



37. ORSZÁGOS
TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI
KONFERENCIA 2025

37. OTDK Biológia szekció

SARS-CoV-2 indukált sejthalál vizsgálata felső légutak hámsejtjeiben

Hallgató: Fikó-László Szilvia – Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem,
Csíkszeredai Kar, Biomérnöki Tanszék, Génsebészet szak, IV. évfolyam (2023-ban)

Témavezetők: dr. Albert Beáta - Biomérnöki Tanszék

dr. Salamon Pál - Biomérnöki Tanszék

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Biomérnöki Tanszék – Csíkszereda
Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház Molekuláris Diagnosztika Kutatólaboratórium

Szeged

2025.április 15-17.



Tartalomjegyzék

1. Kivonat.....	3
2. Elméleti bevezető.....	5
2.1. A koronavírusok okozta COVID-19 járvány terjedése.....	6
2.2. A SARS-CoV-2 vírus terjedésének útvonala.....	7
2.3. PANoptózis.....	9
2.3.1. Apoptózis.....	11
2.3.2. Nekroptózis.....	13
2.3.3. Piroptózis.....	15
2.3.4. PANoptoszóma.....	17
3. Célkitűzés.....	18
4. A kutatás módszertana.....	19
4.1. Elemzett minták.....	19
4.2. Módszerek.....	19
4.2.1. RNS izolálás.....	19
4.2.2. RNS koncentráció mérés és normalizáció.....	21
4.2.3. cDNS szintézis.....	22
4.2.4. SYBR Green valós idejű polimeráz láncreakció (SYBR Green qPCR).....	22
5. Kutatási eredmények bemutatása és tárgyalása.....	26
5.1. Vizsgálati csoportok nemek szerinti eloszlása.....	26
5.2. Vizsgálati csoportok SARS-CoV-2 vírusra pozitív/negatív szerinti eloszlása.....	27
5.3. A vizsgált mintákhoz tartozó betegek elhalálozási aránya.....	28
5.4. Vizsgált betegek társbetegségei.....	29
5.5. Főbb laboratóriumi paraméterek változásának vizsgálata.....	29
6. Következtetések.....	34
7. Köszönetnyilvánítás.....	37
8. Irodalomjegyzék.....	38

1. Kivonat

2019. decemberében megjelent SARS-CoV-2 koronavírus a felelős a súlyos akut légzőszervi szindróma kiváltásáért, amely egy világszintű járványos megbetegedést okozott. A programozott sejthalál evolúciósan konzervált útvonalak szabályozzák, amelyek kritikus szerepet játszanak a fejlődésben és az immunválaszban. A sejthalál szerepet játszik legtöbb kóros folyamat, de a normális szövetek szabályozásának lényeges részében is. A SARS-CoV-2 fertőzés következtében jellemző a PANoptózis, egy újonnan leírt, gyulladásos programozott sejthalál aktivációja, amelyet a PANoptoszóma, egy citoplazmatikus multimer fehérje komplex irányít. A PANoptoszóma képes párhuzamosan működtetni az apoptózist, nekroptózist és a piroptózist, amelyek három, eddig autonómnak tekintett útvonal.

Kutatásunk során SARS-CoV-2 vírussal fertőzött páciensek transzkriptomjának profilemzését végeztük a PANoptoszómát képező gének aktivitásának tekintetében. Vizsgáltuk a ZBP1- függő PANoptoszóma részét képező RIPK3 és MLKL (nekroptotikus fehérjék) és a CASP3 (apoptotikus fehérje) génexpressziós mintázatát RT-qPCR- el a SARS-CoV-2 vírussal történt fertőzést követően felső légutak hámsejtjeiben. Kutatásunk során vizsgáltuk a mintákhoz tartozó személyek életkorát, nemét, elhalálozási arányát, társbetegségeit, illetve a főbb laboratóriumi paraméterek (CRP, kreatinin, urea, limfociták) változását.

Kutatásunk során kapott eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az általunk feldolgozott mintákhoz tartozó SARS-CoV-2 vírussal fertőzött betegek (súlyos kimenetelű, aneszteziológia és intenzív terápiás osztályon fekvő betegek) nagyobb arányban haláloztak el, mint a SARS-CoV-2 vírust tekintve negatívak. Az általunk feldolgozott minták betegek között nagyobb arányban találhatók férfiak. Pozitív betegeknél a CRP, a kreatinin és az urea esetében mennyiségi növekedést figyeeltünk meg a mintavételek között, míg a limfociták esetében nagyobb mértékű csökkenés volt a jellemző. A nekroptoszóma génjeinek expresszióját tekintve, a legmagasabb expressziót az MLKL esetében, míg a legalacsonyabbat a RIPK-3 esetében

figyeltünk meg. Annak érdekében, hogy megmagyarázhassuk a RIPK-3 gén expressziójának alulszabályozására további kísérletek szükségesek.

2. Elméleti bevezető

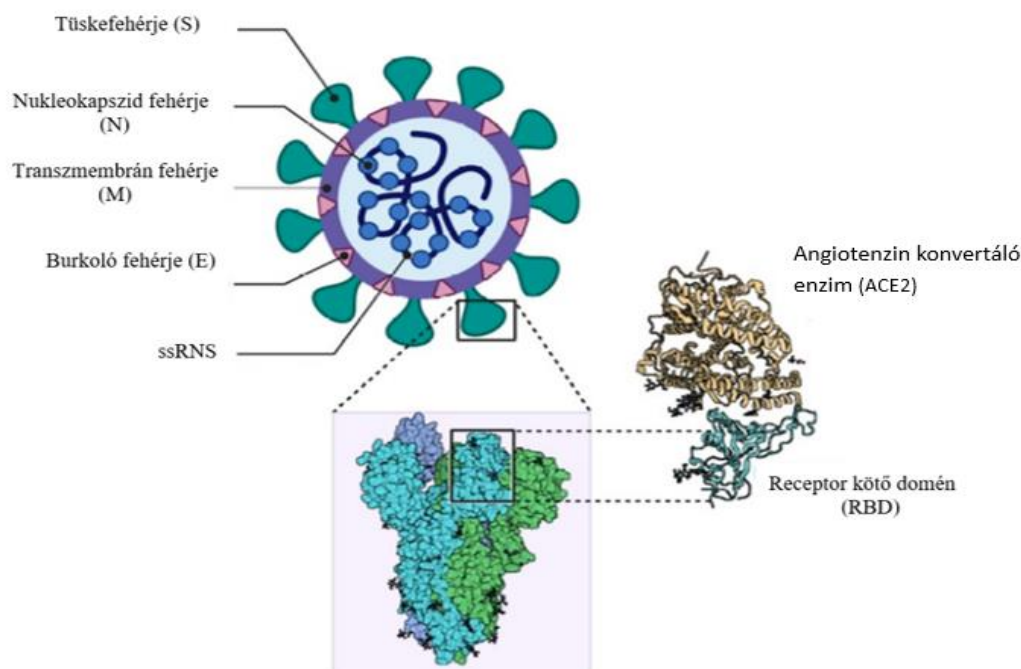
2019 végén Kínában, Wuhan (Wuhan) tartományban kitört egy megmagyarázhatatlan tüdőgyulladást okozó járvány, majd 2020 januárjában egy új koronavírus fajt azonosítottak (Paraskevis és mtsai. 2020). 2020. február 11-ig összesen 45 000 tüdőgyulladásos esetet jelentettek 26 országból. Az esetek mintegy 96,8%-át Kínából jelentették, amelyek közül a Hubei tartományban élő betegek az esetek 75%-át tették ki (Kim és mtsai. 2020).

A koronavírusok (CoV-k) a házi- és vadon élő állatokban, betegségek széles spektrumát okozzák, az enyhe és súlyos bélrendszeri, légzőszervi és szisztémás megbetegedésektől kezdve, megfázást vagy tüdőgyulladást is okoznak (Hasöksüz, Kiliç és Saraç 2020). Hét koronavírusfajról ismert, hogy emberi fertőzést okoz, amelyek közül 4, a HCoV 229E, a HCoV NL63, a HCoV HKU1 és a HCoV OC43 jellemzően megfázásos tüneteket okoz, míg a többi, nevezetesen a SARS-CoV (súlyos akut légzőszervi szindrómás koronavírus) és a MERS-CoV (közel-keleti légzőszervi szindrómás koronavírus) zoonózis eredetű, és súlyos légzőszervi megbetegedést okoz és halálhoz is vezethet (Arias-Reyes és mtsai. 2020; Hasöksüz, Kiliç és Saraç 2020).

A Coronaviridae családba tartozó SARS-CoV-2 vírus okozta a 2019-ben megjelent, COVID-19 világjárványt. A Coronaviridae víruscsalád tagjai pozitív szálú, burokkal rendelkező, ssRNS- vírusok, melyeknek genomja 4 fő strukturális fehérjét kódol. Amint az 1. ábra mutatja, a tüskefehérje (S), nagy felületű nyúlványokat alkot. A nukleokapszid szimmetriájának a kialakításában, a genomi RNS-t körülvevő nukleokapszid fehérje (N) a felelős. A transzmembrán fehérje (M) a transzmembrán folyamatokért felelős, míg a burkoló fehérje (E) a bimbózásban játszik szerepet. Az M és az E fehérjék esetében foszfoproteinekről, míg az S és az N fehérjékkel kapcsolatban glikoproteinekről beszélünk. A genom 5' – 3' végei tartalmazznak egy – egy poli (A) régiót, továbbá egy – egy sapkát (Arias-Reyes és mtsai. 2020; Hasöksüz, Kiliç, és Saraç 2020; Lee, Channappanavar, és Kanneganti 2020; Zheng és mtsai. 2021).

A β -koronavírus fertőzés során megfigyelték, hogy a proinflammatorikus citokinek, így a tumor nekrozis faktor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-1 β és interferon (IFN)- γ 3,4,5,6 erőteljes felszabadulása történik, amelyek bár a veleszületett immunválasz kritikus összetevői, citokin vihart okozva, gyulladásos sejthalál előidézésével a gazdaszövetekben és szervekben jelentős kárt okozhat (Lee, Channappanavar és Kanneganti 2020; Zheng és mtsai. 2021).

A SARS-CoV-2 vírust, a fertőzött egyénektől származó kenetmintákból azonosították, amelyek a torkából és orrából származtak. Az idő előrehaladtával történtek próbálkozások, a széklet- és vérmintákból történő azonosításra is, amelyek sikeresek voltak. Mivel a legkézenfekvőbb módszer az azonosításra a torokból és orrból való izolálás, így az a módszer a legelterjedtebb.



1. ábra: A SARS-CoV-2 vírus és az angiotenzin átalakító enzim szerkezete, specifikus fehérjei
(Módosítva, Hasöksüz, Kiliç és Saraç 2020 alapján)

2.1. A koronavírusok okozta COVID-19 járvány terjedése

A COVID-19 járvány terjedésének legjelentősebb útvonala a légzőszervi cseppek inhalációja vagy nyálkahártyán történő lerakódása, de más átviteli módok is felmerültek (pl. levegőn keresztül és faeco-oralis úton, vagy a szennyezett tárgyakkal való érintkezés). A vírus inkubációs időszaka 0–14 nap között változhat. A COVID-19, az embereket és az állatokat is érinti, súlyos károkat okozva a légutakban, beleértve a tüdőt is. Tünetei között gyakran fellelhető, az anozmia, láz, száraz köhögés, fáradtság, fejfájás, szédülés, hasi fájdalom, hányinger, hányás,

anoszmia, dysgeusia, hasmenés, de rosszabb esetekben, akár véralvadási zavarok, szív működési zavar, májkárosodás, veseelégtelenség alakulhat ki (Larsen és mtsai. 2020).

