2 cells) πνευμόνων και θεωρήθηκε ότι ο ιός προκαλεί ασθένεια του αναπνευστικού. Ακολούθως, νέες μελέτες έδειξαν ότι το καρδιαγγειακό, το πεπτικό και το ουροποιητικό σύστημα, αποτελούν, επίσης, εστίες μόλυνσης. Όλα αυτά τα δεδομένα, οδήγησαν ακόμα περισσότερους ερευνητές σε αναλυτικότερη μελέτη του υποδοχέα και σε άλλα συστήματα. Έτσι, θεωρήθηκε πιθανή η ύπαρξή του σε γαμετικά και σωματικά κύτταρα των όρχεων, αλλά και στα αντίστοιχα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Η αποσαφήνιση αυτού του ζητήματος, προέβαλε ως επιτακτική ανάγκη, καθώς θα μπορούσε να συνεπάγεται καταστροφή κυττάρων αυτού του τύπου και σοβαρές επιπτώσεις στην γονιμότητα και των δύο φύλων. Ακόμη, το ενδεχόμενο της κάθετης μετάδοσης του ιού κατά την εγκυμοσύνη και οι επιπτώσεις του στο αναπτυσσόμενο έμβryo, κατέστησε απαραίτητη την αναστολή των περισσότερων διαδικασιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής από πολυάριθμα εξειδικευμένα κέντρα παγκοσμίως.



Εικόνα 1 Οπτικοποίηση του ιού (μπλε) στην επιφάνεια κυττάρου από καλλιέργεια στο εργαστήριο

Δείγμα σπέρματος από τρεις άνδρες, άγνωστης κατάστασης υγείας, αξιοποιήθηκε από τους Wang και Xu, για την μελέτη της ενδεχόμενης εισόδου του SARS-CoV-2 σε κύτταρα των όρχεων. Αυτοί επιδίωξαν να μελετήσουν κάθε κυτταρικό τύπο, που εμπεριέχεται στο δείγμα, ξεχωριστά, μέσω παρατήρησης των προτύπων έκφρασης γονιδίων που ήταν χαρακτηριστικά για κάθε έναν από αυτούς. Έτσι, το αντικείμενο μελέτης τους αποτελούνταν από σπερματοκύτταρα σε διάφορα στάδια ανάπτυξής τους, κύτταρα Sertoli, κύτταρα Leydig και μονοκύτταρα. Παρότι το δείγμα ήταν επαρκές για εξαγωγή αποτελεσμάτων, είναι πολύ μικρό για να τα θεωρήσουμε αξιόπιστα.

Σε κάθε ένα από τα παραπάνω, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ACE2 και TMPRSS2 σε επίπεδο mRNA. Έγινε σήμανση κάθε μεταγράφου με μικρές αλληλουχίες, προκειμένου να γίνεται αντιληπτός ο κυτταρικός τύπος από τον οποίο αυτό προέρχεται. Υψηλά επίπεδα του mRNA του ACE2 παρατηρήθηκε τόσο σε κύτταρα Sertoli και Leydig, όσο και στα σπερματογόνια, ενώ στα τελευταία βρέθηκε αυξημένη έκφραση και της TMPRSS2, χωρίς να είναι σαφές αν υπάρχει συνέκφρασή των δύο χωρικά και χρονικά. Συμπληρωματικές έρευνες απέδειξαν την ύπαρξη αυτών και σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε όρχεις ασθενών. [8] Το πρόβλημα ήταν ο μη δυνατός διαχωρισμός μεταξύ Sertoli και Leydig, οπότε αυτοί οι τύποι κυττάρων μελετήθηκαν συνδυαστικά.

Συγκρίνοντας τα θετικά για τον υποδοχέα κύτταρα με τα αντίστοιχά τους χωρίς έκφραση αυτού, φάνηκε ότι τα θετικά σπερματογόνια αποτελούσαν το 1.28% των συνολικών σπερματογονίων και είχαν παρόμοια επίπεδα του ACE2 με τα AT2 κύτταρα. Αντίστοιχα, τα θετικά Sertoli και Leydig κύτταρα είχαν τρεις φορές μεγαλύτερη έκφρασή του σε σχέση με τα AT2. Όλα αυτά οδήγησαν στον χαρακτηρισμό των όρχεων ως πιθανή εστία μόλυνσης από τον ιό, παρά το γεγονός ότι τα θετικά κύτταρα φαίνεται να απαντώνται σε χαμηλά ποσοστά.

Το επόμενο ερώτημα των Wang και Xu αφορούσε την επίδραση του SARS-CoV-2 στην γονιμότητα του άνδρα. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποίησαν αναλυτικότερη μελέτη των προτύπων έκφρασης των θετικών για τον υποδοχέα κυττάρων. Στα σπερματογόνια, υπήρχε αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με υικές διεργασίες και μειωμένη έκφραση αυτών που αφορούν στην σπερματογένεση, όπως την κινητικότητα του σπέρματος, την ικανότητά του να αναγνωρίζει το ωάριο, την ακροσωμική αντίδραση και την μείωση. Όμοια, στα Sertoli και Leydig, γονίδια απαραίτητα για την ανοσία και τις συνδέσεις μεταξύ κυττάρων είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, ενώ αυτά που σχετίζονταν με μιτοχόνδρια και την αναπαραγωγική ικανότητα, έφεραν αντίθετα αποτελέσματα.

Νέες σειρές πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν, είχαν περισσότερο κλινικό χαρακτήρα. [5] Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές έκαναν βιοψίες σε ασθενείς με τον ιό, αλλά και σε άνδρες που έχασαν την ζωή τους από αυτόν. Αυξημένα ποσοστά του IgG στο επιθήλιο των σπερματικών σωληναρίων ήταν μια ένδειξη για την ύπαρξη σημαντικής ανοσολογικής απόκρισης. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν πολλά κατεστραμμένα γαμετικά κύτταρα και λίγα έως καθόλου σπερματοζωάρια. Αυτά, σε συνδυασμό με την παρατήρηση, σχετικά με την εμφάνιση δυσφορίας στο όσχεο σε ασθενείς [8], παραπέμπουν στην πιθανή πρόκληση ορχίτιδας από την συγκεκριμένη ασθένεια. Αξίζει, όμως, να αναφερθεί ότι σε καμία από αυτές τις βιοψίες δεν εντοπίστηκε το γονιδίωμα του ιού με real time PCR.

Προκειμένου να αποκτήσουν μια πιο σφαιρική εικόνα για την επίδραση αυτού του τύπου κορονοϊού στην γονιμότητα, αντίστοιχα πειράματα έλαβαν χώρα και για το αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας. Ο ACE2 υποδοχέας εντοπίστηκε σε κάποια κύτταρα του ωοθυλακίου και στο ενδομήτριο, στην mRNA μορφή του. Τα επίπεδα έκφρασης δεν ήταν σταθερά και εξαρτιόνταν από το στάδιο του έμμηνου κύκλου, με μέγιστο στην φάση πολλαπλασιασμού, γεγονός που υποδεικνύει την επίδραση του ιού στην αναγέννηση του ενδομητρίου. Τα δεδομένα έδειξαν ότι αυτός μπορεί επιπλέον να επιδράσει στην λειτουργικότητα των ωοθηκών, στην ποιότητα των ωαρίων, αλλά και να οδηγήσει σε γυναικεία υπογονιμότητα ή αποβολή, σε περίπτωση εγκυμοσύνης. [7]

Το ενδεχόμενο πιθανής κάθετης μετάδοσης του ιού στο έμβρυο ήταν κάτι που προβλημάτισε αρκετές ομάδες επιστημόνων. Το mRNA του ίδιου υποδοχέα εντοπίστηκε στον πλακούντα και σε διάφορους κυτταρικούς τύπους μέσω των οποίων υπάρχει αλληλεπίδραση μητέρας και εμβρύου. [7] Ακόμη, κλινικές μελέτες, έδειξαν αυξημένα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών IgG και IgM και κυτταροκινών σε νεογνά, με ασθενείς μητέρες, αμέσως μετά τον τοκετό. [2] Βέβαια, σημαντικό είναι ότι δεν εντοπίστηκε το γονιδίωμα του ιού με real time PCR στα ίδια άτομα και τα IgG μπορεί να είναι μητρικής προέλευσης.



Σίγουρα δεν μπορούμε να αρνηθούμε την αλληλεπίδραση του SARS-CoV-2 με το αναπαραγωγικό σύστημα, καθώς ο ίδιος ο υποδοχέας και η πρωτεΐνη του φακέλου του ιού βρέθηκαν και στα δύο φύλα. Η είσοδος στους όρχεις και οι επιπτώσεις στην ανδρική γονιμότητα, αλλά και στην ακεραιότητα των κυττάρων αυτής της περιοχής, είναι πιθανά. Όμως, η απουσία του γονιδιώματος του ιού στα δείγματα ασθενών και το χαμηλό ποσοστό κοινής έκφρασης των ACE και TMPRSS2, ανεπαρκή για την είσοδό του σε αυτά τα κύτταρα [8], στερούν μέρος της ισχύς και αξιοπιστίας της έρευνας των Wang και Xu. Για να λυθεί αυτό, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της αλληλεπίδρασής του με τις ορμόνες LH, FSH και τεστοστερόνη, η αναλογία των οποίων στον οργανισμό είναι δείκτης γονιμότητας. Η τελική απάντηση για όλα αυτά θα δοθεί μέσα από κλινικές μελέτες κάποιο χρονικό διάστημα μετά την ανάρρωση των ατόμων αυτών. Παρόλα αυτά, η αβεβαιότητα σχετικά με την ποιότητα των γαμετικών κυττάρων και των δύο φύλων, την πιθανή επίδραση του ιού στην εγκυμοσύνη, αλλά και την κάθετη μετάδοσή του στο έμβρυο, οδήγησε πολλούς ειδικούς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής να συμβουλεύουν τα ζευγάρια να αναστείλουν τις διαδικασίες γονιμοποίησης για το επόμενο διάστημα.

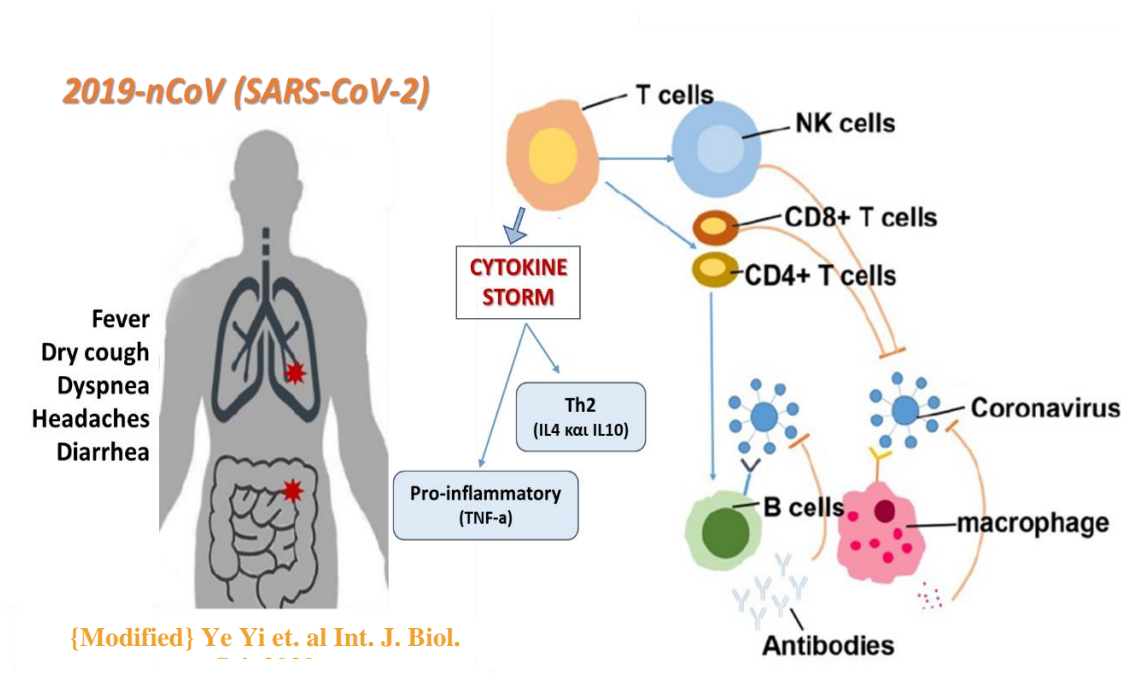
**Note added in proof: Μια μελέτη που δημοσιεύθηκε πρόσφατα στο περιοδικό *Jama Network Open*, έδειξε ότι πράγματι ο ιός μπορεί να εντοπιστεί σε δείγματα σπέρματος με RT-PCR.**

#### Βιβλιογραφία

- 1) Wang and Xu (2020). scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of the ACE2 Receptor, A Target for SARS-CoV-2 Infection in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells. *Cell*, 9. pii: E920
- 2) Dong et al., (2020). Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA*
- 3) Souza et al., Management of ART and COVID-19: Infertility in Times of Pandemic. What Now? *JBRA Assist Reprod*. 2020
- 4) Chen, F., & Lou, D. (2020). Rising Concern on Damaged Testis of COVID-19 Patients. *Urology*. doi:10.1016/j.urology.2020.04.069
- 5) Xu J, Qi L, Chi X, Yang J, Wei X, Gong E, et. Al. Orchitis: A Complication of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *Biol Reprod* 2006;74:410-6.
- 6) Maya, W. D., Plessis, S. S., & Velilla, P. A. (2020). SARS-CoV-2 and the testis: Similarity with other viruses and routes of infection. *Reproductive BioMedicine Online*. doi:10.1016/j.rbmo.2020.04.009
- 7) Li, R., Yin, T., Fang, F., Li, Q., Chen, J., Wang, Y., . . . Qiao, J. (2020). Potential risks of SARS-Cov-2 infection on reproductive health. *Reproductive BioMedicine Online*. doi:10.1016/j.rbmo.2020.04.018
- 8) Pan, F., Xiao, X., Guo, J., Song, Y., Li, H., Patel, D. P., . . . Hotaling, J. M. (2020). No evidence of SARS-CoV-2 in semen of males recovering from COVID-19. *Fertility and Sterility*. doi:10.1016/j.fertnstert.2020.04.024
- 9) Du, M., Cai, G., Chen, F., Christiani, D. C., Zhang, Z., & Wang, M. (2020). Multi-omics Evaluation of Gastrointestinal and Other Clinical Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2020.03.045
- 10) Li D, Jin M, Bao P, Zhao W, Zhang S. Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw open*. 2020;3(5):e208292. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.8292

## Η ανάλυση κυτοκινών στο πλάσμα των ασθενών 2019-nCoV ως εναλλακτική λύση για τη διάγνωση του ιού

Από την Δέσποινα Κυριαζή  
(ΑΜ: 1875)



Ο ιός 2019-nCoV, γνωστός επίσης και ως SARS-CoV-2, εντοπίστηκε για πρώτη φορά τον Δεκέμβριο του 2019 στο Wuhan της Κίνας, και από το Μάρτιο του 2020 έχει θέσει όλο τον πλανήτη σε «παύση». Ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των κορωνοϊών, δηλαδή RNA ιούς, που προσβάλλουν τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά, ενώ στην ίδια οικογένεια ανήκουν ο SARS-CoV και ο MERS-CoV, οι οποίοι προηγουμένως έχουν αποδειχτεί και θανατηφόροι για τον ξενιστή. Το Δεκέμβριο του 2019, παρατηρήθηκαν κάποιες περιπτώσεις πνευμονίας χωρίς να είναι γνωστή η αιτία της. Αναλύσεις οι οποίες έγιναν στη συνέχεια σε δείγματα του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος αποκάλυψαν έναν νέο ιό, που ονομάστηκε 2019-CoV. Μέχρι το Μάιο του 2020 έχουν καταγραφεί πάνω από 5.8 εκατομμύρια κρούσματα και πάνω από 360 χιλιάδες θάνατοι εξαιτίας του ιού. Είναι, λοιπόν, επιτακτική ανάγκη να κατανοηθεί η φυσιολογία και ο τρόπος δράσης του 2019-CoV προκειμένου να μπορέσει να βρεθεί κάποια αποτελεσματική θεραπεία. Αυτή η λογική υιοθετήθηκε ήδη από τους Huang et al. σε μία από τις πιο αρχικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, και περιγράφει τα κλινικά, επιδημιολογικά, εργαστηριακά και ραδιολογικά χαρακτηριστικά ασθενών που έχουν προσβληθεί από τον 2019-nCoV.

Στη μελέτη αυτή συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 41 ασθενείς που νοσηλεύονταν σε νοσοκομείο, οι οποίοι είχαν προσβληθεί από 2019-nCoV. Αρχικά, δύο βασικά ερωτήματα αποτελούν η ηλικία η οποία είναι «πιο ευάλωτη» στον ιό. Βρέθηκε, μετά από στατιστική

επεξεργασία που έγινε σε κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα καθώς και ακτινογραφίες θώρακος, πως το 49% των ασθενών ήταν από 25-49 έτη, ενώ το 34% ήταν από 50-64 έτη. Η μέση ηλικία ήταν τα 49 έτη, και δεν υπήρχαν παιδιά ή έφηβοι που είχαν προσβληθεί. Αυτό συνάδει με τα πιο πρόσφατα δεδομένα, που θέλουν τη μέση ηλικία στην Κίνα να είναι τα 30 με 69 έτη ([Worldometer](#), 2020). Όσον αφορά το φύλο που προσβάλλεται, η ίδια στατιστική επεξεργασία έδειξε πως 73% των ασθενών ήταν άνδρες και 27% γυναίκες, γεγονός που επιβεβαιώνεται από υπάρχοντα δεδομένα. Ήταν σημαντικό να γνωρίζουν εάν η ύπαρξη υποκείμενου νοσήματος επηρέαζε την προσβολή από τον ιό καθώς και τη θνησιμότητα αυτού. Από το σύνολο των ασθενών 32% είχε υποκείμενα νοσήματα, όπως διαβήτης, υπέρταση ή καρδιαγγειακά νοσήματα. Συνολικά εντοπίστηκαν έξι θάνατοι ανάμεσα στους 41 εξεταζόμενους.

Εφόσον είχαν υπολογιστεί τα παραπάνω στοιχεία, επόμενο βήμα ήταν να υπολογισθεί ο επιπολασμός κάποιων συμπτωμάτων. Πιο κοινά συμπτώματα ήταν ο πυρετός (98%) και ο ξηρός βήχας (78%). Λιγότερο κοινά συμπτώματα ήταν ο πονοκέφαλος (8%) και η διάρροια (3%). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως ο 2019-nCoV δρα με παρόμοιο τρόπο με κορωνοϊούς της ίδιας οικογένειας, όπως ο SARS-CoV και ο MERS-CoV. Αυτό μπορεί να βασίζεται στο γεγονός πως φυλογενετικά είναι πλησιέστερος με τους ιούς bat-SL-CoVZC45 και bat-SL-CoVZXC21. Υπάρχει, ωστόσο, ομοιότητα στην δομική πρόσδεση του 2019-nCoV στον υποδοχέα του, ιδιαίτερα με τον SARS-CoV και όχι τον MERS-CoV [1].

Στη συνέχεια, αναλυθήκαν στοιχεία αξονικής τομογραφίας θώρακα, προκειμένου να προσδιοριστεί περαιτέρω ο τρόπος δράσης του ιού. Στους ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στις κλινικές ΜΕΘ, υπήρχαν έντονες αλλοιώσεις στους πνεύμονες που χαρακτηρίζονται από την παρουσία υγρού (κυψελιδική πύκνωση), ακόμη και 15 ημέρες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Άλλες μελέτες επιβεβαιώνουν την ύπαρξη άνισων οζιδίων και την κυψελιδική πύκνωση σε περιφερικές περιοχές και των δύο πνευμόνων και στον υποϋπεζωκοτικό χώρο κατά τα αρχικά στάδια της ασθένειας [2]. Ωστόσο, οι πνεύμονες των ασθενών που δεν χρειάστηκε να νοσηλευτούν στις ΜΕΘ, είχαν διαφορετική κλινική εικόνα και τα συμπτώματα υποχώρησαν νωρίτερα. Παρουσίαζαν σκιάσεις (ή οζίδια) στους πνεύμονες που συνοδεύονταν από κυψελιδική πύκνωση την όγδοη ημέρα μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, ενώ η κυψελιδική πύκνωση είχε υποχωρήσει μέχρι την δωδέκατη ημέρα. Επίσης ή ο εντοπισμός υγρού στην περιφέρεια των πνευμόνων [2].

Έπειτα, οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στην ανάλυση κυτοκινών, η οποία περιγράφει το ανοσολογικό προφίλ των ασθενών και αποτελεί το πιο καινοτόμο σημείο της μελέτης. Ειδικές δοκιμασίες που στοχεύουν την μέτρηση κυτοκινών στο πλάσμα ασθενών (δοκιμασία Human Cytokine Standard 27-Plex σε σύστημα Bio-Plex 200), έδειξαν πως παράγονταν τόσο κυτοκίνες που υποκινούν την επιδείνωση της ασθένειας (όπως TNFα), αλλά και κυτοκίνες Th2 που έχουν αντιφλεγμονική δράση (IL4 και IL10). Συγκεκριμένα, ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στις κλινικές ΜΕΘ (32% των συνολικών) εμφάνισαν αυξημένη συγκέντρωση διάφορων χημειοκινών στο πλάσμα, όπως η IL1B, IL7, IL8, IL9, IL10, IFNγ, TNFα και VEGF σε σχέση με τους υγιείς, ενώ οι IL5, IL15 και RANTES ήταν μειωμένες. Τα επίπεδα αυτά φαίνεται να χαρακτηρίζουν σε γενικές γραμμές και τον ιό MERS-CoV. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς ΜΕΘ σε σχέση τους υπόλοιπους, είχαν αυξημένη συγκέντρωση μόνο της IL2, IL7, IL10 και TNFα. Από

αυτές τις χημειοκίνες, ειδικότερα αυξημένη ήταν σε ασθενείς που είχαν προσβληθεί από τον MERS-CoV, η IL10, χωρίς να αναφέρεται αν αυτό αφορά ασθενείς ΜΕΘ μόνο [3].

Επιπροσθέτως, σημαντικό στοιχείο ήταν να ελεγχθεί πως μεταδίδεται ο ιός. Οι 27 από τους 41 ασθενείς είχαν βρεθεί στην αγορά θαλασσινών από όπου φαίνεται ότι ξεκίνησε η μετάδοση της ασθένειας. Επιπλέον, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο προσβεβλημένων μελών οικογενείας και εργαζόμενων στο χώρο υγείας, επιβεβαιώνουν πως η μετάδοση συμβαίνει από άνθρωπο σε άνθρωπο. Μάλιστα, η μετάδοση συμβαίνει μάλλον μέσω σταγονιδίων [1]. Τέλος, όσον αφορά τη θεραπεία έναντι στον ιό, τα κορτικοστεροειδή αν και χρησιμοποιούνταν παλαιότερα έναντι του SARS-CoV και MERS-CoV, φαίνεται να επιβραδύνουν την απομάκρυνση του ιού από το σώμα. Γενικά καμία θεραπεία δεν έχει αποδειχθεί με σιγουριά πως δρα κατά του ιού, ωστόσο έχει προτεθεί η χρήση πολλών φαρμάκων τα οποία ήταν αποτελεσματικά έναντι του SARS-CoV και MERS-CoV.

Τα συμπτώματα του 2019-nCoV τον συσχετίζουν με αυτά του MERS-CoV [4] και του SARS-CoV [5]. Και οι τρεις φαίνεται να προήλθαν από τις νυχτερίδες και να μεταδόθηκαν στους ανθρώπους μέσω κάποιου ενδιάμεσου ξενιστή [6]. Τα συμπτώματα του ιού περιλαμβάνουν πυρετό και ξηρό βήχα, που είναι τα κυριότερα και δευτερευόντως πονοκέφαλο και διάρροια. Ο 2019-nCoV προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα και οδηγεί σε χαρακτηριστική μορφολογία των πνευμόνων κατά την αξονική τομογραφία θώρακα. Η εξέταση αυτή κρίνεται αναγκαία για τον προσδιορισμό της μόλυνσης από αυτούς και κατ' επέκταση την αντιμετώπισή της [2]. Η παθοφυσιολογία των κορωνοϊών, επίσης, σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα προφλεγμονώδων κυτοκινών στο αίμα, τα οποία οδηγούν σε φλεγμονή στους πνεύμονες. Ο 2019-nCoV, συγκεκριμένα, αυξάνει και κυτοκίνες όπως αυτές των Th2 κυττάρων, που καταστέλλουν τη φλεγμονή [7]. Η κατανόηση των διαφορών στα επίπεδα κυτοκινών, που σε μεγάλο βαθμό χαρακτηρίζει το διαφορετικό τρόπο δράσης ιών ίδιας οικογενείας, θα εξυπηρετήσει την επιστημονική κοινότητα στην περιγραφή του τρόπου με τον οποίο ο 2019-nCoV εκδηλώνει τις θανατηφόρες επιπλοκές του.

### Κεντρικό άρθρο

C. Huang *et al.*, “Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China,” *Lancet*, vol. 395, no. 10223, pp. 497–506, Feb. 2020.

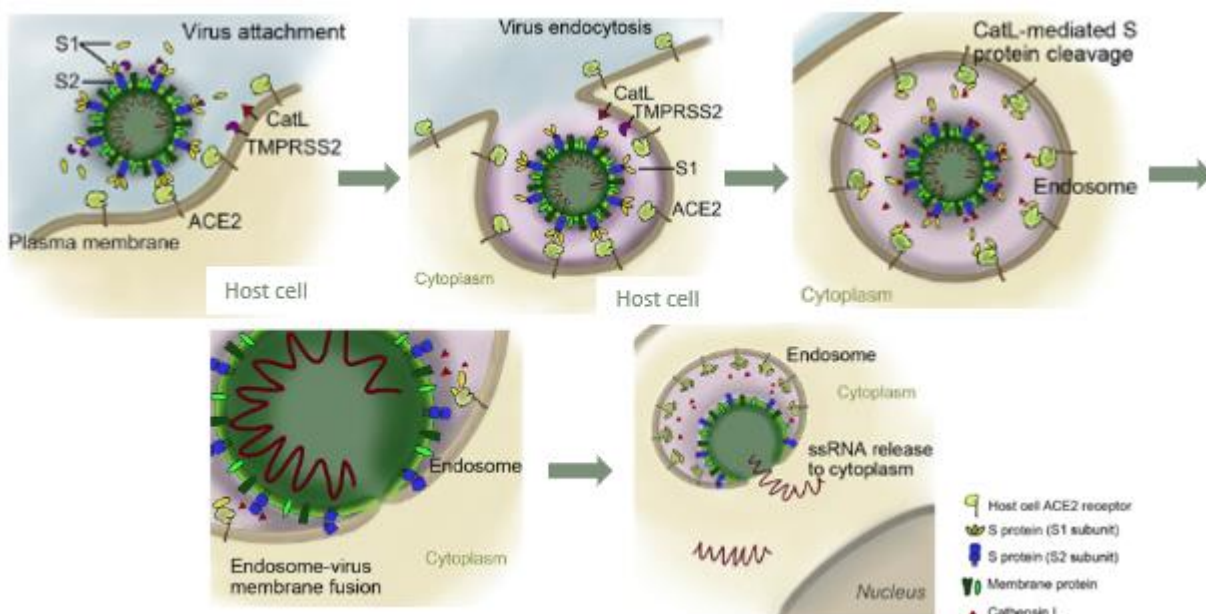
### Βιβλιογραφία

- [1] R. Lu *et al.*, “Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding,” *Lancet*, vol. 395, no. 10224, pp. 565–574, Feb. 2020.
- [2] W. Yang *et al.*, “The role of imaging in 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19),” *Eur. Radiol.*, p. 1, Apr. 2020.
- [3] W. H. Mahallawi, O. F. Khabour, Q. Zhang, H. M. Makhdoum, and B. A. Suliman, “MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokine profile,” *Cytokine*, vol. 104, pp. 8–13, Apr. 2018.
- [4] A. Assiri *et al.*, “Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: A descriptive study,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 13, no. 9, pp. 752–761, Sep. 2013.
- [5] N. Lee *et al.*, “A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 20, pp. 1986–1994, May 2003.
- [6] J. Cui, F. Li, and Z. L. Shi, “Origin and evolution of pathogenic coronaviruses,” *Nature*

- [7] *Reviews Microbiology*, vol. 17, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 181–192, 01-Mar-2019.  
C. K. Wong *et al.*, “Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 136, no. 1, pp. 95–103, Apr. 2004.

*Η κατανόηση μηχανισμών εισόδου του SARS-CoV-2 στον  
ξενιστή μπορεί να οδηγήσει στην αποτελεσματική  
αντιμετώπισή του*

Από την Νίκου Βασιλική  
(Α.Μ.: 1894)



Liu et al., May 2020, modified<sup>[5]</sup>

Εικόνα 1: Είσοδος του SARS-CoV-2 στο κύτταρο ξενιστή<sup>[5]</sup>.

Τον Δεκέμβριο του 2019, πρωτοεμφανίστηκε στην πόλη Ουχάν της Κίνας ένας νέος κορωνοϊός γνωστός ως SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) και έκτοτε εξαπλώθηκε ραγδαία σε πολλές χώρες του κόσμου σχετιζόμενος κυρίως με αναπνευστικές λοιμώξεις. Είναι γνωστό πως οι κορωνοϊοί χρησιμοποιούν μία γλυκοπρωτεΐνη-ακίδα (spike glycoprotein-“S”) για να δεσμευτούν στον υποδοχέα τους και να διαμεσολαβηθεί η είσοδός τους στα κύτταρα του ξενιστή. Ταυτόχρονα απαιτούνται πρωτεολυτικές διασπάσεις στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες για την προετοιμασία και την ενεργοποίησή τους, ώστε να μπορέσει να ακολουθήσει η σύντηξη μεμβρανών, παρόλα αυτά λίγα είναι γνωστά για τον SARS-CoV-2. Δεδομένου ότι μέχρι σήμερα έχουν σημειωθεί 6,8 εκατομμύρια επιβεβαιωμένα κρούσματα και 397 χιλιάδες θάνατοι παγκοσμίως, κρίνεται αναγκαία η κατανόηση των μηχανισμών που χρησιμοποιεί ο ιός για την προσβολή των κυττάρων του ξενιστή, μια διαδικασία κλειδί για τον σχεδιασμό εμβολίων και την εύρεση πιθανών φαρμακευτικών στόχων για την επιτυχή αντιμετώπισή του. Την ίδια γραμμή πλεύσης ακολούθησαν και οι συγγραφείς του εν λόγω άρθρου που εστίασαν στην μελέτη της SARS-CoV-2 S (SARS-CoV-2 spike glycoprotein) για την είσοδο του ιού και στην διασταυρούμενη εξουδετέρωσή της από αντισώματα για τον SARS-CoV.

