ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

COVID-19 ENFEKSİYONU İLE TNF-α 308 G/A VE INF-Γ +874 A/T GENLERİ POLİFORMİZMİNİN KORELASYONU

Mustafa Rawan Abdulraheem ABDULRAHEEM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mustafa Rawan Abdulraheem ABDULRAHEEM tarafından hazırlanan **"COVID-19 Enfeksiyonu ile TNF-α 308 G/A ve INF-Γ +874 A/T Genleri Poliformizminin Korelasyonu"** adlı tez çalışması //2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ahmed Hamad SALEH

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. İsim SOYİSİM
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. İsim SOYİSİM
Biyoloji Anabilim Dalı
Yıldız Teknik Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**COVID-19 Enfeksiyonu ile TNF-α 308 G/A ve INF-Γ +874 A/T Genleri Poliformizminin Korelasyonu**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (01/01/2022).

Mustafa Rawan Abdulraheem ABDULRAHEEM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

COVID-19 ENFEKSİYONU İLE TNF-α 308 G/A VE INF-Γ +874 A/T GENLERİ POLİFORMİZMİNİN KORELASYONU

Mustafa Rawan Abdulraheem ABDULRAHEEM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmed Hamad SALEH

Bu çalışma, koronavirüs enfeksiyonlu tümör nekroz faktörü alfa 308 G/A ve INERFERON gamma +874 A/T gen polimorfizminin artırılmış alakası için tasarlanmıştır. Koronavirüs hastaları, Nisan ilâ Ağustos 2021 tarihleri arasında Al-Şifa Hastanesi, Kerkük, Irak'ın acil servisine başvuran 25 ile 60 yaşları arasındaki her iki cinsiyetten (31 erkek ve 29 kadın dâhil) insanlardır. Sonuçlar, sağlıklı insanlara nazaran hastalık bulaşmış insanlardaki İnterlökin 6 konsantrasyonunda belirgin bir ($P < 0.05$) artışı sergilemiştir. Diğer taraftan, sonuçlar sağlıklı insanlara nazaran hastalık bulaşmış insanlarda tümör nekroz faktörü alfa konsantrasyonunda belirgin bir artışı sergilemiştir. Serum ferritin aynı zamanda, sağlıklı insanlara nazaran hastalık bulaşmış hastalarda ferritin konsantrasyonunda da belirgin bir ($P < 0.05$) artış sergilemiştir. Bu arada, bulgular, sağlıklı insanlara nazaran hastalık bulaşmış hastalarda interferon gama konsantrasyonunda belirgin bir ($P < 0,05$) azalma sergilemiştir. Moleküler çalışma hakkında, iyi durumda olmayan hastalardan elde edilen bulgular, kritik hastalık sonucunda -308G > A tümör nekroz faktörü alfa SNP'nin belirgin bir etkiye sahip olmadığı anlamına gelmektedir. Iraklı bir toplumdaki kritik hastalarda, -308A tümör nekroz faktörü alfa alelin varlığı, sepsis, septik şok, büyük organ disfonksiyonu veya ölüme bağlı değildir. Diğer taraftan, sonuçlar, IFNG rs2430561 (+874 T/A) fonksiyonel gen polimorfizminin hastalarda bildirilen artan hastalık riski üzerinde doğrudan bir etkisi olduğunu göstermemiştir.

2022, 61 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Gen polimorfizmi, TNF-α 308 G/A, INF-Γ +874 A/T, Koronavirüs, MERS-Cov, SARS-Cov-2

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE CORRELATION OF TNF-α 308 G/A AND INF-Γ +874 A/T GENES POLYMORPHISM WITH COVID-19 INFECTION

Mustafa Rawan Abdulraheem ABDULRAHEEM

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Filiz SARIKAYA PEKACAR
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Ahmed Hamad SALEH

This study was designed to elevated the correlation of TNF-α 308 G/A and INF-γ +874 A/T genes polymorphism with COVID-19 infection. The patients of COVID-19 are from both genders (including 31 males and 29 females) between ages of 25-60 years old attending emergency of AL-Shifa Hospital, Kirkuk, Iraq at April to Augustus 2021. The results show a significant ($P<0.05$) increased in the concentration of IL-6 in the infected patients compared to the healthy persons. On the other hand, the results were showed significant increase in the concentration of TNF-α in the infected patients compared to the healthy persons. Serum ferritin also showed a significant ($P<0.05$) increase in the concentration of ferritin in the infected patients compared to the healthy persons. While, the findings were demonstrated significant ($P<0.05$) decrease in the concentration of IFN-γ in the infected patients compared to the healthy persons. About the molecular study, the findings in unwell patients imply that the -308G > A TNF-alpha SNP does not play a significant influence in the outcome of critical illness. In critically patients in an Iraqi population, the presence of the -308A TNF-alpha allele was not linked to sepsis, septic shock, greater organ dysfunction, or mortality. On the other hand, the results did not show that the IFNG rs2430561 (+874T/A) functional gene polymorphism had a direct effect on the increased disease risk reported in patients.

2022, 61 pages

Keywords: Gene polymorphism, TNF-α 308 G/A, INF-Γ +874 A/T, COVID-19, MERS-Cov, SARS-Cov-2

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bana ilmin, sebat ve sabrın anahtarını vermiş olan ve bana göre ilim dağının hep zirvesinde kalacak olan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR'a, beni hayatın tüm engellerini aşmabilmem için teşvik eden yardımcı danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Hamad SALİH'e, ruhu, bedeni ve tüm kalbi ile beni hep destekleyen deniz kaptanı canım babam Rawan ABDULRAHEEM'e, bu başarılara imza attığımı görebilmek için beni dünyaya getiren annem Saraa Muhammad SHAKER'e, ülkem Irak'ta, ve ikinci vatanım Türkiye'de benimle temas halinde olan tüm dostlarıma ve akrabalarıma, ikinci evim olan Çankırı Karatekin Üniversitesi'nin rektöründen tüm çalışanlarına kadar bütün personeline, en güzel ve asil nitelikleri içerisinde barındıran Çankırı şehrine ve en önemlisi bu büyük ülke Türkiye'ye şükran ve minnetlerimi sunar, sonsuz teşekkürlerimi iletirim.

Mustafa Rawan Abdulraheem ABDULRAHEEM
Çankırı, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 COVID-19 ..... **3**
2.1.1 COVID-19 geçmişi **3**
2.1.2 Epidemiyoloji **4**
2.1.3 Bulaşma **4**
2.1.4 Patofizyoloji **6**
2.1.5 Teşhis **8**
2.1.6 Enfeksiyon sonrası bağışıklık **9**
2.2 Sitokinler **10**
2.2.1 İnflamasyonda sitokinler ve kemokinler **12**
2.2.2 Sitokin profili ve sitokin fırtınası **13**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **16**
3.1 Çalışma Tasarımı **16**
3.2 Çalışmanın Ayarları **16**
3.3 Hastalar **17**
3.4 Kan Numunelerinin Alınması ve İşlenmesi **17**
3.5 Biyokimyasal Analiz **17**
3.5.1 Serum interlökin-6 (IL-6) belirlenmesi **17**
3.5.2 Serum tümor nekroz faktörü-α (TNF-α)'nın belirlenmesi **22**
3.5.3 Serum ferritin **27**
3.5.4 Interferon gamma (IFN-γ) **28**

3.6 Genetik Çalışma 33
3.7 İstatistiksel Analiz 35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 36
4.1 Çalışma Örneklemi 36
4.2 Bağışıklık Çalışması 36
4.2.1 İnterlökin 6 (IL-6) 36
4.2.2 Tümör nekroz faktörü α (TNF-α) 39
4.2.3 Serum ferritin 40
4.2.4 Interferon gamma (IFN-γ) 42
4.2.5 TNF alfa 308G/A 44
4.2.6 IFN gamma +874T/A 46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 49
KAYNAKLAR 50
ÖZGEÇMİŞ 61

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
℃	Santigrat derece
kDa	Kilodalton
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
nm	Nanometre

KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	Akut akciğer yarası
ARDS	Akut solunum distres sendromu
CCL	Kronik lemfositik lösemi
CD4	4 değişiklik kümesi
CDC	Hastalık kontrol merkezi
COVID-19	Koronavirus
CSS	Sitokin fırtınası sendromu
CX3CR1	CX3C çemokin ligand 1
DNA	Deksiribonükleik asit
H1N1	Domuz gribi
HRP	Bayır turbu peroksidaz
IL	İnterlökin
INF	İnterferon
INF-α	İnterferon alfa
INF-γ	İnterferon gama
MERS	Ortadoğu solunum sendromu
MOF	Çoklu organ yetmezliği
PRRs	Örnek tanıma reseptörleri
RAMPs	Patojenle bağlantılı moleküler örnekler
RNA	Ribonükleik asit
RO	Üreme sayısı
RSV	Solunum sinsitiyal
SARS	Ciddi akut solunum sendromu
TCR	T hücresi reseptörü
TFH	Foliküler T yardımcısının transkripsiyonel düzenlemesi
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü-β
Th	T yardımcı hücre
TNF	Tümör nekroz faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 COVID-19 immünopatogenez 7
Şekil 2.2 Naif T hücrelerinin farklılaştırılması 11
Şekil 2.3 Tnfα'nın merkezi rolü 12
Şekil 3.1 İnterlökin-6 standart eğrisi 22
Şekil 3.2 Tümor nekroz faktörü-α standart eğrisi 26
Şekil 3.3 İnsan ferritin standart eğrisi 28
Şekil 3.4 Interferon gamma (IFN-γ) standart eğrisi 33
Şekil 4.1 Çalışma örnekleminin yüzdesi (hastalar ve kontrol) 36
Şekil 4.2 Çalışılan gruplarda IL-6 konsantrasyonu 37
Şekil 4.3 Çalışılan gruptaki TNF-A konsantrasyonu 39
Şekil 4.4 Çalışılan gruptaki ferritin konsantrasyonu 41
Şekil 4.5 Çalışılan gruptaki IFN-Γ konsantrasyonu 43
Şekil 4.6 rs1800629 tespiti için TNF alpha 308G/A PCR optimizasyonu 45
Şekil 4.7 rs2430561 tespiti için IFN gamma +874T/A PCR optimizasyonu 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 İnflammatuvar hastalıklarda belirtilen kemokinler ve kemokin reseptörleri 13
Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan araçların listesi 16
Çizelge 3.2 Mikrokuyu şeritlerdeki boşlukların, standartların ve numunelerin düzenlenmesinin bir örneğinin gösterilmesi 20
Çizelge 3.3 Mikrokuyu şeritlerindeki boşlukların, standartların ve numunelerin düzenlenmesine ilişkin bir örneğin gösterilmesi 25
Çizelge 4.1 Çalışılan gruplarda IL-6 konsantrasyonu 37
Çizelge 4.2 Çalışılan grupta TNF-A konsantrasyonu 39
Çizelge 4.3 Çalışılan gruptaki ferritin konsantrasyonu 40
Çizelge 4.4 Çalışılan gruptaki IFN-Γ konsantrasyonu 43

1. GİRİŞ

31 Aralık 2019'da Çin, Hubei, Wuhan'daki hastaneler, nedeni bilinmeyen bir dizi pnömoni vakası bildirerek ulusal ve uluslararası ilgi görmüştür. Salgınla olası bir bağlantı nedeniyle, Wuhan halk sağlığı yetkilileri, vahşi ve canlı hayvanların satıldığı Huanan Deniz Ürünleri Toptancı Pazarı'nı 1 Ocak 2020'de kapatmıştır. Araştırmacılar 7 Ocak 2020'de doğrulanmış enfekte pnömoni hastalarından alınmış hızla yeni bir koronavirüs (SARS-CoV-2, 2019-nCoV olarak da bilinir) keşfetmişlerdir. Gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve yeni nesil dizileme kullanılarak karakterize edilmiştir. (WMHC 2020, Li *et al.* 2020).

Koronavirüsler (CoV), insanlar ve diğer omurgalılar dahil olmak üzere çeşitli konakçı türleri enfekte eden ve aralarında yayılabilen kapalı, pozitif anlamda RNA virüsleridir (Peck *et al.* 2015). İnsanları enfekte eden koronavirüsler iki gruba ayrılabilir: düşük patojenik CoV'ler ve yüksek patojenik CoV'ler. Düşük patojenik CoV'ler üst solunum yolunu enfekte edip mevsimsel solunum hastalığına neden olurken, yüksek düzeyde patojenik CoV'ler alt solunum yollarını enfekte eder ve akut akciğer hasarına (ALI), akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) ve hatta ciddi akut solunum sendromu CoV (SARSCoV) ve Orta Doğu solunum sendromu CoV (MERS-CoV) gibi hastalıklarla ölüme neden olabilir (Su *et al.* 2016, Cui *et al.* 2019).

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü 2 (SARS-CoV-2; daha önce 2019 yeni koronavirüs veya 2019-nCoV) hastalığı (COVID-19) Çin'in Wuhan kentinden dünya çapında 200'den fazla ülkeye ve bölgeye hızla yayılarak DSÖ'ye göre küresel bir pandemiye neden olmuştur. 5 Haziran 2020 tarihi itibariyle salgın 6.500.000'den fazla kişiye bulaşmış olup 380.000'den fazla insanı öldürmüştür (Chen *et al.* 2020).

Sitokin fırtına sendromu (CSS), aynı zamanda sitokin salıverme sendromu (CRS) olarak da bilinir, çeşitli başlatıcı faktörler tarafından tetiklenen, aralıksız yüksek ateş, lenfadenopati, hepatosplenomegali, sitopeni, hiperferritinemi ve merkezi sinir sisteminin (CNS) anormallikleri gibi semptomlarla tetiklenen sitokin aracılı sistemik bir inflamatuar

yanıttır. Tedavi edilmezse, çoklu organ yetmezliğine (MOF) ilerleme neredeyse meydana gelmektedir (Behrens *et al.* 2017, Chen *et al.* 2019). CSS, kontrol edilemeyen ileri beslemeli aktivasyon ve konakçı bağışıklık sisteminin amplifikasyonu ile karakterize edilir, bu da sitokin fırtınasının oluşumuna katkıda bulunan interferon (IFN)-c, tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin (IL)-1, IL-6 ve IL-18 gibi sitokinlerin büyük salınımı ile sonuçlanmaktadır (Gauthier *et al.* 2018, Crayne *et al.* 2019).

Sitokin fırtınaları, önceki araştırmalarda SARS ve MERS hastalarının kötüleşmesiyle ilişkilendirilmiştir (Channappanavar ve Perlman 2017). Diğer yüksek derecede patojenik CoV'lere benzer şekilde, artan inflamatuar faktör üretiminin neden olduğu sitokin fırtınalarının COVID-19 hastalarının patogenezinde rol oynayabileceğine ve bunun hastalığın hızlı bozulmasına yol açan birincil nedenlerden biri olabileceğine dair biriken kanıtlar mevcuttur (Chen *et al.* 2020).

Çalışmanın amaçları şu şekildedir:

1. COVID-19 ile enfekte bir hastada IL-6 konsantrasyonunun tespit edilmesi.
2. COVID-19 ile enfekte bir hastada Tümör nekroz faktörü α konsantrasyonunun tespit edilmesi.
3. COVID-19 ile enfekte bir hastada Serum ferritin konsantrasyonunun tespit edilmesi.
4. COVID-19 ile enfekte bir hastada İnterferon gama (IFN-y) konsantrasyonunun tespit edilmesi.
5. COVID-19 ile enfekte bir hastada TNF-α 308 G/A gen tespit edilmesi.
6. COVID-19 ile enfekte bir hastada INF-γ +874 A/T gen tespit edilmesi.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 COVID-19

2.1.1 COVID-19 geçmişi

Koronavirüs, zatürre, ateş, solunum güçlüğü ve akciğer enfeksiyonu (WMHC 2020). dahil olmak üzere çeşitli semptomlar üretebilen bir virüstür. Bu virüsler dünyanın her yerindeki hayvanlarda her yerde bulunur, ancak insanlarda sadece birkaç vaka bildirilmiştir. 29 Aralık 2019'da Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Çin'in Wuhan kentindeki pnömoni hastalarının alt solunum yollarını enfekte eden bir koronavirüsü tanımlamak için "2019 yeni koronavirüsü" terimini kullanmıştır (Li *et al.* 2020). DSÖ'ye göre 2019 yeni koronavirüsünün resmi terimi koronavirüs hastalığıdır (COVID-19). Virüsün resmi adı şu anda şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'dir (SARS-CoV-2). Aralık 2019'da, kökeni bilinmeyen bir grup pnömoni hastasının izini Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan'daki küçük bir Huanan Güney Çin Deniz Ürünleri Pazarı'na kadar takip etmiştir (Zhu *et al.* 2020).

Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Çin CDC), salgına yanıt olarak epidemiyolojik ve etiyolojik çalışmalar yürütmek üzere Hubei Eyaleti ve Wuhan Şehrine hızlı bir yanıt ekibi göndermiştir. DSÖ'ye göre, koronavirüs salgınının patlak vermesi, Huanan Güney Çin Deniz Ürünleri Pazarı ile bağlantılı olmasına rağmen belirli bir hayvan birliği bulunamamıştır. 10 Ocak 2020'de Prof. Yong-Zhen Zhang liderliğindeki bir araştırma ekibi, yeni koronavirüsün kaynağı olduğu tespit edilen COVID-19'un ilk genomunu ortaya çıkarmıştır (Adhikari *et al.* 2020, Wang *et al.* 2020).

Çin Yeni Yılı sırasında, Çin halkı arasında yüksek derecede insan hareketliliği olduğunda, virüs bir aydan kısa bir sürede Çin'de hızla yayılmıştır. Kimin enfekte olacağını belirlemek için henüz çok erken olsa da, erken kalıplar Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) ve Orta Doğu Solunum Sendromu'na (MERS) neden olan koronavirüslere benzer bir eğilim ortaya koymaktadır. Duyarlılığın yaş, biyolojik cinsiyet ve diğer tıbbi

sorunlarla bağlantılı olduğu görülmektedir (Fehr *et al.* 2017). DSÖ şimdi COVID-19'u Uluslararası Önem Arz Eden Halk Sağlığı Acil Durumu ilan etmiştir (WHO 2020).

2.1.2 Epidemiyoloji

COVID-19 salgını Aralık ayı başlarında Çin'in en kalabalık 7. şehri olan Wuhan'dan başlayarak tüm Çin'e ve ardından artan sayıda ülkeye yayılmıştır. 13 Ocak 2020'de, Çin dışında teyit edilen ilk COVID-19 vakası Bangkok'ta (Tayland) keşfedilmiştir (WHO 2020). 2 Mart 2020'de Çin anakarası dışındaki 67 bölge, 132 ölümle 8565 onaylanmış COVID-19 vakasının yanı sıra İran ve İtalya da dahil olmak üzere dünyanın çeşitli ülkelerinde önemli topluluk bulaşı bildirmiş olup 11 Mart 2020'de DSÖ bunu küresel pandemi olarak ilan etmiştir (Hsu *et al.* 2020).