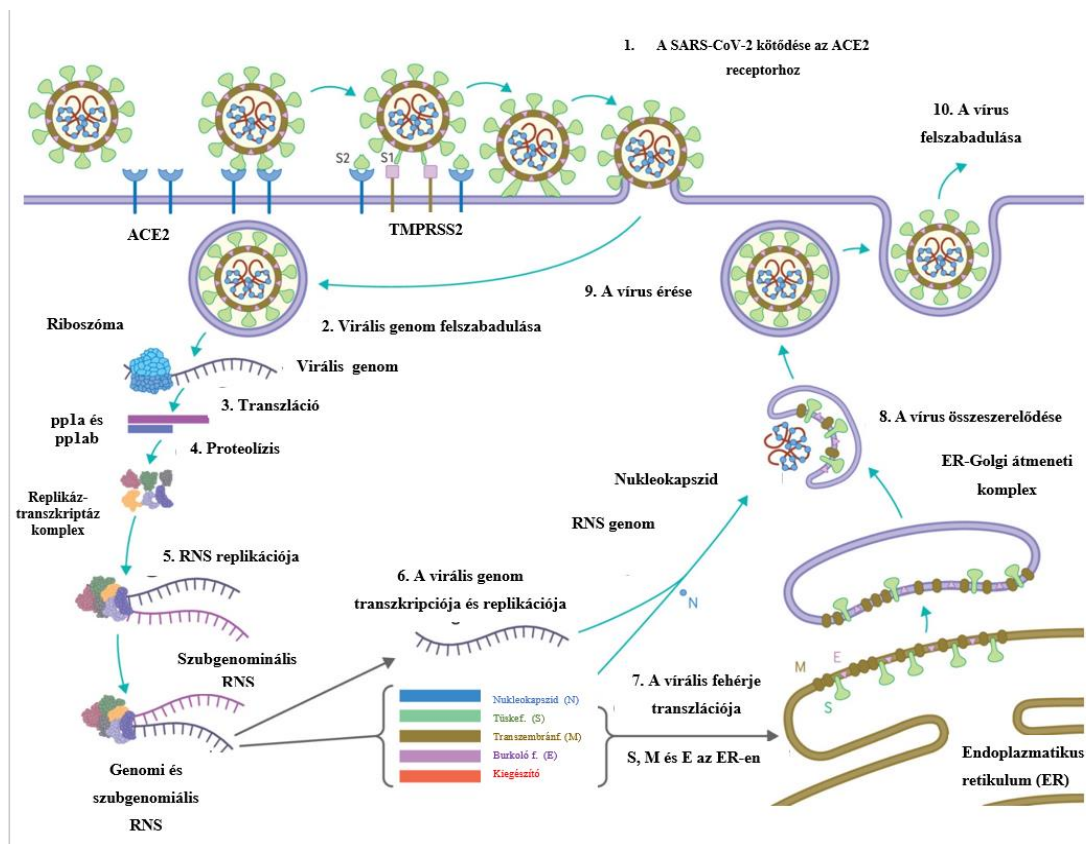
A meglévő tudományos bizonyítékok alapján úgy tűnik, hogy a meleg és nedves éghajlat csökkenti a COVID-19 terjedését, valamint arra következtetésre jutottak, hogy a COVID-19 terjedésében fontos és jelentős szerepet játszanak a változó paraméterek (mint például a népsűrűség, a vásárlóerő, a közegészségügyi beavatkozások, az elszigetelési intézkedések, az általános egészségügyi politikák, a népsűrűség, a közlekedés, a kulturális szempontok) (Mecenas és mtsai. 2020).

A COVID-19 vírussal megfertőzött és diagnosztizált betegek száma világszerte 430 millióra tehető, amelyből közel 6 millióan el is hunytak. A fertőzöttek közül 2,7 millió romániai lakos volt és a betegségben elhunytak száma, kicsivel több mint 6 ezer.

2.2. A SARS-CoV-2 vírus terjedésének útvonala

A SARS- és MERS-kutatások, valamint a legújabb SARS-CoV-2 szekvencia alapján e három, embert fertőző koronavírusnak ugyanaz a receptora (ACE2). A fertőzési mechanizmus az 2. ábrán látható. Az ACE2, más néven ACEH, az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) dipeptidil-karboxydipeptidáz család tagja. Az ACE2 receptor nagy affinitással rendelkezik az Ang II 1-es és 2-es típusú ligandokhoz, és fontos szerepet játszik számos élettani funkcióban, például a sejtproliferációban és hipertrófiában, a gyulladásos válaszban, a vérnyomásban és a folyadék egyensúlyban. Kutatások során vizsgálták az ACE2 fehérjeszintjét emberi szervekben és szövetekben, beleértve a légúti nyálkahártyát, tüdőt, gyomrot, vékonybelet, vastagbelet, bőrt, nyirokcsomókat, csecsemőmirigyet, csontvelőt, lépét, májat, vesét és agyat. Az eredmények azt mutatták, hogy az ACE2 bőségesen kifejeződik a tüdőben és a vékonybélben, valamint gyakorlatilag minden szerv endotélsejtjeiben és simaizomsejtjeiben nagymértékben expresszálódik. Ezért a keringési rendszerbe kerülve a SARS-CoV-2 valószínűleg a véráramláson keresztül terjed. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a SARS-CoV-2 nemcsak a légzőrendszert érinti, hanem potenciális veszélyt jelent az emésztőrendszerre, az urogenitális rendszerre, a központi idegrendszerre és a keringési rendszerre is (Zhang és mtsai. 2020).

A vírus a gazdaszervezet célsejt-receptorához, ACE2 kötődik, együttműködve a gazdaszervezet transzmembrán szerin-proteáz 2-vel, TMPRSS2 (sejtfelszíni fehérje), amely elsősorban a légúti hámsejtekben és az érrendszeri endotélsejtekben fejeződik ki. Ez membránfúzióhoz vezet, és a vírusgenomot a gazdaszervezet citoplazmájába juttatja. A membrán fúziót követően, a vírusreplikáció további lépései következnek, virális genom felszabadulása, transláció, proteolízis, RNS replikáció, a virális genom transzkripciója és replikációja, a virális fehérje translációja. Mindez a vírus összeszereléséhez, éréséhez és a vírus felszabadulásához vezetnek (Cevik és mtsai. 2020; Harrison, Lin, és Wang 2020).



2. ábra: A SARS-CoV-2 terjedésének útvonala (Módosítva, Cevik és mtsai. 2020 alapján)

2.3. PANoptózis

A PANoptózis, egy nemrégiben felfedezett (2020) útvonala a proinflammatorikus programozott sejthalálnak, amelyet egy citoplazmatikus multimer fehérjekomplex irányít, a PANoptoszóma (Samir, Malireddi, és Kanneganti 2020). A 3. ábra a PANoptoszóma, a programozott sejthalál, eddig autonómnak tekintett, három kulcsfontosságú útvonalát, az apoptózist, a nekroptózist, valamint a piroptózist képes párhuzamosan működtetni. A programozott sejthalál döntő szerepet játszik a szervezet fejlődésében és a gazdaszervezet védelmében.

A közelmúltban végzett vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a három ismert sejthalál típus között, piroptózis, az apoptózis és a nekroptózis mechanikai átfedések és a kiterjedt, sokrétű keresztkapcsolat jellemző. A PANoptózis során a gyulladásos sejthalál a piroptózis, az apoptózis és a nekroptózis kollektív aktiválásán keresztül következik be, ami képes megkerülni az egyes halálozási útvonalak kórokozó által közvetített gátlását (Christgen és mtsai. 2020).

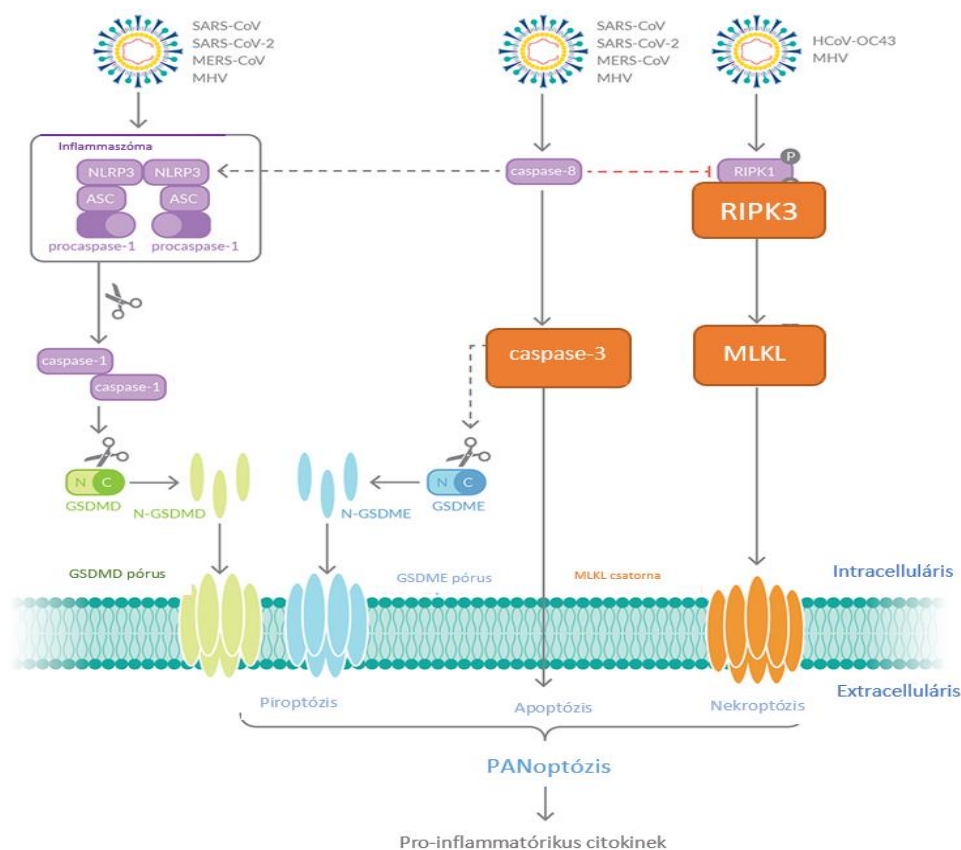
A szervezet megfelelő fejlődéséhez, valamint homeosztázisához a programozott sejthalál összetett folyamatának végrehajtása elengedhetetlen. Ezen túlmenően három kulcsfontosságú programozott sejthalál-útvonal (PCD), a piroptózis (inflammaszóma – függő PCD, amelyet a gázdermin család tagjai hajtanak végre), az apoptózis (az apoptoszóma és a végrehajtó kaszpázok által közvetített PCD) és a nekroptózis (a RIPK3 és a downstream effector MLKL által közvetített PCD) aktiválása létfontosságú a gazdaszervezet patogének elleni védekezéséhez (Christgen és mtsai. 2020). A piroptózist és a nekroptózist a sejthalál lítikus, immunológiaiag aktív formáiként jellemzik, míg az apoptózist történetileg immunológiaiag csendesnek tekintették. Bár ezek az útvonalak egyedi jellemzőkkel rendelkeznek, közös aktivációs mechanizmusokat használnak (Christgen és mtsai. 2020).

Az ezeket a sejthalál-útvonalakat szabályozó mechanizmusokra összpontosító vizsgálatok feltárták és megállapították, hogy egyes molekulák képesek szabályozni a piroptózist, az apoptózist és a nekroptózist. A Z-DNS-kötő fehérjéről (ZBP1) kiderült, hogy mindhárom útvonal aktiválásában döntő szerepet játszik. A Z-DNS-kötő fehérje 1 (ZBP1) egy veleszületett nukleinsav-érzékelő, amely szabályozza a fejlődést, valamint a gazdaszervezet védelmi válaszait (Kesavardhana és mtsai. 2020). A ZBP1 aktiválása esetén a szervezetben gyulladás, valamint

piroptózis, nekroptózis és apoptózis (PANoptózis) jön létre, a RIPK3, a Kaszpáz-8 és az NLRP3 inflammaszóma aktiválásával. A kaszpáz-8 az apoptózis elősegítője, valamint a mechanizmusának a része. Az enzimatikusan inaktív kaszpáz-8 expressziója egerekben embrionális letalitást és gyulladásos szövetelhalást okozhat a nekroptózis és a piroptózis indukálásával (Jiang és mtsai. 2021). Emellett a transzformáló növekedési faktor béta-aktivált kináz 1 (TAK1) aktivitásának genetikai delécióval vagy kórokozó által közvetített gátlással történő elvesztése a piroptózis, az apoptózis és a nekroptózis aktiválásához vezet (Christgen és mtsai. 2020) .

A homeosztázist szabályozó transzformáló növekedési komplexet később PANoptoszómának nevezték el. A PANoptoszómáról kezdetben kimutatták, hogy tartalmazza a RIPK1-et, az apoptózishoz kapcsolódó, kaszpáz-rekriminációs domént tartalmazó foltszerű fehérjét (ASC), a nukleotidkötő oligomerizációs doménhez (NOD) hasonló receptor-pirin domént tartalmazó 3-at (NLRP3) és a kaszpáz (CASP) 8-at. Egy későbbi vizsgálat megállapította, hogy a RIPK3, a CASP6, a Z-DNS-kötő fehérje 1 (ZBP1) és a CASP1 szintén az IAV-fertőzésre válaszul összeálló PANoptoszóma összetevői. Ezek a vizsgálatok együttesen azt mutatták, hogy a PANoptoszóma a piroptózis, az apoptózis és a nekroptózis szempontjából kritikus molekulákat tartalmaz, és képes mindhármát aktiválni a proinflammatorikus sejthalál végrehajtása érdekében. Ezért a PANoptózis egy olyan mechanizmust biztosít a gazdaszervezet számára, amely alternatív sejthalál védelmi mechanizmusokat aktivál, ha egy vagy több PCD-útvonal sérül egy kórokozó vagy más blokádnak miatt (Samir, Malireddi, és Kanneganti 2020).

