

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. Ι. ΓΙΑΜΑΡΕΛΛΟΣ-ΜΠΟΥΡΜΠΟΥΛΗΣ

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΓΑΡΥΦΑΛΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ

ΜΕΤΑΡΝΕΥΜΟΝΙΟΥΣ

ΑΘΗΝΑ 2024

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Γ.Πουλάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ.Πουλάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ε. Ι. Γιαμαρέλλος – Μπουρμπούλης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Διδάκτωρ Ε.Κυριαζοπούλου , Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο metapneumovirus (hMPV) ανήκει στην οικογένεια των Pneumoviridae και αποτελεί έναν RNA αναπνευστικό ιό που προσβάλλει ασθενείς οποιασδήποτε ηλικίας. Ο ιός επάγει συμπτώματα που αφορούν το ανώτερο ή και το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα και συχνά προκαλεί βρογχιολίτιδες, αντιδραστική νόσο των αεραγωγών και επιδείνωση του βρογχικού άσθματος οδηγώντας ενίοτε σε συριγμό. Έτσι λοιπόν το φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων της λοίμωξης από metapneumovirus, κυμαίνεται από ήπιο έως σοβαρό και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί η προσβολή να είναι θανατηφόρα, ιδίως όσον αφορά ευάλωτους πληθυσμούς όπως νεογνά, ηλικιωμένους ή ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Δεδομένης της παραπάνω νοσηρότητας και θνησιμότητας, στόχος της παρούσας εργασίας είναι η κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης βλάβης, των τοπικών και συστηματικών αλληλεπιδράσεων που προκαλούνται από τον παραπάνω ιό, η ανάλυση των ήδη υπάρχοντων στοχευμένων θεραπειών, όπως και η συζήτηση γύρω από την εντατικοποιημένη έρευνα που αφορά τις στρατηγικές αντιμετώπισης των σοβαρών λοιμώξεων.

KEYWORDS: hMPV, Respiratory Infections, Cytokines, Immune Response, Pneumonia, Biomarkers, Antiviral Immunity, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10, Molecular mechanisms of pathogenesis

ABSTRACT

Metapneumovirus (hMPV) belongs to the family Paramyxoviridae and is an RNA respiratory virus that infects patients of any age. The virus induces symptoms involving the upper and/or lower respiratory system and often causes bronchiolitis, reactive airway disease and exacerbation of bronchial asthma, sometimes leading to wheezing. Thus the spectrum of clinical manifestations of metapneumovirus infection ranges from mild to severe and in some cases the infection can be fatal, especially in vulnerable populations such as the young, the elderly or immunocompromised patients. Given the above morbidity and mortality, the aim of the present study is to understand the mechanisms of damage induction, the local and systemic interactions caused by the virus, the analysis of existing targeted treatments, as well as the discussion around intensified research concerning strategies to treat severe infections .

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία με θέμα «Κυτταροκίνες σε λοιμώξεις από *Metarhneumonivus*» εκπονήθηκε στα πλαίσια ολοκλήρωσης του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Λοιμωξιολογία» στο οποίο φοίτησα κατά την περίοδο 2021-2023

Με την ευκαιρία που μου δίνεται θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή για την καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια προετοιμασίας και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Ξεχωριστές ευχαριστίες θα ήθελα να απονείμω στους Καθηγητές κ. Ε. Ι. Γιαμαρέλλο – Μπουρμπούλη και κ. Γ. Πουλάκου αφενός για την έμπνευση και τα ερεθίσματα που μου προσέφεραν για την μελλοντική βαθύτερη ενασχόλησή μου με τον χώρο των λοιμώξεων και αφετέρου για τις συμβουλές τους και τη συμπαράστασή τους σε μια δύσκολη και πιεστική περίοδο που διήνυσα εκπονώντας τη συγκεκριμένη εργασία σε συνδυασμό με την ειδικότητα της παθολογίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και φίλους που υπήρξαν αρωγοί σε αυτή μου την προσπάθεια, άλλοτε με λόγια ενδυνάμωσης και άλλοτε εμπράκτως, επωμιζόμενοι πολλές φορές επιπλέον εργασία. Τέλος, ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω στον σύντροφό μου , που στέκεται δίπλα μου, σε αυτό το περίπλοκο, δύσκολο αλλά μαγικό μονοπάτι της Ιατρικής, με διαρκή στήριξη, υπομονή και αγάπη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Τίτλος	1
Τριμελής επιτροπή	2
Περίληψη	3
Περίληψη στην Αγγλική γλώσσα (Abstract)	4
Ευχαριστίες	5
Γενικό μέρος	7
A) Κλινικές εκδηλώσεις λοίμωξης από μεταπνευμονοϊό	7
B) Αλληλεπιδράσεις κυττάρων-κυτταροκινών	10
α) Τοπικές αλληλεπιδράσεις	10
β) Συστηματικές αλληλεπιδράσεις	20
Γ) Σημασία στη θεραπευτική	32
Ειδικό Μέρος	42
Μέθοδοι	42
Αποτελέσματα	47
Συζήτηση	53
Σύνοψη	56
Βιβλιογραφία	58

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Κλινικές Εκδηλώσεις Λοίμωξης από Μεταπνευμονοϊό

Ο ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός είναι ένας ιός με γενετικό υλικό μονόκλωνου RNA, αρνητικής πολικότητας μη-τμηματοποιημένο, και περίβλημα λιπιδίων που ταξινομείται στην οικογένεια Pneumoviridae και στο γένος Metarnevovirus. Διαχωρίζεται σε δύο κύριες ομάδες, A και B, που στη συνέχεια υποδιαιρούνται σε διάφορες υποομάδες. Απομονώθηκε αρχικά σε έναν παιδιατρικό ασθενή στην Ολλανδία το 2001. Αποτελεί έναν από τους πιο συνήθεις ιούς που προκαλούν οξείες λοιμώξεις αναπνευστικού, τόσο ανωτέρου όσο και κατωτέρου, σε παιδιά κυρίως <2 ετών, ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όπως και ηλικιωμένους.

Η διερεύνηση των κλινικών εκδηλώσεων του μεταπνευμονοϊού (hMPV) αποτελεί θεμελιώδες μέλημα για την αντιμετώπιση και κατανόηση της επίδρασής του στην αναπνευστική λειτουργία. Μέσω της ανάλυσης εμπειριστατωμένων μελετών αναδύονται λεπτομερείς εισηγήσεις σχετικά με την επιδημιολογία του hMPV, τα κλινικά χαρακτηριστικά της λοίμωξης, τις πιθανές επιπλοκές όπως και τους παράγοντες κινδύνου που μπορεί να οδηγήσουν σε αυτές.

Ο hMPV εκδηλώνεται συχνά με ήπια, μη ειδική συμπτωματολογία συμπεριλαμβάνοντας ρινική καταρροή, φαρυγγαλγία, κόπωση, εξάνθημα, μυαλγίες και αρθραλγίες. Κατά την φυσική πορεία της νόσου οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν πυρετό, βήχα, δύσπνοια και υποξυγοναιμία εγκαθιστώντας βρογχολίτιδα, αντιδραστική νόσο των αεραγωγών, κρίση άσθματος, συριγμό ή πνευμονία. Μελέτες όμως έχουν αποδείξει ότι σε πολλές περιπτώσεις

περιστατικών πνευμονίας πως η λοίμωξη από hMPV δεν ήταν μεμονωμένη αλλά συχνά υπήρχε συλλοίμωξη με άλλους αναπνευστικούς ιούς, όπως είναι ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV) ή ο ιός της γρίπης. Σε ορισμένες, πιο σπάνιες περιπτώσεις, εξωπνευμονικά συμπτώματα που αφορούν το κεντρικό νευρικό σύστημα όπως σπασμοί, εγκεφαλίτιδα ή πυρετικοί σπασμοί μπορεί να εκδηλωθούν. Έχουν επίσης αναφερθεί, κυρίως σε παιδιά, εκδηλώσεις από το γαστρεντερικό σύστημα που αφορούν σε διάρροιες, εμέτους και κοιλιακό άλγος.

Παγκοσμίως, περίπου 13 εκατομμύρια παιδιά κάτω των 5 ετών πεθαίνουν ετησίως, θάνατοι από τους οποίους το 1/3 οφείλεται σε οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού. Κύρια αίτια των λοιμώξεων αυτών είναι ο RSV, ο Influenza Type A, ο ρινοϊός, ο hMPV και ο αδενοϊός. Αν και τα περισσότερα επεισόδια αυτών των λοιμώξεων είναι αυτοπεριοριζόμενα, υπάρχουν περιπτώσεις σοβαρών λοιμώξεων με πολλαπλές επιπλοκές και ανάγκη νοσηλείας ή ακόμη και εντατικής θεραπείας. Συγκριτική μελέτη που διεξήχθη σε παιδιά που πάσχουν από οξεία λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού, κατά το διάστημα του Δεκεμβρίου 2013 έως και το Μάρτιο 2016 στο Candigarh της Ινδίας (Department of Virology, Postgraduate Institute of Medical Education and Research) δίνει σημαντικές πληροφορίες για τις διαφορές στην επιδημιολογία, στα κλινικά χαρακτηριστικά και την ανοσολογική απάντηση, μεταξύ του RSV και του hMPV.

Κατά τη διάρκεια της ανωτέρω μελέτης ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα από παιδιά ηλικίας 2 μηνών έως και 5 ετών, που έπασχαν από οξεία λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού, στάλθηκαν για μοριακό έλεγχο με χρήση real-time αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης προς ανίχνευση γενετικού υλικού hMPV ή/και RSV. Τα θετικά δείγματα αναλύονταν περαιτέρω για συλλοιμώσεις και

επίπεδα κυτταροκινών. Από τα 349 δείγματα ασθενών που εντάχθηκαν στη μελέτη, ο RSV ανιχνεύθηκε σε 142 που αντιστοιχεί σε ποσοστό 40,68%, ο hMPV σε 23 που αντιστοιχεί σε ποσοστό 6,59%, ενώ συλλοίμωξη και από τους δύο ιούς ανιχνεύθηκαν σε 5 δείγματα που αντιστοιχεί σε ποσοστό 1,4%. Συλλοιμώσεις με άλλους ιούς ήταν συνήθεις με πιο συχνή την ταυτοποίηση του ρινοϊού. Οι κλινικές παράμετροι μεταξύ των δύο ιών ήταν συγκρίσιμες, ενώ οι συλλοιμώσεις με άλλους ιούς ήταν συχνές και στις δύο περιπτώσεις. Η ακριβής επιδημιολογία απαιτεί τη μοριακή τους ανίχνευση ενώ οι διαφορές στην ανοσολογική απάντηση με αύξηση του λόγου MMP-9/TIMP-1 στον RSV και αύξηση της IFN- γ στον hMPV μπορούν να παίξουν ρόλο στην ανάπτυξη νεώτερων στοχευμένων θεραπειών. (1)

Μελέτες έχουν επίσης αποδείξει την ανίχνευση hMPV σε ασθενείς με χρόνια παραρρινοκολπίτιδα. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν κεφαλαλγία, κακοσμία και απώλεια όσφρησης, συμπτώματα που διαρκούν για περισσότερο από 12 εβδομάδες. Προοπτική μελέτη που ανέλυσε την εποχικότητα των ιών που σχετίζονται με χρόνια παραρρινοκολπίτιδα απέδειξε πως ο hMPV είναι δεύτερος σε συχνότητα ανίχνευσης μετά τον ρινοϊό, ενώ οι περίοδοι μέγιστης ανίχνευσής τους αφορούσε τους φθινοπωρινούς και χειμερινούς μήνες. Η ανίχνευση των ιών πραγματοποιήθηκε με χρήση real-time αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, σε δείγματα ρινικών εκκρίσεων, βλεννογόνου ρινικής κόγχης, ρινικών πολυπόδων ή παραρρίνιου βλεννογόνου ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για χρόνια παραρρινοκολπίτιδα. Υπάρχουν θεωρίες που υποστηρίζουν πως η επίμονη παρουσία ιών στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, ιδίως των RNA ιών, μπορούν να επάγουν την έκφραση διαμεσολαβητών χρόνιας φλεγμονής μέσω αναγνώρισης PAMPs από τους

ανάλογους υποδοχείς (RIG-I,MDA-5,TLR-3,TLR-7). Αυτή η χρόνια φλεγμονή μπορεί να συσχετίζεται με την ανάπτυξη χρόνιας παραρρινοκολπίτιδας. Ωστόσο όπως προκύπτει από την παραπάνω μελέτη η εποχικότητα ανίχνευσης του hMPV σε ασθενείς με χρόνια παραρρινοκολπίτιδα συνάδει με τις περιόδους κυκλοφορίας του συγκεκριμένου ιού και ίσως η ανίχνευση του να αφορά οξεία ασυμπτωματική λοίμωξη και όχι απαραίτητα επίμονη παρουσία του ιού στον ρινικό και παραρρίνιο βλεννογόνο. Πρόσθετες διαχρονικές μελέτες που θα χρησιμοποιούν in situ δείκτες ενεργού πολλαπλασιασμού του ιού μπορούν να δώσουν απάντηση στο παραπάνω ερώτημα. (2)

B. Αλληλεπιδράσεις κυττάρων-κυτταροκινών

α. Τοπικές αλληλεπιδράσεις κυττάρων-κυτταροκινών

Η πρώιμη φυσική ανοσία έναντι του μεταπνευμονοϊού εστιάζεται στην επαγωγή αντιικών ιντερφερονών (IFNs) και άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών που είναι κρίσιμες για την ενεργοποίηση της ειδικής (επίκτητης) ανοσίας. Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-18 είναι σημαντικά αυξημένα σε λοιμώξεις από hMPV. Ο hMPV στοχεύει στο κροσσωτό αναπνευστικό επιθήλιο προκαλώντας τοπικές βλάβες που μεταφράζονται σε μια ευρεία γκάμα αναπνευστικής δυσλειτουργίας.

Οι κυτταροκίνες Th1/Th2, που όπως γνωρίζουμε είναι κρίσιμες στην ανοσία έναντι λοιμώξεων από ιούς, μπορούν να παίξουν το ρόλο του βιοδείκτη για την πρώιμη ανίχνευση της λοίμωξης από hMPV, το διαχωρισμό της από ιούς της

γρίπης αλλά και να βοηθήσει ταυτόχρονα στην εκτίμηση βαρύτητας της νόσου. Τα παραπάνω τεκμηριώνονται από μελέτη που διήρκησε από το Μάιο 2012-Ιούνιο 2019 και προσδιόρισε ποσοτικά, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, τις κυτταροκίνες Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α) στον ορό παιδιών <5 ετών με τεκμηριωμένη πνευμονία από hMPV συγκρινόμενες με αυτές στον ορό υγιών παιδιών και παιδιών με λοιμώξεις από ιό γρίπης A και B. Παιδιά με λοίμωξη από hMPV εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα IL-2 (διάμεση τιμή pg/ml 3.4 vs 5.8 , $p<0.001$) και υψηλότερα επίπεδα IL-4 (διάμεση τιμή, pg/ml 3.0 vs 1.4, $p<0.001$), IL-6 (διάμεση τιμή, pg/ml 8.1 vs 4.1, $p<0.001$), IL-10 (διάμεση τιμή, pg/ml 9.2 vs 2.4, $p<0.001$) και IFN γ (διάμεση τιμή, pg/ml 8.7 vs 4.6, $p<0.001$) στον ορό σε σύγκριση με υγιή παιδιά. Από τη σύγκριση ασθενών που εμφάνιζαν συμπτώματα βαριάς νόσου (N=20) με αυτούς που εμφάνιζαν μέτρια συμπτωματολογία (N=39) φάνηκε πως τα επίπεδα IL-6 και TNF- α ήταν αυξημένα στη βαριά νόσο σε σύγκριση με τις μέτριας βαρύτητας πνευμονία από hMPV, (διάμεση τιμή, pg/ml IL-6 15.35 vs 5.3, $p<0.027$, διάμεση τιμή, pg/ml TNF- α 2.9 vs 5.3, $p<0.049$) .