Teyit edilen vakaların sayısı dünya genelinde istikrarlı bir şekilde artmakta olup Asya ve Avrupa bölgelerini takiben, şu anda düşük gelirli ülkelerde (31 Mart 2020 itibariyle) vakalarda keskin bir artış kaydedilmiştir. Bu pandeminin gerçek ölçeğini tahmin etmek zordur çünkü sadece şiddetli ve semptomatik olanları değil, aynı zamanda hafif olanları da saymak gerekmktedir (Lipsitch *et al.* 2020). Ne yazık ki, şu anda pandemiye küresel veya tek tip bir yanıt yok ve her ülke sorunla kendi yeteneklerine, becerilerine ve varsayımlarına göre uğraşmaktadır. Sonuç olarak, test, hastaneye yatış ve vaka tahmini için çeşitli kriterler mevcut olup bu da bir salgından etkilenen kişi sayısını hesaplamayı zorlaştırmaktadır. Tıbbi olarak tedavi edilen hastalar arasında tahmini vaka ölüm oranı, şu ana kadar sahip olduğumuz verilere göre yaklaşık %2 olmasına rağmen gerçek bir oran bir süredir bilinmemektedir (Lipsitch *et al.* 2015).

2.1.3 Bulaşma

Huanan Deniz Ürünleri Toptancı Pazarı'nın hastalık bulaşmasında ne gibi bir işlevi olduğu bilinmemektedir. İlk COVID-19 vakalarının çoğu bu pazarla ilgiliydi ve bu, SARS-CoV-2'nin hayvanlardan insanlara yayıldığını ima etmektedir (Li *et al.* 2020). Bununla birlikte, genetik bir analiz, virüsün pazara bilinmeyen bir kaynaktan girdiğine ve

insandan insana bulaşma olasılığının daha erken olmasına rağmen daha hızlı yayıldığına dair kanıtlar bulunmuştur. Kişiden kişiye bulaşma, etkilenen aile üyeleri ve tıbbi personelden oluşan kümeler tarafından onaylanmıştır (Chan et al. 2020).

1 Ocak'tan sonra, hastaların %10'undan azı pazara maruz kalmış olup hastaların %70'inden fazlası pazara maruz kalmamıştır (Li *et al.* 2020). Kişiden kişiye bulaşmanın çoğunlukla, enfekte bir kişi yakın temaslar arasında öksürdüğünde veya hapşırdığında oluşan solunum damlacıkları yoluyla gerçekleştiği varsayılmaktadır. SARS-CoV'nin yüzeylerde 96 saate kadar ve diğer koronavirüslerde 9 güne kadar kaldığı gözlemlenmiş olup bu da fomitlerin önemli bir bulaşma kaynağı olabileceğini düşündürmektedir (Kampf *et al.* 2020).

Hastalığın asemptomatik olarak bulaşıp bulaşmadığı tartışmalıdır. Erken yapılan bir çalışma olan Rothe vd. (2020) asemptomatik bulaşma rapor edilmiş olmasına rağmen daha sonra araştırmacıların hastalığı bulaştırmadan önce semptomları olan hastayla doğrudan temas kurmadığı keşfedilmiştir (Kupferschmidt 2020). Daha yakın tarihli bir çalışma Bai vd. (2020) benzer şekilde asemptomatik bulaşma olduğunu iddia etmiş olmasına rağmen bu tür herhangi bir çalışma, kişinin bildirdiği semptom yanlışlıkları veya diğer vakalar ve fomitlerle temas nedeniyle engellenebilmektedir. Hastalık özellikleriyle ilgili bulgular, seçim yanlılığına tabii olup hızlı bir şekilde değişmektedir. Bir araştırmaya göre, ortalama kuluçka süresi 5,2 gündür (%95 güven aralığı: 4,1–7,0). (Li *et al.* 2020). Vaka tanımları normalde 14 günlük bir pencere içerse de, kuluçka süresinin 19 veya 24 gün kadar uzun olduğu gözlemlenmiştir. (Chu *et al.* 2020, Huang *et al.* 2020).

Çeşitli sonuçlar ve yorumlarla temel üreme sayısı (R0) tahmin edilmiştir. Tamamen duyarlı bir popülasyonda R0, tek bir enfekte bireyden kaynaklanabilecek ortalama enfeksiyon sayısını temsil etmektedir (Bauch ve Oraby 2013). Daha önceki salgınlardan yapılan çalışmalarda R0 SARS için 2,7 ve 2009 pandemik H1N1 influenza için 2,4 olarak belirlenmiştir (Bauch ve Oraby 2013). Bir araştırmaya göre, temel üreme sayısı (R0) 2,2'dir (%95 güven aralığı: 1,4 – 3,9) (Huang *et al.* 2020). R0, ise 12 soruşturmanın daha sonraki bir incelemesinde 3,28 olarak belirlenmiştir. R0 ortalama bir değer olduğu için,

büyük kümelerde büyük bir salgın kaynağı olabilecek ancak R0'ın değeri üzerinde çok az etkisi olan süper yayıcıların işlevini de değerlendirmek gerekmektedir (Kucharski and Althaus 2015). R0, bir salgının akut fazında veya pandemi öncesi dönemde kararsız olabilmektedir (Bauch and Oraby 2013).

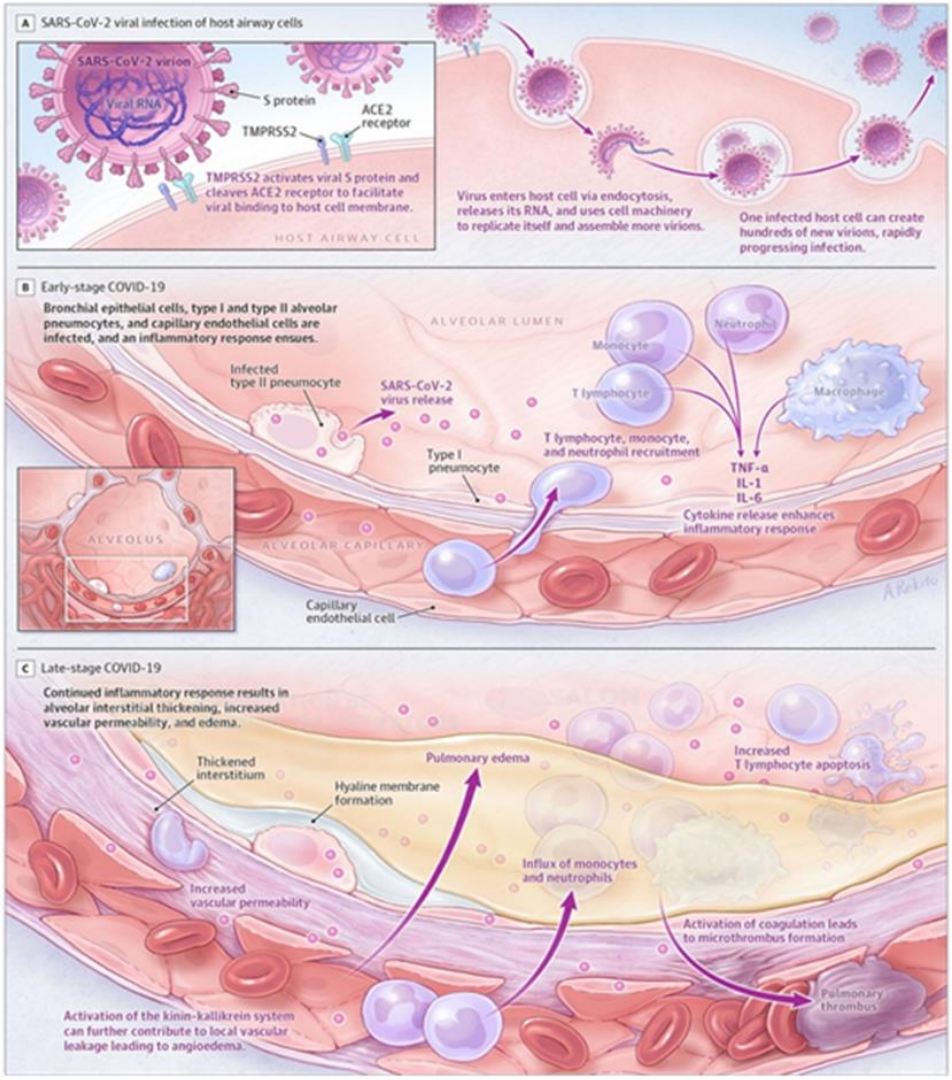
Geç gebelikte COVID-19 geliştiren dokuz hamile kadın üzerinde yapılan bir araştırmaya göre, COVID-19 hamile kadınlarda hamile olmayanlara göre önemli ölçüde daha kötü semptomlara neden olmamış olup dikey bulaşmanın neden olduğu intrauterin enfeksiyona dair bir kanıt yoktur (Chen *et al.* 2020). Bir hastane ortamında 138 COVID-19 hastası üzerinde yapılan bir araştırma, hastane bağlantılı SARS-CoV-2 bulaşmasının hastaların %41'inde meydana geldiğini bulmuştur (Wang *et al.* 2020). Ayrıca, 425 hasta üzerinde yapılan başka bir araştırma, sağlık çalışanlarındaki vaka sayısının zamanla arttığını keşfetmiştir. Bu vakalar büyük olasılıkla daha yüksek bir virüs konsantrasyonuyla uzun süreli yakın temasın sonucudur. Çin dışında, 12 Şubat 2020 itibariyle 24 ülkede 441 doğrulanmış COVID-19 vakası kaydedilmiş olup ilk ithal vaka 13 Ocak 2020'de Tayland'da bildirilmiştir. Bu ülkelerden 11'inde yerel bulaşma belgelenmiştir. Singapur, 47 onaylanmış vakayla en fazla vakayı rapor etmektedir (Sookaromdee and Wiwanitkit 2020).

2.1.4 Patofizyoloji

Koronavirüsler, insanları ve köpekler, kediler, tavuklar, sığırlar, domuzlar ve kuşlar gibi diğer memelileri enfekte eden tek sarmallı RNA virüsleridir. Koronavirüsler solunum, gastrointestinal ve nörolojik sorunlara neden olan virüslerdir. Klinik uygulamada en yaygın koronavirüsler, bağışıklığı yeterli kişilerde soğuk algınlığı semptomlarına neden olan 229E, OC43, NL63 ve HKU1'dir. SARS-CoV-2, son yirmi yılda uluslararası çapta yayılan ve insanlarda ciddi hastalıklara neden olan üçüncü koronavirüstür. (Zhu *et al.* 2020).

Ciddi hastalığa neden olan ilk koronavirüs, Çin'in Foshan kentinde ortaya çıktığı ve 2002-2003 SARS-CoV salgınına neden olduğu düşünülen SARS idi. İkincisi, bir koronavirüsün neden olduğu ve ilk olarak 2012 yılında Arap Yarımadası'nda ortaya çıkan

Orta Doğu solunum yolu hastalığıdır (MERS) (Zaki *et al.* 2012). SARS-CoV-2 virionları 60 ila 140 nanometre çapa ve 9 ila 12 nanometre arasında değişen karakteristik sivri uçlara sahiptir ve onlara bir güneş koronası görünümü verir (Şekil 2.1). Koronavirüsler, genetik rekombinasyon ve varyasyon yoluyla yeni konakçılara uyum sağlayabilir ve onları enfekte edebilir. Yarasaların, SARS-CoV-2 için doğal bir rezervuar olduğu varsayılmasına rağmen insanların virüsü pangolin gibi bir aracı konak aracılığıyla kapmış olmaları mümkündür (Lu *et al.* 2020, Lam *et al.* 2020).



Şekil 2.1 COVID-19 immünopatogenez

2.1.5 Teşhis

Ciddi hastalığa neden olan ilk koronavirüs, Çin'in Foshan kentinde ortaya çıktığı ve 2002-2003 SARS-CoV salgınına neden olduğu düşünülen SARS idi. İkincisi, bir koronavirüsün neden olduğu ve ilk olarak 2012 yılında Arap Yarımadası'nda ortaya çıkan Orta Doğu solunum yolu hastalığıdır (MERS) (Zaki *et al.* 2012). SARS-CoV-2 virionları 60 ila 140 nanometre çapa ve 9 ila 12 nanometre arasında değişen karakteristik sivri uçlara sahip olup onlara bir güneş tacı görünümü vermektedir (Şekil 2.1). Koronavirüsler, genetik rekombinasyon ve varyasyon yoluyla yeni konakçılara uyum sağlayabilir ve onları enfekte edebilir. Yarasaların, SARS-CoV-2 için doğal bir rezervuar olduğu varsayılmasına rağmen insanların virüsü pangolin gibi bir aracı konak aracılığıyla kapmış olmaları mümkündür (Zeng *et al.* 2020).

Virüsler dışkıda ve en ciddi vakalarda kanda da bulunabilir. COVID-19'un mevcut multipleks PCR panellerinin hiçbirinde bulunmadığını belirtmekte fayda vardır. Şu anda ticari testler mevcut değildir. Hindistan'da şüpheli bir vaka olması durumunda, gerekli numune ülkenin belirlenmiş referans laboratuvarlarından birine veya Pune'daki Ulusal Viroloji Enstitüsü'ne iletilmelidir. Salgın ilerledikçe ticari testler erişilebilir hale gelecektir. Diğer laboratuvar testleri türleri sıklıkla spesifik değildir. Çoğu durumda, beyaz hücre sayısı normal veya düşüktür. Lenfosit sayımı lenfopeniyi ortaya çıkarabilir (Jin *et al.* 2020).

Tüm solunum yolu viral enfeksiyonları [grip, parainfluenza, solunum sinsityal virüsü (RSV), adenovirüs, insan metapnömovirüsü, COVID-19 olmayan koronavirüs], atipik organizmalar (mikoplazma, klamidya) ve bakteriyel enfeksiyonlar ayırıcı tanıya dahil edilmektedir. COVID-19, klinik olarak veya normal laboratuvar testleri ile bu hastalıklardan ayırt edilemez. Sonuç olarak, seyahat geçmişinin önemi artmaktadır. Ancak hastalık yayıldıkça, seyahat geçmişi geçersiz hale gelecektir (Singhal 2020).

2.1.6 Enfeksiyon sonrası bağışıklık

Enfeksiyonun ardından SARS-CoV-2'ye özgü antikorlar ve hücre aracılı yanıtlar üretilir. Kanıtlara göre, bu tepkilerin bazıları koruyucu görünmekte olup en az birkaç ay sürmektedir. Bununla birlikte, tüm enfekte hastaların koruyucu bir bağışıklık tepkisi üretip üretmediği veya bu koruyucu etkilerin enfeksiyondan sonra ne kadar süre devam ettiği bilinmemektedir.

2.1.6.1 Hümoral bağışıklık

SARS-CoV-2 enfeksiyonunu takiben, hastaların çoğu viral spike proteinin reseptör bağlama alanına ve ilgili nötralize edici aktiviteye karşı saptanabilir serum antikorları edinmektedir. Antikor yanıtının boyutu ise enfeksiyonun ciddiyeti ile ilişkili olabilir ve hafif enfeksiyonlu kişiler saptanabilir nötralize edici antikorlar üretemeyebilir (Yasui *et al.* 2008). Nötralize edici antikorlar ortaya çıkarıldığında, aktiviteleri tipik olarak enfeksiyondan sonraki aylar içinde azalırken, çoğu çalışma nötralize edici aktivitenin altı ila sekiz aya kadar sürebileceğini ima etmektedir (Siddiqi and Mehra 2020). İlk spike-bağlanma titreleri 1:80 olan 121 iyileşen plazma donörünü içeren bir araştırmada, titreler beş ay boyunca bir miktar azaldı, ancak vakaların büyük çoğunluğunda 1:80 kaldı ve nötralize edici titreler, bağlanma titreleriyle çakışmıştır (Braun *et al.* 2020). 149 nekahat dönemindeki hasta üzerinde yapılan başka bir araştırmada, %7'sinin hastaneye yatırılması gerekmesine rağmen hastalık başladıktan 39 gün sonra sadece %1'i yüksek titrelerde nötralize edici antikorlar sergilemiştir (Agarwal *et al.* 2020).

Buna rağmen, altı hastada (tüm incelenenlerin) reseptör bağlayıcı alana özgü B hücreler ile bu tür antikorların yaratılmasını teşvik etmek için yüksek derecede koruyucu aşıların yaratılabileceğini ima eden serum nötralize edici titreden bağımsız olarak güçlü nötralize edici antikorlar bulunmuştur. Diğer araştırmalar, enfeksiyondan sonraki aylarda sayıları artan ve uzun vadeli bir hümoral bellek yanıtı olasılığını ima eden spike ve reseptör bağlayıcı alan bellek B hücrelerini keşfetmiştir (Song *et al.* 2020).

Antikor tepkileri, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı koruma ile ilişkilendirilmiştir. Başlangıç seviyesi SARS-CoV-2 anti-spike antikor testi yapılan 12.541 sağlık çalışanı üzerinde yapılan bir çalışmada seropozitif olan (geçmiş bir enfeksiyonu düşündüren) 1117 katılımcı, seronegatif (10.000'de 0,3'e karşı 1,09 vaka, insidans oranı oranı 0,12) olan katılımcılara nazaran takip eden altı ay boyunca PCR pozitifliği oranı daha düşüktür. İncelendiğinde, PCR testi pozitif çıkan iki seropozitif kişiden hiçbiri hasta değildi. Enfeksiyondan sonraki ilk birkaç ayda yeniden enfeksiyon oranının düşük olması, bağışıklık sisteminin bu süre boyunca sizi korumaya devam edeceğini düşündürmektedir (Woldemeskel *et al.* 2020, Song *et al.* 2020).

2.1.6.2 Enfeksiyon veya aşı sonrası koruyucu bağışıklık yanıtı

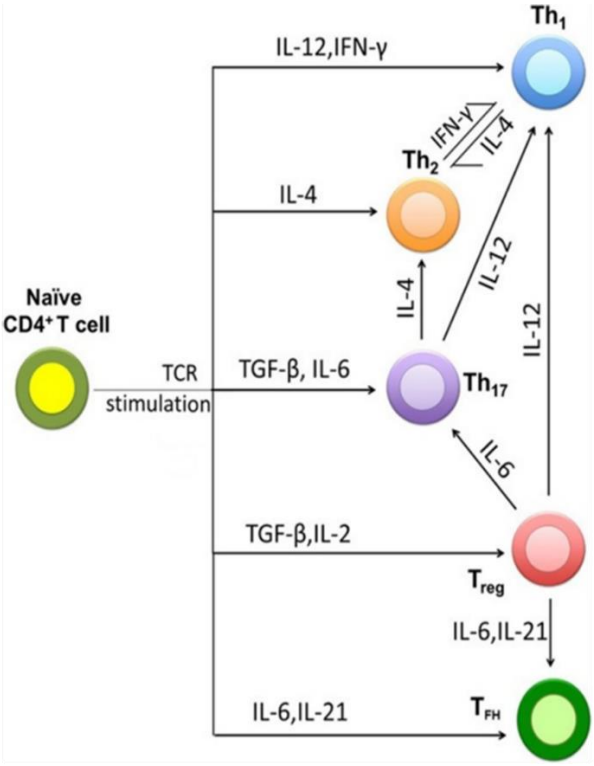
Hayvan çalışmaları, en azından kısa vadede, enfeksiyona karşı immünolojik yanıtın, yeniden enfeksiyona karşı bir miktar koruma sağlayabileceğini ortaya koymuştur (Chandrashekar *et al.* 2020, Gao *et al.* 2020, Yu *et al.* 2020). SARS-CoV-2 ile enfekte olan dokuz al yanaklı makak üzerinde yapılan bir çalışmada, tüm hayvanlar nötralize edici antikorlar geliştirmiştir. 35 gün sonra aynı viral dozla tehdit edildiğinde, tüm hayvanlar anamnestik bağışıklık tepkilerine sahip olup burun sürüntüsünde daha düşük viral RNA seviyelerine ve tehdit edilen saf kontrol hayvanlarına göre daha hızlı viral RNA düşüşüne sahiptir (Chandrashekar *et al.* 2020). Makaklarda COVID-19 aşı adaylarını test eden çalışmalara göre, aşılamaya karşı bağışıklık tepkileri, aşılanmamış kontrollere kıyasla viral tehdidin ardından solunum yolu örneklerinde viral RNA'nın daha düşük seviyelerine veya daha hızlı temizlenmesine neden olmaktadır (Deng *et al.* 2020, Corbett *et al.* 2020, Mercado *et al.* 2020, van Doremalen *et al.* 2020).