A veleszületett immunrendszer által érzékelt kórokozó aktiválja az intracelluláris jelátviteli kaskádokat, hogy proinflammatorikus immunválaszt indukálja. Számos veleszületett szenzor PCD-t is kivált, vagy a szekretált citokinek downstream hatásai révén.



3. ábra: A koronavírusok több programozott sejthalált aktiválnak, a PANotózis aktivációja a koronavírus fertőzés esetében (Módosítva, Lee, Channappanavar, és Kanneganti 2020 alapján)

2.3.1. Apoptózis

Az apoptotikus sejthalált "immunológiailag csendes" sejthalálként jellemezték, azonban a legújabb kutatások arra utalnak, hogy gyulladásos is lehet, mivel az apoptózis kulcsfontosságú szabályozói gyulladásos mechanizmusokat aktiválnak. Az apoptózisnak kitett sejtek morfológiai változásokon mennek keresztül, a sejtmag és a kromatin kondenzációja károsodik, a DNS fragmentálódik és a membrán elvékonyodik. Apoptotikus testek képződnek, amelyek fagocitózis során elpusztulnak (Christgen és mtsai. 2020).

A 4. ábra szemlélteti az apoptózis folyamatát. Az apoptózis 2 útvonalon aktiválódhat, extrinsic vagy intrinsic útvonalakon keresztül. Az extrinsic útvonalat a sejten kívülről érkező jelek, a halálos ligésok indítják el, míg az intrinsic apoptózist tápanyag- vagy növekedési faktor hiánya, DNS-károsodás vagy más belső sejstressz aktiválja. Az apoptózis a sejthalál kaszpáz-8,

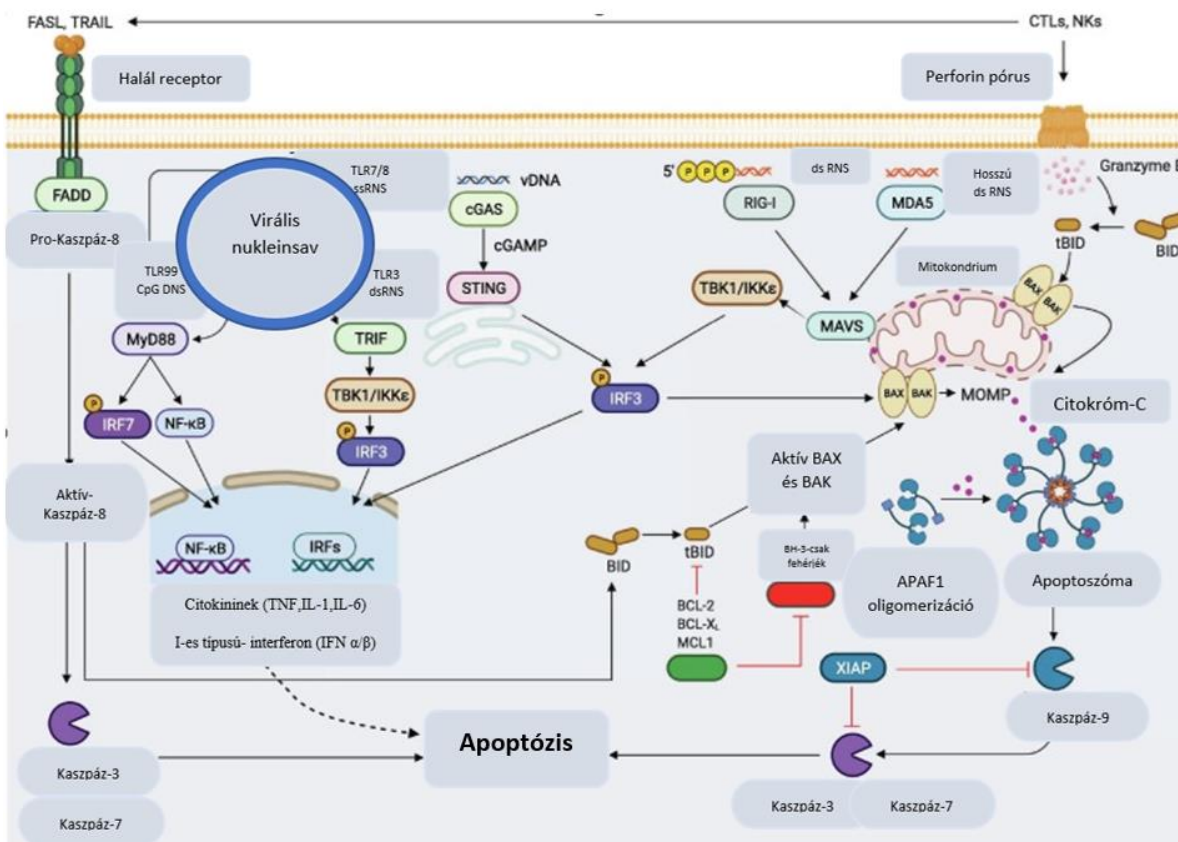
kaszpáz-10 vagy kaszpáz-9-függő formája, amelyet a kaszpáz-3 és kaszpáz-7 hajt végre (Koupenova és mtsai. 2021; Zheng és mtsai. 2020).

Az extrinsic apoptózis a halálreceptoroknak a ligandumjaik által történő aktiválásával indul be. Ilyen például a FAS aktiválása a citotoxikus T-limfocitákon (CTL) vagy természetes ölősejteken (NK) expresszálandó FASL (Fas-ligés) által. Az adaptor fehérje FADD (Fas-asszociált halál-doménből) a pro-kaspáz-8-al együtt ezután a halálreceptor citoszolikus doménjéhez kapcsolódik, ami a kaszpáz-8 aktiválódását indukálja. Az aktív kaszpáz-8 közvetlenül indukálja a kivégzőkaspázokat, a kaszpáz-3 és -7 proteolitikus hasítását, ami extrinsic apoptózist vált ki (Christgen és mtsai. 2020; Donia és Bokhari 2021; Reed 2000).

Az intrinsic apoptózist belső sejtes stressz, például DNS-károsodás vagy ER stressz váltja ki, ami a pro-apoptotikus BH3- fehérjék (például: NOXA, PUMA, BAD és BIM) aktiválódását indukálja. Ez az aktiváció kiváltja a BAX és a BAK aktiválódását a mitokondriális külső membrán permeabilizációjának (MOMP) indukálása érdekében. A MOMP apoptogén faktorok felszabadulásához vezet, beleértve a citokróm C-t, amely kötődik az apoptotikus peptidáz aktiváló faktor 1-hez (APAF1), és az APAF1 oligomerizációját indukálja. Az apoptoszóma kialakulása aktiválja az iniciátor kaszpáz-9-et, amely ezután a végrehajtó kaspázokat, a kaszpáz-3-at és -7-et hasítja, hogy az intrinszik apoptózist elindítsa. Az intrinszik apoptózis tehát aktiválódhat aktív kaszpáz-8-on keresztül is, vagy válaszul a CTL-ek és NK-sejtek által létrehozott perforin póruson keresztül felszabaduló proteáz granzim B-re, amely a BID aktív tBID formájává történő hasítását közvetíti, és a BAX-BAK-ot indítja be a MOMP és az apoptózis indukálásához (Field 2020; Hsu, Chiang, és Wang 2020).

Az apoptotikus sejthalál fontos szerepet játszik a vírusfertőzött sejtek CTL és NK sejtek általi elpusztításában is a vírusfertőzés megfékezése érdekében. Azonban az immunrendszer kijátszása és a vírus túlélési stratégiái érdekében számos vírus olyan virulenciafehérjéket kódol, amelyek gátolják az apoptotikus elhalást, például kaszpáz inhibitorokat. Ilyen például az egér citomegalovírus (MCMV) vICA fehérjéje, amely gátolja a kaszpáz-8-at, vagy a tehénhimlő vírus CrmA fehérjéje, amely gátolja a kaszpáz-8-at és a granzim B-t. A kaszpázgátlók mellett a vírusok BCL-2 homológokat is kódolhatnak, hogy blokkolják a BAX- és BAK-mediált MOMP-függő apoptózist, például az Adenovírus E1B19K. A vírusok a sejthalál elkerülésére irányuló ezen

kísérletei általában alternatív PCD útvonalak aktiválódásához vezet a gazdasejtekben, ami rávilágít a PCD útvonalak összekapcsolódásának fontosságára (Field 2020).



2. ábra: Az apoptózis folyamata két aktivációs útvonalon (extrinszik és intinszik) (Módosítva, Field 2020 alapján)

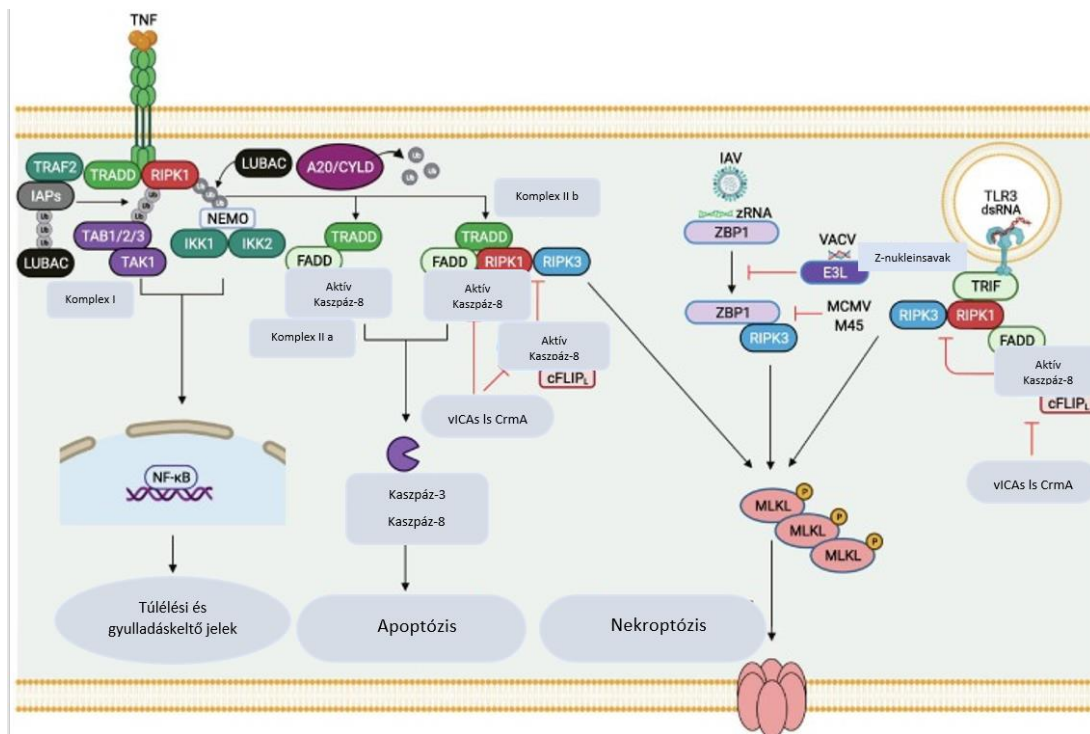
2.3.2. Nekroptózis

A programozott sejthalál (PCD) egy alternatív módja a nekroptózis, amely az apoptózis és a nekrozis jellemzőit hordozza és gyakran olyan esetekben aktiválódik, amikor az apoptózis gátolva van. Amint azt a 4. ábra szemlélteti, a nekroptózist a RIPK3 által aktivált MLKL oligomerizáció jellemzi a sejthalál közvetítése érdekében (Zheng és mtsai. 2020). A TNFR1 receptor felismeri TNF-et és indukálja az I. komplex (ubikvitin állványkomplex) kialakulását, amely magában foglalja a TNF receptor 1-es típusú halál-doménhez kapcsolódó adaptor fehérjét (TRADD), a RIPK1 kinázt, valamint az E3 ubikvitin ligázokat (IAP) és a lineáris ubikvitin lánc

összeszerelő komplexet (LUBAC). Ez a képződmény különféle ubikvitin láncok sűrű hálózatát hozza létre, amelyek lehetővé teszik számos kinázkomplex, köztük a TABs/TAK1 és a NEMO/IKKs rekrutálását, beindítva a MAPK és az NF- κ B jelátviteli útvonalakat, és lehetővé téve a túlélést elősegítő és a gyulladásos gének expresszióját. Az I. komplex disszociációját az A20 és a CYLD deubikvitinázok közvetítik, ami számos halálindukáló komplex kialakulását eredményezi. A TRADD rekrutálja a FADD-kaspáz-8-at, amellyel a IIa komplexet képezi, ami a kaspáz-8 által közvetített apoptózist indukálja. A RIPK1 kináz kapcsolódhat a IIa komplexhez, hogy IIb komplexet képezze és apoptózist indukáljon. A kaspáz-8 aktivitás vírusfehérjék (például a vICAs vagy a CrmA) által közvetített gátlása a RIPK3 kináz bekötődését váltja ki a IIb komplexbe, ami az MLKL foszforilációját és nekroptózist indukálja. A kaspáz-8 gátlása a vICAs vagy a CrmA által a TLR3 által közvetített TRIF-RIPK1-FADD-kaspáz-8 komplexen szintén a RIPK3 rekrutációját eredményezi, hogy közvetítse az MLKL foszforilációját és nekroptózist indukáljon (Field 2020; Ruskowski és mtsai. 2022; Schweizer és mtsai. 2021).