Έτσι, φάνηκε ότι τα επίπεδα της IL-2 σε παιδιά με πνευμονία από hMPV ήταν χαμηλά καθώς η IL-2 παίζει ρόλο τόσο στην διατήρηση και παραγωγή των ρυθμιστικών T κυττάρων αλλά και γενικά στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων , αυξάνοντας την δραστηριότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (NK cells) και αναστέλλοντας τις αποικίες κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων. Η IL-10 μπορεί να απενεργοποιήσει τα μακροφάγα. Η λειτουργία και ο πολλαπλασιασμός των T κυττάρων και των NK cells μπορεί άμεσα να ανασταλεί από την IL-10. Ακόμη η αύξηση και η διαφοροποίηση των B κυττάρων, των μαστοκυττάρων,

των δενδριτικών κυττάρων, των κερατινοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων ρυθμίζεται από την IL-10. Η IL-6 είναι μείζων προφλεγμονώδης διαμεσολαβητής που επάγει οξείας φάσης ανοσολογική απάντηση και συνεισφέρει στην άμυνα του ξενιστή ενάντια στη λοίμωξη ή στην καταστροφή ιστών. Όσον αφορά τον TNF-α γνωρίζουμε ήδη ότι η υπερβολική έκφρασή του μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι STAT3 μέσω NF-κB διαμεσολαβούμενη IL-6. Η απεριόριστη παραγωγή TNF-α μπορεί να οδηγήσει έτσι σε υπερενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος και σε καταρράκτη παραγωγής κυτταροκινών. Αυτός πιθανώς να είναι ο λόγος που τα επίπεδα του TNF-α και της IL-6 είναι σαφώς αυξημένα στη βαριά πνευμονία hMPV εν συγκρίσει με τη μέτριας βαρύτητας. Η IL-4 με τη σειρά της είναι ισχυρός παράγοντας ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω κυτταροκίνες μπορούν να φανούν χρήσιμες στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ του μεταπνευμονοϊού και του ιού της γρίπης. Στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης από τον ιό της γρίπης τα NK cells παράγουν IFN-γ. Στη μεταγενέστερη ανοσιακή απάντηση τα T κύτταρα είναι η κύρια πηγή παραγωγής IFN-γ. CD8+ T κύτταρα ειδικά για τον ιό της γρίπης παράγουν μια σειρά από κυτταροκίνες, συμπεριλαμβάνοντας την IFN-γ και τον TNF-α μέσω πολλών αντιγονοεξαρτώμενων μονοπατιών. Φάνηκε λοιπόν ότι τα επίπεδα της IFN-γ, της IL4 και του TNF- α είναι υψηλότερα στις λοιμώξεις από hMPV σε σχέση με τον ι της γρίπης . Ακόμη φάνηκε ότι η IL-6 στα πρώιμα στάδια λοίμωξης από τον Influenza Virus Type A αυξάνουν επίμονα και για τις πρώτες 6 ημέρες, γεγονός που δε συμβαίνει στη λοίμωξη από hMPV. (3)

Ο RSV και ο hMPV, όπως έχουμε ήδη σημειώσει, προκαλούν βρογχιολίτιδες, αντιδραστική νόσο των αεραγωγών, κρίση βρογχικού άσθματος και τελικά συριγμό. Παρόλα τα κοινά μεταξύ τους υπάρχουν αρκετά διαφορετικά χαρακτηριστικά όπως η ηλικία προσβολής, που στον RSV αφορά μικρότερους ασθενείς, η εποχικότητα των δύο ιών με τον RSV να υπερέχει τους χειμερινούς μήνες, ενώ με τον hMPV να υπερέχει την άνοιξη, την αύξηση των ηωσινοφίλων του αίματος που είναι σαφώς μεγαλύτερη σε λοιμώξεις από RSV αλλά και τα διαφορετικά φλεγμονώδη μονοπάτια που εγείρει η λοίμωξη από τον κάθε ιό. Ενδιαφέροντα είναι τα συμπεράσματα που εξάγονται από τη μελέτη των Jin-Sung Park et Al. που συγκρίνει τα προφίλ των ρινικών κυτταροκινών μεταξύ των δύο ιών σε 1008 παιδιατρικούς ασθενείς που χρειάστηκαν νοσηλεία εξαιτίας οξείας λοίμωξης αναπνευστικού με συριγμό. (4)

Από τους 1008 συμμετέχοντες οι 35 ταυτοποιήθηκαν με λοίμωξη hMPV και οι 67 με λοίμωξη RSV ενώ η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 20 άτομα. Όσον αφορά τα επίπεδα της Th1 κυτταροκίνης IFN- γ φάνηκε να είναι υψηλά στις λοιμώξεις και από τους δύο ιούς συγκρινόμενα με την ομάδα ελέγχου, χωρίς ιδιαίτερη διαφορά μεταξύ τους όμως ($p=0.0874$), για την ομάδα του hMPV (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση 11.9 ± 23.3 pg/ml), για την ομάδα του RSV (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση 12.6 ± 15.8 pg/ml), $p < 0.0001$ και για την ομάδα ελέγχου (0.3 ± 0.7 pg/ml). Η IL-2 εμφάνιζε επίσης υψηλά επίπεδα και στους δύο ιούς, για την ομάδα hMPV (87.9 ± 114.3 pg/ml) και για την ομάδα RSV (14.0 ± 16.6 pg/ml), σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (3.3 ± 8.2 pg/ml), $p < 0.0001$ και $p < 0.0001$ αντίστοιχα, με μεγαλύτερη υπεροχή όμως στους ασθενείς που πάσχουν από hMPV ($p < 0.0001$). Αυτό φάνηκε να ισχύει επίσης και για την Th17 κυτταροκίνη IL-1 β ,

για την ομάδα hMPV (745.0 ± 558.3 pg/ml) ενώ για την ομάδα RSV (184.8 ± 145.1 pg/ml) και την ομάδα ελέγχου (36.8 ± 80.6 pg/ml), $p < 0.0001$, όπως και για την IL-6 (hMPV ομάδα: 844.9 ± 1797.6 pg/ml, RSV ομάδα: 567.6 ± 772.3 pg/ml, ομάδα ελέγχου: 6.8 ± 11.9 pg/ml, $p < 0.0001$). Η Th-2 κυτταροκίνη IL-4 εμφανίζει μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων της στον RSV (1.5 ± 2.4 pg/ml) συγκρινόμενη με την ομάδα hMPV (0.7 ± 0.7 pg/ml) και την ομάδα ελέγχου (0.00 ± 0.00 pg/ml), $p < 0.0003$ και $p < 0.0001$ αντίστοιχα. Η Th2 χημειοκίνη ηωταξίνη αυξάνει τα επίπεδα της σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από hMPV (18.5 ± 25.2 pg/ml) ή από RSV (14.7 ± 18.7 pg/ml), $p = 0.0580$, αλλά υπάρχει υπεροχή σε ασθενείς με λοίμωξη από το συγκυτιακό ιό.

Πέραν του ήδη γνωστού ρόλου της Th2 διαμεσολαβούμενης ανοσίας όσον αφορά το αλλεργικό βρογχικό άσθμα, αποδείχτηκε ακόμη ο σημαντικός ρόλος που παίζει η Th17 διαμεσολαβούμενη ανοσία μέσω εμπλοκής της στο ουδετεροφιλοδιαμεσολαβούμενο άσθμα που εκδηλώνεται σαν σοβαρή και μη αναστρέψιμη αποφρακτική νόσο των αεραγωγών. Τα ηωσινόφιλα που εγείρονται από το Th17 μονοπάτι οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων της IL1β που με τη σειρά της οδηγεί σε αυξημένη έκφραση IL-17 mRNA και τελικά της IL-17 από τα CD4+ κύτταρα. Αυξημένες συγκεντρώσεις ουδετεροφίλων και IL-17 βρέθηκαν σε πνευμονικό ιστό ασθενών που έπασχαν από σοβαρό άσθμα και κορτικοανθεκτικό άσθμα, ενώ πρέπει να υπογραμμιστεί και ο ρόλος τους στην δημιουργία πνευμονικής ίνωσης. Τα CD4+ κύτταρα μνήμης παράγουν και IL-4 και IL-17A, ενώ όσο η φλεγμονή εμμένει το Th2 μονοπάτι μπορεί να μετατραπεί σε Th17 Έτσι μπορεί να τεκμηριωθεί ο ρόλος της μεταλοιμώδους εγκατάστασης του άσθματος σε ασθενείς που νόσησαν από hMPV. Από τα παραπάνω είναι

πλήρως εμφανή τα διαφορετικά ανοσιακά μονοπάτια των RSV, hMPV που οδηγούν σε άσθμα. (4)

Η θυμική στρωματική λεμφοποιητίνη (TSLP) είναι μια επιθηλιακή, κυτταροπροερχόμενη και ομοιάζουσα με την IL-17 κυτταροκίνη που συμμετέχει στην επαγόμενη από μικρόβια βλεννογονική ανοσία. Πρόσφατα έχει βρεθεί στο κέντρο των ερευνών εξαιτίας της σχέσης που μοιάζει να έχει με το προερχόμενο από ιώσεις άσθμα. Μια 6ετής μελέτη στο Soochow της Κίνας, που συμπεριέλαβε νοσηλευόμενα παιδιά με οξεία λοίμωξη αναπνευστικού, μετρώντας τις κυτταροκίνες του πλάσματος σε ασθενείς με hMPV που εμφάνιζαν συριγμό ή όχι και ασθενείς που εμφάνιζαν συριγμό οφειλόμενο σε οποιοδήποτε άλλο ιό, εξάγει συμπεράσματα που ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση. (5)

Αν και δεν είναι σαφής ο μηχανισμός με τον οποίο ο hMPV προκαλεί συριγμό, η υπόθεση βασίζεται στο ότι η λοίμωξη στο αναπνευστικό επιθήλιο από τον μεταπνευμονοϊό προκαλεί τραύμα στα κύτταρα πυροδοτώντας φλεγμονώδη μονοπάτια, ενώ η ανισορροπία Th1/Th2 ανοσίας επάγει την έκκριση φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, κυτταροκινών και χημειοκινών προκαλώντας συριγμό. Εδώ έρχεται και ο ρόλος της TSLP που μοιάζει να επιδεινώνει την πνευμονική φλεγμονή σε λοιμώξεις από hMPV. Η αυξημένη έκφραση της TSLP φαίνεται να εγείρει την Th2 ανοσιακή απάντηση που προκαλεί περαιτέρω φλεγμονή των αεραγωγών και υπεραντιδραστικότητα ενώ μπορεί επίσης να συμβάλει στην πρόκληση συριγμού μέσω επαγωγής της διήθησης των αεραγωγών από ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα.

Από την παραπάνω μελέτη φάνηκε ότι η συγκέντρωση TSLP και IL-4 στο πλάσμα ασθενών με συριγμό από hMPV (270.09 ± 37.51 ng/L και 194.26 ± 45.35

ng/L αντίστοιχα) ήταν σαφώς πιο αυξημένη σε σχέση με ασθενείς που δεν εμφάνιζαν συριγμό αλλά έπασχαν από hMPV ($p=0.008$ και $p=0.043$ αντίστοιχα). Ακόμη φάνηκε πως η συγκέντρωση της IL-2 στο πλάσμα ασθενών με hMPV και συριγμό ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένη σε σχέση με ασθενείς που δεν εμφάνιζαν συριγμό (301.14 ± 95.84 ng/L vs 364.06 ± 97.27 ng/L, $p=0.035$). Όσον αφορά τη σύγκριση των παραπάνω κυτταροκινών μεταξύ ασθενών που εμφάνιζαν συριγμό από hMPV σε σχέση με ασθενείς που εμφάνιζαν συριγμό από άλλους ιούς φάνηκε στατιστικά σημαντικά σημαντική διαφορά ανάμεσά τους με τα επίπεδα της TSLP και της IL-4 να είναι σαφώς αυξημένα σε λοιμώξεις από μεταπνευμονοϊό (270.09 ± 39.51 ng/L και 194.26 ± 45.35 ng/L, αντίστοιχα, $p<0.01$, $p<0.049$). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση IL-2 ανάμεσα στις δύο ομάδες. (5)

Οι ασθματικοί ασθενείς είναι σαφώς πιο επιρρεπείς σε ιογενείς λοιμώξεις κυρίως λόγω ελλιπούς αντιικής άμυνας. Οι μηχανισμοί που αυξάνουν την ευαισθησία αυτή σε λοιμώξεις διαφέρουν από ιό σε ιό. Οι αναπνευστικοί ιοί προσβάλλουν αρχικά το αναπνευστικό επιθήλιο του ανώτερου αναπνευστικού, το οποίο, παρόλα αυτά έχει μελετηθεί λιγότερο σε σχέση με το κατώτερο αναπνευστικό όσον αφορά την ελλιπή αντιική άμυνα. Έχει αποδειχτεί ότι τα ρινικά επιθηλιακά κύτταρα (NECs) από ατοπικά, ασθματικά παιδιά είναι αρμόδια για την παραγωγή IFN ως απάντηση σε λοιμώξεις από hMPV, αν και η παραγωγή της είναι μειωμένη σε σχέση με λοιμώξεις από RSV. Και στους δύο ιούς όμως φάνηκε ότι τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν αυξημένη αντιγραφή. Έτσι λοιπόν προκύπτει ότι οι μηχανισμοί που προκαλούν την αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις αυτών των ασθενών είναι μάλλον ανεξάρτητοι από την παραγωγή ιντερφερόνης. Η

απόπτωση, που αποτελεί σημαντικό κομμάτι της φυσικής ανοσίας και συμβάλλει εξαιρετικά στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού και της εξάπλωσης των ιών, εμφανίζεται ως απάντηση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου που εγείρεται από την ιική πρωτεϊνοσύνθεση και οδηγεί στην ενεργοποίηση μονοπατιών UPR (unfolded protein response). Η διαρκής ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής απάντησης απορυθμίζει τα μιτοχόνδρια και οδηγεί στο σχηματισμό του αποπτοσώματος που ενεργοποιεί με τη σειρά του το μονοπάτι των κασπασών. Σε αυτό ακριβώς το κομμάτι δείχνουν να υστερούν οι ασθματικοί ασθενείς που έχουν προσβληθεί από hMPV.

Μελέτη που συμπεριέλαβε ασθενείς με ατοπία, με μετρίου και σοβαρού βαθμού άσθμα, καλά ρυθμισμένο, χωρίς ανάγκη για λήψη στεροειδών ή ενεργό λοίμωξη, απέδειξε *in vitro* τους μηχανισμούς που σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία του πληθυσμού αυτού σε λοιμώξεις από hMPV, κάτι το οποίο δε φάνηκε να ισχύει για λοιμώξεις από RSV. Οι μηχανισμοί αυτοί φάνηκαν να είναι ανεξάρτητοι από την παραγωγή IFN ενώ είχαν άμεση επίδραση στην εγγενή απόπτωση.

