ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAK'TA SARS-COV-2'NİN MOLEKÜLER VE İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Taisir Ali Yasir ALBOHWALA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Taisir Ali Yasir ALBOHWALA tarafından hazırlanan **"Irak'ta SARS-COV-2'nin Moleküler ve İmmünolojik Özelliklerinin Belirlenmesi"** adlı tez çalışması 17/04/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Amran Mezher LAWAS

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Fiziki Coğrafya Anabilim Dalı
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Irak'ta SARS-COV-2'nin Moleküler ve İmmünolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**" 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 (17/04/2023).

Taisir Ali Yasir ALBOHWALA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAK'TA SARS-COV-2'NİN MOLEKÜLER VE İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Taisir Ali Yasir ALBOHWALA

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Amran Mezher LAWAS

Hızla yayılan solunum yolu virüslerinden biri olan ve akut solunum sendromuna neden olan koronavirüs, tüm dünyada etkili olmuştur. Bu durum, hastalığın ciddiyetini en aza indirmek ve hastanın iyileşmesini hızlandırmak için çok sayıda aşı ve ilacın hızla geliştirilmesine neden olmuştur. Çalışmamızda, interlökin-12 ve anjiyotensin dönüştürücü enzim-2'nin COVID-19'daki genetik değişkenliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yaşları 15 ile 80 arasında değişen 100 COVID-19 hastasından kan örneği alınmıştır. Alınan örneklerde IL-12 ve ACE-2'nin kan düzeylerini değerlendirmek için immünolojik ve genetik araştırmalar yapılmıştır. Daha sonra elde edilen verilerin istatsitiksel olarak anlamlarını belirlemek için T-testi yapılmıştır. Şiddetli ve şiddetli olmayan hasta bireyler arasında serum IL-12 düzeylerinde ve ACE-2 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

2023, 54 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Moleküler, İmmünoloji, SARS-COV-2

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR AND IMMUNOLOGICAL STUDY OF SARS-COV-2 IN IRAQ

Taisir Ali Yasir ALBOHWALA

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Amran Mezher LAWAS

The coronavirus, which is one of the rapidly spreading respiratory viruses and causes acute respiratory syndrome, has been effective all over the world. This has led to the rapid development of a large number of vaccines and drugs to minimize the severity of the disease and speed up the patient's recovery. In our study, it was aimed to determine the genetic variability of interleukin-12 and angiotensin converting enzyme-2 in COVID-19. For this purpose, blood samples were taken from 100 COVID-19 patients aged between 15 and 80 years. Immunological and genetic studies were performed to evaluate the blood levels of IL-12 and ACE-2 in the samples taken. Then, T-test was performed to determine the statistical meaning of the obtained data. A statistically significant difference was found in serum IL-12 levels and ACE-2 levels between severely and non-severely ill individuals.

2023, 54 pages

Keywords: Molecular, Immunological, SARS-COV-2

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN'a sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Taisir Ali Yasir ALBOHWALA
Çankırı, Mayıs 2023

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 Hastalığı **3**
2.2 Koronavirüsler **4**
2.2.1 Koronavirüs sınıflandırması **4**
2.2.2 SARS-COV-19 varyantları **4**
2.2.3 Koronavirüslerin morfolojik özellikleri **5**
2.2.4 Koronavirüsün genomik yapısı **6**
2.3 Patogenez **7**
2.3.1 COVID-19 iletimi **7**
2.3.2 COVID-19'un reseptöre bağlanması **8**
2.3.3 COVID-19'un neden olduğu üst solunum yolu enfeksiyonu **8**
2.3.4 COVID-19'un neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonu **9**
2.3.5 Endotel hücreli SARS-COV-2 enfeksiyonları ve etkileri **9**
2.4 COVID-19'un Patogenezle İlgili Faktörleri **10**
2.5 İnsanlarda COVID-19'un İmmünolojik Yanıtı **11**
2.5.1 ACE-2'nin vücuttaki işlevi **14**
2.5.2 Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE-2) reseptörü **15**
2.5.3 Temel biyokimya ve ACE-2 geni **17**
2.5.4 İnterlökin 12 (IL-12) sitokinleri **19**
2.5.5 TH1 farklılaşması ve IL-12 ..... **20**
2.5.6 IL-12 ve COVID-19 arasındaki ilişki **21**

2.5.7 IL-12 gen polimorfizmi **21**
3. MATERYAL VE METOT **23**
3.1 Materyal **23**
3.1.1 Laboratuvar malzemeleri ve cihazlar **23**
3.1.2 Kitler, biyolojik ve kimyasal malzemeler **23**
3.2 Yöntem **24**
3.2.1 Hastalar **24**
3.2.2 Örnek toplama **24**
3.2.3 Genetik araştırma **24**
3.2.4 İmmünolojik araştırma **28**
3.3 İstatistiksel Analiz **29**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **30**
4.1 Hastaların Klinik Özellikleri **30**
4.1.1 Katılımcıların demografisi **30**
4.2 İmmünolojik Çalışmalar **33**
4.2.1 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalarında interlökin-12 (IL-12) serum seviyesi **33**
4.2.2 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalarında kan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE-2) seviyesi **34**
4.3 İmmünolojik Parametreler Arasındaki İlişki **36**
4.4 Genetik Araştırmalar **37**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **39**
KAYNAKLAR **40**
ÖZGEÇMİŞ **54**

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
±	Artı, eksi
µL	Mikrolitre
℃	Derece santigrat
cm	Santimetre
L	Litre
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

ACE-2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
RNA	Ribonükleik asid
SARS-COV	Akut solunum sendromu koronavirüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İnsan koronavirüs yapısı (Das 2020) 6
Şekil 2.2 Bağışıklık sisteminin koronavirüs enfeksiyonuna karşı tepkileri (Hosseini *et al.* 2020) 13
Şekil 2.3 SARS-COV-2 enfeksiyonunun patogenezinde yer alan sitokinler (Olbei *et al.* 2021) 14
Şekil 2.4 ACE-2'nin koronavirüs enfeksiyonuna inflamatuar yanıttaki rolü (Zhou *et al.* 2020) 16
Şekil 2.5 ACE-2 ekspresyonunun gövdesindeki anahtar alanlarının bir şemasını gösterir, B: Ek olarak ACE-2 özgüllüğünü (Rice *et al.* 2004) 18
Şekil 2.6 IL-12 sitokin ailesi ve reseptörleri 20
Şekil 4.1 ACE-2 amplikonunun (500bp) agaroz jel elektroforezi 37
Şekil 4.2 IL-12A amplikonunun (650 bp) agaroz jel elektroforezi 38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Laboratuvar malzemeleri ve cihazlar 23
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kitler, biyolojik ve kimyasal malzemeler 23
Çizelge 4.1 COVID-19 hastalarında cinsiyet dağılımı 30
Çizelge 4.2 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19'lu hastalarda IL-12 düzeyleri 33
Çizelge 4.3 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19'lu hastalarda ACE-2 düzeyleri 34
Çizelge 4.4 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalarında cinsiyete göre ACE-2 ve IL-12 düzeylerinin karşılaştırılması 36
Çizelge 4.5 COVID-19 hastalarında ACE-2 ve IL-12 arasındaki ilişkiler 37
Çizelge 4.6 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalarında IL-12A rs1460141649 genotiplerinin ve alellerinin dağılımları 38

1. GİRİŞ

Ülkemiz ve tüm dünyada etkili olan COVID-19 nedeniyle, ekonomik ve ticari hareket yavaşlaması, yüz yüze eğitimin sona ermesi ve çevrimiçi eğitimin büyümesi nedeniyle endişe duyulmaktadır. Bu virüsün ölüm oranı %2 olup, tüm dünyada milyonlarca insanı etkilemiştir (Wang *et al.* 2020).

İnsan bağışıklık sistemi üzerine yapılan araştırmalar, özellikle spesifik immünolojik reseptörlerin ve sitokinlerin koronavirüsle mücadelede oynadığı katkıyı ortaya çıkarmıştır. COVID-19'un patofizyolojisini daha iyi anlamak için yapılan çok sayıda araştırmada immünolojik değişkenlerin hastalığın başlangıcı, süresi ve şiddetini önemli ölçüde etkilediği göstermiştir (Rabaan *et al.* 2021).

Virüsün hücrelere iki farklı yoldan girdiği düşünülmektedir: İki tür virüs vardır: genetik materyallerinin viriondan konakçı hücreye salınması için belirli bir pH'ya ihtiyaç duyanlar ve bunu konakçı hücrenin pH'sından bağımsız olarak yapabilenler. İkinci aşama olan endositoz, virüs bölünme bölgesinde ACE-2 reseptörüne bağlandığında devreye girer (Bayati *et al.* 2021). Şiddetli akut solunum yolu koronavirüsü ile insan enfeksiyonu, ACE-2 reseptörünün bağlandığı spika glikoprotein ligandları tarafından kolaylaştırılır (Li *et al.* 2003).

ACE-2 reseptörleri, insan konakçı hücrelerinin zarlarında bulunabilir. Her organda bulunan miktar farklı olabilir. SARS-COV virüsü öncelikle alveoler hücreleri enfekte ettiğinden, ACE-2 ekspresyonunun bu hücrelerde yüksek, ancak burun boşluğu, ağız boşluğu ve göz kapaklarını kaplayanlarda düşük olması olağan bir durumdur. Virüs hem pH'ya bağımlı hem de pH'dan bağımsız olan hücrelere girdiğinden konak hücre ve virion zarları, genetik materyal iletimi için pH'ya bağlı mekanizmalarla kaynaşmaz. Virüs, ACE-2 reseptörünün bölünme bölgesine bağlandığında son adım olan endositoz yolunu tetikler (Zou *et al.* 2020).

Yeni koronavirüse karşı bağışıklık reaksiyonları sırasında yüksek miktarlarda proinflamatuar sitokinler görev yapmaktadır (Prompetchara *et al.* 2020). Her iki durum da solunum sıkıntısı sendromu, ciddi akciğer hasarı ve akciğer iltihabı ile karakterize edilir (Harcourt *et al.* 2020). Ayrıca makrofaj aktivasyon sendromuna ve immünolojik düzensizliğe de sebep olurlar (Prompetchara *et al.* 2020).

SARS-COV-2, T ve B hücrelerini inflamatuar sitokinler üretmeleri için uyararak yalnızca doğuştan gelen bağışıklık sistemini değil, aynı zamanda adaptif bağışıklık sistemini de etkiler (Crisci *et al.* 2020). Araştırmacılar, kritik derecede hasta olan kişilerden alınan plazmayı hafif derecede hasta olan kişilerin plazmasıyla karşılaştırarak, yoğun bakım ünitesi grubunun daha yüksek İnterlökin-12 (IL-12) konsantrasyonlarına sahip olduğunu bulmuşlardır (Yang *et al.* 2020).

IL-12, tip 1 adaptif hücre aracılı savunmanın ana düzenleyicisidir. Patojenlere ve kötü huylu tümörlere karşı korunmak için bu sistem şarttır. Bu durum, iyileştirilmiş klinik sonuçları birbirine bağlayan ve IL-12 bazlı tedavi yöntemleri inceleyen klinik araştırmalar tarafından desteklenmektedir (Leoni *et al.* 2018, Fu *et al.* 2020). Sitokin IL-12, IL-12p40 ve IL-12p35 olarak adlandırılan iki disülfit bağlantılı alt birim içerir. IL-12, çeşitli biyolojik aktivitelere katılır (Hildenbrand *et al.* 2022). Artan sayıda sitokin, İnterferon, TNF ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörler gibi maddelerin üretimi, CD8+ T yardımcı (CTL) ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin üretilmesine ve uyarılmasına yardımcı olur (Cox *et al.* 2021). IL-12, Th1 hücre aracılı bağışıklığın uyarılması için gereklidir (Suzuki and Hayashida 2021).

Bu çalışmada orta şiddetli ve şiddetli COVID-19 vakaları karşılaştırılarak anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE-2) ve interlökin-12'nin (IL-12) immünolojik ve genetik çeşitliliğini belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, ACE-2 geninin polimorfizmi, IL-12A ve IL-12B gen polimorfizminin karşılaştırılması, serum ACE-2 ve IL-12 konsantrasyonlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 COVID-19 Hastalığı

İnvaziv bir şiddetli solunum durumu olan yüksek derecede patojenik bozukluk, yeni bir koronavirüs tarafından ortaya çıkmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 31 Aralık 2019'da yaptığı açıklamaya göre, Çin'in Hubei Bölgesi, Middletown Şehrinde mikrobiyolojik etiyolojisi bilinmeyen doğrulanmış pnömoni vakaları belirlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, bu kişilerin bazılarından klinik örnekler alınarak yeni bir grip virüsü türü keşfedildi. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), pandemiyi ilk olarak 30 Ocak 2020'de küresel bir sağlık acil durumu olarak ilan etti ve daha sonra dünya çapında hızla yayılması ve kötüleşmesi nedeniyle 11 Mart 2020'de bir salgın olarak ilan etti. Ardından hastalar SARS salgınına benzer semptomlar sergilemeye başladı ve COVID-19 koronavirüs suşunun birincil neden olduğu bulundu.

Uluslararası Viral Taksonomi Konseyi (ICTV), resmi olarak 11 Şubat 2020'de adını R-COV-2 olarak değiştirdi (Din and Boppana 2020). Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-COV) ve MERS sendromu koronavirüsü (MERS-COV), yirmi birinci yüzyılda insanlarda ortaya çıkan üç birincil solunum virüsünden ikisidir. SARS-COV ortadan kayboldu ve yeniden ortaya çıkmadı ve MERS-COV ise insanlar arasındaki zayıf bulaşması nedeniyle tür sınırını hiçbir zaman tam olarak aşamadı (Ksiazek *et al.* 2003, Ramadan and Shaib 2019).

Bununla birlikte, virüsün bulaşması, hızlı yayılması ve önemli ölçüde ölüm oranlarına sahip olması insanlarda etkili olan COVID-19'un ortaya çıkmasına neden olmuştur. Morens *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada, hastalığın hızlı yayılmasına neden olan asemptomatik hastaların olduğunu ve tüm dünyada sağlık sistemlerini altüst eden ve sosyal mesafe yasalarının uygulanmasına neden olan bir salgın olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Bu virüsler çeşitli risk faktörü kategorileri, taşıyıcılar ve özel terapötiklerin azlığı (Yuki *et al.* 2020), yüksek prevalansları ve geniş yayılmaları, genetik çeşitlilikleri, sporadik genom rekombinasyonları ve insan-hayvan etkileşimini içerdiği gözlemlenen faaliyetlerdeki artış nedeniyle insanlarda da ortaya çıkmaktadır (Cui *et al.* 2019).

2.2 Koronavirüsler

2.2.1 Koronavirüs sınıflandırması

Nidovirales alemi, koronavirüsler olarak bilinen virüsleri içeren *Coronaviridae* ve *Orthocoronavirinae* ailelerini içerir. COV'lar için genom boyutları 26 ile 32 kb arasında değişir ve bu da onları tüm RNA virüslerinin en büyüğü yapar (Lu *et al.* 2020, Shchelkanov *et al.* 2020).

2.2.2 SARS-COV-19 varyantları

1. Alfa varyantı: Eylül 2020'de Güney Doğu İngiltere'nin Kent şehrinde keşfedilmiştir (VOC-20DEC-01; B.1.1.7 soy). Bazı verilere göre virüsün bu varyasyonu, vahşi tip virüsten daha bulaşıcıdır. 3 Ağustos 2021 itibariyle, varyasyona sahip olmayan temaslıların evlerinde kaydedilen ikincil bulaşma oranı %10,2 olarak tespit edilmiştir (Meyer *et al.* 2021, Nyberg *et al.* 2021).

2. Beta varyantı: Ekim 2020'de Güney Afrika, Nelson Mandela Körfezi'nde ilk defa tespit edilmiştir (VOC-20DEC-02; B.1.351 soy). Bu varyant, alfa tipi gibi, spika proteininde mutasyonlara sahiptir. N501Y mutasyonu hem Birleşik Krallık'ta hem de Güney Afrika'da tanımlanmıştır, ancak dizi analizi, bunun her iki ülkede de bağımsız olarak ortaya çıktığını göstermektedir. Beta çeşidinin Alpha varyantından daha az bulaşıcı olduğu düşünülmektedir. Bu varyantın daha ciddi hastalıkla sonuçlanıp sonuçlanmadığına dair sınırlı yayınlanmış bilgi bulunmaktadır (Priesemann *et al.* 2021).

3. Gamma varyantı: Bu varyantın atalarının Japon B.1.1.28 soyundan geldiği Brezilyada tespit edildiği belirtilmiştir (VOC-21JAN-02; P.1 soyu). Bu varyasyonun, modelleme ve laboratuvar bulgularına dayalı olarak bir miktar bağışıklık kaçışına, daha fazla bulaşabilirliliğe veya her ikisine birden sahip olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, bu etkilerin ne kadar büyük ve klinik olarak ne kadar önemli olduğu hala bilinmemektedir (Priesemann *et al.* 2021).