2.2 Sitokinler

Sitokinlerin tarihi, interferonun ilk kez bulunduğu yirminci yüzyılın başlarına kadar uzanmaktadır. Molekül ağırlığı 30 kDa'dan (200 amino asit) az olan pleiotropik proteinler veya küçük glikoproteinler sitokinler olarak bilinmektedir. Lökositler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri, bağışıklığı, iltihabı ve hematopoezi düzenleyen sitokinler üretmektedir (Deverman and Patterson 2009). Bugüne kadar yaklaşık 200 sitokin

tanımlanmıştır. Yüksek derecede sarmal yapıya sahiptirler ve moleküllerin ortak olarak dört sarmal demet polipeptit katı mevcuttur. Th1 veya Th2 hücrelerinden yapılmış olmalarına göre iki gruba ayrılırlar. Th17 hücreleri ve T düzenleyici hücreler (Treg) yakın zamanda Th1 ve Th2 hücrelerinden farklı sitokin profilleri olan Th hücrelerinin üçüncü bir alt kümesi olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.2). IL-17, IL-17F, IL-22 ve IL25 salgılamaktadırlar. Treg hücreleri tip 1 (Tr1) esas olarak IL-10 ve IFN-y, IL-5'i daha az miktarda ve çok düşük düzeyde TGF-β ve IL-2 salgılamaktadır. Treg'in Tr3 alt kümesi (Th3 hücreleri olarak da adlandırılır) tercihen TGF-β ve daha az miktarda IL-10 üretmektedir (Zídek *et al.* 2009).

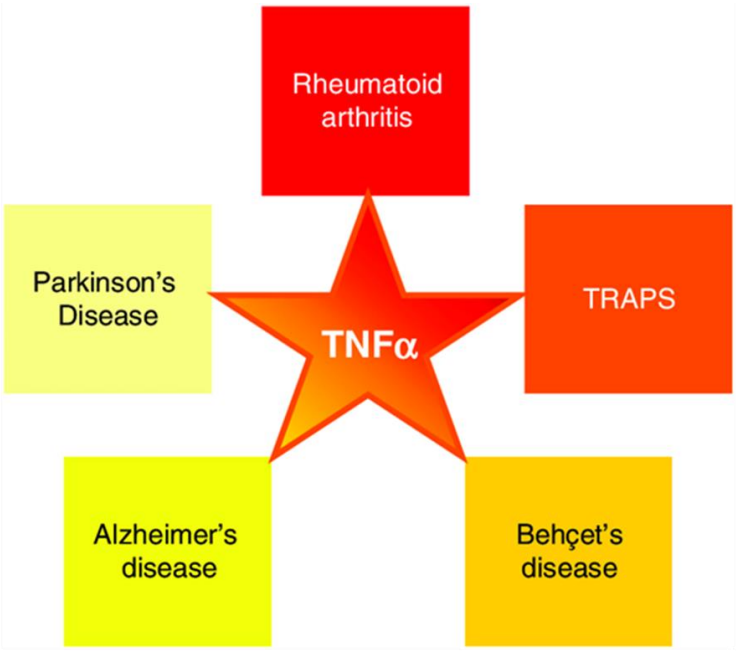
Lenfositler (bağışıklık tepkisini düzenleyen T hücreleri tarafından salgılanan sitokinler), proinflamatuar sitokinler (inflamatuar süreci artıran ve sürdüren sitokinler), büyüme faktörleri (hücrenin hayatta kalmasını destekleyen ve solunum yollarında yapısal değişikliklere neden olan sitokinler), kemokinler (kemotaktik olan sitokinler). inflamatuar hücreler) ve anti-inflamatuar sitokinler, farklı sitokin türleridir (inflamatuar yanıtı negatif olarak modüle eden sitokinler) (Barnes 2008).



Şekil 2.2 Naif T hücrelerinin farklılaştırılması

2.2.1 İnflamasyonda sitokinler ve kemokinler

Anormal veya aşırı sitokin sinyalinin patogenezde rol oynadığı çeşitli bozukluklar tanımlanmıştır. Tip I diyabet, romatoid artrit, lupus nefriti, sedef hastalığı ve sistemik skleroz gibi bir dizi kronik inflamatuar ve otoimmün hastalıkta, IL-1 ve IL-6'nın yukarı regülasyonu bulunmuştur (Brugos *et al.* 2012). TNFα'nın, çeşitli sistemik hastalıkların patolojisiyle doğrudan bağlantılı olduğu ve ayrıca hastalık patolojisi üzerinde daha lokal bir etkiye sahip olduğu yaygın olarak bilinmektedir (Şekil 2.3). TNFα ekspresyonu sayısız inflammatuvar ve nörodejeneratif hastalıklarda anormaldir. TNFα ayrıca hücre proliferasyonu, nekroz ve apoptoz gibi önemli homeostatik aktiviteler için gerekli olup normal hücre fonksiyonu üzerinde bir takım sonuçlara sahiptir (MacEwan 2002). TNFα, hem sistemik hem de yerel reaksiyonları kapsayan inflamatuvar yanıtı koordine ederken önemli bir rol oynamaktadır. TNFα, doku ödemini artıran vasküler endotelyal hücreler tarafından lipit aracılarının ve ayrıca reaksiyon immün hücre infiltrasyonunu teşvik eden lökosit yapışma moleküllerinin üretilmesine neden olur. Örneğin TNFα, mikrobiyal enfeksiyona yanıt olarak kemokin ekspresyonundan ve lenfosit infiltrasyonunun erken aktivasyonundan sorumludur (Roach *et al.* 2002).



Şekil 2.3 Tnfα'nın merkezi rolü

Bir dizi büyük çalışmada anti-TNFα ilacının inflamatuar hastalıklarda etkili olduğu bulunmuştur. TNF'nin sinovyal inflamasyondaki önemli rolünün keşfi, oldukça etkili tedaviler olduğu gösterilen TNFα blokerlerinin oluşturulmasına yol açmıştır (Feldmann *et al.* 2010). İltihaplı hastaların dokularının da daha yüksek düzeyde spesifik kemokinlere ve bunların reseptörlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.1). IL-8, çeşitli iltihaplı romatizmal rahatsızlıkları olan hastaların eklem sıvısında bulunabilir ve aktif ülseratif koliti olan kişilerin mukozalarındaki IL-8 seviyeleri yüksektir (Mahida *et al.* 1992). Romatoid artrit hastalarının eklemlerinde artan CC kemokin seviyeleri, özellikle CCL2, CCL3 ve CCL5, sinovyal dokulara monosit ve T hücresi göçüne karşılık gelmektedir. CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4 ve CXCR5 ayrıca B hücre sinovyal sitokinlerinin sentezi ve aktivasyonu ile bağlantılıdır (Nanki *et al.* 2009).

Çizelge 2.1 İnflammatuvar hastalıklarda belirtilen kemokinler ve kemokin reseptörleri

Kemokin / kemokin reseptörü	**Hastalık**
	WHIM sendromu
CX3CR1, CX3CL1, CXCL1, CXCL8, CXCR2, CCL2	Ateroskleroz
CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, CXCL8	Astım, alerjik hastalıklar
CCR5, CXCR3	Römatoid artirit

2.2.2 Sitokin profili ve sitokin fırtınası

Yeni gelişen bir virüs olan COVID-19, dünya çapında tıbbi sağlık sistemleri için tehdit oluşturmaya devam etmekte olup durum daha da kötüleşmektedir. Şimdiye kadar yüzde 6,4'lük bir ölüm oranıyla COVID-19, insanlar için artan bir tehdit oluşturmaktadır (WHO 2020). COVID-19 enfeksiyonuna karşı güçlü bir inflamatuar yanıtı, "sitokin fırtınası" olarak bilinen bir fenomen olan çok sayıda proinflamatuar sitokinin salınması izlemektedir. SARS-CoV-2 virüsü, konakta hiperaktif bir immünolojik yanıtı tetikleyerek abartılı bir inflamatuar yanıtla sonuçlanmaktadır. COVID-19 hastalarından alınan sitokin profillerini inceleyen birkaç araştırma, sitokin fırtınasının ciddi COVID-19 hastalarında akciğer hasarı, çoklu organ yetmezliği ve kötü prognoz ile bağlantılı olduğunu bulmuştur (Ruan *et al.* 2020, Gao *et al.* 2020).

Bağışıklık sistemi, çeşitli enfeksiyonlara yanıt verebilen karmaşık bir mekanizma ile donatılmıştır. Normal bir antiviral bağışıklık tepkisi için bağışıklık sisteminin enflamatuar yollarının aktivasyonu gereklidir, ancak konağın bağışıklık sisteminin tepkisi anormal veya aşırı ise, kontrol edilmediği takdirde ciddi hastalığa neden olabilir (Braciale and Hahn 2013). Sitokinler, inflamatuar yanıtta çok önemli bir role sahiptir. Doğuştan gelen makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve adaptif T ve B lenfositleri dahil olmak üzere birçok bağışıklık hücresi sitokin üretmektedir. Örüntü tanıma reseptörleri (PRR'ler), bir viral enfeksiyona karşı doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi sırasında istilacı virüse özgü çeşitli moleküler yapıları algılamaktadır. Patojen ilişkili moleküler paternler, bu moleküler yapılara (PAMP'ler) verilen isimlerdir. PAMP'lerin PRR'lere bağlanması, birkaç sinyal yolunu aktive eden istilacı virüse karşı inflamatuar yanıtı başlatmakta olup sonuç olarak, birkaç proinflamatuar sitokini kodlayan genler dahil konağın virüse karşı bağışıklık tepkisinde yer alan çeşitli ürünlerin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyonunu indükleyen transkripsiyon faktörlerini başlatmaktadır. Nükleer faktör kB, aktivasyon proteini 1 ve interferon yanıt faktörleri üç ve yedi, PRR'ler tarafından aktive edilen birincil transkripsiyon faktörleridir. Enflamatuar sitokinleri, kemokinleri ve adezyon moleküllerini kodlayan genler, bu transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenmktedir. Bu olaylar dizisi, lökositlerin ve plazma proteinlerinin enfeksiyon bölgesine alınmasına neden olur ve burada başlatan enfeksiyonla savaşmak için çok sayıda efektör aktivite gerçekleştirirler (Thompson *et al.* 2011).

IL-1, TNFα ve IL-6, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin en belirgin proinflamatuar sitokinlerinden üçüdür. Doğal immün yanıt sırasında doku makrofajları, mast hücreleri, endotel ve epitel hücreleri bu sitokinlerin birincil kaynaklarıdır. "Sitokin fırtınası", kan dolaşımındaki IL-6, IL-1, TNFα ve interferon gibi çeşitli proinflamatuar sitokinlerin seviyelerinde keskin bir artıştan kaynaklanmaktadır. Sitokinlerdeki bu artış, makrofajlar, nötrofiller ve T hücreleri gibi dolaşımdan bağışıklık hücrelerinin enfeksiyon bölgesine akmasına neden olarak, endotel hücre-hücre etkileşimlerinin dengesizleşmesi, vasküler bariyer hasarı, kılcal hasar, insan dokusunda hasar, yaygın alveoler hasar, çoklu organ yetmezliği ve ölüme neden olmaktadır. Sitokin fırtınası, akut akciğer hasarına veya daha

şiddetli versiyonuna tırmanabilen akciğer hasarına neden olabilir. ARDS (Shimizu *et al.* 2019).

COVID-19'da düşük oksijen satürasyon seviyelerine neden olan ARDS, birincil ölüm nedenidir. COVID-19 hastalarında ARDS'nin spesifik mekanizması bilinmemekle birlikte, katkıda bulunan en önemli faktörlerden biri, artan proinflamatuar sitokin üretimidir (Lai *et al.* 2020, Huang *et al.* 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çizelge 3.1 bu çalışmada kullanılan araçların listesini göstermektedir.

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan araçların listesi

Enstrümanlar	Şirket	Ülke
ELISA	Labon	Çin
Spectrophotometr	Biobase	Hindistan
Centrifuge	Memmert	Almanya
Light microscope	Olympus	Japonya
Oven	Memmert	Almanya
Water bath	Memmert	Almanya
Shaking water bath	Memmert	Almanya
Sysmex device	Sysmax	Japonya
Pipette	BioSan	Almanya
Different glasses	-----	Çin
Refrigerator	BEKO	Turkey
Thermal cycler	----	China

3.1 Çalışma Tasarımı

Mevcut çalışma bir vaka (COVID-19'lu enfekte hasta) – kontrol (sağlıklı kişiler) çalışmasıdır.

3.2 Çalışmanın Ayarları

COVID-19 hastaları, Nisan ayından Ağustos 2021 tarihine dek Kerkük, Irak'taki AL-Shifa Hastanesi acil servisine başvuran her iki cinsiyetten 80 kan örneği (31 erkek ve 29 kadın), ortalama yaşları (25 ila 60) arasında olan Koronavirüs bulaşmış kişileri ve çalışma

kontrol grubu olarak görünüşte sağlıklı kişilerden alınmış ve ortalama yaşları (25 ila 50) yıl arasında olan 20 kan örneğini (10 erkek ve 10 kadın) içermektedir.

3.3 Hastalar

COVID-19 hastaları, Kerkük, Irak'taki AL-Shifa Hastanesi acil servisine başvuran her iki cinsiyetten 80 kan örneği (31 erkek ve 29 kadın), ortalama yaşları (25 ila 60) arasında olan Koronavirüs bulaşmış kişileri içermektedir.

3.4 Kan Numunelerinin Alınması ve İşlenmesi

Her hastanın kan örnekleri iyi eğitimli hemşireler tarafından alınmıştır. Çeşitli bilim adamları, taze alınan kan örneklerinin gerekli olup olmadığı konusunda anlaşamamaktadır (Hall *et al.* 1995, Clark and Baudouin 2000). Sonuç olarak, taze toplanmış kanın kullanılması gerekli değildir. Her bireyden beş mililitre venöz kan alındı ve bir EDTA tüpüne (1,0 mL) ve bir vakumlu düz tüpe (4,0 mL) bölünmüştür. Vakumlu düz tüpler, berrak serum örnekleri elde etmek için 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmeden önce kanın pıhtılaşması için kısa bir süre bırakılmıştır. Ayrılan serum beş düz tüpe konuldu, kapatıldı ve analiz tamamlanana kadar -20 ℃'de tutulmuştur. Kullanımdan önce donmuş serum örnekleri 4-8 ℃'de çözülmüş ve oda sıcaklığında hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra serum numuneleri, üreticinin talimatlarına göre ticari olarak temin edilebilen ELISA kitleri kullanılarak IL-6, TNF-α, Ferritin, IFN-γ ve IFN-α sitokinlerinin serum seviyelerini belirlemek için kullanılmıştır.

3.5 Biyokimyasal Analiz

3.5.1 Serum interlökin-6 (IL-6) belirlenmesi

IBL International GmbH Kiti Flughafenstr. 52A, D-22335 Hamburg, Almanya bir enzim immune denemesini kullanan serumdaki insane IL-6 nicelleştirmek için kullanılmıştır (Mindray 96-A mikroplaka okuyucu, Shenzhen 2007-2010).

3.5.1.1 Testin prensibi

1. Bir anti-insan IL-6 kaplama antikoru, mikro kuyucuklara adsorbe edilmektedir.

2. Numunede veya standartta bulunan insan IL-6, mikro kuyucuklara adsorbe edilen antikorlara bağlanmaktadır. Bir biotin-konjuge anti-insan IL-6 antikoru eklenip birinci antikor tarafından yakalanan insan IL-6'sına bağlanmaktadır.

3. İnkübasyonun ardından bağlanmamış biotin-konjuge anti-insan IL-6 antikoru, bir yıkama adımı sırasında çıkarılmaktadır. Streptavidin-HRP eklenir ve biotin-konjuge anti-insan IL-6 antikoruna bağlanmaktadır.

4. İnkübasyonun ardından bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında çıkarılmakta olup HRP ile reaktif substrat solüsyonu kuyulara eklenmektedir.

5. Numune veya standartta bulunan insan IL-6 miktarı ile orantılı olarak renkli bir ürün oluşmaktadır. Reaksiyon asit ilave edilerek sonlandırılmakta olup absorbans 450 nm'de ölçülmektedir. 7 insan IL-6 standart dilüsyonundan ve belirlenen insan IL-6 numune konsantrasyonundan standart bir eğri hazırlanmaktadır.

3.5.1.2 Temin edilen reaktifler

1. İnsan IL-6'ya karşı monoklonal antikorla kaplanmış Microwell Plakalı bir adet alüminyum poşet
2. Bir şişe (100 l) Biyotin-konjugat anti-insan IL-6 monoklonal antikoru
3. Bir şişe (150 l) Streptavidin-HRP
4. İki şişe insan IL-6 Standardı, liyofilize, sulandırıldıktan sonra 200 pg/mL
5. Bir şişe yüksek Kontrol
6. Bir şişe düşük Kontrol
7. Bir şişe (5 mL) Test Tampon Konsantresi 20 x (%1 Tween 20 ve %10 BSA'lı PBS)
8. Bir şişe (50 mL) 20 x Yıkama Tamponu Konsantresi (%1 Tween 20'li PBS)
9. Bir şişe (15 mL) Substrat Solüsyonu (tetrametil-benzidin)
10. Bir şişe (15 mL) Durdurma Solüsyonu (1M Fosforik asit)
11. Bir şişe (0,4 mL) Mavi Boya

12. Bir şişe (0,4 mL) Yeşil Boya
13. Bir şişe (0,4 mL) Kırmızı Boya
14. Dört adet yapışkan Film

3.5.1.3. Reaktif hazırlama

1. Yıkama Tamponu

Yıkama tamponu konsantresi 20 x (50 mL) 950 mL damıtılmış suya eklenmiştir.

2. Deneme Tamponu

Deneme tamponu konsantresi 20 x (5 mL) 95 mL damıtılmış suya eklenmiştir.

3. Biyotin-Konjugat

Bir 1:100 biyotin-konjugat seyreltisi deneme tamponunda gerçekleştirilmiştir.

4. Streptavidin-HRP

Bir 1:200 streptavidin-HRP seyreltisi deneme tamponunda gerçekleştirilmiştir.

5. İnsan IL-6 Standardı

Liyofilize insan IL-6 standardı damıtılmış suyla yeniden oluşturulmuştur.

6. Kontroller

Üç yüz mikrolitre damıtılmış su liyofilize kontrollere eklenmiştir.