Το άσθμα λοιπόν, όπως προκύπτει από την παραπάνω μελέτη, συσχετίζεται με καθυστερημένη και μειωμένη εγγενή απόπτωση σε απάντηση ως προς τις λοιμώξεις από hMPV. Με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής ποσοτικοποιήθηκαν τα θετικά για annexin -V- protein κύτταρα από ασθματικούς και μη ασθματικούς ασθενείς, που έπασχαν από hMPV, και συγκρίθηκαν με μη μολυσμένα κύτταρα. Φάνηκε πως το ποσοστό των θετικών NECs ασθματικών ασθενών που είχαν μολυνθεί από hMPV ήταν χαμηλότερο σε σχέση με τους μη ασθματικούς ασθενείς. Πιο ειδικά ποσοτικοποιήθηκαν οι τελικοί εκτελεστές της

απόπτωσης, κασπάση-3 και κασπάση-7, σε μολυσμένους από hMPV ασθματικούς και μη ασθματικούς ασθενείς. Και από την παραπάνω ποσοτικοποίηση προέκυψε πως η ενεργότητα των κασπασών-3/7 στα NECs των μη ασθματικών ασθενών που έπασχαν από hMPV συγκριτικά με μη μολυσμένα NECs (3πλάσια μεταβολή, $p < 0.001$) και συγκριτικά με μολυσμένα με hMPV NECs από ασθματικούς ασθενείς (2.8 φορές μεταβολή, $p < 0.01$), ήταν σαφώς αυξημένη. Όσον αφορά στην κασπάση 9, ο hMPV φάνηκε να επάγει σημαντικά την ενεργότητα της κασπάσης 9 σε μη ασθματικά NECs συγκριτικά με αμόλυντα NECs (3.4 φορές μεταβολή, $p < 0.01$) ενώ από τη σύγκριση ασθματικών με μη ασθματικούς ασθενείς δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά. Επιπλέον, για να ερευνηθεί το αν η ελαττωματική ενεργοποίηση της απόπτωσης και της ενεργοποίησης των κασπασών είναι ένα έμφυτο ελάττωμα ασθενών με άσθμα, σε κύτταρα NECs έγινε έγχυση AT-101, που προκαλεί έμφυτη απόπτωση μέσω αναστολής των Bcl2 πρωτεϊνών και ενεργοποίηση των BH-3 πρωτεϊνών, PUMA και NOXA. Φάνηκε λοιπόν ότι η AT-101 επάγει την ενεργοποίηση των κασπασών -3/7 και της κασπάσης 9 σε NECs ασθματικών και μη ασθματικών ατόμων. Αυτό αποδεικνύει ότι η ελαττωματική απόπτωση που παρατηρήθηκε σε ασθενείς με άσθμα και λοίμωξη από hMPV, προκαλείται από ειδικούς μηχανισμούς εξαρτώμενους από τον ιο hMPV, και δεν πρόκειται για κάποια εγγενή δυσλειτουργία.

Ο hMPV φάνηκε όμως να προκαλεί, τόσο σε ασθματικούς όσο και σε μη ασθματικούς ασθενείς μια δυσπροσαρμοστικότητα στην απάντηση των UPR πρωτεϊνών. Το παρατεταμένο στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο επάγει μια δυσπροσαρμοστική απάντηση στις παραπάνω πρωτεΐνες μέσω των μονοπατιών

PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) και IRE1a (Inositol-requiring protein 1α). Ο hMPV δεν ενεργοποιεί το μονοπάτι IRE1α. Σε αυτό το μονοπάτι η απόπτωση εγείρεται με τη φωσφορυλίωση της JNK που με τη σειρά της ενεργοποιεί τη BIM και μειώνει την αντιαποπτωτική Bcl-2 πρωτεΐνη. Ο hMPV δεν επάγει τη φωσφορυλίωση της JNK ή την έκφραση BIM. Σε NECs ασθματικών ή μη ασθματικών ασθενών, ενεργοποιεί το PERK μονοπάτι με αυξημένη μεταγραφή του παράγοντα CHOP, που με τη σειρά του προκαλεί παρατεταμένο στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω αύξησης της πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω GADD34. Ο παράγοντας CHOP επίσης διαταράσσει τη μιτοχονδριακή ακεραιότητα μέσω μεταγραφικής αύξησης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών BH3, PUMA και NOXA.

Ενδιαφέρουσα ήταν επίσης η διαπίστωση πως η έκφραση HSP70 είναι αυξημένη σε NECs από ασθματικούς ασθενείς και ενισχύεται ακόμη περισσότερο όταν συνυπάρξει λοίμωξη από hMPV. Η λειτουργία του αποπτοσώματος ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη Smac/Diablo inhibitor of apoptosis όπως είναι η XIAP και την οικογένεια HSPs όπως είναι η πρωτεΐνη HSP70. Η μεταγραφή της smac στα NECs ήταν μη διακριτή. Η μεταγραφή της XIAP, που επάγεται από τον hMPV δε φάνηκε να έχει διαφορά στους ασθματικούς ασθενείς. Αντιθέτως όμως φάνηκε ότι η έκφραση της HSP70 πρωτεΐνης σε NECs από ασθματικούς ασθενείς ήταν σαφώς υψηλότερη, σε σχέση με μη ασθματικούς ασθενείς, και μάλιστα ακόμη και πριν τη λοίμωξη από hMPV, η οποία βέβαια οδηγούσε σε επαγωγή ακόμη μεγαλύτερης έκφρασης. Η αναστολή της πρόσδεσης της HSP70 μέσω χρήσης VER-155008 έδειξε να επαναφέρει τη λειτουργικότητα των κασπασών

3/7, γεγονός που υποδεικνύει ότι η HSP70 μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικός στόχος στο μέλλον. (6)

B. Συστηματικές αλληλεπιδράσεις κυττάρων – κυτταροκινών

Ο hMPV, όπως και άλλοι αναπνευστικοί ιοί, επάγουν βλάβες στα CD8+ T- κύτταρα μέσω μονοπατιών σηματοδότησης PD1-PDL1. Τα CD8+ T κύτταρα είναι απαραίτητα για την κάθαρση των αναπνευστικών ιών. Το μονοπάτι σηματοδότησης της IFN1, που ενεργοποιείται μέσω του υποδοχέα της IFNAR, φαίνεται να είναι αναπόσπαστο κομμάτι της πρώιμης ανοσίας συμβάλλοντας στην παραγωγή αντιικών μορίων αλλά και στην διαμόρφωση της επίκτητης ανοσίας μέσω κλωνικής επέκτασης και συντήρησης των κυττάρων μνήμης και επαγωγής της διαφοροποίησης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs). Ο ρόλος της σηματοδότησης που επάγει η IFN1, στην φυσική και επίκτητη ανοσία, μελετήθηκε σε ποντικούς που εμφάνιζαν έλλειψη του συγκεκριμένου μονοπατιού. Φάνηκε ότι παρόλο που οι τίτλοι του hMPV, σε απουσία του μονοπατιού της ιντερφερόνης, ήταν αυξημένοι, ο ιός καθαιρέθηκε και οι ποντικοί εμφάνισαν λιγότερο βαριά ασθένεια, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι ο ρόλος της IFN1 σε hMPV λοιμώξεις συμβάλλει ουσιαστικά στην παθογένεια και στην εμφάνιση των περισσότερων συμπτωμάτων και όχι την κάθαρση του ιού. Ακόμη, παρά τα μικρότερα επίπεδα του PDL-1 συνδέσμου στα παραπάνω ποντίκια, τα CD8+ T- κύτταρα ήταν πιο δυσλειτουργικά, γεγονός στο οποίο φάνηκε επίσης να συμβάλλουν συγκεκριμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και ο υποδοχέας Tim-3.

Πιο συγκεκριμένα, στην παραπάνω μελέτη, προκειμένου να χαρακτηριστεί ο ρόλος του μονοπατιού σηματοδότης IFNAR, μελετήθηκε η κινητική αντιγραφής του hMPV σε γενετικά τροποποιημένους ποντικούς με έλλειψη IFNAR (IFNAR^{-/-}) που συγκρίθηκαν με ποντικούς Wild Type (WT) και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Οι ποντικοί IFNAR^{-/-} την ημέρα 3 και 5 μετά τη μόλυνση από hMPV εμφάνισαν υψηλότερους ιικούς τίτλους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, όμως η κάθαρση του ιού μεταξύ των δύο ομάδων ήταν παρόμοια με τα αποτελέσματα να δείχνουν την ημέρα 7 μετά τη λοίμωξη παρόμοια μείωση του ιικού φορτίου το οποίο ήταν μη ανιχνεύσιμο μετά την 10^η ημέρα και στις δύο περιπτώσεις. Ακόμη αποδείχτηκε ότι 22 ημέρες μετά τη λοίμωξη και στις 2 ομάδες το ιικό φορτίο παρέμεινε μη ανιχνεύσιμο. Έπειτα για να διερευνηθεί ο ρόλος του IFNAR στη βαρύτητα της νόσου εκτίμηθηκε η απώλεια βάρους και η αναπνευστική δυσλειτουργία μέσω παλμικής οξυμετρίας και εκτίμησης της παράτασης αναπνοής. Τα IFNAR^{-/-} ποντίκια εμφάνισαν στατιστικά σημαντική λιγότερη απώλεια βάρους έναντι των IFNAR^{+/+} ποντικών όπως και λιγότερη αναπνευστική δυσλειτουργία με μειωμένη παράταση αναπνοής. Μάλιστα ενδιαφέρον αποτελεί ότι οι μετρήσεις των IFNAR^{-/-} ποντικών για τις παραπάνω 2 παραμέτρους ήταν παρόμοιες με ποντικούς IFNAR^{+/+} μη μολυσμένους. Για να καθοριστεί ακόμη αν αυτή η έλλειψη αναπνευστικής δυσλειτουργίας στα IFNAR^{-/-} ποντίκια μεταφράζεται ιστοπαθολογοανατομικά, οι πνεύμονες των δύο ομάδων ποντικών μελετήθηκαν μετά τη χρώση τους με αιματοξυλίνη/ηωσίνη και PAS χρώση. Φάνηκε λοιπόν στα IFNAR^{-/-} λιγότερη διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα, διαπίστωση που προκύπτει και μετά από χρήση στανταρισμένων scoring systems ενώ η αρχιτεκτονική των πνευμόνων τους ομοιάζε με IFNAR^{+/+}

αμόλυντα ποντίκια. Ακολούθως και μέσω χρήσης RT-PCR μετρήθηκαν οι κυτταροκίνες σε ποντικούς IFNAR^{-/-} και IFNAR^{+/+} τόσο μολυσμένους όσο και αμόλυντους. Φάνηκε ότι τα επίπεδα TH1 κυτταροκινών IFN- γ , IL-2 και IL-12 ήταν χαμηλότερα στους μολυσμένους IFNAR^{-/-} ποντικούς σε σύγκριση με τους IFNAR^{+/+} μολυσμένους ποντικούς. Δε φάνηκε διαφορά στην TH2 κυτταροκίνη IL-4.

Η έλλειψη επαγόμενης από IFN1 σηματοδότησης δεν προκαλεί αλλαγές στη διήθηση από CD8⁺ T κύτταρα, CD19⁺ B κύτταρα ή CD11c⁺ κύτταρα κατά τη διάρκεια της hMPV λοίμωξης επομένως δεν κρίνεται και σημαντική για την επαγωγή της επίκτητης ανοσίας. Αυτό αποδείχθηκε μέσω μέτρησης των τίτλων αντισωμάτων για hMPV και μελετής κυττάρων ανοσίας, σημαντικά για την αντιική άμυνα, από ορό ποντικών IFNAR^{-/-} και IFNAR^{+/+} 21 ημέρες μετά τη μόλυνση από hMPV. Ο τίτλος αντισωμάτων ήταν σαφώς αυξημένος στα IFNAR^{-/-} ποντίκια αλλά και οι δύο ομάδες εμφάνισαν ανοσία στην επαναλοίμωξη. Επιπλέον 10 ημέρες μετά τη λοίμωξη ο συνολικός αριθμός λεμφοκυττάρων στους πνεύμονες και των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικός ενώ και οι δύο ομάδες 10 ημέρες μετά τη λοίμωξη εμφάνισαν σαφώς υψηλότερα ποσοστά CD11c⁺ κυττάρων στον πνεύμονα σε σχέση με αμόλυντους ποντικούς αλλά στη μεταξύ τους σύγκριση δε φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, κάτι που ισχύει και για τα CD8⁺, CD19⁺ B κύτταρα.

Από ποσοτικοποίηση ωστόσο των CD8⁺ ειδικών για τον hMPV κυττάρων, σε πνεύμονες ποντικών IFNAR^{-/-} και στην ομάδα ελέγχου, φάνηκε πως ο αριθμός τους ήταν σαφώς μικρότερος για τα IFNAR^{-/-} ποντίκια. Έπειτα, 10 ημέρες μετά τη μόλυνση από hMPV, ο έλεγχος της λειτουργικότητας των

παραπάνω κυττάρων με βάση τον προσδιορισμό της παραγωγής IFN γ και φάνηκε ένα σημαντικά μειωμένο ποσοστό παραγωγής της από τα κύτταρα CD8+ των IFNAR $^{-/-}$ ποντικών σε σχέση με τα CD8+ των ποντικών ελέγχου ενώ καμία διαφορά δεν φάνηκε ανάμεσα στις δύο ομάδες όσον αφορά την έκφραση PD1. Το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω IFN1 φάνηκε να συμβάλλει επίσης και στον περιορισμό της επέκτασης της ιικής λοίμωξης στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής. Με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος αλλά και πολυκλωνικού αντι-hMPV ορού, ανιχνεύθηκαν τα hMPV+ EpCAM+ επιθηλιακά κύτταρα την 5^η μετά τον ενοφθαλμισμό HMPV. Από τις μετρήσεις φαίνεται ότι τα επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα των IFNAR $^{-/-}$ ποντικών είχαν αυξημένα ποσοστά hMPV+ EpCAM+ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Η έκφραση του PDL1 φάνηκε να είναι καθοδηγούμενη αλλά όχι απολύτως εξαρτώμενη από το μονοπάτι της IFN 1. Ξέροντας ότι η έκφραση του PD-1 δεν έχει διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες μελέτης, μετρήθηκε η έκφραση PDL-1 σε αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα και CD11c 5 και 10 ημέρες μετά από την hMPV λοίμωξη. Από την παραπάνω ποσοτικοποίηση και όσον αφορά τα επιθηλιακά κύτταρα στις 5 ημέρες μετά τη λοίμωξη προκύπτουν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ποσοστά έκφρασης PDL-1 στους IFNAR $^{-/-}$ ποντικούς ενώ στις 10 ημέρες μετά τη λοίμωξη καμία διαφορά που να είναι στατιστικά σημαντική, αν και στις 2 μετρήσεις τα μολυσμένα από hMPV ποντίκια είχαν αυξημένη PDL-1 έκφραση σε σχέση με τα αμόλυντα. Για τα CD 11c+ κύτταρα δεν φάνηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στις 5 όσο και στις 10 ημέρες μετά τη λοίμωξη ενώ περαιτέρω αναλύσεις απέδειξαν ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι

ετερογενή και η έκφραση του PDL-1 είναι στη βάση της διαφορετική για τους διαφόρους υποτύπους των APC κυττάρων.