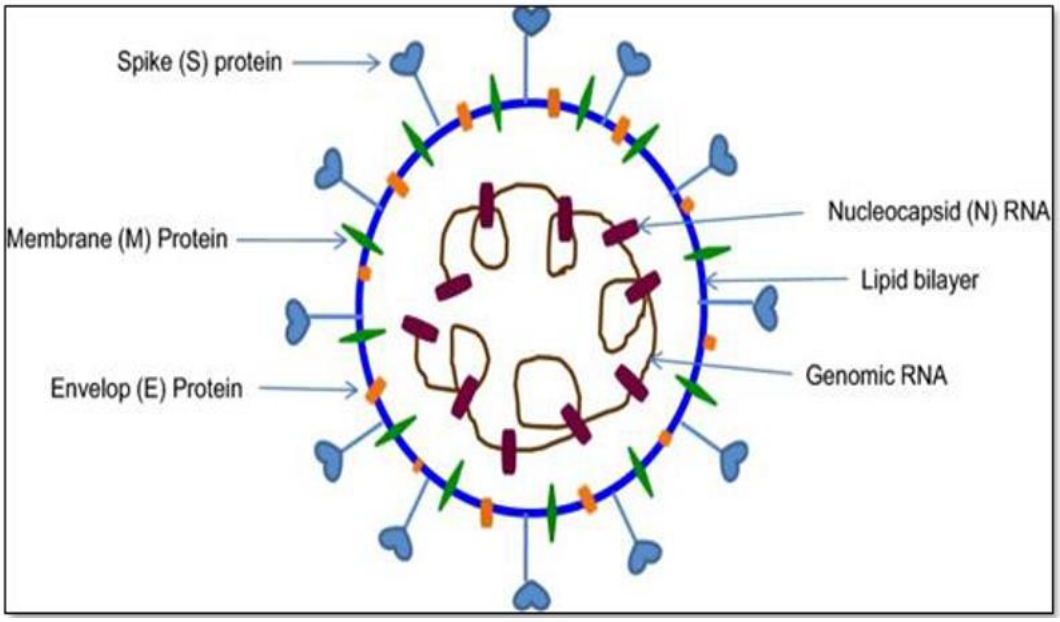
4. Delta varyantı: ilk olarak Nisan 2021'de Hindistan'da keşfedilmiştir (VOC-21APR-02; B.1.617.2). Çok sayıda ülkede kaydedilmiştir ve şu anda Birleşik Krallık'ta en yaygın türdür. K417N mutasyonu, Delta formunda çok nadir görülür ve popülasyonun yalnızca küçük bir yüzdesini etkiler (AY.1 soyu). İlk veriler, bu varyantın Alfa formundan daha bulaşıcı olduğunu göstermektedir. Vaka olarak aynı evde yaşayan ancak onlarla seyahat etmeyenlerde (3 Ağustos 2021 itibariyle) ikincil atak riski %10,8 olarak bulunmaktadır (Priesemann *et al.* 2021, Twohig *et al.* 2022).

5. Omicron varyantı: Kasım 2021'de ilk keşfedildiğinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) onu uçucu organik bileşik (VOC) olarak sınıflandırdı ve hızla dünyayı dolaştı. Omicron varyantının spika proteininin ana haplotipinde, onu bildirilen diğer SARS-COV-2 izolatlarından ayıran 37 değişiklik belirlenmiştir. Bu bulgular, Omicron'un hastalıklar ve aşılar tarafından tetiklenen immünolojik tepkilerden kaçabilme olasılığını artırmaktadır. Enfeksiyon veya aşılamadan sonra reseptör bağlanma alanında (RBD) değişiklikler birikme eğilimindedir, bu nedenle bu antikorlar virüsü nötralize etmede bu kadar etkilidir (Greaney *et al.* 2021). Konak reseptörü ACE-2'nin RBD alt alanı ile etkileşime giren RBM, bu değişikliklerin dokuzuna maruz kalmaktadır (Walls *et al.* 2020).

2.2.3 Koronavirüslerin morfolojik özellikleri

Viryonlar genellikle yuvarlaktır. COV'lar, virüsün yüzeyinden çıkıntı yapan virion yüzeyindeki sivri uçlar nedeniyle tanınabilir taç formuna sahiptir. Yaprak şeklindedirler ve distal ucunda ampullere benzeyen özelliklere sahiptirler (Payne 2017). Virüsün zara bağlı üç proteini, S (başak), M (zar) ve E (zarf) ile dördüncü bir N (nükleokapsid) proteini vardır.

S proteininin viral zarftan uzandığı ve viriona kendine özgü formunu verdiği için virüs bağlanması ve füzyonu için çok önemli olduğu düşünülmektedir (Evangelin *et al.* 2020). Baskınlığı, zarfla yakın ilişkisi ve hidrofobik bölgelerin ve glikosile edilmiş dış alanların varlığı nedeniyle M proteini, zar eğriliğini desteklemek için gereklidir (Yao *et al.* 2020). Bir viroporin olan E proteini, hücre altı bölmelerdeki elektrokimyasal dengeyi etkileyen iyon kanalları oluşturmak için zarlarda birleşir (Sarkar and Saha 2020). Genomik RNA, daha sonra onu uzun, esnek bir nükleokapsid zarf içinde kaplayan protein N tarafından bağlanabilir. Enfekte hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve virüsün toplanmasına ve tomurcuklanmasına katılır. Ayrıca RN üretimi için gerekli bir protein olan replikasyon transkripsiyon faktörü ile lokalize olabilir ve konak translasyon durmasını ve hücre döngüsünü duraklatmayı artırarak hücre döngüsünü kontrol etme gibi ek sorumlulukları da yerine getirir (Zeng *et al.* 2020) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 İnsan koronavirüs yapısı (Das 2020)

2.2.4 Koronavirüsün genomik yapısı

Genom, 30 kb büyüklüğünde ve 20 farklı proteini kodlayan, polisistronik, pozitif-duyulu, tek sarmallı bir RNA'dan oluşur. İki poliprotein (pp), genomun 5' ucunda yer alan iki açık okuma çerçevesi (ORF) tarafından kodlanır; bunlar pp1a ve pp1ab'dir. ORF1b bölgesinin

kopyalanmasına izin veren pp1ab'nin oluşturulması için ribozomal çerçeve kaydırma gereklidir. Hem viral birincil proteaz (3CLpro) hem de papain benzeri bir proteaz, ORF1a tarafından kodlanır ve her ikisi de ORF1b'yi (PLpro) ayırır. Yapısal olmayan proteinler, viral genomun 3' ucu tarafından kodlanan 16 poliproteini içerir (Guo *et al.* 2020, Chan *et al.* 2020). Mevcut tüm genetik verileri kullanan bir filogenetik ağaç analizi, tüm SARS-COV-2 genomlarının önemli dizi farklılığı sergilediğini ortaya çıkarmıştır.

Yarasa COV sekansının yaklaşık %96,2 sekans kimliğine sahip olması, onu %99'dan fazla benzerlikle en yakın sekans haline getirerek nCOV-2019'un hayvanlardan kaynaklandığı teorisini desteklemektedir (Ceraolo and Giorgi 2020). Farklı ülkelerden (Çin, Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, Kore ve Finlandiya dahil) gelen suşların tüm genomları dizilendiğinde, dizilerin %99,9'unun aynı olduğu ortaya çıkmıştır (Chitranshi *et al.* 2020). Kim *et al.* (2018) tarafından yapılan araştırmaya göre, SARS-COV-2'nin RCOV-2 ve MERS-COV ile sekans özdeşliği %50'ye yaklaşmıştır.

2.3 Patogenez

2.3.1 COVID-19 iletimi

2002–2003'te SARS-COV ve 2019'da SARS-COV-2'nin bulaşması büyük ölçüde solunum damlacıkları ve yakın fiziksel temas yoluyla gerçekleşmiştir (Guo *et al.* 2020). 2002–2003 yıllarında SARS salgını sırasında araştırmacılar SARS-COV'un havadan ve ciltten yayılabileceğini keşfettiler (Olsen *et al.* 2003). Lu *et al.* (2020) tarafından SARS-COV-2'nin hava yoluyla yayılmasına ilişkin çalışmalar yapılmıştır. SARS-COV ve SARS-COV-2, kültürlenebilir koronavirüslerin ağız yoluyla ve sindirim sistemi yoluyla bulaşabileceğini kanıtlamaktadır (Leung *et al.* 2003, Isakbaeva *et al.* 2004). SARS-COV-2 ile enfekte olanlar, taşıyıcının semptomları olmasa veya çok hafif olsa bile başkalarına bulaşabilir (Li *et al.* 2020, Bai *et al.* 2020).

2.3.2 COVID-19'un reseptöre bağlanması

SARS-COV ve SARS-COV-2, enfeksiyonun erken evrelerinde burun, ağız ve konjonktival dokulardaki ACE-2 reseptör bölgelerini kullanmaktadır (Khavandi *et al.* 2020). Eskiden SARS-COV-2 bulaşmasında damlacıkların küçük bir rolü olduğu düşünülüyordu ancak konjonktival dokularda virüs için ACE-2 bağlama bölgeleri bulunmuştur (Khavandi *et al.* 2020, Liu and Sun 2020). COVID-19'a maruz kalan hastaların, KKD giyen sağlık çalışanlarının kullandıklarına benzer gözlük takması önerilmektedir (WHO 2020). Hem SARS-COV hem de SARS-COV-2 koronavirüslerinin ACE-2 reseptörlerine bağlanma şekilleri oldukça farklıdır (Lu *et al.* 2020).

SARS-COV'un akciğerlerde tip 2 makrofajlar ve pnömositler tarafından taşındığı belirlenmiştir (To and Lo 2004, Sims *et al.* 2005). ACE-2 reseptörünü eksprese eden kardiyovasküler ve renal hücreler, pulmoner makrofajlar ve tip 2 pnömositlere ek olarak SARS-COV-2 enfeksiyonuna karşı hassastır (Hoffmann *et al.* 2020, Sims *et al.* 2005, Hickmet *et al.* 2020). SARS-COV'un tip 2'nin spika proteini, her yerde bulunan proprotein konvertaz furin tarafından S1 ve S2 bölgesinde bölünür (Izaguirre 2019) ve bu sayede konakçı hücrelere erişim elde eder (Hoffmann *et al.* 2020, Papa *et al.* 2021).

2.3.3 COVID-19'un neden olduğu üst solunum yolu enfeksiyonu

COVID-19 hastaları genellikle SARS-COV-2'yi önce burun ve boğazdan alırlar ve soğuk algınlığına benzer semptomlar gösterirler (Cummings *et al.* 2020). Bazı kişiler aniden koku alma veya tat alma yeteneklerini kaybeder (Xydakis *et al.* 2020). SARS-COV-2'nin çok hızlı yayılmasının nedeni asemptomatik bireylerin varlığından kaynaklanmaktadır (Bai *et al.* 2020, Li *et al.* 2020). Bununla birlikte SARS-COV-2, ACE-2 reseptörleri aracılığıyla tercihen oral ve nazal geçişlerdeki epitel hücrelere bağlanmaktadır (Hoffman *et al.* 2020, Sungnak *et al.* 2020).

2.3.4 COVID-19'un neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonu

COVID-19 olarak bilinen hastalığın iki aşaması var. Erken aşamada, üst solunum yolu 5 ile 7 gün süreyle enfekte olur. İkinci aşama, hastalığın başlamasından iki hafta sonra ortaya çıkar ve akciğer enfeksiyonu ile belirginleşir (Cummings *et al.* 2020). Ateş ve nefes darlığı bu aşamanın tipik belirtileridir. Sessiz hipoksemini oluşan hem asemptomatik hem de semptomatik bireyler, nabız oksimetresindeki oksijen satürasyonu %90'ın altına düşerse oksijen tedavisi için hastaneye yatırılmalıdır (Wilkerson *et al.* 2020).

Endotel disfonksiyonu ve hiper pıhtılaşma hem yaygın alveoler hasar hem de intravasküler fibrin trombüs ile ilişkilendirilmiştir. Tip II pnömositlerin seçici ölümü, bu kişilerde mortalitenin fizyolojik temeli gibi görünmekte, alveolar boşluklara sıvı dökülmesine ve yetersiz hava değişimine yol açmaktadır (Hanley *et al.* 2020). SARS-COV-2 virüsü, dokuyu enfekte ettiğinde ACE-2 aktivitesini düşürür ve bu da inflamatuar ve hiper pıhtılaşma durumlarının ortaya çıkmasını teşvik eder (Bryce *et al.* 2020). Alveoler ödem, erken enfeksiyonun alveoller üzerindeki etkilerinden biridir. ACE-2 aşağı regüle edildiğinde kallikrein-bradikinin yolu aktive olur ve bu da vasküler geçirgenliği artırır (Li *et al.* 2019). Bunun sonucunda vasküler sistemin artan geçirgenliği pulmoner ödemi daha da kötüleştirir. Bu durum, ACE-2'nin çoğunlukla zarlarda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Çözünür ACE-2'nin SARS-COV-2'yi azalttığı gösterilmiştir, bu da ACE-2'nin COVID-19'un patogenezinde potansiyel bir rol oynadığını düşündürmektedir (Monteil *et al.* 2020).

2.3.5 Endotel hücreli SARS-COV-2 enfeksiyonları ve etkileri

COVID-19'un birincil patojenik mekanizması endotel hücre enfeksiyonudur (Li *et al.* 2019, Bryce *et al.* 2020, Blanco-Melo *et al.* 2020). Bir kişinin tromboz ve kanama riski, virüsler endotel hücrelerini işgal ettiğinde artar (Goeijenbier *et al.* 2012). Tromboembolik hastalık da dahil olmak üzere koagülopati, endotel hücrelerinin SARS-COV-2 enfeksiyonu nedeniyle COVID-19 bireylerinde bulunabilir (Teuwen *et al.* 2020). Şiddetli COVID-19 vakaları olan hastalar da ciddi SARS-COV-2 viremi riski altında olabilir (Li

*et al.*2020). Çoklu organ yetmezliği SARS-COV-2 viremi riskini artırır (Bryce *et al.* 2020). Trombosit aktivasyonu, Coxsackievirus tip 19 (COVID-19) ile enfekte kişilerde tromboza yol açabilir. COVID-19 hastalarından alınan trombositler, SARS-COV-2 nükleokapsid geni N1 için haberci RNA içerir. Bu durum virüsün trombosit genlerinin ekspresyonu ve işlevinde rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, COVID-19 hastalarında daha hızlı trombosit agregasyonu ve daha büyük kollajen ve fibrinojen dağılımı bulunmaktadır (Manne *et al.* 2020).

2.4 COVID-19'un Patogenezle İlgili Faktörleri

Çok sayıda çalışma, hastalığın semptomlarını ve bununla ilişkili komplikasyonları kötüleştirebilecek çok sayıda risk faktörü olduğunu belirlemiştir. COVID-19 çeşitli klinik sonuçlara neden olabilir. Hastanın yaşı bu değişkenlerin başında gelmektedir çünkü araştırmalar 65 yaş altı kişilerde ölüm oranlarının daha düşük olduğunu göstermektedir (Qin *et al.* 2020, Wu *et al.* 2020). Cinsiyet bakımından incelendiğinde erkeklerin hastalığa yakalanma oranının kadınlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, çeşitli bağışıklıkla ilgili faktörler üzerinde etkisi olan erkekler ve kadınlar arasındaki steroid hormonlarındaki farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Ek olarak, X kromozomundaki toll benzeri reseptör 7 (TLR7) gibi birkaç bağışıklık düzenleyici gen, kadınlarda viral yükleri ve iltihaplanmayı azaltmaktadır (Conti and Younes 2020).

Hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık (KVH) gibi önceden var olan morbiditeler, hipoksi, sistemik inflamasyon ve doğrudan kardiyomiyosit hasarından kaynaklanan miyokardiyal hasar ve ayrıca her iki tip 1 tarafından artan sitokin yanıtı ve tip 2 T yardımcı hücreleri ile ilişkisi nedeniyle COVID-19'un gelişme riskini artırır. Ayrıca *diabetes mellitus* (DM) olan bireyler, diyabetik olmayanlara göre daha ciddi zorluklar yaşarlar. Bu durum, ACE-2 yolunun aktivasyonundaki dengesizlikle bağlantılı olabilir bu da inflamatuar reaksiyona ve pankreas beta hücrelerinin bozulmasına neden olabilir (Wang *et al.* 2020). Obezite başka bir risk faktörüdür ve yüksek vücut kitle indeksine (VKİ) sahip olanlar, sitokin fırtınasını yoğunlaştıran kronik enflamasyonları nedeniyle kötü prognoza sahiptir (Yan *et al.* 2021). Bu hastaların akciğer epiteli tehlikede olduğundan, kronik solunum yolu hastalıkları risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. ACE-2 reseptör

seviyeleri, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olanlarda tipik olarak daha yüksektir. Bu, SARS-COV-2'yi yaymanın ve solunum epiteline sızmanın en etkili yoludur (Hasanagic and Serdarevic 2020). Bir diğer önemli konu da viral enfeksiyonlar ve toplum kökenli pnömoni riskindeki artışla ilişkili olduğu iyi bilinen D vitamini eksikliğidir (Marik *et al.* 2020). Bu bulgunun öne sürdüğü mekanizma, D vitamini yoksunluğunun, konakçı hücre istilası için potansiyel adezyon molekülü olduğu düşünülen CD26 ekspresyonunda bir artışa neden olmasıdır (McCartney and Byrne 2020).