3.5.1.4 Test protokolü

Test prosedürü sayfaları, aşağıda belirtilen test prosedürünün uygulanmasıyla birlikte mevcuttu:

A. Mikro kuyu şeritleri, yıkamalar arasında mikro kuyu içeriğinin tam aspirasyonu ile kuyu başına 400 L yıkama tamponunda iki kez yıkanmıştır. Aspirasyondan önce yıkama

tamponunun kuyucuklarda 10 ila 15 saniye oturmasına izin verilmiştir (Mikroplakalar otomatik bir mikroplaka yıkayıcıda yıkandı). Fazla Yıkama Tamponunu çıkarmak için kuyular ve musluk mikrokuyu şeritleri, son yıkama aşamasından sonra bir emici ped veya kağıt havlu üzerine boşaltılmıştır. Mikrokuyu şeritler yıkandıktan hemen sonra kullanılmıştır.

B. Mikrokuyu plakası standart seyreltme: tüm standart oyuklara yüz mikrolitre tahlil tamponu sağlanmıştır. İlk kuyucuklara hazırlanmış yüz standart pipetlendi ve yüz kuyudan kuyuya hareket ettirilerek standart seyreltmeler yapılmıştır. Kalan yüz kuyu atılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Mikrokuyu şeritlerdeki boşlukların, standartların ve numunelerin düzenlenmesinin bir örneğinin gösterilmesi

	1	**2**
A	Standart 1 (100,00 pg/mL)	Numune 1
B	Standart 2 (50,00 pg/mL)	Numune 2
C	Standart 3 (25,00 pg/mL)	Numune 3
D	Standart 4 (12,50 pg/mL)	Numune 4
E	Standart 5 (6,25 pg/mL)	Numune 5
F	Standart 6 (3,13 pg/mL)	Numune 6
G	Standart 7 (1,56 pg/mL)	Numune 7
H	Boşluk	Numune 8

C. Boşluk kuyucuklara yüz mikrolitre tahlil tamponu ilave edilmiştir.

D. Numune kuyularına elli mikrolitre tahlil tamponu ilave edilmiştir.

E. Her numuneden elli mikrolitre numune kuyularına ilave edilmiştir.

F. Biotin-Konjugat hazırlanmıştır.

G. Tüm kuyucuklara 50 mikrolitre Biyotin-konjugat ilave edilmiştir.

H. Mikrokuyu şeritleri bir yapışkan film ile kaplanmış olup oda sıcaklığında (18 ila 25°C) 2 saat, 100 rpm'ye ayarlanmış bir mikroplaka çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir.

I. Streptavidin-HRP hazırlanmıştır.

J. Yapışkan film çıkarılıp kuyucuklar boşaltılmıştır. Mikrokuyu şeritleri, otomatik mikroplaka yıkayıcı kullanılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkanmıştır.

K. Tüm kuyucuklara yüz mikrolitre seyreltilmiş streptavidin-HRP eklenmiştir.

L. Mikrokuyu şeritleri bir yapışkan film ile kaplanmış olup 100 rpm'ye ayarlanmış bir mikroplaka çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında (18 ila 25°C) inkübe edilmiştir.

M. Yapışkan film çıkarılıp kuyucuklar boşaltılmıştır. Mikrokuyu şeritleri, otomatik mikroplaka yıkayıcı kullanılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkanmıştır.

N. Tüm kuyucuklara yüz mikrolitre TMB substrat solüsyonu pipetlenmiştir.

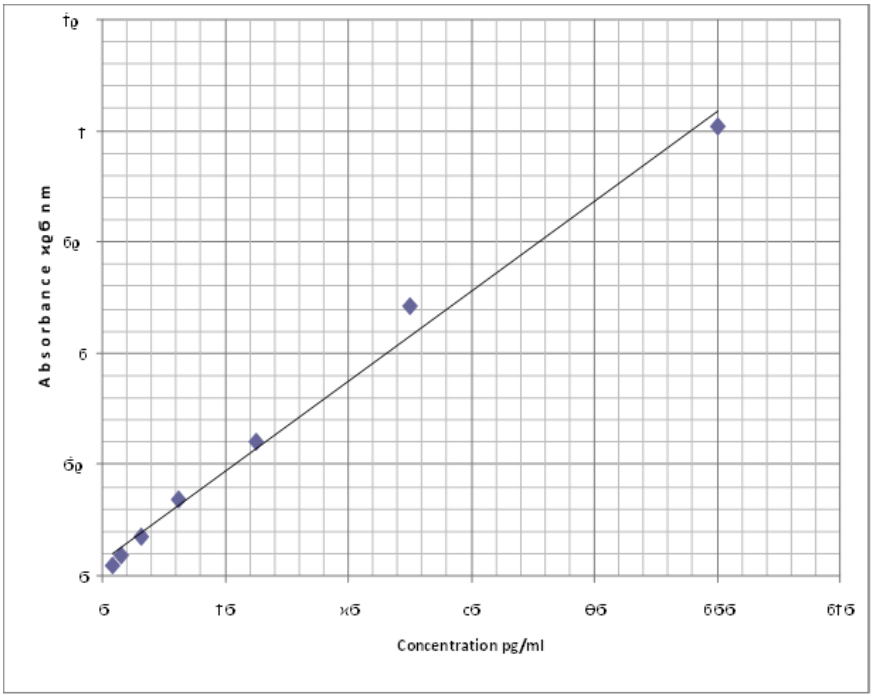
O. Mikrokuyu şeritler, yaklaşık 10 dakika boyunca oda sıcaklığında (18 ila 25°C) inkübe edilmiştir. Yoğun ışığa doğrudan maruz kalmaktan kaçınılmıştır.

P. Enzim reaksiyonu, her kuyucuğa hızlı bir şekilde yüz durdurma solüsyonu pipetlenerek durdurulmuştur.

Q. Absorbans, 450 nm'de bir spektro-fotometrede her bir mikro kuyucuktan okunmuştur. Plaka okuyucu, boşluk kuyucuklar kullanılarak üreticinin talimatlarına göre körleştirilmiştir. Hem numunelerin hem de standartların absorbansları belirlenmiştir.

3.5.1.5 Sonuçların hesaplanması

Her bir numune için devridaim eden insane IL-6 konsantrasyonu standart eğriden belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 İnterlökin-6 standart eğrisi

3.5.2 Serum tümor nekroz faktörü-α (TNF-α)'nın belirlenmesi

IBL International GmbH Kit Flughafenstr. 52A, D-22335 Hamburg, Almanya kullanılarak, insan tümor nekroz faktörü-α (TNF-α) hücre kültürü süpernatantları, serum ve plazmada nicelendirilmiştir (Mindray 96-A mikroplaka okuyucu, Shenzhen 2007-2010)

3.5.2.1 Testin prensibi

- Bir anti-insan TNF-α kaplama antikoru, mikro kuyucuklara adsorbe edilmiştir.
- Numunede veya standartta bulunan insan TNF-α, mikro kuyulara adsorbe edilen antikorlara bağlanmaktadır. Biyotinle konjuge bir anti-insan. TNF-α antikoru eklenip birinci antikor tarafından yakalanan insan TNF-α'sına bağlanmaktadır.
- İnkübasyonun ardından bağlanmamış biotin-konjuge anti-insan TNF-α antikoru bir yıkama adımı sırasında çıkarılmaktadır. Streptavidin-HRP eklenip biotin-konjuge anti-insan TNF-α antikoruna bağlanmaktadır.

- İnkübasyonun ardından bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında çıkarılıp kuyucuklara HRP ile reaktif substrat solüsyonu eklenmektedir.
- Numune veya standartta bulunan insan TNF-α miktarı ile orantılı olarak renkli bir ürün oluşur. Reaksiyon asit ilave edilerek sonlandırılır ve absorbans 450 nm'de ölçülmektedir. 7 insan TNF-α standart dilüsyonundan ve belirlenen insan TNF-α numune konsantrasyonundan standart bir eğri hazırlanmaktadır.

3.5.2.2 Temin edilen reaktifler

- İnsan TNF-α'ya karşı monoklonal antikorla kaplanmış Microwell Plakalı bir alüminyum poşet
- Bir şişe (100 L) Biotin-Konjugat anti-insan TNF-α poliklonal antikoru
- Bir şişe (150 L) Streptavidin-HRP
- İki şişe insan TNF-A Standart liyofilize, sulandırıldıktan sonra 3000 pg/mL
- Bir şişe yüksek Kontrol, liyofilize
- Bir şişe düşük Kontrol, liyofilize
- Bir şişe (12 mL) Örnek Seyreltici
- Bir şişe (5 mL) Test Tampon Konsantresi 20 x (%1 Tween 20 ve %10 BSA'lı PBS)
- Bir şişe (50 mL) 20 x Yıkama Tamponu Konsantresi (%1 Tween 20'li PBS)
- Bir şişe (15 mL) Substrat Solüsyonu (tetrametil-benzidin)
- Bir şişe (15 mL) Durdurma Solüsyonu (1M Fosforik asit)
- Bir şişe (0,4 mL) Mavi Boya
- Bir şişe (0,4 mL) Yeşil Boya
- Bir şişe (0,4 mL) Kırmızı Boya
- Dört adet yapışkan Film

3.5.2.3 Reaktif hazırlama

1. Yıkama Tamponu

Yıkama Tamponu Konsantresi 20 x (50 mL) 950 mL damıtılmış suya eklenmiştir.

2. Deneme Tamponu

Deneme Tamponu Konsantresi 20 x (5 mL) 95 mL damıtılmış suya eklenmiştir.

3. Biyotin-Konjugat

Bir 1:100 Biyotin-konjugat seyreltisi Deneme Tamponunda gerçekleştirilmiştir.

4. Streptavidin-HRP

Bir 1:100 Streptavidin-HRP seyreltisi Deneme Tamponunda gerçekleştirilmiştir.

5. İnsan TNF-α Standardı

Liyofilize insan TNF-α standardı damıtılmış suyla yeniden oluşturulmuştur.

6. Kontroller

Beş yüz mikrolitre damıtılmış su liyofilize kontrollere eklenmiştir.

3.5.2.4 Test protokolü

Deneme prosedür formları aşağıd bahsedilen deneme prosedürünün uygulanması, set ile mevcuttur:

- Mikrokuyu şeritleri, kuyu başına 400 L yıkama tamponu ile iki kez yıkanmış olup ardından yıkamalar arasında mikrokuyu içeriği kuvvetli bir şekilde aspire edilmiştir. Aspirasyondan önce yıkama tamponunun kuyucuklarda 10 ila 15 saniye kalmasına izin verilmiştir. Mikroplakalar otomatik mikroplaka yıkayıcı kullanılarak temizlenmiştir. Ekstra yıkama tamponunu ortadan kaldırmak için, kuyucuklar ve musluk mikro kuyu şeritleri, son yıkama aşamasından sonra emici bir ped veya kağıt havlu üzerine boşaltılmıştır. Mikrokuyu şeritler yıkandıktan hemen sonra kullanılmıştır.
- Mikrokuyu plaka üzerinde standart bir seyreltme gerçekleştirilmiştir. Tüm standart kuyucuklara 100 mikrolitre numune seyreltici verilmiştir. İlk kuyucuklara hazırlanmış yüz standart pipetlenmiş olup yüz kuyudan kuyuya hareket ettirilerek standart seyreltmeler yapılmıştır. Kalan yüz kuyu atılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Mikrokuyu şeritlerindeki boşlukların, standartların ve numunelerin düzenlenmesine ilişkin bir örneğin gösterilmesi

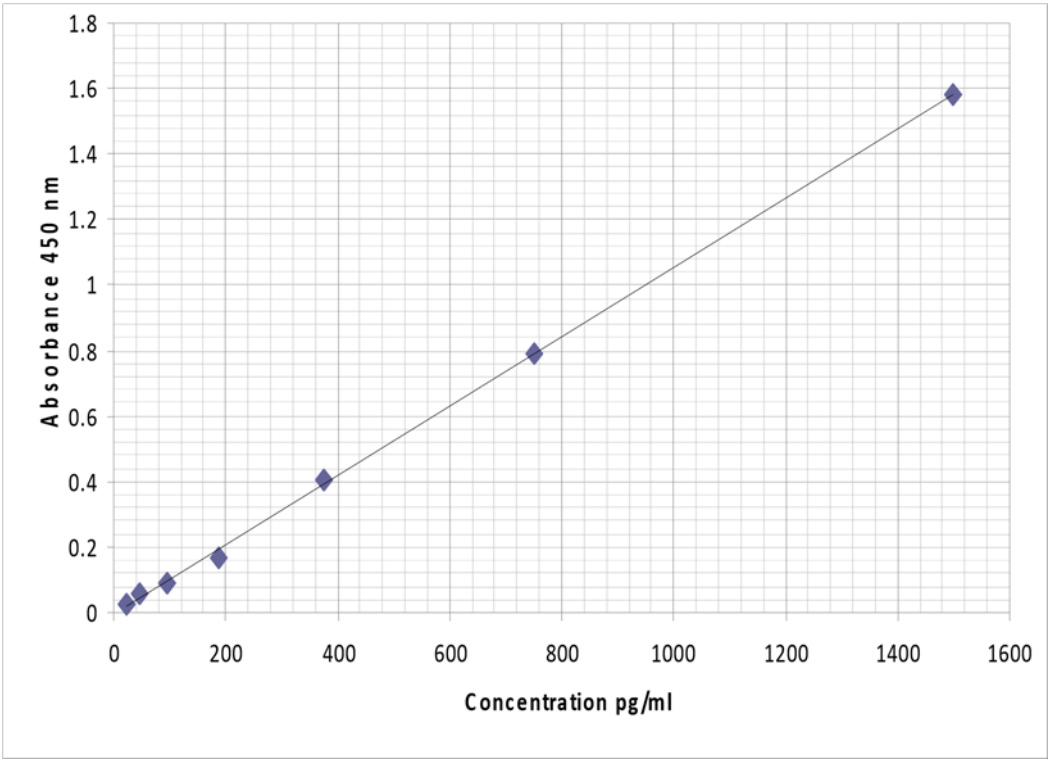
	1	2
A	Standart 1 (1500 pg/mL)	Numune 1
B	Standart 2 (750 pg/mL)	Numune 2
C	Standart 3 (375 pg/mL)	Numune 3
D	Standart 4 (188 pg/mL)	Numune 4
E	Standart 5 (94 pg/mL)	Numune 5
F	Standart 6 (47 pg/mL)	Numune 6
G	Standart 7 (23 pg/mL)	Numune 7
H	Boşluk	Numune 8

- Boşluk kuyucuklara yüz mikrolitre örnek seyreltici ilave edilmiştir.
- Numune kuyularına elli mikrolitre numune seyreltici ilave edilmiştir.
- Numune kuyularına her numuneden elli mikrolitre ilave edilmiştir.
- Biyotin-konjugat hazırlanmıştır.
- Tüm kuyucuklara elli mikrolitre biyotin-konjugat ilave edilmiştir.
- Mikro kuyucuk şeritleri bir yapışkan film ile kaplanmış olup oda sıcaklığında (18 ila 25 ℃) 100 rpm'ye ayarlanmış bir mikroplaka çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübe edilmiştir.
- Streptavidin-HRP hazırlanmıştır.
- Yapışkan film çıkarılmış olup kuyular boşaltılmıştır. Mikrokuyu şeritleri, otomatik mikroplaka yıkayıcı kullanılarak yıkama tamponu ile 6 kez yıkanmıştır.
- Tüm kuyucuklara yüz mikrolitre seyreltilmiş streptavidin-HRP ilave edilmiştir.
- Mikrokuyu şeritleri bir yapışkan film ile kaplanmış olup oda sıcaklığında (18 ila 25 ℃) 100 rpm'ye ayarlanmış bir mikroplaka çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir.
- Yapışkan film çıkarılmış olup kuyular boşaltılmıştır. Mikrokuyu şeritleri, otomatik mikroplaka yıkayıcı kullanılarak yıkama tamponu ile 6 kez yıkanmıştır.
- Tüm kuyucuklara yüz mikrolitre TMB Substrate Solution pipetlenmiştir.

- Mikrokuyu şeritler, yaklaşık 10 dakika boyunca oda sıcaklığında (18 ila 25 ℃) inkübe edilmiştir. Yoğun ışığa doğrudan maruz kalmaktan kaçınılmıştır.
- Enzim reaksiyonu, her kuyuya hızlı bir şekilde yüz Durdurma Solüsyonu pipetlenerek durdurulmuştur.
- Absorbans, 450 nm'de bir spektro-fotometrede her bir mikro kuyucuktan okunmuştur. Plaka okuyucu, boşluk kuyucuklar kullanılarak üreticinin talimatlarına göre körleştirilmiştir. Hem numunelerin hem de standartların absorbansları belirlenmiştir.

3.5.2.5 Sonuçların hesaplanması

Her bir numune için devridaim insane TNF-α konsantrasyonu standart eğriden belirlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Tümor nekroz faktörü-α standart eğrisi

3.5.3 Serum ferritin

İnsan serumundaki enzim immune denemesince Ferritin'in doğrudan nicel belirlemesi içindir.

3.5.3.1 Testin prensibi

Aşağıdaki enzim immünoassay testinin prensibi, tipik bir tek adımlı yakalama veya "sandviç" tipi tahlili takip etmektedir. Testte iki yüksek düzeyde spesifik monoklonal antikor kullanılmaktadır: Ferritin'e özgü bir monoklonal antikor, mikro kuyucuklu plaka üzerinde hareketsiz hale getirilmektedir ve Ferritin'in farklı bir bölgesine özgü başka bir monoklonal antikor, yaban turpu peroksidazına (HRP) konjuge edilmektedirz

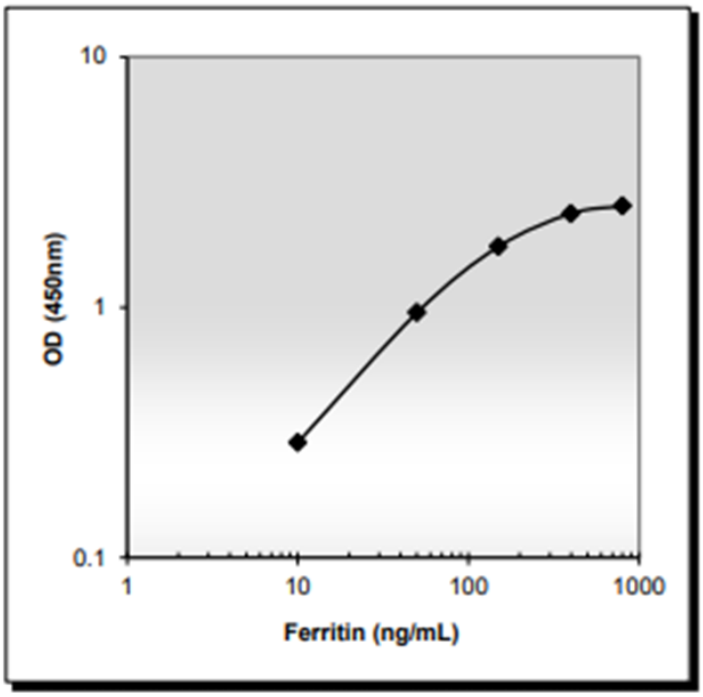
3.5.3.2 Deneme prosedürü

- Anti-Ferritin-HRP konjugatının ve yıkama tamponunun çalışma solüsyonlarının hazırlanması. Hazırlama talimatları için "Sağlanan Reaktifler"e (yukarıda) bakılması.
- Gerekli sayıda mikro kuyu şeridi çıkarılması. Torbayı kullanılmayan şeritlerle tekrar kapatıp buzdolabına geri koymak.
- Her bir kalibratörden, kontrolden ve numuneden 20 µL'nin uygun şekilde etiketlenmiş kuyucuklara iki kopya halinde pipetlenmesi.
- Her kuyucuğa 200 µL konjugat çalışma solüsyonunun pipetlenmesi (Çok kanallı bir pipet kullanmanızı öneririz).
- Plaka çalkalayıcıda (yaklaşık 200 rpm) oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmesi.
- Kuyuları, kuyu başına 300 µL seyreltilmiş yıkama tamponu ile 5 kez yıkayıp kuru olduğundan emin olmak için plakanın emici kağıda sıkıca vurulması (bir yıkayıcı kullanılması önerilir).
- Zamanlanmış aralıklarla her kuyucuğa 150 µL TMB substratının pipetlenmesi.
- Oda sıcaklığında 15-20 dakika bir plaka çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmesi.
- Adım 7'deki ile aynı zaman aralıklarında her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonunun pipetlenmesi.