Η βλάβη στα CD8+ ειδικά για τον hMPV κύτταρα φάνηκε να είναι ανεξάρτητη από τα ρυθμιστικά CD4+ άρα και το IFNAR σηματοδοτικό μονοπάτι, αλλά επαγόμενη κυρίως μέσω του υποδοχέα Tim-3+. Οι πνεύμονες IFNAR-/- ποντικών είχαν σαφώς μικρότερη διήθηση από Treg Cells 5 ημέρες μετά τη μόλυνση αλλά το ποσοστό έκφρασης του Tim-3+ στα CD8+ ειδικά για hMPV κύτταρα σε IFNAR-/- ποντικούς ήταν σημαντικά αυξημένο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά και συγκριτικά με αμόλυντα κύτταρα ή μη ειδικά για hMPV CD8+

Οι διάφοροι υπότυποι των πνευμονικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων επηρεάζονται διαφορετικά από το μονοπάτι IFNAR στη λοίμωξη από hMPV. Από μετρήσεις φάνηκε πως μπορεί τα κυψελιδικά μακροφάγα να αυξάνουν και στα IFNAR-/- ποντίκια και στην ομάδα ελέγχου κατά τη διάρκεια hMPV λοίμωξης, όμως τα δένδριτικά κύτταρα στους πνεύμονες των IFNAR -/- ποντικών ήταν σχεδόν όμοια σε αριθμό με τα αμόλυντα μη τροποποιημένα ποντίκια ενώ επιπρόσθετα τα CD11b+ ήταν σημαντικά αυξημένα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με τα IFNAR -/-. Όσον αφορά τα CD11b- και τα μεσοθηλιακά μακροφάγα δεν φάνηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η IFNAR σηματοδότηση στα δένδριτικά κύτταρα και τα μεσοθηλιακά κύτταρα έδειξε να επηρεάζει την έκφραση PDL-1 , με τα IFNAR -/- ποντίκια να έχουν σημαντικά μειωμένη έκφραση, σε αντίθεση με τα κυψελιδικά μακροφάγα που συνέχιζαν την παραγωγή PDL-1 ανεξαρτήτως ύπαρξης ή όχι IFN τόσο σε μολυσμένα όσο και αμόλυντα ποντίκια. (7)

Ο hMPV ανταγωνίζεται το μονοπάτι σηματοδότησης IFN του ξενιστή, πιο συγκεκριμένα τις πρωτείνες STAT1 ή/και STAT2, μέσω χρήσης εναλλακτικών μεταγραφών της φωσφοπρωτεΐνης. Η ικανότητα του hMPV να αναστέλλει τα μονοπάτια σηματοδότησης εξαρτάται από τον ξενιστή. Η οικογένεια πρωτεϊνών STAT2 εμφανίζει ετερογένεια ανάμεσα στα διάφορα είδη και αυτή η ετερογένεια παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα ορισμένων οργανισμών να περιορίζει τη λοίμωξη hMPV. Η συγκεκριμένη διαπίστωση, και πιο ειδικά ο ρόλος των STAT2 στις λοιμώξεις hMPV στον άνθρωπο, εξετάστηκε μέσω της ακόλουθης μελέτης: ποντικοί STAT2 $-/-$ μολύνθηκαν με hMPV, κατόπιν χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* μέθοδοι για την απόδειξη πως ο hMPV αναστέλλει τα μονοπάτια STAT1/2 στους ανθρώπους αλλά όχι σε κύτταρα ποντικών και τελικώς χρησιμοποιήθηκαν *in vivo* μέθοδοι μέσω μόλυνσης ποντικών h STAT-knock-in και μετρώντας την απώλεια βάρους τους, την αναστολή της παραγωγής IFN και το προφίλ των παραγόμενων κυτταροκινών συγκρινόμενα με μολυσμένα μη τροποποιημένα ποντίκια.

Αρχικά διαπιστώθηκε η μη δυνατότητα αναπαραγωγής του hMPV σε ποντικούς που εξέφραζαν STAT2 όπως αδύνατη ήταν και η σειριακή μεταφορά του hMPV από ποντικό σε ποντικό σε μη τροποποιημένους ποντικούς -ενώ κατέστη δυνατή στους STAT2 $-/-$. Αυτό αποδεικνύει τον προστατευτικό ρόλο και την αντιική δραστηριότητα που παρέχει η συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών στους ποντικούς όσον αφορά τη λοίμωξη από hMPV. Κατόπιν λοιπόν, χρησιμοποιήθηκαν STAT2 $-/-$ ποντικοί, μολυνθηκαν με hMPV, θανατώθηκαν την 5^η ημέρα και μετρήθηκαν οι ιικοί τίτλοι των πνευμόνων τους συγκρινόμενοι με μη τροποποιημένα ποντίκια και STAT1 $-/-$ ποντίκια. Οι ιικοί τίτλοι του hMPV στα

STAT2-/- ποντίκια ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένοι συγκρινόμενοι με τις άλλες δύο ομάδες.

Ακολούθως, βρογχοεπιθηλιακά ανθρώπινα κύττρα (BEAS2b) μολύνθηκαν με hMPV και 24ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού έλαβαν έγχυση IFN προκειμένου να επαχθεί η φωσφορυλίωση και η μετατόπιση προς τον πυρήνα των STAT1/2. Συγκρίθηκε έπειτα η μετατόπιση προς τον πυρήνα των STAT1/2 στα παραπάνω κύτταρα αλλά και σε κύτταρα BEAS2b που δεν ενοφθαλμίστηκαν με hMPV και φάνηκε ότι στην πρώτη ομάδα αναστάληκε η μετατόπιση, κάτι που δε συνέβη στη δεύτερη. Συνεπώς, η παρουσία hMPV αναστέλλει την μετατόπιση προς τον πυρήνα των STAT1/2 γεγονός που αποδεικνύει ότι ο ανταγωνισμός τους μπορεί να προάγει την hMPV λοίμωξη.

Ο hMPV φάνηκε ακόμη να πολλαπλασιάζεται ικανούς τίτλους σε ποντικούς STAT2-/- συγκριτικά με μη τροποποιημένους ποντικούς γεγονός που επιβεβαιώνει την υπόθεση πως ο hMPV μπορεί να αναχαιτίσει τα μονοπάτια STAT1/2 σε ανθρώπινα κύτταρα αλλά όχι σε κύτταρα ποντικών. Πιο συγκεκριμένα μετά τη μόλυνση με hMPV κυττάρων προτευόντων θηλαστικών (VeroE6 cells- που απαντούν σε ιντερφερόνη αλλά δεν παράγουν ενδογενώς) και κυττάρων ποντικών (CMT64/61, NIH/3T3-έλλειψη κάποιων μονοπατιών IFN), και την έγχυση IFN σε αυτά μετρήθηκε η έκφραση και η φωσφορυλίωση των STAT1/2. Μετρήσεις στα VeroE6 κύτταρα έδειξαν μειωμένα ποσοστά ολικών STAT1/STAT2 όπως και μειωμένα ποσοστά φωσφορυλίωσης σε σχέση με αμόλυντα κύτταρα, σε αντίθεση με τα μολυσμένα κύτταρα ποντικών που εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά και των δύο παραμέτρων.

Επιπλέον, U3A και U6A κύτταρα, που εμφανίζουν αντιστοίχως έλλειψη STAT1 και STAT2 μολύνθηκαν με hMPV και έπειτα IFN και κατόπιν μετρήθηκε η έκφραση και φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αυτών. Βρέθηκε πως ο hMPV σε κύτταρα U6A(έλλειψη STAT2) οδηγούν σε μείωση της έκφρασης STAT1 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και αυξανόμενη MOI. Ο hMPV σε U3A (έλλειψη STAT1) οδήγησε σε μείωση της STAT2 αλλά μόνο σε MOI =3 και όχι σε MOI=1. Συνεπώς, ο ιός έχει τη δυνατότητα να στοχεύει και τις δύο πρωτεΐνες ανεξάρτητα, όμως ο ανταγωνισμός της STAT1 φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικός συγκριτικά με την STAT2. (8)

Η μεταγραφική απάντηση του ξενιστή σε λοίμωξη από hMPV δεν είναι πλήρως μελετημένη .Εικάζεται ότι ο hMPV καταστέλλει την εξαρτώμενη από την ιντερφερόνη απάντηση του ξενιστή, περισσότερο από άλλους αναπνευστικούς ιούς και κυρίως τον RSV. Σε πειραματικά μοντέλα ζώων φάνηκε ότι ο hMPV είναι ισχυροτέρος επαγωγέας της ιντερφερόνης α και γ όμως και αναστολέας του μονοπατιού αναγνώρισης-σηματοδότησης μέσω RIG-I-like receptors οδηγώντας σε μείωση της επαγωγής της ιντερφερόνης τελικά. BALB-c ποντικοί που μολύθηκαν από hMPV φάνηκε να έχουν μικρότερα ποσοστά κυτταροκινών στο αίμα τους σε σχέση με λοίμωξη από RSV αλλά εμμένουσα παραγωγή CXCL10 κυτταροκινών στην περίπτωση του μεταπνευμονιοϊού. Τα παραπάνω δεδομένα, που υποστηρίζουν μια ενδιάμεση εξαρτώμενη από ιντερφερόνη απάντηση του ξενιστή που έχει προσβληθεί από hMPV, ενισχύονται από την παρακάτω μελέτη της μεταγραφικής απάντησης του ξενιστή σε διάφορες ιογενείς λοιμώξεις μέσω ανάλυσης του περιφερικού αίματος τους.

Η ανάλυση των διαφορετικών και μοναδικών στοιχείων της μεταγραφικής απάντησης ενός ξενιστή, στους διαφόρους ιούς μπορεί επίσης να δώσει τη δυνατότητα ταυτοποίησης του εκάστοτε παθογόνου παρά τις κοινές τους κλινικές εκδηλώσεις. Αυτός ήταν και ο σκοπός της μελέτης που διεξήχθη από το 2009-2016 σε επείγοντα τμήματα κέντρων της Βόρειας Καρολίνας και από το 2012-2014 στη Νότια Επαρχία της Σρι Λάνκα και συμπεριέλαβε ασθενείς με οξεία λοίμωξη αναπνευστικού ή υποψία σήψης και οξεία, εμπύρετη λοίμωξη αντίστοιχα. Με τη χρήση RT-PCR ή ανίχνευσης αντισωμάτων στον όρο με τη χρήση ELISA εντάχθηκαν τελικά μόνο οι επιβεβαιωμένες ιογενείς λοιμώξεις, που αριθμούσαν τους 182 ασθενείς με την ομάδα ελέγχου (υγιείς) να φτάνει τους 20, από αυτούς οι 17 έπασχαν από hMPV. Αρχικά συγκρίθηκε η μεταγραφική απάντηση των ξενιστών που προσβλήθηκαν από ιο της γρίπης, μεταπνευμονοϊό ή εντεροϊό/ρινοϊό με το γκρούπ ελέγχου, μέσω ανίχνευσης των διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων (DEGs) σε κάθε μια περίπτωση από δείγμα περιφερικού αίματος του ξενιστή. Ο συνολικός αριθμός των DEGs που εκφράστηκαν σε σύγκριση με το γκρούπ ελέγχου, ήταν περίπου ίδιος για κάθε ιό, 1335 για τον ιό της γρίπης, 1136 για τους εντεροϊό/ρινοϊό και 1691 για τον hMPV. Από την ανάλυση των ευρημάτων τα ειδικά, για κάθε ιό, γονίδια που προέκυψαν από τη μεταγραφική απάντηση και δεν αλληλοεπικαλύφθηκαν ήταν 367 για τον IAV, 189 για τους ENV και 456 για hMPV ενώ τα κοινά για τους 3 ιούς γονίδια που εκφράστηκαν ήταν 598. Από τις λειτουργικές αναλύσεις των ειδικών για τον hMPV DEGs, φάνηκε να σχετίζονται με τα ακόλουθα μονοπάτια: έκφραση ιικών γονιδίων, στόχευση πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη μεμβράνη και διάφορα μονοπάτια σχετιζόμενα με την κυτταρική διαίρεση. Από περαιτέρω

συγκριτική ομαδοποιημένη ανάλυση όλων των αυξορυθμισμένων και μειορυθμισμένων DEGs και για τους 3 ιούς, φάνηκε τα πρώτα να σχετίζονται με την αντιική απάντηση, το μονοπάτι της ιντερφερόνης, την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας, την έκκριση κυτοκινών ενώ τα δεύτερα με τη στοχοποίηση μεμβρανών από πρωτείνες, την κυτταρική διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των T κυττάρων. Όσον αφορά την έκφραση των κοινών DEGs μεταξύ των τριών παθογόνων, φάνηκε να υπερισχύουν μονοπάτια που σχετίζονται με την αντιική απάντηση του ξενιστή και πιο συγκεκριμένα η ρύθμιση της εγγενούς ανοσιακής απάντησης, η κυτταρική απάντηση στην IFN 1, η έκκριση κυτοκινών και η ρύθμιση της ιικής ανάπτυξης. Απο τον έλεγχο του μεγέθους της απόκρισης του ξενιστή η μέση πολλαπλασιαστική μεταβολή των DEGs για κάθε ίωση συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου υπολογίστηκε αρχικά για τα αυξορυθμισμένα DEGs και οι διαφορές ανάμεσα στον hMPV και τους ENV ήταν στατιστικά σημαντικές με τον hMPV να υπερέχει. Έπειτα όσον αφορά τα μειορυθμισμένα DEGs, φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 3 ιών με τον hMPV να υπερέχει ξανά. Από την περαιτέρω ανάλυση καθορίστηκε το κατά πόσο το μέγεθος της απόκρισης για συγκεκριμένα μονοπάτια ήταν διαφορετικό ανάμεσα στα 3 παθογόνα, με τα αποτελέσματα να δείχνουν πώς για τα μονοπάτια της «απάντησης στην τύπου 1 IFN» και της «έκκρισης κυτταροκινών» να είναι τα κύρια αλλά αυξορυθμισμένα καθ'υπεροχή στον IAV και έπειτα στον hMPV. Για τα μειορυθμισμένα μονοπάτια και κυρίως αυτό της ρύθμισης της T-κυτταρικής διέγερσης ο hMPV φαίνεται έχει την μεγαλύτερη μείωση έκφρασης. Φαίνεται λοιπόν ότι παρά τις πολλαπλές κοινές αλλαγές στη μεταγραφή γονιδίων που μοιράζονται οι παραπάνω ιογενείς λοιμώξεις συγκριτικά

με τους υγιείς, υπάρχουν και πιο ειδικές για κάθε ιό αλλαγές που αφορούν συγκεκριμένα μονοπάτια. Ωστόσο από σύγκριση που έγινε μεταξύ των ίδιων των ιών, χωρίς να συμπεριληφθεί η ομάδα των υγιών συμμετεχόντων, ο hMPV δεν παρουσίασε συγκεκριμένη γονιδιακή απάντηση σε σύγκριση με τον IAV ή τους ENV και μια πιθανή εξήγηση είναι η ενδιάμεση απάντηση που προκαλεί ο hMPV και συνεπώς το μέγεθος της διαφοράς του με τους παραπάνω δύο ιούς είναι πολύ μικρό για να ανιχνευθεί.

Ψηφιακή ανάλυση και ποσοτικοποίηση των κυττάρων, βασιζόμενη στα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων, έδωσε τη δυνατότητα εκτίμησης των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών που επικρατούν σε κάθε ίωση. Ανεξάρτητα ιού- συνεπώς και για τον hMPV- φάνηκε αύξηση στα μονοκύτταρα, NK κύτταρα και ευρθροβλάστες και μείωση στα CD4 και CD8 T κύτταρα. (9)

Επιπρόσθετα, σε διάφορες μελέτες έχει αναφερθεί, η συλλοίμωση hMPV και πνευμονιοκόκκου που οδηγεί σε επιδείνωση της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας ποντικών. Έχει φανεί πως ο hMPV αυξάνει την προσκόλληση του πνευμονιοκόκκου στο αναπνευστικό επιθήλιο και οδηγεί σε μειωμένη κάθαρση του βακτηρίου και εν τέλει σε επιδείνωση της πνευμονίας σε μολυσμένα ποντίκια. Η πιο λεπτομερής επίδραση του hMPV στην προσκόλληση και διείσδυση του πνευμονιοκόκκου, *in vivo* και *in vitro*, μελετήθηκε με τη μόλυνση κυττάρων ποντικών, αρχικά με hMPV και έπειτα με ενοφθαλμισμό *S.pneumoniae*, και κατόπιν μέτρηση της προσκόλλησης του πνευμονιοκόκκου μέσω καθορισμού του αριθμού των αποικιών του και με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, μικροσκόπησης των προσβεβλημένων πνευμονικών ιστών και ποσοτικοποίησης της φλεγμονής όπως και μέτρησης κυτταροκινών και ουδετεροφίλων σε BALs.

Για τις *in vitro* αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν Hep2 και A549 κύτταρα ,το στέλεχος hMPV CAN97-83 που διαδόθηκε μέσω LLC-MK2 κυττάρων ενώ όσον αφορά τον πνευμονιόκκο έγινε χρήση των οροτύπων ST3 και ST14 που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα, επαναιωρήθηκαν σε συγκέντρωση 10^8 CFU/mL και σημάνθηκαν έπειτα με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC-SP). Από τις *in vitro* αναλύσεις φάνηκε ότι το ποσοστό προσκόλλησης του πνευμονιοκόκκου ST3 σε κύτταρα μολυσμένα από hMPV και μη-μολυσμένα από hMPV κύτταρα A549 ήταν 37,4% και 23,1% αντίστοιχα και για το στέλεχος πνευμονιοκόκκου ST14 33,6% και 13,5% αντίστοιχα, ποσοστά με στατιστικά σημαντική διαφορά. Αύξηση της προσκόλλησης των παραπάνω στελεχών πνευμονιοκόκκου φάνηκαν και σε κύτταρα Hep-2, χωρίς όμως τόσο εντυπωσιακά ποσοστά. Όσον αφορά την προσκόλληση στο αναπνευστικό επιθήλιο, η κυτταρομετρία ροής με τη χρήση των FITC κυττάρων απέδειξε ότι το ποσοστό των FITC κυττάρων ήταν σαφώς υψηλότερο σε μολυσμένα από hMPV A549 κύτταρα σε σχέση με τα μη μολυσμένα, με τα ποσοστά να είναι 43,9% έναντι 19,5% αντιστοίχως.