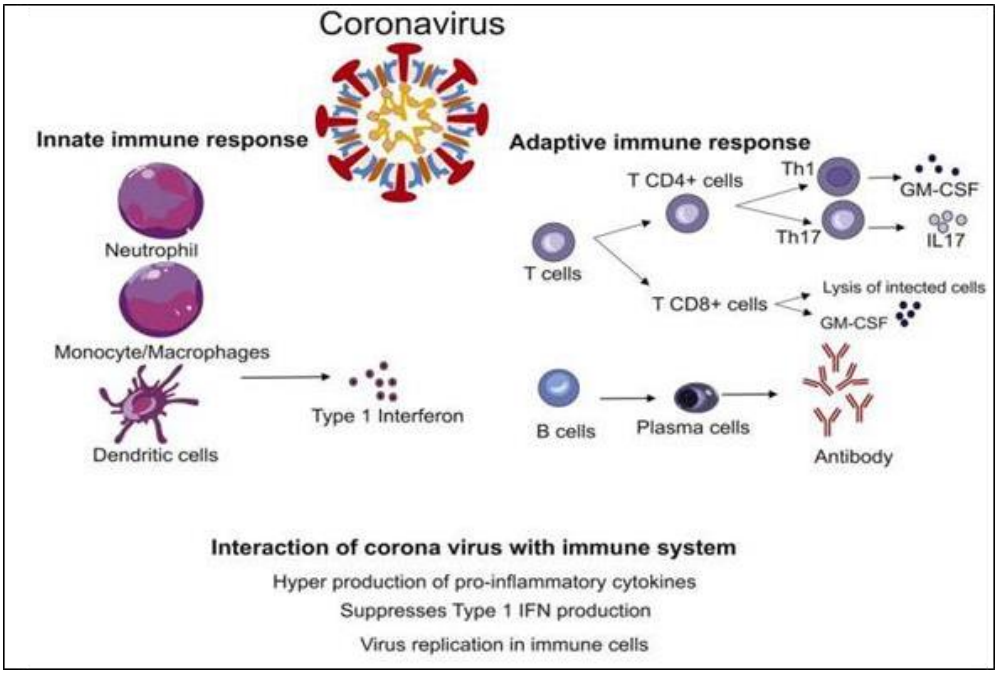
2.5 İnsanlarda COVID-19'un İmmünolojik Yanıtı

COVID-19 doku ve organlarda yaygın hasara bağlanan düzensiz doğuştan ve adaptif bağışıklık tepkilerine neden olabilir (Thierry and Roch 2020).

Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, viral enfeksiyondan sonra vücudun ilk savunma hattıdır ve amacı virüsün tamamen ortadan kaldırılmasıdır. Doğuştan bağışıklığın T-hücresi ve B-hücresi yanıtları, enfeksiyondan yaklaşık yedi gün sonra etkinleştirilene kadar bu yol, bağışıklık yanıtını korur (Lowery *et al.* 2021). Doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin en temel dört türü dendritik hücreler, nötrofiller, makrofajlar ve NK (doğal öldürücü) hücrelerdir (Azkur *et al.* 2020). Vücudun SARS-COV-2 enfeksiyonuna karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin bir parçası olan tip I interferon (IFN-I), COVID-19 hastalarında az eksprese edilebilir (Zanoni 2021). Virüs bulaşmış hücreler, viral replikasyonu engelleyen ve enfekte hücrelerin belirli dokulara yerleşmesini önleyen IFN-I salgılar (Mantlo *et al.* 2020). Son araştırmalar, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin ve ardından gelen adaptif bağışıklık tepkilerinin, enfekte hastaların yaklaşık %80'inde virüsü yok etmede etkili olduğunu ortaya koymuştur. Viral replikasyon sürdürüldüğünde ve inflamatuar hücrelerin toplanmasını hızlandıran inflamatuar yanıtların üretimiyle bağlantılı olduğunda, hastaların geri kalan %20'sinde orta ila şiddetli akciğer hastalığı meydana getirebilir (Khosroshahi *et al.* 2021). İnflamatuvar hücrelerin çoğu, enfekte olmuş alveoler makrofajlar ve hava yolu epitel hücreleri tarafından üretilen sitokinler tarafından çekilebilir. Bu tür sitokinlerin yaygın örnekleri, kemokin olan IL-6, TNF- ve CXCL10'dur (Ni *et al.* 2020).

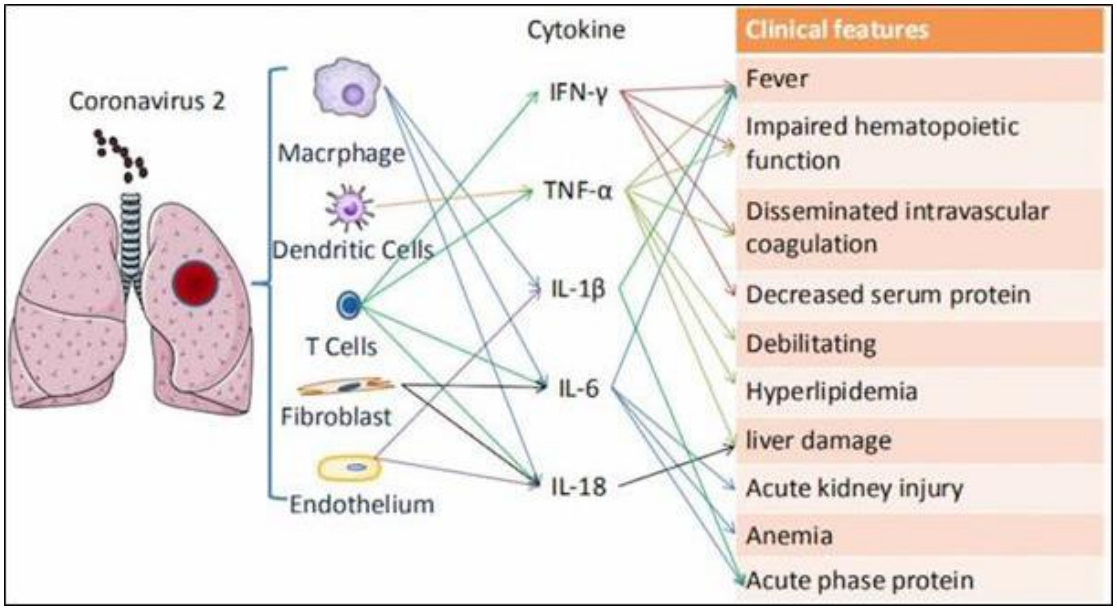
Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), SARS-COV-2 enfeksiyonuna karşı dirence katkıda bulunabilecek ek önemli doğal bağışıklık bileşenleridir (Ghosh and Weinberg 2021). Çeşitli antibakteriyel, antiviral ve antifungal özelliklere sahip düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir (Dijksteel *et al.* 2021). AMP'ler, lipid bakımından zengin zarlara girebilir ve pozitif bir yüke ve hidrofobik ve hidrofilik bir tarafa sahip oldukları için sulu ortamlarda çözünürler (Annunziato and Costantino 2020). Hedef bir mikrobiyal zardan geçtikten sonra, bu peptitler hedef hücreleri çeşitli şekillerde öldürebilir. Katelikidinler ve defensinler, memelilerdeki AMP'lerin iki ana grubudur (Bahar and Ren 2013).

Her iki T-lenfosit tipinin de (T-yardımcı CD4+ ve T-sitotoksik CD8+) adaptif bağışıklık bağlamında COVID-19'un patogenezinde önemli ölçüde rol oynadığı gösterilmiştir (Huang *et al.* 2000). Özellikle ağır vakalarda SARS-COV-2 enfeksiyonu ilerledikçe her iki hücre grubunun da sayıları azaldığını ve işlev bozukluğu sergilediğini göstermektedir (Jacques and Apedaile 2020). Viral replikasyonu düzenleme işlevleri nedeniyle virüse özgü bellek CD8+ T hücrelerinin, bireyleri hastalığın ölümcüllüğünden korumada yardımcı olduğu bilinmektedir (Schulien *et al.* 2021). CD8+ hücrelerine benzer şekilde, CD4+ hücre sayılarının ve bunların R-COV-2 replikasyonunu düzenlemedeki rollerinin azaldığı gösterilmiştir. B hücre popülasyonlarının, CD4+ ve CD8+ hücrelerine ek olarak, ciddi hastalığı olan COVID-19 hastalarında sağlıklı kişilere kıyasla sayılarının da azaldığı görülmüştür (Lian *et al.* 2020). Bu hücrelerin virüse karşı IgG ve IgM antikorları oluşturma yeteneği, virüsün iyileşme veya devam etme yeteneğiyle bağlantılı olan bu sayısal kayba rağmen işlevlerinin korunmasını sağlamaktadır (Sette and Crotty 2021). Koronavirüslerin bağışıklık sistemi ile nasıl etkileşime girdiği Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Bağışıklık sisteminin koronavirüs enfeksiyonuna karşı tepkileri (Hosseini *et al.* 2020)

COVID-19'un immünopatogenezi, R-COV-2'ye karşı aşılamada yukarıda belirtilen hücresel kusurlara ek olarak muhtemelen proinflamatuar sitokinlerden kaynaklanmaktadır (Khosroshahi *et al.* 2021). COVID-19'un yaşadığı şiddetli hastalık ve ani solunum sıkıntısı, bu durumla birlikte meydana gelen proinflamatuar sitokinlerdeki artış nedeniyle sitokin salınım sendromu (bazen sitokin fırtınası olarak adlandırılır) olarak bilinen bir durumla ilişkilendirilmiştir (Pum *et al.* 2021). Bu bağlamdaki önemli sitokinler, Şekil 2.3'te gösterildiği gibi IL-1, IL-6, IL-18, TNF ve IFN'dir (Olbei *et al.* 2021). Buna rağmen IL-6 en yaygın sitokindir ve COVID-19 hastalarında yüksek ciddi hastalık ve ölüm riski ile ilişkilendirilmiştir (Santa Cruz *et al.* 2021). Dendritik hücreler ve makrofajlar, enfeksiyon bölgelerinde istilacı mikropları bulmak için toll benzeri reseptörler kullanır (Ascierto *et al.* 2021).



Şekil 2.3 SARS-COV-2 enfeksiyonunun patogenezinde yer alan sitokinler (Olbei *et al.* 2021)

2.5.1 ACE-2'nin vücuttaki işlevi

Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS) inflamatuar, yara iyileşmesi ve kan basıncıyla ilgili süreçleri kontrol eder (Sriram and Insel 2020) Anjiyotensin II (ANG II), çeşitli doku yaralanmalarına neden olan bir proteindir. Kan basıncı, iltihaplanma ve kan damarı astarlarında hasar, ANG II, ACE-2 tarafından eylemlerine karşı koyan bileşiklere dönüştürülür (Sriram and Insel 2020).

Vücuda oksijen sağlamak için gerekli olan alveoller, ANG II sonucunda iltihaplanabilir ve hatta ölebilir; ACE-2 bu olumsuz sonuçları azaltır (Sriram and Insel 2020). İnsanlarda ACE-2 bulunur, ancak seviyeler insanlar, organlar ve hücreler arasında farklılık gösterir. Diyabet, koroner kalp hastalığı ve hipertansiyonu olan hastalarda yüksek ACE-2 seviyeleri olabilir. yapılan araştırmalarda, ACE-2'den yoksun farelerde kalp, akciğerler ve diğer organlarda ciddi doku hasarları tespit edilmiştir (Sriram and Insel 2020).

2.5.2 Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE-2) reseptörü

ACE-2 adı verilen bir protein, birçok farklı hücre tipinin dış zarlarında bulunur. Anjiyotensinojen daha yönetilebilir proteinlere indirgeyen ve daha sonra hücresel süreçleri kontrol eden bir enzimdir (Sriram and Insel 2020).

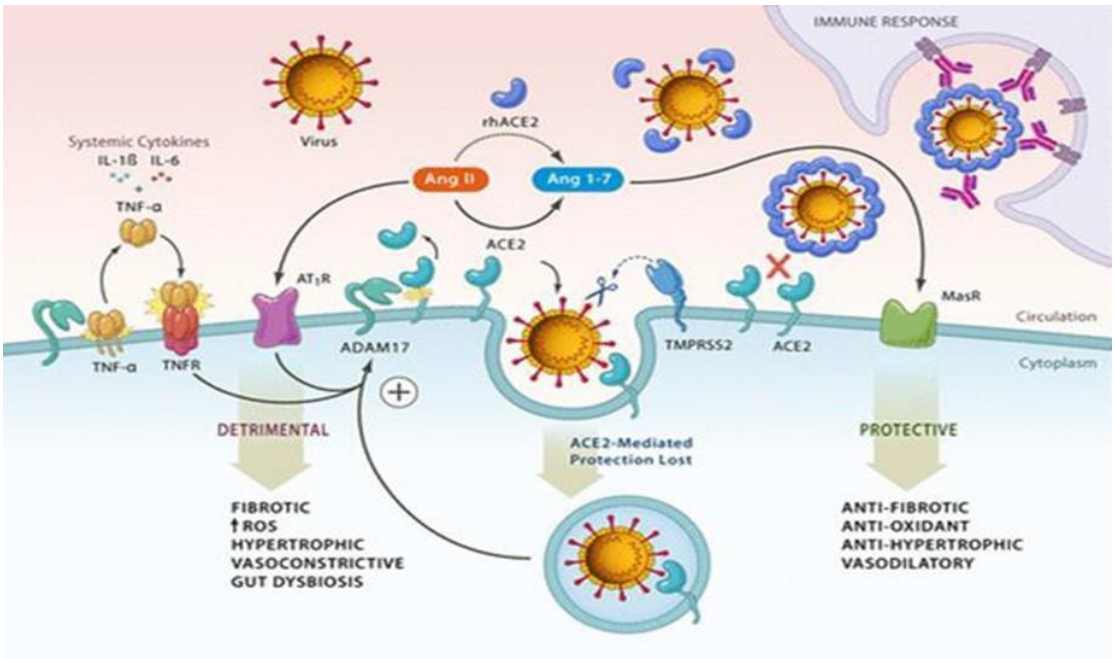
SARS-COV-2, yüzeyinde sivri uçlu bir protein kullanarak hücrelere girmeden ve onları enfekte etmeden önce ACE-2'ye bağlanır. COVID-19 virüsü enfekte olduğunda reseptör olarak ACE-2'yi kullanır (Sriram and Insel 2020). Akciğerler, kalp, kan damarları, böbrekler, karaciğer ve bağırsaklar dahil birçok doku ve organ ACE-2'yi barındırır. Genellikle doku kenarlarında bariyer oluşturan epitel hücreleri izole tutulduğu yerdir (Sriram and Insel 2020). Akciğerler ve kan arasındaki karbondioksit ve oksijen alışverişinde akciğerlerin epitel astarının önemli bir işlevi vardır. ACE-2, burun boşluğu, ağız boşluğu ve akciğerler dahil olmak üzere solunum sistemi boyunca bulunabilir. Tip 2 pnömositleri ACE-2'yi yüksek oranda bulundururlar. Bu hücreler, dışarı verilen karbondioksit ile solunan oksijen arasındaki gaz alışverişi bölgeleri olan alveollerde bulunmaktadır (Sriram and Insel 2020). İlk SARS-COV varyasyonundaki bir amino asit değişikliği nedeniyle meydana gelen SARS-COV-2, viral spike (S) proteinini insan ACE-2'sine bağlayan altı amino asitten beşi için farklı bir diziye sahiptir.

Konak tropizmi çoğunlukla, antiviral ve aşı terapilerinin yaratılması için birincil araştırma hedefi olan viral S-proteinleri tarafından belirlenir. Hem S proteinleri hem de ACE-2, girişte konakçı hücre proteazları tarafından değiştirildiğinden, bu adım SARS-COV-2 için çok önemlidir. COVID-19'un dünya çapındaki etkisinin olası bir açıklaması da SARS virüsünün SARS-COV-2'nin tuz köprüsü proteininin ACE-2'ye olan afinitesini artırmasıdır (Yan *et al.* 2021).

Diğer bir taraftan, SARS-COV-2, S-proteinini hazırlamak ve reseptör temasından sonra hücre girişine izin vermek için çok çeşitli konakçı proteazları kullanacak şekilde uyum sağlamıştır. Bu proteazlar; Katepsin L ve B, tripsin, faktör X, elastaz, furin ve TMPRSS2'dir (Millet and Whittaker 2015). Bir katepsin L/B inhibitörü olan kamostat mesilat ve bir serin proteaz inhibitörü olan kamostat mesilat E-64d'nin, SARS-COV-2

enfeksiyonunu bloke ettiği tespit edilmiştir (Da Silva *et al.* 2017). SARS-COV ve SARS-COV-2'nin S-proteini, transmembran ACE-2 proteinlerinin hücre dışı bölgeleriyle etkileşerek virüslerin hücrelere girişini artırır ve ACE-2 ifadesi yüzeyde azalmaya başlar (Zhou *et al.* 2020).