- Durdurma solüsyonunun eklenmesinden sonra 20 dakika içinde 450 nm'de bir mikro kuyucuklu plak okuyucuda plağın okutulması.

3.5.3.3 Sonuçların hesaplanması

Her bir numune için devridaim insane Ferritin konsantrasyonu standart eğriden belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 İnsan ferritin standart eğrisi

3.5.4 Interferon gamma (IFN-γ)

İnsan IFN-γ ELISA, İnsan IFN-γ nicel belirlemesi için bir enzim bağlı immüğnosorbent denemedir.

3.5.4.1 Testin prensibi

- Bir anti-İnsan IFN-γ kaplama antikoru, mikro kuyucuklara adsorbe edilmektedir.

- Numunede veya standartta bulunan insan IFN-γ'si, mikro kuyucuklara adsorbe edilen antikorlara bağlanmaktadır. Biyotinle konjuge bir anti-İnsan IFN-γ antikoru eklenip ilk antikor tarafından yakalanan İnsan IFN-γ'sine bağlanmaktadır
- İnkübasyon bağlanmamış biotin-konjuge anti-İnsan IFN-γ antikoru, bir yıkama adımı sırasında çıkarılır. StreptavidinHRP eklenip biyotin-konjuge anti-İnsan IFN-γ antikoruna bağlanmaktadır.
- İnkübasyona bağlı olmayan Streptavidin-HRP, bir yıkama adımı sırasında çıkarılıp kuyulara HRP ile reaktif substrat solüsyonu eklenmektedir.
- Numune veya standartta bulunan İnsan IFN-γ miktarı ile orantılı olarak renkli bir ürün oluşur. Reaksiyon asit ilave edilerek sonlandırılıp absorbans 450 nm'de ölçülmektedir. 7 İnsan IFN-γ standart dilüsyonundan ve belirlenen İnsan IFN-y numune konsantrasyonundan standart bir eğri hazırlanmıştır.

3.5.4.2 Temin edilen reaktifler

- İnsan IFN-γ'ya karşı monoklonal antikorla kaplanmış Microwell Plakalı bir alüminyum poşet
- Bir şişe (70 L) Biotin-Konjugat anti-insan TNF-γ poliklonal antikoru
- Bir şişe (150 L) Streptavidin-HRP
- İki şişe insan TNF-γ Standart liyofilize, sulandırıldıktan sonra 200 pg/mL
- Bir şişe (12 mL) Örnek Seyreltici
- Bir şişe (5 mL) Test Tampon Konsantresi 20 x (%1 Tween 20 ve %10 BSA'lı PBS)
- Bir şişe (50 mL) 20 x Yıkama Tamponu Konsantresi (%1 Tween 20'li PBS)
- Bir şişe (15 mL) Substrat Solüsyonu (tetrametil-benzidin)
- Bir şişe (15 mL) Durdurma Solüsyonu (1M Fosforik asit)

3.5.4.3 Reaktif hazırlama

1. Yıkama Tamponu

Yıkama Tamponu Konsantresinde kristaller oluşmuşsa, tamamen eriyene kadar hafifçe ısıtılmıştır.

2. Deneme Tamponu

Deneme Tamponu Konsantresinin (20 x) tüm içeriği (5 mL) temiz bir 100 mL dereceli silindire dökülmüştür. Damıtılmış su ile 100 mL'lik son hacme getirilmiştir. Köpürmeyi önlemek için hafifçe karıştırılmıştır.

3. Biyotin-Konjugat

Konsantre Biyotin-Conjugate solüsyonu Deneme Tamponu (1x) ile gerektiği gibi temiz bir plastik tüp içinde 1:100 oranında seyreltilmiştir.

4. Streptavidin-HRP

Konsantre Streptavidin-HRP çözeltisi Deneme Tamponu (1x) ile gerektiği gibi temiz bir plastik tüp içinde 1:100 oranında seyreltilmiştir.

5. İnsan IFN- -γ Standardı

Sulandırma hacmi Kalite Kontrol Sayfasında belirtilmiştir. Tam ve homojen çözünmeyi sağlamak için hafifçe döndürülmüş veya karıştırılmıştır (sulandırılan standart konsantrasyonu = 200 ng/mL). Standardın 10-30 dakika sulandırılmasına izin verilmiştir. Seyreltme yapmadan önce iyice karıştırılmıştır. Kullanımdan sonra kalan standart depolanamaz ve atılması gerekmektedir.

3.5.4.4 Test protokolü

- Gerekli sayıda numuneyi test etmek için gereken mikro kuyucuk şeritlerinin sayısını ve ayrıca çalıştırılacak boşluk ve standartların sayısı belirlenmiştir. Standart, boşluk ve isteğe bağlı kontrol numuneleri dahil her numune iki kez test edilmelidir. Ekstra mikro kuyulu şeritler tutucudan çıkarılmalı ve 2°-8°C'de sağlanan kurutucu ile sıkıca kapatılmış bir folyo torbada saklanmalıdır.
- Mikro kuyucuk şeritlerini kuyu başına 400 lt Yıkama Tamponu ile iki kez yıkanmıştır, yıkamalar arasında mikro kuyu içeriği iyice aspire edilmiştir. Aspirasyondan önce

Yıkama Tamponunun kuyulara yerleşmesi için 10-15 saniye beklenmiştir. Mikrokuyuların yüzeyini çizmemeye dikkat edilmiştir. Son yıkama aşamasından sonra fazla Yıkama Tamponunu çıkarmak için kuyular boşaltılmış olup mikro kuyucuk şeritlerini emici ped veya kağıt havlu üzerine hafifçe vurulmuştur. Yıkadıktan sonra mikro kuyucuk şeritleri hemen kullanılmıştır. Mikro kuyu şeritleri ayrıca maksimum 15 dakika boyunca nemli emici kağıt üzerine baş aşağı yerleştirilebilir. Kuyuların kurumasına izin vermek iyi bir fikir değildir.

- Mikrokuyu plaka üzerinde standart damıtma (Alternatif olarak standart damıtma tüplerde hazırlanabilir – bkz. 0): Tüm standart kuyucuklara iki kopya halinde 100 µL Numune Seyreltici eklenmiştir. A1 ve A2 kuyularına 100 µL hazırlanmış standart (bakınız Standart 0 Hazırlanması, konsantrasyon = 200 pg/mL) pipetlenmiştir. A1 ve A2 kuyularının içeriğini tekrarlayan aspirasyon ve ejeksiyon (standart 1 konsantrasyonu, S1 = 100 pg/mL) ile karıştırılmış olup sırasıyla B1 ve B2 kuyularına 100 µL aktarılmıştır. Mikrokuyuların iç yüzeyini çizmemeye dikkat edilmiştir. 100,00 ila 1,56 pg/mL arasında değişen iki sıra İnsan IFN-y standart damıtımı oluşturarak bu işleme 5 kez devam edilmiştir. Kullanılan son mikro kuyulardan (G1, G2) 100 µL içerik atılmıştır.
- Boşluk kuyucuklara iki kopya halinde 100 µL Numune Seyreltici eklenmiştir.
- Numune kuyularına 50 µL Numune Seyreltici eklenmiştir.
- Numune kuyularına her numuneden iki kopya halinde 50 µL eklenmiştir.
- Biyotin-Konjugat hazırlanmıştır (bkz. Biyotin-Konjugat 0'ın Hazırlanması).
- Tüm kuyucuklara 50 µL Biyotin-Konjugat eklenmiştir.
- Yapışkan bir filmle örtüp varsa bir mikroplaka çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında (18 ila 25°C) 2 saat inkübe edilmiştir.
- Streptavidin-HRP hazırlanmıştır (bkz. Streptavidin-HRP 0'ın Hazırlanması).
- Yapışkan filmi çıkarıp kuyular boşaltılmıştır. Mikro kuyu şeritleri test protokolünün b noktasına göre 3 kez yıkanmıştır. Hemen sonraki adıma geçilmiştir.
- Boşluk kuyucuklar dahil tüm kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş Streptavidin-HRP eklenmiştir.

- Yapışkan bir filmle örtüp varsa bir mikroplaka çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında (18° ila 25°C) 1 saat inkübe edilmiştir.

- Yapışkan filmi çıkarıp kuyular boşaltılmıştır. Mikro kuyu şeritleri test protokolünün b noktasına göre 3 kez yıkanmıştır. Hemen sonraki adıma geçilmiştir.

- Tüm kuyucuklara 100 µL TMB Substrat Solüsyonu pipetlenmiştir.

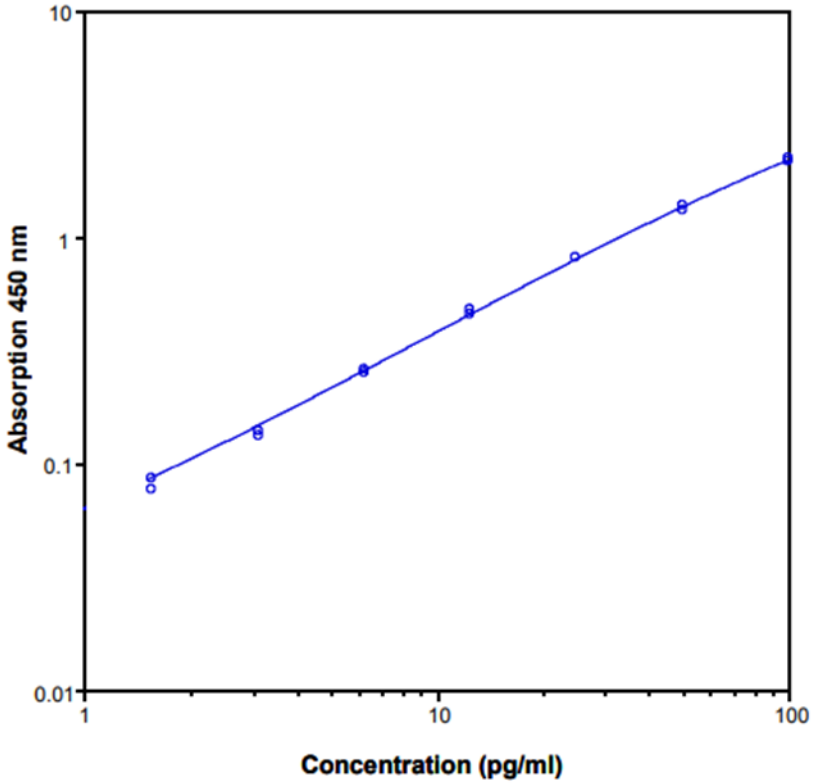
- Mikrokuyu şeritleri oda sıcaklığında (18° ila 25°C) yaklaşık 10 dakika inkübe edilmiştir. Yoğun ışığa doğrudan maruz kalmaktan kaçınılmıştır. Pozitif kuyucuklar artık düzgün bir şekilde kaydedilemez hale gelmeden önce plakadaki renk gelişimi izlenmeli ve substrat reaksiyonu durdurulmalıdır (bu protokolün bir sonraki noktasına bakınız). Renk gelişimi için ideal sürenin belirlenmesi her test için ayrı ayrı yapılır. En yüksek standart koyu mavi bir renk geliştirdiğinde durdurma solüsyonunun eklenmesi önerilir. Alternatif olarak renk gelişimi, ELISA okuyucu tarafından 620 nm'de izlenebilir. Standart 1, 0,9 – 0,95'lik bir OD'ye ulaşır ulaşmaz substrat reaksiyonu durdurulmalıdır.

- Her kuyucuğa hızlı bir şekilde 100 µL Durdurma Solüsyonu pipetleyerek enzim reaksiyonunu durdurulmuştur. Durdurma Çözeltisinin enzimi tamamen etkisiz hale getirmek için mikro kuyucuklar boyunca hızlı ve eşit bir şekilde yayılması önemlidir. Sonuçlar, Durdurma Çözeltisi eklendikten hemen sonra veya mikro kuyucuk şeritleri karanlıkta 2 - 8°C'de saklanıyorsa bir saat içinde okunmalıdır.

- Birincil dalga uzunluğu olarak 450 nm (opsiyonel olarak referans dalga uzunluğu olarak 620 nm, 610 nm ila 650 nm kabul edilebilir) kullanarak bir spektro-fotometrede her mikro kuyunun absorbansı okunmuştur. Boş kuyuları kullanarak üreticinin talimatlarına göre plaka okuyucu boşaltılmıştır. Hem numunelerin hem de standartların absorbansı belirlenmiştir.

3.5.4.5 Sonuçların hesaplanması

Her numune için dolaşan insan INF-γ konsantrasyonu standart eğriden belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Interferon gamma (IFN-γ) standart eğrisi

3.6 Genetik Çalışma

DNA ekstraksiyonu için her katılımcıdan/denekten bir EDTA tüpünde 2 mL venöz kan alınmıştır. DNA, tuzlama yöntemiyle izole edilmiştir (Lahari *et al.* 1992). Özetle, RBC'yi parçalamak için tam kan örneğine Triton-X içeren eşit miktarda RBC lizis tamponu eklenmiş olup pelet elde etmek için santrifüjlenmiştir. Pelet, %10 SDS içeren WBC lizis tamponu ile parçalanmış olup ardından protein fraksiyonunu ayırmak için arka arkaya yüksek molar konsantrasyonda NaCl ilave edilmiştir. Son olarak, ayrılan ve TE tamponunda yeniden süspanse edilen DNA'yı elde etmek için buz soğukluğunda etanol ilave edilmiş ve PCR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -20°C'de saklanmıştır. +874A/T konumundaki interferon gamadaki (IFNγ) polimorfizm, amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (ARMS PCR) kullanılarak incelenmiştir (IFN gamma +874T/A rs2430561).

IF2 GTGTGTGTGTGTGTGTGAGA 22

IR2 TTTATTCTTACAACACAAAATCAAAACA 28

OF2 TTCAAGCTAGGCTAAAAAATACAAAA 26

OR2 TTATTGATGGTTAATGAAAAGTTTTTACA 29

Tavlama: 57

T alel için ürün ebadı: 211

A alel için ürün ebadı: 161

İki dış astarın ürün ebadı: 322

Aksi halde, 308 G/A pozisyonunda TNF-α'daki polimorfizmi amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (ARMS PCR) kullanılarak incelenmiştir. TNF alfa 308G/A rs1800629

IF CAATAGGTTTTGAGGGGCAGGA 22

IR GGAGGCTGAACCCCGTACC 19

OF CCCTCAAGGACTCAGCTTTCTGA 23

OR CCTGCACCTTCTGTCTCGGTTT 22

Tavlama: 61

G alel için ürün ebadı: 158

A alel için ürün ebadı: 201

İki dış astarın ürün ebadı: 318

Toplam 20 µL'lik hacimdeki PCR enkübasyon karışımı, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 400 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl2, 0,5 birim Taq polimeraz, 0,8 mM'lik her bir astar, %0,01 jelatin ve 40 ng genomik DNA'dan meydana gelmektedir. Amplifikasyon, 95°C'de 1 dakika süreyle bir başlangıç denatürasyonu ile gerçekleştirilmiş olup 95°C'de 15 saniye denatürasyon ile 10 döngü, 62°C'de 50 saniye tavlama ve 72°C'de 40 saniye uzatma ile yapılmıştır. Ürünler etidyum bromür ile boyanmış %2 agaroz jel üzerinde analiz edilmiştir.

3.7 İstatistiksel Analiz

Veriler, SPSS ve Microsoft Excel XP sistemi altında bir istatistiksel Minitab programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Veriler, ortalama ± SD (standart sapma), minimum ve maksimum değerlerin basit ölçümünde sunulmuştur.

Sonuçlar, tedavi edilen ve kontrol grupları arasındaki değişkenliğin önemini değerlendirmek için Varyans Analizi (ANOVA) testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Veri ortalamaları Duncan'ın Çoklu Aralık testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

0,05'ten büyük olasılık seviyeleri istatistiksel olarak anlamsız olarak kabul edilmiş olup burada 0,05'ten küçük değerler aşağıdaki gibi anlamlı kabul edilmiştir:

$P > 0,05$ Anlamsız

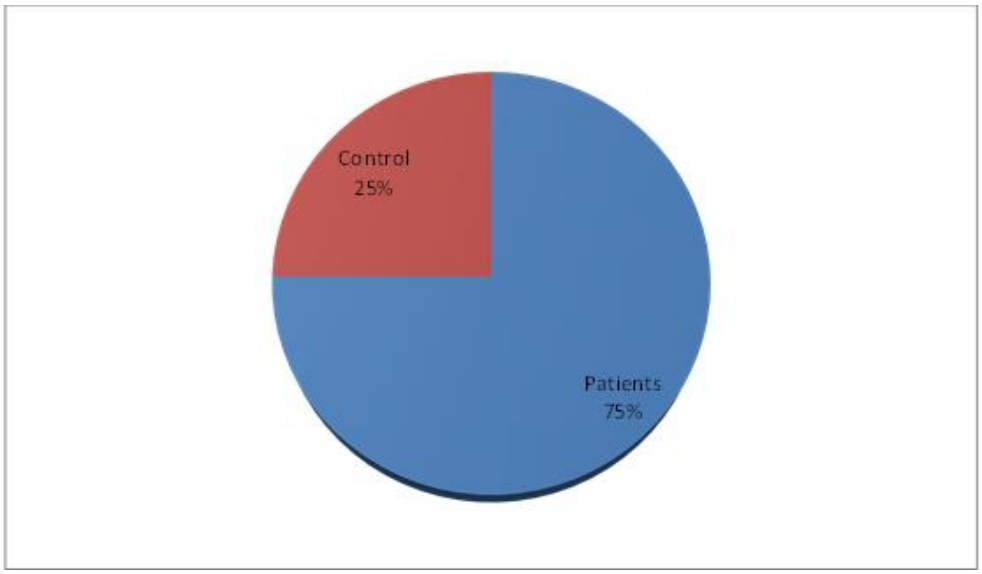
$P < 0,05$ Anlamlı

$P < 0,01$ Oldukça anlamlı (Beth *et al.* 2004).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Çalışma Örneklemi

Çalışmaya, ortalama yaşları 25 ila 60 arasında koronavirüs bulaşmış kişilerden 80 kan örneği 31 erkek ve 29 kadın olmak üzere 66 kan örneği ve çalışmada 20 kan örneği 10 erkek ve 10 kadın yer almıştır. Kontrol grubu olarak görünüşte sağlıklı kişiler dâhil edilmiş olup ortalama yaşları 25 ila 50 arasındaydı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Çalışma örnekleminin yüzdesi (hastalar ve kontrol)

4.2 Bağışıklık Çalışması

Çalışılan numunelerdeki bazı sitokinlerin konsantrasyon seviyeleri, Enzim-Bağlantılı ImmunoSorbent Deneme (ELISA) tekniği kullanılarak tahmin edilmiştir.