Αρχικά, οι Ou et al., 2020, χρησιμοποιώντας σύστημα ψευδοτύπων λεντιών (lentiviral pseudotype system) εξέτασαν την ευαισθησία διαφόρων κυτταρικών τύπων ανθρώπου, μαϊμούδων και νυχτερίδων στη μόλυνση από συνθετικά ιικά σωματίδια που φέρουν την πρωτεΐνη SARS-CoV-2 S (SARS-CoV-2 S pseudovirions). Διαπίστωσαν πως ο πιο ευάλωτος ήταν ο Calu3 (human lung cancer cell line) που αφορούσε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, πράγμα που συνάδει με το γεγονός πως ο εν λόγω ιός προκαλεί κυρίως αναπνευστικές λοιμώξεις στους ανθρώπους. Η κυτταρική σειρά LLCMK2 (rhesus monkey kidney epithelium cell line) εμφάνισε διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας στην διαμόλυνση από SARS-CoV-2 S και SARS-CoV S συνθετικά ιικά σωματίδια προτείνοντας πως υπάρχει κάποια διαφορά στον μηχανισμό εισόδου που εξαρτάται από την πρωτεΐνη S ανάμεσα στην SARS-CoV-2 S και την SARS-CoV S.

Όσον αφορά τον υποδοχέα στον οποίο προσδένεται η πρωτεΐνη SARS-CoV-2 S για να επιτευχθεί η είσοδος του ιού, επιβεβαιώθηκε ότι είναι ο hACE2, ο ίδιος δηλαδή με την SARS-CoV S, έπειτα από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής και πειράματα ανταγωνιστικής παρεμπόδισης χρησιμοποιώντας διαλυτό hACE2. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που διεξήχθησαν την ίδια περίοδο<sup>[2], [3], [4]</sup>. Ο υποδοχέας αυτός πέρα από τους πνεύμονες εκφράζεται και σε άλλα όργανα όπως μεταξύ άλλων στους όρχεις, στο έντερο και στην καρδιά<sup>[2]</sup>. Παράλληλα, αποδείχτηκε ότι η ενδοκυττάρωση είναι το κύριο μονοπάτι εισόδου του ιού στο κύτταρο ξενιστή, αφού χρησιμοποιώντας λυσοσωμοτροπικούς παράγοντες (lysosomotropic agents), NH<sub>4</sub>Cl και bafilomycin A, οι ερευνητές είδαν ότι μειώθηκε η ικανότητα εισόδου των SARS-CoV-2 S συνθετικών ιικών σωματίων σε κυτταρική σειρά που εξέφραζε τον hACE2 υποδοχέα. Παράλληλα, μετά από αναστολή των PIKfyne, TPC2, πρωτεϊνών απαραίτητων για την ενδοκυττάρωση του ιού, επίσης μειώθηκαν τα επίπεδα εισόδου του καθιστώντας τα πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους.

Επιπλέον, οι ερευνητές, γνωρίζοντας πως οι πρωτεάσες cathepsins είναι απαραίτητες για την είσοδο των ιών SARS-CoV και MERS-CoV μέσω ενδοκυττάρωσης καθώς ενεργοποιούν τις spike πρωτεΐνες τους διασπώντας αυτές στο λυσόσωμα, εξέτασαν αν οι cathepsins είναι απαραίτητες για την είσοδο του SARS-CoV-2. Τελικά, διαπίστωσαν αναστέλλοντας τις πως η cathepsin L, και όχι η B, είναι κρίσιμη για την πρωτεολυτική ενεργοποίηση της SARS-CoV-2 S.

Παράλληλα, είναι γνωστό πως στον MERS-CoV και στον SARS-CoV η πρωτεάση σερίνης TMPRSS (Type II membrane serine proteases) μπορεί να οδηγήσει σε πρωτεολυτική διάσπαση της spike πρωτεΐνης τους και εν τέλει να ενεργοποιήσει τον διαμεσολαβούμενο από τον υποδοχέα σχηματισμό συγκυτίων. Έτσι διερευνήθηκε αν συμβαίνει το ίδιο και με την SARS-CoV-2 S. Πράγματι, η έκφραση αυτών των μεμβρανοσύνδετων πρωτεασών σε κύτταρα που εξέφραζαν και τον υποδοχέα hACE2 ενίσχυσε τη σύντηξή τους με κύτταρα που εξέφραζαν την SARS-CoV-2 S. Για τον ίδιο σκοπό ελέγχθηκε και η δράση της θρυψίνης. Συγκεκριμένα, η προσθήκη θρυψίνης πυροδότησε την δημιουργία συγκυτίων ανάμεσα σε κύτταρα που εκφράζουν τον hACE2 με κύτταρα που εκφράζουν την SARS-CoV S, πράγμα που στην περίπτωση της SARS-CoV-2 S δεν συνέβη καθώς τα κύτταρα που εξέφραζαν την SARS-CoV-2 S και κύτταρα που εξέφραζαν τον hACE2, είτε παρουσία είτε απουσία θρυψίνης, σχημάτιζαν κανονικά συγκύτια. Έτσι, θεωρήθηκε πως οι SARS-CoV-2 S πρωτεΐνες μπορούν να



πυροδοτήσουν τον εξαρτώμενο από τον υποδοχέα και ανεξάρτητο από πρωτεάσες σχηματισμό συγκυτίων κατά τη σύνδεση με τον υποδοχέα χωρίς την ενεργοποίηση ή την προετοιμασία τους από κάποια εξωγενή πρωτεάση. Σε αυτό το σημείο παρατηρείται μία υπερβολή ως προς τη γενίκευση των συμπερασμάτων που διεξήχθησαν καθώς ελέγχθηκε μόνο η προσθήκη θρυψίνης και όχι κάποιας άλλης εξωγενούς πρωτεάσης. Για περαιτέρω διερεύνηση μάλιστα προτείνεται η δράση της furin μιας και η SARS-CoV-2 S, έχει μία περιοχή που αναγνωρίζεται από την εν λόγω πρωτεάση<sup>[1],[4]</sup>.

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στη θερμοκρασία της SARS-CoV-2 S, βρέθηκε ότι σε σχέση με την SARS-CoV S, η SARS-CoV-2 S ήταν λιγότερο σταθερή σε αύξηση της θερμοκρασίας γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση έχει ελαττώσει το ενεργειακό της φράγμα μειώνοντας τη θερμοσταθερότητά της. Ίσως, λοιπόν, με αυτόν τον τρόπο να μπορεί να μεταδίδεται πιο αποτελεσματικά.

Τέλος, δείχθηκε ότι πολυκλωνικά αντισώματα rabbit anti-SARS S1 T62 δεν ανιχνεύουν σε ικανοποιητικό βαθμό την SARS-CoV-2 S και οδηγούν σε φτωχή αναστολή της εισόδου του ιού στα κύτταρα. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι οι κύριοι επίτοποι που αναγνωρίζουν τα αντισώματα T62 πιθανώς βρίσκονται στην περιοχή της RBD (Receptor Binding Domain) της εν λόγω spike πρωτεΐνης. Εξάλλου, υπάρχουν όντως λεπτές αλλά λειτουργικές αλλαγές που ξεχωρίζουν την RBD της SARS-CoV-2 S και της SARS-CoV S βάσει κρυσταλλογραφικών δεδομένων<sup>[3]</sup> και η περιοχή αυτή θα μπορούσε να χρησιμεύσει στην παραγωγή εμβολίων αλλά και αντισωμάτων που να στοχεύουν σε αυτήν. Το παραπάνω συμπέρασμα οδήγησε τους ερευνητές στο να εξετάσουν και αν ο ορός ασθενών που έχουν αναρρώσει από τον SARS-CoV και από την COVID-19 θα μπορούσε να εξουδετερώσει SARS-CoV S και SARS-CoV-2 S συνθετικά ιικά σωματίδια, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα, τελικά, δεν ήταν ενθαρρυντικά καθώς έδειξαν ότι κάποιος που ανάρρωσε από τον ιό SARS-CoV δεν σημαίνει ότι είναι προστατευμένος από την COVID-19 και το αντίστροφο.

Συμπερασματικά, στη συγκεκριμένη μελέτη οι ερευνητές διαπίστωσαν πως ο hACE2 είναι ο υποδοχέας της SARS-CoV-2 S, πως ο ιός εισέρχεται στα κύτταρα κυρίως μέσω ενδοκυττάρωσης, πως οι PIKfyve, TPC2 και cathepsin L αποτελούν κρίσιμες πρωτεΐνες για την είσοδο του ιού και πως η SARS-CoV-2 S είναι λιγότερο σταθερή από την SARS-CoV S. Παράλληλα, βρέθηκε ότι η είσοδος SARS-CoV-2 S συνθετικών ικών σωματιδίων δεν παρεμποδίζεται από πολυκλωνικά anti-SARS S1 αντισώματα και περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ο ορός ασθενών που είχαν αναρρώσει από τον SARS-CoV δεν εξουδετέρωνε την μόλυνση κυττάρων από SARS-CoV-2 S συνθετικά ιικά σωματίδια και το αντίστροφο. Γενικά, πολλά ευρήματα είναι αμφιλεγόμενα και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης<sup>[1],[4]</sup>. Ωστόσο, η πλήρης κατανόηση των μηχανισμών εισόδου του θα μπορέσει να οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στην εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας του ιού χτυπώντας στη ρίζα του προβλήματος<sup>[1],[4]</sup>.

#### Βιβλιογραφία:

Κεντρικό άρθρο:

[1]: Ou, X., Liu, Y., Lei, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* **11**, 1620 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>



Δορυφορικά άρθρα:

[2]: Liang Chen, Xiangjie Li, Mingquan Chen, Yi Feng, Chenglong Xiong, The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2, *Cardiovascular Research*, Volume 116, Issue 6, 1 May 2020, Pages 1097–1100, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa078>

[3]: Shang, J., Ye, G., Shi, K. *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>

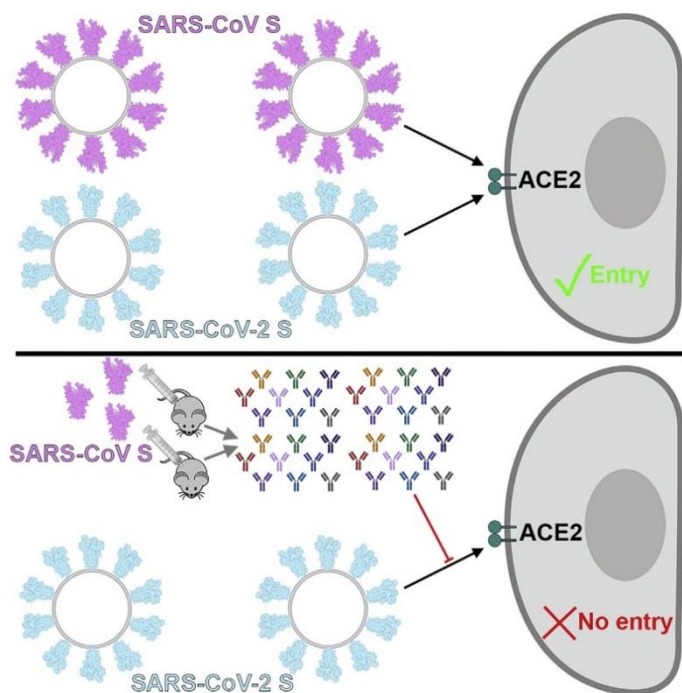
[4]: Lukassen, S., Chua, R. L., Trefzer, T., et al. (2020). SARS -CoV-2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *The EMBO Journal*. doi:10.15252/emj.20105114

Εικόνα 1:

[5]: T. Liu, S. Luo, P. Libby, et al., Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients, *Pharmacology and Therapeutics* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107587>

**Ο μηχανισμός μόλυνσης του SARS-CoV-2 και η μοριακή μηχανή που την καθιστά δυνατή**

Από τον Σαλαμώτα Ηλία  
(Α.Μ.: 1911)



Εικόνα 2 - Οπτική σύνοψη του άρθρου. Ο hACE2 διαμεσολαβεί την είσοδο του SARS-CoV-2 ενώ αντισώματα έναντι του SARS-CoV αναστέλλουν την είσοδο του SARS-CoV-2. Walls, A. C. et al. (Graphical Abstract).

Η πανδημία covid-19 αποτελεί μια ταχέως εξελισσόμενη κατάσταση με επιστημονικές ομάδες να δουλεύουν εντατικώς για την ανακάλυψη ιδιοτήτων του παθογόνου παράγοντα SARS-CoV-2 που θα οδηγήσουν στην αναχαίτιση της πανδημίας. Από νωρίς, και καθώς οι β-κορονοϊοί έχουν προσβάλλει ανθρώπους προκαλώντας επιδημίες στο παρελθόν ο hACE2 αναγνωρίστηκε ως πιθανός στόχος του SARS-CoV-2 καθώς αποτελούσε και στόχο του SARS-CoV. Έτσι ερευνήθηκε γρήγορα το ενδεχόμενο η είσοδος του SARS-CoV-2 στο κύτταρο ,με τη βοήθεια των S γλυκοπρωτεϊνών του, να γίνεται μέσω αυτού του υποδοχέα κάτι που επιβεβαιώθηκε από πολλές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των Letko et al, Hoffman et al και τους συγγραφείς του κυρίως άρθρου που αναλύσαμε, Walls et al. Φυσικά, επόμενος στόχος ήταν η λύση της δομής της κρίσιμης S γλυκοπρωτεΐνης και η ανάλυση της προς εύρεση λειτουργικών περιοχών, που θα αποτελέσουν τους καλύτερους στόχους για πιθανά εμβόλια. Επιπλέον, ο έλεγχος διασταυρούμενης αντιδραστικότητας αντισωμάτων SARS-CoV S έναντι της SARS-CoV-2 S είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε διαγνωστικά τεστ αντισωμάτων αλλά και σε πιθανές θεραπείες με αντισώματα.

Οι επιστήμονες για να αξιολογήσουν την ικανότητα εισόδου του SARS-CoV-2 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές χρησιμοποίησαν ψευδοϊούς που εκφράζουν την πρωτεΐνη

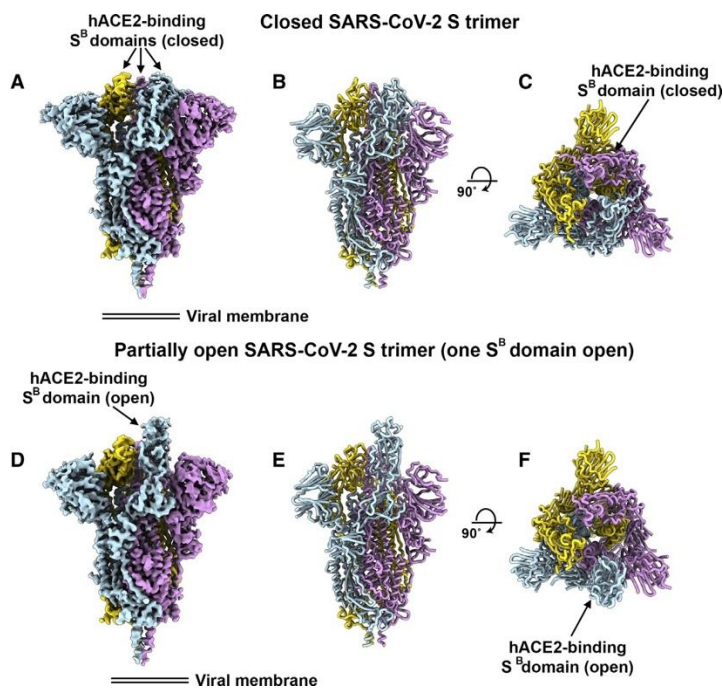
SARS-CoV-2 S. Αρχικό εύρημα της ομάδας των ερευνητών ήταν η επιβεβαίωση της θεωρίας που θέλει τον υποδοχέα αγγειοτενσίνης 2 (hACE2) να αποτελεί την πύλη του SARS-CoV-2 για το κύτταρο. Η οικογένεια των β-κορονοϊών, όπως ο SARS-CoV και SARS-CoV RatG13 είναι γνωστό ότι χρησιμοποιούν υποδοχείς όπως ο hACE2 για προσβολή των κυττάρων του ξενιστή για αυτό και ο hACE2 από νωρίς τέθηκε υπό μελέτη. Η αλληλεπίδραση SARS-CoV-2 – hACE2 έχει καταγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία από τους Hoffman et al, Letko et al και άλλους, και αποτελεί την επικρατούσα θεωρία της στρατηγικής εισόδου του ιού. Πιο συγκεκριμένα, οι Wrapp et al μελέτησαν τη πρόσδεση της S πρωτεΐνης στον hACE2 και βρήκαν ότι συνδέεται με υψηλή συγγένεια. Επιπλέον, οι Letko et al ανέπτυξαν ένα σύστημα γρήγορου ελέγχου της αλληλεπίδρασης της πρωτεϊνικής ακίδας εισόδου β-κορονοϊών με γνωστούς υποδοχείς κορονοϊών. Σε αυτό, η περιοχή αναγνώρισης υποδοχέα (RBD) κάποιου κορονοϊού κλωνοποιείται στην RBD του SARS-CoV με επακόλουθο έλεγχο των χημικών ακίδων ως προς την ικανότητα επαγωγής εισόδου ψευδοϊών. Το σύστημα αυτό, εφάρμοσαν και με την RBD της S πρωτεΐνης του SARS-CoV-2, επιβεβαιώνοντας ότι ο hACE2 είναι ο υποδοχέας του. Πιο πρόσφατες μελέτες, όπως των Ou, X. et al, επίσης υποστηρίζουν αυτό το εύρημα ενώ υποδεικνύουν και άλλα σημαντικά μόρια όπως PIKfyve, TPC2 και καθεψίνη L, ως κρίσιμα για την είσοδο του SARS-CoV-2 στο κύτταρο μέσω ενδοκύττωσης.

Φυσικά, η ομοιότητα πολλών κορονοϊών ως προς την αλληλεπίδραση της γλυκοπρωτεΐνης S τους με τον υποδοχέα, δεν πέρασε απαρατήρητη, με τους ερευνητές να πραγματοποιούν σύγκριση με τον SARS-CoV, έναν ιό που προκάλεσε παλαιότερα σοβαρή επιδημία στους ανθρώπους. Οι ερευνητές, συγκρίνοντας την κινητική πρόσδεσης των SARS-CoV και SARS-CoV-2 S στον hACE2 βρέθηκε ότι έχουν παρόμοια συγγένεια, κάτι που πιθανώς οφείλεται στα πολλαπλά συντηρημένα αμινοξέα μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, τα οποία έχουν μάλιστα αναγνωριστεί ως σημαντικά για την είσοδο των ιών. Βέβαια, οι Wrapp et al χρησιμοποιώντας διαφορετικό σύστημα ελέγχου κινητικής, ανέφεραν ότι η S πρωτεΐνη του SARS-CoV-2 διαθέτει 10-20 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον hACE2 σε σύγκριση με την S πρωτεΐνη του SARS-CoV κάτι που μπορεί να εξηγεί και τη μεγαλύτερη μεταδοτικότητα που έχει παρατηρηθεί μεταξύ ανθρώπων.

Επιπλέον, στη σύγκριση των δύο πρωτεϊνών εντοπίστηκε και μια κύρια διαφορά. Η S πρωτεΐνη του SARS-CoV-2 εμφανίζει μια καινούργια θέση, δράσης φουρίνης. Αυτή η περιοχή δράσης εντοπίστηκε στο όριο των υπομονάδων S1, S2 και οδηγεί στη σχάση της S γλυκοπρωτεΐνης, κατά την επεξεργασία της στο οργανίδιο Golgi. Όταν, με μετάλλαξη της θέσης αυτής, ελέγχθηκε η συνεισφορά αυτής της επεξεργασίας από φουρίνη στην ικανότητα εισόδου του ιού, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι επουσιώδης.

Οι ερευνητές θέλοντας να μελετήσουν τις σημαντικές στην αλληλεπίδραση με hACE2 περιοχές της S γλυκοπρωτεΐνης, επιστράτευσαν κρυογενική-ηλεκτρονική μικροσκοπία. Έτσι, τους δόθηκε η δυνατότητα οπτικοποίησης των διαφορετικών διαμορφώσεων του τριμερούς S κατά τη διαδικασία αναγνώρισης του hACE2 αλλά και ο προσδιορισμός των θέσεων γλυκοζυλίωσης της. Η πρωτεΐνη S βρέθηκε σε δύο διαμορφώσεις, μια με κλειστή και μια με ανοιχτή περιοχή S<sup>B</sup> της S1 υπομονάδας. Η ανοιχτή αυτή διαμόρφωση, επιτρέπει την εμφάνιση μοτίβων σχάσης της S2' περιοχής της S2 υπομονάδας. Η σχάση αυτή εμφανίζει το πεπτίδιο σύντηξης που επιτρέπει την είσοδο του ιού. Αυτό το συμπέρασμα, υποστηρίζεται και από τα

αποτελέσματα των πειραμάτων της ομάδας του D. Wrapp. Το προφίλ γλυκοζυλίωσης της SARS-CoV-2 S που εντοπίστηκε, όταν συγκρίθηκε με αυτό της SARS-CoV S, βρέθηκε εξαιρετικά όμοιο, κάτι που καθιστά πιθανή την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανασταλτικών αντισωμάτων.



**Εικόνα 3 - Η λύση της δομής S γλυκοπρωτεΐνης από cryo-EM μικροσκοπία και οι διαφορετικές διαμορφώσεις που λαμβάνει η S<sup>B</sup> περιοχή για αναγνώριση του hACE2 και σύντηξη του SARS-CoV-2 με κύτταρα ξενιστή. Walls, A. C. et al. (Fig. 3).**

Λόγω των σημαντικών ομοιοτήτων μεταξύ των S ακίδων των SARS-CoV και SARS-CoV-2, οι ερευνητές θέλησαν να ελέγξουν πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα αντισωμάτων SARS-CoV S. Βρέθηκε ότι ορός ποντικών, ανοσοποιημένων κατά της SARS-CoV S αναστέλλει σημαντικά την είσοδο ψευδοϊών. Αποτέλεσμα μερικώς αμφιλεγόμενο, καθώς μελέτες όπως της ομάδας του Zhaohui Qian, βρήκαν ότι πολυκλωνικά αντισώματα SARS-CoV S1 δεν αναστέλλουν την είσοδο ψευδοϊών SARS-CoV-2 S. Επιπλέον βρέθηκε μικρή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα κατά τον έλεγχο ορών από ασθενείς SARS ή νόσο covid-19.

Καθώς η κρίση παγκόσμιας υγείας του covid-19 εξελίσσεται, μελέτες, όπως αυτή της ομάδας του D. Veessler, είναι εξαιρετικά σημαντικές. Η επιβεβαίωση του hACE2 ως υποδοχέα για τον SARS-CoV-2, προσφέρει στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου, καθώς η κατανομή του στους ιστούς διαφέρει. Επιπλέον, επικεντρώνει τις προσπάθειες ερευνητών για τη δημιουργία θεραπειών που στοχεύουν την αλληλεπίδραση SARS-CoV-2 S – hACE2. Η αναγνώριση της νέας θέσης δράσης φουρίνης στην SARS-CoV-2 S παρουσιάζει ενδιαφέρον, ενώ μελέτες θα πρέπει να γίνουν για πιθανή συνεισφορά αυτής της τροποποίησης στην παθογένεια του ιού. Αναγνωρίζοντας τα λειτουργικά σημαντικά κομμάτια της πρωτεϊνικής ακίδας του SARS-CoV-2, καθώς και το μοριακό μηχανισμό ανοίγματός της, γίνεται δυνατή η πιο συγκεντρωμένη προσέγγιση στη δημιουργία αντισωμάτων κατά αυτών των λειτουργικών

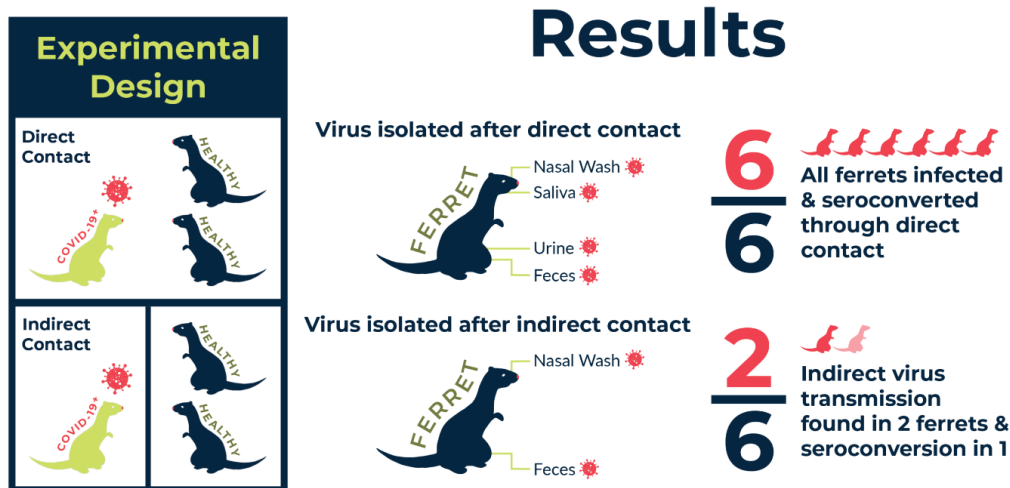
δομών. Το εύρημα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας αντισωμάτων SARS-CoV, αν και παρουσιάζει ενδιαφέρον, δεν υποστηρίζεται αρκετά στη βιβλιογραφία, έτσι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για σχηματισμό πλήρους εικόνας.

#### Βιβλιογραφία

1. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271-280.e8 (2020).
2. Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 562–569 (2020).
3. Ou, X. et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* 11, 1620 (2020).
4. Walls, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181, 281-292.e6 (2020).
5. Wrapp, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260–1263 (2020).

## *SARS-CoV-2: Ο πανταχού παρών ιός που λατρεύει τις κοινωνικές επαφές*

Από τον Σωματάκη Στέφανο  
(Α.Μ.: 1917)



**Εικόνα 1:** Ταχεία, άμεση και καθολική μόλυνση από SARS-CoV-2 παρατηρείται σε νυφίτσες μετά από άμεση επαφή με μολυσμένη νυφίτσα. Αντίθετα, σε περίπτωση μόλυνσης μέσω του αέρα, μόνο ένα ποσοστό των ζώων μολύνεται από τον ιό.

Ο νέος κορωνοϊός SARS-CoV-2 είναι η νέα υγειονομική απειλή για τον πλανήτη, αφού μέσα σε τρεις μήνες άφησε πίσω του περισσότερους από 400.000 νεκρούς <sup>[1]</sup>. Ο ταχύτατος ρυθμός με τον οποίο μπορεί να μεταδίδεται, σε συνδυασμό με την εκπληκτική του προσαρμοστικότητα <sup>[2]</sup>, έχει ρίξει τους επιστήμονες στο πεδίο της μάχης για την άμεση και αποτελεσματική καταπολέμησή του. Οι κορωνοϊοί είναι μια κατηγορία μονόκλωνων RNA ιών, που έχουν την ικανότητα να μεταλλάσσονται και να ανασυνδυάζονται ταχύτατα. Ο SARS-CoV-2 είναι ένας β κορωνοϊός, που συγγενεύει στενά με τον SARS-CoV, ο οποίος ήταν η αιτία μιας αντίστοιχης επιδημίας τα έτη 2002-3 <sup>[2]</sup>. Ο SARS-CoV-2 αναγνωρίζει και συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στο ανθρώπινο ένζυμο hACE2 των πνευμονικών κυττάρων <sup>[3][4]</sup>, όπως αποδεικνύεται από τη σύγκριση των receptor-binding motifs (RBM) των SARS-CoV και SARS-CoV-2 <sup>[2]</sup>. Φαίνεται εξάλλου ότι προέρχεται από μεταλλαγμένο ιό νυχτερίδων που πέρασε στον άνθρωπο μέσω ενός ενδιάμεσου ξενιστή <sup>[2][4][5]</sup>. Όπως και ο SARS-CoV, ο SARS ξεκίνησε την επέλασή του, χρησιμοποιώντας ένα ζώο ως ενδιάμεσο ξενιστή <sup>[2]</sup>. Αρθρογραφώντας στο *Cell Host & Microbe*, οι Kim *et al.* καταδεικνύουν <sup>[6]</sup>, μέσω του σχεδιασμού ενός έξυπνου και συνάμα περιεκτικού πειράματος, την ανάγκη ύπαρξης ενός αποτελεσματικού μοντέλου ζώου, τόσο για τη μελέτη των κλινικών συμπτωμάτων που ο ιός προκαλεί, όσο και για την ανάπτυξη προληπτικής χορήγησης φαρμάκων και εμβολίων.

Η ανακάλυψη ότι οι νυφίτσες αποτελούν ένα σπουδαίο μοντέλο για την μελέτη της μετάδοσης των ιών που προκαλούν λοιμώξεις του αναπνευστικού <sup>[6]</sup>, αλλά και των ιών της γρίπης<sup>[6]</sup>, αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα για την ομάδα των Kim *et al.*, ώστε να πραγματοποιήσουν πρωτότυπες μελέτες πάνω στους τρόπους μετάδοσης του SARS-CoV-2. Μολύνοντας νυφίτσες με ενδορρινική χορήγηση ενός στελέχους του SARS-CoV-2, οι επιστήμονες αξιολόγησαν τα κλινικά συμπτώματα και την αναπαραγωγή του ιού στους ιστούς των ζώων. Έτσι, τα εν λόγω ζώα, αλλά και ζώα, τα οποία ήρθαν σε άμεση επαφή με αυτά, παρουσίασαν πυρετό και συμπτώματα μειωμένης κινητικότητας. Ανάλογα συμπτώματα με αυτά που εμφανίζονται σε μολυσμένες νυφίτσες έχουν παρατηρηθεί και στους προσβεβλημένους από SARS-CoV-2 ανθρώπους. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, αυτά ενδέχεται να είναι αρκετά βαρύτερα <sup>[7][8][9]</sup>.

Σε επόμενο στάδιο μελέτης των τρόπων μόλυνσης, οι επιστήμονες προσομοίωσαν τον τρόπο έμμεσης επαφής των μολυσμένων ζώων, προσθέτοντας ένα χώρισμα μεταξύ των κλουβιών μιας άμεσα μολυσμένης νυφίτσας και των υπολοίπων μη μολυσμένων ζώων. Το χώρισμα επέτρεπε την ελεύθερη κυκλοφορία του αέρα μεταξύ των κλουβιών. Ως επακόλουθο, παρατηρήθηκε μόλυνση και σε αυτή την ομάδα ζώων, αλλά δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση πυρετού ή άλλων συμπτωμάτων. Αυτή είναι μάλιστα μια πρώτη ένδειξη, ότι απαιτείται κυρίως άμεση επαφή μεταξύ των μολυσμένων ατόμων για τη μετάδοση του ιού.