Dokulardaki ACE-2 aşağı regülasyonu ve sistemik RAS dengesizliği, sağlıklı kontrollere göre çok daha yüksek dolaşımdaki ANG II seviyelerine sahip olan 12 kişilik COVID-19 hastasından oluşan bir grupta SARS-COV-2 enfeksiyonlarından kaynaklanan çoklu organ hasarıyla ilişkilendirilmiştir (Liu *et al.* 2020). Viral S proteininin RBD'sinde insan ACE-2 ile SARS-COV-2 arasındaki etkileşimi bloke eden tedaviler geliştirilebilir. Reseptör bağlama alanı bloke etme yöntemine alternatifler arasında ACE-2'den türetilen peptitler, küçük moleküllü inhibitörler, ACE-2 antikorları ve ACE-2'ye karşı tek zincirli antikor fragmanları bulunur (Şekil 2.4).



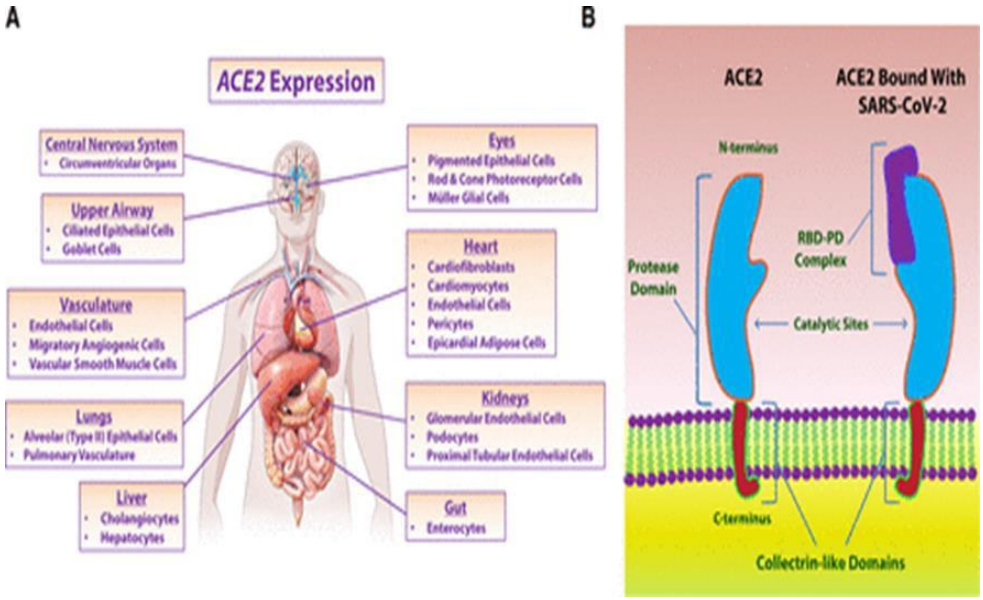
Şekil 2.4 ACE-2'nin koronavirüs enfeksiyonuna inflamatuar yanıttaki rolü (Zhou *et al.* 2020)

Endositoz meydana geldiğinde hem enzim hem de SARS-COV-2 virüs parçacıkları hücre tarafından emilerek ACE-2'nin sunduğu kardiyovasküler korumayı geçersiz kılar. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve vazokonstriksiyona bağlı olarak ACE-2/ANG 1-7

güdümlü yolların yokluğunda vücutta ve bağırsakta fibrotik ve hipertrofik değişikliklerin yanı sıra bağırsak disbiyozunun gelişimi meydana gelebilir. Endositozlu SARS-COV-2 spika proteinleri, bir disintegrin ve metaloproteinaz olan ADAM17 tarafından ACE-2'nin proteolitik bölünmesini artırır. AT1R, artan ANG II seviyeleri tarafından tetiklendiğinde, ADAM17 aktivitesi daha da artar. Çözünür olan tümör nekroz faktörü (TNF-), ADAM17'den hücre dışı boşluğa salınır ve hem otokrin hem de parakrin etkilere sahiptir. ADAM17 aktivitesini yükseltmek için üçüncü mekanizma, TNF-'nin aktive ettiği TNFR'dir. Bir sitokin fırtınası, diyabet ve hipertansiyon gibi eşlik eden durumlara ek olarak SARS-COV-2 enfeksiyonunun neden olduğu TNF- ve diğer sistemik sitokinlerin üretilmesinden kaynaklanabilir.

2.5.3 Temel biyokimya ve ACE-2 geni

İnsan kromozomu 17'de bulunan ACE geninin aksine, farelerde Xp22'de 40 kb büyüklüğündeki ACE-2 geni yerleştirilmiştir. 18 ekzonunun büyük kısmı, ACE genininkilerle karşılaştırılabilir. Somatik ACE'nin iki aktif bölgesi varken, ACE-2'nin katalitik alanında sadece bir bölgesi vardır. ACE ve ACE-2'nin her ikisi de çinko metalopeptidazlar olsa da çeşitli substrat tercihleri bakımından, RAS'ta farklı ve tamamlayıcı işlevlere sahip oldukları görülür. ACE-2, ANG 1-7'yi oluşturmak için ANG I'i hidrolize edebilen basit bir karboksipeptidaz olarak çalışırken, ACE, ANG I'i ANG 1-9'u yapmak için hidrolize eder (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 ACE-2 ekspresyonunun gövdesindeki anahtar alanlarının bir şemasını gösterir, B: Ek olarak ACE-2 özgüllüğünü (Rice *et al.* 2004)

Hücre yüzeyine amino asit taşınması, ACE-2'nin C-terminal alanını paylaşan, Collectrin adlı bir protein tarafından düzenlenir. Bu nedenle, ACE-2 birkaç fizyolojik bağlamda işlev görebilir. SARS-COV-2 salgını sırasında, kapsamlı fizyolojik önemi nedeniyle ACE-2 bir reseptör olarak seçilmiştir (Yan *et al.* 2021). ACE-2 ile kompleks haldeki SARS-COV'un yapısal analizleri, SARS-COV-2'nin daha ince noktalarını ortaya çıkarmıştır (Wrapp *et al.* 2020). SARS ile ilişkili koronavirüs tip 2 (COV-2) spike glikoproteini (S1), ACE-2'nin N-terminal bölgesi ile etkileşime girer. SARS-COV-2 enfeksiyonunu daha iyi anlamak ve önlemek için, SARS-COV'un keşfinden bu yana geçen 20 yılda değişen ACE-2'nin biyolojisini ve fizyolojisini anlamak önemlidir.

İnce bağırsak, böbrekler, testisler, tiroit, kalp ve yağ dokusunda maksimum miktarlarda ACE-2 üretilir. Adrenal bez, karaciğer, akciğerler, kolon ve mesane ile ACE-2'yi bulundurur (Li *et al.* 2020). Çözünür ACE-2 (sACE-2), metalloproteinaz 17 (ADAM17) tarafından hücrelerden salınan 555 amino asitli fonksiyonel bir ACE-2 formudur. sACE-2, SARS-COV-2'ye bağlanarak virüsün konakçı hücrelere girmesini önler ve COVID-19'un yayılmasını durdurur. Viral reseptörlerden biri olan ACE-2, kardiyovasküler sistemi korurken, nötr amino asitlerin bağırsaklar yoluyla emilmesine de yardımcı olur (Kuba *et al.* 2010). Devaux *et al.* (2020), ACE-2 geninde ve proteininde, tek nükleotid

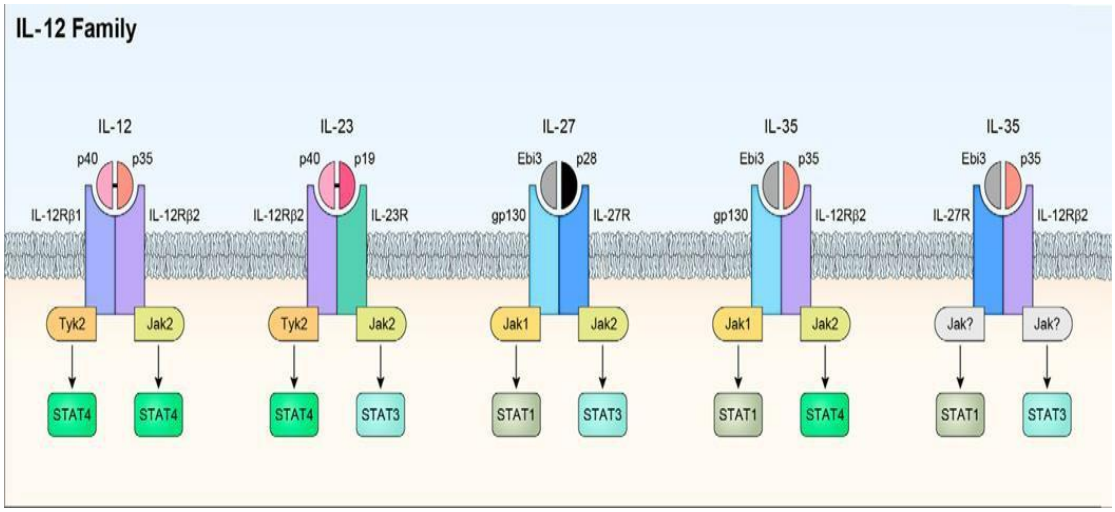
varyasyonu, transkripsiyonel varyasyon, transkripsiyon sonrası değişiklikler ve varsayılan protein mutasyonları dahil olmak üzere önemli düzeyde genetik değişkenlik bulmuştur. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) son zamanlarda bilim dünyasında büyük ilgi görmüştür. 805 amino asitli insan ACE-2'sinin (hACE-2) 256 kodonu kapsayan ve proteini çeşitli şekillerde değiştiren 298 farklı varyasyonu vardır (Suryamohan *et al.* 2021).

COVID-19 ile ilişkili semptom aralığı, tamamen yokluktan pnömoni ve ARDS ve hatta ölüme kadar değişen ciddi durumlara kadar dikkat çekicidir (Lopera Maya *et al.* 2020). SARS-COV-2 füzyonu ve girişi için gerekli olan ACE-2'deki varyasyonlar bu ayrıma katkıda bulunabilir. Bu nedenle, ACE-2 polimorfizminin değerlendirilmesi ve tanımlanması çok önemlidir.

2.5.4 İnterlökin 12 (IL-12) sitokinleri

IL-12p35/Ebi3 ile ortak atayı paylaşan dört sitokinin (IL-12, IL-33, IL-19 ve IL-35) her birinin konak bağışıklığının önemli bir modülatörü olduğu gösterilmiştir. Tip 1 sitokin reseptör alt birimleri, hücre dışı bölgelerinde yapısal ve tip 1 sitokinlere benzer sarmal şekillere sahiptir (Trinchieri *et al.* 2003, Vignali and Kuchroo 2012). Sitokin ancak her iki zincir de mevcut olduğunda salgılanabilir. IL-12p35, IL-23p19 ve IL-27p28 alt birimleri -zincirini oluştururken, - zincirinden IL-12p40 ve Ebi3 sorumludur.

Dört heterodimerik sitokinin salgılanmasının, sırasıyla yüksek miktarlarda IL12p35 veya IL23p19 içeren dokular veya hücre tipleriyle sınırlı IL-12 ve IL-35 sentezi ile zincirin ifadesi tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. Çok çeşitli konakçı savunma mekanizmaları, benzersiz zincir eşleştirme karışıklığı nedeniyle IL-12 sitokinlerini içerir. Buna karşılık, Ebi3 ile dimerizasyon, IL-27 ve IL-35 gibi anti-inflamatuar ve anti-otoimmün IL-12 sitokinleri üretirken, IL-12p40 ile dimerizasyon, IgM ve IFN- gibi proinflamatuar IL-12 sitokinleri üretir (Şekil 2.6). IL-12 sitokinezi ayrıca Janus kinazlara (JAK'lar) bağlanır ve onları aktive eder, böylece bu proteinlerin hücrenin sinyal yollarındaki kritik rollerini yerine getirmelerine izin verir (Trinchieri *et al.* 2003).



Şekil 2.6 IL-12 sitokin ailesi ve reseptörleri

IL-6 süper ailesinin (IL-12p19, IL-12p35 ve IL-27p28) sınıf I reseptör zincirleri ve sarmal alfa alt birimi homologdur. Biyolojik süreçleri düzenleyen hedef genler, aynı kökenli reseptörlerin bağlanmasıyla JAKS ve STAT'lerin (STAT1, STAT3 ve STAT4) aktivasyonunun bir sonucu olarak kopyalanır. T hücreleri üzerindeki STAT1 ve STAT4 reseptörleri, IL-12R2 veya gp130/gp130 yoluyla aktive edilebilir. B hücrelerinde STAT1 ve STAT3'ü aktive etmek için IL-12R/IL-27'yi kullanır. IL-35 stimülasyonuna yanıt olarak B hücreleri tarafından JAK kullanımı bilinmemektedir. Biyomühendislik ürünü heterodimerik IL-12 sitokin IL27p28/IL12p40'ı oluşturmak için bir bisistronik vektör kullanılabilir. Bu sitokin, STAT'ları aktive etmez, bunun yerine GP130 ve IL-27 sinyalini bloke eder (Sun *et al.* 2015).

2.5.5 TH1 farklılaşması ve IL-12

TH1 farklılaşma yolunun ilk modelleri, T-bet transkripsiyon faktörünün, T-bağlılık hücrelerinin TH1'e bağlanması için gerekli olduğuna dair artan kanıtlar nedeniyle kademeli olarak değiştirilmiştir (Peng 2006). Mullen *et al.* (2001)'de farelerdede T-bet'in IL-12 olmadan TH1 efektör kaderini kontrol edebildiğini ortaya çıkardı. T-impact bet'in IFN-alel kromatin yeniden şekillenmesi üzerindeki çalışması ve IL-12R2 üretimini teşvik etmek, araştırmacıların TH1 hücresinin kaderini belirlemesine olanak sağlamıştır (Mullen *et al.* 2001). Sonuç olarak, yeni bir TH1 farklılaştırma modeli artık T-bahse IL-12'den

daha fazla öncelik vermektedir. Örneğin, T-bet ifade eden hücrelerde T-bet sentezi, T-bet ifade eden nave T hücrelerinde NK hücresi türevli IFN-aktive edici STAT1 sayesinde artırılır. Buna rağmen, IL-12'nin T-bet hücresi homeostazındaki rolü kritik olmaya devam eder (Murphy and Reiner 2002). IFN- geninin pozitif düzenleyicisi olarak çalışmasıyla en iyi bilinen transkripsiyon faktörü GATA-3, aynı zamanda TH1'in kaderini belirlemede çok önemli bir rol oynar ve onu TH2 soyunun T hücresi taahhüdünün birincil düzenleyicisi yapar (Usui *et al.* 2006).

2.5.6 IL-12 ve COVID-19 arasındaki ilişki

COVID-19'da IL-23/IL-17 eksenini inhibe etmek, organ yetmezliğine ve nihayetinde ölüme neden olan "sitokin fırtınasını" azaltabilir (Messina and Piaserico 2020). COVID-19'un neden olduğu inflamatuar barsak hastalığı olan bireylerin daha az ölçüde, tümör nekroz faktörü inhibitörleri, daha düşük yoğun bakım ünitesine kabul ve ölüm oranlarıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Brenner *et al.* 2020).

IL-12, etkili viral klirens için gerekli olan TH1 polarizasyonunu desteklediğinden, IL-12'yi inhibe etmek SARS-COV'u bozabilir. IL-12 sinyaline daha az duyarlı olan IL-12 reseptör polimorfizmleri, SARS enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. IL-12, durumla ilişkili iltihaplanmaya katkıda bulunabilir ve zararlı olma potansiyeline de sahiptir (Tang *et al.* 2008).

2.5.7 IL-12 gen polimorfizmi

Çok çeşitli insan immünolojik ve inflamatuar yanıtlarına katkıda bulunan sitokin genlerindeki polimorfizmler de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin dikkate alınması önemlidir. Enfeksiyöz ve otoimmün bozuklukların gelişimi, TH 1 veya 2 alt kümelerine karşı bağışıklık tepkilerinin polarizasyonunun ana düzenleyicisi olan interlökin 12'den (IL-12) etkilenebilir (Hall *et al.* 2000).