Alternatívaként a nekroptózist aktiválhatja a Z-DNS-kötő fehérje 1 (ZBP1) szenzor is, egy RHIM doméneket tartalmazó ISG, amely toborozza és aktiválja a RIPK3 által indukált MLKL foszforilációt, ezáltal sejthalált eredményezve. A ZBP1 által közvetített sejthalált különböző vírusfertőzések során figyelték meg, például a citomegalovírus (CMV), Nyugat-Nílus vírus (WNV), Zika vírus (Field 2020).

Más PCD-útvonalakhoz hasonlóan sok vírus rendelkezik olyan vírusfehérjékkel, amelyek gátolják a sejtek nekroptózisát. Például a VACV E3L vírusfehérje egy N-terminális Z α doménnel rendelkezik, amely hasonló a ZBP1-ben találhatóhoz, és amely így képes a ZBP1helyére lépni, gátolva a ZBP1-RIPK3-t és blokkolja a nekroptózist (Field 2020).



3. ábra: A nekroptózis aktiválódásának molekuláris mechanizmusai vírusfertőzés során (Módosítva, Field 2020 alapján)

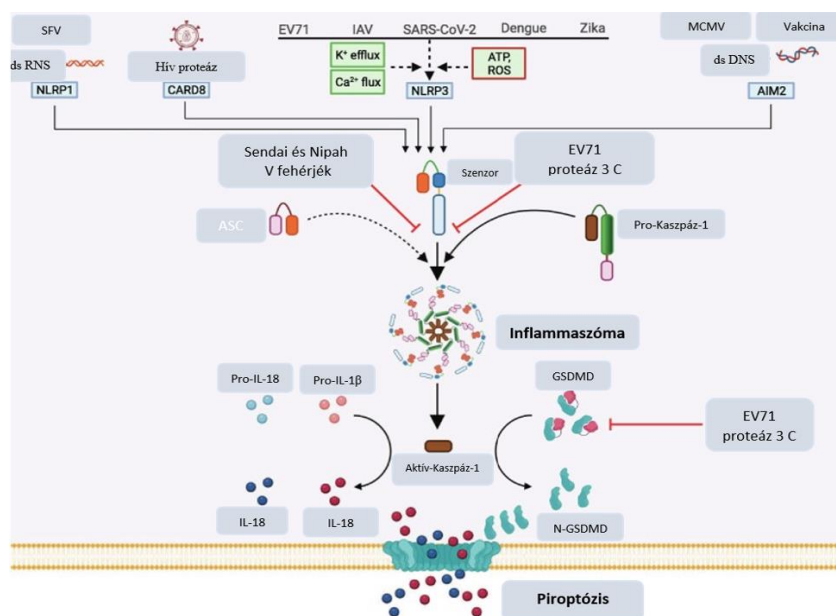
2.3.3. Piroptózis

A piroptózis a gyulladásos kaszpázok, köztük a kaszpáz-1 és a kaszpáz-4/5 által közvetített lítikus, gyulladásos sejthalál egy formája, amely a membrán felszakadását eredményezi a PAMP-ok és a DAMP-ok felszabadítása érdekében. Az 5. ábra bemutatja vírusfertőzés során a piroptózis aktiválódásának molekuláris mechanizmusát. A piroptózist a gázdermin család tagjai hajtják végre, amelyek a gázdermin D (GSDMD) inflammaszóma-aktiváció által közvetített kaszpáz-1 hasításával aktiválódhat. A GSDMD kaszpáz-11, kaszpáz-4, kaszpáz-5 vagy kaszpáz-8-mediált hasításával; a GSDME kaszpáz-3-mediált hasításával; vagy a GSDMB granzim-A-mediált hasításával aktiválható (Zheng és mtsai. 2020) .

Az inflammaszóma aktiválódása vírusfertőzések során a specifikus PAMP-okat érzékelő PRR-ekre válaszul történik. Ilyen például az AIM2 (dsDNS), a CARD8 (HIV-proteáz) és az NLRP1 (hosszú dsRNS) általi közvetlen érzékelés; vagy az NLRP3 (ionos fluxion, ATP vagy ROS) általi közvetett érzékelés. Az inflammaszómák hagyományosan egy PRR-szenzorból, az ASC adaptorfehérjéből és a kaszpáz-1-ből állnak, ahol az aktivált kaszpáz-1 felszabadul, majd

proteolitikusan hasítja a pro-IL-1 β -t és a pro-IL-18-at bioaktív gyulladásos citokinekké. Ezzel egyidejűleg az aktív kaszpáz-1 hasítja a GSDMD-t, hogy felszabadítsa a pórusképző N-terminális fragmentumot (N-GSDMD), hogy membránpórusokat hozzon létre, és indítsa el az aktív IL-1 β és IL-18 felszabadulását, valamint piroptotikus sejthalált indukáljon. A Sendai- és Nipah-vírus V fehérje közvetlenül az NLRP3-hoz tud kötődni, hogy gátolja az NLRP3 önligomerizációját, és megakadályozza az NLRP3 és az ASC összeszerelődését az inflammaszóma aktiválásához. Ezenkívül az EV71 3C proteáza képes hasítani az NLRP3-at vagy a GSDMD-t a piroptózis gátlása érdekében (Field 2020; Yu és mtsai. 2021)

Míg a vírusfertőzések során az inflammaszóma és a piroptózis aktiválódására számos példa van, a vírusok közvetlenül is beavatkozhatnak a piroptotikus sejthalálba az inflammaszóma aktiválódásának szabályozásával vagy a piroptotikus végrehajtó GSDMD célba vételével (Yu és mtsai. 2021). Egyes vírusfertőzések során a vírus V fehérje közvetlenül az NLRP3-hoz tud kötődni és gátolja az NLRP3 önligomerizációját és az NLRP3-ASC összeszerelődést, ami az IL-1 β felszabadulás csökkenéséhez. Ezáltal az immunválasz is csökken és nő a vírus túlélési esélye (Field 2020).



4. ábra: A piroptózis aktiválódásának molekuláris mechanizmusai vírusfertőzés során (Módosítva, Field 2020 alapján)

2.3.4. PANOptoszóma

A programozott sejthalált evolúciósan konzervált útvonalak szabályozzák, amelyek kritikus szerepet játszanak a fejlődésben és az immunválaszban. A proinflammatorikus programozott sejthalál újonnan felismert útját, a PANoptózist egy nemrégiben azonosított citoplazmatikus multimer fehérjekomplex irányítja, amelyet PANoptoszómának neveztek el. A PANoptózis révén többféle sejthalál útvonal aktiválása lehetőséget biztosít a gazdasejtek számára, hogy megakadályozzák a kórokozókat a felismerés elkerülésében. A PANoptoszóma a programozott sejthalál három kulcsfontosságú módját - a piroptózist, az apoptózist és a nekroptózist - képes párhuzamosan működtetni és koordinálni az egyes útvonalak kulcskomponenseinek kölcsönhatásait. A RIPK1, a RIPK3, a CASP8, az NLRP3, az ASC és a FADD képesek kölcsönhatásba lépni, hogy PANoptoszómát alkossanak, azonban a PANoptoszóma komplex összeszerelődése, a PANoptoszóma teljes összetétele és a PANoptoszóma összeszerelődését irányító mechanizmusok még ismeretlenek. Például nemrégiben megállapították, hogy a kaszpáz-6 (CASP6) elősegíti az IAV által indukált PANoptoszómát, és szerepet játszik a ZBP1 és a RIPK3 közötti kölcsönhatás elősegítésében IAV fertőzést követően, ami arra utal, hogy ez a fehérje a ZBP1 PANoptoszóma egyik összetevője (Christgen és mtsai. 2020; Samir, Malireddi, és Kanneganti 2020) (Christgen és mtsai. 2020).

3. Célkitűzés

Jelen tudományos kutatás alatt intenzív osztályon fekvő, intubált betegektől származó mintákból nyert felső légúti hámsejtekből izolált transzkriptomon molekuláris módszerekkel vizsgáltuk a SARS-CoV-2 indukált sejthalált.

A veleszületett immunszenzor, a ZBP1 a PANOptoszóma képződésének és aktivációjának pozitív szabályozója. A ZBP1-függő PANOptoszóma részét képezi a ZBP1 (érzékelő), a RIPK3 és MLKL (nekroptotikus fehérjék) és a CASP3 (apoptotikus fehérje). A kutatásunk célja a PANOptoszóma komponensei (RIPK3, CASP3, MLKL) expressziós mintázatának meghatározása SARS-CoV-2 vírussal történt fertőzést követően. A SARS-CoV-2 fertőzött tünetmentes személyek esetében az immunválasz, a molekuláris háttér még nem ismert. A kutatásunk során mindezek mellett figyelembe vettük a mintákhoz tartozó személyek életkorát, nemét, elhalálozási arányát, társbetegségeit, illetve a főbb laboratóriumi paramétereinek (CRP, kreatinin, urea, limfociták) változását.

Jövőbeni céljaink között szerepel további molekuláris útvonalak aktiválódásának vagy gátlásának felderítése SARS-CoV-2 fertőzött egyének esetében, különös hangsúlyt fektetve a tünetmentes és a súlyos (esetleg halálos) lefolyású fertőzésekre.

4. A kutatás módszertana

4.1. Elemzett minták

Jelen kutatáshoz a mintákat a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház COVID 19 diagnosztika laboratóriuma biztosította. A minták a kórház aneszteziológia és intenzív terápiás osztályán fekvő betegektől származtak, amelyek a Romániában érvényes, embereken végzett kutatások etnikai felülvizsgálatáról szóló törvénynek megfelelően (az Európai Parlament és Tanács 2016. április 27.-ei 679. számú rendeletének 2018. július 01.-től hatályos módosításának értelmében, 95/46/EK irányelvének hatályon kívül helyezéséről) kerültek feldolgozásra, anonim módon, a betegek beleegyező nyilatkozatával.

Az elemzett mintákat a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház, aneszteziológia és intenzív terápiás osztályon gyűjtötték be, olyan betegektől, amelyeknek súlyos állapotuk következtében intubációt alkalmaztak. A mintavételezés során a betegek légútjaiban használt aspirációs szonda 5 cm-es darabját kellett eltávolítani és 3 mL vírus transzport médiumot, VTM-et (REF C67VC1001, LOT 20210623) tartalmazó tubusba helyezni. A minták feldolgozását a sejtek begyűjtése jelentette ezen tubusokból, centrifugálással. Az RNS izolálásának lépéséig, a begyűjtött mintákat -80 C°-on fagyasztva tároltuk.

4.2. Módszerek

4.2.1. RNS izolálás

A minták begyűjtését követően, a sejtek feltárása, az RNS izolálása és tisztítása következett. Ehhez optimálisnak a peqGOLD Total RNA Kitje (VWR Life Science peqGOLD, Amerikai Egyesült Államok - LOT 13683424073-19) bizonyult, mivel alkalmas 100 µg össz-RNS izolálására eukarióta sejtekből és szövetből egyaránt¹.

¹ https://si.vwr.com/assetsvc/asset/sl_SI/id/17035099/contents, letöltés dátuma: 2022.11.17.

Az RNS izoláláshoz, a megfelelő steril környezet biztosításához a Telstar Class II Microbiological Safety Cabinet Bio II Advance Plus (Azbil Telstar Technologies S.L.U., Spanyolország) lamináris fülkét használtuk.

Az RNS izolálás első lépéseként a sejtlízist indukáló oldat elkészítése szükséges, amely magába foglal 660 μ L lízis puffert (TRK Lysis Buffer, LOT 24079GF56), 20 μ L DTT-t (LOT 9Y013441) és 20 μ L proteináz K-t (LOT 201M, REF 31-00846), amelynek 30 mg-ját, 1,5 mL nukleáz mentes vízben oldottuk fel (Nuclease-free Water, LOT 24075DZ60). Minden mintához 700 μ L oldatot adtunk hozzá, majd a sejtek feltárásának érdekében az MP-FastPrep-24TM (MP Biomedicals, Amerikai Egyesült Államok) malom segítségével 5 m/s-os sebességgel 20 másodpercig roncsoltuk.