Εκτός από τα κλινικά συμπτώματα, οι Kim *et al.* αξιολόγησαν το ιικό φορτίο μετρώντας τα επίπεδα του ιικού RNA της πρωτεΐνης ακίδας (spike protein) του ιού, (που αναγνωρίζει και συνδέεται με το hACE2) <sup>[3][4]</sup> σε εκκρίματα από τις νυφίτσες. Μελετήθηκαν δείγματα: α) αίματος (ορός), β) ρινικών επιχρισμάτων, γ) σιέλου, δ) ούρων, καθώς και ε) κοπράνων, αφού είναι γνωστό ότι ο SARS-CoV-2 προκαλεί προβλήματα και στη γαστρεντερική οδό, μεταξύ άλλων <sup>[9]</sup>. Βέβαια, στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλά και διαφορετικά συμπτώματα που μπορεί να προκαλεί ο συγκεκριμένος ιός, με πιο σημαντικά αυτά της αναπνευστικής οδού <sup>[5][6][7][8]</sup>. Με τη μέθοδο της RT-PCR (qPCR), δημιουργήθηκε το cDNA του RNA της πρωτεΐνης ακίδας του ιού και πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τον αριθμό των αντιγράφων RNA σε νυφίτσες που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου. Έτσι, ιικό RNA εντοπίστηκε στην πλειοψηφία των επιμολυσμένων ζώων δύο ημέρες μετά την επιμόλυνση. Παρομοίως, στις νυφίτσες που ήρθαν σε άμεση επαφή με τις επιμολυσμένες, εντοπίστηκε ιικό RNA δύο ημέρες μετά την επαφή. Σε αμφοτέρους τις περιπτώσεις τα επίπεδα RNA ήταν τα υψηλότερα στα δείγματα από τα ρινικά επιχρίσματα.

Όσον αφορά τις νυφίτσες που ήρθαν σε έμμεση επαφή με τις επιμολυσμένες, παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα ιικού RNA σε σχέση με τις επιμολυσμένες, αλλά και με τις μολυσμένες από άμεση επαφή. Αξιοσημείωτο είναι ότι μόνο κάποιες από αυτές μολύνθηκαν από τον ιό. Συνολικά, 10 ημέρες μετά από τη μόλυνση, καθόλου RNA δεν ανιχνεύθηκε στα ζώα, τα οποία επανήλθαν στην φυσιολογική τους κατάσταση, χωρίς να σημειωθεί κανένας θάνατος.

Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα των αρθρογράφων είναι ο εντοπισμός του SARS-CoV-2 σε υγιείς νυφίτσες, οι οποίες επιμολύνθηκαν με δείγματα από νυφίτσες που είχαν μολυνθεί από τον ιό σε προηγούμενο στάδιο. Μετά από φυγοκέντρηση, υπερκείμενα από δείγματα ούρων και κοπράνων και των τριών ομάδων των ζώων εμβολιάστηκαν σε άλλες νυφίτσες. Τα



αποτελέσματα έδειξαν ότι κάποια από τα ζώα φάνηκαν να είναι μολυσμένα. Επίσης, είναι άξιο να αναφερθεί ότι σε νυφίτσες που εμβολιάστηκαν με δείγμα από τις έμμεσα μολυσμένες νυφίτσες, δεν ανιχνεύθηκε παρουσία του ιού.

Πόσο πολύ «διδεισδύει» ο ιός στα διάφορα όργανα του ζώου; Νυφίτσες που επιμολύνθηκαν με τον SARS-CoV-2 θυσιάστηκαν, με σκοπό τη μελέτη του ιικού φορτίου. Αντίγραφα του RNA του ιού εντοπίστηκαν στις ρινικές τους κόγχες, στην τραχεία, στους πνεύμονες, αλλά και στους νεφρούς και στα έντερά τους.

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της αναπαραγωγής του SARS-CoV-2 στις νυφίτσες, η επιστημονική ομάδα πραγματοποίησε δοκιμασίες ανοσοϊστοχημείας, χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την παρουσία των ιικών αντιγράφων RNA, αφού το αντίσωμα εντοπίστηκε σε κύτταρα των ρινικών κογχών, της τραχείας, του πνεύμονα και τμημάτων του εντέρου των μολυσμένων ζώων. Επιπρόσθετα, ιστολογική εξέταση των πνευμόνων των ζώων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτά έπασχαν από οξεία βρογχιολίτιδα, ως απόρροια της μόλυνσης από τον SARS-CoV-2.

Εν κατακλείδι, οι Kim *et al.* χρησιμοποιούν τη νυφίτσα ως ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη του νέου κορωνοϊού SARS-CoV-2. Μολύνοντας ζώα άμεσα και έμμεσα και μελετώντας ιικά RNA στους ιστούς, καταφέρνουν να συνοψίσουν τους τρόπους μετάδοσης του ιού σε ένα θηλαστικό, το οποίο αποτελεί ένα από τα πλέον αξιόπιστα μοντέλα για τη διερεύνηση της μετάδοσης αυτού του τύπου των ιών. Από την πολύπλευρη αυτή μελέτη προκύπτει ότι ο SARS-CoV-2 μπορεί να μεταδοθεί είτε μέσω άμεσης επαφής ή μέσω του αέρα. Εντούτοις, όπως διαφαίνεται και από την έρευνα σε έμμεσα μολυσμένες νυφίτσες, η αερογενής μετάδοση φαίνεται να είναι πιθανή, αλλά όχι τόσο ισχυρή όσο η άμεση.

Η σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων έγκειται στο γεγονός ότι τα ευρήματα για τις νυφίτσες μοιάζουν με εκείνα που παρατηρούνται σε ιχθυηλάτσειες επαφών σε προσβεβλημένους από τον ιό ανθρώπους. Επομένως, το συγκεκριμένο ζώο θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη φαρμάκων και εμβολίων εναντίον του SARS-CoV-2 <sup>[6][10]</sup>. Περιορισμοί ωστόσο υπάρχουν πάντα, αλλά στη συγκεκριμένη μελέτη αφορούν κυρίως τα ηπιότερα συμπτώματα που παρουσιάζουν οι μολυσμένες νυφίτσες, σε αντίθεση με τη συμπτωματολογία που έχει περιγραφεί στον άνθρωπο <sup>[7][8][9]</sup>. Δυστυχώς, ούτε και ο χρόνος στέκεται σύμμαχος, καθότι μελέτη έχει δείξει ότι υπάρχουν συγκεκριμένα αμινοξέα, που, αν υποστούν μετάλλαξη, ο ιός ενδέχεται να προσδένεται στον υποδοχέα του με ακόμη μεγαλύτερη συγγένεια <sup>[2]</sup>. Άλλωστε, η επιστημονική κοινότητα βρίσκεται ήδη σε συνεχή επαγρύπνηση για την επόμενη μέρα, αφού είναι καίριας σημασίας να αξιοποιηθούν μοντέλα ζώων για την ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων και εμβολίων, βασιζόμενη στη μεγάλη ομολογία του γονιδιώματος του SARS-CoV-2 με άλλους «SARS-like» ιούς νυχτερίδων και άλλων θηλαστικών <sup>[2][5][10]</sup>.

#### Βιβλιογραφία

1. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard, World Health Organization, <https://covid19.who.int/>, Accessed Jun 9, 2020
2. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. & Li, F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol* **94**, e00127-20, /jvi/94/7/JVI.00127-20.atom (2020).

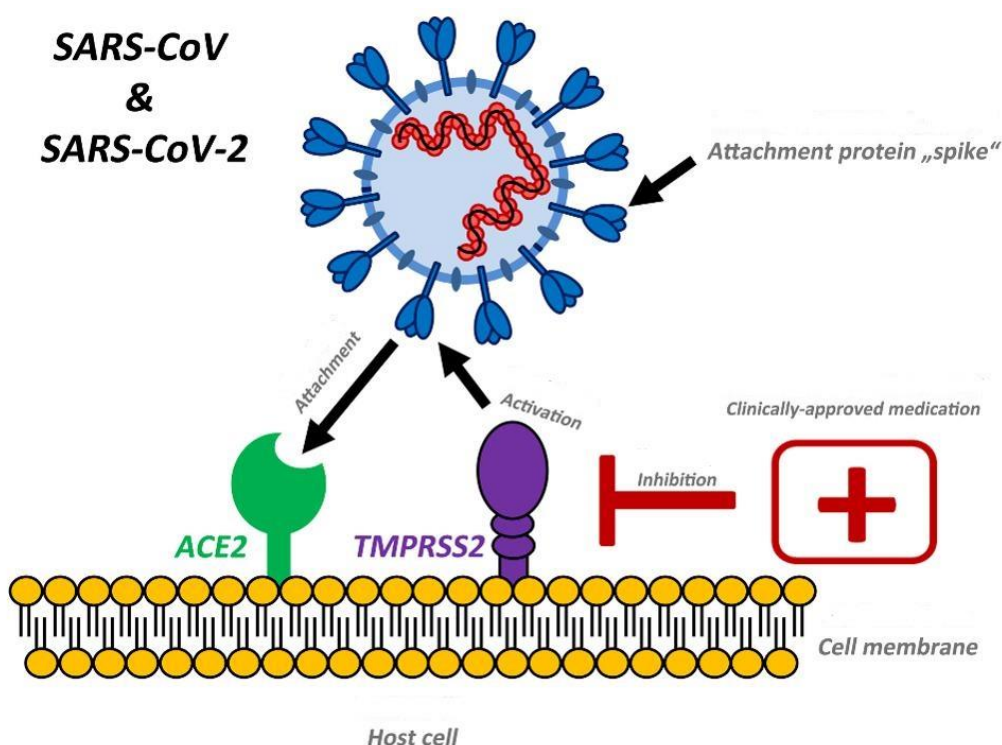


3. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
4. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
5. Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N. & Siddique, R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research* **24**, 91–98 (2020).
6. Kim, Y.-I. *et al.* Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host & Microbe* **27**, 704-709.e2 (2020).
7. Chan, J. F.-W. *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet* **395**, 514–523 (2020).
8. Guo, Y.-R. *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Med Res* **7**, 11 (2020).
9. Lin, L. *et al.* Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. *Gut* **69**, 997–1001 (2020).
10. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C. & Garry, R. F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* **26**, 450–452 (2020).

Πηγή εικόνας: Researchers Advance the Ferret Model for SARS-CoV-2, Posted April 13, 2020, NIAID CEIRS | Research Publication Commentary  
(<http://www.niaidceirs.org/news/2020/04/researchers-advance-the-ferret-model-for-sars-cov-2/>)

*Μηχανισμός εισόδου στα κύτταρα στόχους στο αναπνευστικό σύστημα του νέου Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 και αναπάντεχες θεραπευτικές προοπτικές*

Από τον Τάντη-Ταπεινό Δημήτρη  
(Α.Μ.: 1919)



**Εικόνα 1:** Ο SARS-CoV-2 αλληλοεπιδρά με σημαντικά στοιχεία της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων στόχων μέσω της πρωτεΐνης ‘‘ακίδας’’ S. Το ACE-2 λειτουργεί ως υποδοχέας ενώ η TMPRSS2 διαμεσολαβεί την πραγματοποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας της πρωτεΐνης ‘‘ακίδας’’ S με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της τελευταίας και την τελική είσοδο στα κύτταρα στόχους. Ενώσεις όπως το comostat mesylate που αποτελούν αναστολείς της TMPRSS2 επιδεικνύουν αντιϊική δράση.

**Υπόμνημα:**

ACE-2: Angiotensin-converting enzyme 2

TMPRSS2: Transmembrane protease, serine 2

HA: Hemagglutinin

VSV: Vesicular stomatitis virus

CatB/L: cysteine proteases cathepsin B and L

Replication-deficient VSV pseudotypes (ψευδοϊοί VSV απουσία ικανότητας αντιγραφής): Τεχνητά ιικά σωματίδια ιού VSV που φέρουν στην επιφάνεια τους και πρωτεΐνες επιφανείας ξένων ιών (εδώ SARS-2-S και SARS-S) δίχως να έχουν την δυνατότητα παραγωγής ορισμένων κρίσιμων δικών τους, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ανικανότητα επανειλημμένων μολύνσεων κυττάρων και πολλαπλασιασμού.

Ο ιός SARS-CoV-2 εμφανίστηκε στα τέλη του 2019 στην Wuhan στην Κίνα και προκαλεί την ασθένεια του αναπνευστικού συστήματος, COVID-19. Η γρήγορη εξάπλωσή του, τον έχει πλέον οδηγήσει σε επίπεδο πανδημίας καθιστώντας τον αίτιο παγκόσμιας υγειονομικής κρίσης. Συγκεκριμένα, ο ιός αυτός ανήκει στο γένος β της οικογένειας των κοροναϊών, δηλαδή ομάδας ιών με θετικής πολικότητας RNA για γονιδίωμα και λιποπρωτεϊνικό έλυτρο για στήριξη πρωτεϊνών ‘‘ακίδων’’ S, οι οποίες συμμετέχουν στην διαδικασία εισόδου στα κύτταρα στόχους<sup>[1]</sup>. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι εμφανίζει την μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ομοιότητα, δηλαδή 87,99 % και 87,23 %, με τους ιούς νυχτερίδας bat-SL-CoVZC45 και bat-SL-CoVZXC21, αντίστοιχα<sup>[2]</sup>. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι οι νυχτερίδες αποτελούν τον πρωτότυπο ξενιστή και ότι κάποιο άγνωστο ζώο, το οποίο ήταν προς πώληση σε αγορά τροφίμων της Wuhan, αποτελεί τον ενδιάμεσο ξενιστή, λόγω της αρχικής τοπικής εξάρσης<sup>[3]</sup>. Τα παραπάνω γεγονότα έχουν στρέψει την επιστημονική κοινότητα στην μελέτη του νέου αυτού ιού. Αρθρογραφώντας στο ‘‘Cell’’, ο Hoffmann και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ότι ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί το ACE-2 για υποδοχέα και την TMPRSS2 για πρωτεολυτική επεξεργασία της πρωτεΐνης ‘‘ακίδας’’ S με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της τελευταίας και την τελική είσοδο στα κύτταρα στόχους. Εκτός αυτών, ανακάλυψαν ότι το comostat mesylate και τα αντισώματα ασθενών έναντι της SARS-S εμφανίζουν αντιϊκή δράση εμποδίζοντας την διαμεσολαβούμενη από την SARS-2-S είσοδο στα κύτταρα στόχους<sup>[10]</sup>. Η παραπάνω έρευνα είναι πρωτοποριακή καθώς είναι η πρώτη που ανέδειξε ένα εμπειριστατωμένο μηχανισμό εισόδου στα κύτταρα στόχους του SARS-CoV-2 ενώ παρουσιάζει ενθαρρυντικά στοιχεία για αντιϊκή δράση ορισμένων μορίων.

Ο Hoffmann και οι συνεργάτες του αρχικά, δεδομένου ότι η SARS-2-S και SARS-S εμφανίζουν αμινοξική αλληλουχιακή ομοιότητα ~ 76 % καθώς και του γεγονότος ότι η τελευταία χρησιμοποιεί το ACE-2 για υποδοχέα και την TMPRSS2 για πρωτεολυτική ενεργοποίηση κατά την διαδικασία της εισόδου στα κύτταρα στόχους, ερεύνησαν αν παρόμοιος μηχανισμός λαμβάνει χώρα και στην πρωτεΐνη SARS-2-S<sup>[4], [5]</sup>. Κύτταρα 293T (Homo sapiens, νεφρό) διαμολύνθηκαν αρχικά με φορέα κλωνοποίησης για την έκφραση HA tagged-C terminal-SARS-2-S και υπέστησαν μεταγωγή τελικά με ψευδοϊούς VSV οι οποίοι είχαν κατασκευαστεί με την SARS-2-S στο έλυτρο τους και στην συνέχεια αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western και παρατηρήθηκε η κατάσταση της SARS-2-S μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού (πρωτογενές αντίσωμα mouse anti-HA tag, δευτερογενές αντίσωμα goat anti-mouse, peroxidase conjugated). Παρατηρήθηκαν μπάντες με μοριακά βάρη τα οποία αναμένονταν για την πρωτεολυτικά μη επεξεργασμένη SARS-2-S (S0) και για την μετά από πρωτεολυτική επεξεργασία υπομονάδα S2 (S2). Αυτό σημαίνει ότι η πρωτεολυτική επεξεργασία της SARS-2-S λαμβάνει χώρα στην περιοχή κατάτμησης S1/S2 και σχετίζεται πιθανότατα με την έντονη παρουσία καταλοίπων αργινίνης

Δεδομένου του παρόμοιου μηχανισμού εισόδου, κατεύθυναν τις προσπάθειες τους στην εύρεση των κυττάρων τα οποία θα αποτελούσαν στόχο του SARS-CoV-2 με στόχο την εξαγωγή συμπερασμάτων για το είδος του υποδοχέα. Διακριτοί ψευδοϊοί VSV οι οποίοι είχαν κατασκευαστεί με την SARS-S και την SARS-2-S στο έλυτρο τους, αντίστοιχα, συνδυάστηκαν

ξεχωριστά με πληθώρα κυττάρων ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης. Παρατηρήθηκε ότι το ίδιο φάσμα κυττάρων στόχων ήταν ευάλωτο στην διαμεσολαβούμενη από την SARS-S και την SARS-2-S είσοδο. Αυτό σημαίνει ότι πιθανότατα χρησιμοποιείται ο ίδιος υποδοχέας.

Δεδομένης της ένδειξης για χρήση ίδιου υποδοχέα και του γεγονότος ότι το RBM της SARS-2-S φέρει διατηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα απαραίτητα για την αλληλεπίδραση της SARS-S με το ACE-2, κατεύθυναν τις προσπάθειες τους στην επιβεβαίωση της χρήσης του τελευταίου ως υποδοχέα. Κύτταρα BHK-21 (*Mesocricetus auratus*, νεφρό) διαμολύνθηκαν με φορέα κλωνοποίησης για την έκφραση hACE-2 και στην συνέχεια υπέστησαν μεταγωγή με ψευδοϊούς VSV οι οποίοι είχαν κατασκευαστεί με την SARS-2-S στο έλυτρο τους. Παρατηρήθηκε ότι ήταν πλέον δυνατή η διαμεσολαβούμενη από την SARS-2-S είσοδος. Αυτό σημαίνει ότι το hACE-2 αποτελεί τον υποδοχέα του SARS-CoV-2 <sup>[6]</sup>. Το παραπάνω επιβεβαιώνεται και από την έρευνα του Wang και των συνεργατών του, όπου παρατηρήθηκε η συνύπαρξη των χμιαϊκών πρωτεϊνών SARS-CoV-2-S1-mFc και SARS-CoV-2-CTD-mFc με κύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί με φορέα κλωνοποίησης pEGFP-N1-hACE-2<sup>[7]</sup>.

Δεδομένου του παρόμοιου μηχανισμού εισόδου, κατεύθυναν τις προσπάθειες τους στην εύρεση της εξάρτησης της εισόδου στα κύτταρα στόχους από την πρωτεολυτική επεξεργασία μέσω της TMPRSS2. Κύτταρα Vero (*Chlorocebus sabaeus*, νεφρό), δίχως έκφραση TMPRSS2, υπέστησαν μεταγωγή με ψευδοϊούς VSV οι οποίοι είχαν κατασκευαστεί με την SARS-2-S στο έλυτρο τους ωστόσο προηγουμένως είχε πραγματοποιηθεί προσθήκη E-64d προς αναστολή της εναλλακτικής της TMPRSS2, CatB/L. Παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της διαμεσολαβούμενης από την SARS-2-S εισόδου ενώ η μεταγενέστερη κατευθυνόμενη έκφραση TMPRSS2 διέσωσε την κατάσταση επιτρέποντας την διαμεσολαβούμενη από την SARS-2-S είσοδο. Αυτό σημαίνει ότι η TMPRSS2 αποτελεί τον πρωτεολυτικό ενεργοποιητή της SARS-2-S. Το παραπάνω επιβεβαιώθηκε και από την έρευνα του Matsuyama και των συνεργατών του, όπου στα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα VeroE6/TMPRSS2 ιδιαίτερα μεγαλύτερος αριθμός είχε μολυνθεί με SARS-CoV-2 σε σχέση με τα μητρικά κύτταρα VeroE6<sup>[8]</sup>. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι το μόριο comostat mesylate, το οποίο αποτελεί αναστολέα της TMPRSS2, εμποδίζει την διαμεσολαβούμενη από SARS-2-S είσοδο σε κύτταρα Caco-2 (*Homo sapiens*, παχύ έντερο), με έκφραση TMPRSS2. Αυτό σημαίνει ότι το μόριο comostat mesylate μπορεί να περιορίσει την μόλυνση από τον SARS-CoV-2.

Ο Hoffmann και οι συνεργάτες του τελικά, δεδομένου ότι η SARS-2-S και SARS-S εμφανίζουν αμινοξική αλληλουχιακή ομοιότητα ~76 %, ερευνήσαν αν αντισώματα έναντι της SARS-S θα εμπόδιζαν την διαμεσολαβούμενη από την SARS-2-S είσοδο στα κύτταρά στόχους. Παρατηρήθηκε αναστολή της διαμεσολαβούμενης από την SARS-2-S εισόδου, σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων, σε μικρότερο ωστόσο βαθμό σε σχέση με την διαμεσολαβούμενη από την SARS-S είσοδο. Αυτό σημαίνει ότι η ανοσολογική απόκριση έναντι του SARS-CoV μπορεί να περιορίσει την μόλυνση από τον SARS-CoV-2.

Συνολικά δείχθηκε ότι τα μόρια ACE-2 και TMPRSS2 είναι αναγκαία και ικανά ώστε να αποτελέσουν τον υποδοχέα και τον πρωτεολυτικό ενεργοποιητή του SARS-CoV-2, αντίστοιχα. Οι ερευνητές κατέληξαν και σε πολλά ερωτήματα τα οποία χρήζουν μελλοντικής έρευνας για την πλήρη διαλεύκανσή τους. Δεν είναι γνωστό αν ο SARS-CoV-2 αναστέλλει

την έκφραση του ACE-2 στα κύτταρα στόχους όπως ο SARS-CoV. Επιπλέον, η αναγκαιότητα, της ύπαρξης της περιοχής κατάτμησης S1/S2, πλούσιας σε αργινίνη, για την είσοδο του SARS-CoV-2 στα κύτταρα στόχους, δεν είναι επιβεβαιωμένη. Βασική προέκταση της έρευνας αυτής είναι η διασαφήνιση του αν αναστολείς της TMPRSS2 μπορούν να λειτουργήσουν θεραπευτικά. Προς τον στόχο αυτόν περαιτέρω κλινικές δοκιμές είναι απαραίτητες. Ένα πεδίο εντονότερης διαφωνίας αποτελεί η δράση αντισωμάτων, τα οποία αποτελούν μέρος της ανοσολογικής απόκρισης έναντι του SARS-CoV, στον SARS-CoV-2. Αντίθετα με τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας, ο Wang και οι συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα από τρωκτικά έναντι της SARS-S1 και του SARS-RBD, παρατήρησαν ανικανότητα αλληλεπίδρασης με κύτταρα τα οποία εξέφραζαν SARS-2-S<sup>[7]</sup>. Παρατηρούνται λοιπόν διαφορές στην ικανότητα αλληλεπίδρασης διαφορετικών αντισωμάτων, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στο ότι χρησιμοποιούν διαφορετικούς επιτόπους με διαφορετικό επίπεδο αμινοξικής αλληλουχιακής ομοιότητας μεταξύ των SARS-2-S και SARS-S. Συγκριμένα στην έρευνα του Wang και των συνεργατών του χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα, από τρωκτικά, έναντι επιτόπων της S1, ενώ στην έρευνα του Hoffmann και των συνεργατών του χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα, από ορό ασθενών, έναντι πολλαπλών επιτόπων. Υποσχόμενα φαίνεται να είναι και τα ανθρώπινα χμιαρικά αντισώματα<sup>[9]</sup>. Συνολικά η ποικιλία διαφορετικών δεδομένων στο θέμα αυτό σημαίνει ότι απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την διασαφήνιση της θεραπευτικής δράσης των αντισωμάτων.

### **Βιβλιογραφία**

- [1]: Guzzi, P. H., Mercatelli, D., Ceraolo, C. & Giorgi, F. M. Master Regulator Analysis of the SARS-CoV-2/Human Interactome. *JCM* **9**, 982 (2020).
- [2]: Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**, 727–733 (2020).
- [3]: Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* **395**, 565–574 (2020).
- [4]: Glowacka, I. *et al.* Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *Journal of Virology* **85**, 4122–4134 (2011).
- [5]: Matsuyama, S. *et al.* Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2. *JVI* **84**, 12658–12664 (2010).
- [6]: Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
- [7]: Wang, Q. *et al.* Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* **181**, 894-904.e9 (2020).
- [8]: Matsuyama, S. *et al.* Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 7001–7003 (2020).
- [9]: Wang, C. *et al.* A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* **11**, 2251 (2020).
- [10]: Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).

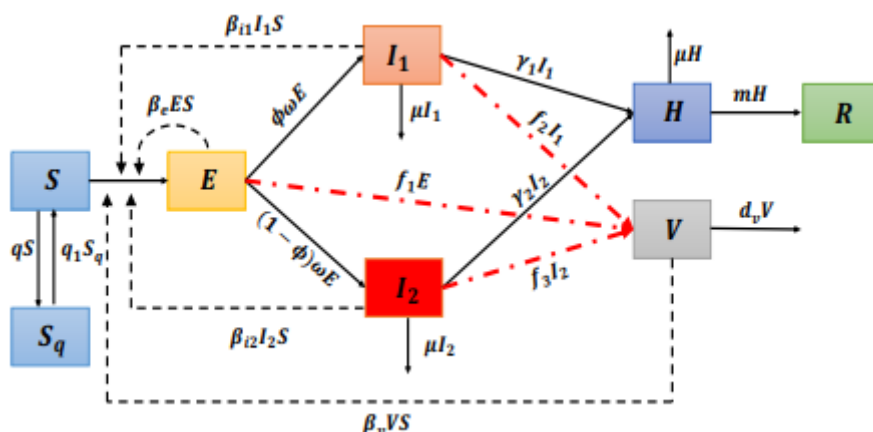
Πηγή Εικόνας: Preventing Spread of SARS Coronavirus-2 in Humans, posted March6th,2020, GERMAN PRIMATE CENTER.

(<https://www.labmanager.com/news/preventing-spread-of-sars-coronavirus-2-in-humans-21942>)

## Χρειάζονται προληπτικά μέτρα ή δεν χρειάζονται, ιδού η απορία

(To need prevention measures or not to need, that is the question)

Από την Τζήμα Χρυσούλα  
(Α.Μ.: 1920)



**Εικόνα 4:** Απεικόνιση μαθηματικού μοντέλου της μετάδοσης του ιού SARS-CoV-2. Τα βέλη υποδεικνύουν τους ρυθμούς μετάπτωσης από μία κατάσταση σε κάποια άλλη, ενώ τα κόκκινα βέλη επισημαίνουν τις πιθανές εισροές του ιού από το περιβάλλον [από τα εκτεθειμένα (E) και τα μεταδοτικά/συμπτωματικά άτομα (I1,I2)] (S: πιθανά κρούσματα, Sq: πιθανά κρούσματα που απομονώθηκαν (quarantine), E: εκτεθειμένα άτομα, I1: μεταδοτικά άτομα με άμεση διάγνωση, I2: μεταδοτικά άτομα με καθυστέρηση διάγνωσης, H: νοσηλευμένα άτομα, R: άτομα που ανάρρωσαν, V: ιός, q,q1: οι ρυθμοί μετάπτωσης από τη φάση S στην Sq και αντίστροφα, 1/ω: η περίοδος επώασης, φ: το ποσοστό των συμπτωματικών ατόμων που θα διαγνωστούν εγκαίρως, 1/γ1, 1/γ2: οι μέρες που απαιτούνται για να υποχωρήσει η μεταδοτικότητα σε εγκαίρως διαγνωσμένα και μη άτομα αντίστοιχα με 1/γ1 < 1/γ2, m: ρυθμός ανάρρωσης ασθενών, μ: death rate κάθε μόλυνσης (I1, I2, H), fi: ο ρυθμός που μπαίνει ο ιός από το περιβάλλον, dv: ο ρυθμός με τον οποίο ο ιός εξαφανίζεται από το περιβάλλον) [τα χρώματα δεν έχουν κάποιο επιστημονικό νόημα, απλά διευκολύνουν την απεικόνιση] (Xinmiao et al., 2020)

**Γιατί τέτοια βιασύνη κατά την εμφάνιση ενός νέου ιού? Γιατί οι επιστήμονες “τρέχουν” να αποκωδικοποιήσουν τα μυστικά του? Τι θα τους προσφέρει αυτή η νέα γνώση? Η απάντηση είναι απλή: επιθυμούν να προβλέψουν τις “κινήσεις” του ιού, όπως ένας καλός σκακιστής, ώστε με τα κατάλληλα μέτρα την κατάλληλη στιγμή να τον νικήσουν. Και όταν γνωρίζεις τον αντίπαλό σου κάτι τέτοιο καθίσταται πιο εύκολο. Καθώς, όμως, κατά την εμφάνισή του δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα, οι επιστήμονες καταφεύγουν σε μοντέλα ιών της ίδιας οικογένειας, ώστε να μελετήσουν την μεταδοτικότητά του, η οποία αποτελεί σημείο-κλειδί για την αντιμετώπιση και τον περιορισμό του.**

Κατά το ξέσπασμα της επιδημίας στην πόλη της Wuhan στην Κίνα τον Δεκέμβριο του 2019, ολόκληρη η επιστημονική κοινότητα έσπευσε να μελετήσει και να ταυτοποιήσει τον νέο ιό που προκαλούσε πνευμονία. Η μελέτη της εξάπλωσης του ιού, καθώς και ο τρόπος μετάδοσής του ήταν οι κατεπείγοντες στόχοι, ώστε να ληφθούν μέτρα για την προστασία του πληθυσμού.



Μία από τις μελέτες εκείνη την περίοδο, λαμβάνοντας δεδομένα για το διάστημα 10 έως 24 Ιανουαρίου της πόλης Wuhan, προσδιόρισε τον βασικό αναπαραγωγικό ρυθμό ( $R_0$ )<sup>1</sup> βασιζόμενη σε μοντέλο εκθετικής αύξησης (exponential growth model). Οι εκτιμήσεις του  $R_0$  προέκυψαν από διάφορα σενάρια αύξησης του ρυθμού μετάδοσης του ιού 2019-nCoV (8-fold, 4-fold, 2-fold, 1-fold, 0,5-fold και 0-fold (χωρίς αλλαγή)) [1]. Λόγω των περιορισμένων δεδομένων και γνώσεων περί τον 2019-nCoV, οι συγγραφείς έπρεπε να πραγματοποιήσουν συσχετίσεις με παρόμοιους ιούς (MERS, SARS) και να οδηγηθούν σε υποθέσεις και αποτελέσματα, βασιζόμενοι σε ήδη υπάρχουσα γνώση αυτών των ιών.

Η αρχική εικόνα των δεδομένων που κλήθηκαν να χειριστούν υποδείκνυε εκθετική ανάπτυξη του ιού. Υπολογίστηκε πως ο βασικός αναπαραγωγικός ρυθμός ( $R_0$ ) κυμαίνεται μεταξύ 2.24 και 5.71, συσχετισμένος με 8-fold έως 0-fold αύξηση στο ρυθμό μετάδοσης. Εφόσον ο  $R_0$  είναι μεγαλύτερος του 1, ο 2019-nCoV έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει εξάρσεις [1]. Όσο υψηλότερο είναι το  $R_0$ , τόσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός μετάδοσης και τόσο μεγαλύτερη είναι η περίοδος μόλυνσης.