Fonksiyonel sitokin, sırasıyla 35 ve 40 kDa olan iki proteinden (p35 ve p40) oluşan 75 kDa'lık bir heterodimerdir. Bu özelliklerin tümü, çeşitli kromozomlar üzerinde ayrı genetik talimat setlerine sahiptir. İnsan kromozomu 3, 3p12e3q13.2'de IL-12p35 alt birim genine sahipken, kromozom 5, 5q31e33'te IL-12p40 alt birim genini içerir. Hem IL-12 p70 hem de IL-23 alt birimleri, p40 alt birimini içerir. IL-12 heterodimerinin salgılanması hem p40 hem de p35 zincirlerinin ifadesini gerektirir. p35'in salgılanması, her zaman mevcut olmayan p40'ın varlığını gerektirir (Trinchieri *et al.* 2003). Yapılan çalışmlarada, IL-12 p40 geninde, IL12B'de promotör, intron ve üç çevrilmemiş bölgedeki varyasyonlar dahil olmak üzere yedi polimorfizm tanımlanmıştır (Huang *et al.* 2000).

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) araştırmasını kullanan son çalışmalar, 3 çevrilmemiş bölgedeki (UTR) (Taq I) bir varyasyonun varlığını in vitro IL-12 salgılanmasının daha yüksek seviyelerine bağlamıştır (Seegers *et al.* 2002). IL-12B 3UTR ekspresyonu hücre hatları arasında büyük farklılıklar gösterirken, tip 1 diyabet (T1D) için tek bazlı ikame duyarlılık lokusunun aile öyküsü ile güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Morahan *et al.* 2001). Diğer araştırmalar, genotip ve IL-12 ekspresyonu arasında bir bağlantı bulamamıştır, bu da bu polimorfizmin tip 1 diyabet geliştirme riski üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını düşündürmektedir (Bergholdt *et al.* 2004).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar malzemeleri ve cihazlar

Çizelge 3.1'de, araştırmada kullanılan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Laboratuvar malzemeleri ve cihazlar

Cihazlar	**Menşei**
Kuluçka makinesi	Almanya/ABD
Vorteks	Hollanda
Mikropipet 20-1000 µL	Japonya
Mikrosantrifüj	Almanya
Santrifüj	Almanya
Otoklav	Hirayama
Damıtıcı	GFL
Elektrik hassas denge	Denver
ELISA okuyucu, ELISA yıkayıcı	BioTeck
Jel elektroforez sistem	Cleaver Scientific
PCR	Techne
Buzdolabı	Concord
Nano damla 2000c spektrofotometre	Fisher Scientific

3.1.2 Kitler, biyolojik ve kimyasal malzemeler

Çizelge 3.2'de, araştırmada kullanılan kitler ve biyolojik malzemeler gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kitler, biyolojik ve kimyasal malzemeler

Kitler	**Şirket (Menşei)**
DNA ekstraksiyon kiti	Favorgen (Tayvan)
DNA ladder	Bioner (Kore)
Green master mix	Bioner (Kore)
Primerler	Makrogen (Kore)
ACE-2 ELISA kiti	Biotech (Çin)
IL-12 ELISA kiti	Biotech (Çin)
Agaroz, TBE tamponu	Condalab (İspanya)
Simply Safe	Eurx (Polonya)

3.2 Yöntem

3.2.1 Hastalar

Bu çalışmaya COVID-19'lu hastalar (15-80) dahil edilerek 100 kan örneği alınmıştır. Hastalığın ciddiyetine solunum cihazı gerektirmeyen ve solunum cihazı gerektiren olarak iki gruba ayrıldı. PCR sonuçlarına göre pozitif olan 54 ciddi olmayan ve ventilatöre ihtiyaç duyan ve solunum cihazında yatan 46 ciddi hasta tespit edildi. Plaka geç sayımı sonuçları, CBC tıbbi kayıtlarından elde edildi ve hasta geçmişleri incelenerek, fiziksel muayeneler ve PCR testleri yapılarak tanılara ulaşıldı. Bu hastalar birbirleriyle karşılaştırıldı. Ayrıca, çalışmaya katılan hastalardan bir anket doldurmaları istendi ve hiçbirinin ailesinde herhangi bir hastalık öyküsü tespit edilmedi.

3.2.2 Örnek toplama

Her hastanın damarından beş mililitre kan alındı. Kan örnekleri daha sonra rastgele ikiye bölündü. İlk 2,5 mL, DNA ekstraksiyon işlemi sırasında kanın pıhtılaşmasını önlemek için kullanılan bir EDTA tüpüne yerleştirildi. Kanın oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika pıhtılaşmasına izin verildikten sonra kalan fraksiyon (2,5 mL) serum ayrılması için Jel tüpe aktarılarak tüp 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Serum daha sonra dört şişeye bölündü. Ardından serum dört tekrarlayıcıda toplandı ve -20°C'de steril bir Eppendorf tüpünde saklandı.

3.2.3 Genetik araştırma

3.2.3.1 Genomik DNA’nın elde edilmesi

Favor the PrepTM Genomic Mini Kit kullanılarak üreticinin talimatlarına göre donmuş insan kanından genomik DNA ekstrakte edildi. Bunun için aşağıdaki adımlar izlendi.

- EDTA'lı tüpten 200 µL çözülmüş donmuş kan 1,5 mL'lik mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Bundan sonra numune, inkübatörde 30 mL proteinaz K ile 60°C'de 15 dakika süreyle inkübe edildi.
- Numune 70°C'de 15 dakika inkübe edildi ve tekrar teste eklenmeden önce hücrelerin uygun şekilde parçalanmasını sağlamak için vortekslendi veya çalkalandı. Bu noktada, hücre lizisi için 200 µL FABG Tamponunun eklenmesiyle kan yeşilimsi siyah hale geldi. Her üç dakikada bir ters çevrilerek yeni bir numune elde edildi. Elüsyon Tamponu, DNA elüsyonu için önceden 70°C'ye ısıtılmış bir inkübatöre konuldu.
- 200 mL etanol (%96-100) örneğe ilave edildi ve DNA bağlanması sırasında çökelme oluşmadığından emin olmak için 10 saniye vortekslendi. Numune daha sonra dikkatlice FABG kolonuna aktarıldı ve 1400 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Akış atıldı ve FABG kolonu, iki mililitre taze toplama tüpüne aktarıldı.
- FABG tüpü 400 mL W1 Buffer ile dolduruldu ve 1400 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. FABG kolonu, atıldıktan ve pozitif (kırmızı) elektrotlara yönlendirildikten sonra toplama tüpüne yeniden yerleştirildi. Kolu çalıştırarak güç açıldı.
- 600 mL yıkama tamponu FABG tüpünde 1400 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek kolon kurutuldu. FABG tüpü daha sonra toplama tüpüne kondu ve akış atıldıktan sonra 3 dakika daha santrifüjlendi.
- Havayla kurutulduktan sonra, FABG kolonu temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve kolonun membran tarafına 100 mL sıcak elüsyon tamponu veya TE ilave edildi. 37 santigrat derecede 10 dakika inkübasyondan sonra DNA, 1 dakika boyunca dakikada 1400 devirde santrifüjleme ile ekstre edildi. 4℃'de muhafaza edildi.

3.2.3.2 Primerlerin hazırlanması

Bu araştırmada kullanılan Tris-HCL (10 Mm) ve EDTA-Na2 primer çiftlerini çözmek için TB Tamponu kullanıldı. Üreticinin (makrojen /Kore) talimatlarına göre, nükleaz içermeyen su eklenerek mikrolitre başına 300 pikomol konsantrasyonuna sahip bir primer stok solüsyonu yapıldı. Çalışma solüsyonu, stok solüsyonu nükleaz içermeyen su ile 10

pikomol/mikrolitre konsantrasyonuna seyrelterek hazırlandı (Green and Sambrook 2012).

3.2.3.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Hedef DNA, dikkatlice seçilmiş primer çiftleri ile geleneksel PCR kullanılarak büyütüldü. Bu durum, örneğin ısıtılması için kullanılan döngü sayısını açıklar, PCR ürünü (amplikon) üç adımın sırayla tekrarlanmasıyla yapılır ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenir.

3.2.3.4 TBE tamponu (Tris-Borat-EDTA)

TBE tampon kullanılarak, DNA ve RNA jel elektroforezi gerçekleştirildi. TBE stok solüsyonu hazırlandı. 108 gram Tris, 55 gram borik asit ve 40 mL 0,5 M EDTA'nın 1000 mL DW içinde çözülmesi ile 1x solüsyonunu elde edildi. Jel elektroforez için, son hacim DW 900 mL TBE çözeltisine 100 mL 10x TBE tamponu eklenerek hazırlandı. 950 mL'lik son hacme 100 mL 10x TBE tamponu eklenerek 1x TBE çözeltisi konsantrasyonu yapıldı (Sambrook and Russel 2001).

3.2.3.5 Agaroz jel elektroforezi

DNA fragmanlarını ayırmak için bir agaroz jel üzerinde elektroforez kullanılabilir. Bir jeldeki agaroz miktarı, ayrılan DNA parçalarının boyutuna bağlıdır. Bu oran %2 ile %5 arasında değişmektedir (Lee *et al.* 2012). PCR sonucunun küçük bileşenlerinin (100-700 bp) görüntüsünü elde etmek için 1,5 jel kullanıldı. Diğer taraftan 100 mL 1x TBE tamponu ilave edilerek öngörülen ağırlıktaki agaroz mikrodalgada çözelti berraklaşıncaya kadar eritildi. Agaroz jel daha sonra 50–55°C'lik bir sıcaklığa kadar soğutuldu. İstenilen sonucu elde etmek için 100 mL eriyen agaroz jeli 5 mL "simply safe" boya (10 mg/mL) ile karıştırıldı ve %0,5 konsantrasyon elde edildi (Sambrook and Russell 2006). Jel tepsisine agaroz ilave edildi, tarak doğru yerleştirildi ve daha sonra kurumaya bırakıldı. İşaretleyiciler jelin bir kuyusuna girdi ve diğerine yerleştirildi. Jelin %'si ve boyutu

kullanılarak elektrotların birbirine bağlanması için uygun şekilde bir çalışma yapılmıştır (Agaroz jel elektroforez süresi PCR ürünü için 70 dakikadır).

- Plastik tepsi kullanırken tarağın dişlerinin tepsinin tabanından en az 0,5 mm daha yüksek olduğundan emin olunur.
- 1000 mL deiyonize su ve 2,1 mL TBE (10X) stok solüsyonu, 1 mL TBE (10X) solüsyonuna (1X) eşittir.
- 1,5 g agaroz ve tamponu 500 mL'lik bir şişede birleştirilir. Agarozu çözmek için karışımı yüksek güçte 90 saniye mikrodalgada ısıtılır. Agaroz parçacığı bulunmadığından ve agaroz solüsyonunun iyice çözüldüğünden emin olunur.
- 5 mL Güvenli Stok Çözeltisini 50°C Agaroz Çözeltisi ile birleştirilir. Jel döküm tepsisine sabit bir agaroz akışı dökülmelidir. Hava kabarcıklarını gidermek için sarı uç kullanılır.
- Uygulama sırasında tarağı jelin kenarından 1,5 cm uzakta tutun. Agaroz solüsyonunu kullanmadan önce 20–30 dakika bekleyin. Agaroz jel katılaştıktan sonra, yırtılmayı önlemek için tarak dikkatlice çıkarılmalıdır. Jel döküm tepsisini jel kutusunun ortasındaki platforma yerleştirin.
- Jel tepsisini jel kutusundan çıkardıktan sonra orta platforma yerleştirilir.
- Tampon haznesine tampon eklenerek elektroforez tamponu jel yüzeyinin 0,5–1 cm üzerine çıkartılır.
- Örnekler sarı uçlu kuyucuklara yerleştirilir. Enjeksiyon yaparken, şırınga ucunun elektroforez tamponunun oldukça üzerinde olduğundan emin olunur. Örneği yavaşça çıkarmadan önce birkaç saniye beklenir. Her kuyucuğa teker teker bir örnek konulur.
- Daha sonra diğer kuyucuğa 5 µL DNA örneği ve jelin her iki tarafına (örnek hattının yanında olacak şekilde) 5 µL merdiven moleküler ağırlık markörü eklenir.
- Jel kutusu kapağı elektrotlara bağlanabilir. Pozitif elektrot (kırmızı) kullanılarak kuyudan DNA elde etmek mümkündür. Makinenin düzgün çalışması için güç kaynağı açık olmalıdır.
- İzleme boyası jeli en az 10 cm geçmeden elektroforez yapılmamalıdır.

3.2.4 İmmünolojik araştırma

İnsan ACE-2 ve IL-12'nin in vitro kantitatif tayini, serum İnsan ACE-2 ve IL-12 ELISA kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

Test Prosedürü

Sandviç-ELISA, sırasıyla IL-12 ve ACE-2'yi tanımlamak için ELISA kitinde kullanılır. Önceden kaplanmış bir İnsan IL-12 antikoruna sahip 96 oyuklu bir mikro titre plakası bu testin bir parçasıdır. Uygun kuyularda numuneler veya standartlar doğru antikorla birleştirilir. Daha sonra, biyotinlenmiş bir ACE-2 tespit antikoru dahil edilir. Her kuyucuğa (HRP) bir avidin-yaban turpu peroksidaz konjugatı eklenir. Kromatojenik prosedürün ardından kalan serbest bileşenlerden kurtulmak için yıkama yapılır. Her kuyucuğun inkübasyonu için kullanılan substrat farklıdır. Biyotinlenmiş tespit antikorları yalnızca ACE-2 ve IL-12 içeren kuyularda bulunur ve Avidin HRP ile eşlenir. Durdurma solüsyonunun eklenmesi, enzim-substrat reaksiyonunun sararmasına neden olur. Bir spektrofotometrik yöntem kullanılarak, bir uyarma dalga boyundaki optik yoğunluk (OD) ölçülür (450 nm 2 nm). Çalışmamızda OD değeri ile performans konsantrasyonu arasında güçlü bir ilişki tespit edilmiştir. Numunelerin OD'si standart eğriyle karşılaştırarak, ACE-2 ve IL-12 içeriğini tahmin etmek mümkün olmuştur.

Reaktif düzeneği

Tüm numuneler ve kit bileşenleri kullanımdan önce buzdolabından çıkarılır.

Standart solüsyonun hazırlanması: liyofilize rekombinant proteini, bir protein tüpüne 1 mL standart ve numune seyrelticiler tamponu ve (80 ng/L) IL-12 ve (24 ng/L) ACE-2 eklenerek solüsyonları üretmek üzere iyice karıştırarak sulandırılır. Tüp tamamen birleştirilir, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir ve ardından köpük oluşumunu önlemek için vorteksle hafifçe çalkalanır.

Test tekniği

- Her kuyucuğa 100 mL standart, boş veya numune yerleştirilir. Önce bir numune alınır. Plaka, 37°C'de 60 dakikalık inkübasyondan sonra kapatılır.
- Her oyuğa, biyotinlenmiş olan 100 mL saptama Ab çalışma solüsyonu verilir. Plakayı sabitlemek için bir plaka mühürleyici kullanılır. Tam homojenizasyon elde etmek için 37°C'de bir saat inkübe edilir.
- Durulama işlemi için aspire edilir ve her biri üç kez yıkanır. Yıkamak için her kuyuya yıkama tamponu eklenir. Her adımda sistem boşaltılır. Son yıkamadan sonra kalan yıkama tamponu aspire edilerek boşaltılır ve ters çevrildikten sonra temiz emici kâğıt üzerine alınır.
- Kuyu başına 100 mL çalışma solüsyonu eklendikten sonra 37°C'de 30 dakika boyunca plaka kapatıcıyı kullanılır.
- Yıkama işlemi için adım 3 ve 4 beş kez tekrarlanır.
- Substrat: Kapatılan her kuyucuğa 90 mL substrat solüsyonu verilir ve bu, 37°C'de 15 dakika inkübe edilir. Plaka ışığa maruz kalmadığı için reaksiyon süresi değişebilir ancak 15 dakikayı geçmemelidir.
- Durdurma: Her bir kuyucuğa 50 mL durdurma solüsyonu eklendiğinde renk hemen sarı olur. Durdurma solüsyonu, substrat solüsyonundan sonra aynı sırada verilmelidir.
- Optik yoğunluk (OD): Her kuyucuğun optik yoğunluğu, 450 nm'ye kalibre edilmiş bir mikroplaka okuyucu kullanılarak eş zamanlı olarak hesaplanır.

3.3 İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, bağımsız bir T-testi kullanılarak hesaplanır ve standart sapma (SD) ile ortalama olarak gösterilir. Değişkenler arasındaki ilişkileri değerlendirmek için korelasyon analizi yapılır. Çalışmamızda, polimorfizm ile COVID-19 güvenlik açığı arasındaki korelasyon, OR ve %96 CI kullanılarak ifade edildi. 0,05 p değeri ile anlamlılık düzeyi yüksek kabul edildi. İstatistiksel analizi yapmak için GraphPad Prism sürüm 8,0,0 ve IBM SPSS Statistics 25,0'ı (Armonk, NY: IBM Corp. San Diego, California ABD) kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hastaların Klinik Özellikleri

Babil Eyaletindeki Mercan Medical City ve Al-Imam Al-Sadiq Hastanesi'ndeki COVID-19 Servislerinde iki aylık bir süre boyunca (Kasım ve Aralık 2021) tedavi edilen 100 COVID-19 hastasının klinik özellikleri kaydedilerek değerlendirilmiştir.