Για τις *in vivo* αναλύσεις, θηλυκοί ποντικοί BALB/c μολύνθηκαν με hMPV ή PBS (phosphate buffer saline) – ομάδα ελέγχου ,και 5 ημέρες έπειτα ενοφθαλμίστηκαν με S.Pneumoniae και κάποιοι με FITC-SP.Οι ποντικοί που μολύνθηκαν με S.Pneumoniae ST14 θανατώθηκαν 24 ώρες ή 48 ώρες μετά τη μόλυνση τους και έγιναν οι διάφορες αναλύσεις ενώ οι μολυσμένοι με σημασμένα στελέχη 1 ώρα μετά ακολουθώντας η μελέτη τους σε μικροσκόπιο φθορισμού. Φάνηκε λοιπόν από τη μικροσκόπηση φθορισμού ότι στο βρογχικό επιθήλιο μολυσμένων με hMPV ποντικίων τα σήματα ήταν σαφώς περισσότερα σε σχέση

με τα μολυσμένα από hMPV ποντίκια. Από υγρό BAL των ποντικών μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός κυττάρων 24 και 48 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό πνευμονιοκόκκου, και έπειτα ο αριθμός των ουδετεροφίλων με τα αποτελέσματα να δείχνουν στατιστικά σημαντική υπεροχή των συνολικών κυττάρων αλλά και των ουδετεροφίλων, και στις δύο μετρήσεις, στα ποντίκια που δεν είχαν μολυνθεί με hMPV. Ακολούθως οι μολυσμένοι με hMPV ποντικοί έδειξαν σημαντική μείωση της κάθαρσης από τον πνευμονιόκοκκο 24 ώρες μετά τη μόλυνση, ποσοστά που μπορεί να βελτιώθηκαν στις 48 ώρες παραμέναν όμως χαμηλά σε σχέση με τους μη μολυσμένους με hMPV ποντικούς. Από την ιστοπαθολογική μελέτη των πνευμόνων των ποντικών, προέκυψαν επίσης στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά βαθιάς φλεγμονής περιβρογχικά σε μολυσμένους από hMPV ποντικούς σε σχέση μη μολυσμένους, 87% vs 75% αντίστοιχα όπως και περιαγγειακά, 72% vs 57% αντίστοιχως. Η μέτρηση κυτοκινών – χημειοκινών του BAL, σε ποντικούς που μολύνθηκαν από hMPV σε σύγκριση με μη μολυσμένα ποντίκια, τόσο 24 όσο και 48 ώρες μετά τη μόλυνση από S.Pneumoniae έδειξαν σημαντικά μειωμένα ποσοστά IL1-a, KC και του παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων(gm-csf). Η IL-10 φάνηκε επίσης μειωμένη σε μολυσμένα κύτταρα από hMPV. (10)

Γ. Σημασία στη θεραπευτική

Δεδομένης της έλλειψης αντιικών φαρμάκων, στοχευμένων θεραπειών και εμβολίων, ο hMPV αποτελεί σημαντικό πλήγμα, κυρίως για ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Το ποσοστό του hMPV που ανιχνεύεται σε ασθενείς μεταμοσχευμένους

με αλλογενή αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα αγγίζει περίπου το 9%. Έχει στο παρελθόν γίνει χρήση του νουκλεοσιδικού αναλόγου ριβαμπιρίνη σε συνδυασμό ή όχι με ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη, με μη ικανοποιητικά αποτελέσματα και με αρκετές παρενέργειες (όπως αιμολυτική αναιμία ή κυτταροπενίες). Βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας θεωρείται ότι στην άμυνα έναντι του hMPV υπερέχει η κυτταροεπαγόμενη ανοσία της χυμικής. Έτσι λοιπόν, η έρευνα έχει στραφεί πια και στην προσπάθεια ανάπτυξης ανοσοθεραπειών μέσω ανίχνευσης των κυτταρικών αντιικών μηχανισμών και ταυτοποίησής τους.

Στην ακόλουθη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρχικά υγιείς δότες από τους οποίους απομονώθηκαν PBMCs (μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος) τα οποία μετά από διέγερση με ειδικά πεπτιδία που καλύπτουν και τα 9 hMPV αντιγόνα (N,P,M,F,M2-1,M2-2,SH,G,L) εκτιμήθηκαν για τη συχνότητα έκφρασης αυτών(χρήση IFN- γ ELISPOT assay). Το μέγεθος της δραστηριότητας αυτών των κυττάρων ήταν κάτω από το κατώφλι ανίχνευσης της χυμικής δοκιμής που χρησιμοποιήθηκε (ELISPOT) αλλά μέσω in vitro διέγερσης των PBMCs 29 υγιών δοτών για 9-11 ημέρες ήταν δυνατή η επέκτασή τους σε κλινικά σημαντικούς αριθμούς, δηλαδή μέση αύξηση $4.3 \pm 0,2$ των συνολικών κυττάρων ενώ οι επεκτεινόμενοι πληθυσμοί αποτελούνταν από: CD3+ T κύτταρα στο $91.7\% \pm 1\%$ σε συνδυασμό με κυτταροτοξικά CD8+ T κύτταρα ($29,5\% \pm 2,3\%$), βοηθητικά CD4+ T κύτταρα ($61,8\% \pm 2,3\%$), κύτταρα μνήμης CD45RO+CD62L+ ($38.6\% \pm 2.4\%$), CD45RO+CD62L- ($26.9\% \pm 2.2\%$) αλλά καθόλου T-ρυθμιστικά κύτταρα. Στην επέκταση των κυτταρικών πληθυσμών δεν ήταν δυνατή η επέκταση των κυττάρων για το αντιγόνο M2-2. Από τις μετρήσεις που ακολούθησαν βάση του αριθμού των δοτών που ανταποκρίθηκαν θετικά στο κάθε αντιγόνο (≥ 30 SFCs/ 2

$\times 10^5$ κύτταρα) αλλά και το μέγεθος της απόκρισης (βασισμένης στη μέτρηση IFN- γ - παραγόμενων SFCs/ 2×10^5 κύτταρα), αποδείχθηκε πως το αντιγόνο F ανιχνεύθηκε σε 28 από τους 29 δότες (97%) και επήγαγε τη μεγαλύτερη συχνότητα ειδικών κυττάρων (300 ± 52 SFCs/ 2×10^5 κύτταρα) ακολουθούμενο κατά σειρά από τα αντιγόνα N(25/29 δότες), M2-1(23/25 δότες), M(23/25 δότες), P(20/25 δότες), L(13/25 δότες), G(9/25 δότες), SH(1/25 δότες), M2-2(0/25 δότες). Συνολικά οι δότες εξέφρασαν ≥ 5 αντιγόνα. Ακολούθως, μέσω χρήσης ενδοκυττάρων χρώσεων κυτταροκινών αποδείχθηκε ότι για τα 5 κύρια αντίγονα που αναφέρθηκαν παραπάνω φάνηκε να υπερισχύει η CD4+ απάντηση έναντι hMPV. Τα επεκτεινόμενα ειδικά, κατευθυνόμενα για hMPV κύτταρα (VSTs) φάνηκε ότι παράγουν στην πλειοψηφεία τους μαζί με IFN γ και TNF α όπως και GM-CSF και granzyme B και γενικά Th2 κυτταροκίνες (IL2, IL-6) ενισχύοντας την κυτταρολυτική δράση, βελτιώνοντας την *in vitro* δραστηριότητα και αποδεικνύοντας πως η επέκταση των ειδικών hMPV κυττάρων επάγει πολυκλωνικές Th1 T κυτταρικές σειρές. Ελέγχθηκε έπειτα αν τα επεκτεινόμενα T ειδικά κύτταρα μπορούν να εξοντώσουν τους μολυσμένους από hMPV στόχους μέσω συγκαλλιέργειας των ειδικών T κυττάρων (Cr51 labeled) μαζί με αυτόλογα peptide-loaded-PHA (phytohemagglutinin blasts) και unloaded PHA βλάστες σαν ομάδα ελέγχου. Οι unloaded στόχοι αναγνωρίστηκαν και λύθηκαν από τα Cr51 labeled T κύτταρα με μέσο ποσοστό λύσης: 22% για ratio 40/1, 18% για 20/1, 12% για 10/1) κάτι που δε συνέβη για την ομάδα ελέγχου (ποσοστό λύσης για ratio 10/1: 6.5%).

Προκειμένου να επιτευχθεί λοιπόν ο στόχος δημιουργίας ανοσοθεραπειών έναντι του hMPV έπρεπε να αποδειχτεί πως τα T κύτταρα που αναγνωρίζουν τον

hMPV κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα των υγιών ατόμων που έχουν εκτεθεί στον ιό και ότι αυτά τα T κύτταρα είναι ικανά να επάγουν ανοσία όταν συναντήσουν μολυσμένο από hMPV κύτταρο. Η παραπάνω μελέτη απέδειξε την ύπαρξη των ειδικών T κυττάρων στο περιφερικό αίμα τόσο υγιών ατόμων με παλαιά έκθεση όσο και μεταμοσχευμένων ασθενών με ενεργό αναπνευστική λοίμωξη αλλά καθόρισε επίσης με βάση τον αριθμό των ανταποκρινόμενων δοτών και το μέγεθος των ενεργοποιημένων T κυττάρων την ιεραρχία στα ανοσοκυρίαρχα αντιγόνα αποδεικνύοντας ταυτόχρονα πως τα T κύτταρα για αυτά τα αντιγόνα μπορούν επαναλαμβανόμενα να επεκταθούν ex vivo με ένα T-Helper type 1- polarized προφίλ (Th1) και να εξοντώσουν αντιγονοεκφραζόμενους στόχους. Έτσι, αυτή η κλωνική επέκταση των πληθυσμών των συγκεκριμένων T κυττάρων αναμένεται να αποδειχθεί κλινικά πολύτιμη για την πρόληψη αλλά και τη θεραπεία του hMPV κυρίως για τους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. (11)

Ο σημαντικός ρόλος του ιού σε παροξύνσεις ΧΑΠ και άσθματος έχει επίσης σημειωθεί και αυτό υπογραμμίζει ακόμη περισσότερο την ανάγκη ανακάλυψης στεοχευμένων αντιικών θεραπειών και για αυτή την κατηγορία ασθενών. Βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα(PBECs) υγιών εθελοντών, ασθενών με άσθμα ή ΧΑΠ μολύνθηκαν με hMPV καλλιιεργήθηκαν για 72 ώρες και αναλύθηκαν ο ιικός πολλαπλασιασμός, οι φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις, ο ρόλος των εισπνεόμενων γλυκοκορτικοειδών και η χρήση της εισπνεόμενης ιντερφερόνης ως θεραπευτικό όπλο.

Από την παραπάνω μελέτη φάνηκε ότι ο hMPV ήταν ο δεύτερος πιο κοινός ιός που συσχετιζόταν με νοσοκομειακές παροξύνσεις ΧΑΠ και ανιχνεύθηκε περίπου στο 5% των ασθενών με παρόξυνση (σε 43 από τους 167 ασθενείς της

μελέτης) σε μια μεγάλη προοδευτική κοορτή. Φάνηκε επίσης ότι ο hMPV αναπαράγεται ισχυρά και σε μεγαλύτερο βαθμό σε ασθενείς με ΧΑΠ, όπως και η έκφραση του γονιδίου hMPV N ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με ΧΑΠ. Ταυτόχρονα με την αύξηση των ιικών αντιγράφων, ακόλουθη αύξηση εμφάνιζε και η έκφραση των γονιδίων ISG56 και IFN β ενώ και στις 3 ομάδες εθελοντών υπήρξε αύξηση της επαγωγίμης από IFN πρωτεΐνης 10 (IP-10). Η αύξηση της χημειοκίνης RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) εμφάνισε σημαντική αύξηση μόνο σε κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ. προκαλώντας όμως τις ίδιες επαγόμενες από IFN απαντήσεις και χωρίς να είναι σαφείς οι κλινικές συνέπειες αυτής της διαπίστωσης.

Ακολούθως τα PBECs υγιών εθελοντών, 24 ώρες πριν τη μόλυνση με hMPV υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 10 nmol/L προπιονική φλουτικαζόνη, δόση που έχει αποδειχτεί ότι αντικατοπτρίζει τα θεραπευτικά επίπεδα των εισπνεόμενων γλυκοκορτικοειδών στον πνεύμονα. Η χρήση της φλουτικαζόνης αύξησε σημαντικά τα ποσοστά των ιικών αντιγράφων όπως και του γονιδίου N του hMPV 48 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση, γεγονός που ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας κατόπιν τον ανταγωνιστή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (RU486) και παρατηρώντας την ομαλοποίηση του πολλαπλασιασμού του hMPV. Μετρήσεις των MxA και 25OAS, ως κύριες IRGs που παράγονται σε ιογενείς λοιμώξεις, έδειξαν σημαντική αύξηση υπο την επίδραση των γλυκοκορτικοειδών 48 ώρες μετά τη μόλυνση ενώ παρατήρηθηκε επίσης ότι η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων hMPV N και ISG56 48 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση δεν εμφανίζει μεταβολή από τα γλυκοκορτικοειδή, κάτι που ισχύει και για την παραγωγή IL-6 και IL-8. Μείωση 48 ώρες μετά τη μόλυνση και πλήρη

καταστροφή στις 72 ώρες όμως φάνηκε για την IP10. Η RANTES χημειοκίνη αυξήθηκε 72 ώρες μετά , ίσως λόγω αύξησης IFN- γ και ISG56. Τα δεδομένα αυτά ήταν απροσδόκητα δεδομένων των υπαρχόντων μελετών για την άμβλυση των αποκρίσεων της IFN από RV και IAV αλλά και δε μπορούν να εξηγήσουν τη δυνατότητα αύξησης του πολλαπλασιασμού του hMPV αφού τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τις αποκρίσεις της IFN. Η απάντηση δόθηκε όταν φάνηκε ότι η χρήση των εισπεόμενων γλυκοκορτικοειδών αύξησε τον πολλαπλασιασμό του hMPV μέσω αποτροπής της απόπτωσης. Μέσω χρήσης κυτταρομετρίας ροής ποσοτικοποιήθηκε η απόπτωση και 20 ώρες μετά φάνηκε σημαντική μείωση των αποποτικών κυττάρων είτε είχαν μολυνθεί με hMPV είτε όχι συγκριτικά με κύτταρα που δεν είχα λάβει θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, κάτι που ίσχυε και για την δράση της κασπάσης 3/7. Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής στα 48 ώρες έδειξε σημαντική αύξηση των κυττάρων που εμφάνιζαν δείκτες κυτταρικού θανάτου υποδεικνύοντας ότι τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την απόπτωση πρώιμα , αμβύνοντας αυτό το μηχανισμό αντιμετώπισης του ιού και ο επακόλουθος αυξημένος πολλαπλασιασμός αντικατοπτρίζεται στη συνέχεια με αυξημένο κυτταρικό θάνατο και νέκρωση σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο (48 ώρες). Όλα τα παραπάνω εμποδίστηκαν με τη χρήση RU486. Τέλος τα γλυκοκορτικοειδή φάνηκε να επάγουν σημαντικά την έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων (BCL-2, BCL-XL).