Επιπλέον μελέτες έχουν υποστηρίξει αυτό το εύρημα. Με διαφορετικές προσεγγίσεις, όλες οι μελέτες εκτιμούν ότι  $R_0 > 1$ . Πιο συγκεκριμένα, ο  $R_0$  κυμαίνεται από 2 έως 5 [1], κοντά στο 3 [2], από 2.24 έως 3.58 [3], ενώ σε review article αναφέρονται ως εκτιμώμενες τιμές οι 2.2 ή 1.4-2.5 ή 3.77 [4].

Οι προσεγγίσεις που πραγματοποιήθηκαν από τους ερευνητές για την εκτίμηση του  $R_0$  με το μοντέλο εκθετικής αύξησης, προϋπέθετε την γνώση του serial interval (SI)<sup>2</sup> του 2019-nCoV, το οποίο δεν ήταν ακόμη γνωστό. Ελλείπει βασικών στοιχείων, έγινε η παραδοχή πως τα SI των MERS και SARS είναι κατά προσέγγιση παρόμοια με αυτό του νέου ιού, έτσι ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα μετάδοσής του. Για το λόγο αυτό, μπορεί τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης να μην θεωρούνται 100% αξιόπιστα, όμως παρέχουν μία σημαντική γνώση, γιατί, ακόμα και αν οι αριθμοί δεν επαληθευθούν, η έξαρση του 2019-nCoV που προβλέπουν είναι πολύ πιθανή.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία, ο  $R_0$  έχει προσδιοριστεί μέσω μαθηματικών μοντέλων ([2],[5]), του μοντέλου susceptible – infectious - recovered framework (SIRf)(μοντέλο που εξετάζει τις επιδράσεις διαφόρων μεταβλητών στην μετάδοση του SARS-CoV-2 σε ευάλωτο τμήμα του πλυθισμού)[6], του μοντέλου inference framework [7] και του μοντέλου Euler-Lotka equation [8]. Ανεξαρτήτως της μεθόδου εκτίμησης που πραγματοποιήθηκε, υπήρξε ομοφωνία όσον αφορά τον επιδημικό χαρακτήρα του νέου ιού. Αυτή η παρατήρηση συναίνει στο γεγονός πως η προσέγγιση των προηγούμενων ερευνητών ([1]) ήταν επιστημονικά αποδεκτή.

Ως συνέπεια των προαναφερθέντων, η πλειονότητα των ερευνητών συμφωνεί πως ο SARS-CoV-2 βρίσκεται σε επιδημική φάση [4]. Η εξάπλωση του ιού παγκοσμίως είναι πραγματικότητα, σύμφωνα με τους Chih-Cheng et al., 2020. Στο σημείο αυτό ανακύπτει και ένα ακόμα πρόβλημα, το οποίο συσχετίζει τη διάγνωση του ιού με τη μεταδοτικότητά του: η καθυστέρηση στη διάγνωση του ιού οδηγεί σε αυξημένη μεταδοτικότητα, με συνέπεια την έξαρση της ασθένειας [2].

<sup>1</sup> **Basic reproduction number:** A metric used in epidemiology, which corresponds to the mean number of new cases of infection linked to a person infected shortly after the pathogen was introduced into a population with no pre-existing immunity, in absence of interventions to control the infection. (<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Basic+reproduction+number>)

<sup>2</sup> **Serial Interval:** the period of time between analogous phases of an infectious illness in successive cases of a chain of infection that is spread from person to person (<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/serial+interval>)

Οι μελέτες που παρατίθενται στο παραπάνω κείμενο υπογραμμίζουν κάποια βασικά συμπεράσματα. Ο βασικός αναπαραγωγικός ρυθμός ( $R_0$ ) του νέου ιού 2019-nCoV εκτιμήθηκε με διάφορες μεθόδους και σε κάθε περίπτωση υποδείκνυε έξαρση του ιού ( $R_0 > 1$ ). Η έξαρση του συσχετίστηκε και με την καθυστέρηση της διάγνωσής του. Όταν ο WHO έδωσε στη δημοσιότητα το επίσημο διαγνωστικό πρωτόκολλο (17/01/2020), περισσότερες μολύνσεις εντοπίστηκαν και καταγράφηκαν. [1]

Καθώς η αξιοπιστία των παρόντων αποτελεσμάτων θα θεωρηθεί αμφισβητήσιμη, κρίνεται αναγκαίο να επισημανθεί πως ακόμα και η παραμικρή ένδειξη ραγδαίας εξάπλωσης ενός νέου ιού καθίσταται αφορμή για λήψη μέτρων και περαιτέρω έρευνα. Συνεπώς η σπουδαιότητα αυτών των ευρημάτων δεν μπορεί να αμφισβητηθεί. Σε αυτό το πλαίσιο σκέψης, η διάγνωση, όπως και η ευχέρεια της μετάδοσης του 2019-nCoV αποτελούν αξιόπιστα εργαλεία κατά την κατάστροφη μιας στρατηγικής αντιμετώπισης όσον αφορά την έγκαιρη λήψη μέτρων.

Οι αρχικές προβλέψεις και εκτιμήσεις επαληθεύτηκαν, καθώς ο ιός προκάλεσε πανδημία και μεταδόθηκε σε όλη την υφήλιο. Έξι μήνες μετά την εμφάνιση του νέου κορωνοϊού, οι γνώσεις όσον αφορά την μεταδοτικότητά του έχουν πολλαπλασιαστεί. Η διάγνωσή του έχει απλοποιηθεί και τα προληπτικά μέτρα προστασίας αποτελούν μέρος της καθημερινότητας της πλειονότητας των πολιτών.

**Note added in proof:** Μια μελέτη που δημοσιεύθηκε πρόσφατα στο περιοδικό BioMed Research International έδειξε ότι αν και τα μέτρα πρόληψης που πάρθηκαν κατέστειλαν την μεταδοτικότητα του COVID-19, ο  $R_0$  παραμένει μεγαλύτερος του 1. [9]

#### **Βιβλιογραφία**

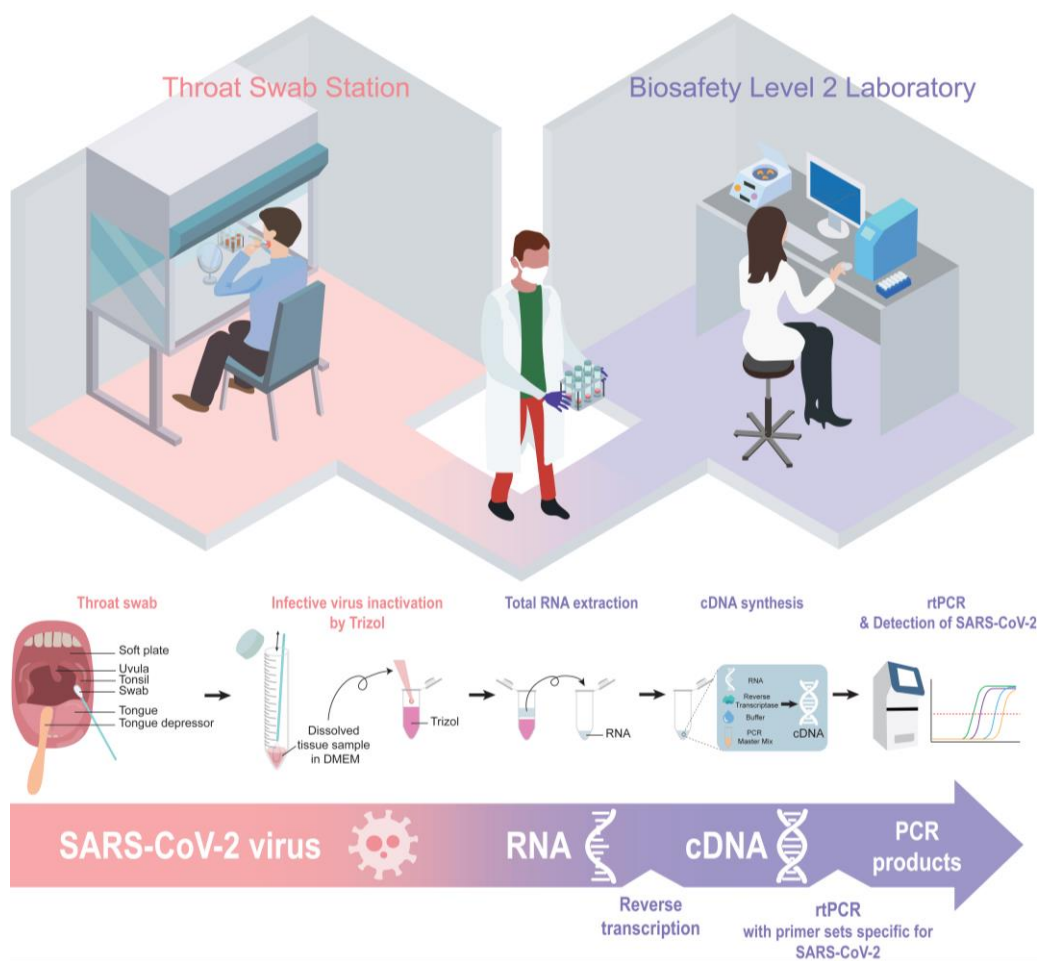
- 1) Zhao S. *et al. International Journal of Infectious Diseases* 92, 214-217 (2020)
- 2) Xinmiao R. *et al. MBE*, 17, 2725–2740 (2020)
- 3) Chih-Cheng L. *et al. International Journal of Antimicrobial Agents* 55, 105924 (2020)
- 4) She J. *et al. J Med Virol.*, 1-8 (2020)
- 5) Ferretti L. *et al. Science* 368, 6936 (2020)
- 6) Lourenço S. *et al. medrxiv* (preprint) (2020)
- 7) Li R. *et al. Science* 368, 489–493 (2020)
- 8) Park S. W. *et al. medrxiv* (preprint) (2020)
- 9) Zhao Y. *et al. BioMed Research International* 2020, 3842470 (2020)



**Ενότητα 2: Τα διαγνωστικά εργαλεία που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2**

*Πως ένα χαμηλού κόστους πρωτόκολλο μπορεί να οδηγήσει στην ασφαλή ανίχνευση του SARS-CoV-2*

Από την Κουτεντάκη Γεωργία  
(Α.Μ.: 1709)



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου που προτείνεται για τον εντοπισμό του SARS-CoV-2.

Η εύρεση ενός αποτελεσματικού τρόπου για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 υπήρξε μία μεγάλη πρόκληση για τον επιστημονικό κόσμο. Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει την εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου, το οποίο είναι φθινό και εκτελείται με ασφάλεια από το εργαστηριακό δυναμικό. Στηρίζεται σε απλές διαδικασίες και σε εφαρμογές/μεθόδους γνωστές κι ιδιαίτερα διαδεδομένες στην επιστημονική κοινότητα (εξαγωγή RNA, μετατροπή RNA σε ανασυνδυασμένο DNA και PCR πραγματικού χρόνου). Προτείνει μία σειρά βημάτων που εξασφαλίζουν την προστασία του εργαστηριακού προσωπικού, καθώς και ένα χαμηλό συνολικό κόστος, καθιστώντας την αντίστοιχη εξέταση προσιτή στον οποιοδήποτε. Διευκρινίζεται πως εξυπηρετεί στην ορθή διάγνωση των αρνητικών κι όχι των θετικών δειγμάτων.

Ο ιός SARS-CoV-2, που εμφανίστηκε στα τέλη του 2019 στην Κίνα, εξαπλώθηκε ταχύτατα σε αρκετές χώρες, προκαλώντας την κήρυξη πανδημίας. Οι διαρκώς αυξανόμενοι αριθμοί τόσο των κρουσμάτων όσο και των θανάτων έκαναν επιτακτική την ανάγκη εύρεσης αξιόπιστων μεθόδων και τεστ ανίχνευσης του ιού. Οι ερευνητές της παρούσας μελέτης στόχευσαν στη διαμόρφωση ενός τέτοιου τεστ, στηριζόμενοι σε ένα απλό και κατανοητό πρωτόκολλο (Won J. *et al.*, 2020). Κύριος άξονάς του είναι η διασφάλιση της υγείας των εργαζομένων που το διεκπεραιώνουν, σε συνδυασμό με όσο το δυνατόν μικρότερο συνολικό κόστος.

Σε αυτή τη μελέτη, οι ερευνητές στόχευσαν στην ανάπτυξη ενός γρήγορου, οικονομικού, έγκυρου και ασφαλούς πρωτοκόλλου για τον έλεγχο ασυμπτωματικών ατόμων και την ανίχνευση του SARS-CoV-2. Το πρωτόκολλο αυτό χαρακτηρίζεται από την εύκολη συλλογή δειγμάτων από τους ίδιους τους εθελοντές μέσω φαρυγγικού επιχρίσματος, μειώνοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις τους με το προσωπικό του εργαστηρίου και, επομένως, τον κίνδυνο μετάδοσης του ιού. Έπειτα, γίνεται αδρανοποίηση του ιού στα δείγματα και εξαγωγή του ιικού RNA. Ο εντοπισμός του SARS-CoV-2 βασίζεται σε PCR πραγματικού χρόνου (rtPCR). Επομένως, για την εκτέλεση της rtPCR, έγινε μετατροπή του RNA σε cDNA. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για τον SARS-CoV-2, οι οποίοι και επιλέχθηκαν μετά από έλεγχο ως οι πιο κατάλληλοι, έχοντας ως θετικό control αντίστοιχο υλικό κυττάρων μολυσμένα με τον ιό. Προστέθηκαν, επίσης, και εκκινητές ειδικοί για ανθρώπινο RNA που χρησίμευσαν ως εσωτερικό control, ενισχύοντας την εγκυρότητα των αρνητικών αποτελεσμάτων.

Η παρούσα έρευνα στηρίχθηκε στα εργαλεία που ήταν διαθέσιμα έως τότε για την ανίχνευση του SARS-CoV-2. Τα εργαλεία αυτά βασίζονται στην ανίχνευση του RNA με την τεχνική της rtPCR μέσω μετατροπής του RNA σε cDNA. Η ανίχνευση του ιού με την τεχνική αυτή φαίνεται να υποστηρίζεται, καθώς χρησιμοποιείται και σε άλλες μελέτες για τον εντοπισμό του SARS-CoV-2 (Liu R. *et al.*, 2020, Pan Y. *et al.*, 2020, Long C. *et al.*, 2020).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιείται από τους ίδιους τους εξεταζόμενους, σύμφωνα με τις οδηγίες των ερευνητών. Μετά τη λήψη, γίνεται αδρανοποίηση του ιού με την προσθήκη TRIzol, οπότε και τα δείγματα είναι ασφαλή για χειρισμό χωρίς τον κίνδυνο μόλυνσης. Σε μία άλλη σχετική μελέτη αναφέρεται θερμική αδρανοποίηση μέσω επώασης σε νερό στους 56°C (Pan Y. *et al.*, 2020).

Σημεία-κλειδιά του πειράματος αποτελούν η εξαγωγή του ιικού RNA με την προσθήκη του TRIzol και η εκτέλεση της rtPCR με χρήση χρωστικής SYBRGreen αντί για την πιο διαδεδομένη Taqman, εξασφαλίζοντας, έτσι, χαμηλότερο κόστος. Οι Pan Y. *et al.* πραγματοποίησαν την εξαγωγή RNA με χρήση του QIAamp Viral RNA Mini Kit, ενώ, αντί για την SYBRGreen, εκτέλεσαν την rtPCR προσθέτοντας το TaqMan Master Mix. Το RNA που εξήχθη χρησιμοποιώντας TRIzol βρέθηκε σχεδόν εξίσου καλό ποιοτικά όσο κι εκείνο των εμπορικών kit που χρησιμοποιούνται στην κλινική διάγνωση.

Οι ερευνητές, κατά τη διάρκεια της μελέτης, διαπίστωσαν ότι κάποιοι από τους εκκινητές που χρησιμοποίησαν, τους οποίους προτείνει το πρωτόκολλο του CDC για την

ανίχνευση του SARS-CoV-2, δεν είναι αξιόπιστοι, καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αρνητική διάγνωση. Ο ισχυρισμός αυτός, ωστόσο, δεν φαίνεται να υποστηρίζεται ή να διαψεύδεται στις άλλες μελέτες αφού δεν αναφέρεται κάτι σχετικό.

Τα περισσότερα από τα συνολικά 12 δείγματα των εθελοντών διαγνώστηκαν αρνητικά στον SARS-CoV-2. Από αυτά, 3 έδωσαν ασαφή αποτελέσματα, τα οποία μετά από επανεξέταση επιβεβαιώθηκαν ομοίως ως αρνητικά. Το συνολικό κόστος υπολογίστηκε γύρω στα 15 \$, μη λαμβάνοντας υπόψη το κόστος εργασίας, ενώ η συνολική διάρκεια εκτέλεσης του πρωτοκόλλου εκτιμήθηκε περίπου στις 4 ώρες.

Πρωταρχικός στόχος των ερευνητών, για την ανάπτυξη αυτού του πρωτοκόλλου, ήταν να επικεντρωθούν στον καθορισμό του αρνητικού ατόμου (απουσία SARS-CoV-2), αντί του θετικού (παρουσία SARS-CoV-2). Με αυτόν τον τρόπο, ένα αρνητικό άτομο θα μπορεί να εκτελεί τις καθημερινές του δραστηριότητες ελεύθερα, ενώ για ένα θετικό άτομο συνιστάται η περαιτέρω διάγνωση με πιστοποιημένα διαγνωστικά kit. Προτείνουν τη χρήση του πρωτοκόλλου, εκτός από τον ίδιο αυτό, και για τον εντοπισμό οποιουδήποτε μελλοντικού πανδημικού ιού. Χάρη στην απλότητα και στην ασφάλεια που το χαρακτηρίζουν, μπορεί να εκτελεστεί κι από εργαστήρια με συμβατικό εξοπλισμό. Ωστόσο, τονίζεται ότι δεν αποτελεί ασφαλή τρόπο για την διάγνωση των θετικών ούτε αντικαθιστά τη διάγνωση που τελείται από τους αρμόδιους στα πλαίσια κλινικής εξέτασης.

Αν και πρόκειται για μία αξιόλογη μελέτη που παρουσιάζει ένα αξιόπιστο πρωτόκολλο με προοπτικές, εντοπίζονται μερικές αδυναμίες, με σημαντικότερη το πλήθος των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Σαφώς και τα αποτελέσματα των ερευνητών θα ήταν πιο ισχυρά αν το πλήθος των εθελοντών που συμμετείχαν ήταν μεγαλύτερο, ώστε να έχουν περισσότερα δείγματα και επομένως στατιστικά πιο υπολογίσιμα συμπεράσματα.

Εκτός από την rtPCR, υπάρχουν κι άλλες τεχνικές-μέθοδοι που έχουν προταθεί για την ανίχνευση του SARS-CoV-2. Σύμφωνα με την μελέτη των Long C. *et al.* (2020), κατά την οποία έγινε σύγκριση της rtPCR και της υπολογιστικής (αξονικής) τομογραφίας (CT), η εξέταση CT προέκυψε πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση του ιού. Ωστόσο, δεν απορρίπτει την χρήση της rtPCR, αλλά προτείνει τον συνδυασμό των δύο μεθόδων για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις ασθενών με συμπτωματολογία του ιού και αντίστοιχα αποτελέσματα CT που δεν διαγνώστηκαν θετικοί (Wang Y. *et al.*, 2020).

Εν κατακλείδι, οι ερευνητές κατάφεραν να αναπτύξουν ένα πρωτόκολλο ασφαλές, οικονομικό και υψηλής ευαισθησίας, που με την εφαρμογή του είναι εφικτή η εξακρίβωση των υγείων ατόμων. Αν και υπάρχουν περιορισμοί, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την επιστημονική κοινότητα κι έναν σημαντικό οδηγό για τη διαμόρφωση και την εξέλιξη σχετικών τεστ για την όσο το δυνατόν πιο έγκαιρη αλλά και έγκυρη ανίχνευση του ιού.

### **Note added in proof**

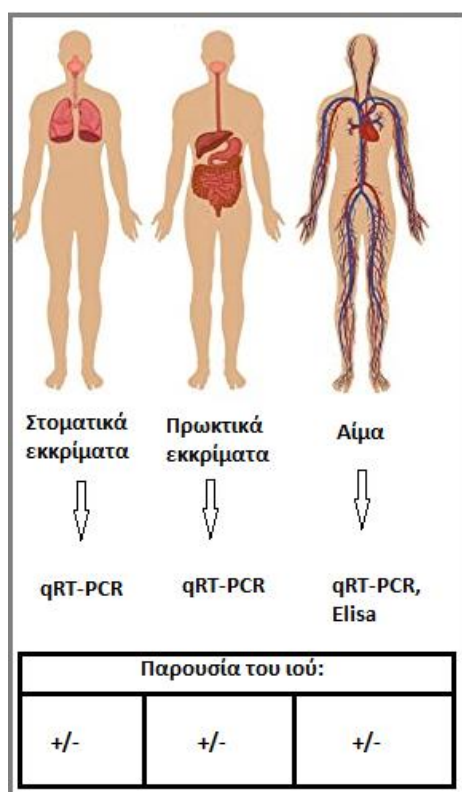
Μια μελέτη που δημοσιεύθηκε πρόσφατα από τους Wehrhahn C. M. *et al.* στο περιοδικό *Journal of Clinical Virology* υποστήριξε τη συλλογή των δειγμάτων από τους ίδιους τους εξεταζόμενους, ως έναν εναλλακτικό τρόπο δειγματοληψίας που περιορίζει την έκθεση των εργαζομένων στον ιό και, άρα, τον κίνδυνο μόλυνσης.

### **Βιβλιογραφία**

- Won J. *et al.* *Exp. Neurobiol.* **29**, 107-119 (2020).  
Liu R. *et al.* *Clin. Chim. Acta.* **505**, 172-175 (2020).  
Pan Y. *et al.* *Clin. Chem.* **66**, 794-801 (2020).  
Long C. *et al.* *Eu. J. Radiol.* **126**, 108961 (2020).  
Wang Y. *et al.* *J. Med. Virol.* **92**, 538-539 (2020).  
Wehrhahn C. M. *et al.* *J. Clin. Virol.* **128**, 104417 (2020).

*Αντιμετώπιση της πανδημίας -  
Αποτελεσματική διάγνωση κρουσμάτων κορωνοϊού*

Από τον Λέντζαρη Παναγιώτη  
(Α.Μ.: 1881)



Εικόνα 1- Παρουσιάζονται τα διαφορετικά δείγματα ασθενών που λήφθηκαν, καθώς και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό του ιού (qRT-PCR – προσδιορισμός ιικού RNA, Elisa-προσδιορισμός ειδικών ανοσοσφαιρινών). Ακόμα γίνεται εμφανής η δυνητική αναξιοπιστία των τεστ στα παραπάνω δείγματα, αφού η παρουσία του ιού μπορεί να ανιχνευτεί ή όχι (+/-).

Η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση ενός πιθανώς προσβεβλημένου ατόμου από τον νέο κορωνοϊό (SARS-CoV-2), μπορεί να συμβάλει στον περιορισμό της εξάπλωσης της νόσου και τελικά στην αντιμετώπιση της πανδημίας, που πλήττει τις περισσότερες χώρες παγκοσμίως. Όμως, η πολυπόθητη αυτή διάγνωση των μολυσμένων ατόμων, έχει δημιουργήσει πλήθος ερωτημάτων τόσο στην επιστημονική κοινότητα όσο και στο ευρύ κοινό, με κυριότερα να είναι: «Ποιο τεστ είναι καλύτερο να χρησιμοποιηθεί, ανάλογα με το χρόνο πιθανής μόλυνσης;», «Τί είδους εκκρίματα να ληφθούν από τον πιθανό ασθενή;», «Απαιτείται συνδυασμός διαγνωστικών τεστ για επιβεβαίωση του αποτελέσματος;». Όλα τα παραπάνω ερωτήματα, είναι δυνατόν να απαντηθούν μελετώντας τα ευρήματα της πρωτοποριακής επιστημονικής μελέτης με τίτλο : “Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes”[1]. Ενδιαφέρον μάλιστα παρουσιάζει, πως η συγκεκριμένη μελέτη ήταν από τις πρώτες που τόνισαν την απαίτηση συνδυασμού διαγνωστικών τεστ, απορρίπτοντας ταυτόχρονα την μέχρι τότε άποψη ότι ο ιός περιορίζεται στην μόλυνση μόνο του αναπνευστικού συστήματος.

Η μελέτη που εξετάζεται επικεντρώθηκε στην απόδειξη πως ο SARS-CoV-2 δεν μολύνει μόνο το αναπνευστικό σύστημα, αλλά και επιπλέον συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Ακόμα απέδειξε ότι ο ιός δεν μένει στάσιμος σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Για να εξάγουν τα συμπεράσματά τους, οι ερευνητές πραγματοποίησαν δύο ξεχωριστές επιμέρους μελέτες.

Για κάθε μελέτη λήφθηκαν δείγματα διαφορετικών ασθενών (που είχαν θετικά σε ιικό RNA εκκρίματα και βρίσκονταν υπό θεραπευτική αγωγή) ενός πνευμονολογικού νοσοκομείου στην Γουχάν. Από τους ασθενείς απομονώθηκαν: στοματικά εκκρίματα, πρωκτικά εκκρίματα και δείγματα αίματος, όπως παρουσιάζεται στην «Εικόνα 1». Ακόμα, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: η qRT-PCR για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του ιικού RNA και η Elisa (από kit) για τον προσδιορισμό των ειδικών ανοσοσφαιρινών. Μάλιστα για να μπορέσουν να κάνουν συγκρίσεις οι ερευνητές, η δεύτερη μελέτη επαναλήφθηκε δύο φορές, με μεσοδιάστημα 5 ημερών.

Μέσω της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας οι ερευνητές απέδειξαν αρχικά πως ο κορωνοϊός δεν περιορίζεται στο να μολύνει μόνο το αναπνευστικό σύστημα. Πιο ειδικά εντοπίστηκε ιικό RNA εκτός των στοματικών εκκρίσεων, στο αίμα καθώς και στα κόπρανα. Δηλαδή διαπίστωσαν ότι ο ιός προσβάλλει ποικίλα συστήματα. Μάλιστα το εύρημα αυτό αποδείχθηκε και από μεταγενέστερες μελέτες, όπως η μελέτη των Wang, W. et al [2]. Η εν λόγω εργασία επικεντρώθηκε στην απόδειξη – με την μέθοδο της rRT-PCR- πως το ιικό RNA μπορεί να εντοπιστεί σε δείγματα ποικίλων περιοχών του σώματος όπως πτύελα, εκκρίματα του κατώτερου αναπνευστικού, κόπρανα, ρινικά εκκρίματα και αίμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μάλιστα πως στο συγκεκριμένο άρθρο, γίνεται αναφορά στην μελέτη που εξετάζουμε, κάτι που αναμφίβολα δείχνει την πρωτοπορία και την απήχηση που εμφανίζει η τελευταία στην επιστημονική κοινότητα.

Μια άλλη πολύ σημαντική παρατήρηση των ερευνητών ήταν ότι, ιικό RNA είναι δυνατόν να εντοπιστεί σε κόπρανα και αίμα, ενώ ταυτόχρονα να μην εντοπίζεται σε στοματικά εκκρίματα ( «Εικόνα 1»)- παρουσία ιού: +/-). Η σημασία αυτής, έγκειται στην ανεξέλεκτη μετάδοση της νόσου από ασθενή, που ενώ «φάνηκε» αρνητικός σε τεστ στοματικών εκκρίματων, πάσχει. Έτσι οι ερευνητές πρότειναν την χρήση συνδυασμού διαγνωστικών τεστ, αφού ο ιός είναι δυνατόν να αποκρύπτεται σε δείγματα άλλης περιοχής του σώματος. Μάλιστα, και το συγκεκριμένο εύρημα αποδείχθηκε σε επόμενες μελέτες, κάτι που υπογραμμίζει την ορθότητα αυτού. Πιο ειδικά στα άρθρα των Xie, X. et al [3] και των Xu, X. et al [4], μελετώνται περιπτώσεις που τα τεστ για ιικό RNA σε εκκρίματα ήταν αρνητικά, ενώ μια άλλη τεχνική- η αξονική τομογραφία θώρακος (Computed Tomography - CT) -έδειξε σημάδια μόλυνσης από τον ιό. Επίσης οι έρευνες αυτές έδειξαν πως ακόμα και αν ο ασθενής δεν έχει κλινική εικόνα νοσούντος, αν από το ιστορικό του είναι πιθανό να έχει μολυνθεί, είναι απαραίτητο να ελεγχθεί με συνδυασμό διαγνωστικών τεστ, αφού ο ιός είναι δυνατόν να υποκρύπτεται.

Σχετικά με τις ειδικές ανοσοσφαιρίνες (IgM και IgG) στο αίμα, οι ερευνητές διαπίστωσαν πως αποτελούν ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο. Πιο ειδικά παρατήρησαν ότι η συγκέντρωσή τους γενικά αυξάνεται με την πάροδο της νόσου. Η μεταβολή αυτή όμως, έρχεται σε αντίθεση με εκείνη της ποσότητας ιικού RNA στα εκκρίματα, η οποία μειώνεται

(παρατηρήθηκε επίσης μια μετατόπιση από τα στοματικά προς τα πρωκτικά εκκρίματα, κατά την πρόοδο της νόσου).

Από όλα τα παραπάνω ευρήματα, είναι πλέον σαφής η σπουδαιότητα της συγκεκριμένης μελέτης στο πεδίο της διάγνωσης της νόσου του νέου κορωνοϊού (SARS-CoV-2). Μάλιστα η διαπίστωση πιθανότητας ύπαρξης ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος για ιικό RNA σε στοματικά εκκρίματα ξεχωρίζει, λόγω των συνεπειών αυτού στην περαιτέρω εξάπλωση της νόσου. Έτσι απαιτείται συνδυασμός τεστ. Μπορεί να περιλαμβάνει έλεγχο για ιικό RNA σε άλλα εκκρίματα, έλεγχο στον ορό του αίματος για παρουσία ή μη ανοσοσφαιρινών ή και απεικονιστικές τεχνικές όπως η αξονική θώρακος.

Φυσικά, υπάρχουν και ορισμένοι περιορισμοί, που θα ήταν παράληψη να μην αναφερθούν. Αρχικά, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις δύο επιμέρους έρευνες προς εξαγωγή συμπερασμάτων, ήταν από μόλις 15 και 16 άτομα, κάτι που είναι πιθανόν να οδηγήσει στην εξαγωγή μη καθολικών συμπερασμάτων. Ακόμα όλα τα άτομα ήταν υπό θεραπευτική αγωγή και είχαν εκκρίματα θετικά σε ιικό RNA, κάτι που δείχνει περιορισμένη ποικιλία αρχικού δείγματος. Ταυτόχρονα δεν λήφθηκε υπόψη ούτε το φύλο ούτε η ηλικία των ατόμων. Τέλος, δεν επισημάνθηκε από τους ερευνητές ένας περιορισμός που εμφανίζει η ανίχνευση του ιού μέσω της τεχνικής qRT-PCR, λόγω της αστάθειας και της υψηλής συχνότητας ανασυνδυασμού του ιικού RNA [5].