4.1.1 Katılımcıların demografisi

Bu araştırmada, ACE-2 ve IL-12'nin etkilerini belirlemek için 46 şiddetli COVID-19 hastası ve 44 şiddetli olmayan COVID-19 hastası olmak üzere toplamda 90 örneğin immünolojik verileri incelenmiştir. Araştırmanın ikinci bölümünde, 46 şiddetli COVID-19 hastası ve 54 daha az şiddetli COVID-19 hastası olmak üzere toplamda 100 örnekte immün gen polimorfizmi (ACE-2 ve IL-12) incelenmiştir. Çalışmaya göre, ağır hastaların tam kan sayımlarında (CBC) düşük trombosit sayısı ile tüm hastalarda PCR ve C-reaktif protein (CRP) testleri pozitif çıkmıştır.

İmmünolojik çalışmanın cinsiyet dağılımına ilişkin bulguları, şiddetli COVID-19 vakaları 23 (%50) erkek ve 23 (%50) kadın vakadan, şiddetli olmayan COVID-19 vakalarının ise 22 (%50) erkek ve 22 (%50) kadın vakadan oluşmaktadır.

Genetik çalışmanın bulguları için cinsiyet dağılımına bakıldığında, şiddetli COVID-19 hastaları arasında 23 (%44,3) erkek ve 23 (%47,9) kadın, şiddetli olmayan COVID-19 hastaları ise 29 (%55,7) erkek ve 25 (%52,1) kadından oluşmaktadır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 COVID-19 hastalarında cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	**İmmünolojik çalışma**		**Genetik çalışma**	
	Şiddetli	**Şiddetli değil**	**Şiddetli**	**Şiddetli değil**
Erkek	23 (%50)	22 (%50)	23 (% 44,3)	29 (%55,7)
Dişi	23 (%50)	22 (%50)	23 (%47,9)	25 (%52,1)
Toplam	**90**		**100**	

Mevcut çalışma da dahil olmak üzere çok sayıda araştırma, erkeklerde ve kadınlarda COVID-19'un farklı insidanslarını belgelemiş olsa da erkek cinsiyetinin bu durumdan ağırlıklı olarak etkilendiği görülmektedir. Ayrıca erkeklerin tipik olarak kadınlardan daha ciddi bir hastalığa ve daha kötü bir prognoza sahip olduğu belirlenmiştir (Cheng and Shan 2020, Ortolan *et al.* 2020).

Bazı araştırmalarda erkeklerin neden daha yüksek COVID-19 seviyelerine sahip olduğunu ve neden kadınların hastalık prevalansı ve ölüm oranı açısından daha iyi durumda olduğunu açıklamada, X kromozomuna bağlı immünolojik aktiviteler, cinsiyet hormonlarının potansiyel etkisi ve cinsiyetle ilişkili bazı davranış kalıpları dahil olmak üzere üç ilgili belirleyici tartışılmıştır (Lakbar *et al.* 2020).

Ortaya çıkan koronavirüs, delta ve omikron varyantlarını takip eden mutant virüsler, orijinal virüsün aksine genç yaşları ciddi şekilde enfekte etsede yaşlılar hala akut enfeksiyona, akciğer hasarına ve yoğun bakıma yatışlara maruz kalmanın en büyük yüzdesini oluşturmaktadır. Şiddetli COVID hastalarında yaş ortalaması 15-80 yıl ve şiddetli olmayan hastalarda 10-75 yıl arasındadır. Çalışmaya göre, şiddetli olan ve olmayan hastalar arasında p değeri (0,05) açısından anlamlı fark bulunmaktadır.

Akciğer hasarının ve oksijen kullanımının skorlanması, yaşla birlikte artan *diabetes mellitus*, kalp rahatsızlıkları ve hipertansiyon gibi kronik hastalıklarla ilişkili olabilir. Yaşlıların COVID-19'a daha duyarlı olduğu hipotezi, yaşlandıkça hava yolundaki siliyer hücrelerin miktarının ve boyutunun azaldığını ve burun direncinin de düştüğünü gösteren kanıtlarla desteklenmektedir. Ayrıca, akciğerlerin tutulumu, hipoksi ve artan oksijen takviyesi ihtiyacı da yaşla ilişkilidir. Bu grupta bulunan hastalar daha genç meslektaşlarına göre daha şiddetli COVID-19 vakalarına ve daha sık mekanik solunum kullanımı ve yoğun bakım ünitesine yatış oranına sahiptir (Lian *et al.* 2020).

Doğuştan ve adaptif bağışıklık sistemlerinin yaşlılarda bozulduğu görülmektedir, bu da gözlenen immünolojik değişikliklere katkıda bulunabilir. Bu durum CD4+ hücre sayısının düşmesine, inflamatuar yanıt nedeniyle daha fazla sitokin üretimine ve viral klirensin bozulmasına neden olur (Aw *et al.* 2007, Napoli *et al.* 2020).

Çalışmamızda, yaşlıların gençlere göre COVID-19'a daha duyarlı olduğunu bulunmuştur ve bu daha önceki araştırmalarla desteklenmiştir (Yang *et al.* 2020). Jingchun *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada, COVID-19 hastalarının medyan yaşının 62 olduğu, erkek ve kadın grupları arasında medyan yaşta önemli bir fark olmadığını belirtilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızın bulguları ile desteklenmektedir.

Çalışmalar, daha genç hastalara kıyasla, yaşlanmayla bağlantılı kronik hastalıkların, virüsü taşıyan yaşlı kişilerin %80'inden fazlası için hastaneye yatışların, akciğer hasarının ve suni solunum sistemleri gereksiniminin ana nedeni olduğunu göstermektedir (Mueller *et al.* 2020).

Çalışmamızda, şiddetli COVID-19'lu hastalarda ortalama trombosit seviyesi 207.7671.01, şiddetli olmayan COVID-19'lu hastalarda ise 276,9556,78 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, şiddetli vakalarda tam kan sayımlarına (CBC) bakıldığında, çok düşük trombosit sayıları da tespit edilmiştir. Enfeksiyon ilk başladığında ve hasta hastaneye yatırıldığında, bazı vakalarda trombosit sayısı (26) 109/L'ye düşmüştür. Uygun tedavi aldıktan sonra, trombosit sayısı olağan aralığı olan (150-450) 109/L'ye ulaşmıştır. Durumu kötü olmayan hastalarda ise trombosit sayısı tipik eşiğin altına düşmeyerek ortalama trombosit sayısı aralığı (190- 330) 109/L olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç, Liu *et al.* (2020) trombosit sayısındaki önemli bir düşüşün, trombotik durumun ağırlaşmasının neden olduğu ölüm sayısındaki artışla bağlantılı olduğunu bulan araştırması tarafından desteklenmektedir. Ölen hastalarda trombosit sayısı (0-50) 109/L, şiddetli vakalarda (50-100) 109/L ve sağlıklı kişilerde (150) 109/L arasında değişmiştir. Diğer taraftan, COVID-19 hastalarında trombosit sayısında gözlemlenen artış, yaklaşmakta olan klinik iyileşmenin habercisi olabilir. Çalışmamızda, trombositopenisi olan COVID-19 katılımcılarında ortalama trombosit hacminin, trombosit sayısı sabit olanlardan önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ortalama trombosit hacmindeki artışlar, konjenital trombosit anormalliklerinin varlığından veya yokluğundan bağımsız olarak trombosit sayısındaki artışı gösterir.

Chabert *et al.* (2015)'e göre, viral enfeksiyon birkaç nedenden dolayı trombositopeniye bağlanabilir. Hipoproliferatif trombositopenili hastaların çoğunda ilerlemiş bir virüs

enfeksiyonu vardır. Viral enfeksiyonlara yanıt olarak trombositopeninin hızlı gelişimi, genellikle artmış trombosit klirensi/yıkımından kaynaklanır. Aktive edilmiş trombositler, viral antijen-antikor komplekslerine maruz kaldıktan veya konak kaynaklı inflamasyona maruz kaldıktan sonra retiküloendotelyal sistem tarafından dolaşımdan daha kolay temizlenir (Assinger 2014). Weyrich and Zimmerman (2013), trombositlerin alveoler kılcal bazal bariyeri sağlam tutmaya yardımcı olduğunu, ancak bir dizi farklı akciğer hastalığı ve sendromunda akciğerlere zarar verebileceklerini belirlemiştir.

4.2 İmmünolojik Çalışmalar

4.2.1 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalarında interlökin-12 (IL-12) serum seviyesi

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, IL-12 serum seviyeleri açısından şiddetli ve şiddetli olmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (P=0,05). IL-12'nin kan seviyeleri, ağır vakalarda (33,340 ng/L), şiddetli olmayan vakalara (20,913 ng/L) kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19'lu hastalarda IL-12 düzeyleri

Hastalar	**Hasta sayısı**	**IL-12 ng/L Ortalama± SD**	**P değeri**
Şiddetli	45	33,340±11,987	
Şiddetli değil	45	20,913±4,361	0,000

*Önemli (P≤0,05).

Bu çalışmada, solunum bakım ünitesindeki (RCU) hastaların, şiddetli olmayan hastalar için olağan sınıra yaklaştıklarında kan IL-12 seviyelerinde bir artış yaşadıklarını, bunun da bir bağışıklık fırtınasının ortaya çıkmasına neden olduğunu ve şiddetli COVID-19 hastalarında alveollerin tahrip olmasına katkıda bulunduğunu tespit etmiştir. Benzer şekilde, Long *et al.* (2020) asemptomatik COVID-19 hastalarının semptomatik hastalara göre daha düşük IL-12 serum ve diğer inflamatuar sitokin ve kemokin seviyelerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Tjan *et al.* (2021), aşırı semptomatik COVID-19 hastalarında IL-12'nin kan seviyelerinin düşük olmasına rağmen, asemptomatik ve hafif geçiren

kişilerde de düşük olduğunu bulmuştur. Bu sonuç çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla çelişmektedir. Şiddetli vakalar için elde edilen numune sayısı ve enfeksiyon sonrası numune toplama süresi, iki araştırma arasındaki tutarsızlığı açıklayabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar, şiddetli COVID-19 hastalarında, RCU'da kan IL-12 seviyeleri yükseldiğinde ve şiddetli olmayan hastalarda görülen seviyeye yaklaştığında alveoler hasarın meydana geldiğini göstermektedir. Bu durum büyük ölçüde IL-12'ye dayanır. Wahyuningtyas *et al.* (2021), IL-12'nin Th1 tipi bağışıklık tepkilerini ve hücre aracılı bağışıklığı iyileştirebileceğini göstermiştir. IL-12'nin, aktive edilmiş NK ve T hücrelerinin genişlemesini uyarmak, sitolitik aktivitelerini arttırmak ve bu hücre tipleri (T ve NK) tarafından interferon- (IFN-) üretimini teşvik etmek gibi çeşitli biyolojik etkileri vardır. IL-12'ye yanıt olarak sentezlenen interferon, vücudun doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık sistemleri arasındaki boşluğu kapatır.

IL-12 doğrudan SARS-COV reseptörüne bağlandığı için SARS-COV direncinde bir rolü olabilir (Floss *et al.* 2020). B1 ve B2'nin, aktive edilmiş T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde eksprese edilen IL-12R komplekslerinin bileşenleri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, hastalıkların inflamatuar semptomları IL-12 ile şiddetlenmektedir (Tang *et al.* 2008).

4.2.2 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalarında kan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE-2) seviyesi

Çalışmamızda, COVID-19'lu tüm hastalarda ACE-2'nin kan seviyeleri analiz edilmiştir. Şiddetli ve şiddetli olmayan vakalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (P=0,05). Kan ACE-2 seviyeleri şiddetli vakalarda 11,023 ng/mL, şiddetli olmayan vakalarda ise 5,443 ng/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19'lu hastalarda ACE-2 düzeyleri

Hastalar	**Hasta sayısı**	**ACE-2 ng/mL**	**P değeri**
		Ortalama± SD	
Şiddetli	45	11,023 ±5,731	
Şiddetli değil	45	5,443±1,211	0,000

*Önemli (P≤0,05)

Sriram and Insel (2020), ACE-2'nin tüm insan hücrelerinde ve dokularında bulunduğunu, ancak miktarın değiştiğini belirtmiştir. Yüksek ACE-2 seviyeleri diyabet, kardiyovasküler hastalık ve hipertansiyon riskinde artış ile ilişkilidir.

Araştırmalar, hastaların dolaşımdaki ANG II düzeylerinin, sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu (ve viral yük ile doğrusal olarak ilişkili olduğunu) belirlemiştir. Ayrıca, ACE-2 aşağı regülasyonu ile sistemik RAS dengesizliği arasında COV-2 enfeksiyonlarının SARS- COV'dan çoklu organ hasarının gelişimine yardımcı olan doğrudan bir bağlantı olduğunu göstermiştir.

COVID-19 hastalarından alınan lavaj sıvılarında ACE-2, renin ve kallikrein enzimlerinin artan ekspresyonu, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde bir düzensizlik olduğunu göstermiştir (Garvin *et al*. 2020).

Xu *et al.* (2020) yapmış oldukları çalışmada, böbrek, kan damarı, bağırsak ve akciğer epitel hücrelerinde yüksek ACE-2 ekspresyonunun, ciddi COVID-19 enfeksiyonu olan kişilerde görülen yüksek pnömoni ve bronşit oranlarına katkıda bulunabileceğini tespit etmiştir.

Linsky *et al.* (2020), ciddi COVID-19 vakaları olan hastaların kanında yüksek miktarlarda ACE-2 ve çözünür E-selektin tespit etmiştir. Viral titreler, ACE-2 aktivitesi normalin yaklaşık 40 katı üzerine çıktıktan sonra bile yüksek kaldığından, yüksek serum ACE-2'nin virüs bağlama bölgelerini inhibe ederek SARS-COV-2'ye karşı endojen bir savunma işlevi görebileceğini varsaymaktadır.

Kaseb *et al.* (2021) tarafından, COVID-19 enfeksiyonunun sıklığı ve şiddeti arasındaki farklılıkların doğrudan ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu durum, enfeksiyona yakalanma ve ciddi hastalık geçirme olasılığı yüksek olanları riskli sınıfta değerlendirilmesini öngörmektedir.

Ahmadpoor and Rostaing (2020)'a göre endozomlardaki TLR-7, hücrelere giren koronavirüsler için anahtar giriş bölgesidir. Her ikisi de belirli hedefleri öldürme yeteneği ile CD8+ T lenfositlerin gelişimini destekleyen tümör nekroz faktörü ve interlökin-6'nın salınmasına neden olur. Antikorlar, daha sonra antijene özgü B hücresinin gelişimini uyaran CD4+ yardımcı T hücreleri tarafından yapılır.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalığına sahip erkek ve kadın bireylerde ACE-2 ve IL-12 düzeyleri analizi sonucunda bu iki gruba dahil olan hastalar arasında cinsiyet bakımından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalarında cinsiyete göre ACE-2 ve IL-12 düzeylerinin karşılaştırılması

Parametreler		**Erkek Ortalama± S.D**	**Kadın Ortalama± S. D**	**P değeri**
IL-12	Şiddetli	35,044±12,948	31,636±10,962	0,341
ng/L	Şiddetli olmayan	21,164±4,838	20,722±3,873	0,372
ACE-2	Şiddetli	12,128±7,330	9,917±3,303	0,194
ng/mL	Şiddetli olmayan	5,411±0,996	5,403±1,409	0,166

*Önemli (P≤0,05)

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kadınları viral enfeksiyonlara karşı koruyan yüksek östrojen ve progesteron düzeyleri nedeniyle enfeksiyon oranı düşük kalırken, erkeklerde enfeksiyon oranlarının daha yüksek oranlarda belirlenmiştir (Hussain *et al.* 2020, Valencia 2020).