A sejtek feltárását követően, 20 percig, 37 °C-os rázató inkubátorba helyeztük a mintákat (Thermo Scientific Digital Heating Shaking Dry Bath Cat. num: 88880028, Kórea), majd ezt követően centrifugáltuk a MicroCL 21R Centrifugával (Thermo ScientificTM, Németország), 21100 g-n 5 percig. A centrifugálás során kapott felülúszót a peqGOLD RNS homogenizáló oszlopokra (LOT 24076EX36) pipettáztuk, majd 1 percig 13000 g-n centrifugáltuk. A centrifugálás során az átfolyó a 2 mL-s gyűjtő tubusokba (LOT 24074G276) került, amelyet nukleáz mentes centrifugatubusokba áthelyeztük és 70 %-os tisztaságú etanollal (100%-os tisztaságú etanolból hígítás során 70 %-os oldatot készítettünk, LOT 426) 1:1-hez arányban hígítottuk. Az elegyet a következő lépésben vortexeltük a Vortex V-1 plusz (BioSan, Lettország) műszerrel, majd a peqGOLD RNS mini oszlopra (LOT 24077CL78) pipettáztuk és 10000 g-n 1 percig centrifugáltuk. Ezen lépést kétszer ismételtük meg, mivel $\approx$ 1.400 μ L elegy keletkezett az etanollal való hígítás során, de a mini oszlop maximálisan 700 μ L-es kapacitással rendelkezett. A használt gyűjtő tubusokat eldobtuk és a mini oszlopra 250 μ L mosópuffert (RNA Wash Buffer I, LOT 24078EZ59) pipettáztunk, majd 1 percig 10000 g-n centrifugáltuk.

A centrifugálás után a gyűjtő tubusokat cseréltük, továbbá ebben a lépésben történt meg a mini oszlopok DN-ázzal történő kezelése, amelyhez az E.Z.N.A. RN-áz mentes DN-áz I kitjét (Omega Bio-TEK, Amerikai Egyesült Államok - LOT E109126263-22) használtuk. A mini oszlopokra 1,5 μ L DN-áz I-et (LOT 24886AO16) és 73,5 μ L DN-áz I emésztő puffert (LOT 23462AN18) pipettáztunk, majd inkubáltuk szobahőmérsékleten (21,1 °C) 15 percig. Az inkubálást követően a mini oszlopra 250 μ L mosópuffert pipettáztunk, majd centrifugáltuk 1 percig 10000 G-

n. A gyűjtőtubusok cseréje után 500 μL mosópuffert pipettáztunk az oszlopra, majd centrifugáltuk 30 másodpercig, 10000 g-n. A használt gyűjtő tubusokat újra cseréltük, majd az oszlopokra 80 %-os etanolt (100%-os etanolból hígítottuk) pipettáztunk, centrifugáltuk 1 percig 10000 G-n. Miután ezt a lépést megismételtük és lecseréltük a gyűjtő tubusokat, centrifugáltuk 21100 g-n 2 percig a mini oszlopokat, annak érdekében, hogy az oszlopon fennmaradt folyadékot (pl. mosópuffer, alkohol) teljesen eltávolítsuk.

Végül tiszta, nukleáz mentes centrifuga tubusokba (LOT 311-08-051) helyeztük át a mini oszlopot, hozzáadtuk az elúcióhoz szükséges 50 μL nukleáz mentes vizet, majd 2 percig 21100 g-n centrifugáltuk.

4.2.2. RNS koncentráció mérés és normalizáció

Az előző fejezetben bemutatott sejtfeltárás, RNS kivonás és tisztítás során kapott RNS mennyiségét Invitrogen Qubit 2.0 fluorométerrel (Thermo Fisher Scientific, Egyesült Királyság) mértük.

Annak érdekében, hogy a cDNS szintézis során minden mintából ugyanolyan mennyiségű DNS-t szintetizáljunk, a kiinduló RNS koncentráció minden mintában megegyező kellett legyen, így a legalacsonyabb koncentrációhoz viszonyítva, 1 ng/ μL -s koncentrációra normalizáltunk minden mintát.

Az RNS koncentrációjának meghatározásához a QubitTM RNA HS Assay Kitjét (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Amerikai Egyesült Államok - LOT 2167159, REF 032855) használtuk. Készítettünk egy oldatot, amely tartalmazott 199 μL puffert (QubitTM RNA HS Buffer, LOT 2167159, Q 32855B) és 1 μL reagenst (QubitTM RNA HS Reagent *200X, LOT 2167159, REF Q32855A). Ebből az oldatból 195 μL -t, míg az izolált RNS-ből 5 μL pipettáztunk, 0,5 ml-s centrifuga tubusokba, majd vortex segítségével homogenizáltuk az oldatokat. 2 percet hagytuk szobahőmérsékleten állni, majd a Qubit 2.0 fluorométer segítségével lemértük az RNS koncentrációkat és normalizáltuk a minták RNS koncentrációját 1 ng/ μL -re a megfelelő mennyiségű nukleáz mentes vízzel kiegészítve.

4.2.3. cDNS szintézis

A cDNS szintézis vagy reverz transzkripció az a folyamat, amely során a templátként szolgáló izolált RNS-t, az enzim (reverz transzkriptáz - RNS függő DNS polimeráz, amely 5'-3' aktivitással rendelkezik) és a nukleotidok (dNTP mix) segítségével, hőmérséklet hatására (42 °C-on) cDNS-é íródik át ².

A cDNS szintézist a RevertAid H Minus First Stésard cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Litvánia - LOT 00995520, REF K1632) segítségével végeztük el.

Mintánként 1 µL primer (100 µM, Oligo dT₁₈ Primer, LOT 00323485), 8 µL puffer (250 mM Tris,-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 5X Reaction Buffer, LOT 00728751), 1 µL RN-áz inhibitor (20 U/µL, Ribolock RNase inhibitor, LOT 00736465), 2 µL 10 mM dNTP Mix (10 mM, LOT 00985207), 1 µL reverztranszkriptáz (200 U/µL, RevertAid Reverse Transcriptase, LOT 00728754) és 27 µL (1 ng/µL koncentrációjú) RNS. A komponensek összemérése után az elegyet vortexeltük, majd inkubáltuk 1 órát 42 °C-on a rázó inkubátorba, hogy a reakció végbemenjen. Az egy óra lejártá után a hőfokot felemeltük 70 °C-ra, 5 percig annak érdekében, hogy a reakciót inhibáljuk.

A cDNS tárolásához a mintákat 4x-re hígítottuk (120 µL nukleáz mentes vizet adtunk a mintához) és -80 °C-on tároltuk (CryoCube® F570h, Eppendorf, Egyesült Királyság) a minták további felhasználásáig.

4.2.4. SYBR Green valós idejű polimeráz láncreakció (SYBR Green qPCR)

4.2.4.1. A SYBR Green qPCR során használt elegy előkészítése

A SYBR Green qPCR során az AccuPower® 2xGreenStar™ Qpcr Master Mixet ³(Bioneer Corporation, Dél-Korea - LOT 2103C, REF K-6253) használtam. A méréseink során vizsgáltuk a

²https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0012715_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1621_UG.pdf, letöltés dátuma: 2022.11.17.

³ <https://AccuPower®2XGreenStar™QPCRMasterMix8-11>, letöltés dátuma: 2022.11.17.

GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Gliceralehid-3-foszfát dehidrogenáz), az MLKL (Mixed lineage kinase domain like pseudokinase, Vegyes vonalú kináz domén, mint pszeudokináz), RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, Receptor-interakcióban lévő szerin/treonin-protein kináz 3) és a CASP3 (Caspase-3, Kaszpáz-3) gének kifejeződésének mértékét vizsgáltuk.

A qPCR mix előkészítését megelőzően primer mixeket készítettünk a forward és reverse primerekből minden vizsgált génre. Az elegyek 200 µL végtérfogattal rendelkeztek, amelyh 10 µL forward primer, 10 µL reverse pimer és 180 µL nukléz mentes vizet (LOT 196991) tartalmazott.

1. táblázat: A felhasznált primerek tulajdonságai

Gén	Forward primer				Reverse primer			
	Szekvencia (5'-3')	Olvasási hőmérséklet (°C)	G/C arány (%)	Bázis hossz (bp)	Szekvencia (5'-3')	Olvasási hőmérséklet (°C)	G/C arány (%)	Bázis hossz (bp)
GAPDH	TGAAGGTCGGAGT CAACGGATTTGGT	62,33	50	26	CATGTGGGCCAT GAGGTCCACCAC	65,58	62,50	24
Kaspáz-3	GTTTGAGCCTG AGCAGAGAC	56,10	55	20	TGGCAGCAT CATCCACAC	54,25	55,56	18
RIPK-3	CGCCTGCTG AAAGAAGTG	54,25	55,56	18	GTGAGCCTC CCTGAAATG	53,22	55,56	18
MLKL	TTCACCCATA AGCCAAGGAG	54,54	50	20	GGATCTCCTG CATGCATTTT	52,99	45	20

A GAPDH gén vizsgálatához elkészítettük azt a primer mixet, amely tartalmazta a GAPDH nukleotid szekvenciájára specifikus forward és reverse primereket (1. táblázat). A forward primer szekvenciája 5'TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT3', olvasási hőmérséklete 62,33 °C, a G/C arány 50,00%, a bázis hossza 26 bp, míg a reverse primer szekvenciája 5'CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC3', olvasási hőmérséklete 65,58 °C, a G/C arány 62,50%, a bázis hossza 24 bp.

A második primer mix a CASP3 gén nukleotid szekvenciájára specifikus primereket tartalmazta (1. táblázat). A forward primer nukleotid szekvenciája 5'GTTTGAGCCTGAGCAGAGAC3', olvadási hőmérséklete 56,10 °C, a G/C arány 55,00%, a bázis hossza 20 bp, míg a reverse primer szekvenciája 5'TGGCAGCATCATCCACAC3', olvadási hőmérséklete 55,78 °C, a G/C arány 55,56%, a bázis hossza 18 bp, a fragmens hossza pedig 83 bp volt.

A harmadik primer mix azokat a primereket tartalmazta, amelyek a RIPK3 génre volt specifikus (1. táblázat). A forward primer nukleotid szekvenciája 5'CGCCTGCTGAAAGAAGTG3', olvadási hőmérséklete 54,25 °C, a G/C arány 55,56%, a bázis hossza 18 bp, míg a reverse primer szekvenciája 5'GTGAGCCTCCCTGAAATG3', olvadási hőmérséklete 53,22 °C, a G/C arány 55,56%, a bázis hossza 18 bp, a fragmens hossza pedig 122 bp volt.

Az MLKL gén jelenlétének a vizsgálatához szükséges primer mix tartalmazta a génre specifikus primereket (1. táblázat). A forward primer nukleotid szekvenciája 5'TTCACCCATAAGCCAAGGAG3', olvadási hőmérséklete 54,54 °C, a G/C arány 50,00%, a bázis hossza 20 bp, míg a reverse primer szekvenciája 5'GGATCTCCTGCATGCATTTT3', olvadási hőmérséklete 52,99 °C, a G/C arány 45,00%, a bázis hossza 20 bp, a fragmens hossza pedig 155 bp volt.

A mérés során használt elegyhez az előző lépésben szintetizált, 4x-re hígított cDNS-ekből 8 µL-t, az AccuPower® 2xGreenStar™ Qpcr Master Mixből (LOT 2103C, REF K-6253) 10 µL-t, míg a primer mixből 2 µL-t pipettáztam mintánként.

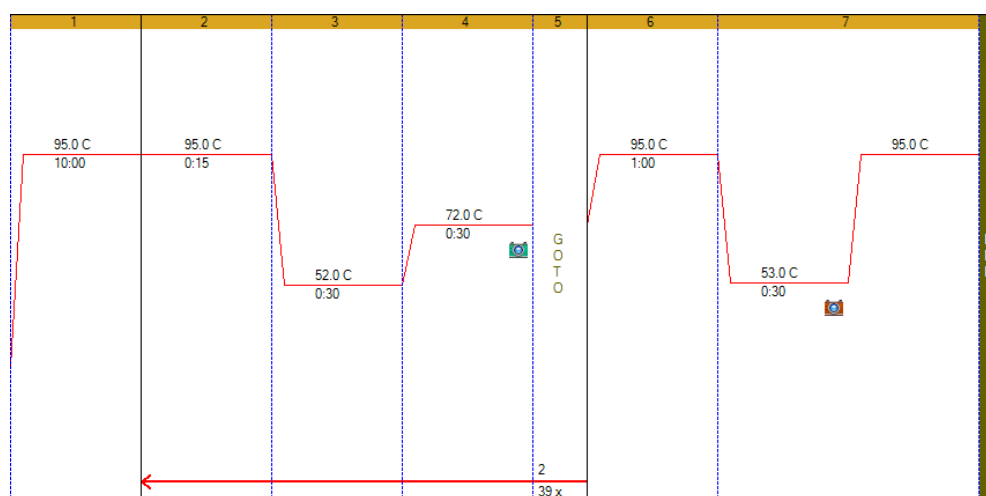
Az elegyet a mérés előtt szuszpendáltuk, majd spineltem a Capsulefuge PMC-580 Mini Centrifugával (GILSON GMCLab, Japán), az elegy homogenizálásának érdekében.