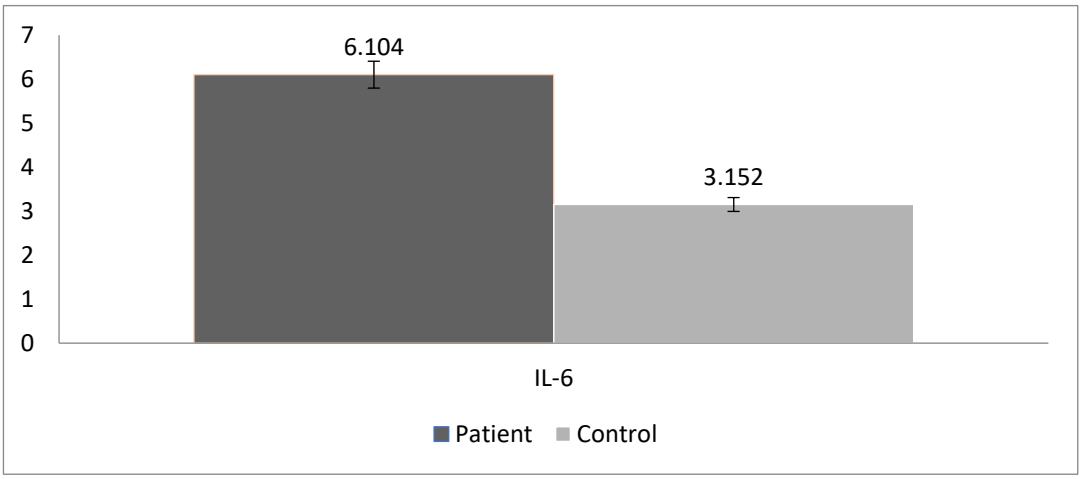
4.2.1 İnterlökin 6 (IL-6)

Çizelge 4.1, enfekte hastaların serumundaki konsantrasyon (6,104 ± 0,165) pg/mL olduğundan, enfekte hastalarda sağlıklı kişilere kıyasla IL-6 konsantrasyonunda önemli bir artış gösterirken, konsantrasyonu kontrol örneğinde (3,152 ± 0,116) pg/mL idi (Şekil

4.2). İstatistiksel analizin sonuçları, koronavirüs ile enfekte olanlar ile kontrol numunesi arasında ve olasılık seviyesi P < 0,05 altında IL-6 konsantrasyonunda önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.1 Çalışılan gruplarda IL-6 konsantrasyonu

Parametre	Hastalar (60) Ortalama ± SS	%95 CI	Sağlıklı kişiler (20) Ortalama ± SS	%95 CI	P-Değeri
IL-6	6,104±0,165	5,179-5,569	3,152±0,116	3,2473-3,637	0,000



Şekil 4.2 Çalışılan gruplarda IL-6 konsantrasyonu

Mevcut bulgularda görüldüğü gibi, IL-6 konsantrasyonu, sağlıklı kişilere kıyasla enfekte hastalarda önemli (P<0,05) bir artış göstermektedir. Önceki retrospektif çalışmalar, yüksek bir interlökin-6 (IL-6) seviyesinin, yüksek COVID-19 enfeksiyonu vaka ölüm oranı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Chen *et al.* 2020).

Solunum disfonksiyonu olan hastalarda daha önce IL-6 seviyelerinde bir artış gözlemlenmişti (Wang *et al.* 2020). Bu, COVID-19 enfeksiyonunun neden olduğu sitokin aracılı akciğer hasarının olası bir ortak mekanizmasını ima etmektedir. Ayrıca, yüksek derecede patojenik SARS-CoV-2'nin hızlı virüs replikasyonu ve alt solunum yollarını enfekte etme eğilimi ile ilişkili olduğu ve bunun da IL-6'nın neden olduğu ciddi solunum

sıkıntısı tepkisinin artmasına neden olduğu görülmektedir. Bu nedenle sonuçlarımız, dolaşımdaki IL6 seviyelerinin seri ölçümünün COVID-19 ile enfekte hastalarda hastalık ilerlemesini belirlemede önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımız doğrultusunda, yüksek bir IL-6 seviyesinin, hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonunun şiddeti için iyi bir biyobelirteç olduğu kanıtlanmıştır (Xia *et al.* 2015).

SARS-CoV-1 hastalarında akciğer lezyonlarıyla ilişkili akut evrede interlökin-6'da yükselme saptandı. Özellikle IL-6, solunum yolunun SARS CoV-1 istilasına bağlı olarak hiper-doğuştan inflamatuar yanıtı uyarabilir (Wang *et al.* 2004). Bu, IL-6 konsantrasyonu açısından mevcut çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur.

SARS-CoV-1'deki IL-6 seviyelerindeki artış, farelerdeki ciddi inflamasyonun bir sonucu olarak da aşırı olmuştur (Nagata *et al.* 2008, Day *et al.* 2009). Bu, COVID-19'daki SARS-CoV-2 durumunda meydana gelir. Daha yüksek IL 6 ve C-reaktif proteinin, bazı meta-analizler ve retrospektif çalışmalar tarafından hafif hastalığın aksine mortalite ve ciddi bozukluk ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gong *et al.* 2020). Her ikisi de dikkate alındığında, akut solunum yetmezliği ve SARS CoV-2 olan hastalarda kritik hasta gruplarında makrofaj aktivasyon Sendromu veya immün yetmezlik olduğuna dair birçok kanıt mevcuttur. İnflamatuar sitokinler, interlökin-1beta (IL1beta) değil, IL-6'nın karakteristiğidir, dolayısıyla bağışıklık düzensizliğini düzenlemektedir.

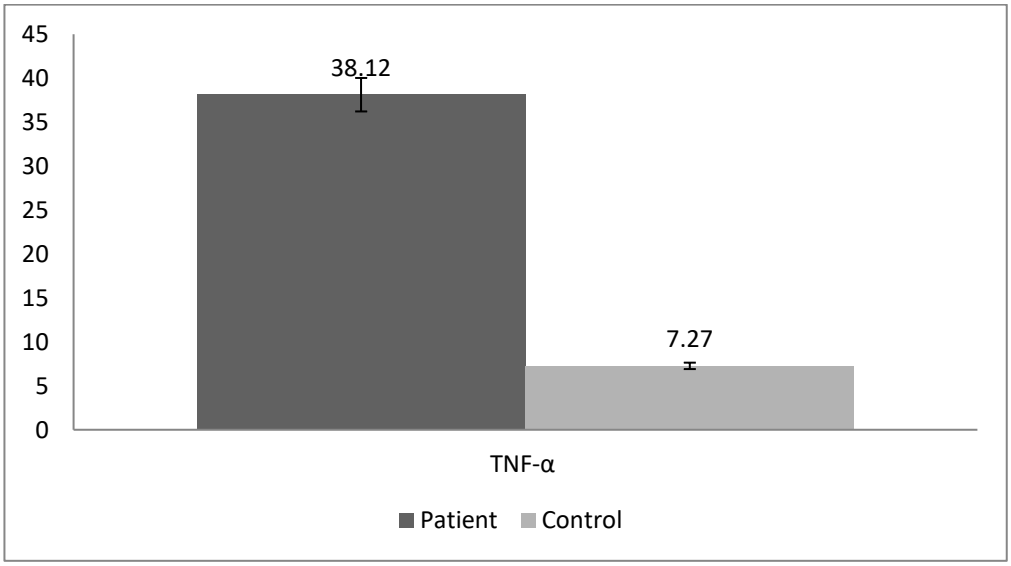
Mevcut çalışmada, koronavirüs ile enfekte hastalarda ortalama IL6 seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak oldukça anlamlıydı. Bu bulgu, Al-Samkari ve Berliner (2018) ve Huang vd. (2020) tarafından bildirilen bulgularla uyumlu olup SARS vakalarında yüksek IL-6 seviyeleri gözlemlenmiştir ve semptomların şiddeti ile bağlantılı olup artan IL-6 seviyesi COVID-19 şiddeti ile ilişkilidir (Huang *et al.* 2020). Son çalışma, semptomların şiddeti ile ilişkili olarak IL-6 düzeylerinin yükseldiğini bildirmiştir (Wong *et al.* 2004, Cheung *et al.* 2005, Liu *et al.* 2020). COVID-19 hastalarında yüksek IL-6 ekspresyonunda sitokin fırtınası ve ilerleyici hastalık gösterilmiştir. Bu hastalarda yüksek IL-6 seviyeleri ile kardiyak hasar da gözlenmiştir (Zhou *et al.* 2020). Sevier SARS-CoV-2 hastasında sitokin fırtınasında IL-6 ve inflamasyon ve pulmoner fibrozise neden olmuştur (Shieh *et al.* 2019, Xu *et al.* 2020).

4.2.2 Tümör nekroz faktörü α (TNF-α)

Çizelge 4.2, enfekte hastaların serumundaki konsantrasyon (38,12 ± 3,37) pg/mL olduğu için, sağlıklı kişilere kıyasla enfekte hastalarda TNF-α konsantrasyonunda önemli bir artış gösterirken, konsantrasyonu kontrol örneğinde (7,27 ± 1,46) pg/mL idi (Şekil 4.3). İstatistiksel analizin sonuçları, Koronavirüs ile enfekte olanlar ile kontrol numunesi arasında ve olasılık seviyesi P < 0,05 altında TNF-α konsantrasyonunda önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.2 Çalışılan grupta TNF-A konsantrasyonu

Parametre	Hastalar (60) Ortalama ±SS	%95 CI	Sağlıklı kişiler (20) Ortalama ± SS	%95 CI	P-Değeri
TNF-α	38,12±3,37	26,76-35,29	7,27±1,46	3,73-10,78	0,000



Şekil 4.3 Çalışılan gruptaki TNF-A konsantrasyonu

Mevcut çalışmanın sonucu, kontrol grubuna kıyasla COVID-19 hastalarında ortalama tümör nekroz faktör-alfa seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Farklar istatistiksel olarak oldukça anlamlıydı ve bu bulgu Huang vd. (2020), Liu vd. (2020) ve

Chen vd. (2019), SARS COVID-19'lu hastalarda yüksek serum TNF-α seviyesinin daha şiddetli hastalık ile daha yüksek olduğunu göstermiştir. TNF-α, aşırı üretimi SARS-CoV hastalarında kötü prognozla ilişkili olan sitokinlerden biriydi (Law *et al.* 2005, Zhou *et al.* 2017). TNFa konsantrasyonu, hastalığın şiddeti ile ilişkilidir (Gong *et al.* 2020). Ayrıca ARDS'de akciğer hasarında TNF-α çok önemli bir rol oynamaktadır.

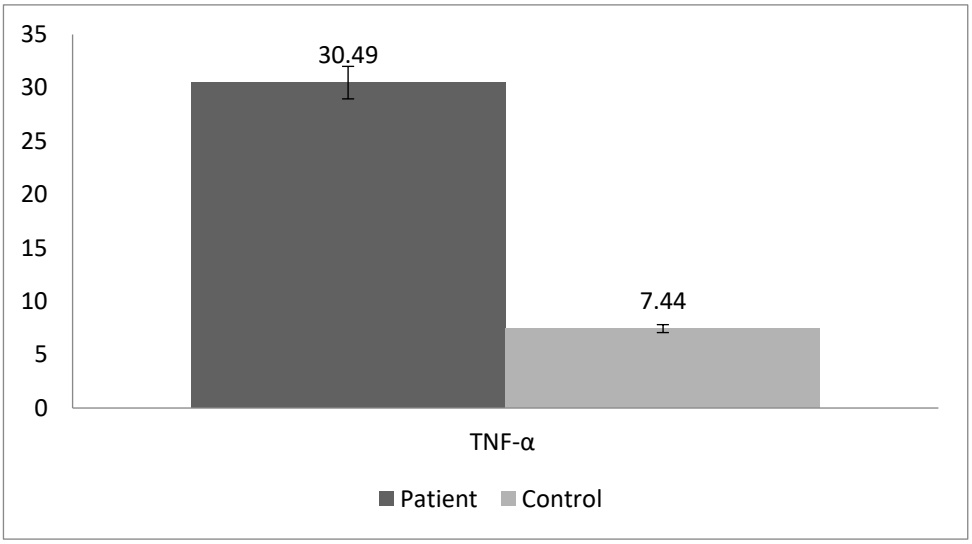
TNF-α'nın serum konsantrasyonları COVID-19 hastalarında daha yüksektir ve sonuç olarak ARDS geliştirme ve ölüm olasılığı daha yüksektir (Leija-Martínezab *et al.* 2020). Ayrıca TNF, aşırı inflamasyonla yakından ilgili bir proinflamatuar sitokindir. COVID-19'da TNF seviyeleri yüksektir ve erken seviyeler mortaliteyi öngörmektedir (Del Valle *et al.* 2020).

4.2.3 Serum ferritin

Çizelge 4.3, enfekte hastaların serumundaki konsantrasyon (105,11 ± 13,57) pg/mL iken, kontrol numunesindeki konsantrasyonu (3,94 ± 0,65) pg/mL olduğundan sağlıklı kişilere kıyasla enfekte hastalarda ferritin konsantrasyonunda önemli bir artış göstermektedir. İstatistiksel analizin sonuçları, Koronavirüs ile enfekte olanlar ile kontrol numunesi arasında ve olasılık seviyesi $P < 0,05$ altında ferritin konsantrasyonunda anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.3 Çalışılan gruptaki ferritin konsantrasyonu

Parametre	Hastalar (60) Ortalama ± SS	%95 CI	Sağlıklı kişiler (20) Ortalama ± SS	%95 CI	P-Değeri
Ferritin	105,11±13,57	31,85-44,61	3,94±0,65	3,41-13,54	0,000



Şekil 4.4 Çalışılan gruptaki ferritin konsantrasyonu

Serum ferritin seviyeleri normal aralıktan daha fazla yükselmiş olup bu fonlama Zhou F *et al.* (2020), SARS COVID-19 hastalarında ferritin düzeyinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Proinflamatuar etkiler immün düzensizliği etkiler, bu da sitokin fırtınası hiperferritinemi, COVID-19'un şiddetini etkileyen kritik bir faktör olabileceğine katkıda bulunması nedeniyle ferritin düzeylerinin arttığını ve durmadığını düşündürür (Abbaspour *et al.* 2014).

20 adet COVID-19 hastasıyla yapılan bir çalışmada, şiddetli ve çok şiddetli COVID-19'lu bireylerin artmış serum ferritin seviyesi sergilediği, çok şiddetli COVID-19 grubunda serum ferritininin şiddetli COVID-19 grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla 291,13 ng/mL'ye karşı 1006,16 ng/mL) (Bo Zhou *et al.* 2020). Bununla uyumlu olarak, başka bir çalışma, COVID-19'dan ölen hastalarda, hastaneye başvuru sırasında ve hastanede kalış süresi boyunca ferritin düzeylerinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Hastanede yatışının 16, gününden sonra serum ferritin düzeylerinin medyan değerleri, bu hastalarda üst saptama sınırını aşmış olup bu da ferritin düzeylerinin durmadan arttığını düşündürmüştür (Fei *et al.* 2020).

Ayrıca Chen vd. (2020), 63'ünün serum ferritini normal aralığın çok üzerinde olan 99 hastanın klinik özelliklerini analiz etmiştir. Ölüm nedeni SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan 12 hastanın otopsilerinde de yüksek ferritin seviyeleri bulunmuştur (Fox *et al.* 2020).

Şiddetli COVID-19'lu 69 hastanın periferik kanının analizi, ciddi olmayan hastalığı olan hastalara kıyasla yüksek ferritin seviyelerini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle serum ferritin düzeylerinin COVID-19 şiddeti ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Tao *et al.* 2020).

Artan ferritin seviyeleri, COVID-19'da güçlü bir inflamatuar reaksiyonun göstergesi olabilir ve son araştırmalar, artan dolaşımdaki ferritin seviyeleri seviyelerinin, makrofaj aktive edici sendromu andırdığı bir sitokin fırtınasının gelişimine katkıda bulunarak kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Kernan and Carcillo 2017, Wessling-Resnick 2018, Shoenfeld 2020).

Cecconi vd. (2020), ayrıca, hastanede yatan COVID-19 hastalarında yoğun bakım ünitesine transfer veya ölüme yol açan klinik bozulma riski taşıyan hastaların erken tanımlanmasına ve yönetimine ferritinin yardımcı olabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle, COVID-19 hastalarında ferritin seviyelerindeki değişiklikler hayatta kalanlarda hayatta kalanlara göre daha yüksek olmakla kalmaz, aynı zamanda hastalığın kötüleşmesiyle birlikte artar (Zhou *et al.* 2020). Benzer şekilde, YBÜ ve YBÜ olmayan hastalar arasında katı organ nakli uygulanan COVID-19 hastalarında bifazik değişen bir ferritin paterni gözlenmiştir. Gerçekten de, kalış sırasında ferritin seviyeleri arttı, daha sonra yoğun bakım hastalarında 19. günde mortalite oranı (%36'ya karşı %5) ve olmayanlara göre daha yüksek olan YBÜ hastalarında koenfeksiyon (%36'ya karşı %15) zirve yapmıştır. Bununla birlikte, Bolondi vd. (2020) tarafından yoğun bakımda kalış sırasında COVID-19 hastalarında ferritin seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

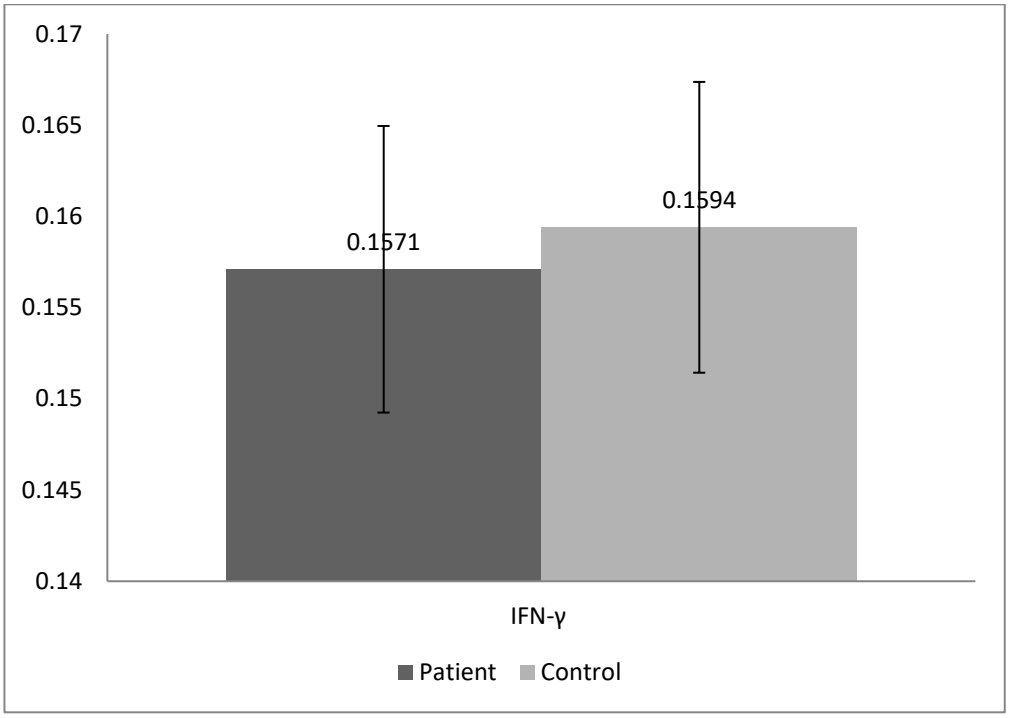
4.2.4 Interferon gamma (IFN-γ)

Çizelge 4.4, enfekte hastaların serumundaki konsantrasyon (0,1571 ± 0,0019) pg/mL olduğu için, enfekte hastalarda sağlıklı kişilere kıyasla IFN-γ konsantrasyonunda önemli bir düşüş gösterirken, konsantrasyonu kontrol numunesinde (0,1594 ± 0,0014) pg/mL idi (Şekil 4.5). İstatistiksel analizin sonuçları, Koronavirüs ile enfekte olanlar ile kontrol

numunesi arasında ve olasılık seviyesi P < 0,05 altında IFN-γ konsantrasyonunda anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir

Çizelge 4.4 Çalışılan gruptaki IFN-Γ konsantrasyonu

Parametre	Hastalar (60) Ortalama ± SS	%95 CI	Sağlıklı kişiler (20) Ortalama ± SS	%95 CI	P-Değeri
IFN-γ	0,1571±0,0019	0,151-0,165	0,1594±0,0014	0,161- 0,167	0,011



Şekil 4.5 Çalışılan gruptaki IFN-Γ konsantrasyonu

Mevcut çalışmanın sonucu, kontrol grubuna kıyasla COVID-19 hastalarında ortalama IFN-y seviyesinin daha düşük olduğunu göstermiştir. CD4+ T hücrelerinde azalmış IFN-γ ekspresyonu, Lagunas-Rangel ve Chávez-Valencia (2020) ve Pedersen ve Ho (2020) gibi çeşitli çalışmalarda (mevcut çalışma ile uyumlu olarak şiddetli COVID-19 ile bir ilişki göstermiştir.