4.3 İmmünolojik Parametreler Arasındaki İlişki

Çalışmamızda, sitokin ve immün reseptörün doğrudan bir bağlantısı olup olmadığını belirlemek için COVID-19 hastalarının kanındaki ACE-2 ve IL-12 arasındaki ilişkiyi incelenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 COVID-19 hastalarında ACE-2 ve IL-12 arasındaki ilişkiler

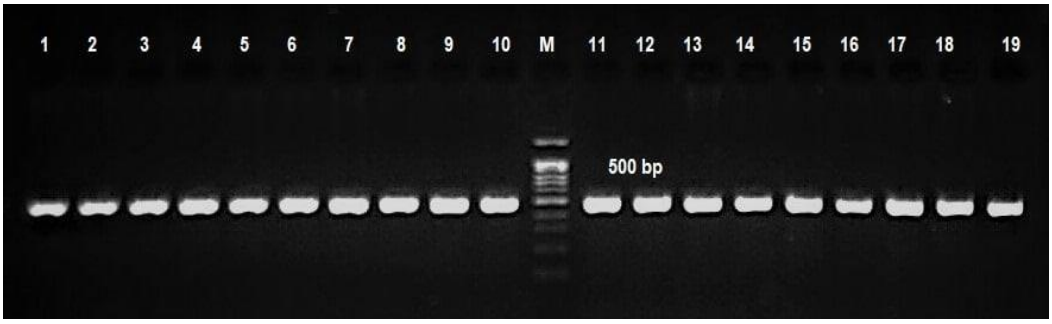
Korelasyon	r değeri	P değeri
IL-12&ACE-2	0,586**	0,000

** Önemli (0,01)

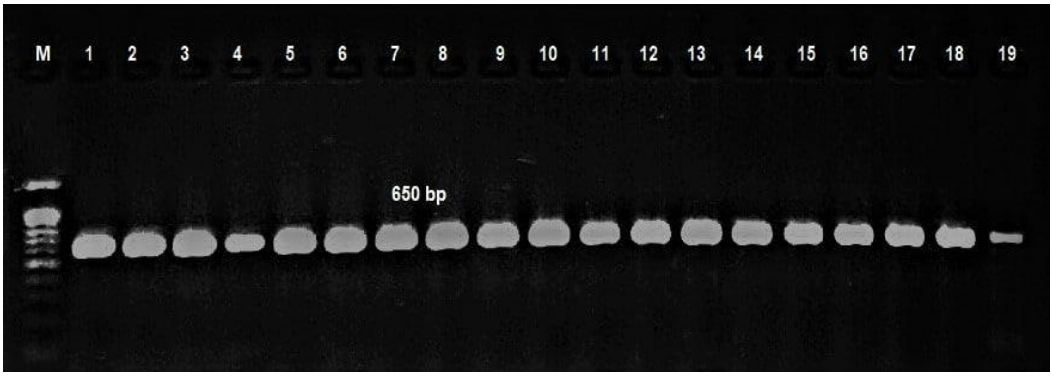
Bu veriler doğrultusunda, yeni Coronavirüs'ün insan vücuduna girdiğinde bir sitokin fırtınasına neden olduğu ve bunun COVID-19 hastalarında enfeksiyon şiddeti ve ölüm oranındaki artışla bağlantılı olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, elde edilen sonuçlar antijenlerin virüse özgü bağışıklık hücrelerine aracılık ettiği, hümoral ve hücresel bağışıklığı artırdığını gösteren diğer çalışmalarla da uyumluluk göstermektedir (Yao *et al.* 2020). Kontrolsüz bir sistemik inflamatuar reaksiyon olan sitokin fırtınası, koronavirüslere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. SARS-COV ve MERS-COV gibi COVID-19 enfeksiyonu, proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini uyararak güçlü bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmaktadır.

4.4 Genetik Araştırmalar

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de insan DNA'sından ekstrakte edilmiş ve PCR ile amplifiye edilmiş ACE-2-2, IL-12 A ve IL-12 B segmentleri, bunların tespit edildiği fragmanlar gösterilmektedir.



Şekil 4.1 ACE-2 amplikonunun (500bp) agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.2 IL-12A amplikonunun (650 bp) agaroz jel elektroforezi

Çalışmamızda incelenen ilk SNP olan IL-12A rs1460141649, şiddetli COVID-19'a sahip bireylerin %84,7 CC, %15,3 CG ve %0 GG genotipi taşıdığını ve C aleli için %0,43- G aleli için %0,03 ise alel frekansına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Şiddetli olmayan hastalardaki genotip dağılımı ise %0 GG, %7,5 CG ve %92,5 CC olarak tespit edilmiştir. Şiddetli olmayan durumlarda C-aleli frekansı %0,52 ve G-aleli frekansı ise %0,02 olarak belirlenmiştir. C aleli hem şiddetli hem de şiddetli olmayan durumlarda daha yaygındır, ancak C ve G allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmamıştır hatta G alelinin oranı hastalarda neredeyse hiç artmamıştır.

Bunlara ek olarak, şiddetli ve şiddetli olmayan hastalarda IL-12A rs1460141649 CG (OR: 0,445, Cl 95%:0,12-1,63, p=0,222) ve CC, GG genotiplerinin genotip dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Şiddetli ve şiddetli olmayan COVID-19 hastalarında IL-12A rs1460141649 genotiplerinin ve alellerinin dağılımları

IL-12A rs1460141649 Genotip		**Şiddetli N=46(%)**	**Şiddetli olmayan N=54(%)**	**P-Değer**	**Ortalama**	**CL=%95**
Vahşi tip CC		39 (84,7)	50 (92,5)	0,222	0,445	0,12-1,63
Heterozigot CG		7 (15,3)	4 (7,5)	0,222	2,243	0,61-8,21
Homozigot İyi oyun		0 (0)	0 (0)	0,937	1,172	0,02-60,2
Aleller (%)	C	85(0,43)	104(0,52)	0,236	0,467	0,13-1,64
	G	7 (0,03)	4 (0,02)	0,236	2,141	0,60-7,55

OR=ortalama oranı, Cl (%95)=güven aralığı, p-değeri<0,05

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler, ACE-2 ve IL-12'nin patojenik etkilerinin bulunduğunu göstermektedir. Şiddetli COVID-19 hastalığına sahip olan kişilerde meydana gelen sitokin fırtınası sırasında serum IL-12 ve ACE-2 seviyeleri yükselmektedir. Bu durum hastanın sağlığının kötüleşmesine ve ölüm olasılığının artmasına neden olmaktadır. Rs1460141649 konumundaki IL-12A geninde meydana gelen mutasyonların polimorfizmlerin COVID-19'lu kişiler için çok az tehdit oluşturduğu varsayılmaktadır. Fakat yapılan çalışmalar sonucunda IL-12A genindeki belirli bir SNP'nin COVID-19'lu kişiler için bir tehdit oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak L-12 A/B polimorfizminin şiddetli hastalıktaki potansiyel olarak önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu veriler doğrultusunda, İnterferon ve interferon gibi diğer sitokinlerin belirlenmesi ve bunların COVID-19'un ne kadar şiddetli olduğunu etkileyip etkilemediklerinin tespit edilmesi, özgüllüklerinin ve polimorfizmlerinin belirlenmesi, IL-6 serum seviyelerinin özellikle COVID-19'un ciddiyetine katkıda bulunup bulunmadığının ve daha spesifik olarak erken teşhis aracı olarak kullanılıp kullanılamayacağının değerlendirilmesi, HLA-DRB1'in COVID-19'un ciddiyetine katkıda bulunup bulunmadığının ve HLA-DRB1'i tanımlamanın yanı sıra özgüllüğünü ve polimorfizminin belirlenmesi ve son olarak COVID-19 enfeksiyonunu erken teşhis etmek için serumda ACE-2 ve IL-12'nin kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmadpoor, P. and Rostaing, L. 2020. Why the immune system fails to mount an adaptive immune response to a Covid-19 infection. Transplant International, 33(7): 824-825.

Annunziato, G. and Costantino, G. 2020. Antimicrobial peptides (AMPs): a patent review (2015–2020). Expert Opinion on Therapeutic Patents, 30(12): 931-947.

Ascierto, P. A., Fu, B. and Wei, H. 2021. IL-6 modulation for COVID-19: the right patients at the right time?. Journal for Immunotherapy of Cancer, 9(4).

Assinger, A. 2014. Platelets and infection–an emerging role of platelets in viral infection. Frontiers in Immunology, 5: 649.

Aw, D., Silva, A. B. and Palmer, D. B. 2007. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. Immunology, 120(4): 435-446.

Azkur, A. K., Akdis, M., Azkur, D., Sokolowska, M., Van de Veen, W., Brüggen, M. C., O'Mahony, L., Gao, Y., Nadeau, K. and Akdis, C. A. 2020. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. Allergy, 75(7): 1564-1581.

Bahar, A. A. and Ren, D. 2013. Antimicrobial peptides. Pharmaceuticals, 6(12): 1543-1575.

Bai, Y., Yao, L., Wei, T., Tian, F., Jin, D. Y., Chen, L. and Wang, M. 2020. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. Jama, 323(14): 1406-1407.

Bayati, A., Kumar, R., Francis, V. and McPherson, P. S. 2021. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. Journal of Biological Chemistry, 296.

Bergholdt, R., Ghandil, P., Johannesen, J., Kristiansen, O. P., Kockum, I., Luthman, H. and Pociot, F. 2004. Genetic and functional evaluation of an interleukin-12 polymorphism (IDDM18) in families with type 1 diabetes. Journal of Medical genetics, 41(4): 38-39.

Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R. and Albrecht, R. A. 2020. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. Cell, 181(5): 1036-1045.

Brenner, E. J., Ungaro, R. C., Colombel, J. F. and Kappelman, M. D. 2020. IBD in the COVID-19 era: the value of international collaboration. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 5(10): 887-888.

Bryce, C., Grimes, Z., Pujadas, E., Ahuja, S., Beasley, M. B., Albrecht, R. and Fowkes, M. 2020. Pathophysiology of SARS-CoV-2: targeting of endothelial cells renders a complex disease with thrombotic microangiopathy and aberrant immune response. The Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. MedRxiv, 2020: 5.

Ceraolo, C. and Giorgi, F. M. 2020. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. Journal of Medical Virology, 92(5): 522-528.

Chabert, A., Hamzeh-Cognasse, H., Pozzetto, B., Cognasse, F., Schattner, M., Gomez, R. M. and Garraud, O. 2015. Human platelets and their capacity of binding viruses: meaning and challenges?. BMC Immunology, 16: 1-8.

Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S. and Yuen, K. Y. 2020. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. Emerging Microbes & Infections, 9(1): 221-236.

Cheng, Z. J. and Shan, J. 2020. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. Infection, 48: 155-163.

Chitranshi, N., Gupta, V. K., Rajput, R., Godinez, A., Pushpitha, K., Shen, T. and Graham, S. L. 2020. Evolving geographic diversity in SARS-CoV2 and in silico analysis of replicating enzyme 3CLpro targeting repurposed drug candidates. Journal of Translational Medicine, 18(1): 1-15.

Conti, P. and Younes, A. 2020. Coronavirus COV-19/SARS-CoV-2 affects women less than men: Clinical response to viral infection. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 34(2): 339–343.

Cox, A., Cevik, H., Feldman, H. A., Canaday, L. M., Lakes, N. and Waggoner, S. N. 2021. Targeting natural killer cells to enhance vaccine responses. Trends in Pharmacological Sciences, 42(9): 789-801.

Crisci, C. D., Ardusso, L. R., Mossuz, A. and Müller, L. 2020. A precision medicine approach to SARS-CoV-2 pandemic management. Current Treatment Options in Allergy, 7: 422-440.

Cui, J., Li, F. and Shi, Z. L. 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews Microbiology, 17(3): 181-192.

Cummings, M. J., Baldwin, M. R., Abrams, D., Jacobson, S. D., Meyer, B. J., Balough, E. M. and O'Donnell, M. R. 2020. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. The Lancet, 395(10239): 1763-1770.

Da Silva, J. S., Gabriel-Costa, D., Wang, H., Ahmad, S., Sun, X., Varagic, J. and Groban, L. 2017. Blunting of cardioprotective actions of estrogen in female rodent heart linked to altered expression of cardiac tissue chymase and ACE2. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 18(3): 1470320317722270.

Das, S. K. 2020. The pathophysiology, diagnosis and treatment of corona virus disease 2019 (COVID-19). Indian Journal of Clinical Biochemistry, 35(4): 385-396

Devaux, C. A., Rolain, J. M. and Raoult, D. 2020. ACE2 receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 53(3): 425-435.

Dijksteel, G. S., Ulrich, M. M. W., Middelkoop, E. and Boekema, B. K. H. L. 2021. Review: lessons learned from clinical trials using antimicrobial peptides (AMPs). Frontiers in Microbiology, 12: 616979.

Din, M. A. U. and Boppana, L. K. T. 2020. An update on the 2019-nCoV outbreak. American Journal of Infection Control, 48(6): 713.

Evangelin, M. P., Krishna, B. G., Raga, S. Y., Vamsi, G. K., Zakeer, S. K. and Raju, K. N. 2020. A review: outbreak of Corona. Journal of Medical Biomedical and Applied Sciences, 8(4): 354-357.

Floss, D. M., Moll, J. M. and Scheller, J. 2020. IL-12 and IL-23—close relatives with structural homologies but distinct immunological functions. Cells, 9(10): 2184.

Fu, Y., Lin, Q., Zhang, Z. and Zhang, L. 2020. Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity. Acta Pharmaceutica Sinica B, 10(3): 414-433.

Garvin, M. R., Alvarez, C., Miller, J. I., Prates, E. T., Walker, A. M., Amos, B. K. and Jacobson, D. 2020. A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm. Elife, 9: e59177.

Ghosh, S. K. and Weinberg, A. 2021. Ramping up antimicrobial peptides against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. Frontiers in Molecular Biosciences, 8: 620806.

Goeijenbier, M., Van Wissen, M., Van De Weg, C., Jong, E., Gerdes, V. E. A., Meijers, J. C. M. and Van Gorp, E. C. M. 2012. Viral infections and mechanisms of thrombosis and bleeding. Journal of Medical Virology, 84(10): 1680-1696.

Greaney, A. J., Loes, A. N., Crawford, K. H., Starr, T. N., Malone, K. D., Chu, H. Y. and Bloom, J. D. 2021. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. Cell Host & Microbe, 29(3): 463-476.

Green, M. R. and Sambrook, J. 2012. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344 page, New York.

Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J. and Yan, Y. 2020. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak–an update on the status. Military Medical Research, 7: 1-10.

Guo, Z. D., Wang, Z. Y., Zhang, S. F., Li, X., Li, L., Li, C. and Chen, W. 2020. Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, Wuhan, China, 2020. Emerging Infectious Diseases, 26(7): 1586.

Hall, M. A., McGlinn, E., Coakley, G., Fisher, S. A., Boki, K., Middleton, D. and Lanchbury, J. S. 2000. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. Genes & Immunity, 1(3): 219-224.

Hanley, B., Naresh, K. N., Roufosse, C., Nicholson, A. G., Weir, J., Cooke, G. S. and Osborn, M. 2020. Histopathological findings and viral tropism in UK patients with severe fatal COVID-19: a post-mortem study. The Lancet Microbe, 1(6): e245-e253.

Harcourt, J., Tamin, A., Lu, X., Kamili, S., Sakthivel, S. K., Murray, J. and Thornburg, N. J. 2020. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States. Emerging Infectious Diseases, 26(6): 1266.

Hasanagic, S. and Serdarevic, F. 2020. Potential role of memantine in the prevention and treatment of COVID-19: Its antagonism of nicotinic acetylcholine receptors and beyond. European Respiratory Journal, 56(2).

Hikmet, F., Méar, L., Edvinsson, Å., Micke, P., Uhlén, M. and Lindskog, C. 2020. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. Molecular Systems Biology, 16(7): e9610.

Hildenbrand, K., Aschenbrenner, I., Franke, F. C., Devergne, O. and Feige, M. J. 2022. Biogenesis and engineering of interleukin 12 family cytokines. Trends in Biochemical Sciences, 22(1).

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. and Pöhlmann, S. 2020. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. Molecular Cell, 78(4): 779-784.

Hosseini, E. S., Kashani, N. R., Nikzad, H., Azadbakht, J., Bafrani, H. H. and Kashani, H. H. 2020. The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. Virology, 551: 1-9.

Huang, D., Cancilla, M. R. and Morahan, G. 2000. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. Genes & Immunity, 1(8): 515-520.

Hussain, A., Bhowmik, B. and Do Vale Moreira, N. C. 2020. COVID-19 and diabetes: Knowledge in progress. Diabetes Research and Clinical Practice, 162: 108142.

Isakbaeva, E. T., Khetsuriani, N., Beard, R. S., Peck, A., Erdman, D., Monroe, S. S. and SARS Investigation Group. 2004. SARS-associated coronavirus transmission, United States. Emerging Infectious Diseases, 10(2): 225.

Izaguirre, G. 2019. The proteolytic regulation of virus cell entry by furin and other proprotein convertases. Viruses, 11(9): 837.

Jacques, F. H. and Apedaile, E. 2020. Immunopathogenesis of COVID-19: Summary and possible interventions. Frontiers in Immunology, 11: 564925.

Jingchun, F., Xiaodong, L., Weimin, P., Mark, W. D. and Shisan, B. 2020. Epidemiology of 2019 novel coronavirus disease-19 in Gansu Province, China. Emerging Infectious Diseases, 26(6).

Kaseb, A. O., Mohamed, Y. I., Malek, A. E., Raad, I. I., Altameemi, L., Li, D. and Ma, Q. 2021. The impact of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression on the incidence and severity of COVID-19 infection. Pathogens, 10(3): 379.

Khavandi, S., Tabibzadeh, E., Naderan, M. and Shoar, S. 2020. Corona virus disease-19 (COVID-19) presenting as conjunctivitis: atypically high-risk during a pandemic. Contact Lens and Anterior Eye, 43(3): 211-212.

Khosroshahi, L. M., Rokni, M., Mokhtari, T. and Noorbakhsh, F. 2021. Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; An overview. International Immunopharmacology, 93: 107364.