4.2.4.2. A SYBR Green qPCR

A mintákban jelen levő cDNS mennyiségének a meghatározására (qPCR során) egy nukleinsavfestékre épülő módszert alkalmaztam. A SYBR Green módszer során SYBR zöld színű

fluoreszcens festéket tartalmazó mixet (AccuPower® 2xGreenStar™ Qpcr Master Mixet) használtam. Az említett festék egy olyan fluoreszcens molekula, amelyet nukleinsav (DNS) kimutatására alkalmaznak és valós idejű PCR (qPCR) során a DNS mennyiségi meghatározását biztosítja. A PCR reakció során a DNS-festék komplex a kék fényt (a kék fény tartománya 380-500 nm) elnyeli ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$) és intenzív, fluoreszcens zöld fényt bocsájt ki ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$), amelynek az intenzitása arányos a PCR termék mennyiségével, tehát minél több a termék annál intenzívebb a kibocsátott fluoreszcens jel. Ezáltal mérhetővé válik a mintában levő cDNS mennyisége a kibocsátott fluoreszcens jel által.

A SYBR Green qPCR reakcióhoz a CFX96 valós idejű PCR (BIO-RAD, Szingapúr) detektáló rendszer készülékét használtam a hozzá tartozó programmal. A program első részében történt a denaturáció (szétválik a DNS kettős szála), 95 °C -on, a második részben történt a primerek bekapcsolódása, 53 °C -on és végül 72 °C-on megtörtént az elongáció (a szál meghosszabbítása). A denaturáció, a primerek bekapcsolódása és az elongáció 39 cikluson keresztül ismétlődött, minden ciklus végén mérve az újonnan szintetizált DNS szálba integrálódott SYBR Green intenzitását. A program legvégén lassú, fokozatos felfűtés során (53 °C-ról 95 °C-ra) mérve a SYBR Green intenzitást vizsgáltuk a disszociációs görbéket, amelyek információt adnak az alkalmazott primerek specificitásáról.



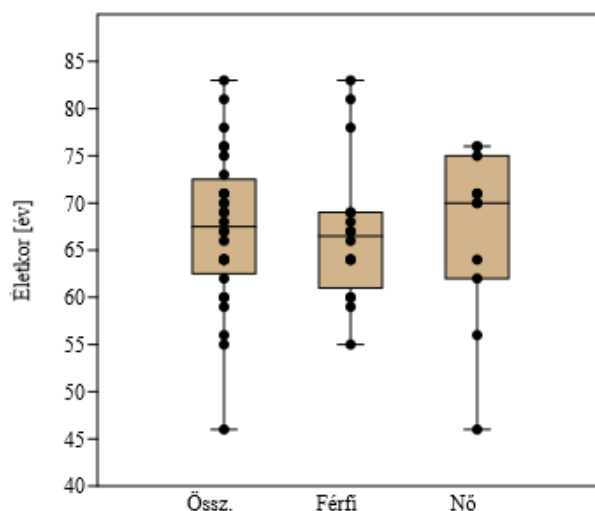
6. ábra. A qPCR program hőmérsékleti profilja

5. Kutatási eredmények bemutatása és tárgyalása

Eredményeink kiértékelése során több paramétert vizsgáltunk. Figyelembe vettük a feldolgozott mintákhoz tartozó betegek életkorát, nemét, elhalálozási arányát, SARS-CoV-2 vírusra pozitív vagy negatív teszt eredményüket, illetve társbetegségeiket. Elemeztük a vizsgált mintákhoz tartozó főbb laboratóriumi paramétereket, továbbá vizsgáltuk a különböző sejthalál típusú útvonalak főbb génjeinek expressziós szintjét.

5.1. Vizsgálati csoportok nemek szerinti eloszlása

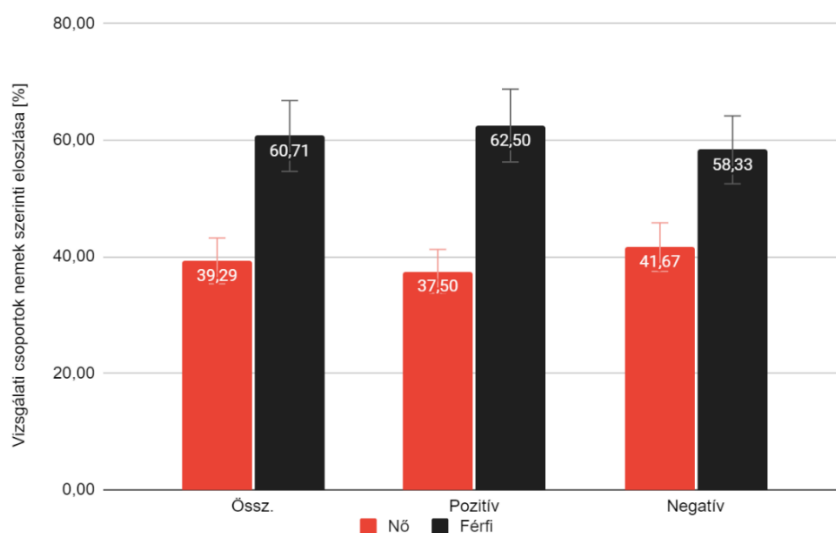
A 7. ábra tartalmazza a vizsgálati csoportok nemek szerinti eloszlását az életkoruk függvényében. Megfigyelhetjük, hogy férfiak esetében a medián alacsonyabban helyezkedik el, mint az össz. és a nők esetében, ellenben megfigyelhető, hogy a legidősebb vizsgált betegek (3 személy) a férfiak körében voltak.



7. ábra: A vizsgált minták nemek szerinti ábrázolása az életkor függvényében

Vizsgáltuk a csoportok nemek szerinti eloszlását, a SARS-CoV-2 vírusra pozitív és negatív diagnosztizálás függvényében. A 8. ábra szemlélteti, hogy a vizsgált 28 minta csupán 39,29%-a (11 személy) származott nőktől, míg 60,71%-a (17 személy) férfiaktól. A pozitív minták 37,5%-a (6 személy) női betegektől származott, míg 62,5%-a (10 személy) férfiaktól. A negatív minták 41,67%-a nőktől (5 személy), míg 58,33%-a (7 személy) férfiaktól ered. Az

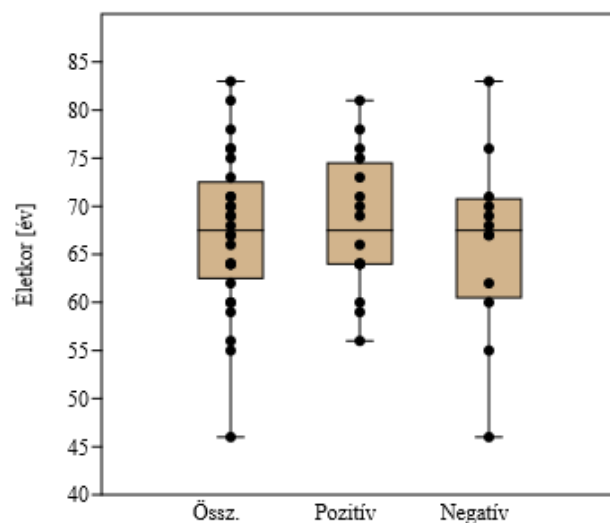
általunk vizsgált, intenzív terápiás osztályon fekvő súlyos kimenetelű esetek közül, a férfiak nagyobb mértékben fertőződnek meg a SARS-CoV-2 vírussal, mint a nők.



8. ábra: Vizsgálati csoportok nemek szerinti százalékos eloszlása

5.2. Vizsgálati csoportok SARS-CoV-2 vírusra pozitív/negatív szerinti eloszlása

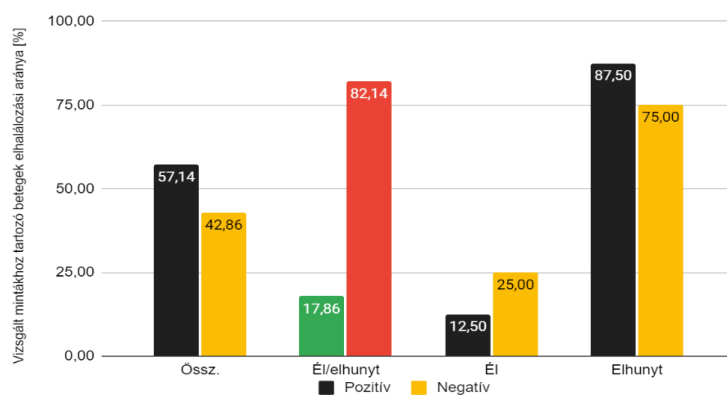
A 9. ábra a SARS-CoV-2 vírusra pozitív és negatív betegeket ábrázolja az életkoruk szerint. Megfigyeltük, hogy pozitív betegek esetében a medián ugyanott helyezkedik el, ahol az össz.-nek. A negatív korosztály lefedi a teljes vizsgált életkorspektrumot (46-83 év), míg a pozitív minták betegeinek életkora szűkebb intervallumban helyezkedik el (56-81 év).



9. ábra: SARS-CoV-2 vírusra pozitív és negatív betegek életkor szerinti megoszlása

5.3. A vizsgált mintákhoz tartozó betegek elhalálozási aránya

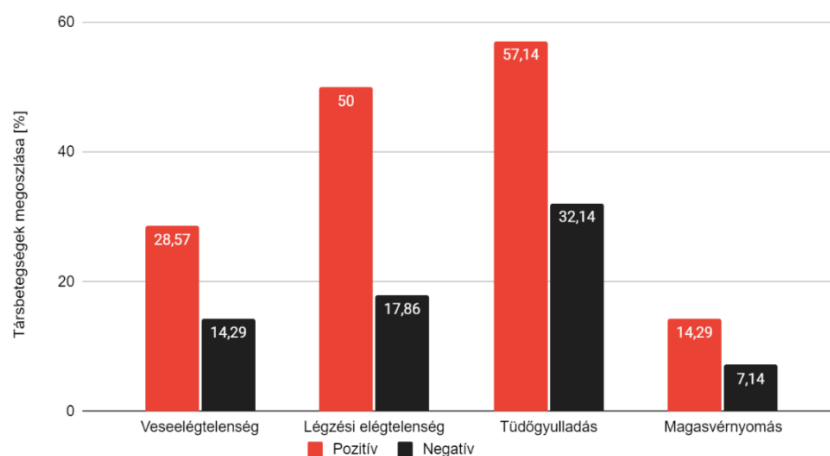
A 10. ábra a SARS-CoV-2 vírusra pozitív és negatív betegek elhalálozási arányát ábrázolja. Megfigyeltük, hogy a 28 vizsgált minta 57,14%-a (16 személy) bizonyult pozitívnak, a SARS-CoV-2 vírust tekintve, míg 42,86% (12 személy) volt negatív. Minden vizsgált mintához tartozó beteg közül csupán 17,86% (5 személy) maradt életben és 82,14% (23 személy) hunyt el. A pozitív személyek 87,50%-a (14 személy) hunyt el és csupán 12,50%-a (2 személy) maradt életben. A negatív betegek 75,00%-a (9 személy) elhalálozott, míg 25%-a (3 személy) életben maradt.



10. ábra: SARS-CoV-2 vírusra pozitív és negatív betegek elhalálozási aránya

5.4. Vizsgált betegek társbetegségei

A 11. Ábra az intenzíven fekvő betegek társbetegségeit mutatja be, annak függvényében, hogy az adott páciens a SARS-CoV-2 vírusra pozitív vagy negatív teszt eredménnyel rendelkezett. A SARS-CoV-2 vírussal megfertőződött betegeknél leggyakrabban megfigyelt betegségeket vizsgáltuk, a veseelégtelenséget, a légzési elégtelenséget, a tüdőgyulladást, valamint a magasvérnyomást. Az alábbi ábrán megfigyelhetjük, hogy a veseelégtelenség, mint társbetegség a pozitív betegek 28,57%-ban (8 személy), míg a negatív betegek esetében csupán 14,29%-ban (4 személy) volt. A pozitív betegek 50%-nál (14 személy) légzési elégtelenség lépett fel, míg a negatívak esetében ez csupán 17,86%-ára (5 személy) volt jellemző. A SARS-CoV-2 vírusra pozitív betegek esetében a tüdőgyulladás a betegek 57,17%-nál (16 személy) jelen volt, míg a negatív betegek esetében csupán 32,14%-nál (9 személy). Magasvérnyomás a pozitív betegek 14,29%-nál (4 személy), míg a negatív betegek csupán 7,14%-nál (2 személy) volt jelen.