Παρά τους παραπάνω περιορισμούς, επιτεύχθηκε η διεξαγωγή ορθών αποτελεσμάτων, όπως φαίνεται μετά την σύγκριση με την βιβλιογραφία. Μάλιστα σε γενικές γραμμές παρατηρείται ομοφωνία απόψεων. Πέραν των τριών άρθρων που παρατέθηκαν παραπάνω και τεκμηριώνουν μεγάλο μέρος των ευρημάτων της μελέτης, επιβεβαιώνεται και το εύρημα σχετικά με την μεταβολή της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών IgG, IgM με την πρόοδο της νόσου. Πιο ειδικά μια νεότερη μελέτη [6] απέδειξε ότι η συγκέντρωσή τους αυξάνεται, αποτελώντας δυνητικά ένα διαγνωστικό εργαλείο της νόσου. Η ίδια μάλιστα μελέτη [6] επιβεβαιώνει πως η ποσότητα του ιικού RNA μειώνεται με την πρόοδο της νόσου. Σχετικά με την μετακίνηση του ιού στον πεπτικό σωλήνα, δεν εντοπίστηκε κάποια έρευνα στην βιβλιογραφία που να το τεκμηριώνει με καθολικότητα. Μια μελέτη βέβαια έδειξε ότι βρέθηκαν θετικά δείγματα κοπράνων για το ιικό RNA ενώ τα στοματοφαρυγγικά δείγματα είχαν γίνει αρνητικά, αλλά δεν ήταν δυνατόν να εκφραστεί με βεβαιότητα η εν λόγω μετακίνηση [7]. Τέλος, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την ανάγκη για επιπλέον διερεύνηση, όπως των Yeo et al., 2020 [8].

**Note added in proof:** Μια μελέτη [9] που δημοσιεύθηκε πρόσφατα στο περιοδικό “European Review for Medical and Pharmacological Sciences”, επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι ο ιός προσβάλλει ποικίλες περιοχές του ανθρώπινου οργανισμού, με μια εναλλακτική μάλιστα προσέγγιση. Πιο ειδικά, απομονώθηκαν δείγματα πνεύμονα, νεφρού και καρδιάς, από θανόντες ασθενείς κορωνοϊού, τα οποία μελετήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης και σάρωσης (TEM και SEM αντίστοιχα). Τα ευρήματα επιβεβαίωσαν την παρουσία του ιού και στα 3 δείγματα, δείχνοντας ότι ο ιός προσβάλλει κύτταρα οργάνων ποικίλων περιοχών του οργανισμού.



**Βιβλιογραφία:**

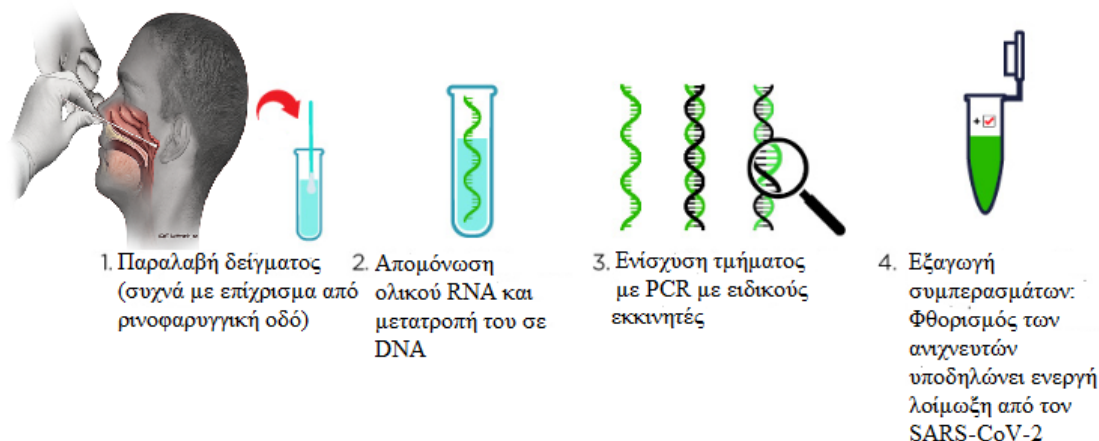
- [1] Zhang, W. *et al.* Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging Microbes & Infections* **9**, 386–389 (2020).
- [2] Wang, W. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* (2020) doi:[10.1001/jama.2020.3786](https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786).
- [3] Xie, X. *et al.* Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology* 200343 (2020) doi:[10.1148/radiol.2020200343](https://doi.org/10.1148/radiol.2020200343).
- [4] Xu, X. *et al.* Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **47**, 1275–1280 (2020).
- [5] Zhong, J. F., Weiner, L. P., Burke, K. & Taylor, C. R. Viral RNA extraction for in-the-field analysis. *Journal of Virological Methods* **144**, 98–102 (2007).
- [6] Juanjuan Zhao, Quan Yuan, *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019, *Clinical Infectious Diseases* **344**, (2020).
- [7] Bonato, G., Dioscoridi, L. & Mutignani, M. Faecal-oral transmission of SARS-COV-2: practical implications. *Gastroenterology* S0016508520304492 (2020) doi:[10.1053/j.gastro.2020.03.066](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.066).
- [8] Yeo, C., Kaushal, S. & Yeo, D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal–oral transmission of SARS-CoV-2 possible? *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **5**, 335–337 (2020).
- [9] Pesaresi, M. *et al.* SARS-CoV-2 identification in lungs, heart and kidney specimens by transmission and scanning electron microscopy. 3.

## Μοριακή διάγνωση στην πρώτη γραμμή ενάντια στον κορωνοϊό

Από την Νότη Δέσποινα  
(Α.Μ.: 1896)

### Μοριακή εξέταση ( Ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος)

Διάγνωση λοίμωξης από τον SARS-CoV-2



**Εικόνα 5:** Πορεία βημάτων που ακολουθείται κατά την εξέταση δειγμάτων για μόλυνση από τον SARS-CoV-2. Το τμήμα DNA στόχος (RNA πολυμεράση/ελικάση) ενισχύεται με PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές που το οριοθετούν, και ανιχνευτές που είναι συμπληρωματικοί προς αυτό και φέρουν φθορίζουσες χρωστικές. Ο φθορισμός είναι ανάλογος των ικών αντιγράφων και εάν υπερβεί ένα όριο (αριθμός κύκλων PCR για να καταστεί μετρήσιμος ο φθορισμός), το δείγμα διαγιγνώσκεται ως θετικό.

Η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος εξέτασης δειγμάτων για τον COVID-19 σε όλα τα εργαστήρια παγκοσμίως στηρίζεται στη μοριακή διάγνωση. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο(real time PCR)είναι μία ποσοτική μέθοδος που πραγματοποιεί πολλαπλούς κύκλους αντιγραφής ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Για το σκοπό αυτό σχεδιάζονται probes(ανιχνευτές)-δηλαδή ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς το τμήμα στόχο σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως ποσοτικό μέτρο- και primers(εκκινητές). Η εφαρμογή της PCR για τον εντοπισμό του SARS-CoV-2, που είναι ένας ιός με γονιδίωμα RNA, περιλαμβάνει ακόμη ένα αρχικό στάδιο: την αντίστροφη μεταγραφή του(Reverse Transcription) σε DNA. Η δημοσίευση στο Journal of Clinical Microbiology με τίτλο “Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens”, θεμελιώνει την RT-PCR που στοχεύει το τμήμα RNA πολυμεράση/ελικάσης του ιού, ως την πιο αξιόπιστη για την διάγνωση ασθενών. Η εν λόγω μέθοδος παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα χάρη στην αλληλουχία των ανιχνευτών που αναγνωρίζουν μόνο τον SARS-CoV-2, γεγονός που την καθιστά ιδανική για τον εντοπισμό κρουσμάτων και κατ’ επέκταση για την σωστή εφαρμογή της

**απομόνωσης αυτών, ώστε να αποφευχθεί η ταχύτατη διασπορά του ιού και να υπάρξει έλεγχος της εξέλιξης της πανδημίας.**

Η μελέτη των Chan WJF et.al εξετάζει 3 εναλλακτικούς τρόπους ελέγχου για μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2 με την τεχνική της real time RT-PCR, σε in vitro υκά μετάγραφα και σε κλινικά δείγματα. Ο 1<sup>ος</sup> στοχεύει το γονίδιο της εξαρτώμενης από RNA RNA πολυμεράση/ελικάσης (RdRp/Hel), το ένζυμο που αντιγράφει το γονιδίωμα του ιού και παράγει τα τμήματα mRNA που μεταφράζονται από τα ριβοσώματα του ξενιστή. Ο 2<sup>ος</sup> στοχεύει στο γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης S και είναι αυτή που χρησιμοποιεί ο ιός για να εισέλθει στα κύτταρα. Ο 3<sup>ος</sup> στοχεύει το γονίδιο N που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το γονιδίωμα RNA του ιού. Η σημαντικότητα αυτής της μελέτης έγκειται στην καθιέρωση ενός εύχρηστου πρωτοκόλλου διάγνωσης, το οποίο θα εξασφαλίζει υψηλή ευαισθησία και απόλυτη ειδικότητα ως προς τον SARS-CoV-2.

Στην εν λόγω έρευνα απομονώθηκαν δείγματα από επιβεβαιωμένους ασθενείς με COVID-19 προερχόμενα από την αναπνευστική οδό, τα ούρα, το πλάσμα και τα κόπρανα. Η λήψη κάθε τύπου δείγματος επαναλαμβανόταν για κάποιο διάστημα ημερών. Από κάθε δείγμα απομονώθηκε το RNA, το οποίο υποβλήθηκε και στις 3 δοκιμές PCR. Το kit που χρησιμοποιήθηκε διέθετε και τα 2 απαραίτητα ένζυμα, την αντίστροφη μεταγραφάση και την DNA πολυμεράση, εξασφαλίζοντας όμως την ειδική ενεργοποίηση τους σε δεδομένη θερμοκρασία (45°C και 95°C αντίστοιχα). Η μέθοδος με την υψηλότερη ευαισθησία αναδείχθηκε η RdRp/Hel με όριο διάγνωσης (LoD)= 11,2 RNA αντίγραφα/αντίδραση. Ο υπολογισμός του LoD βασίστηκε σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις πρότυπων in vitro μεταγράφων, τα οποία δημιουργήθηκαν εισάγοντας σε πλασμίδια τα γονίδια RdRp/Hel, N, και S υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (φάγου T7). Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα κλινικά δείγματα και το ποσοστό των θετικών κρουσμάτων έφταναν στο 43,6%, με τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα να οφείλονται στο μειωμένο ικό φορτίο των δειγμάτων.

Οι primers και τα probes για την RdRp/Hel ήταν ειδικοί μόνο για τον SARS-CoV-2 και δεν αντέδρασαν με άλλους κορωνοϊούς ή ιούς του αναπνευστικού(πίνακας 1). Αυτό διαπιστώθηκε εφαρμόζοντας την RdRp/Hel RT-PCR σε RNA απομονωμένο από καλλιέργειες (SARS-CoV, άλλων ανθρώπινων κορωνοϊών και κορωνοϊών νυχτερίδων) καθώς και σε δείγματα από ασθενείς που εμφάνιζαν παρόμοια συμπτώματα με μόλυνση από τον SARS-CoV-2, αλλά βρέθηκαν θετικοί σε άλλα παθογόνα.

	COVID-19 RdRp/Hel Forward Primer	COVID-19 RdRp/Hel Probe	COVID-19 RdRp/Hel Reverse Primer
COVI D-19 RdRp/Hel	CGCATACAGTCTTR CAGGCT	TTAAGATGTGGTGCTTGCA TACGTAGAC	GACCATGTCATWTCAA CATCACAC
2019-nCoV	***** **	***** **	***** *
SARS-CoV	*A***** **	C*TC*T**C*****C*T*TA* G****	**T**C*****C***** *T

**Πίνακας 1:** Πίνακας στοίχισης των primers και του probe που σχεδιάστηκαν για την real time RT-PCR που στοχεύουν τμήμα της αλληλουχίας κωδικοποίησης της ελικάσης της RNApol του SARS-CoV-2. Στην 1<sup>η</sup> γραμμή δίνεται η αλληλουχία τους, στη 2<sup>η</sup> η αλληλουχία του SARS-CoV-2 και στην 3<sup>η</sup> του SARS-CoV. Με αστερίσκο αναπαρίστανται οι ταυτότητες. Η αλληλουχίες έχουν κατεύθυνση 5' προς 3'. Η αλληλουχία της 3<sup>ης</sup> στήλης είναι η αντίστροφη και συμπληρωματική του Reverse primer.

Ο συνδυασμός των μοριακών τεχνικών με τις ανοσολογικές μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία των διαγνώσεων έως το 98,6% όπως υποστηρίζεται από τη δημοσίευση του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης “Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19)”. Υποστηρίζεται μάλιστα ότι έπειτα από 5,5 μέρες εμφάνισης συμπτωμάτων η ELISA είναι πιο ευαίσθητη συγκριτικά με την RT-PCR. Βέβαια ένα σημαντικό ποσοστό των επιβεβαιωμένο δειγμάτων (22%) παρουσιάστηκε ως αρνητικό με τη anti-N IgM ELISA γεγονός που οφείλεται σε ατομικούς παράγοντες όπως ελαττωμένη χυμική απόκριση ή η καθυστέρηση παραλαβής των δειγμάτων και άρα η μείωση των IgM, καθώς είναι οι πρώτοι Υποδοχείς των B λεμφοκυττάρων (BCR) που εκφράζονται στα ενεργοποιημένα B-λεμφοκύτταρα. Η μέτρηση των IgG έχει ιδιαίτερη αξία καθώς τα IgG παραμένουν στο αίμα των ασθενών, ενώ αντιθέτως μετά από κάποιο σημείο, οπότε οι ασθενείς αναρρώσουν και θα σταματήσει ο πολλαπλασιασμός του ιού, θα εμφανίζονται αρνητικοί με RT-PCR.

Η μέθοδος RdRp/Hel real time RT-PCR, προσφέρει νέες προοπτικές στον τομέα της διάγνωσης του COVID-19. Χάρη στην ειδικότητα και την υψηλότερη ευαισθησία που παρουσιάζει συγκριτικά με μία άλλη παρόμοια μέθοδο διάγνωσης (+15% θετικά δείγματα), δίνει τη δυνατότητα εξέτασης δειγμάτων σιέλου και πλάσματος. Η χρήση σιέλου για την διάγνωση COVID-19, όπως γίνεται και με την διάγνωση του Influenza, είναι ένας απλός και αρκετά πιο ασφαλής τρόπος δειγματοληψίας για το υγειονομικό προσωπικό σε σχέση με αυτόν που χρησιμοποιείται για τον SARS-CoV-2. Επιπλέον το γεγονός ότι η RT PCR RdRP/Hel μπορεί να ανιχνεύει τον ιό σε δείγματα ορού έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η σοβαρότητα των συμπτωμάτων και της ανάγκης διασωλήνωσης συνδέεται με το ιικό φορτίο στο αίμα των ασθενών. Συγκεκριμένα είχε αποδειχθεί για τους ασθενείς με SARS ότι, όσο περισσότερο είναι το ιικό RNA που εντοπίζεται στο αίμα των ασθενών, τόσο χειρότερη είναι η έκβαση της ασθένειας.

Ένας πολλά υποσχόμενος τρόπος διάγνωσης βασίζεται στην τεχνική της γενετικής τροποποίησης CRISPR και υπερέχει από άποψη χρόνου και κόστους έναντι των μοριακών μεθόδων PCR. Το άρθρο: ” CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2” στο Nature Biotechnology προτείνει μία απλή, γρήγορη μέθοδο διάγνωσης(40 λεπτά) με εύκολα ερμηνεύσιμο οπτικό αποτέλεσμα σε ταινία πλευρικής ροής. Η μέθοδος που ανέπτυξαν ονομάζεται DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter) και επιτυγχάνει κύκλους ενίσχυσης του γονιδίου N(nucleocapsid) και E(envelope). Συγχρόνως η Cas12 καθοδηγούμενη από ειδικά σχεδιασμένα μόρια οδηγούς-RNA(guide-RNA) μπορεί να τεμαχίζει σημασμένα μόρια αναφοράς, ανάλογα με το αν το σύμπλοκο Cas12-gRNA εντοπίσει το γονίδιο-στόχο (N,E). Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται με τρόπο παρόμοιο των τεστ εγκυμοσύνης(εμφάνιση λωρίδων επί της ταινίας). Η μέθοδος εμφάνισε 95% συμφωνία με τα επιβεβαιωμένα κρούσματα βάσει RT-PCR.

Οι μοριακές μέθοδοι διάγνωσης, δηλαδή οι RT-PCRs είναι τα πιο ισχυρά μέσα που διαθέτουμε ως στιγμής λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους, ωστόσο είναι δαπανηρές και μη πρακτικές, όταν γίνεται λόγος για την εξέταση εκατομμυρίων δειγμάτων εν όψει μιας πανδημίας. Όπως φάνηκε από την μελέτη των Chan JF et. al, η RdRp/Hel real time RT-PCR χάρη στην αλληλουχία των ανιχνευτών και των εκκινητών της, που στοχεύουν τμήμα της RNA πολυμεράσης/ ελικάσης του ιού, εμφανίζει ειδικότητα αναγνώρισης μόνο για τον SARS-CoV-2, ενώ συγχρόνως δίνει τη δυνατότητα εξέτασης δειγμάτων σιέλου και αίματος χάρη στην αυξημένη ευαισθησία της. Ωστόσο μένει να αξιολογηθεί ως προς το χρονικό παράθυρο της διάγνωσης και να επιβεβαιωθεί η ευαισθησία της με δειγματοληψία από επιπλέον ασθενείς. Επιπλέον πρέπει να γίνει αξιολόγηση της μεθόδου ως προς την ικανότητα της να εντοπίζει υποψήφια κρούσματα που βρίσκονται στη φάση επώασης του ιού και είναι ασυμπτωματικά, διότι μπορούν και μεταδίδουν τον ιό. Από την άλλη γεννάται η ανάγκη για πιο απλές μεθόδους διάγνωσης με εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα. Γίνεται αντιληπτό ότι η ανάπτυξη εύχρηστων διαγνωστικών όπως αυτού της CRISPR καθίσταται αναγκαία σε ελέγχους ρουτίνας ώστε να «επανεκκινήσουν» με ασφάλεια οι κοινωνίες.

### **Βιβλιογραφία**

- 1) Chan WFJ et al. *Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens* Journal of Clinical Microbiology Apr2020, 58 (5) e00310-20; DOI: 10.1128/JCM.00310-20
- 2) Corman VM et al. *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR*. Euro Surveill. 2020;25(3):2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- 3) Li Guo et al. *Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19)*, *Clinical Infectious Diseases*, , ciaa310, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>
- 4) Broughton, J.P., et al. *CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2*. Nat Biotechnol (2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- 5) Michael J. Loeffelholz & Yi-Wei Tang (2020) *Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art*, *Emerging Microbes & Infections*, 9:1, 747-756, DOI: 10.1080/22221751.2020.1745095

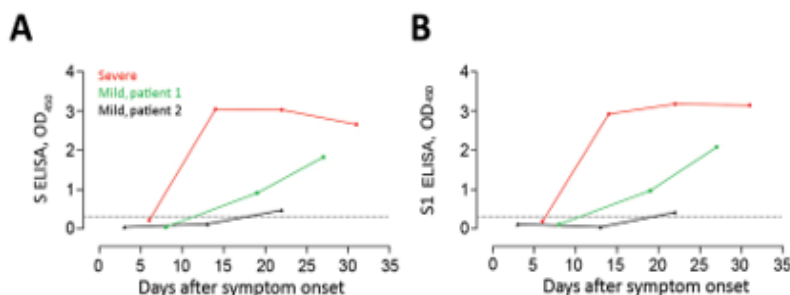
## Ανιχνεύοντας τα Όπλα του Εχθρού

Από τον Πιπεράκη Αρτέμιο  
(Α.Μ.: 1753)



Μία μολυσματική νόσος αποκαλείται πανδημία όταν ο μολυσματικός παράγοντας όπως ένας ιός ή ένα βακτήριο, καταφέρει να περάσει τα σύνορα μίας χώρας και να κυριεύσει σχεδόν ένα ολόκληρο είδος. Στην ανθρώπινη ιστορία έχουν καταγραφεί πολλές θανατηφόρες πανδημίες που μείωσαν με απίστευτα αποτελεσματικό τρόπο το ανθρώπινο είδος όπως η χολέρα που προκλήθηκε από το βακτήριο *Vibrio Cholerae*, η πανώλη ή μαύρος θάνατος που προξενήθη από το βακτήριο *Yersinia pestis*, η ισπανική γρίπη ή γρίπη των πτηνών που δημιουργήθηκε από τον ιό H1N1 και ακόμα πιο πρόσφατα ο κορονοϊός. Ο ιός SARS-CoV-2 ξεκίνησε να μαστίζει την Wuhan στα τέλη του 2019 και από τότε εξαπλώθηκε σε όλο τον πλανήτη μέσα σε λίγους μήνες. Πώς όμως καταφέρνει ο άνθρωπος να επιβιώνει από την εξαφάνιση του είδους του σε τέτοιες περιπτώσεις; Στην σημερινή εποχή της επιστημονικής προόδου, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την πρόληψη, την διάγνωση και την θεραπεία μολυσματικών νόσων. Ο ιός, μία μικρή μονάδα ζωής, αποτελείται από πρωτεΐνες, λιπίδια και σάκχαρα, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν για τη διάγνωση της ασθένειας. Σε αυτό το άρθρο θα αναλυθεί ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία στον τομέα της διάγνωσης που είναι η τεχνική ανίχνευσης αντιγόνων του κορονοϊού μέσω αντισωμάτων. Για να είναι αποτελεσματική αυτή η τεχνική θα πρέπει πρώτα να ερευνηθεί ποια από τις δομές του SARS-CoV-2 έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα προς τα αντισώματα.

Αντιγόνο είναι ένας βιολογικός παράγοντας, ο οποίος δεν ανήκει στο σύστημα του ανθρώπου, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζεται από τα αντισώματα, τα οποία θα το σηματοδοτήσουν για καταστροφή. Τα πιο γνωστά αντιγόνα του SARS-CoV-2 είναι η πρωτεΐνη S (spike protein), η οποία προσδένεται στον υποδοχέα των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα και τη χρησιμοποιεί ο ιός για να εισέλθει στο κύτταρο και η πρωτεΐνη N, η οποία είναι πρωτεΐνη του καψιδίου. Διάφορα δείγματα υπέστησαν ανάλυση όπως οι υπομονάδες του S, οι οποίες είναι ο RBD (receptor binding domain) και το S1. Πιο συγκεκριμένα από την υπομονάδα S1 ερευνήθηκε το αμινοτελικό άκρο S1<sup>A</sup>. Σε μία πρόσφατη μελέτη *Nisreen et al* έγινε η προσπάθεια ανάπτυξης αντισωμάτων που ανιχνεύουν με μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία τα αντιγόνα του SARS-CoV-2. Στη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε η πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος για τα προειρημένα αντιγόνα, μέσω ELISA, σε τρεις Covid-19 πάσχοντες. Τα αποτελέσματα ήταν ότι το S1 αντιγόνο είναι το πιο ειδικό από ολόκληρη την υπομονάδα S για τη διάγνωση του SARS-CoV 2 (Εικ. 1).



**Εικ. 1.** Κινητική των αντισωματικών αντιδράσεων κατά του SARS-CoV-2 μετά τη μόλυνση. Πραγματοποιήθηκε δοκιμή σε 1 ασθενή που είχε σοβαρή νόσο κοροναϊού 2019 (κόκκινο) και σε 2 ασθενείς που είχαν ήπια νόσο κοροναϊού 2019 (πράσινο και μαύρο) για αποκρίσεις αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης A) S, B) υπομονάδα πρωτεΐνης S1.

Η πρωτεΐνη S με όλες τις υπομονάδες της εντοπίστηκε και στα τρία είδη κορονοϊών MERS-CoV, SARS-CoV και SARS-CoV-2, ενώ το N-terminal του S1 ανιχνεύεται περισσότερο στον SARS-CoV-2, ελάχιστα στον SARS-CoV και καθόλου στον MERS-CoV. Στην ίδια μελέτη διεξήχθη περαιτέρω αξιολόγηση της ειδικότητας του S1 και κανένα από τα δείγματα ορού με HCoV, MERS-CoV, SARS-CoV δεν αντέδρασε με αντίσωμα κατά του S1 σε ELISA, ενώ δείγματα ορού από ασθενείς με SARS-CoV-2 ανταποκρίθηκαν, δείχνοντας 100% ειδικότητα. Όσο αφορά τα υπόλοιπα αντιγόνα, εκτός από τα δείγματα ορού από ασθενείς με SARS-CoV, κανένα από τα δείγματα ορού ελέγχου δεν ήταν θετικό για αντισώματα κατά του RBD, ενώ ένα δείγμα ορού με MERS-CoV ήταν ασθενώς θετικό για αντισώματα N πρωτεΐνης. Υποτέθηκε ότι αυτή η διαφορά οφείλεται στη σχετικά υψηλή ευαισθησία και την πρόωμη απόκριση στο αντιγόνο S σε σύγκριση με το αντιγόνο N σε ασθενείς με συμπτώματα COVID-19. Το συμπέρασμα είναι ότι το αντιγόνο N δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας αξιόπιστος δείκτης ανίχνευσης του SARS-CoV-2. Παρόλο αυτά πιστεύεται ότι η ELISA που βασίζεται σε μίγμα αντισωμάτων ειδικών για N- και S, μπορεί να παίζει έναν κομβικό ρόλο στη διάγνωση με υψηλή ευαισθησία.

Ακολούθως διερευνήθηκε ποιο αντίσωμα από τα IgM, IgG ή IgA είναι το πιο ειδικό για το S1 αντιγόνο. Το αντίσωμα IgM μειώνεται και εξαφανίζεται μετά από 2 εβδομάδες, ενώ η συγκέντρωση του IgG αυξάνεται σταδιακά. Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι δύσκολο να διαγνωσθεί ακριβώς πότε ο ασθενής μολύνθηκε ή πόσο καιρό φέρει την ασθένεια. Για αυτό το λόγο, η συνδυασμένη ανάλυση IgM-IgG έχει μεγαλύτερη χρησιμότητα και ευαισθησία στη διάγνωση της μόλυνσης. Παρόλο αυτά, η ανοσοσφαιρίνη A είναι ένα αντίσωμα που κατέχει καθοριστικό ρόλο στην ανοσολογική λειτουργία των βλεννογόνων. Η μέση διάρκεια ανίχνευσης των αντισωμάτων IgM και IgA είναι 5 ημέρες, ενώ η IgG ανιχνεύεται 14 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Τα δεδομένα που πάρθηκαν από ELISA σε δείγματα από το Βερολίνο και την Ολλανδία, έδειξαν ότι η ELISA που ανιχνεύει την ανοσοσφαιρίνη IgA παρουσίασε υψηλότερη ευαισθησία από την ELISA με βάση την ανοσοσφαιρίνη IgG. Ωστόσο, το IgG ELISA εμφάνισε υψηλότερη ειδικότητα από το IgA. Οι προσδιορισμοί IgA και IgG μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ορολογική διάγνωση, όμως η IgG παρουσιάζει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και ως εκ τούτου προτιμάται για μελέτες διάγνωσης της συγκεκριμένης ασθένειας.



Σύμφωνα με τα ειρηθέντα, υπάρχει μια επείγουσα ανάγκη για την εύρεση μιας ακριβούς και γρήγορης μεθόδου, έτσι ώστε να πραγματοποιείται ταχύτατη αναγνώριση μεγάλου αριθμού μολυσμένων ασθενών και ασυμπτωματικών φορέων. Με αυτό τον τρόπο, υφίσταται πρόληψη της μετάδοσης του ιού και εξασφαλίζεται η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των συμπτωμάτων της ασθένειας. Ωστόσο δημιουργείται μια αμφιταλάντευση όσον αφορά την επιλογή των τεχνικών, δηλαδή αν θα γίνει χρήση της ELISA ή της RT-PCR. Η ELISA αποτελεί μία πολύ πιο αξιόπιστη μέθοδο σε σχέση με τη RT-PCR, διότι στη RT-PCR έχουν αναφερθεί μεγάλο βαθμού ψευδώς αρνητικά ποσοστά. Αντίθετα, για την ανίχνευση του ιικού γονιδιώματος, η RT-PCR αποτελεί πιο αποτελεσματική τεχνική, εφόσον μπορούν να διαγνωστούν και οι ασυμπτωματικοί στους οποίους δεν έχουν παραχθεί αντισώματα. Οι περισσότεροι επιστήμονες θεωρούν ότι καλύτερη λύση αποτελεί ο συνδυασμός αυτών των δύο. Συμπερασματικά, για την ανάπτυξη αποτελεσματικών πρωτοκόλλων διάγνωσης και θεραπείας και πιο συγκεκριμένα για την χρήση της ELISA, απαιτείται περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερο δείγμα πληθυσμού που εμφανίζει συμπτώματα COVID-19 καθώς και φορέων που είναι ασυμπτωματικοί .

**Note added in proof:** Μια μελέτη που δημοσιεύθηκε πρόσφατα στο περιοδικό *Emerging Microbes & Infections* έδειξε ότι νωρίς κατά την είσοδο του ιού οι ασθενείς χωρίς συμπτώματα εμφάνιζαν υψηλότερη συγκέντρωση IgG αντισωμάτων ειδικά προς την S πρωτεΐνη, ενώ οι ασθενείς με συμπτώματα εμφάνιζαν υψηλότερη συγκέντρωση IgG αντισωμάτων ειδικά προς την N πρωτεΐνη. Ένα δεδομένο που ίσως αλλάξει τον τρόπο διάγνωσης μεταξύ των ασθενών. Αυτή η μελέτη απέδειξε ότι πράγματι μόνο η S πρωτεΐνη προκαλεί υψηλή παραγωγή αντισωμάτων κατά του ιού καθ' όλη τη διάρκεια της λοίμωξης .