Έπειτα δεδομένα απέδειξαν το όφελος της χρήσης εισπνεόμενης ιντερφερόνης τόσο στην άμβλυση των ανεπιθύμητων ενεργειών των κορτικοειδών όσο και στη μείωση του πολλαπλασιασμού του ιού και της

φλεγμονής των αεραγωγών. In vitro τα μολυσμένα PEBCs των 3 ομάδων εθελοντών εκτέθηκαν σε ανασυνδυασμένη IFN που μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό hMPV κάτι που παρατήρηθηκε και για αυτά που είχαν λάβει θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή . Για να τεκμηριωθεί το όφελος της IFN στη μείωση της φλεγμονής των αεραγωγών χρησιμοποιήθηκε μοντέλα ποντικών BALB/c τα οποία μολύνθηκαν με hMPV και έπειτα έλαβαν ανασυνδυασμένη IFN την ημέρα 1 και 3 μετά τη μόλυνση. Φάνηκε στατιστικά σημαντική μείωση τόσο των ιικών τίτλων στους πνεύμονες των ποντικών όσο και εξασθένηση της διήθησης των λευκοκυττάρων στον περιαγγειακό ιστό , των κυττάρων που εκκρίνουν βλέννη αλλά και μείωση των επιθηλιακών φλεγμονωδών αλλαγών.(12)

Στη λοίμωξη από hMPV έχει επίσης αποδειχτεί ο ρόλος του RIG-I υποδοχέα (RLRs) για την αναγνώριση των PAMPs του ιού και την ακόλουθη καταπολέμησή του. Οι RLRs υποδοχείς είναι ενδοκυτταριοί αισθητήρες των ιικών συστατικών που περιλαμβάνουν μονής (ssRNA) και διπλής αλυσίδας (dsRNA) RNA και μέσω αναγνώρισης των PAMPs επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια για τη μεταγραφή αντιικών γονιδίων. Στα επιθηλιακά κύτταρα ο υποδοχέας RIG-I αναγνωρίζει PAMPs του hMPV οδηγώντας σε έκκριση IFNs μέσω των παραγόντων IRF7(interferon response factor 7) και IRF3 (interferon response factor 3). Μελέτη απέδειξε τον σημαντικό ρόλο που παίζει το μόριο CEACAM1 (carcinoembryonic antigen- related cell adhesion molecule 1) στην έμφυτη ανοσία έναντι hMPV όπως και πως κατά την ενεργοποίησή του δεν υπάρχει βλάβη στα υγιή κύτταρα. Το CEACAM1 ανήκει στη οικογένεια των καρκινοεμβρυικών αντιγόνων και μπορεί να προσδεθεί ομόφιλα ή ετερόφιλα με μέλη της οικογένειας CEACAM. Ακολουθώς ασκεί την ανασταλτική του δράση

μέσω ανασταλτικών μονοπατιών με βάση την τυροσίνη (ITIMs) και έπειτα της τυροσινικής φωσφατάσης (SHP1) για τα ανοσοποιητικά κύτταρα και της SHP2 για τα μη ανοσοποιημένα κύτταρα.

Αναλυτικότερα κύτταρα A549 μολύνθηκαν με hMPV και 48 ώρες μετά επιβεβαιώθηκε η μόλυνση τους, είτε μέσω PCR είτε μέσω ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα-μάρτυρες και τα μολυσμένα κύτταρα βάφτηκαν με χρώσεις προς ανίχνευση διαφόρων μορίων όπως το CEACAM1. Φάνηκε εξαιρετικά σημαντική επαγωγή έκφρασης του μορίου CEACAM1 στα μολυσμένα κύτταρα ενώ από την ανάλυση της κινητικής της έκφρασης του μορίου φάνηκε η έκφρασή του να ξεκινά 6 ώρες μετά τη μόλυνση ($p < 0.01$) και να φθάνει στο μέγιστο 12 ώρες μετά ($p < 0.01$). Έπειτα για τον έλεγχο των λειτουργικών συνεπειών που μπορεί να έχει η επαγωγή του CEACAM1, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα θυμώματος ποντικών που διαμολύνθηκαν με χιμαιρική πρωτεΐνη CEACAM1-CD3z και έπειτα επωάστηκαν στα μολυσμένα με hMPV A549 κύτταρα, σε κύτταρα μάρτυρες και σε κύτταρα μολυσμένα με hMPV με μπλοκάρισμα του CEACAM1 μέσω αντισώματος. Μετρήθηκε η παραγωγή IL2 που διεγείρεται μέσω σύνδεσης του CEACAM1 στον προσδέτη του, στις 3 κατηγορίες κυττάρων για παρατηρηθεί σημαντική επαγωγή της έκκρισης IL-2 στα μολυσμένα κύτταρα συγκριτικά με τις άλλες δύο κατηγορίες ($p < 0.05$, $p < 0.02$). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε πως η επαγωγή του CEACAM1 απαιτεί ζώντα ιό καθώς δεν υπήρξε παραγωγή του μορίου από μόλυνση με UV ανενεργό ιό, ενώ αποδείχθηκε πως το hMPV RNA είναι αυτό που επάγει την παραγωγή CEACAM1 μέσω διαμόλυνσης A549 κυττάρων με συνθετικό ανάλογο dsRNA και παρατηρώντας την επαγωγή έκφρασης του μορίου. Με τη χρήση shRNAs σε A549 κύτταρα απενεργοποιήθηκε

ο υποδοχέας RIG -1 και ο διαμεσολαβητής του IRF3, 48 ώρες μετά μετρήθηκε η επαγωγή του CEACAM1 και συγκρίθηκε με την ομάδα ελέγχου με τα αποτελέσματα να καταδεικνύουν πλήρη κατάργηση της επαγωγής του CEACAM1 στα κατεσταλμένα κύτταρα ($p < 0.01$, $p < 0.001$). Ο τρόπος με τον οποίο το μόριο CEACAM1 μπορεί να καταστείλλει τον hMPV ελέγχθηκε αρχικά είτε με απενεργοποίηση του ίδιου του μορίου, είτε της SHP2 με τη χρήση ειδικών shRNAs. 24 ώρες μετά μετρήθηκαν τα ιικά φορτία και συγκρίθηκαν με ομάδα ελέγχου για να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική αύξηση των ιικών φορτίων στα κύτταρα που εξέφραζαν τα ειδικά shRNAs για CEACAM1 και SHP2 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της SHP2 διαμεσολαβούμενης καταστολής του hMPV χρησιμοποιήθηκε η υπερέκφραση του πλήρους γονιδίου CEACAM1 ή δύο μεταλλάξεων αυτού: 1) CEACAM1 με έλλειψη της ενδοκυτταρικής σηματοδοτικής περιοχής που περιέχει ITIM (CEACAM1 Mut) και 2) Σύντηξη της ενδοκυτταρικής σηματοδοτικής περιοχής με GFP (GFP-ITIM). 24 ώρες μετά τη μόλυνση από hMPV μετρήθηκε το ιικό φορτίο και συγκρίθηκε αναμέσα στις 3 ομάδες κυττάρων παρατηρώντας στατιστικά σημαντικά αυξημένο ιικό φορτίο σε κύτταρα που εξέφραζαν μεταλλάξεις σε σχέση με αυτά που εξέφραζαν το πλήρες γονίδιο ($p < 0.01$). Απο την υπερέκφραση της φωσφατάσης SHP2 σε κύτταρα A549 και μέτρηση του ιικού φορτίου 24 ώρες μετά τη μόλυνση με hMPV παρατήρησαμε σημαντική μείωση του ιικού φορτίου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.01$). Τέλος, κύτταρα A549 που εξέφραζαν shRNAs έναντι των CEACAM1 και SHP2 σημαδεύτηκαν με 35S-μεθειονίνη και μετά από 24 ώρες μόλυνσης από hMPV προσδιορίστηκε η σήμανση με 35S-μεθειονίνη. Όπως φάνηκε, τα κύτταρα που εκφράζουν shRNAs που στοχεύουν

το CEACAM1 ή το SHP2, παρουσίασαν περίπου 3 φορές αύξηση στην ενσωμάτωση 35S-μεθειονίνης σε σύγκριση με το scrambled shRNA .Συνεπώς, συμπεραίνουμε ότι το CEACAM1 καταστέλλει την hMPV λοίμωξη με τρόπο εξαρτώμενο από την SHP2, αναστέλλοντας τον μηχανισμό παραγωγής πρωτεϊνών ($p < 0.001$). (13)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η κλινική αξία των μοριακών διαγνωστικών μεθόδων αλλά και της μέτρησης των εκκρινόμενων κυτταροκινών σε κάθε λοίμωξη, παραμένει ασαφής, ωστόσο κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος στην καθ'ημέρα κλινική πράξη λόγω της ταχύτητας και της ευκολίας των πρώτων, αλλά και της αυξανόμενης δυνατότητας μέτρησης, όσον αφορά τις κυτταροκίνες. Πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια επικεντρώνονται στις κλινικές εκδηλώσεις των συχνότερων ή αναδυόμενων ιών, όπως ο SARS-CoV-2. Ωστόσο, ιοί με μικρότερο επιπολασμό ή περιορισμένη δυνατότητα πρόκλησης επιδημιών, όπως ο Μεταπνευμονοϊός, δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς την κλινική τους επίπτωση. Στο πλαίσιο αυτό, διενεργήθηκε η παρακάτω μελέτη, στην οποία ενήλικες ασθενείς με οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού που προσήλθαν στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών υπεβλήθησαν σε μοριακό έλεγχο ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος για προσδιορισμό συγκεκριμένων παθογόνων, και κατόπιν εξετάστηκε η συγκέντρωση εκκρινόμενων κυτταροκινών σε ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις ασθενών με λοίμωξη από Μεταπνευμονιοϊό συγκριτικά με λοίμωξη αναπνευστικού από άλλο παθογόνο μικροοργανισμό.

Μέθοδοι

Πρόκειται για μια πολυκεντρική, προοπτική μελέτη που διεξήχθη σε 7 κέντρα στην Ελλάδα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε από την 1η Φεβρουαρίου έως τις 30 Απριλίου 2023 σε ασθενείς που προσήλθαν στα Τμήματα Επειγόντων Περιστατικών των συμμετεχόντων κέντρων της μελέτης. Το πρωτοκόλλο της

μελέτης έλαβε έγκριση από τα Επιστημονικά Συμβούλια των συμμετεχόντων νοσοκομείων ως εξής: Δ' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ με αριθμό πρωτοκόλλου έγκρισης 119/22.02.2023, Τμήμα Επείγουσας Ιατρικής, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ με αριθμό πρωτοκόλλου έγκρισης 119/22.02.2023, Γ' Παθολογική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Σωτηρία" με αριθμό πρωτοκόλλου έγκρισης 6696/13.03.2023, Α' Παθολογική Κλινική, Θριάσιο Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας με αριθμό πρωτοκόλλου έγκρισης 3837/13.02.2023, Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, Τζάνειο Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά με αριθμό πρωτοκόλλου έγκρισης 8/20.02.2023, Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, Γενικό Νοσοκομείο Ασκληπιείο Βούλας με αριθμό πρωτοκόλλου έγκρισης 4516/09.03.2023, Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών και Γενικό Νοσοκομείο Χανίων "Άγιος Γεώργιος", με αριθμό πρωτοκόλλου έγκρισης 3/06.02.2023.

Οι συμμετέχοντες εντάχθηκαν στη μελέτη αφού ενημερώθηκαν και παρείχαν γραπτή συγκατάθεση είτε οι ίδιοι ή οι νόμιμοι εκπρόσωποί τους.

Κριτήρια Ένταξης και Αποκλεισμού

Τα κριτήρια ένταξης ήταν: α) ενήλικες (18 ετών και άνω) και των δύο φύλων που παρείχαν γραπτή συγκατάθεση μετά από ενημέρωση, β) έναρξη συμπτωμάτων λιγότερο από 8 ημέρες, και γ) παρουσία συμπτωμάτων συμβατών με λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, περιλαμβάνοντας τουλάχιστον ένα από τα εξής: πυρετό (θερμοκρασία σώματος μεγαλύτερη ή ίση με 37,5°C), ρίγη, βήχα, πονόλαιμο, μυαλγίες, αιφνίδια εμφάνιση κεφαλαλγίας, καταρροή ή δύσπνοια. Κριτήρια αποκλεισμού ήταν η επιρρέπεια σε ρινορραγίες,

η ανικανότητα παροχής έγγραφης συγκατάθεσης από τον ίδιο τον ασθενή ή το νόμιμο εκπρόσωπό του, η ηλικία κάτω των 18 ετών, η διπλή καταγραφή του ίδιου ασθενούς.

Συλλογή και Επεξεργασία Δειγμάτων

Ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα συλλέχθηκαν από επαγγελματίες υγείας. Το δείγμα ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος αναλύθηκε για όλους τους στόχους του πάνελ FilmArray για το ανώτερο αναπνευστικό (BioFire® Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus), (Πίνακας 1). Για τις ανάγκες μεταφοράς, το ρινοφαρυγγικό επίχρισμα τοποθετήθηκε σε σωληνάριο που περιείχε μέσο μεταφοράς ιών (Viral Transport Medium, VTM), το οποίο σφραγίστηκε πλαστικό πώμα με ετικέτα που περιλάμβανε τις πληροφορίες του ασθενούς, διατηρώντας την ακεραιότητα του δείγματος και κλείνοντας στεγανά (15°C-30°C). Το VTM κρυοσυντηρήθηκε στους -80°C για ένα έτος μετά την ανάλυση. Τα ρινικά επιχρίσματα προαραιώθηκαν σε συγκέντρωση 0,5 mg/ml και οι συγκεντρώσεις των ιντερλευκινών (IL)-1β, IL-6, ιντερλευκίνης-10 (IL-10), του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1Ra), του παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) και της ιντερφερόνης-γάμμα (IFN-γ) μετρήθηκαν εις διπλούν με τη μέθοδο ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (enzyme immunosorbent assay, Diaclone SAS). Για τη μέτρηση της IFN-α χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο VeriKine Human Interferon Alpha ELISA (PBL Assay Science). Το κεντρικό εργαστήριο βρίσκεται στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων στη Δ' Παθολογική Κλινική στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ (Επιβλέπων: Καθηγητής Ε. Ι. Γιαμαρέλλος-Μπουρμπούλης)

Καταγραφή

Καταγράφηκαν τα εξής δεδομένα: δημογραφικά στοιχεία (ηλικία, φύλο), τύπος και έναρξη των συμπτωμάτων, τύπος παθογόνου και, στην περίπτωση λοίμωξης από SARS-CoV-2, η τιμή Ct της θετικότητας. Η τιμή Ct θετικότητας (Cycle Threshold) αναφέρεται στον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση γενετικού υλικού του ιού στο εξεταζόμενο δείγμα (χαμηλή τιμή Ct σχετίζεται με υψηλό ιικό φορτίο). Οι ασθενείς με COVID-19 ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα στάδια της νόσου που ορίζει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) σε ήπια (ασθενείς με συμπτώματα όπως πυρετό, βήχα, κόπωση, φαρυγγαλγία, χωρίς ενδείξεις πνευμονίας ή υποξαιμίας), μέτρια (ασθενείς που παρουσιάζουν σημεία πνευμονίας, όπως πυρετό, βήχα και δυσκολία στην αναπνοή, με κορεσμό οξυγόνου $\geq 90\%$ στον αέρα δωματίου) και σοβαρή (ασθενείς με συμπτώματα όπως ταχύπνοια ≥ 30 αναπνοές ανά λεπτό για ενήλικες, σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια, ή κορεσμό οξυγόνου $< 90\%$ στον αέρα δωματίου). (14) Εξετάσαμε επίσης τις συγκεντρώσεις κυτοκινών στις αναπνευστικές εκκρίσεις ως δείκτη της φλεγμονώδους αντίδρασης μεταξύ των διάφορων ανιχνευόμενων παθογόνων.