11. ábra: A vizsgált betegek társbetegségeinek százalékos megoszlása

5.5. Főbb laboratóriumi paraméterek változásának vizsgálata

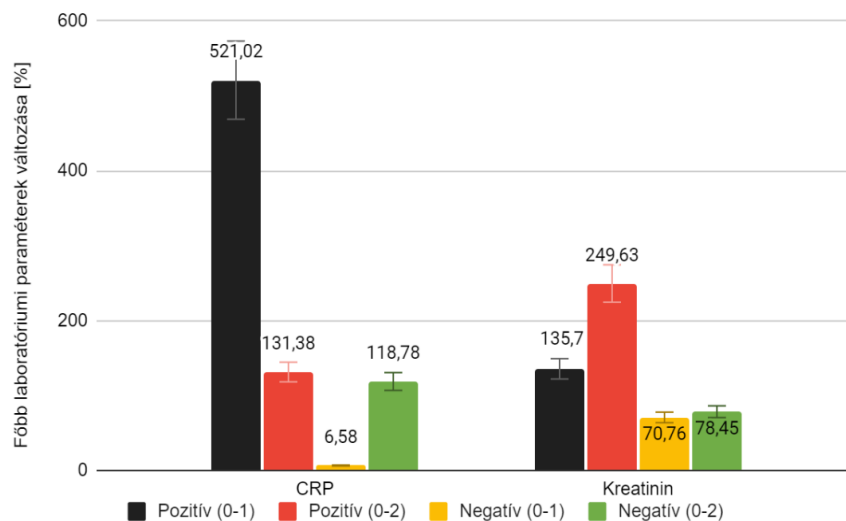
A továbbiakban részletezzük a főbb laboratóriumi paraméterek százalékos változását (12. ábra, 13. ábra). A feketével jelölt, Pozitív (0-1) oszlopok az aneszteziológia és intenzív terápiás osztályra való bekerüléskor mért, valamint a mintavételezéskor mért értékek közötti százalékos

változást mutatják be a SARS-CoV-2 vírusra pozitív betegek esetében. A pirossal jelölt, Pozitív (0-2) oszlopok az aneszteziológia és intenzív terápiás osztályra való bekerüléskor mért, valamint az elhalálozáskor/hazaengedéskor mért értékek közötti százalékos változást ábrázolják a SARS-CoV-2 vírusra pozitív betegek esetében. A sárgával jelölt, Negatív (0-1) oszlopok az aneszteziológia és intenzív terápiás osztályra való bekerüléskor mért, valamint a mintavételezéskor mért értékek közötti százalékos változást mutatják be a SARS-CoV-2 vírusra negatív betegek esetében. A zölddel jelölt, Negatív (0-2) oszlopok az aneszteziológia és intenzív terápiás osztályra való bekerüléskor mért, valamint az elhalálozáskor/hazaengedéskor mért értékek közötti százalékos változást ábrázolják a SARS-CoV-2 vírusra negatív betegek esetében.

A 12. ábrán megfigyelhetjük, a C-reaktív fehérje (CRP) és a kreatinin időbeli változását a SARS-CoV-2 vírusra pozitív és negatív betegek esetében. A CRP és a kreatinin mennyiségi változásait nyomon követtük, az aneszteziológia és intenzív terápiás osztályra való bekerüléstől egészen a halál/hazaengedés napjáig.

A CRP esetében megfigyelhetjük, hogy a pozitív betegek esetében átlag 521,02% -os növekedés figyelhető meg a CRP mennyisége az osztályra való bekerüléskor- és a mintavétel időpontjában mért értékek között, míg a negatív betegek esetében ugyanez az érték 6,58% -ra csökkent. Az osztályra való bekerüléskor mért és a halál/hazaengedés időpontjában mért CRP mennyisége átlag 131,38%-os növekedést mutatott a pozitív betegek esetében, míg a negatívaknál 118,78%-ot.

A kreatinin esetében is hasonló eredményeket kaptunk, a pozitív minták esetében az osztályra való bekerüléskor, valamint a mintavételkor mért értékek között átlag 135,7%-os mennyiségi növekedést figyeltünk meg, míg a negatív minták esetében ez csupán 70,76% volt. A halál/hazaengedéskor mért kreatinin érték átlagosan 249,63% -al növekedett a pozitív minták esetében az osztályra való bekerüléskor mért értékekhez képest, míg a negatív minták esetében ugyanez az érték 78,45% volt.

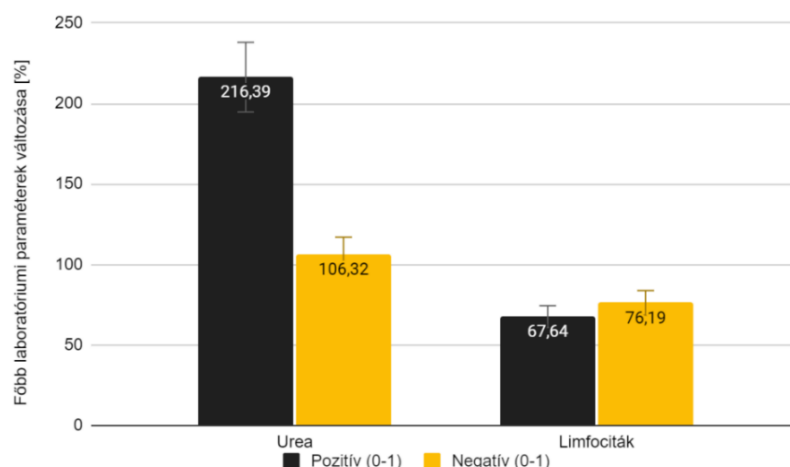


12. ábra: CRP és kreatinin időbeli változása a vizsgált betegek esetében

A 13. ábra az urea és a limfociták mennyiségének időbeli változását szemlélteti. Az urea, valamint a limfociták csak az osztályra való bekerüléskor és a mintavételkor lett vizsgálva, a halál/hazaengedés időpontjában nem.

Megfigyelhetjük, hogy a pozitív minták esetében az urea átlag 216,36%-os növekedést mutat az osztályra való bekerüléskor és a mintavétel időpontjában mért mennyiségi értékekhez képest, míg a negatív minták esetében csupán 106,32%-os növekedés volt.

A limfociták esetében viszont az figyelhető meg, hogy a negatív betegeknél a növekedés nagyobb mértékű, mint a pozitívaknál, ugyanis a negatív betegeknél átlag 24,81%-ban csökkent a limfociták mennyisége az osztályra való bekerülés és a mintavétel között, míg a pozitív minták esetében 32,36%-ban.

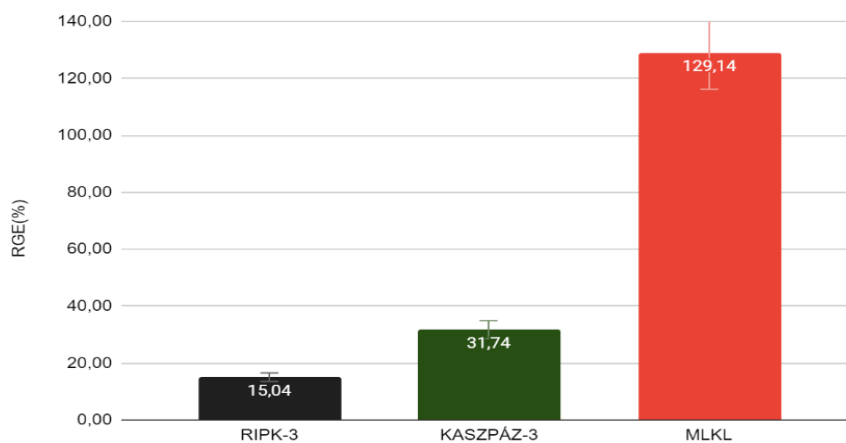


13. ábra: Az urea és a limfociták időbeli változása a vizsgált betegek esetében

5.6. A Nekroptoszóma génjeinek expressziója

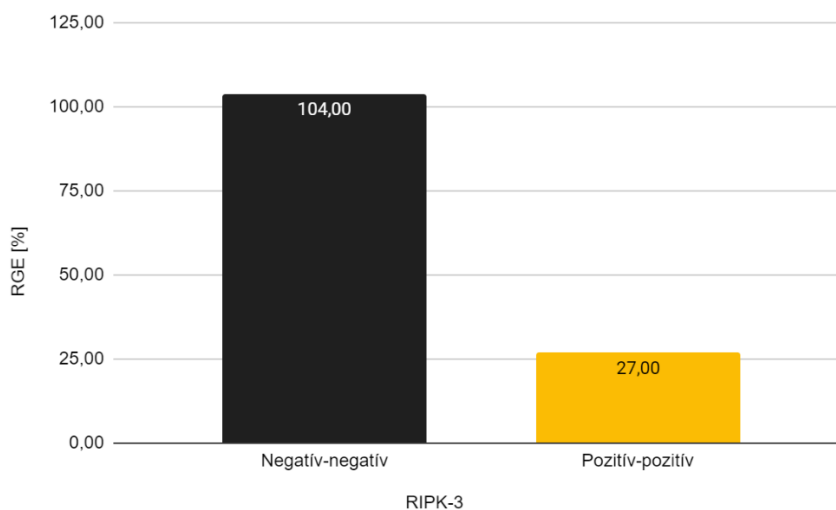
A 14. ábrán tüntettük fel a nekroptoszóma génjeinek expressziós mintázatát, a nekroptoszóma útvonalát szabályozó főbb gének kifejeződésének mértékét a vizsgált mintákban.

Az alábbi ábrán látható, a RIPK-3, a Kaszpáz-3 és az MLKL gének expressziójának mértéke. Megfigyeltük, hogy a RIPK-3 gén 15,03%-ban expresszáldott, míg a Kaszpáz-3 31,74%-ban expresszáldott. Az MLKL gén expressziója volt a legnagyobb mértékű, 129,14%-os, amely a nekroptózis önfoszforylációra képes, kulcsfontosságú génje. Az MLKL gén megnövekedett szintje magyarázatot ad, a szervezetben lejátszódó gyulladásos sejthalálra, amely a SARS-CoV-2 vírus esetében a betegeknél megfigyelhető.



14. ábra: A Nekroptoszóma génjeinek expressziós mintázata (RIPK-3, Kaszpáz-3 és MLKL)

A 15. ábrán a RIPK-3 gén expressziós mintázata látható, olyan betegek esetében, amelyektől többmintát vizsgáltunk. A RIPK-3 gén esetében vizsgáltuk egy olyan beteg mintáit, akitől több mintát kaptunk, de mindegyik negatív volt a SARS-CoV-2 vírura nézve és egy olyan beteg mintáit, akitől szintén több mintát dolgoztunk fel, de mindegyik pozitív volt a SARS-CoV-2 vírus tekintetében. Azt vizsgáltuk, hogy a RIPK-3 gén kifejeződésének mértéke hogyan változik, ha ugyanazon betegtől több minta származik. Azt figyeltük meg, hogy annak a betegnek a mintájánál, amelyiktől a negatív minták származtak, a RIPK-3 gén expressziója 104%-os volt, míg annál a betegnél, akitől pozitív mintákat vizsgáltunk a gén expressziós mértéke 73%-os csökkenést mutatott az előző méréshez képest. A rendelkezésre álló szakirodalmi adatok SARS-CoV-2 fertőzés esetében magas RIPK-3 génexpressziót mutatnak különböző sejttípusokban, ellenben nem tárgyalják az általunk vizsgált felső légutak hámsejtjeiben. Annak érdekében, hogy választ kapjunk a RIPK-3 gén expressziójának alul szabályozására további kísérletek szükségesek.



15. ábra: A RIPK-3 gén expressziós mintázata olyan betegek esetében, amelyektől több mintát vizsgáltunk

6. Következtetések

Az általunk vizsgált 28 minta 39,29%-a (11 személy) származott nőktől és 60,71%-a (17 személy) férfiaktól. A pozitív minták 37,5%-a (6 személy) női betegektől származott, míg 62,5%-a (10 személy) férfiaktól, amely egyezést mutat számos szakirodalomban fellelhető statisztikával (Gili és mtsai. 2021; Yang és mtsai. 2020). A negatív minták 41,67%-a nőktől (5 személy), míg 58,33%-a (7 személy) férfiaktól ered. A negatív korosztály lefedi a teljes vizsgált életkorspektrumot (46-83 év), míg a pozitív minták betegeinek életkora szűkebb intervallumban helyezkedik el (56-81 év). Következtetésképp tehát elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált intenzív terápiás osztályon fekvő súlyos kimenetelű betegek esetében a férfiak nagyobb mértékben fertőződtek meg a SARS-CoV-2 vírussal, mint a nők. A negatív betegek életkorspektruma szélesebb tartományú (46-83 év), míg a pozitív betegek egy szűkebb életkorspektrumon mozognak (56-81 év).