#### **Βιβλιογραφία**

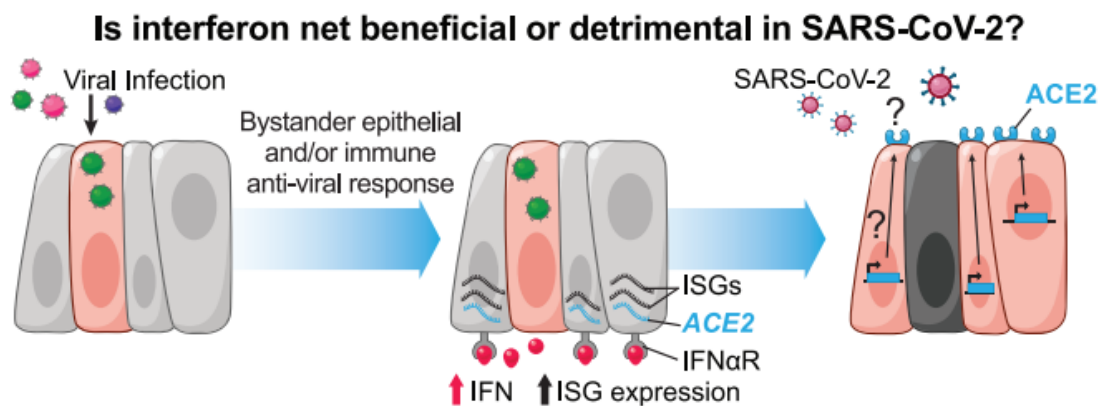
1. Nisreen M.A. Okba et al., *Emerg Infect Dis.* 2020 Ju
2. Li Guo et. al., *Clin Infect Dis Oxford* 2020 Mar
3. Zhengtu Li et al., *Medical Virology* 2020 Feb
4. Wanbing Liu et al., *J. Clin. Microbiol.* 2020 Mar
5. Hsueh PR et al. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:1062–6.
6. Zhou P et al. *Nature.* 2020;579:270–3.
7. Corman VM et al. *Euro Surveill.* 2020;25:2000045.
8. **Baoqing Sun et al. *Emerg. Microb & Infect* 2020 Apr, VOL. 9**



**Ενότητα 3: Οι μηχανισμοί στους οποίους στηρίζονται καινοτόμα (ή/και παλιά) φάρμακα καθώς και εμβόλια για την αντιμετώπιση του Covid-19**

## Η Αντιϊκή Δράση της Ιντερφερόνης-α

Από την Δελή Μαριάννα  
(Α.Μ.: 1841)



Εικόνα 1: Επαγωγή της έκφρασης γονιδίων από την ιντερφερόνη, ως απόκριση στον ιό SARS-CoV-2 (τροποποίηση από Ziegler C. G. K. et al., 2020 [6]).

Η νόσος COVID-19 εμφανίστηκε για πρώτη φορά το Δεκέμβριο του 2019 στην πόλη Wuhan της Κίνας. Αποτελεί μία ασθένεια του αναπνευστικού συστήματος που προκαλείται από τον ιό SARS-CoV-2. Η ιντερφερόνη (IFN) είναι μια κυτοκίνη που έχει σημαντική αντιϊκή δράση αφού επάγει την ανοσιακή απόκριση του οργανισμού, γι' αυτό και ο ρόλος της έναντι του SARS-CoV-2 διερευνήθηκε περαιτέρω. Η παρούσα μελέτη παρείχε σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη δράση της IFN-α ως θεραπευτικό μέσο έναντι του MHV-1 ιού (Mouse Hepatitis Virus), ο οποίος αποτελεί έναν κορονοϊό τύπου 2. Συγκεκριμένα, η IFN επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση (π.χ. *pkc*, *2'5'-oas* κ.α.), μέσω κινασών που ενεργοποιεί. Η αναστολή της λειτουργίας των παραπάνω κινασών, οδηγεί σε παρεμπόδιση της μεταγραφής των γονιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αντιϊκής δράσης της IFN-α. Επιπλέον, ακόμη και με χορήγηση μεγαλύτερων δόσεων IFN-α4, παράλληλα με τους φαρμακολογικούς αναστολείς παρατηρήθηκε και πάλι παρεμπόδιση της λειτουργίας της. Επομένως, τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν πως η IFN-α έχει αντιϊκό ρόλο, μέσω ρύθμισης της ενεργοποίησης κινασών και επαγωγής της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Ωστόσο, απαιτείται να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί η χρήση της ως θεραπευτικό μέσο.

Η ιντερφερόνη (IFN) είναι ικανή να ελέγχει την αντιγραφή των ιών ρυθμίζοντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων (Interferon Stimulated Genes-ISGs), όπως είναι το *pkc* (RNA-dependent protein kinase) και το *2'5'-oas* (*2'5'*- oligoadenylate synthetase). Η μόλυνση από τον ιό MHV-1 (Mouse Hepatitis Virus), επάγει τη μεταγραφή των IFNs και ως επακόλουθο οδηγεί στην έκφραση και των γονιδίων *pkc* και *2'5'-oas* (εικόνα 1). Συγκεκριμένα, σε L2 κύτταρα ινοβλαστών ποντικού, όπου ενέθηκε ο ιός MHV-1,

παρατηρήθηκε με τη μέθοδο της RT-PCR μείωση της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων. Αντίθετα, με χορήγηση  $10^4$  U/ml IFN- $\alpha 4$  η έκφρασή τους αυξήθηκε εκ νέου.

Επιπλέον έχει βρεθεί πως στους ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από συστηματικό ερυθματώδη λύκο (systemic lupus erythematosus), τα γονίδια που ρυθμίζονται από την IFN (ISGs) εμφανίζονται υπομεθυλιωμένα. Κατά συνέπεια, με την παραγωγή IFN, τα γονίδια ISGs υπερεκφράζονται οδηγώντας σε υπέρμετρη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στον ιό και καταστροφή των ιστών. Γι' αυτό και οι ασθενείς που πάσχουν από ερυθματώδη λύκο εμφανίζουν πιο σοβαρά συμπτώματα όταν προσβάλλονται από τον SARS-CoV-2 αλλά και από άλλους ιούς [2].

Σε μεταγενέστερα πειράματα, εξετάστηκαν οι επιδράσεις της παρεμπόδισης συγκεκριμένων κινάσων στην έκφραση γονιδίων που επάγονται από την IFN (*pkr* και *2'5'-oas*). Οι IFN- $\alpha$ s και οι IFN- $\beta$  προσδένονται στον υποδοχέα τους, IFNAR, και ενεργοποιούν τις κινάσες Janus (Jak1), p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) και πρωτεϊνική κινάση C (PKC $\delta$ ). Η χορήγηση φαρμακολογικών αναστολέων που στοχεύουν τις παραπάνω κινάσες σε κύτταρα L2 ποντικού μολυσμένα με τον MHV-1 ιό, οδήγησε σε μειωμένη έκφραση των *pkr* και *2'5'-oas* γονιδίων. Για παράδειγμα, με αναστολή της Jak1 κινάσης, οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT δεν ενεργοποιούνται, οπότε δεν εκφράζονται ISGs γονίδια [1].

Επίσης, με τη χορήγηση του αναστολέα της PKC $\delta$  κινάσης, Rottlerin, παρατηρήθηκε με τη μέθοδο Western Blot μείωση της φωσφορυλίωσης της PKC $\delta$  κινάσης και αναστολή της αντιϊκής δράσης της IFN- $\alpha 4$ . Και σε αυτήν την περίπτωση σημειώθηκε παρεμπόδιση της μεταγραφής των ISGs γονιδίων. Το παραπάνω εύρημα ενισχύει την υπόθεση ότι η χορήγηση φαρμακολογικών αναστολέων δρα αρνητικά στην έκφραση γονιδίων που επάγονται από την IFN [1].

Η σημασία που έχει η δράση της PKC $\delta$  κινάσης έναντι του ιού γίνεται ιδιαίτερα αντιληπτή και από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε T κύτταρα ασθενών που πάσχουν από ερυθματώδη λύκο. Η μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2 προκαλεί οξειδωτικό στρες στα κύτταρα, το οποίο παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της PKC $\delta$  κινάσης. Ως εκ τούτου, δεν επάγεται το μονοπάτι MEK/ERK και παρατηρείται μειωμένη έκφραση της DNA methyltransferase (DNMT1). Έτσι, η μεθυλίωση του DNA επιδεινώνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η είσοδος του ιού στα κύτταρα λόγω υπερέκφρασης του ACE2 γονιδίου [2].

Επομένως, η παραγωγή IFN φυσιολογικά επάγει την έκφραση ISGs γονιδίων μέσω μονοπατιών σηματοδότησης που ενεργοποιεί, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στον ιό. [1] Στους ασθενείς με ερυθματώδη λύκο όμως, η δράση της οδηγεί σε υπερέκφραση των ISGs γονιδίων, όπως το ACE2, υπέρμετρη απόκριση του ανοσοποιητικού στον ιό και συνεπώς καταστροφή των ιστών [2].

Για την περαιτέρω διερεύνηση της αντιϊκής δράσης της IFN, μελετήθηκε το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα περιφερικού αίματος δύο ασθενών που πάσχουν από SARS στους οποίους χορηγήθηκε το συνθετικό ανάλογο της IFN- $\alpha$ , IFN alfacon-1. Για να πραγματοποιηθεί η σύγκριση μετρήθηκε και η έκφραση γονιδίων σε έναν ακόμη ασθενή, που πάσχει από SARS, στον οποίο χορηγήθηκαν μόνο κορτικοστεροειδή. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως στους ασθενείς που είχαν προσλάβει IFN alfacon-1, ενισχύθηκε η

έκφραση γονιδίων που παρεμποδίζουν την αντιγραφή του ιού και γονιδίων που έχουν αντιϊκή δράση, όπως είναι η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) <sup>[1]</sup>.

Από την άλλη πλευρά, οι Xie et al. χρησιμοποίησαν μια εναλλακτική μέθοδο για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών δόσεων της IFN-α στο διπλασιασμό του ιϊκού γονιδιώματος. Για το σκοπό αυτό, ανέπτυξαν μοντέλα infectious clone SARS-CoV-2-mNeonGreen τα οποία εισήγαγαν σε Vero E6 κύτταρα μαϊμούς. Όταν στα παραπάνω κύτταρα προστέθηκε η υψηλότερη δόση IFN-α (1000 U/ml), παρατήρησαν πως δεν υπήρξε έκφραση του mNG (mNeonGreen) γονιδίου. Μέσω περαιτέρω πειραμάτων φθορισμού που πραγματοποίησαν κατέληξαν στο συμπέρασμα, πως 101 U/ml IFN-α είναι ικανά να παρεμποδίσουν την αντιγραφή του ιού στα κύτταρα σε ένα ποσοστό 50% <sup>[3]</sup>.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα γίνεται αντιληπτό πως η IFN-α έχει ιδιαίτερα σημαντική επίδραση στον περιορισμό της μόλυνσης από κορονοϊούς, κυρίως επάγοντας την έκφραση γονιδίων (Interferon Stimulated Genes), μέσω κινασών που ενεργοποιεί. Τα γονίδια αυτά υποστηρίζεται πως έχουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα<sup>[1]</sup>. Ωστόσο, υπάρχει αντιπαράθεση σχετικά με την αντιϊκή τους δράση αφού το *pkr* γονίδιο δεν επηρεάζει την αντιγραφή του ιού αλλά συμμετέχει στην επαγωγή της απόπτωσης. Επιπλέον, δεν υπάρχουν δεδομένα πως το *oas* γονίδιο δρα αποτελεσματικά έναντι κορονοϊών που προσβάλλουν τον άνθρωπο <sup>[4]</sup>. Αξιοσημείωτο είναι πως η IFN-β έχει αποδειχθεί πιο ισχυρός αναστολέας των κορονοϊών σε σχέση με την IFN-α. Υπάρχει επίσης σχετική ομοφωνία για τη χορήγηση IFN τύπου I, δηλαδή IFN-α και IFN-β, ως θεραπευτικό μέσο έναντι της μόλυνσης από SARS-CoV-2. Παρ' όλα αυτά οι ίδιες δεν φαίνεται να επηρεάζουν τόσο την αντιγραφή του ιού και ακόμα δεν είναι πλήρως κατανοητή η αντιϊκή λειτουργία τους σε ανθρώπους<sup>[5]</sup>. Μελλοντικά, απαιτείται να διερευνηθεί περαιτέρω ο ακριβής μηχανισμός δράσης των IFNs, ποια είναι η κατάλληλη δόση που πρέπει να χορηγείται και ποιος τύπος IFN είναι ο πιο αποτελεσματικός έναντι του SARS-CoV-2. Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί πως έχουν βρεθεί περίπου 40 ISGs με αντιϊκή δραστηριότητα, όμως παραμένει αδιευκρίνιστο ποια από αυτά δρουν έναντι κορονοϊών που προσβάλλουν τον άνθρωπο<sup>[4]</sup>.

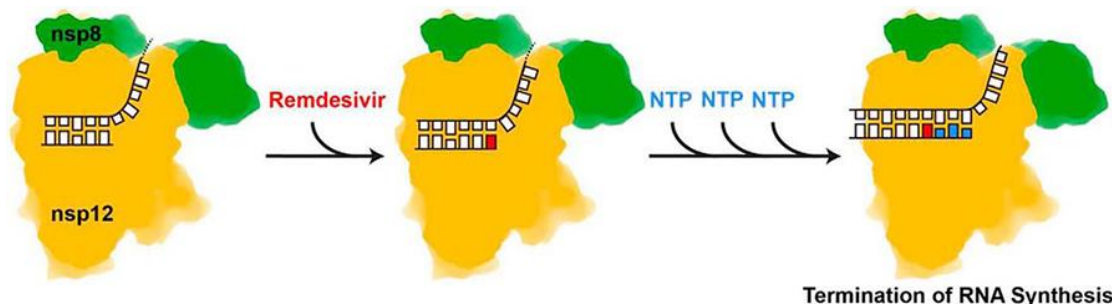
**Note added in proof:** Μια μελέτη που δημοσιεύτηκε πρόσφατα στο περιοδικό *Antiviral Research*, έδειξε ότι πράγματι ο ιός SARS-CoV-2 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη θεραπεία με IFN-α και IFN-β, διότι σε *in vitro* κυτταρικές καλλιέργειες οι παραπάνω ιντερφερόνες είναι ικανές να αναστείλουν την αντιγραφή του ιού, επάγοντας την έκφραση γονιδίων ISGs με αντιϊκή λειτουργία <sup>[7]</sup>.

#### Βιβλιογραφία:

- [1] Zorzitto J. et al.. *Cell Research*, 16, 220-229 (2006).
- [2] Sawalha H. A. et al. *Clinical Immunology*, 215 (2020).
- [3] Xie X. et al. *Cell Host & Microbe*, 27, 841-848 (2020).
- [4] Kindler E. et al. *Advances in Virus Research*, 96, 219-243 (2016).
- [5] Sallard E. et al. *Antiviral Research*, 178 (2020).
- [6] Ziegler C. G. K. et al. *Cell*, 181, 1016-1035 (2020).
- [7] Mantlo E., et al. *Antiviral Research*, 179: 104811 (2020).

*Η ρεμδεσιβίρη φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη πιθανή λύση στο πρόβλημα του COVID-19*

Από τον Λαχανόπουλο Αριστοτέλη  
(Α.Μ.: 1880)



*Εικόνα 1: Η ρεμδεσιβίρη μπλοκάρει τη δράση της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης του ιού, μέσω σύνδεσής της στην ενεργή υπομονάδα nsp12 ως νουκλεοτιδικό ανάλογο, επάγοντας πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής*

Η εξάπλωση του COVID-19 (νόσος του ιού SARS-CoV-2) σε πανδημικό επίπεδο από τον Ιανουάριο και μετά, είναι μια πρωτόγνωρη κατάσταση για όλους μας. Με τα κρούσματα να αυξάνονται συνεχώς και πολλές χώρες να βρίσκονται σε κατάσταση lockdown, είναι ξεκάθαρη η ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με σκοπό τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών του ιού και τον εντοπισμό πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η ρεμδεσιβίρη(RDV), φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη πιθανή λύση στο πρόβλημα του κωρονοϊού. Η ένωση αυτή, είναι ένα νουκλεοτιδικό ανάλογο, που γενικά είναι γνωστό ότι μπορεί να αναστείλει την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση των ιών του αναπνευστικού. Το άρθρο των *Gordon et al. (2020)* έκανε σημαντική πρόοδο στην μελέτη της ρεμδεσιβίρης ως πιθανό θεραπευτικό. Οι ερευνητές, προσδιόρισαν ότι η υπομονάδα nsp12 της RdRp έχει την καταλυτική δράση. Ακόμα απέδειξαν ότι η RDV ανταγωνίζεται την ATP και προσδένεται στην υπομονάδα αυτή αναστέλλοντας την πολυμεράση. Επιπλέον έδειξαν ότι η αναστολή γίνεται μέσω καθυστερούμενου τερματισμού της μεταγραφής. Μάλιστα, βρήκαν ότι η RDV έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το ενεργό κέντρο από την ATP. Όλα αυτά τα ευρήματα, μας δίνουν μια καλή εικόνα του μηχανισμού της RDV και υποστηρίζουν την υπόθεση ότι είναι ένα πολύ αποδοτικό «όπλο» εναντίον του SARS-COV-2. Είναι μεγάλη λοιπόν η σημασία αυτής της ερευνητικής εργασίας, αφού επιδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στην κατεύθυνση της RDV και παρέχει μια αρκετά ολοκληρωμένη εικόνα της ως υπόβαθρο.

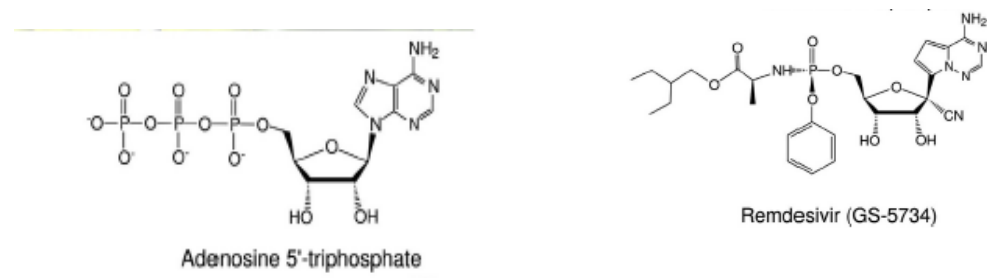
Οι Gordon et al, ανέπτυξαν ένα σύστημα συν-έκφρασης των επιμέρους συστατικών της RdRp του ιού MERS-COV, που είναι συγγενικός με τον COVID-19, σε κύτταρα εντόμων. Με καθαρισμό των εκφρασμένων γονιδίων με χρωματογραφία συγγένειας που χρησιμοποιεί

ετικέτα ιστιδίνης, βρήκαν ότι η μη-δομική πρωτεΐνη nsr8 του ιού (όχι όμως η nsr7) σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με την μη δομική πρωτεΐνη nsr12.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα *in vitro* σύστημα μεταγραφής (επιμήκυνσης του RNA) το οποίο αποτελείται από ένα μοντέλο «εκκινητή/εκμαγείου» και κάποια κατάλοιπα σημασμένης γουανίνης, έδειξαν ότι το σύμπλοκο αυτό είναι λειτουργικό και επιπλέον ότι η υπομονάδα nsr12 έχει την καταλυτική δράση ενώ η nsr8 επικουρικό, στηρικτικό ρόλο. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζονται και από τη δουλειά των *Asleigh Shannon et al*, (2020) οι οποίοι σχεδίασαν ένα λεπτομερές μοντέλο του ενεργού κέντρου της RdRp του SARS-COV-2 χρησιμοποιώντας φωτογραφίες δομών από κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα, που προέκυψε από το μελέτη του μοντέλου μεταγραφής από τους *Gordon et al*, είναι το γεγονός ότι ο μηχανισμός αναστολής της RdRp από την RDV δεν περιλαμβάνει άμεσο τερματισμό της μεταγραφής όταν γίνει η πρόσδεση της, αλλά τερματισμό μετά την προσθήκη 3 ακόμη νουκλεοτιδίων. Αυτό λέγεται καθυστερούμενος τερματισμός της μεταγραφής (**delayed chain termination**). Από την έρευνα των *Yang Gao et al*, (2020) προκύπτει ότι η RDV, λόγω του ότι διατηρεί μια ενεργή ομάδα ριβόζης, μπορεί να δημιουργήσει δίκτυα δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα S282, D225 και T680 της RdRp. Έτσι σταθεροποιεί την πρόσδεση επόμενου νουκλεοτιδίου οπότε δε σταματάει άμεσα η μεταγραφή. Αυτό εξηγεί την παρατήρηση αυτού του μοντέλου καθυστερούμενης αναστολής της μεταγραφής. Ένας επιπλέον παράγοντας που συντελεί σε αυτό το φαινόμενο προκύπτει από τις παρατηρήσεις των *Asleigh Shannon et al*, (2020). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το 3' άκρο της RDV, μετά την πρόσδεση βρίσκεται σε τέτοια θέση που μπορεί να μετατοπιστεί τρεις φορές. Έτσι μπορεί να κινηθεί ο μεταγραφικός μηχανισμός και να προστεθούν τρία ακόμη νουκλεοτίδια. Μετά την τρίτη μετατόπιση όμως υπάρχει στερεοχημική σύγκρουση μεταξύ του καταλοίπου R858 της RdRp και της ομάδας 1-CN που διαθέτει η ρεμδεσιβίρη. Αυτό οδηγεί στον τερματισμό της μεταγραφής.

Αφού λοιπόν μελέτησαν το μοντέλο της μεταγραφής, επόμενος στόχος τους ήταν να προσδιορίσουν πως ακριβώς αναστέλλει η RDV την πολυμεράση. Αυτό το πέτυχαν μέσω μετρήσεων της σύνθεσης του RNA παρουσία σταθερής συγκέντρωσης NTPs και αυξανόμενων συγκεντρώσεων της RDV. Βρήκαν λοιπόν ότι η RDV ανταγωνίζεται την ATP που αποτελεί φυσικό υπόστρωμα της πολυμεράσης(ανταγωνιστική αναστολή). Όντως, τα δομικά μοντέλα των *Asleigh Shannon et al*, , δείχνουν ότι η RDV συνδέεται στο ενεργό κέντρο της πολυμεράσης αντί της ATP.



**Εικόνα 2:** Η ρεμδεσιβίρη είναι νουκλεοτιδικό ανάλογο με παρόμοια δομή με την ATP την οποία και ανταγωνίζεται.

Τέλος οι ερευνητές θέλησαν να προσδιορίσουν και την απόδοση με την οποία γίνεται η αναστολή και έτσι μετρήσαν τις Km της RDV, της ATP και δυο άλλων αναλόγων της ATP για την RdRp. Από αυτές τις μετρήσεις παρατηρήθηκε ότι, σε αντίθεση με τα άλλα ανάλογα, η συγγένεια της RDV για την RdRp είναι μεγαλύτερη από αυτή της ATP.

Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι η έρευνα των *Asleigh Shannon et al*, , επισημαίνει πως η RdRp των ιών Corona περιέχει και μια μη δομική πρωτεΐνη nsr14 με δράση εξωνουκλεάσης

η οποία διασπά τα νουκλεοτιδικά ανάλογα. Αυτό εξηγεί γιατί δεν έχει βρεθεί ακόμη αποτελεσματική θεραπεία για αυτούς τους ιούς. Στην έρευνα αυτή όμως, βρέθηκε ότι η RDV δεν μπορεί να μπει σε κατάλληλη θέση στο ενεργό κέντρο της nsp14. Επομένως η αποδόμηση της είναι λιγότερο αποδοτική σε σχέση με τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια. Αυτό εξηγεί το παραπάνω αποτέλεσμα.

Είναι ξεκάθαρο πως η ρεμδεσιβίρη αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προοπτική στην αντιμετώπιση του COVID-19 και επομένως η σφαιρική κατανόηση της είναι εξαιρετικής σημασίας. Οι Gordon et al. ,«χαρτογράφησαν» πλήρως το μηχανισμό δράσης της. Όχι μόνο έδειξαν ότι τερματίζει τη μεταγραφή του ιού με τη μέθοδο καθυστερούμενου τερματισμού και ότι ανταγωνίζεται την ATP για την υπομονάδα nsp12 της πολυμεράσης, αλλά και έδειξαν ότι είναι πιο αποδοτική από το φυσικό υπόστρωμα, κάτι που συνδέεται με την αντίσταση της στην αποδόμηση εξωνουκλεάσης. Αυτό είναι σημαντικό εύρημα που δείχνει ότι μπορεί να είναι ένα εξαιρετικά αποδοτικό φάρμακο. Πράγματι, η μελέτη των [Timothy P Sheahan et al \(2020\)](#) σε ποντίκια, έδειξε ότι η RDV έχει πολύ υψηλότερη απόδοση από άλλες ουσίες που έχουν αντλήσει ενδιαφέρον ως πιθανά θεραπευτικά για το MERS-CoV. Επιπλέον, όσο προχωρούν οι έρευνες, συνεχίζει να έχει ενδιαφέρον ως πιθανός στόχος ,σε αντίθεση με άλλες ουσίες όπως η λοπιναβίρη και τα κορτικοστεροειδή , που αν και αρχικά άντλησαν ενδιαφέρον, τελικά αποδείχτηκαν αναποτελεσματικές. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί, ότι ενώ η έρευνα των Gordon et al. επικεντρώθηκε στο MERS-COV, οι ίδιοι δημοσίευσαν και συμπληρωματική έρευνα που ακολουθεί το ίδιο πρωτόκολλο για τον SARS-COV-2 και κατέληξαν σε ανάλογα αποτελέσματα.

Δε θα μπορούσε να μην επισημανθεί μια αντίφαση στη σχετική βιβλιογραφία. Το review των Li Ziyi et al,(2020) επισημαίνει ότι δεν είναι σίγουρο πως η RDV είναι ασφαλής για χορήγηση σε ανθρώπους, αναφερόμενο σε έλλειψη δεδομένων από κλινικές δοκιμές και την εμφάνιση κυτταροτοξικότητας από τη χρήση της σε ασθενείς με Ebola. Η έρευνα των Gordon et al., από την άλλη λέει ότι υπάρχουν «human safety data» παρότι είναι προγενέστερη. Πιο πρόσφατα οι Maegan L et al,(2020) παρατήρησαν ότι η RDV είναι πιθανό να προκαλέσει ζημιά στα νεφρά. Όπως και να, έχει είναι ξεκάθαρα σημαντικό να ενταθεί η έρευνα γύρω από τη ρεμδεσιβίρη ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί σύντομα για μαζική θεραπεία.

### **Βιβλιογραφία**

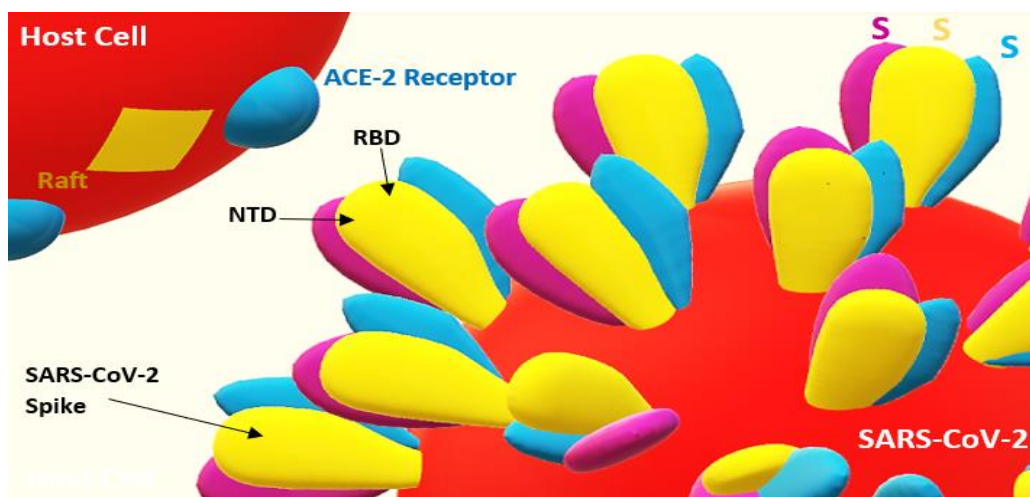
1. [Gordon](#) C. et al, The Journal of Biological Chemistry 295, 4773-4779 (2020), The Antiviral Compound Remdesivir Potently Inhibits RNA-dependent RNA polymerase From Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
2. [Gao](#) Y. et al, Science 779-782 (2020), Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 Virus
3. [Shannon](#) A. et al, Antiviral research (2020), Remdesivir and SARS-CoV-2: Structural Requirements at Both nsp12 RdRp and nsp14 Exonuclease Active-Sites
4. [Sheahan](#) T. et al, *Nature Communications* volume 11, Article number: 222 (2020), Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV
5. Li Z. et al, [Drug Discov Ther.](#) 73-76 (2020), Rapid Review for the Anti-Coronavirus Effect of Remdesivir
6. B. Cao et al, The New England journal of medicine, 1787-1799(2020) A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19
7. Zha L. et al, Med J Aust (9): 416-420, (2020) Corticosteroid treatment of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)
8. Adamsick M. et al, Journal of the American Society of Nephrology Volume 31, Issue 6 (2020), Remdesivir in Patients with Acute or Chronic Kidney Disease and COVID-19

9. Gordon C. et al, The journal of biological chemistry (20):6785-6797, (2020) Remdesivir Is a Direct-Acting Antiviral That Inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 with High Potency
10. Laurel Oldach, ASBMBTODAY, 2020, A mechanism for remdesivir activity and a platform to test other antivirals

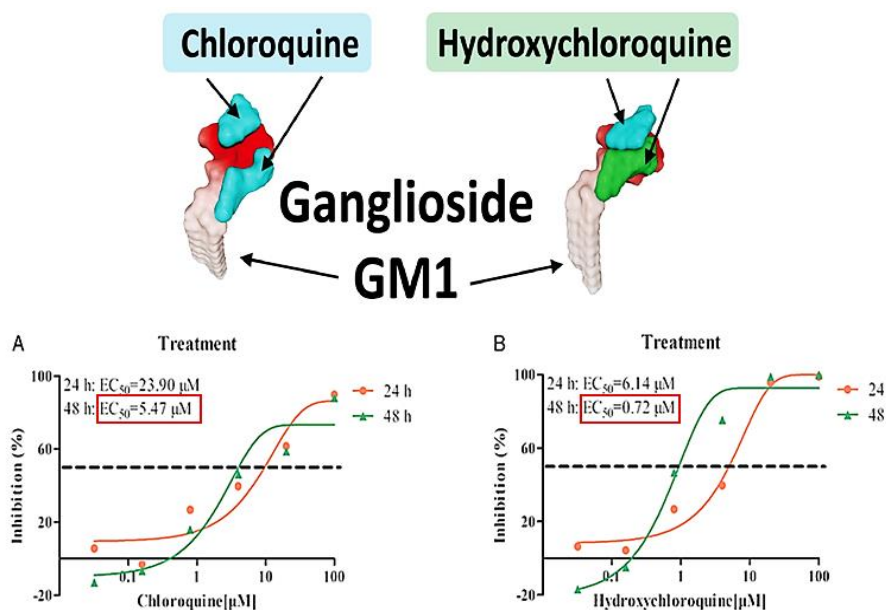


*Πώς ο μηχανισμός προσκόλλησης του SARS-CoV-2 στα κύτταρα ξενιστές μπορεί να παρεμποδιστεί από την χλωροκίνη και την υδροξυχλωροκίνη*

Από την Παλιάγκα Αικατερίνη  
(Α.Μ.: 1899)



**Εικόνα 6:** Η προσκόλληση του SARS-CoV-2 στα κύτταρα ξενιστές επιτυγχάνεται μέσω δύο διαφορετικών περιοχών της κικής πρωτεϊνής ακίδας (S). Την περιοχή RBD (receptor binding region) και την περιοχή NTD (N-terminal domain).



**Εικόνα 7:** Η CLQ και η CLQ-OH δεσμεύονται σε γαγγλιοσίδες που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του πνεύμονα, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσβαση του ιού σε αυτές. Από τα δύο αυτά

φαρμακευτικά μόρια η CLQ-OH ασκεί ισχυρότερη αντική δράση έναντι του SARS-CoV-2 (τροποποιημένη από Fantini J. et al. 2020 και Yao X. et al. 2020).