Στατιστική Ανάλυση

Η δοκιμή Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κανονικότητας των κατανομών των συνεχών μεταβλητών ενώ η δοκιμή Mann-Whitney U χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση διαφορών των συνεχών μεταβλητών μεταξύ ομάδων ασθενών. Οι δυαδικές μεταβλητές παρουσιάζονται

με απόλυτο αριθμό και ποσοστό επί του συνόλου, ενώ οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται με τη διάμεσο και το διάμεσο εύρος (interquartile range). Το διάστημα εμπιστοσύνης ήταν 5% (αμφίπλευρη ανάλυση). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του IBM SPSS Statistics for Windows, Έκδοση 29.0.2.0 (IBM Corp., 2023, Armonk, NY) και το GraphPad Prism, Έκδοση 10.0.0 για Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA).

Πίνακας 1. BioFire® Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus)

Viren	Bakterien
Adenovirus	<i>Bordetella parapertussis</i>
Coronavirus 229E	<i>Bordetella pertussis</i>
Coronavirus HKU1	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Coronavirus NL63	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Coronavirus OC43	
Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (Nahost- Atemwegssyndrom-Coronavirus) (MERS-CoV)	
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-Coronavirus 2) (SARS-CoV-2)	
Human Metapneumovirus (Humanes Metapneumovirus)	
Human Rhinovirus/Enterovirus (Humanes Rhinovirus/Enterovirus)	
Influenza A, (Influenzavirus A), einschließlich Subtypen H1, H3 und H1-2009	
Influenza B (Influenzavirus B)	
Parainfluenza Virus 1 (Parainfluenzavirus 1)	
Parainfluenza Virus 2 (Parainfluenzavirus 2)	
Parainfluenza Virus 3 (Parainfluenzavirus 3)	
Parainfluenza Virus 4 (Parainfluenzavirus 4)	
Respiratory Syncytial Virus (Respiratorisches Syncytial-Virus)	

Αποτελέσματα

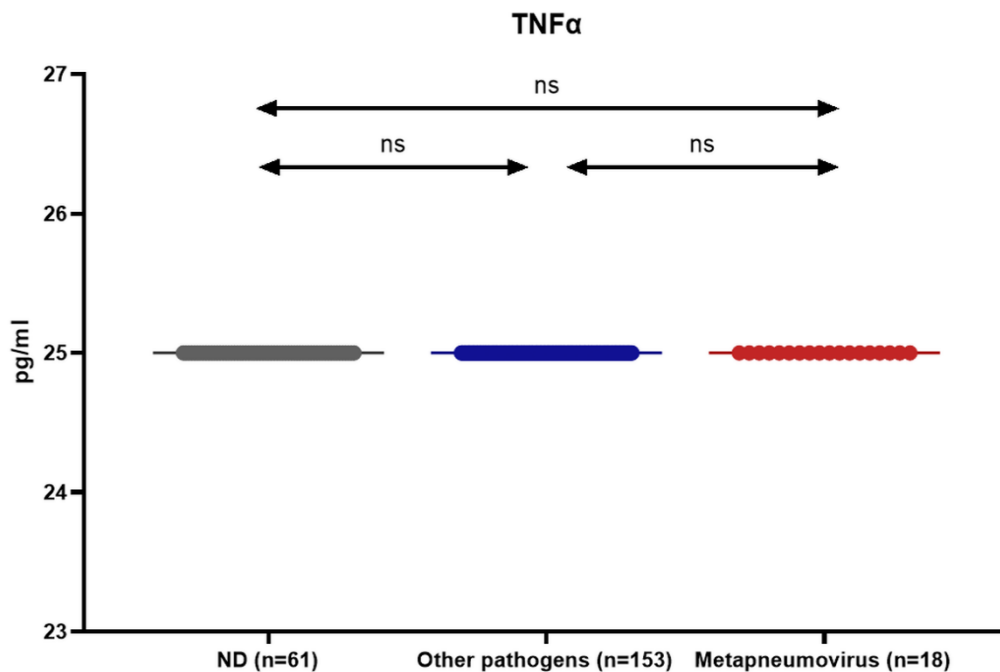
Συνολικά, 514 ασθενείς συμμετείχαν στη μελέτη. Ο πρώτος ασθενής εντάχθηκε στις 2 Μαρτίου 2023, ενώ ο τελευταίος στις 6 Απριλίου 2023. Η ταξινόμηση έγινε στις εξής κατηγορίες: COVID-19, Γρίπη Α, Γρίπη Β και άλλες ιογενείς λοιμώξεις. Από το σύνολο των ασθενών το 44,6% ήταν άνδρες (N=228) και η μέση ηλικία ήταν τα 52,5 έτη. Ο μεταπνευμονοϊός απομονώθηκε στο 3,6% (N=19) των ασθενών με μέση ηλικία σε αυτή την ομάδα τα 59,7 έτη. Τα παραπάνω δημογραφικά στοιχεία, όπως και τα ποσοστά των κύριων συμπτωμάτων των ασθενών που είχαν ή όχι μεταπνευμονοϊό φαίνονται στον Πίνακα 2. Επιπλέον, διερευνήθηκαν οι συγκεντρώσεις κυτταροκινών στις αναπνευστικές εκκρίσεις ως δείκτης της τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης ανάμεσα στα διάφορα ανιχνευθέντα παθογόνα. Στα ακόλουθα διαγράμματα (Εικόνα 3,4,5,6) αναπαριστώνται οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών στις αναπνευστικές εκκρίσεις των ασθενών με τεκμηριωμένη λοίμωξη από μεταπνευμονοϊό και οι αντίστοιχες συγκρίσεις με δύο ομάδες ασθενών, αυτών όπου δεν ανιχνεύθηκε παθογόνος μικροοργανισμός και αυτών που ανιχνεύθηκαν διάφοροι άλλοι παθογόνοι. Από το σύνολο των 19 δειγμάτων στα οποία απομονώθηκε ο μεταπνευμονοϊός μέτρηση κυτοκινών έγινε στα 18.

Πίνακας 2. Δημογραφικά δεδομένα πληθυσμού

Πίνακας 2. Δημογραφικά δεδομένα πληθυσμού		
	Σύνολο ασθενών N=514 (%)	Ασθενείς με hMPV N=19 (%)
Ηλικία σε έτη, μέση τιμή (σ)	52,5 (19,9)	59,7 (21,2)
Ανδρικό φύλο, N (%)	228 (44,6)	7 (36,8)
Θετικό Αποτέλεσμα για COVID-19, N (%)	71 (3,8)	
Θετικό Αποτέλεσμα για Γρίπη Α, N (%)	4 (0,8)	
Θετικό Αποτέλεσμα για Γρίπη Β, N (%)	13 (2,6)	
Θετικό Αποτέλεσμα για hMPV	19 (3,6)	
Ασθενείς χωρίς ανίχνευση παθογόνου και μέτρηση κυτταροκινών	61 (11,8)	-
Ασθενείς με hMPV και μέτρηση κυτταροκινών	18 (3,5)	18 (94,7)
Ασθενείς με άλλο παθογόνο και μέτρηση κυτταροκινών	153(29,7)	-
Συμπτώματα, N (%)		
Βήχας	286 (55,6)	14 (73,7)
Πυρετός	247 (48,1)	12 (63,2)
Δύσπνοια	144 (28)	9 (47,4)
Ρινική Συμφόρηση	94 (18,3)	2 (10,5)
Φαρυγγαλγία	103 (20)	4 (21,1)
Κεφαλαλγία	21 (4,1)	1 (5,3)
Μυαλγίες	19 (3,7)	1 (5,3)

Συνομογραφίες: N: αριθμός ασθενών, σ: τυπική απόκλιση

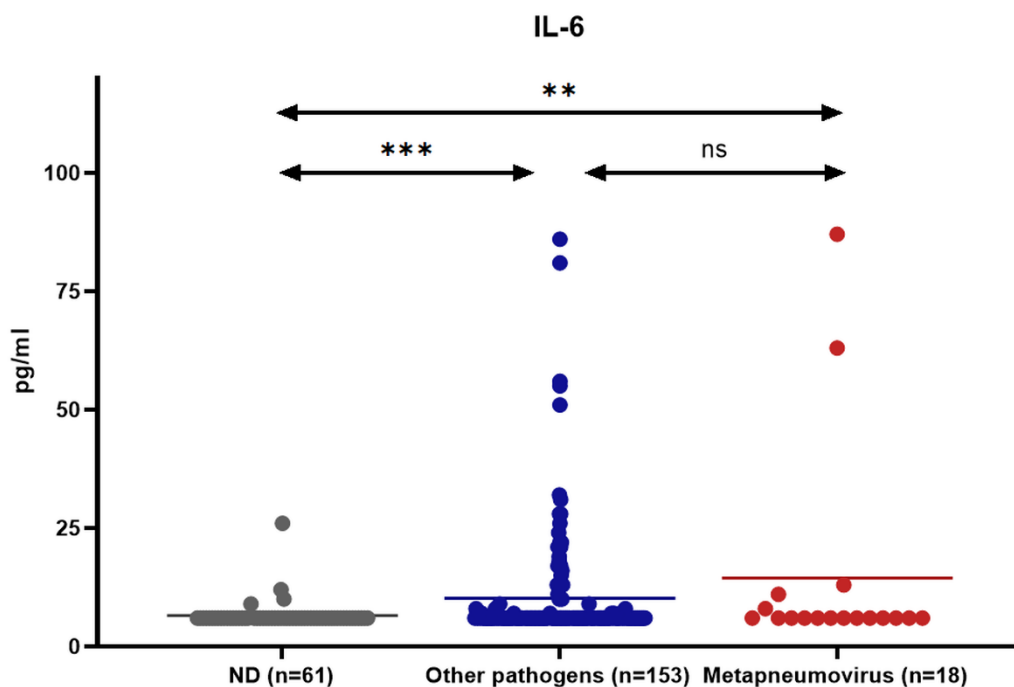
Το διάγραμμα (Εικόνα 2) παρουσιάζει συγκρίσεις των επιπέδων του παράγοντα TNFα(Tumor Necrosis Factor alpha) στα δείγματα των 3 διαφορετικών ομάδων. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει τα επίπεδα TNFα (pg/ml), τα οποία κυμαίνονται από 23-27 pg/ml.



Εικόνα 2. Συγκρίσεις συγκεντρώσεων TNFα στις ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις των ασθενών ανάλογα με το παθογόνο. [ND: ασθενείς με μη ανιχνεύσιμους παθογόνους μικροοργανισμούς (n=61), Other Pathogens: άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί (n=153), Metapneumovirus:Μεταπνευμονοϊός(n=18)]

Τα επίπεδα TNF-a μετρήθηκαν στην ομάδα μη ανίχνευσης παθογόνων, στην ομάδα άλλων παθογόνων και στην ομάδα metapneumovirus. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα μεταξύ των ομάδων.

Στο επόμενο διάγραμμα (Εικόνα 3) παρουσιάζεται η σύγκριση των επιπέδων της κυτταροκίνης IL-6 (Interleukin-6) στις τρεις διαφορετικές ομάδες. Στον κατακόρυφο άξονα βλέπουμε τα επίπεδα IL-6 σε pg/ml, με τιμές που κυμαίνονται από 0 έως > 100 pg/ml.

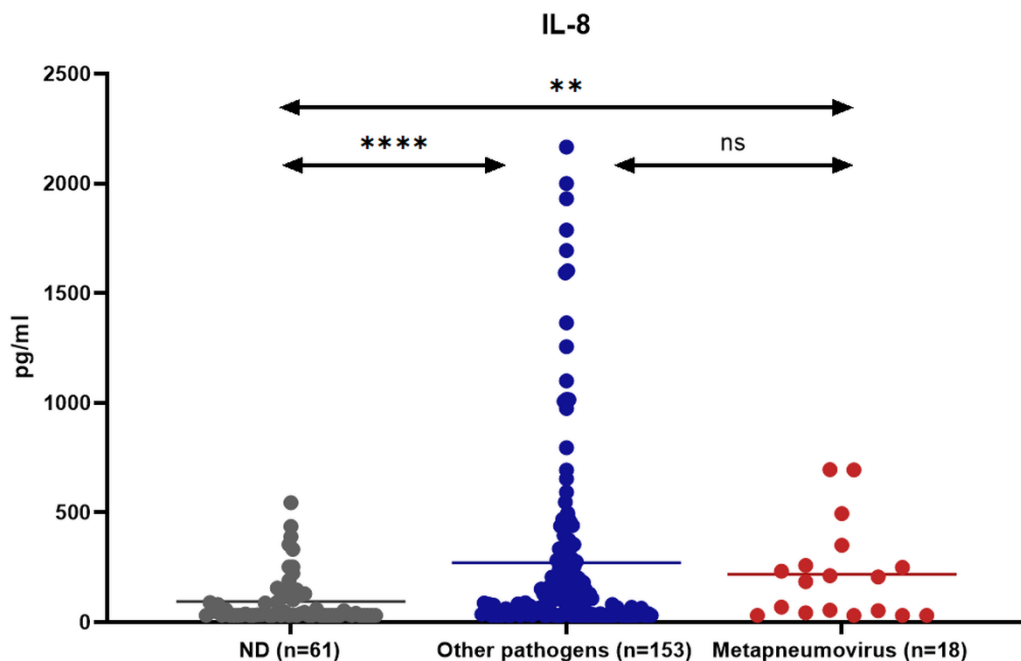


Εικόνα 3. Συγκρίσεις συγκεντρώσεων IL-6 στις ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις των ασθενών ανάλογα με το παθογόνο. [ND: ασθενείς με μη ανιχνεύσιμους παθογόνους μικροοργανισμούς (n=61), Other Pathogens: άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί (n=153), Metapneumovirus: Μεταπνευμονοϊός(n=18), *p<0.05, **p<0.01, *p<0.0001 ,****p<0.00001]**

Παρατηρούμε πως η ομάδα ND παρουσιάζει τα χαμηλότερα επίπεδα IL-6 σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ND και της ομάδας των 'άλλων παθογόνων μικροοργανισμών' καθώς και με την ομάδα του μεταπνευμονοϊού. Τα επίπεδα της IL-6 είναι παρόμοια μεταξύ της ομάδας των 'άλλων παθογόνων μικροοργανισμών' και της ομάδας του μεταπνευμονοϊού. Συμπερασματικά, η IL-6 είναι αυξημένη στην παρουσία

παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά η αύξηση είναι παρόμοια μεταξύ των διαφορετικών παθογόνων.

Στο διάγραμμα (4) συγκρίνονται τα επίπεδα της IL-8 για τις τρεις ομάδες. Στον κατακόρυφο άξονα απεικονίζονται τα επίπεδα της IL-8 σε pg/ml, τα οποία κυμαίνονται από 0 έως 2.500 pg/ml.