A SARS-CoV-2 vírusra pozitív és negatív betegek elhalálozási arányát tekintve elmondhatjuk, hogy a 28 vizsgált mintához tartozó beteg közül csupán 17,86% (5 személy) maradt életben és 82,14% (23 személy) hunyt el. A pozitív személyek 87,50%-a (14 személy) vesztette életét és csupán 12,50% (2 személy) maradt életben. A negatív betegek 75,00%-a (9 személy) elhalálozott, míg 25%-a (3 személy) életben maradt. Konzekvenciaképp elmondható, hogy az általunk vizsgált (súlyos kimenetelű, aneszteziológia és intenzív terápiás osztályról származó) betegek jelentősen nagyobb százalékban hunytak el, mint ahányan túléltek. (Gili és mtsai. 2021; Yang és mtsai. 2020).

A SARS-CoV-2 vírussal megfertőződött betegeknél leggyakrabban megfigyelt társbetegségek a veseelégtelenség, a légzési elégtelenség, a tüdőgyulladás, valamint a magasvérnyomás. Megfigyeltük, hogy a veseelégtelenség, mint társbetegség a pozitív betegek 28,57%-ban (8 személy), míg a negatív betegek esetében csupán 14,29%-ban (4 személy) volt. A pozitív betegek 50%-nál (14 személy) légzési elégtelenség lépett fel, míg a negatívak esetében ez csupán 17,86%-ára (5 személy) volt jellemző. A SARS-CoV-2 vírusra pozitív betegek esetében a tüdőgyulladás a betegek 57,17%-nál (16 személy) jelen volt, míg a negatív betegek esetében csupán 32,14%-nál (9 személy). Magasvérnyomás a pozitív betegek 14,29%-nál (4 személy), míg

a negatív betegek csupán 7,14%-nál (2 személy) volt jelen. Összességében elmondhatjuk, hogy ezen négy betegség a SARS-CoV-2 vírus tekintetében pozitív személyek esetében jelentősen többször fordult elő (Yang és matsai. 2020).

A főbb laboratóriumi paraméterek tekintetében megfigyeltük, hogy a C-reaktív fehérje (CRP), a kreatinin, az urea és a limfociták időbeli változását a SARS-CoV-2 vírusra pozitív és negatív betegek esetében. A CRP esetében megfigyelhetjük, hogy a pozitív betegek esetében átlag 521,02% -al nőtt a CRP mennyisége az osztályra való bekerüléskor- és a mintavétel időpontjában mért értékek között, míg a negatív betegek esetében ugyanez az érték 6,58% -ra csökkent. Az osztályra való bekerüléskor mért és a halál/hazaengedés időpontjában mért CRP mennyisége átlag 131,38%-os növekedést mutatott a pozitív betegek esetében, míg a negatívaknál 118,78%-ot. A kreatinin esetében is hasonló eredményeket kaptunk, a pozitív minták esetében az osztályra való bekerüléskor, valamint a mintavételkor mért értékek között átlag 135,7%-os mennyiségi növekedést figyeltünk meg, míg a negatív minták esetében ez csupán 70,76% volt. A halál/hazaengedéskor mért kreatinin érték átlagosan 249,63% -al növekedett a pozitív minták esetében az osztályra való bekerüléskor mért értékekhez képest, míg a negatív minták esetében ugyanez az érték 78,45% volt. Az urea esetében urea átlag 216,36%-os növekedést figyeltünk meg az osztályra való bekerüléskor és a mintavétel időpontjában mért mennyiségi értékekhez képest, míg a negatív minták esetében csupán 106,32%-os növekedés volt jellemző. A limfociták esetében viszont az figyeltük meg, hogy a negatív betegeknél a növekedés nagyobb mértékű volt, mint a pozitívaknál, ugyanis a negatív betegeknél átlag 23,81%-ban csökkent a limfociták mennyisége az osztályra való bekerülés és a mintavétel között, míg a pozitív minták esetében csupán 32,39%-ban. Következtetésképp elmondhatjuk, hogy a CRP, a kreatinin és az urea mennyiségét tekintve átlagosan jelentős növekedést tapasztaltunk a SARS-CoV-2 vírus tekintetében pozitív minták esetében, míg a negatív mintáknál ez nem volt jellemző. A limfociták esetében viszont a SARS-CoV-2 vírusra pozitív minták átlagos mennyiségi csökkenését figyeltünk meg, a negatív mintákkal ellentétben, ahol a mennyiségi növekedés volt jellemző (Gili és mtsai. 2021; Gupta, Marzook, és Ahmad 2022).

A vizsgált minták esetében, a RIPK-3 gén 15,03%-ban, míg a Kaszpáz-3 31,74%-ban expresszáldott. Az MLKL gén (nekroptózis önfoszforilációra képes, kulcsfontosságú génje) expressziója volt a legnagyobb mértékű, 129,14%-os. Az MLKL gén megnövekedett szintje

magyarázatot ad, a szervezetben lejátszódó gyulladásos sejthalálra, amely a SARS-CoV-2 vírus esetében a betegeknél gyakran megfigyelhető. A RIPK-3 gén esetében vizsgálatokat végeztünk olyan mintákon, amelyek egy betegétől származtak. Vizsgáltunk olyan esetet, ahol több minta származott egy betegtől, de mindegyik negatív volt a SARS-CoV-2 vírura nézve és olyant is, ahol mindegyik minta pozitív volt. Megfigyeltük, hogy a RIPK-3 gén kifejeződésének mértéke hogyan változik, ha ugyanazon betegtől több minta származik. A RIPK-3 gén expressziója 104%-os volt azon beteg esetében, ahol minden minta negatív volt, míg annál a betegnél, akitől pozitív mintákat vizsgáltunk csupán 27% volt. Konzekvenciaképp elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált minták esetében a gyulladást okozó sejthalál útvonalak génje, az MLKL gén expressziója magas volt a pozitív minták esetében. A rendelkezésre álló szakirodalmi adatok SARS-CoV-2 fertőzés esetében magas RIPK-3 génexpressziót mutatnak különböző sejttípusokban, ellenben nem tárgyalják az általunk vizsgált felső légutak hámsejtjeiben. Annak érdekében, hogy választ kapjunk a RIPK-3 gén expressziójának alul szabályozására további kísérletek szükségesek.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk, dr. Albert Beáta és dr. Salamon Pál vezető tanároknak a kísérletek elvégzése, kiértékelése, továbbá a dolgozat elkészítése során nyújtott támogatásért.

Köszönettel tartozunk továbbá, a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórháznak és különösen az aneszteziológia és intenzív terápiás osztály osztályvezető főorvosának, dr. Bartha Istvánnak és helyettesének, dr. Ráduly Dénesnek a rendelkezésünkre bocsájtott mintákért és a betegek (esetenként hozzátartozóik) szakszerű felvilágosításáért a minták felhasználásával kapcsolatban, a kórház molekuláris diagnosztika laboratóriumának, hogy a kísérleteink elvégzéséhez biztosították a megfelelő helyszínt, anyagokat és eszközöket, valamint a Sapientia EMTE Csíkszeredai Karának és azon belül is a Biomérnöki Tanszéknek a TDK dolgozat elkészítéséhez kapott támogatásért.

8. Irodalomjegyzék

- Arias-Reyes, Christian et al. 2020. "Does the Pathogenesis of SARS-CoV-2 Virus Decrease at High-Altitude?" *Respiratory Physiology and Neurobiology* 277: 1–22.
- Cevik, Muge, Krutika Kuppalli, Jason Kindrachuk, and Malik Peiris. 2020. "Virology, Transmission, and Pathogenesis of SARS-CoV-2." *The BMJ* 371: 1–6.
- Christgen, Shelbi et al. 2020. "Identification of the PANoptosome: A Molecular Platform Triggering Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis)." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10(May): 1–12.
- Donia, Ahmed, and Habib Bokhari. 2021. "Apoptosis Induced by SARS-CoV-2: Can We Target It?" *Apoptosis* 26(1–2): 7–8. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01656-2>.
- Field, Death. 2020. "Since January 2020 Elsevier Has Created a COVID-19 Resource Centre with Free Information in English and Mandarin on the Novel Coronavirus COVID- Company 's Public News and Information Website . Elsevier Hereby Grants Permission to Make All Its COVID-19-Related Research That Is Available on the COVID-19 Resource Centre - Including This Research Content - Immediately Available in PubMed Central and Other Publicly Funded Repositories , Such as the WHO COVID Database with Rights for Unrestricted Research Re-Use and Analyses in Any Form or by Any Means with Acknowledgement of the Original Source . These Permissions Are PANoptosis in Viral Infection : The Missing Puzzle Piece in the Cell." (January).
- Gili, Tommaso et al. 2021. "SARS-COV-2 Comorbidity Network and Outcome in Hospitalized Patients in Crema, Italy." *PLoS ONE* 16(3 March): 1–17.
- Gupta, Anamika, Hezlin Marzook, and Firdos Ahmad. 2022. "Comorbidities and Clinical Complications Associated with SARS-CoV-2 Infection: An Overview." *Clinical and Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00821-4>.
- Harrison, Andrew G., Tao Lin, and Penghua Wang. 2020. "Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis." *Trends in Immunology* 41(12): 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.
- Hasöksüz, Mustafa, Selcuk Kiliç, and Fahriye Saraç. 2020. "Coronaviruses and Sars-Cov-2." *Turkish Journal of Medical Sciences* 50(SI-1): 549–56.

- Hsu, Fei Ting, I. Tsang Chiang, and Wei Shu Wang. 2020. "Induction of Apoptosis through Extrinsic/Intrinsic Pathways and Suppression of ERK/NF-KB Signalling Participate in Anti-Glioblastoma of Imipramine." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24(7): 3982–4000.
- Jiang, Mingxia et al. 2021. "Caspase-8: A Key Protein of Cross-Talk Signal Way in 'PANoptosis' in Cancer." *International Journal of Cancer* 149(7): 1408–20.
- Kesavardhana, Sannula et al. 2020. "The Z α 2 Domain of ZBP1 Is a Molecular Switch Regulating Influenza-Induced PANoptosis and Perinatal Lethality during Development." *Journal of Biological Chemistry* 295(24): 8325–30. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.013752>.
- Kim, Jeong Min et al. 2020. "Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with Covid-19." *Osong Public Health and Research Perspectives* 11(1): 3–7.
- Koupenova, Milka et al. 2021. "SARS-CoV-2 Initiates Programmed Cell Death in Platelets." *Circulation Research* 129(6): 631–46.
- Larsen, Joseph R. et al. 2020. "Modeling the Onset of Symptoms of COVID-19." *Frontiers in Public Health* 8.
- Lee, Sang Joon, Rudragouda Channappanavar, and Thirumala Devi Kanneganti. 2020. "Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines." *Trends in Immunology* 41(12): 1083–99. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.005>.
- Mecenas, Paulo, Renata Travassos da Rosa Moreira Bastos, Antonio Carlos Rosário Vallinoto, and David Normando. 2020. "Effects of Temperature and Humidity on the Spread of COVID-19: A Systematic Review." *PLoS ONE* 15(9 September): 1–21.
- Paraskevis, D. et al. 2020. "Full-Genome Evolutionary Analysis of the Novel Corona Virus (2019-NCoV) Rejects the Hypothesis of Emergence as a Result of a Recent Recombination Event." *Infection, Genetics and Evolution* 79(January): 104212. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104212>.
- Reed, John C. 2000. "Warner-Lambert/Parke Davis Award Lecture: Mechanisms of Apoptosis." *American Journal of Pathology* 157(5): 1415–30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64779-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64779-7).
- Ruskowski, Katharina et al. 2022. "Persistently Elevated Plasma Concentrations of RIPK3, MLKL, HMGB1, and RIPK1 in Patients with COVID-19 in the Intensive Care Unit." *American*

Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 67(3): 405–8.

- Samir, Parimal, R. K. Subbarao Malireddi, and Thirumala Devi Kanneganti. 2020. "The PANoptosome: A Deadly Protein Complex Driving Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis)." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10(June).
- Schweizer, Tiziano A. et al. 2021. "Blunted SFasL Signalling Exacerbates TNF-Driven Neutrophil Necroptosis in Critically Ill COVID-19 Patients." *Clinical and Translational Immunology* 10(12): 1–12.
- Yang, Jing et al. 2020. "Prevalence of Comorbidities and Its Effects in Coronavirus Disease 2019 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis." *International Journal of Infectious Diseases* 94: 91–95.
- Yu, Pian et al. 2021. "Pyroptosis: Mechanisms and Diseases." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>.
- Zhang, Yuhao et al. 2020. "New Understanding of the Damage of SARS-CoV-2 Infection Outside the Respiratory System." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 127(April): 110195. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110195>.
- Zheng, Min et al. 2020. "Impaired NLRP3 Inflammasome Activation/Pyroptosis Leads to Robust Inflammatory Cell Death via Caspase-8/RIPK3 during Coronavirus Infection." *Journal of Biological Chemistry* 295(41): 14040–52. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.015036>.
- . 2021. "TLR2 Senses the SARS-CoV-2 Envelope Protein to Produce Inflammatory Cytokines." *Nature Immunology* 22(7): 829–38. <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-021-00937-x>.