**Ο SARS-CoV-2, όπως και άλλοι ανθρώπινοι κοροναϊοί, προκειμένου να εισέλθει στα κύτταρα ξενιστές (κύτταρα πνεύμονα) θα πρέπει να δεσμευτεί τόσο με τον ανθρώπινο υποδοχέα ACE-2 (hACE-2) των κυττάρων ξενιστών, όσο και με σιαλικά οξέα συνδεδεμένα με γαγγλιοσίδες, τα οποία εντοπίζονται στην επιφάνεια των εν λόγω κυττάρων. Η προσκόλληση αυτή επιτυγχάνεται μέσω δύο διαφορετικών περιοχών της ιικής πρωτεΐνης ακίδας (S). Την περιοχή RBD και την περιοχή NTD. Αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής NTD, σημαντικά για την προσκόλληση του ιού στα κύτταρα στόχους, επιτρέπουν στον εν λόγω ιό να δεσμεύεται αρκετά ισχυρά με αυτά με αποτέλεσμα, την ταχύτερη εξάπλωσή του από άτομο σε άτομο.<sup>[1][2]</sup> Τα μόρια CLQ και CLQ-OH, τα οποία έχουν προταθεί για την καταπολέμηση της νόσου COVID-19, ασκούν την αντική τους δράση ακριβώς σε αυτό το στάδιο. Δηλαδή, δεσμεύονται σε γαγγλιοσίδες που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του πνεύμονα, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσβαση του ιού σε αυτές. Από τα δύο αυτά φαρμακευτικά μόρια φαίνεται ότι η CLQ-OH ασκεί ισχυρότερη αντική δράση έναντι του SARS-CoV-2.<sup>[1][2]</sup>**

Πρόσφατα έκανε την εμφάνισή του ένας νέος παθογόνος κοροναϊός ο SARS-CoV-2, ο οποίος σύμφωνα με έρευνες φαίνεται να μεταδόθηκε στον άνθρωπο από την νυχτερίδα. Ο ιός αυτός αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου COVID-19 και είναι ο έβδομος κοροναϊός μέχρι σήμερα, που φαίνεται να προκαλεί λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος στους ανθρώπους.<sup>[1][2]</sup> Ο SARS-CoV-2, όπως και άλλοι ανθρώπινοι κοροναϊοί, προκειμένου να εισέλθει στα κύτταρα ξενιστές (κύτταρα πνεύμονα) θα πρέπει να δεσμευτεί τόσο με τον υποδοχέα hACE-2, των κυττάρων ξενιστών, όσο και με σιαλικά οξέα συνδεδεμένα με γαγγλιοσίδες, τα οποία εντοπίζονται στην επιφάνεια των εν λόγω κυττάρων.<sup>[1][2]</sup>

Η πρωτεΐνη (S) της ακίδας του SARS-CoV-2 αποτελείται από δύο περιοχές μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η προσκόλλησή του ιού στα κύτταρα ξενιστές. Την περιοχή RBD (receptor binding region), η οποία εμπλέκεται σε λειτουργικές αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα ACE-2 των κυττάρων ξενιστών, καθώς επίσης και την περιοχή NTD (N-terminal domain). Η NTD περιοχή είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του ιού σε περιοχές πλούσιες σε γαγγλιοσίδες (λιπιδιακές σχεδίες) και πιο συγκεκριμένα είναι σε θέση να δεσμεύσει δύο μόρια γαγγλιοσίτη σχηματίζοντας ένα τριμοριακό σύμπλεγμα με συμμετρική δομή τύπου δισκοπότηρου. Καλύπτει μια έκταση 52 αμινοξικών καταλοίπων (aa 111-162) και αποτελείται από μια μεγάλη επίπεδη επιφάνεια, η οποία περιέχει αρωματικά και βασικά αμινοξικά κατάλοιπα. Τα κατάλοιπα αυτά οργανώνονται με τέτοιο τρόπο δημιουργώντας ένα μοτίβο, το οποίο αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές, μία κεντρική αρωματική περιοχή και δύο τερματικές/ακραίες βασικές περιοχές. Μοτίβο το οποίο συναντάται συχνά σε GBD (ganglioside binding domain)



όπου, ο όρος  $X_n$  αναφέρεται σε παρεμβαλλόμενα τμήματα 4 έως 5 αμινοξικών καταλοίπων, τα οποία μπορεί να περιέχουν οποιοδήποτε αμινοξύ αλλά συχνότερα Gly, Pro ή/και Ser.<sup>[2]</sup>

Η εξέλιξη αυτού του μοτίβου έχει προσδώσει στον ιό SARS-CoV-2 ενισχυμένη ικανότητα προσκόλλησης στην αναπνευστική οδό μέσω βελτιωμένης αλληλεπίδρασης ακίδας-γαγγλιοσιδίου.<sup>[2]</sup> Παράλληλα, έρευνες αναφέρουν ότι η ακίδα του SARS-CoV-2 είναι 10 έως 20 φορές πιο πιθανό να δεσμευτεί στον υποδοχέα των κυττάρων του ξενιστή hACE-2 από ότι η ακίδα του SARS, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο ιός SARS-CoV-2 εξαπλώνεται πολύ πιο εύκολα από άτομο σε άτομο σε σχέση με άλλους κοροναϊούς.<sup>[1]</sup>

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 εμφανίζεται ταυτόσημο με εκείνο του ιού Bat-conRaTG13 κατά ένα ποσοστό περίπου 97%.<sup>[1]</sup> Μάλιστα, φαίνεται ότι αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής NTD που μεσολαβούν στην σύνδεση της ακίδας του SARS-CoV-2 είναι πλήρως συντηρημένα μεταξύ των παγκοσμίως κλινικά απομονωμένων στελεχών SARS-CoV-2, καθώς επίσης και με τον Bat-conRaTG13, γεγονός το οποίο ενισχύει την υπόθεση μετάδοσης του ιού από την νυχτερίδα στον άνθρωπο.<sup>[2]</sup>

Όλο αυτό το χρονικό διάστημα διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να βρεθεί άμεσα το κατάλληλο θεραπευτικό πρωτόκολλο για την αντιμετώπιση της νόσου COVID-19. Δύο από αυτά τα φαρμακευτικά σκευάσματα είναι η CLQ (Chloroquine) και η CLQ-OH (Hydroxychloroquine), μόρια τα οποία φαίνεται να δρουν ως ισχυροί αναστολείς έναντι των περισσότερων κοροναϊών. Οι Jacques Fantini *et al.* (2020) θέλησαν να ελέγξουν κατά πόσο τα εν λόγω μόρια είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν τον SARS-CoV-2. Έτσι, χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό προσεγγίσεων δομικής και μοριακής μοντελοποίησης *in silico* αποδείξανε ότι τόσο η CLQ όσο και η CLQ-OH συνδέονται με υψηλή συγγένεια με απομονωμένα σιαλικά οξέα, συμπεριλαμβανομένου του 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid (9-O-SIA), με το οποίο φαίνεται ότι ο SARS-CoV-2 προτιμά να αλληλεπιδρά. Παράλληλα, δείξανε ότι τα δύο αυτά μόρια είναι σε θέση να συνδέονται με μονάδες σιαλικών οξέων στο φυσικό τους περιβάλλον (κύτταρα αναπνευστικής οδού), δηλαδή με σιαλικά οξέα δεσμευμένα σε γαγγλιοσίτες (όπως το GM1, αντιπροσωπευτικότερο γαγγλιοσίδιο της πλασματικής μεμβράνης των ανθρώπινων κυττάρων), καταλαμβάνοντας την ίδια θέση δέσμευσης πάνω στο μόριο του γαγγλιοσιδίου. Μάλιστα, σε κάθε μόριο GM1 εντόπισαν δύο θέσεις δέσμευσης των φαρμάκων οι οποίες είναι τοποθετημένες στο πολικό σακχαριτικό τμήμα του μορίου.<sup>[1][2]</sup>

Συνεπώς, η CLQ και η CLQ-OH περιέχοντας μοριακές ομάδες οι οποίες μιμούνται πλήρως τον τρόπο δέσμευσης της ιικής πρωτεΐνης (S) σε γαγγλιοσίτες, είναι σε θέση να συνδεθούν με το γαγγλιοσίδιο αποτρέποντας οποιαδήποτε πρόσβαση του ιού στις μονάδες Glc και GalNAc του GM1, κρίσιμα συνδετικά κατάλοιπα για τα αμινοξέα Phe-125 και Asn-137, αντίστοιχα, της περιοχής NTD.<sup>[2]</sup> Η CLQ-OH (EC<sub>50</sub>=0.72 μM) εμφανίζεται να έχει ισχυρότερη αντική δραστηριότητα έναντι του SARS-CoV-2 σε σχέση με την CLQ (EC<sub>50</sub>= 5,47 μM), καθώς όπως προκύπτει από τις τιμές EC<sub>50</sub> για τα δύο αυτά μόρια, απαιτείται πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωροκίνης σε σχέση με αυτή της υδροξυχλωροκίνης προκειμένου να επιτευχθεί το μισό της μέγιστης δράσης του φαρμάκου.<sup>[2][3]</sup>

Φαίνεται λοιπόν ότι, τόσο η χλωροκίνη όσο και η υδροξυχλωροκίνη μπορούν να συμβάλουν στην αντιμετώπιση της νόσου COVID-19 αποτρέποντας την είσοδο του ιού SARS-CoV-2 στα κύτταρα ξενιστές. Έντονος είναι όμως ο προβληματισμός της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με τους κινδύνους που εγκυμονεί η χρήση των παραπάνω μορίων.

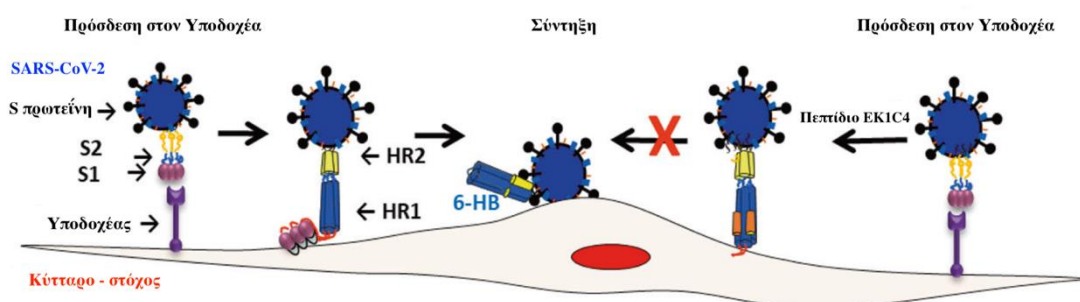
Ιδιαίτερο κίνδυνο φαίνεται να διατρέχουν οι ασθενείς στους οποίους γίνεται οξεία χορήγηση χλωροκίνης, καθώς υπάρχει μικρός κίνδυνος εμφάνισης αμφιβληστροειδοπάθειας της ωχράς κηλίδας, η οποία εξαρτάται από τη συσσωρευτική δόση, ενώ επίσης έχει αναφερθεί η καρδιομυοπάθεια ως σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια, η οποία προκαλείται λόγω της χρήσης του συγκεκριμένου μορίου.<sup>[1]</sup> Σημαντικό θα ήταν λοιπόν να δοθεί ιδιαίτερη βαρύτητα από την μεριά της επιστημονικής κοινότητας στην ανεύρεση των πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών που μπορεί να έχουν τα φαρμακευτικά αυτά σκευάσματα για τους ασθενείς στους οποίους χορηγούνται, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η χρήση τους είναι τελικά ασφαλής ή όχι. Παράλληλα, σημαντικός κρίνεται και ο έλεγχος άλλων λιγότερο επιβλαβών για τους ασθενείς μορίων προκειμένου, να διαπιστωθεί κατά πόσο μπορούν να ασκήσουν αντική δράση έναντι του SARS-CoV-2. Σύμφωνα με τον ερευνητή Undurti N. Das (2020) ως τέτοια αντικά μόρια θα μπορούσαν να δράσουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα AA, EPA και το DHA, καθώς και οι μεταβολίτες αυτών.<sup>[4]</sup>

### **Βιβλιογραφία**

1. Devaux c.a. *et al. International journal of antimicrobial agents* **55**, 105938 (2020).
2. Fantini j. *Et al. International journal of antimicrobial agents* **55**, 105960 (2020).
3. Yao x. *Et al. Clinical infectious diseases*, xx(xx):1–8 (2020).
4. Das u. N. *Archives of medical research* **51**, 282-286 (2020).

**Πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2:  
Αίτιο της έντονης μολυσματικότητάς του και πιθανός  
θεραπευτικός στόχος**

Από τον Τζιαβάρια Κωνσταντίνο  
(Α.Μ.: 1921)



**Εικ.8** Αριστερά: Ο μηχανισμός εισόδου του SARS-CoV-2 στα κύτταρα του ξενιστή, Δεξιά: Η αντική δράση του πεπτιδίου EK1C4 (Πηγή: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0374-2>)

Τον Απρίλιο του 2018, ο Π.Ο.Υ. (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) δημοσίευσε μια λίστα παθογόνων υψηλής προτεραιότητας, γνωστή ως “*Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts*” (<https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>). Στην λίστα αυτή συμπεριλαμβάνονταν πολλοί γνωστοί ιοί, όπως οι ιοί Ebola, Zika, SARS-CoV, MERS-CoV, καθώς και η “Disease X”. Ως Disease X αναφέρεται οποιαδήποτε ασθένεια που μπορεί να εξελιχθεί σε επιδημία ή πανδημία και η οποία θα προκληθεί από ένα άγνωστο, νέο παθογόνο. Η έξαρση της σοβαρής αναπνευστικής νόσου COVID-19 στην πόλη Ουχάν της Κίνας, τον Δεκέμβριο του 2019, με αιτιολογικό παράγοντα τον SARS-CoV-2, θεωρείται η πρώτη Disease X. Από τότε η νόσος COVID-19 έχει εξελιχθεί σε μια παγκόσμια πανδημία, που μετρά περισσότερα από 385.000 θύματα. Αυτή την στιγμή δεν υπάρχει κάποια ειδική θεραπεία για την πρόληψη ή την αντιμετώπιση του COVID-19. Έτσι, η ανάπτυξη νέων, ειδικών, αποτελεσματικών και ασφαλών φαρμάκων που μπορούν να αποτρέψουν ή να θεραπεύσουν την μόλυνση από τον SARS-CoV-2 κρίνεται υψίστης σημασίας για την καταπολέμηση μίας εκ των πιο μολυσματικών επιδημιών των τελευταίων ετών. Για να επιτευχθεί η ανάπτυξη τέτοιων ειδικών φαρμάκων έναντι του SARS-CoV-2, πρώτα πρέπει να προσδιοριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ο ιός μολύνει τα κύτταρα του ξενιστή. Η πρωτοποριακή μελέτη των Xia. S. et al, παρέχει ενθαρρυντικά στοιχεία και ένα διαφορετικό τρόπο προσέγγισης για την θεραπεία της νόσου COVID-19. Οι εν λόγω ερευνητές εστιάζουν στην εύρεση λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης S (spike protein), που είναι απαραίτητες για την σύντηξη του ιού

**με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή και στην ανάπτυξη αποτελεσματικών αναστολέων έναντι αυτών των περιοχών.**

Στην συγκεκριμένη μελέτη, αρχικά επιβεβαίωσαν *in vitro* (cell-cell fusion system) ότι η πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 είναι αναγκαία και ικανή για την σύντηξη του ιού με τα κύτταρα του ξενιστή. Η πρωτεΐνη S αποτελείται από δυο υπομονάδες την S1 και την S2. Η S1 είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του υποδοχέα του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, δηλαδή το ανθρώπινο ένζυμο μετατροπής της αγγειοτασίνης - II (hACE2). Ενώ η S2 είναι απαραίτητη για την σύντηξη του ιού με το κύτταρο του ξενιστή. Μόλις η S1 αλληλεπιδράσει με το hACE2 προκαλούνται αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση της S2. Συγκεκριμένα οι περιοχές HR-1 (heptad repeat 1) και HR-2 (heptad repeat 2) της S2 έρχονται πιο κοντά, κυρίως μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, και σχηματίζουν μια δομή 6-HB (six-helical bundle). Η δημιουργία αυτής της δομής είναι απαραίτητη για την μολυσματικότητα του ιού, καθώς φέρνει σε πολύ κοντινή απόσταση τον ιό με την κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας έτσι την σύντηξή τους (Εικ.1).

Στην συνέχεια, οι ερευνητές έλυσαν την δομή 6-HB του SARS-CoV-2 μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Είναι γνωστό ότι ο SARS-CoV-2 έχει πολλές ομοιότητες με τον SARS-CoV, τον αιτιολογικό παράγοντα του SARS. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες S των δύο ιών παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία στην αμινοξική τους ακολουθία. Η κρυσταλλογραφία της δομής 6-HB έδειξε ότι η διαμόρφωση αυτή είναι αρκετά όμοια με εκείνη του SARS-CoV και ιδιαίτερα συντηρημένη στους ανθρώπινους κορωνοϊούς (HCoV). Παρόλα αυτά στην περιοχή HR1 της S2 υπομονάδας του SARS-CoV-2 υπάρχουν μερικά διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα σε σχέση με τον SARS-CoV. Αυτά τα μεταλλαγμένα κατάλοιπα πιθανόν οδηγούν σε ισχυρότερη αλληλεπίδραση της περιοχής HR-1 με την HR-2, σταθεροποιώντας περαιτέρω την δομή 6-HB. Έτσι, είναι πολύ πιθανόν η ύπαρξη αυτών των νέων αμινοξικών καταλοίπων να είναι ένας από τους λόγους που ο ιός εμφανίζει τόσο ιδιαίτερα υψηλή μολυσματικότητα.

Σε προηγούμενες μελέτες τους, οι συγκεκριμένοι ερευνητές είχαν σχεδιάσει το πεπτιδίο EK1, το οποίο δρα σαν αναστολέας της σύντηξης ιού - κυττάρου ξενιστή σε πληθώρα κορωνοϊών, όπως οι SARS-CoV και MERS-CoV, στοχεύοντας την περιοχή HR1 του εκάστοτε ιού. Στην εργασία τους έδειξαν ότι το συγκεκριμένο πεπτιδίο εμφανίζει ανασταλτική δράση κατά του SARS-CoV-2 *in vitro* (Εικ.1), καθώς επίσης και σε περιπτώσεις μόλυνσης με SARS-CoV-2 ψευδοϊό (PsV infection).

Ακολούθως, σχεδίασαν μια πιο ειδική και αποτελεσματική “παραλλαγή” του πεπτιδίου EK1 για τον SARS-CoV-2, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της HR-1 περιοχής του. Για να το πετύχουν αυτό πρόσθεσαν υδρόφοβα μόρια, όπως η χοληστερόλη και το παλμιτικό οξύ, στο πεπτιδίο EK1, καθώς έχει δείχθει ότι η προσθήκη τέτοιων μορίων αυξάνει την ανασταλτική δραστηριότητα παρόμοιων αντικών πεπτιδίων. Από τις παραλλαγές που σχεδίασαν, το πεπτιδίο **EK1C4** (προσθήκη ενός μορίου χοληστερόλης στο πεπτιδίο EK1, με “μοριακό συνδέτη” το ολιγοπεπτιδίο Gly-Ser-Gly-Ser-Gly και το PEG4, Εικ.2) παρουσίαζε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στη σύντηξη του SARS-CoV-2 *in vitro*, καθώς επίσης και σε περιπτώσεις μόλυνσης με SARS-CoV-2 ψευδοϊό (226 φορές και 149 φορές πιο αποτελεσματικό, αντίστοιχα).





**Εικ.9** Το πεπτιδίο EK1C4 (Πηγή <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x>)

Έπειτα, έδειξαν ότι το πεπτιδίο EK1C4 είναι αποτελεσματικό στην παρεμπόδιση της σύντηξης ενός συνόλου διαφορετικών κορωνοϊών όπως ο SARS-CoV, ο MERS-CoV και ο HCoV-OC43 (cell-cell fusion system και PsV infection). Επιπλέον το πεπτιδίο EK1C4 δεν εμφάνιζε κάποια ιδιαίτερη κυτταροτοξικότητα *in vitro* σε μια πληθώρα κυτταρικών τύπων που δοκιμάστηκε (selectivity index: SI > 136). Ενώ τέλος, το χορήγησαν ενδορινικώς σε ζωικό μοντέλο ποντικού το οποίο μόλυναν με HCoV-OC43. Η χορήγηση του EK1C4 τόσο πριν όσο και μετά την μόλυνση των ποντικών με τον HCoV-OC4,3 αύξησε σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης τους.

Όπως προαναφέρθηκε, δεν υπάρχουν ειδικά φάρμακα για την πρόληψη ή την αντιμετώπιση του SARS-CoV-2. Σε διάφορες κλινικές μελέτες όμως έχουν χρησιμοποιηθεί κάποια μη ειδικά αντικά φάρμακα, όπως η ρεμδεσιβίρη, η χλωροκίνη και η υδροξυχλωροκίνη δίνοντας θετικά αποτελέσματα. Η ρεμδεσιβίρη είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση πληθώρας RNA ιών *in vitro*. Δρα ως ανάλογο της αδενοσίνης και ενσωματώνεται στο αντιγραφόμενο ιικό γονιδίωμα, οδηγώντας σε πρόωρη λήξη της αντιγραφής. Ενώ η χλωροκίνη, και το παράγωγό της υδροξυχλωροκίνη, είναι ασθενείς βάσεις και αυξάνουν το pH των όξινων ενδοκυττάρων οργανιδίων, όπως είναι τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα, εμποδίζοντας έτσι την μεταφορά των ιικών σωματίων από τα ενδοσώματα στα ενδολυσοσώματα. Η παραπάνω μεταφορά φαίνεται πως είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα.

Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητά τους έναντι του SARS-CoV-2 καθώς και η ασφάλεια της χρήσης τους χρήζουν περαιτέρω μελέτης. Η χρήση του ειδικού πεπτιδίου EK1C4 για τον SARS-CoV-2, πιθανόν να είναι ωφελιμότερη σε σχέση με την χρήση των παραπάνω μη ειδικών φαρμάκων, καθώς διαθέτει έναν ισχυρό γενετικό φραγμό κατά της ανάπτυξης αντοχής αφού είναι ειδικό για την HR1 περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την μολυσματικότητα του SARS-CoV-2. Επίσης, η ανάπτυξη και η χορήγηση ενός σκευάσματος με δραστική ουσία το πεπτιδίο EK1C4, τοπικά (ρινικό εκνέφωμα) και όχι συστηματικά, θα είναι πιθανόν πιο ασφαλής σε σχέση με την συστηματική χορήγηση των κλασσικών αντικών φαρμάκων.

Εν κατακλείδι, η επιστημονική κοινότητα είναι ενωμένη και γίνεται μια παγκόσμια προσπάθεια με ταχύτατους ρυθμούς για την καταπολέμηση του SARS-CoV-2. Στο επίκεντρο αυτής της προσπάθειας είναι η εύρεση ειδικών και αποτελεσματικών θεραπευτικών εργαλείων. Και επειδή <<Το δε προνοείν και προλαμβάνειν κρείττον εστί του θεραπεύειν>>, η εύρεση ειδικών ουσιών που παρεμποδίζουν την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή αποτελεί ίσως την ωφελιμότερη προσέγγιση.

### **Βιβλιογραφία**

1.WHO. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts.

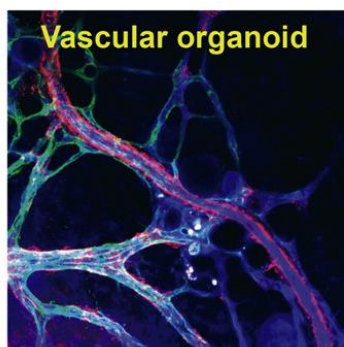
<https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts> (2019).

- 2.WHO. Coronavirus disease (accessed 05 June 2020). <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> .
- 3.Xia, S. et al. Cell Mol. Immunol. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0374-2> (2020).
- 4.Chong, H. et al. J. Virol. 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00288-17> (2017).
- 5.Wang, M. et al. Cell Res. 30. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0> (2020).
- 6.Liu, J. et al. Cell Discovery. 6(1), <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0> (2020).
- 7.Xia, S. et al. Cell Research, 30(4), <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x> (2020).

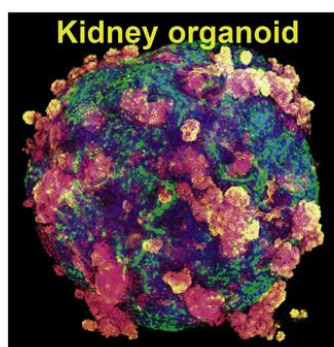


*Ο SARS-CoV-2 μολύνει άμεσα αγγειακά και νεφρικά οργανοειδή και το ανθρώπινο διαλυτό ένζυμο ACE2 μπορεί να τον περιορίσει*

Από τον Τσιούρη Αλέξανδρο  
(Α.Μ.: 1927)

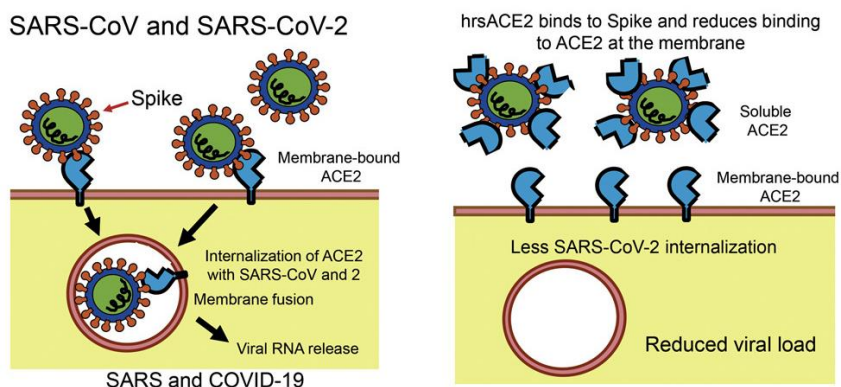


SARS-CoV-2 replicates in human blood vessel and kidney organoids which is inhibited by hrsACE2



Εικόνα 1. Αγγειακό οργανοειδές (αριστερά) και νεφρικό οργανοειδές (δεξιά) όπου μολύνθηκαν με τον ιό και εξετάστηκε η δράση του hrsACE2. [Monteil et al., 2020, Cell 181, 1–9]

Ο ιός SARS-CoV-2 έχει μολύνει μέχρι σήμερα σχεδόν 7 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, ενώ οι θάνατοι ξεπερνούν τους 400 χιλιάδες. Η έκταση που μπορεί να φτάσει αυτή η πανδημία είναι άγνωστη, αλλά οι επιστήμονες αναζητούν καθημερινά τρόπους να περιοριστεί. Για το σκοπό αυτό, ο υποδοχέας του ιού έγινε βασικός στόχος για την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας. Το ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) αποτελεί τον υποδοχέα του ιού. Το ACE2 εντοπίζεται σε πολλά συστήματα οργάνων, όπως το αναπνευστικό, το καρδιαγγειακό, το πεπτικό και το ουροποιητικό, με το αναπνευστικό να αποτελεί τον κύριο στόχο του ιού και διαταραχές αυτού απαρτίζουν τα σοβαρότερα και κυριότερα συμπτώματα. Το ACE2 αποτελεί κεντρικό στοιχείο του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) και έχει δειχθεί ότι είναι ρυθμιστικό στοιχείο στην παθογένεια των πνευμόνων. Το ACE2 τεμαχίζει την αγγειοτενσίνη I για την παραγωγή αγγειοτενσίνης II, η οποία δρα ως επαγωγέας οξείας πνευμονικής βλάβης μέσω διάφορων μηχανισμών, περιλαμβανομένης της αύξησης της διαπερατότητας των αγγείων. Όταν η αγγειοτενσίνη II είναι αυξημένη, το ACE2 δρα προστατευτικά μειώνοντας τα επίπεδά της [6]. Ο SARS-CoV-19, όπως και ο SARS-CoV, μειώνοντας την έκφραση του ACE2 οδηγεί σε οξεία πνευμονική ανεπάρκεια [7]. Έναντι αυτού, κατασκευάστηκε το ανθρώπινο ανασυνδυασμένο διαλυτό ACE2 (hrsACE2) με διττή δράση: 1) προσδένεται με τον ιό και μειώνει την εξάπλωσή του και 2) προστατεύει τους πνεύμονες από τραυματισμό καθώς κρατά το ACE2 σε φυσιολογικά επίπεδα [2]. Οι Monteil et al. ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι το hrsACE2 μπορεί να δράσει ως γενικός αναστολέας του SARS-CoV-2 στον οργανισμό, χρησιμοποιώντας οργανοειδή που προσομοιάζουν τριχοειδή αγγεία και τους νεφρούς [1].



**Εικόνα 2.** Μηχανισμός μετάδοσης ιού στο εσωτερικό του κυττάρου (αριστερά). Δράση του hrsACE2 ως αναστολέας (δεξιά). [Monteil et al., 2020, Cell 181, 1–9]

Ένα από τα πρώτα πράγματα που έπρεπε να ελεγχθούν ήταν η προστατευτική λειτουργία του hrsACE2. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια ειδική κυτταρική σειρά για μελέτη ιών (Vero cells), η οποία επιμολύνθηκε με τον SARS-CoV-2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σε κάθε περίπτωση, μετά την χρήση hrsACE2 η ανάπτυξη του ιού μειώθηκε κατά 1000 με 5000 φορές. Όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του hrsACE2 η δράση του ήταν πιο καθοριστική, καθιστώντας το δοσολογικά εξαρτώμενο.

Παράλληλα με τον έλεγχο της δράσης του hrsACE2, οι ερευνητές θέλησαν να επιδείξουν την άμεση δράση του ιού σε άλλα όργανα εκτός των πνευμόνων. Έτσι, κατασκεύασαν δύο τύπους οργανοειδών, τα οποία αποτελούν τεχνητές προσομοιώσεις οργάνων που κατασκευάζονται μέσω ελεγχόμενης διαφοροποίησης πολυδύναμων και όχι μόνο βλαστικών κυττάρων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (με χρήση μεταγραφικών παραγόντων) σε συγκεκριμένο περιβάλλον και για αρκετό χρονικό διάστημα.

Λόγω του μεγέθους του (80-100nm), ο ιός για να επεκταθεί στον οργανισμό θα έπρεπε ή να υπάρχει τραυματισμός από όπου θα μπορούσε να περάσει ή να μεταναστεύσει μέσω του αγγειακού συστήματος. Έτσι, κατασκεύασαν αγγειακά οργανοειδή τα οποία μολύνθηκαν με τον ιό. Παρατηρήθηκε αντιγραφή του ιού ενώ το δείγμα μολυσμένου ιστού είχε τη δυνατότητα να μολύνει κυτταροκαλλιέργειες Vero. Άρα, τα αγγεία είναι δυνατόν να μολυνθούν άμεσα από τον SARS-CoV-2. Το hrsACE2 έδρασε θετικά σε αρχικά στάδια της μόλυνσης στα αγγειακά οργανοειδή και περιόρισε την μόλυνση.