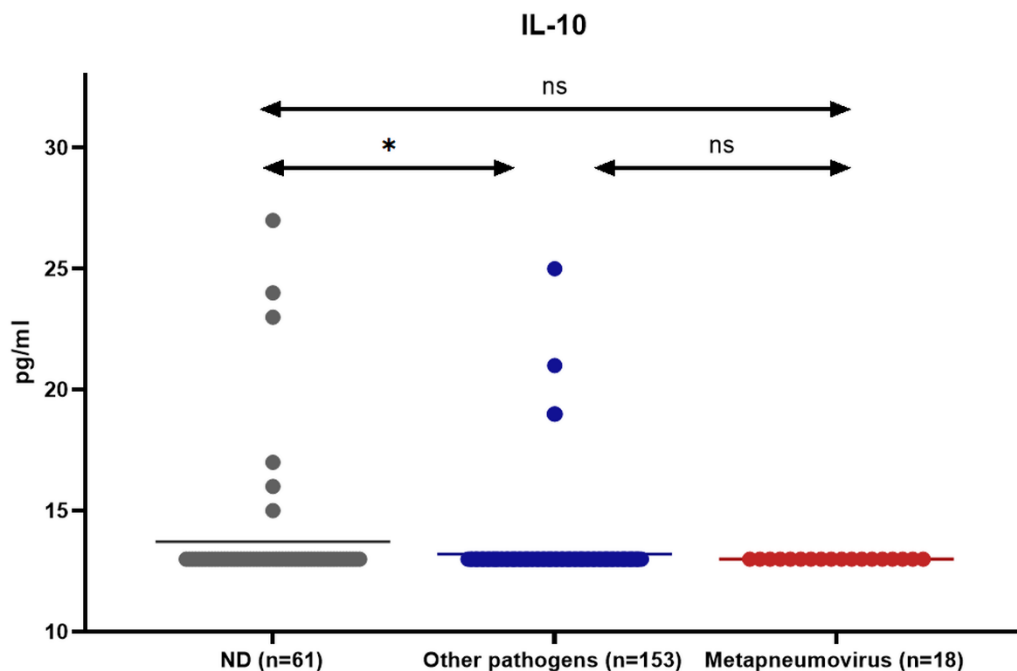


Εικόνα 4. Συγκρίσεις συγκεντρώσεων IL-8 στις ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις των ασθενών ανάλογα με το παθογόνο. [ND: ασθενείς με μη ανιχνεύσιμους παθογόνους μικροοργανισμούς (n=61), Other Pathogens: άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί (n=153), Metapneumovirus: Μεταπνευμονοϊός(n=18), *p<0.05, **p<0.01, *p<0.0001 ,****p<0.00001]**

Η ομάδα ND εμφανίζει τα χαμηλότερα επίπεδα IL-8, με συγκεντρώσεις που είναι σημαντικά χαμηλότερες από τις άλλες δύο ομάδες. Η ομάδα των 'άλλων παθογόνων' παρουσιάζει πολύ αυξημένα επίπεδα IL-8 σε σχέση με την ND

ομάδα. Η ομάδα του μεταπνευμονοϊού έχει παρόμοια επίπεδα IL-8 με την ομάδα ‘των άλλων παθογόνων μικροοργανισμών’, μη στατιστικά σημαντική διαφορά, αλλά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από την ομάδα ND.

Τέλος, στο διάγραμμα (5) συγκρίνονται τα επίπεδα της κυτταροκίνης IL-10 ανάμεσα στις 3 προαναφερθείσες ομάδες. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζονται τα επίπεδα της IL-10 σε pg/ml, τα οποία κυμαίνονται από 10-30 pg/ml.



Εικόνα 5. Συγκρίσεις συγκεντρώσεων IL-10 στις ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις των ασθενών ανάλογα με το παθογόνο. [ND: ασθενείς με μη ανιχνεύσιμους παθογόνους μικροοργανισμούς (n=61), Other Pathogens: άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί (n=153), Metapneumovirus: Μεταπνευμονοϊός(n=18), *p<0.05, **p<0.01,*p<0.0001 ,****p<0.00001]**

Φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ND και της ομάδας 'των άλλων παθογόνων'. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ άλλων συνδυασμών ομάδων. Η ανάλυση υποδεικνύει ότι τα επίπεδα IL-10 μπορεί να ποικίλλουν σε διαφορετικές συνθήκες, με μια εμφανή διαφοροποίηση ανάμεσα σε ασθενείς χωρίς ανίχνευση παθογόνου μέσω μοριακού ελέγχου και ασθενείς με απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών, αν και δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ του μεταπνευμονοϊού και άλλων ομάδων.

Συζήτηση

Η παρούσα ανάλυση υποδεικνύει πως οι κυτταροκίνες IL-6 και IL-8 αυξάνονται παρουσία των ιογενών παθογόνων που μελετήθηκαν, αλλά δεν διαφοροποιούνται μεταξύ των διαφορετικών λοιμώξεων αναπνευστικού. Τα επίπεδα TNF-α παραμένουν σταθερά ανεξάρτητα από την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών σε λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος. Η IL-10 αυξάνεται κυρίως σε περιπτώσεις ασθενών στους οποίους δεν ανιχνεύεται παθογόνος μικροοργανισμός με τις μοριακές μεθόδους, αλλά δεν διαχωρίζει αποτελεσματικά λοιμώξεις από μεταπνευμονοϊό από τα λοιπά στελέχη μικροοργανισμών που ανιχνεύει το πάνελ αναπνευστικού που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη.

Περιορισμοί της μελέτης μας αποτέλεσαν: η μη μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών σε υγιείς μάρτυρες, ο μικρός αριθμός ασθενών με hMPV η μη συσχέτιση των επιπέδων των κυτταροκινών με τη διάρκεια των συμπτωμάτων,

τη βαρύτητα αυτών, την έκβαση των ασθενών και τη θνητότητα και τέλος, η μη μελέτη της συστηματικής φλεγμονής με μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών στον ορό των ασθενών.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία που αντίστοιχα εξετάζουν την τοπική φλεγμονή σε ρινικές ή βρογχικές εκκρίσεις ασθενών με λοίμωξη από ιούς ή τη συστηματική φλεγμονή με μέτρηση κυτταροκινών σε ορό. Οι περισσότερες που αφορούν τον hMPV, εξετάζουν στο μεγαλύτερο κομμάτι τους παιδιατρικούς ασθενείς με μέτρηση κυτταροκινών στον ορό αυτών, αντίθετα με τη δική μας μελέτη.

Έχει έτσι διερευνηθεί η δυνατότητα χρήσης της IL-6, IL-8 και του TNF-α ως προγνωστικών δεικτών για τη βαρύτητα νόσησης από hMPV (3) ή η συσχέτιση αυξημένων επιπέδων TSLP με αυξημένη σοβαρότητα νόσου και εμφάνιση συριγμού (5). Από τα αποτελέσματα των παραπάνω προσφέρονται επίσης, πιθανές μέθοδοι διαφοροδιάγνωσης ανάμεσα στον hMPV και στους διάφορους ιούς που μένει να εμπεριστατωθούν με επόμενες μελέτες.

Διαφορές στα προφίλ κυτταροκινών στις ρινικές εκκρίσεις παιδιατρικών ασθενών, έχουν όμως αναγνωριστεί ανάμεσα στον RSV και τον hMPV, υποδεικνύοντας σημαντική αύξηση των IL-4 και IL-10 στη λοίμωξη από hMPV σε αντίθεση με την αύξηση των IL-2 και η IFN-γ στη λοίμωξη από RSV, δίνοντας δυνατότητα πιθανής χρήσης αυτών σαν διαφοροδιαγνωστικό μέσο ανάμεσα στους δύο ιούς. (4)

Η μελέτη προσφέρει χρήσιμα δεδομένα για την τοπική φλεγμονώδη απόκριση στις λοιμώξεις αναπνευστικού, αλλά υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τη διαγνωστική και προγνωστική αξία των κυτταροκινών στις

αναπνευστικές λοιμώξεις. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να συμβάλουν στη βελτίωση της κατανόησης της παθοφυσιολογίας των λοιμώξεων και ενδεχομένως στη στοχευμένη θεραπευτική παρέμβαση. Μπορεί κανείς να υποθέσει λοιπόν, πως σε βαριές λοιμώξεις αναπνευστικού από μεταπνευμονιό, τη συστηματική ενεργοποίηση του καταρράκτη της φλεγμονής θα μπορούσε να αναχαιτίσει ένας φαρμακευτικός παράγων αντι-IL6 ή αντι-IL8 ενώ δεν αναμένεται κλινική ανταπόκριση με την χρήση των αντι-TNFα παραγόντων. Περαιτέρω έρευνα μένει να επιβεβαιώσει τις υποθέσεις αυτές και να ανοίξει νέους δρόμους στην κατανόηση και την αντιμετώπιση των ιικών λοιμώξεων.

Σύνοψη

Η παρούσα εργασία εστιάζει στις λοιμώξεις από τον ανθρώπινο μεταπνευμονοϊό (hMPV), έναν RNA ιό της οικογένειας Pneumoviridae, και αναδεικνύει τη σύνδεσή του με τις οξείες αναπνευστικές λοιμώξεις και το ρόλο των κυτταροκινών σε αυτές. Ο ιός προσβάλλει κυρίως ευάλωτες πληθυσμιακές ομάδες, όπως νεογνά, ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, προκαλώντας ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων από ήπια έως σοβαρή συμπτωματολογία, περιλαμβανομένης της βρογχιολίτιδας, της πνευμονίας και της επιδείνωσης του άσθματος. Η ανάλυση των κυτταροκινών στις λοιμώξεις αυτές αποκάλυψε σημαντικά ανοσολογικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη φυσική και την επίκτητη ανοσία, με άμεσες θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές.

Οι λοιμώξεις από hMPV συχνά συνυπάρχουν με άλλους αναπνευστικούς ιούς, όπως ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV) και οι ιοί της γρίπης, γεγονός που περιπλέκει τη διάγνωση και τη διαχείριση. Μελέτες επιβεβαιώνουν ότι ο hMPV προκαλεί κλινική συμπτωματολογία που κυμαίνεται από ήπια συμπτώματα, όπως ρινική καταρροή και φαρυγγαλγία, έως σοβαρή πνευμονία με υποξυγοναιμία. Σημαντικό εύρημα είναι η παρουσία εξωπνευμονικών εκδηλώσεων, όπως επιπλοκές από το κεντρικό νευρικό σύστημα και το γαστρεντερικό. Η εποχικότητα του hMPV παρουσιάζει διακυμάνσεις, με αυξημένη εμφάνιση την άνοιξη, ενώ η ηλικιακή κατανομή διαφέρει από τον RSV.

Οι κυτταροκίνες αποτελούν κεντρικό μηχανισμό στην ανοσολογική απόκριση έναντι του hMPV. Τοπικά, ο ιός προκαλεί παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-18, που ενεργοποιεί την ειδική ανοσία, και επάγει τη

δυσλειτουργία του αναπνευστικού επιθηλίου. Συστηματικά, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών όπως IL-6, IL-10 και TNF-α, με τα επίπεδά τους να συσχετίζονται με τη βαρύτητα της λοίμωξης. Η αυξημένη έκφραση των Th1/Th2 κυτταροκινών (π.χ., IFN-γ, IL-4) διαφοροποιεί τον hMPV από άλλους ιούς και μπορεί να αξιοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς. Ο hMPV και ο RSV μοιράζονται κοινές παθοφυσιολογικές εκδηλώσεις, όπως η βρογχιολίτιδα, αλλά εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στα ανοσολογικά μονοπάτια που ενεργοποιούν. Ο RSV σχετίζεται περισσότερο με αυξημένα ηωσινόφιλα και Th2 κυτταροκίνη IL-4, ενώ ο hMPV συνδέεται με εντονότερη Th1/Th17 ανοσία και υψηλότερα επίπεδα IL-6 και IL-17. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του hMPV με το μονοπάτι της απόπτωσης και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση.

Ειδική αναφορά γίνεται στη σχέση του hMPV με την εμφάνιση ή επιδείνωση του άσθματος. Ο ιός πυροδοτεί ουδετεροφιλική φλεγμονή μέσω της Th17 ανοσιακής απόκρισης, επάγοντας μακροχρόνια αναπνευστική δυσλειτουργία. Η δυσλειτουργία της απόπτωσης σε ασθματικούς ασθενείς προσδίδει ευαισθησία στη λοίμωξη, ενώ η υπερέκφραση πρωτεϊνών όπως η HSP70 προσφέρει θεραπευτικές δυνατότητες. Η στόχευση των κυτταροκινών αποτελεί πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση. Τα επίπεδα TNF-α και IL-6 μπορούν να καθοδηγήσουν τη διαχείριση σοβαρών περιπτώσεων, ενώ η ανάπτυξη αντιικών παραγόντων που περιορίζουν την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών μονοπατιών είναι ζωτικής σημασίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης οι στρατηγικές που στοχεύουν τη διόρθωση της δυσλειτουργικής απόπτωσης και την ανοσορρύθμιση.

Η εντατικοποίηση της έρευνας γύρω από τους μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τον hMPV είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ιού με το μονοπάτι IFN και τις πρωτεΐνες STAT, καθώς και η επίδρασή του στην επίκτητη ανοσία, αποτελούν πεδία με σημαντική ερευνητική δυναμική. Επιπλέον, η ταυτοποίηση βιοδεικτών κυτταροκινών μπορεί να συμβάλει στην πρόωμη διάγνωση και τη διαστρωμάτωση των ασθενών.

Η εργασία παρέχει σημαντικές γνώσεις για τον ρόλο των κυτταροκινών στις λοιμώξεις από hMPV, προσφέροντας τόσο διαγνωστικές όσο και θεραπευτικές κατευθύνσεις. Η σύνθεση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας με τα ευρήματα της μελέτης που αναλύθηκε ανοίγει τον δρόμο για περαιτέρω μελέτες που θα ενισχύσουν την κλινική διαχείριση των λοιμώξεων αυτών.

Βιβλιογραφία

1. Sarkar S, Ratho RK, Singh M, Singh MP, Singh A, Sharma M. Comparative Analysis of Epidemiology, Clinical Features, and Cytokine Response of Respiratory Syncytial and Human Metapneumovirus Infected Children with Acute Lower Respiratory Infections. *Jpn J Infect Dis.* 2022 Jan;75(1):56–62.
2. Lima JT, Paula FE, Proença-Modena JL, Demarco RC, Buzatto GP, Saturno TH, et al. The seasonality of respiratory viruses in patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2015 Jan 1;29(1):19–22.
3. Xiang W qing, Li L, Wang B han, Ali AF, Li W. Profiles and predictive value of cytokines in children with human metapneumovirus pneumonia. *Viol J.* 2022 Dec 1;19(1).
4. Park JS, Kim YH, Kwon E, Callaway Z, Fujisawa T, Kim CK. Comparison of nasal cytokine profiles of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Asia Pac Allergy.* 2017 Oct;7(4):206–12.
5. Gu W, Wang Y, Hao C, Zhang X, Yan Y, Chen Z, et al. Elevated serum levels of thymic stromal lymphopoietin in wheezing children infected with human metapneumovirus. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70(2):161–6.
6. Baturcam E, Snape N, Yeo TH, Schagen J, Thomas E, Logan J, et al. Human metapneumovirus impairs apoptosis of nasal epithelial cells in asthma via HSP70. *J Innate Immun.* 2017 Jan 1;9(1):52–64.
7. Hastings AK, Erickson JJ, Schuster JE, Boyd KL, Tollefson SJ, Johnson M, et al. Role of Type I Interferon Signaling in Human Metapneumovirus Pathogenesis and Control of Viral Replication. *J Virol.* 2015 Apr

- 15;89(8):4405–20.
8. Rogers MC, Miranda-Katz M, Zhang Y, Oury TD, Uccellini MB, García-Sastre A, et al. STAT2 Limits Host Species Specificity of Human Metapneumovirus. *Viruses*. 2020 Jul 1;12(7).
 9. Tsalik EL, Fiorino C, Aqeel A, Liu Y, Henao R, Ko ER, et al. The Host Response to Viral Infections Reveals Common and Virus-Specific Signatures in the Peripheral Blood. *Front Immunol*. 2021 Oct 27;12.
 10. Lai SH, Liao SL, Wong KS, Lin TY. Preceding human metapneumovirus infection increases adherence of *Streptococcus pneumoniae* and severity of murine pneumococcal pneumonia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016 Apr 1;49(2):216–24.
 11. Tzannou I, Nicholas SK, Lulla P, Aguayo-Hiraldo PI, Misra A, Martinez CA, et al. Immunologic Profiling of Human Metapneumovirus for the Development of Targeted Immunotherapy. In: *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2017. p. 678–87.
 12. Kan-O K, Ramirez R, Macdonald MI, Rolph M, Rudd PA, Spann KM, et al. Human Metapneumovirus Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Impact of Glucocorticosteroids and Interferon. *J Infect Dis*. 2017 May 15;215(10):1536–45.
 13. Diab M, Vitenshtein A, Drori Y, Yamin R, Danziger O, Zamostiano R, et al. Oncotarget 66468 www.impactjournals.com/oncotarget Suppression of human metapneumovirus (HMPV) infection by the innate sensing gene CEACAM1 [Internet]. Vol. 7, *Oncotarget*. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/

14. Who W. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. Interim guidance. *Pediatr i Med Rodz.* 2020;16(1):9–26.