Bununla birlikte, bazı durumlarda, hafif vakalara kıyasla şiddetli vakalarda periferik kanda IFN-γ düzeylerinde artış tespit edilmiş olup, çocuklarda bulgular esas olarak hastalığın hafif bir formundan etkilenen hastalık artmış IFN-γ göstermiştir (Liu *et al.* 2020, Sun *et al.* 2020). IFN-γ'nin esas olarak şiddetli COVID-19 formunda azaldığı görülmektedir.

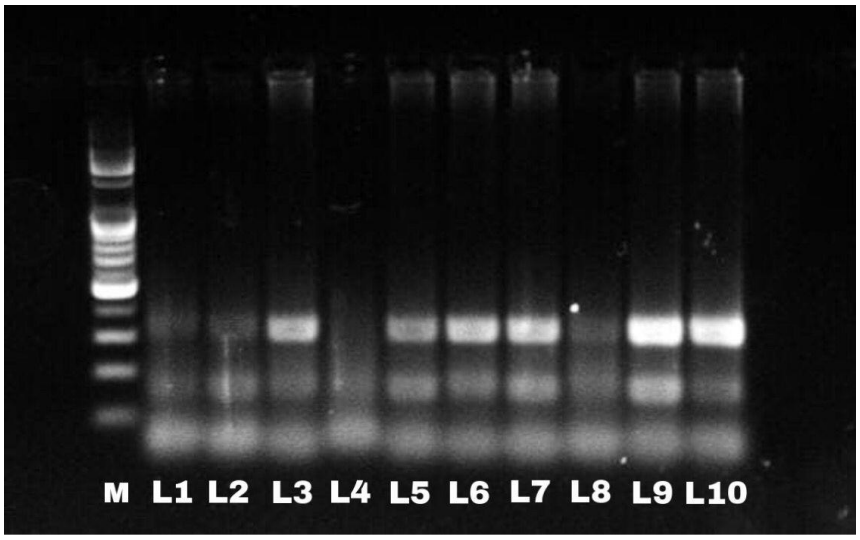
Ayrıca, IFN üretimi, virüsü temizlemek ve adaptif bağışıklık tepkileri geliştirmek için kritik öneme sahiptir (Kronstad *et al.* 2018). İnterferon kaynaklı transmembran proteinler (IFITM'ler) ve üçlü motif içeren proteinler (TRIM'ler) ayrıca antiviral bağışıklık tepkisine katkıda bulunmaktadır. IFITM'ler, virüsün konakçı hücrelere girişini kısıtlayarak İnfluenza A, Flavivirüsler, HIV-1, Ebola virüsü ve MERS-CoV gibi bazı virüslere karşı korunmada rol oynamaktadır (Kak *et al.* 2018). BCG aşılaması ve daha sonra COVID-19 ölüm oranlarının düşük olduğu ülkeler arasında yüksek düzeyde IFN'ye yol açan hepatit A ve influenza gibi viral enfeksiyonların şiddetli endemisitesi, ülkeler arasındaki ölüm farklılıklarını açıklamaya katkıda bulunabilmektedir (Husseini *et al.* 2021), Bu, sağlıklı insanlara kıyasla virüs hastalarında daha düşük IFN seviyeleri açısından mevcut çalışmanın hipotezini doğrulamaktadır.

4.2.5 TNF alfa 308G/A

rs1800629 tespiti için TNF alpha 308G/A PCR optimizasyonu Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Tavlama sıcaklığı 61°C idi. Bu optimum koşul, spesifik olmayan parçayı en aza indirirken, belirlenen boyutta en kalın DNA parçasının ortaya çıkmasıyla belirlenmiştir. (M Ladar) 100bp markörden oluşur. Tüm şeritler ürünleri içerir ve iki dış primerin (318bp) ürünü, L4 ve L8 hariç boş kalır. G allelinin L1-L2-L3-L5-L6-L7-L9-L10 ürünü (158bp). Ve A alelinin (201bp) hiçbir ürünü bulunamadı.

Paskulin vd. (2011), -308G > A olan TNF-alfa genotipleri ile kötü kritik hastalık sonuçları (sepsis, septik şok, daha fazla organ disfonksiyonu veya ölüm) arasında bir bağlantı bulamamışlardır. Ek olarak, bazı çalışmalara göre, -308A nadir alel sıklığı %15 olup, Danimarka'da (%22) (Jessen *et al.* 2007), İngilizlerde (%20) (Gordon *et al.* 2004), Fransızlarda (%18) (Mira *et al.* 1999) ve İspanyollarda (%9) (Garnacho-Montero *et al.*

2005) gösterilen eğilimi doğrulamaktadır. -308A aleli daha uyarılabilir ve yapısal TNF-alfa üretse de, sepsis, septik şok, organ disfonksiyonu ve mortalitedeki fenotipik etkileri karıştırılmıştır (Clark and Baudouin 2006). Bazı genetik ilişki çalışmalarında keşfedilmesine rağmen diğerlerinde gözlenmemiştir (Reid *et al.* 2002, Gordon *et al.* 2004, Jessen *et al.* 2007).(Çizelge 4.5)



Şekil 4.6 rs1800629 tespiti için TNF alpha 308G/A PCR optimizasyonu

Çizelge 4.5 Enfekte örnek ve kontrol örneğinde TNF alfa 308G/A rs1800629 geni için genotiplerin frekansları

Gene	Genotip	Enfekte Örnekler (60)	Kontrol Grubu (20)	(95%CI) OR	P Değeri
TNF alpha G/A rs1800629	AA	30	10		
	P.F				
	GA	6	3		
	E.F				
	GG	24	7		
	E.F				
Ki-kare istatistiği 0.4301'dir. p değeri .806498'dir. Sonuç p < .05'te anlamlı değildir.					

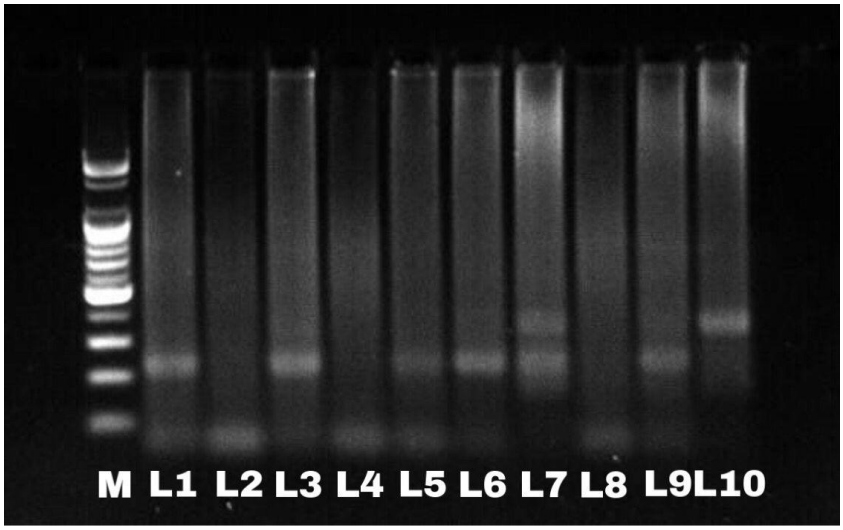
Son olarak, önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında daha büyük örneklem büyüklüğü, tutarsızlığa katkıda bulunmuş olabilir. Yine de, Gordon vd. (2004), -308A aleli ve septik şoku içeren araştırmalarda, %90 güç ve 0,01 p-değeri elde etmek için en az 2.000 hastanın gerekli olacağını belirtmiştir. Negatif sonuçlar önemli olmakla birlikte, anlamlı bir önemli

genetik bağlantıda yanlış pozitif bulgu riskini belirlemek kadar küçük etkileri tespit etme gücünün belirlenmesi de aynı derecede önemlidir.

TNF-alfa inhibitörü monoklonal antikor tarafından ölümcül bir akut solunum sıkıntısı sendromu ile şiddetlenen ciddi bir COVID-19 tipi yaşanmıştır. Genel popülasyondan elde edilen istatistiklere göre, yaş ve kardiyovasküler komorbiditeler, COVID-19 ile ilişkili şiddetli evrim ve mortalite için en önemli risk faktörleri olarak görünmektedir. Bu hastadaki olumsuz sonucun TNF-alfa baskılanmasından ziyade yaş ve hipertansiyondan kaynaklandığına inanıyoruz (Duret *et al.* 2020). Feldmann vd. (2020), TNF karşıtı ilaçların neden COVID-19'da test edilmesi gerektiğini açıklamışlardır. Hiperinflamasyon veya sitokin salınım sendromu olarak bilinen COVID-19'un yıkıcı aşırı inflamatuar fazının bir parçası olan sitokin yanıtının önde gelen bir bileşeni olan TNF, bu ilaçlar tarafından nötralize edilmektedir. COVID-19'da kandaki TNF seviyeleri yüksektir, bu da hiperinflamatuar bir yanıtı gösterir (Robinson *et al.* 2020).

4.2.6 IFN gamma +874T/A

rs2430561 tespiti için IFN gamma +874T/A PCR optimizasyonu Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Tavlama sıcaklığı 57 °C idi. Bu optimum koşul, spesifik olmayan parçayı en aza indirirken, belirlenen boyutta en kalın DNA parçasının ortaya çıkmasıyla belirlenmiştir. (M Ladder) 100 bp markörden oluşur. L1, L3, L5, L6 ve L9, T alelinin (211bp) ürününden oluşur, ancak L7'in iki T aleli ürünü ve iki dış primerin ürünü (322bp) içerdiğini düşünülür ve A alelinin (161bp) hiçbir ürünü yoktur. L10'in sadece iki dış primeri vardır. (Çizelge 4.6).



Şekil 4.7 rs2430561 tespiti için IFN gamma +874T/A PCR optimizasyonu

Çizelge 4.6 Enfekte örnek ve kontrol örneğinde IFN gamma +874T/A rs2430561 geni için genotiplerin frekansları

Gene	Genotip	Enfekte Örnekler (60)	Kontrol Grubu (20)	(95%CI) OR	P Değeri
IFN gamma + T/A rs2430561	AA	24	8		
	P.F				
	TA	6	2		
	E.F				
	TT	30	10		
	E.F				
Ki-kare istatistiği 0'dır. p değeri 1'dir. Sonuç p < .05'te anlamlı değildir.					

Bu veriler, IFN gama rs2430561 (+874T/A) polimorfizminin insanlarda artan hastalık riskiyle bağlantılı olduğu teorisini çürütmüştür. IFN gama, Th1 bağışıklık yanıtını (bir Th2 yanıtından ziyade) destekleyen bir sitokindir. Sonuç olarak, aktive edilmiş T hücreleri, makrofaj aktive edici bir sitokin olan IFN gama salan Th1 efektör hücreler haline gelir. Bu sitokin, antijen sunum etkinliğini arttırırken, proinflamatuar sitokinler TNF-a ve IL-1'in üretimini de arttırmaktadır. Bu sitokinler, makrofajların ve vasküler hücrelerin çeşitli inflamatuar ve sitotoksik maddeler üretmesine neden olmak üzere birlikte çalışmaktadır. Tüm bu aktiviteler aterosklerozun ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Hansson and Libby 2006). Hastalar genellikle yüksek miyokard

enfarktüsü ve ani ölüm riskiyle bağlantılı "sessiz" bir koroner arter hastalığı öyküsüne sahiptir (Maradit-Kremers *et al.* 2005).

İnsan aterosklerotik lezyonlarında, makrofajlar ve endotelyal hücreler tarafından IFN gama ekspresyonu daha önce belgelenmiştir (Schroecksnadel *et al.* 2006). Bazı hastalarda tedaviye başarılı bir yanıt verildikten sonra bile endotel disfonksiyonu devam edebilir (Amezcua-Guerra *et al.* 2008). Kerekes vd. (2005), IFN gama serum düzeylerinin, durumu iyi olmayan hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğunu keşfetmişlerdir. Başarılı anti-artritik tedaviye rağmen, Amezcu'a-Guerra vd. (2008), yüksek serum IFN gama seviyeleri ve uzun süreli endotel disfonksiyonu olan bir hasta alt grubu keşfetmiştir.

COVID-19'daki en yaygın ölüm nedeni akut solunum sıkıntısı sendromudur (ARDS). COVID-19'un patofizyolojisi, ciddi hastalığı olan bireylerde önemli sayıda proinflamatuar sitokinin (IFN-alfa, IFN-gamma) salındığını ortaya koymaktadır (Huang *et al.* 2019, Di Lernia 2020). Pierce vd. (2021), COVID-19 ile klinik prezentasyonda çocukların nazofarenksinde yetişkinlere kıyasla daha güçlü bir erken doğuştan gelen bağışıklık yanıtına ilişkin ilk somut kanıtı açıklamıştır. Diğer enfeksiyonların doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin (IFN gama) da yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir (Stüber *et al.* 1996, Tang *et al.* 2000). Bu koruyucu sitokinlerin nereden geldiği belli değildir, ancak bunlar mukozal ve hava yolu epitel hücrelerinin yanı sıra değişmez doğal öldürücü T hücrelerinden gelebilir (Sharma *et al.* 2007, Farin *et al.* 2014). Yaşla birlikte erken doğuştan gelen tepkilerdeki değişikliklerin nedenleri bilinmemekle birlikte, erken COVID-19 tedavisi için inhale interferon beta-1 ile ilgili son çalışmalar, bu yolları artıran ilaçların uygun bir tedavi yöntemi olabileceğini ve sonraki viral istila zararına karşı koruma sağlayabileceğini göstermektedir (Pierce *et al.* 2021).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanmaktadır:

1. Sonuçlar, sağlıklı kişilere kıyasla enfekte hastalarda IL-6 konsantrasyonunda önemli bir artış göstermiştir.
2. Sonuçlar, sağlıklı kişilere kıyasla enfekte hastalarda TNF-α konsantrasyonunda önemli bir artış göstermiştir.
3. Sonuçlar, sağlıklı kişilere kıyasla enfekte hastalarda ferritin konsantrasyonunda önemli bir artış olduğunu göstermiştir.
4. Sonuçlar, sağlıklı kişilere kıyasla enfekte hastalarda IFN-γ konsantrasyonunda önemli bir düşüş göstermiştir.
5. İyi olmayan hastalardaki bu bulgular, -308G > A TNF-alfa SNP'nin kritik hastalığın sonucunda önemli bir etki oynamadığını ima etmektedir. Irak popülasyonundaki kritik hastalarda, -308A TNF-alfa alelinin varlığı sepsis, septik şok, daha büyük organ disfonksiyonu veya ölümle bağlantılı değildir.
6. Sonuçlar, IFNG rs2430561 (+874T/A) fonksiyonel gen polimorfizminin hastalarda bildirilen artmış hastalık riski üzerinde doğrudan bir etkisi olduğunu göstermemiştir.

Öneriler aşağıdaki gibi listelenmiştir:

1. COVID-19 hastalarında diğer sitokin tiplerinin belirlenmesi.
2. COVID-19 hastalarında bazı hormon düzeylerinin belirlenmesi.
3. COVID-19 hastalarında diğer mineral türlerinin belirlenmesi.
4. COVID-19 hastalarında diğer gen polimorfizm tiplerinin belirlenmesi.

KAYNAKLAR

Abbaspour, N., Hurrell, R. and Kelishadi, R. 2014. Review on iron and its importance for human health. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences, 19(2): 164-8.

Adhikari, S. P., Sha, M., Yu-Ju, W., Yu-Ping, M., Rui-Xue, Y., Qing-Zhi, W., Chang, S., Sean, S., Scott, R., Hein, R. and Huan, Z. 2020. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. Inf. Dis. Pov., 9: 29-41.

Agarwal, A., Mukherjee, A., Kumar, G., Chatterjee, P., Bhatnagar, T. and Malhotra, P. 2020. Convalescent plasma in the management of moderate covid-19 in adults in India: open label phase II multicentre randomised controlled trial. Placid Trial Bmj, 371: 3939-3944.

Al-Samkari, H. and Berliner, N. 2018. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Annual review of pathology: mechanisms of disease, 13: 27-49.

Amezcua-Guerra, L. M., Marquez-Velasco, R., Hernandez-Avalos, R., Vargas, A. and Bojalil, R. 2008. Interferon-gamma is associated with vascular endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol, 35: 2071–2074.

Bai, Y., Yao, T., Wei, F., Tian, D. Y., Jin, L. and Chen, L. 2020. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. JAMA, 32: 78-85.

Barnes, P. J. 2008. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Invest, 118(11): 3546-3556.

Beth, D., Robert, G. and Trapp, S. 2004. Basic and clinical biostatistics, 4th ed. Lange Medical Books/ Mc Graw-Hill Medical Publishing Division. New York. pp. 83-154.

Bo Zhou, F., Jianqing, S. and Yadan, W. 2020. Utility of Ferritin, Procalcitonin. and C-reactive Protein in Severe Patients with 2019 Novel Coronavirus Disease. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-18079/v1. Erişim tarihi: 22 Mayıs 2020.

Bolondi, G., Russo, E. and Gamberini, E. 2020. Iron metabolism and lymphocyte characterisation during Covid-19 infection in ICU patients: an observational cohort study. World J Emerg Surg, 15: 41-48.

Braciale, T. and Hahn, Y. 2013. Immunity to viruses. Immunol Rev, 255: 11-17.

Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M., Wendisch, D., Georg, P. and Kurth, F. 2020. SARSCoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. Nature, 587(7833): 270–4.

Brugos, B., Vincze, Z., Sipka, S., Szegedi, G. and Zeher, M. 2012. Serum and urinary cytokine levels of SLE patients. Pharmazie, 67: 411–413.