Τα νεφρικά οργανοειδή ήταν ο δεύτερος τύπος με τον οποίο ασχολήθηκαν οι ερευνητές, καθώς είχε αποδειχθεί ότι ο υποδοχέας ACE2 εκφράζεται σημαντικά και στα νεφρικά σωληνάκια. Το εύρημα ότι οι νεφροί είναι άμεσος στόχος του SARS-CoV-2 μέσω του ACE2 ενισχύεται μέσω της μελέτης των Lin et al., όπου προτείνεται ότι η νεφρική βλάβη σε ασθενείς με COVID-19 δεν οφείλεται αποκλειστικά σε ανοσολογική απόκριση του ξενιστή στον ιό. Στους νεφρούς, ο ACE2 εντοπίζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, αλλά με πιο έντονη έκφραση στα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου. Εκτός από την μόλυνση στους νεφρούς, εντοπίζεται μόλυνση και στην κύστη ασθενών, όμως μικρότερης έκτασης συγκριτικά, καθώς τα νεφρά έχουν μεγαλύτερη έκφραση σε ACE2 και έτσι μεγαλύτερη ευαισθησία. Ανάλυση 12 νεφρικών κυτταρικών τύπων έδειξε την έκφραση ACE2 σε όλους τους επιθηλιακούς κυτταρικούς τύπους, με σταδιακή μείωση της έκφρασης από το εξωτερικό επιθήλιο προς τα

εσωτερικά στρώματα [5]. Καθώς έχουν παρόμοιες κυτταρικές σειρές με τους φυσικούς νεφρούς τα οργανοειδή παρουσίαζαν τον υποδοχέα ACE2 και επομένως η μόλυνση με SARS-CoV-2 ήταν αναμενόμενα επιτυχής. Ξανά, η χρήση hrsACE2 έδρασε περιοριστικά έναντι του ιού. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι το hrsACE2 δεν εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα οργανοειδή, αλλά ούτε και στη κυτταρική σειρά Vero.

Για την μελέτη της ύπαρξης και των επιπέδων μόλυνσης από τον SARS-CoV-2, τόσο στα κύτταρα Vero, όσο και στους δύο τύπους οργανοειδών οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ως δείκτη το ιικό RNA το οποίο προσδιοριζόταν με την τεχνική qRT-PCR. Οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν σε αυτές που προτάθηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Επιπρόσθετα, μια παράλληλη έρευνα που υποστηρίζει την ευρεία κατανομή του ACE2 στον οργανισμό είναι αυτή των H. Zhang et al., όπου μελετήθηκε το εντερικό σύστημα και η συσχέτιση του με την COVID-19. Το ACE2 εκφράζεται στα ανθρώπινα εντεροκύτταρα του λεπτού εντέρου που εντοπίζονται στην επιφάνειά του. Η παρουσία του εκεί μπορεί να αποτελεί την οδό εισβολής του ιού στο γαστρεντερικό σύστημα και την μετέπειτα επαγωγή φλεγμονής και έτσι μια εναλλακτική οδό σε σχέση με το αναπνευστικό. Μέσω αυτού μπορεί να εξηγηθεί η πεπτική δυσλειτουργία (διάρροια, ναυτία και/ή έμετος, ανορεξία και κοιλιακοί πόνοι) σε πολλούς COVID-19 ασθενείς. Η παρουσία του ιού στα κόπρανα αποτελεί τέλος σημείο μελέτης για τη σχέση του SARS-CoV-2 και της πεπτικής οδού [4].

Συνοψίζοντας, είναι ξεκάθαρο ότι ο SARS-CoV-2 μολύνει άμεσα πολλά όργανα εκτός των πνευμόνων και έτσι θα πρέπει η προσοχή να στραφεί και σε άλλα συστήματα εκτός του αναπνευστικού. Τα αγγειακά και νεφρικά οργανοειδή των Monteil et al. ήταν εξαιρετικά μοντέλα μόλυνσης οργάνων από τον ιό, ο οποίος αντιγράφηκε επιτυχώς και στα δύο είδη παρουσία του υποδοχέα του, ACE2. Αλλά, για να εδραιωθούν ως έμπιστα μοντέλα προσομοίωσης της δράσης του ιού, θα πρέπει να αναπτυχθούν και άλλοι τύποι οργανοειδών, ιδιαίτερα το πνευμονικό, όπου είναι ο κύριος στόχος του SARS-CoV-2, αλλά και το καρδιακό. Τέλος, το hrsACE2 μπορεί να αποτελέσει ένα ασφαλές μέσω περιορισμού της μόλυνσης. Έχει εγκριθεί για ανθρώπινη χρήση και παράλληλα αναπτύσσεται ως θεραπεία κατά του Συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) και έτσι μπορεί για αρχή να ελεγχθεί και η χρήση του έναντι των αναπνευστικών συμπτωμάτων από τον ιό [2]. Επίσης, επισημαίνεται και η έλλειψη τοξικότητας και η ανοχή των ανθρώπινων οργανισμών σε αυτό [3]. Όμως, η δράση του φαίνεται να είναι στα αρχικά στάδια της μόλυνσης και είναι άγνωστο προς το παρόν αν δρα σε μεταγενέστερα στάδια και περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς του.

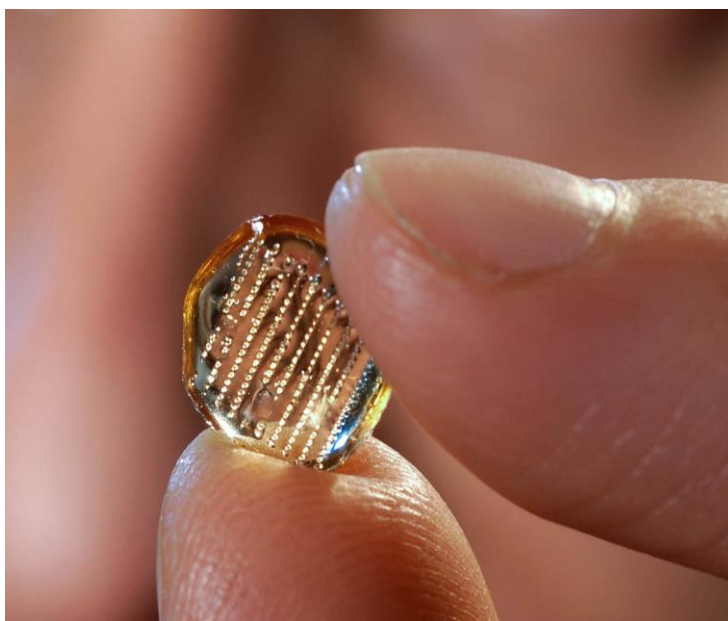
### **Βιβλιογραφία**

- [1] Monteil et al., 2020, Cell 181, 1–9
- [2] Zhang et al., Intensive Care Med (2020) 46:586–590
- [3] Haschke et al., ClinPharmacokinet 52, 783–792 (2013).
- [4] H. Zhang et al., International Journal of Infectious Diseases 96 (2020) 19–24
- [5] Wei Lin et al. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.08.939892>
- [6] Imai Y et al., Nature, 01 Jul 2005, 436(7047):112-116
- [7] Kuba K et al., 2005, Nat Med 11:875–879

*Ανάπτυξη ανώδυνων εμβολίων κατά του SARS-CoV-2 : ένας πολλά υποσχόμενος σύμμαχος έναντι της πανδημίας*

Από την Φιρογλάνη Μοσχή-Μαριάνθη  
(Α.Μ.: 1930)

Οι ερευνητές στο πανεπιστήμιο του Πίτσμπουργκ, κατάφεραν να δημιουργήσουν ένα υποψήφιο εμβόλιο κατά του SARS-CoV-2 , μόλις τέσσερις εβδομάδες μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματος του ιού. Συγκεκριμένα , οι επιστήμονες δημιούργησαν μια βελτιωμένη μορφή της πρωτεΐνης που χρησιμοποιεί ο ιός ώστε να προσδεθεί και ύστερα να εισέλθει στα κύτταρα του ξενιστή . Ως μέσο έγχυσης χρησιμοποιήθηκε το έμπλαστρο εμβολίου (microneedle array) , καθώς ήδη από προηγούμενες μελέτες είχε εμφανίσει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της κλασσικής υποδόριας ένεσης. Πρόκειται για μια μελέτη ,που αν και βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο και πολλά ακόμα πειράματα πρέπει να λάβουν χώρα, φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη . Σε μια πρωτόγνωρη , για όλους μας εποχή , είναι εξαιρετικά ελπιδοφόρο το γεγονός πως οι επιστήμονες βρίσκονται σε ετοιμότητα και μπορούν να τροποποιούν άμεσα ήδη υπάρχουσες μελέτες , ώστε να δημιουργούν πιθανά “όπλα” έναντι ενός εχθρού που απειλεί την παγκόσμια υγεία.



**Εικόνα 1.** Ένα έμπλαστρο εμβολίου (MNA) θα μπορούσε να μειώσει την ανάγκη για επώδυνες βελόνες και να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα της ανοσοποίησης. Στην εικόνα παρουσιάζεται το έμπλαστρο που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Γεωργίας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας για την Παράδοση Φαρμάκων, που περιέχει σειρές από βελόνες μήκους μικρότερου του ενός χιλιοστού. <https://www.npr.org/sections/health-shots/2017/07/23/537287781/beyond-the-nasty-needle-trying-to-make-vaccines-more-comfy-and->

Αρχικά, οι επιστήμονες του πανεπιστημίου του Πίτσμπουργκ, είχαν ως αντικείμενο μελέτης τον MERS-CoV , έναν κορωνοϊό που πρωτοεμφανίστηκε το 2012 στην Σαουδική Αραβία. Κατάφεραν να κατασκευάσουν ανασυνδυασμένες και βελτιωμένες MERS-CoV-S1 υπομονάδες, οι οποίες δημιουργούσαν πλέον τριμερή και έφεραν εξαμερή ιστιδίνης ώστε να γίνεται ευκολότερη η διαδικασία του καθαρισμού τους. Έπειτα από εισαγωγή τους σε ήδη ανοσοποιημένα ποντίκια και με την χρήση ELISA , φάνηκε πως οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αντιδρούσαν ισχυρά με τα ειδικά τους αντισώματα.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί , πως οι ερευνητές επέλεξαν να χρησιμοποιήσουν την S1 υπομονάδα του MERS-CoV ,καθώς γνώριζαν πως ο ιός χρησιμοποιεί αυτή την υπομονάδα για να “αγκυστρωθεί” στον ανθρώπινο ACE2 υποδοχέα και να εισέλθει στο κύτταρο του ξενιστή. Τον ίδιο μηχανισμό φαίνεται να ακολουθεί και ο SARS-CoV-2. Άλλοι επιστήμονες ,όπως οι Elfiky et al., 2020, και Martinez et al., φαίνεται να ασπάζονται και εκείνοι την άποψη , πως η πρωτεΐνη S (spike) είναι καθοριστικής σημασίας για τον ιό. Το γεγονός αυτό την καθιστά εξαιρετικό στόχο υποψήφιων εμβολίων αλλά και φαρμάκων, τα οποία μπορούν να έχουν προληπτική ή θεραπευτική δράση. Επίσης, η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται και το σημείο κλειδί για την κατανόηση του πως ο ιός ξεπέρασε τα όρια του είδους και μεταδόθηκε από ζώο σε άνθρωπο.

Στην συνέχεια , για να ελεγχθεί αν οι παραπάνω πρωτεΐνες μπορούσαν να προκαλέσουν ανοσοποίηση in vivo, εισήχθησαν οι ανασυνδυασμένες υπομονάδες σε ποντίκια με τον παραδοσιακό τρόπο (υποδόρια ένεση) και με έμπλαστρο εμβολίου (MNA). Προέκυψε πως οι IgG αντιδράσεις που προέκυψαν ήταν ισχυρότερες όταν το μέσο έγχυσης ήταν το MNA παρά η κλασσική ένεση.

Έπειτα ήταν αναγκαίο να ελεγχθεί αν τα προκύπτοντα αντισώματα μπορούν να εξουδετερώσουν αποτελεσματικά τον ιό. Για τον λόγο αυτό , τα ποντίκια μολύνθηκαν με τον MERS-CoV. Μετά την 6<sup>η</sup> βδομάδα φάνηκε πως με την MNA έγχυση της υποψήφιας υπομονάδας , δημιουργείται ισχυρή εξουδετερωτική δραστηριότητα, μεσολαβούμενη από αντισώματα ,που μάλιστα προσεγγίζει την δραστηριότητα που προκαλείται από τον εμβολιασμό ζωντανών αδενοβακτηρίων. Επίσης , υπερβαίνει την ισχυρή εξουδετερωτική δραστηριότητα που παρατηρείται από την υποδόρια έγχυση, ακόμη και όταν ένα ισχυρό εξωγενές πρόσθετο προστίθεται στο υποδόριο εμβόλιο. Η πολλά υποσχόμενη ανοσογονικότητα των εμβολίων MNA MERS-CoV χωρίς χημικά ανοσοενισχυτικά αποτελεί ιδανικό υποψήφιο για μελλοντικές κλινικές μελέτες.

Τα ανοσοποιημένα ποντίκια ήταν υπό συνεχή παρακολούθηση για τις επόμενες εβδομάδες και φάνηκε πως τα επίπεδα των αντισωμάτων συνέχιζαν να αυξάνονται έως και 55 εβδομάδες μετά την ανοσοποίηση, όταν το μέσο έγχυσης ήταν το MNA.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα , η μέθοδος έγχυσης Microneedle array (MNA) προκαλεί ισχυρότερες αντιδράσεις ανοσοποίησης από την κλασσική ένεση. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός πως ο παρατεταμένος τοπικός τραυματισμός του δέρματος ενεργοποιεί τους ενδογενείς μηχανισμούς ανοσίας. Δεν είναι όμως το μοναδικό πλεονέκτημα της μεθόδου. Όταν ένα έμπλαστρο τοποθετηθεί, οι μικροβελόνες που πιέζονται στο δέρμα του ατόμου ,είναι αρκετά μακριές για να τρυπήσουν το εξωτερικό στρώμα του δέρματος και να παραδοθεί το φάρμακο, αλλά δεν φτάνουν αρκετά βαθιά για να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς πόνου - με άλλα λόγια, είναι ανώδυνο. Επιπλέον, δεν απαιτείται η διατήρηση του εμβολίου σε χαμηλή θερμοκρασία και μπορεί να τοποθετηθεί από μη εξειδικευμένο προσωπικό. Αυτό μειώνει το κόστος του εμβολίου και το καθιστά προσιτό σε περισσότερους ανθρώπους. Το έμπλαστρο είναι συμπαγές αλλά απορροφήσιμο, αφού είναι κατασκευασμένο από ένα υλικό που περιέχει μόρια κυτταρίνης και σακχάρων.

Με το ξέσπασμα της πανδημίας του SARS-CoV-2 , οι ερευνητές αποφάσισαν να επαναπροσδιορίσουν τα πειράματά τους. Έτσι , χρησιμοποίησαν τα υπάρχοντα πρωτόκολλα



για την κατασκευή, τον καθαρισμό και την έγχυση ΜΝΑ ανασυνδυασμένης SARS-CoV-2-S1 υπομονάδας σε ποντίκια. Έπειτα από δύο εβδομάδες ανιχνεύθηκαν υψηλά ποσοστά αντισωμάτων έναντι του SARS-CoV-2. Επίσης, η ανοσογονικότητα των εμβολίων ΜΝΑ διατηρήθηκε μετά από αποστείρωση με ακτίνες-γ, υποδηλώνοντας μια βιώσιμη μέθοδο, για να διασφαλιστεί η αποστείρωση των εμβολίων ΜΝΑ για κλινικές εφαρμογές. Όμως οι συγγραφείς επέλεξαν (λανθασμένα) να μην συμπεριλάβουν τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης στο άρθρο τους.

Επισημαίνεται πως, αν και πραγματοποιήθηκαν πειράματα απενεργοποίησης του MERS-CoV σε ποντίκια τα οποία έχουν εμβολιαστεί με ΜΝΑ εμβόλια που περιέχουν την υπομονάδα S1, δεν πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα απενεργοποίησης του SARS-CoV-2. Αυτά τα απαραίτητα πειράματα δεν πραγματοποιήθηκαν, καθώς τα αντισώματα φαίνεται να αποκτούν την δυνατότητα αποτελεσματικής αντιμετώπισης του ιού μετά την 6<sup>η</sup> εβδομάδα. Όταν οι ερευνητές δημοσίευσαν τα αποτελέσματα τους, τα πειράματα βρίσκονταν μόλις στην 4<sup>η</sup> εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό των ποντικιών. Είναι όμως κρίσιμο να υλοποιηθούν, πριν οι μελέτες προχωρήσουν στο στάδιο των κλινικών δοκιμών.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια άμεση και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στην μάχη εύρεσης ενός αποτελεσματικού εμβολίου κατά του SARS-CoV-2. Βεβαίως, πολλά ακόμη πειράματα πρέπει να λάβουν χώρα για να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα αλλά και η ασφάλεια του εμβολίου. Η χορήγηση του εμβολίου με έμπλαστρο, το καθιστά προσιτό για τον ευρύ πληθυσμό. Αυτό ίσως να είναι και το σημείο κλειδί για την καταπολέμηση της πανδημίας. Εκτός από τα εμβόλια που περιέχουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες S1 του SARS-CoV-2, αξιολογούνται και άλλες τεχνολογίες για την κατασκευή εμβολίων, όπως εμβόλια που περιέχουν ολόκληρο τον ιό και εμβόλια που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα.

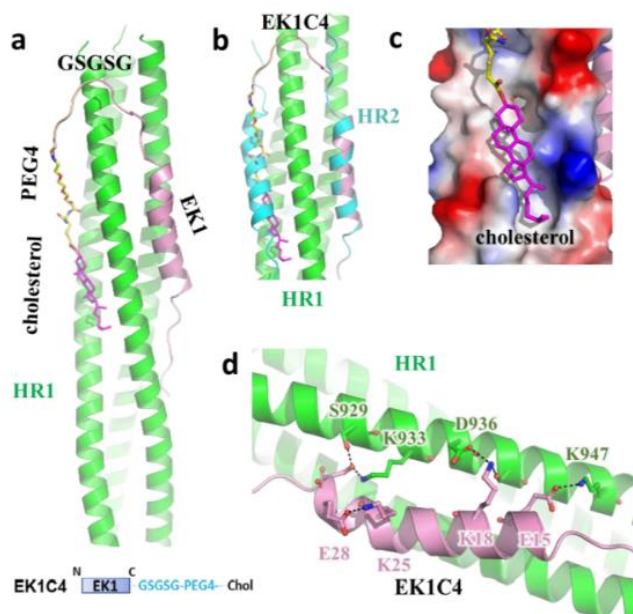
Όπως και να έχει, αυτή η πρόσφατη πανδημία πρέπει να αφυπνίσει τη διεθνή ερευνητική κοινότητα, όχι μόνο να αντιδράσει, αλλά και να προετοιμαστεί για τον επόμενο κορωνοϊό, καθώς βλέπουμε πως κάθε δεκαετία τον 21<sup>ο</sup> αιώνα υπάρχει έξαρση ενός νέου ιού (SARS-CoV στη δεκαετία του 2000, MERS το 2010 και τώρα ο SARS-CoV-2). Απαιτείται, λοιπόν, επείγοντως ένα εμβόλιο παν-κορωνοϊού και φαντάζει επιστημονικά εφικτό εάν διατεθούν επαρκείς πόροι.

### **Βιβλιογραφία :**

1. Chen et al., The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *CurrTropMedRep*. 3:1-4. (2020)
2. Elfiky, A. A. *Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. Life Sciences*, 117477. (2020)
3. E. Kim et al., Microneedle array delivered recombinant coronavirus vaccines: Immunogenicity and rapid translational development, *EBioMedicine* (2020)
4. Martinez, M. A. *Compounds with therapeutic potential against novel respiratory 2019 coronavirus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2020)
5. <https://www.npr.org/sections/health-shots/2017/07/23/537287781/beyond-the-nasty-needle-trying-to-make-vaccines-more-comfy-and-convenient?t=1591103294721>
6. <https://www.bbc.com/news/health-10661117>

**«Pan-coronavirus» αναστολέας: Θα μπορούσε να είναι μία λύση στην αντιμετώπιση του SARS-CoV-2 όπως και άλλων όμοιων κορονοϊών;**

Από την Χρηστοφή Κυράνια-Κάαρινα  
(Α.Μ.: 1936)



Εικόνα 1. Μοντέλο αλληλεπίδρασης του τροποποιημένου αναστολέα EK1C4 με την επικράτεια HR1. Ο αναστολέας, μαζί με την ουρά χοληστερόλης που περιέχει, καλύπτει τις υδροφοβικές περιοχές με τις οποίες θα αλληλεπιδρούσε η HR2 και έτσι παρεμποδίζεται ο σχηματισμός της 6HB δομής, η οποία είναι απαραίτητη για να γίνει η διάχυση του ιού στο κύτταρο του ξενιστή.

Xia S. et al., 2020 Cell Research

Ένας “pancoronavirus” αναστολέας της διάχυσης του ιού στα κύτταρα του ξενιστή θα μπορούσε να αποτελεί εμπόδιο στην μόλυνση από τον SARS-CoV-2. Ο πιθανός αυτός αναστολέας συγκεκριμένα για τον SARS-CoV-2 αφορά ένα πεπτίδιο (EK1), τροποποιημένο με την προσθήκη χοληστερόλης (EK1C4). Είναι πλέον κοινή γνώση πως η επιδημία που ξέσπασε αρχικά στην πόλη της Wuhan, Κίνα τον Δεκέμβριο του 2019 η οποία τελικά ανήχθη σε πανδημία τον Μάρτιο του 2020 και πλέον μετρά πάνω από 7 εκατομμύρια κρούσματα με πάνω από 400.000 θανάτους παγκοσμίως, χρήζει επιτακτικής αντιμετώπισης και εύρεσης θεραπευτικής προσέγγισης η οποία θα εμποδίσει την περαιτέρω εξάπλωση και θα ανακουφήσει από τα συμπτώματα που προκαλεί ο νέος κορονοϊός SARS-CoV-2 στους ήδη ασθενείς.

Ο SARS-CoV-2 ανήκει στην οικογένεια των κορονοϊών μαζί με άλλους όπως ο MERS-CoV και ο SARS-CoV, οι οποίοι ανά τα χρόνια έχουν προκαλέσει επιδημίες μικρότερης κλίμακας με παρόμοια όμως χαρακτηριστικά, δηλαδή την λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού και σε σοβαρές καταστάσεις ακόμα και πνευμονία. Μεγαλύτερη ομοιότητα με τον νέο κορονοϊό παρουσιάζει ο SARS-CoV με τον οποίο μοιράζονται 89.8% ομοιότητα στην αλληλουχία μίας εκ των δύο υπομονάδων (S2) μίας κρίσιμης πρωτεΐνης του καψιδίου τους (spike protein S), υπεύθυνης για τη διάχυση του ιού στο

εσωτερικό του κυττάρου του ξενιστή. Πιο αναλυτικά, η πρωτεΐνη S του καμιδίου αποτελείται από δύο υπομονάδες S1 και S2 από τις οποίες η S1 είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του υποδοχέα hACE2 στα κύτταρα του ξενιστή και σε αυτή οφείλεται η υψηλή μεταδοτικότητα του ιού, ενώ η S2 διαμεσολαβεί στη διάχυση του ιού στο κύτταρο του ξενιστή. Η S2 υπομονάδα με τη σειρά της αποτελείται από δύο επικράτειες HR1 και HR2 οι οποίες, μόλις έχει γίνει η αναγνώριση του hACE2 από την S1 θα έρθουν κοντά σχηματίζοντας μία ιδιαίτερη δομή (6-HB) που θα επιτρέψει τη διάχυση του ιού στο κύτταρο του ξενιστή.

Αυτή ακριβώς η δομή που υποβοηθά τη διάχυση, είναι και ο στόχος ενός “pan-coronavirus” αναστολέα της διάχυσης που είχε σχεδιαστεί προηγουμένως από τους Xia S. *et al.* για τον MERS-CoV και SARS-CoV και έχει προταθεί από τους ίδιους ως αναστολέας της εισόδου του SARS-CoV-2 στα ανθρώπινα κύτταρα με μία μικρή τροποποίηση. Ο αναστολέας αυτός είναι ο EK1, ένα μικρό πεπτίδιο (36 αμινοξέα) το οποίο στις προηγούμενες έρευνες σχεδιάστηκε για να εισέρχεται σε μία υδροφοβική περιοχή, σαν αύλακα, στην επικράτεια HR1 της S2 υπομονάδας και να την «καλύπτει». Έτσι, δεν μπορεί στην ίδια αυτή θέση να υπάρξει αλληλεπίδραση με την HR2 επικράτεια της S2 υπομονάδας, η οποία είναι αναγκαία για να σχηματιστεί η απαραίτητη δομή 6-HB για τη διάχυση του ιού στο κύτταρο του ξενιστή.

Μετά από κρυσταλλογραφία, η οποία έλυσε τη δομή 6-HB που σχηματίζουν οι επικράτειες του SARS-CoV-2 για την είσοδό του στο κύτταρο του ξενιστή, φάνηκε πως σε σχέση με τους ιούς για τους οποίους είχε σχεδιαστεί ο αρχικός αναστολέας EK1, υπάρχουν μεταλλάξεις σε κάποια κρίσιμα αμινοξέα της HR1 επικράτειας, που οδηγούν στην ακόμα πιο ενισχυμένη αλληλεπίδραση των HR1, HR2 και άρα στην ισχυρότερη διάχυση στο κύτταρο του ξενιστή. Για αυτό το σκοπό οι Xia S. *et al.* προέβησαν σε μία τροποποίηση του ήδη υπάρχοντος αναστολέα EK1. Έγινε σειρά πειραμάτων και δοκιμών με διαφορετικού εύρους τροποποιήσεις του, ώστε τελικά να καταλήξουν στον πιο ισχυρό μεταξύ των υπολοίπων τροποποιημένο αναστολέα που θα μπορούσε να εμποδίσει την διάχυση του ιού στο ανθρώπινο κύτταρο. Ο τροποποιημένος αναστολέας που επικράτησε ήταν ο EK1C4 ο οποίος διατηρεί την ίδια ακριβώς αμινοξική αλληλουχία με τον αρχικό EK1 αναστολέα, όμως περιέχει μία ουρά χοληστερόλης στο καρβοξυτελικό του άκρο. Φάνηκε πως όταν η ουρά αυτή συνδεόταν στον EK1 αναστολέα μέσω ενός συγκεκριμένου συνδέτη (μοτίβο γλυκίνης/σερίνης GSGSG) τότε ο αναστολέας είχε το καλύτερο ανασταλτικό αποτέλεσμα σε σχέση με τη σύνδεση μέσω άλλων συνδετών, δηλαδή, απαιτούνταν μικρότερη ποσότητα αναστολέα για να υπάρξει το τελικό επιθυμητό αποτέλεσμα. Αυτή η προσθήκη χοληστερόλης στο καρβοξυτελικό άκρο του αναστολέα προτάθηκε πως πιθανά καλύπτει επιπλέον υδροφοβικές περιοχές της HR1 επικράτειας και έτσι εμποδίζει ακόμα περισσότερο την αλληλεπίδραση με την HR2 και άρα τη διάχυση του ιού στο κύτταρο του ξενιστή, ακόμα και στην περίπτωση του SAR-CoV-2 ο οποίος εμφάνισε ενισχυμένη αλληλεπίδραση των δύο επικρατειών.

Αυτή η προσέγγιση αποτελεί μόνο ένα μέρος της συνολικής προσπάθειας που γίνεται σε παγκόσμιο επίπεδο. Είναι μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική η οποία αν και χρειάζεται περαιτέρω μελέτες τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε κλινικό επίπεδο, βασίζεται σε μία απλή και αποτελεσματική λογική πορεία με τελικό στόχο την παρεμπόδιση της εισόδου του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Σε παρόμοιο κλίμα κυμαίνονται και άλλες ερευνητικές ομάδες, όπως εκείνη των Tai W. *et al.*, οι οποίοι επιχειρούν επίσης την παρεμπόδιση εισόδου του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, στοχεύοντας όμως την άλλη υπομονάδα της πρωτεΐνης S, την S1.

Κάπως διαφορετικές προσεγγίσεις προσφέρονται επίσης ανά τον κόσμο, όπως η στόχευση του πολλαπλασιασμού του ιού μετά από την είσοδο στο κύτταρο του ξενιστή από τους Gordon C.J. *et al.*, ενώ άλλοι ερευνούν λιγότερο συνηθισμένους τρόπους θεραπείας, όπως η χρήση βλαστικών μεσεγγυματικών κυττάρων από τους Leng Z. *et al.* οι οποίοι σε μία κλινική δοκιμή παρατήρησαν πως η ενσωμάτωση των βλαστικών αυτών κυττάρων στον προσβεβλημένο οργανισμό μείωνε σημαντικά τα



συμπτώματα του COVID-19 τόσο σε ασθενείς με ήπια συμπτώματα όσο και σε άλλους με σοβαρή πνευμονία.

Η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα που ασχολείται ερευνητικά με την πανδημία, έχει διαχωρηστεί ώστε να εξεταστούν όλες οι πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του SARS-CoV-2. Από τον σχεδιασμό εμβολίων που θα δώσουν μία μακροπρόθεσμη λύση, στον σχεδιασμό φαρμάκων για την αποτροπή της μόλυνσης, μέχρι και την αντιμετώπιση με φαρμακευτική αγωγή και άλλες προσεγγίσεις των συμπτωμάτων που προκαλεί ο ιός, οι επιστήμονες προσπαθούν να βρουν μία καθολική ή έστω μερική λύση στο πρόβλημα, σε ένα όσο το δυνατόν πιο σύντομο χρονικό διάστημα, για να αποφευχθούν τα περαιτέρω αρνητικά αποτελέσματα της πανδημίας.

Παρ' όλο που είναι ακόμη νωρίς για να καταλήξει η επιστημονική κοινότητα σε μία σίγουρα αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση, η πρόοδος που έχει γίνει και η πληροφορία που έχει συλλεχθεί σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα είναι αξιοσημείωτη. Πιθανά, εάν συνεχιστούν το ίδιο εντατικά οι έρευνες στο συγκεκριμένο πεδίο, να υπάρξει σύντομα μία οριστική λύση στο καίριο αυτό πρόβλημα που έχει προκληθεί από τον SARS-CoV-2.

### **Βιβλιογραφία**

- Xia S. et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Research*, 30:343-355. (2020).
- Xia S. et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci. Adv.* 5, eaav4580 (2019).
- Tai W. et al., Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & Molecular Immunology* (2020).
- Gordon C.J. et al. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Biological Chemistry* (2020).
- Leng Z. et al. Transplantation of ACE2- Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging and Disease*, 11(2): 216-228. (2020).
- WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic, (03/2020), <http://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/3/who-announces-covid-19-outbreak-a-pandemic>
- *Coronavirus COVID-19(2019-nCoV)*, (viewed 10/06/2020), <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>

### **Εικόνα 1:**

- Xia S. et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Research*, 30:343-355. (2020).