Cecconi, M., Piovani, D. and Brunetta, E. 2020. Early predictors of clinical deterioration in a cohort of 239 patients hospitalized for Covid-19 infection in Lombardy, Italy. J Clin Med, 9(8): 24-29.

Chan, J. F., Yuan, K. H., Kok, K. K., To, H., Chu, J. and Yang, S. 2020. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. Lancet, 395: 565-575.

Chandrashekar, A., Liu, J. and Martinot, A. J. 2020. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. Science, 2567287: 87-93.

Channappanavar, R. and Perlman, S. 2017. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. Semin Immunopathol, 39: 529–39.

Chen, H., Wang, F. and Zhang, P. 2019. Management of cytokine release syndrome related to CAR-T cell therapy. Front Med, 13: 610–7.

Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F. and Han, Y. 2020. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet, 395: 507–13.

Cheung, C. Y., Poon, L. L., Ng, I. H., Luk, W., Sia, S. F., Wu, M. H., Chan, K. H., Yuen, K. Y., Gordon, S., Guan, Y. and Peiris, J. S. 2005. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. Journal of virology, 79(12): 7819-26.

Chong, W. P., Eddie, I., Gloria, H. W. T., Man, W. N., Wilfred, H. S. W., Helen, K. W. L., Raymond, W. Y., Eudora, Y C., Eric, Y. C., Wilina, L., Malik, P. and Yu, L. L. 2006. The interferon gamma gene polymorphism +874 A / T is associated with severe acute respiratory syndrome. BMC Infectious Diseases, 6: 82-8.

Clark, M. F. and Baudouin, S. V. A. 2006. Systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. Int Care Med, 32(11): 1706-12.

Corbett, K. S., Flynn, B. and Foulds, K. E. 2020. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. N Engl J Med, 383: 1544-9.

Crayne, C. B., Albeituni, S., Nichols, K. E. and Cron, R. Q. 2019. The immunology of macrophage activation syndrome. Front Immunol, 10: 119-26.

Cui, J., Li, F. and Shi, Z. L. 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat Rev Microbiol, 17: 181–92.

Day, W. C., Baric, R. and Cai, X. S. 2009. A new Mouse-Adapted Strain of SARS-CoV as a Lethal Model for Evaluating Antiviral Agents in Vitro And in Vivo. Virology, 395: 210–222.

Del Valle, D. M., Kim-Schulze, S., Huang, H. H., Beckmann, N. D., Nirenberg, S., Wang, B., Lavin, Y., Swartz, T. H., Madduri, D. and Stock, A. 2020. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. Nat. Med., 26: 1636–1643.

Deng, W., Bao, L. and Liu, J. 2020. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. Science, 369: 818-24.

Deverman, B. E. and Patterson, P. H. 2009. Cytokines and CNS Development. Neuron, 64(1): 61-78.

Di Lernia, V. 2020. Antipsoriatic treatments during COVID-19 outbreak. Dermatologic therapy, 16: 89-96.

Duret, P. M., Spielmann, L. and Messer, L. 2020. Rheumatic diseases and COVID-19: a cohort of 17 patients under DMARDs. Response to:‘Comment on: Recovery from COVID-19 in a patient with spondyloarthritis treated with TNF-alpha inhibitor etanercept. A report on a COVID-19 patient with psoriatic arthritis receiving ustekinumab. Annals of the Rheumatic Diseases, 18: 65-9.

Farin, H. F., Karthaus, W. R., Kujala, P., Rakhshandehroo, M., Schwank, G. and Vries, R. G. 2014. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma. J Exp Med, 211(7): 1393-405.

Fehr, A. R., Channappanavar, R. and Perlman, S. 2017. Middle East respiratory syndrome: emergence of a pathogenic human coronavirus. Annu Rev Med, 68: 387–99.

Fei, Z., Ting, Y., Ronghui, D., Guohui, F., Ying, L. and Zhibo, L. 2020. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet, 395: 1054–62.

Feldmann, M., Maini, R. N. and Woody, J. N. 2020. Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. Lancet, 395: 1407–09.

Feldmann, M., Maini, R. N. and Huang, Y. Z. 2010. Anti-TNF therapy, from rationale to standard of care: what lessons has it taught us?. J. Immunol., 185: 791–794.

Fox, S. E., Akmatbekov, A., Harbert, J. L., Li, G., Brown, J. Q. and Vander Heide, R. S. 2020. Pulmonary and Cardiac Pathology in Covid-19: The First Autopsy Series from New Orleans. MedRxiv, 575: 16-25.

Gao, Q., Bao, L. and Mao, H. 2020. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. Science, 369: 77-85.

Gao, Y., Li, T., Han, M., Li, X., Wu, D. and Xu, Y. 2020. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. J Med Virol, 92: 791–6.

Garnacho-Montero, J., Aldabo-Pallas, T. and Garnacho-Montero, C. 2006. Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. Crit Care, 10(4): 111-120.

Gauthier, J., Turtle, C. J. and Aganna, E. 2018. Insights into cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19-specific CAR-T cell therapy. Curr Res Transl Med, 66: 50–2.

Gong, H., Dong, S. and Xia, Q. 2020. Correlation Analysis Between Disease Severity and Inflammation-related Parameters in Patients with COVID-19 Pneumonia. MedRxiv, e20025643.

Gong, J., Dong, H., Xia, S. Q., Huang, Y. Z., Wang, D., Zhao, Y., Liu, W., Tu, S., Zhang, M., Wang, Q. and Lu, F. 2020. Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19 pneumonia. MedRxiv, e14912020.

Gordon, A. C., Lagan, A. L. and Aganna, E. 2004. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. Genes Immun, 5(8): 631-40.

Hansson, G. K. and Libby, P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a doubleedged sword. Nat Rev Immunol, 6: 508–519.

Hsu, L. Y., Chia, P. Y. and Lim, J. F. 2020. The Novel coronavirus (SARS-CoV-2) epidemic. Ann. Acad. Med. Singap., 49: 1–3.

Huang, C., Wang, Y., Li, X, Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X. and Cheng, Z. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The lancet, 15(39): 497-506.

Husseini, A. A., Kamil, A. A. and Aloudal, M. R. 2021. COVID-19 Disease and Interferon-γ: Has it a Protective Impact on Mortality? Erciyes Med J, 43(2): 116–21.

Jessen, K. M., Lindboe, S. B. and Petersen, A. L. 2007. Common TNF-α, IL-1β, PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. BMC Infect Dis, 18(7): 108-15.

Kak, G., Raza, M. and Tiwari, B. K. 2018. Interferon-gamma (IFN-γ): Exploring its implications in infectious diseases. Biomol Concepts, 9(1): 64–79.

Kampf, G., Todt, S. and Pfaender, E. 2020. Steinmann Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and its inactivation with biocidal agents. J Hosp Infect, 8: 98-103.

Kerekes, G., Szekanecz, Z., Der, H., Sandor, Z. and Lakos, G. 2008. Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. J Rheumatol, 35: 398–406.

Kernan, K. F. and Carcillo, J. A. 2017. Hyperferritinemia and inflammation. Int Immunol, 29(9): 401–9.

Kroeger, K. M., Carville, K. S. and Abraham, L. J. 1997. The -308 tumor necrosis factor-α promoter polymorphism effects transcription. Mol Immunol. 34(5): 391-9.

Kronstad, L. M., Seiler, C., Vergara, R., Holmes, S. P. and Blish, C. A. 2018. Differential Induction of IFN-α and Modulation of CD112 and CD54 Expression Govern the Magnitude of NK Cell IFN-γ Response to Influenza A Viruses. J Immunol, 7: 2117–31.

Kupferschmidt, K. 2020. Study claiming new coronavirus can be transmitted by people without symptoms was flawed Science news.

https://www.science.org/content/article/paper-non-symptomatic-patient-transmitting-coronavirus-wrong. Erişim tarihi: 6 Kasım 2021.

Lagunas-Rangel, F. A. and Chávez-Valencia, V. 2020. High IL-6/IFN-γ ratio could be associated with severe disease in COVID-19 patients. J Med Virol, 554: 32-40.

Lahari, D. K., Steve, B. and Nurenberger, J. J. 1992. A non organic and non enzymatic extraction methods gives high yields of genomic DNA from whole blood samples than do nine other methods tested. J Biochem and Bioph Met, 25: 193-205.

Lai, C., Shih, T., Ko, W., Tang, H. and Hsue, P. R. 2020. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. Int J Antimicrob Agents, 55: e105924.

Law, H. K., Cheung, C. Y., Ng, H. Y., Sia, S. F., Chan, Y. O., Luk, W., Nicholls, J. M., Peiris, J. S. and Lau, Y. L. 2005. Chemokine upregulation in sars-coronavirus–infected, monocyte-derived human dendritic cells. Blood, 106(7): 2366-72.

Leija-Martínezab, J. J., Fengyang, H. B. E., Del-Río, N., Fausto, S. M., Onofre, M. H., Abraham, G. M., Margareth, S. H. M. and Dario, E. V. 2020. IL-17A and TNF-α as potential biomarkers for acute respiratory distress syndrome and mortality in patients with obesity and COVID-19. Med Hyp, 144: 1-6.

Li, Q., X. Guan, P., Wu, X., Wang, L. and Zhou, Y. 2020. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. N Engl J Med, 382(13): 1199-1207.

Liang, S., Domon, H., Hosur, K. B., Wang, M. and Hajishengallis, G. 2009. Age-related alterations in innate immune receptor expression and ability of macrophages to respond to pathogen challenge in vitro. Mech Ageing Dev, 130(8): 538-46.

Lipsitch, M., Donnelly, C. A., Fraser, C., Blake, I. M., Cori, A., Dorigatti, I., Ferguson, N. M., Garske, T., Mills, H. L. and Riley, S. 2015. Potential biases in estimating absolute and relative case-fatality risks during outbreaks. PLoS Negl. Trop. Dis., 9: 72-77.

Lipsitch, M., Swerdlow, D. L. and Finelli, L. 2020. Defining the epidemiology of covid-19–Studies needed. N. Engl. J. Med., 382: 1194–1196.

Liu, J., Li, S., Liu, J., Liang, B., Wang, X. and Wang, H. 2020. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. EBioMedicine, 55: e102763.

MacEwan, D. J. 2002. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. Cell Signal, 14: 477–492.

Mahida, Y. R., Ceska, F., Effenberger, L., Kurlak, I., Lindley, C. J. and Hawkey, M. 1992. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. Clin. Sci., 82: 273–275.

Maradit-Kremers, H., Crowson, C. S., Nicola, P. J., Ballman, K. V. and Roger, V. L. 2005. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. Arthritis Rheum, 52: 402–411.

Mercado, N. B., Zahn, R. and Wegmann, F. 2020. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. Nature, 586: 583-8.

Mira, J. P., Cariou, A. and Grall, F. 1999. Association of TNF2, a TNFalpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. JAMA, 282(6): 561-8.

Molony, R. D., Nguyen, J. T., Kong, Y., Montgomery, R. R., Shaw, A. C. and Iwasaki, A. 2017. Aging impairs both primary and secondary RIG-I signaling for interferon induction in human monocytes. Sci Signal, 10: 509-13.

Nagata, N., Iwata, N. and Hasegawa, H. 2008. Mouse-Passaged Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Leads to Lethal Pulmonary Edema and Diffuse Alveolar Damage in Adult But Not Young Mice. Am J Pathol, 172: 1625–1637.

Nanki, T. K., Takada, Y., Komano, T., Morio, H., Kanegane, A., Nakajima, P. E., Lipsky, N. and Miyasaka, H. 2009. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, Arthritis Res Ther, 11: 149-56.

Paskulin, D. D. Á., Fallavena, P. R., Paludo, F. J., Borges, T. J., Picanço, J. B., Dias, F. S. and Alho, C. S. 2011. TNF-308G > A promoter polymorphism (rs1800629) and outcome from critical illness. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 15: 231-238.

Peck, K. M., Burch, C. L., Heise, M. T. and Baric, R. S. 2015. Coronavirus host range expansion and middle east respiratory syndrome coronavirus emergence: biochemical mechanisms and evolutionary perspectives. Annu Rev Virol, 2: 95–117.

Pedersen, S. F. and Ho, Y. C. 2020. SARS-CoV-2: a storm is raging. J Clin Invest, 130(5): 2202–2205.

Pierce, C. A., Sy, S., Galen, B., Goldstein, D. Y., Orner, E. and Keller, M. J. 2021. Natural mucosal barriers and COVID-19 in children. medRxiv, e4545921.

Reid, C. L., Perrey, C. and Pravica, V. 2002. Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. Crit Care Med, 30(10): 2216-21.

Roach, D. R., Bean, C., Demangel, M. P., France, H., Briscoe, W. J. and Britton, A. G. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. J. Immunol, 168: 4620–4627.

Robinson, P. C., Richards, D., Tanner, H. L. and Feldmann, M. 2020. Accumulating evidence suggests anti-TNF therapy needs to be given trial priority in COVID-19 treatment. The Lancet Rheumatology, 2(11): 653-655.

Rothe, C., Schunk, P., Sothmann, G., Bretzel, G., Froeschl, C. and Wallrauch, M. 2020. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. N Engl J Med, 33: 45-54.

Ruan, Q., Yang, K., Wang, W., Jiang, L. and Song, J. 2020. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. Intensive Care Med, 46: 846–8.

Schroecksnadel, K., Frick, B., Winkler, C. and Fuchs, D. 2006. Crucial role of interferon-gamma and stimulated macrophages in cardiovascular disease. Curr Vasc Pharmacol, 4: 205–213.

Sharma, M., Sharma, S., Roy, S., Varma, S. and Bose, M. 2007. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to Mycobacterium tuberculosis infection. Immunol Cell Biol, 85(3): 229-37.

Shieh, J. M., Tseng, H. Y., Jung, F., Yang, S. H. and Lin, J. C. 2019. Elevation of IL-6 and IL-33 levels in serum associated with lung fibrosis and skeletal muscle wasting in a bleomycin-induced lung injury mouse model. Mediators of inflammation, 71: 9-15.

Shimizu, M. 2019. Clinical features of cytokine storm syndrome. In: Cron R, Behrens E editors. Cytokine Storm Syndrome. Cham: Springer pp. 31–42.

Shoenfeld, Y. 2020. Corona (COVID-19) time musings: our involvement in COVID-19 pathogenesis, diagnosis, treatment and vaccine planning. Autoimmun Rev, 27: e102538.

Siddiqi, H. K. and Mehra, M. R. 2020. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. J Heart Lung Transplant, 39(5): 405–7.

Song, G., He, W. T., Callaghan, S., Anzanello, F., Huang, D. and Ricketts J. 2020. Crossreactive serum and memory B cell responses to spike protein in SARS-CoV-2 and endemic coronavirus infection. bioRxiv, e712089.

Stüber, F., Petersen, M., Bokelmann, F. and Schade, U. 1996. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-a concentrations and outcome of patients with severe sepsis. Crit Care Med, 24(3): 381-4.

Su, S, Wong, G. and Shi, W. 2016. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. Trends Microbiol, 24: 490–502.

Sun, D., Li, H., Lu, X. X., Xiao, H., Ren, J. and Zhang, F. R. 2020. Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: a single center's observational study. World J Pediatr, 16(3): 251–9.

Tang, G. J, Huang, S. L. and Yien, H. W. 2000. Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection. Crit Care Med, 28(8): 2733-6.

Tao, L., Jieying, Z., Yuhui, Y., Hong, M., Zhengyu, L. and Jiaoyu, Z. 2019. The potential role of IL-6 in monitoring severe case of coronavirus disease. medRxiv, e20029769.

Thompson, M., Kaminski, J., Kurt-Jones, E. and Fitzgerald K. 2011. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. Viruses, 3: 920–40.

van Doremalen, N., Lambe T. and Spencer A. 2020. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. Nature, 586: 578-84.

Wang, H., Luo, S., Shen, Y., Li, M., Zhang, Z. and Dong, Y. 2020. Multiple enzyme release, inflammation storm and hypercoagulability are prominent indicators for disease progression in COVID-19: a multi-centered, correlation study with CT imaging score. SSRN Electron J, https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3544837. Erişim tarihi: 9 Temmuz 2021.

Wang, K. W., Chen, Y. S. and Liu, J. I. 2004. Temporal relationship of viral load, ribavirin, interleukin (IL)-6, IL-8, and clinical progression in patients with severe acute respiratory syndrome. Clin. Infect. Dis., 39: 1071-1075.

Wang, W., Tang, J. and Wei, F. 2020. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus 2019-nCoV) in Wuhan, China. J Med Virol., 92: 441–7.

Wessling-Resnick, M. 2018. Crossing the iron gate: why and how transferrin receptors mediate viral entry. Annu Rev Nutr, 38: 431–58.

Wilson, A. G., Symons, J. A. and McDowell, T. L. 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor-α promoter on transcriptional activation. Immunol, 94: 3195-9.

WMHC. 2020. Wuhan Municipal Health and Health Commission's Briefing on the Current Pneumonia Epidemic Situation in Our City. http://wjw.wuhan.gov.cn/front/web/showDetail/2019123108989. Erişim tarihi: 15 Ağustos 2021.

Woldemeskel, B. A., Kwaa, A. K., Garliss, C. C., Laeyendecker, O., Ray, S. C. and Blankson, J. N. 2020. Healthy donor T-cell responses to common cold coronaviruses and SARS-CoV-2. J Clin Invest, 130(12): 6631–8.

Wong, C. K., Lam, C. W., Wu, A. K., Ip, W. K., Lee, N. L., Chan, I. H., Lit, L. C., Hui, D. S., Chan, M. H., Chung, S. S. and Sung, J. J. 2004. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. Clinical & Experimental Immunology, 136(1): 95-103.

World Health Organization, WHO. 2020. Novel Coronavirus 2019-nCoV), Situation Report 1. 21 January 2020. Available online: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019- ncov.pdf. Erişim tarihi: 30 Kasım 2021.

Xia, C., Liu, Y., Chen, Z. and Zheng, M. 2015. Involvement of Interleukin 6 in Hepatitis B Viral Infection. Cell Physiol Biochem, 37(2): 677–86.

Xu, X., Han, M., Li, T., Sun, W., Wang, D., Fu, B., Zhou, Y., Zheng, X., Yang, Y. and Li, X. 2020. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. Proceedings of the National Academy of Sciences, 19(11720): 109-111.

Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda, M. and Yokochi, S. 2008. Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated

coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. J Immunol, 181(9): 6337–48.

Yu, J., Tostanoski, L. H. and Peter, L. 2020. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. Science, 369: 806-11.

Zhang, Y., Li, B. Ning, D. and Trabattoni, B. 2020. The Comparative Immunological Characteristics of SARS-CoV Coronavirus Infect., 11: 10-20.

Zhou, F., Yu, T. and Du, R. 2020. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet, 395: 1054-1062.

Zhou, J., Li, C., Zhao, G., Chu, H., Wang, D., Yan, H. H., Poon, V. K., Wen, L., Wong, B. H., Zhao, X. and Chiu, M. C. 2017. Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. Science advances, 3(11): eaao4966.

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B. and Song, J. 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med, 44: 90-6.

Zídek, Z., Anzenbacher, P. and Kmonickoval, E. 2009. Current status and challenges of cytokine pharmacology. Br J Pharmacol, 157(3): 342-361.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mustafa Rawan Abdulraheem ABDULRAHEEM

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Osol Al-Deen Üniversitesi Tıp Fakültesi Patolojik Analiz Bölümü	2012-2017

e-mail: mekorawan@gmail.com
tel: 00964 7702952422