Kim, J., Yang, Y. L., Jang, S. H. and Jang, Y. S. 2018. Human β-defensin 2 plays a regulatory role in innate antiviral immunity and is capable of potentiating the induction of antigen-specific immunity. Virology Journal, 15(1): 1-12.

Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S. and SARS Working Group. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. New England Journal of Medicine, 348(20): 1953-1966.

Kuba, K. 2010. Triology of ACE2: Apeptidase in the rennin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporter. Pharmacology and Therapeutics, 128: 119-128.

Lakbar, I., Luque-Paz, D., Mege, J. L., Einav, S. and Leone, M. 2020. COVID-19 gender susceptibility and outcomes: A systematic review. PLoS One, 15(11): e0241827.

Lee, S. H., Yang, J., Goddard, M. E., Visscher, P. M. and Wray, N. R. 2012. Estimation of pleiotropy between complex diseases using single-nucleotide polymorphism-derived genomic relationships and restricted maximum likelihood. Bioinformatics, 28(19): 2540-2542.

Leoni, V., Vannini, A., Gatta, V., Rambaldi, J., Sanapo, M., Barboni, C. and Campadelli-Fiume, G. 2018. A fully-virulent retargeted oncolytic HSV armed with IL-12 elicits local immunity and vaccine therapy towards distant tumors. PLoS Pathogens, 14(8): e1007209.

Leung, W. K., To, K. F., Chan, P. K., Chan, H. L., Wu, A. K., Lee, N. and Sung, J. J. 2003. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. Gastroenterology, 125(4): 1011-1017.

Li, H., Zhou, Y., Zhang, M., Wang, H., Zhao, Q. and Liu, J. 2020. Updated approaches against SARS-CoV-2. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(6): e00483-20.

Li, M. Y., Li, L., Zhang, Y. and Wang, X. S. 2020. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. Infectious Diseases of Poverty, 9(02): 23-29.

Li, R., Pei, S., Chen, B., Song, Y., Zhang, T., Yang, W. and Shaman, J. 2020. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). Science, 368(6490): 489-493.

Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A. and Farzan, M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature, 426(6965): 450-454.

Li, X., Sun, X. and Carmeliet, P. 2019. Hallmarks of endothelial cell metabolism in health and disease. Cell Metabolism, 30(3): 414-433.

Lian, J., Jin, X., Hao, S., Cai, H., Zhang, S., Zheng, L. and Yang, Y. 2020. Analysis of epidemiological and clinical features in older patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) outside Wuhan. Clinical Infectious Diseases, 71(15): 740-747.

Linsky, T. W., Vergara, R., Codina, N., Nelson, J. W., Walker, M. J., Su, W. and Silva, D. A. 2020. De novo design of potent and resilient hACE2 decoys to neutralize SARS-CoV-2. Science, 370(6521): 1208-1214.

Liu, Y., Sun, W., Guo, Y., Chen, L., Zhang, L., Zhao, S. and Yu, L. 2020. Association between platelet parameters and mortality in coronavirus disease 2019: Retrospective cohort study. Platelets, 31(4): 490-496.

Liu, Y., Yang, Y., Zhang, C., Huang, F., Wang, F., Yuan, J. and Liu, L. 2020. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. Science China Life Sciences, 63: 364-374.

Liu, Z. and Sun, C. B. 2020. Conjunctiva is not a preferred gateway of entry for SARS-CoV-2 to infect respiratory tract. Journal of Medical Virology, 92(9): 1410.

Long, Q., Tang, X. J., Shi, Q. L., Li, Q., Deng, H. J., Yuan, J., Hu, J. L., Xu, W. and Zhang, Y. 2020. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. Nature Medicine, 26: 1200-1204.

Lopera Maya, E. A., Van der Graaf, A., Lanting, P., Van der Geest, M., Fu, J., Swertz, M. and Lifelines Cohort Study. 2020. Lack of association between genetic variants at ACE2 and TMPRSS2 genes involved in SARS-CoV-2 infection and human quantitative phenotypes. Frontiers in Genetics, 11: 613.

Lowery, S. A., Sariol, A. and Perlman, S. 2021. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. Cell Host & Microbe, 29(7): 1052-1062.

Lu, J., Gu, J., Li, K., Xu, C., Su, W., Lai, Z. and Yang, Z. 2020. COVID-19 outbreak associated with air conditioning in restaurant, Guangzhou, China, 2020. Emerging Infectious Diseases, 26(7): 1628.

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H. and Tan, W. 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. The Lancet, 395(10224): 565-574.

Manne, B. K., Denorme, F., Middleton, E. A., Portier, I., Rowley, J. W., Stubben, C. and Campbell, R. A. 2020. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. Blood, 136(11): 1317-1329.

Mantlo, E., Bukreyeva, N., Maruyama, J., Paessler, S. and Huang, C. 2020. Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection. Antiviral Research, 179: 104811.

Marik, P. E., Kory, P. and Varon, J. 2020. Does vitamin D status impact mortality from SARS-CoV-2 infection?. Medicine in Drug Discovery, 6: 100041.

McCartney, D. and Byrne, D. G. 2020. Optimisation of vitamin D status for enhanced Immuno-protection against Covid-19. The Irish Medical Journal, 113(4): 58.

Messina, F. and Piaserico, S. 2020. SARS-CoV-2 infection in a psoriatic patient treated with IL-23 inhibitor. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 34(6): e254.

Meyer, M., Holfter, A., Ruebsteck, E., Gruell, H., Dewald, F., Koerner, R. W., Klein, F., Lehmann, C., Huenseler, C. and Weber, L. T. 2021. The alpha variant (B.1.1.7) of SARS-CoV-2 in Children: First Experience from 3544 Nucleic Acid Amplification Tests in a Cohort of Children in Germany. Viruses, 13(8): 1600.

Millet, J. K. and Whittaker, G. R. 2015. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. Virus Research, 202: 120-134.

Monteil, V., Kwon, H., Prado, P., Hagelkrüys, A., Wimmer, R. A., Stahl, M. and Penninger, J. M. 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. Cell, 181(4): 905-913.

Morahan, G., Huang, D., Ymer, S. I., Cancilla, M. R., Stephen, K., Dabadghao, P. and Colman, P. G. 2001. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. Nature Genetics, 27(2): 218-221.

Morens, D. M., Daszak, P. and Taubenberger, J. K. 2020. Escaping Pandora's box—another novel coronavirus. New England Journal of Medicine, 382(14): 1293-1295.

Mueller, A. L., McNamara, M. S. and Sinclair, D. A. 2020. Why does COVID-19 disproportionately affect older people?. Aging, 12(10): 9959.

Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M. and Reiner, S. L. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. Science, 292(5523): 1907-1910.

Murphy, K. M. and Reiner, S. L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. Nature Reviews Immunology, 2(12): 933-944.

Napoli, C., Tritto, I., Benincasa, G., Mansueto, G. and Ambrosio, G. 2020. Cardiovascular involvement during COVID-19 and clinical implications in elderly patients. A review. Annals of Medicine and Surgery, 57: 236-243.

Ni, L., Ye, F., Cheng, M. L., Feng, Y., Deng, Y. Q., Zhao, H. and Dong, C. 2020. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. Immunity, 52(6): 971-977.

Nyberg, T., Twohig, K. A., Harris, R. J., Seaman, S. R., Flannagan, J., Allen, H. and Presanis, A. M. 2021. Risk of hospital admission for patients with SARS-CoV-2 variant B. 1.1. 7: cohort analysis. BMJ, 373.

Olbei, M., Hautefort, I., Modos, D., Treveil, A., Poletti, M., Gul, L., Shannon- Lowe, C. D. and Korcsmaros, T. 2021. SARS-CoV-2 causes a different cytokine response compared to other cytokine storm-causing respiratory Viruses in severely ill patients. Frontiers in Immunology, 12: 629193.

Olsen, S. J., Chang, H. L., Cheung, T. Y. Y., Tang, A. F. Y., Fisk, T. L., Ooi, S. P. L. and Dowell, S. F. 2003. Transmission of the severe acute respiratory syndrome on aircraft. New England Journal of Medicine, 349(25): 2416-2422.

Ortolan, A., Lorenzin, M., Felicetti, M., Doria, A. and Ramonda, R. 2020. Does gender influence clinical expression and disease outcomes in COVID-19? A systematic review and meta-analysis. International Journal of Infectious Diseases, 99: 496-504.

Papa, G., Mallery, D. L., Albecka, A., Welch, L. G., Cattin-Ortolá, J., Luptak, J. and James, L. C. 2021. Furin cleavage of SARS-CoV-2 Spike promotes but is not essential for infection and cell-cell fusion. PLoS Pathogens, 17(1): e1009246.

Peng, S. L. 2006. The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity. Cellular and Molecular Immunology, 3(2): 87–95.

Priesemann, V., Balling, R., Brinkmann, M. M., Ciesek, S., Czypionka, T., Eckerle, I. and Szczurek, E. 2021. An action plan for pan-European defence against new SARS-CoV-2 variants. The Lancet, 397(10273): 469-470.

Prompetchara, E., Ketloy, C. and Palaga, T. 2020. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 38(1): 1-9

Pum, A., Ennemoser, M., Adage, T. and Kungl, A. J. 2021. Cytokines and chemokines in SARS-CoV-2 infections—therapeutic strategies targeting cytokine storm. Biomolecules, 11(1): 91.

Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y. and Tian, D. S. 2020. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. Clinical Infectious Diseases, 71(15): 762-768.

Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Garout, M. A., Al-Qaaneh, A. M., Sule, A. A., Tirupathi, R. and Dhama, K. 2021. Diverse immunological factors influencing pathogenesis in patients with COVID-19: a review on viral dissemination, immunotherapeutic options to counter cytokine storm and inflammatory responses. Pathogens, 10(5): 565.

Ramadan, N. and Shaib, H. 2019. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): A review. Germs, 9(1): 35.

Rice, G. I., Thomas, D. A., Grant, P. J., Turner, A. J. and Hooper, N. M. 2004. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. Biochemical Journal, 383(1): 45-51.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2006. Agarose gel electrophoresis. CSH Protocols, 2006(1).

Santa Cruz, A., Mendes-Frias, A., Oliveira, A. I., Dias, L., Matos, A. R., Carvalho, A. and Silvestre, R. 2021. Interleukin-6 is a biomarker for the development of fatal

severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 pneumonia. Frontiers in Immunology, 12: 613422.

Sarkar, M. and Saha, S. 2020. Structural insight into the role of novel SARS-CoV-2 E protein: A potential target for vaccine development and other therapeutic strategies. PloS One, 15(8): e0237300.

Schulien, I., Kemming, J., Oberhardt, V., Wild, K., Seidel, L. M., Killmer, S. and Neumann-Haefelin, C. 2021. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8+ T cells. Nature Medicine, 27(1): 78-85.

Seegers, D., Zwiers, A., Strober, W., Pena, A. S. and Bouma, G. 2002. A TaqI polymorphism in the 3′ UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. Genes & Immunity, 3(7): 419-423.

Sette, A. and Crotty, S. 2021. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. Cell, 184(4): 861-880.

Shchelkanov, M. Y., Popova, A. Y., Dedkov, V. G., Akimkin, V. G. and Maleyev, V. V. 2020. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). Russian journal of Infection and Immunity, 10(2): 221-246.

Sims, A. C., Baric, R. S., Yount, B., Burkett, S. E., Collins, P. L. and Pickles, R. J. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. Journal of Virology, 79(24): 15511-15524.

Sriram, K. and Insel, P. A. 2020. Risks of ACE inhibitor and ARB usage in COVID-19: evaluating the evidence. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 108(2): 236-241.

Sun, L., He, C., Nair, L., Yeung, J. and Egwuagu, C. E. 2015. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. Cytokine, 75(2): 249-255.

Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M. and Barnes, J. L. 2020. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. Nature Medicine, 26(5): 681-687.

Suryamohan, K., Diwanji, D., Stawiski, E. W., Gupta, R., Miersch, S., Liu, J. and Seshagiri, S. 2021. Human ACE2 receptor polymorphisms and altered susceptibility to SARS-CoV-2. Communications Biology, 4(1): 475.

Suzuki, K. and Hayashida, H. 2021. Effect of exercise intensity on cell-mediated immunity. Sports, 9(1): 8.

Tang, F., Liu, W., Zhang, F., Xin, Z. T., Wei, M. T., Zhang, P. H. and Cao, W. C. 2008. IL-12 RB1 genetic variants contribute to human susceptibility to severe acute respiratory syndrome infection among Chinese. PloS One, 3(5): e2183.

Teuwen, L. A., Geldhof, V., Pasut, A. and Carmeliet, P. 2020. COVID-19: the vasculature unleashed. Nature Reviews Immunology, 20(7): 389-391.

Thierry, A. R. and Roch, B. 2020. SARS-CoV2 may evade innate immune response, causing uncontrolled neutrophil extracellular traps formation and multi-organ failure. Clinical Science, 134(12): 1295-1300.

Tjan, L. H., Furukawa, K., Nagano, T., Kiriu, T., Nishimura, M., Arii, J. and Mori, Y. 2021. Early differences in cytokine production by severity of coronavirus disease 2019. The Journal of Infectious Diseases, 223(7): 1145-1149.

To, K. F. and Lo, A. W. 2004. Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): the tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 203(3): 740-743.

Trinchieri, G., Pflanz, S. and Kastelein, R. A. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. Immunity, 19(5): 641-644.

Twohig, K. A., Nyberg, T., Zaidi, A., Thelwall, S., Sinnathamby, M. A., Aliabadi, S. and Bashton, M. 2022. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B. 1.617. 2) compared with alpha (B. 1.1. 7) variants of concern: a cohort study. The Lancet Infectious Diseases, 22(1): 35-42.

Usui, T., Preiss, J. C., Kanno, Y., Yao, Z. J., Bream, J. H., O'Shea, J. J. and Strober, W. 2006. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. The Journal of Experimental Medicine, 203(3): 755-766.

Valencia, D. N. 2020. Brief review on COVID-19: the 2020 pandemic caused by SARS-CoV-2. Cureus, 12(3).

Vignali, D. A. and Kuchroo, V. K. 2012. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. Nature Immunology, 13(8): 722-728.

Wahyuningtyas, R., Lai, Y. S., Wu, M. L., Chen, H. W., Chung, W. B., Chaung, H. C. and Chang, K. T. 2021. Recombinant antigen of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-2) promotes M1 repolarization of porcine alveolar macrophages and Th1 type response. Vaccines, 9(9): 1009.

Walls, A. C., Fiala, B., Schäfer, A., Wrenn, S., Pham, M. N., Murphy, M. and King, N. P. 2020. Elicitation of potent neutralizing antibody responses by designed protein nanoparticle vaccines for SARS-CoV-2. Cell, 183(5): 1367-1382.

Wang, L., Wang, Y., Ye, D. and Liu, Q. 2020. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. International Journal of Antimicrobial Agents, 55(6): 105948.

Weyrich, A. S. and Zimmerman, G. A. 2013. Platelets in lung biology. Annual Review of Physiology, 75: 569-591.

WHO, World Health Organization. 2020. Coronavirus disease (COVID-19). World Health Organization, 2020.

Wilkerson, R. G., Adler, J. D., Shah, N. G. and Brown, R. 2020. Silent hypoxia: a harbinger of clinical deterioration in patients with COVID-19. The American Journal of Emergency Medicine, 38(10): 2243-e5.

Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O. and McLellan, J. S. 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science, 367(6483): 1260-1263.

Wu, Z., Hu, R., Zhang, C., Ren, W., Yu, A. and Zhou, X. 2020. Elevation of plasma angiotensin II level is a potential pathogenesis for the critically ill COVID-19 patients. Critical Care, 24: 1-3.

Xu, X. W., Wu, X. X., Jiang, X. G., Xu, K. J., Ying, L. J., Ma, C. L. and Li, L. J. 2020. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. BMJ, 368.

Xydakis, M. S., Dehgani-Mobaraki, P., Holbrook, E. H., Geisthoff, U. W., Bauer, C., Hautefort, C. and Hopkins, C. 2020. Smell and taste dysfunction in patients with COVID-19. The Lancet Infectious Diseases, 20(9): 1015-1016.

Yan, L., Whitelock-Wainwright, A., Guan, Q., Wen, G., Gašević, D. and Chen, G. 2021. Students' experience of online learning during the COVID-19 pandemic: A province-wide survey study. British Journal of Educational Technology, 52(5): 2038-2057.

Yang, J., Zheng, Y. A., Gou, X., Pu, K., Chen, Z., Guo, Q. and Zhou, Y. 2020. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. International Journal of Infectious Diseases, 94: 91-95.

Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., Sun, C. and Li, S. 2020. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. Cell, 183(3): 730-738.

Yuki, K., Fujiogi, M. and Koutsogiannaki, S. 2020. COVID-19 pathophysiology: A review. Clinical Immunology, 215: 108427.

Zanoni, I. 2021. Interfering with SARS-CoV-2: are interferons friends or foes in COVID-19?. Current Opinion in Virology, 50: 119-127.

Zeng, L., Xia, S., Yuan, W., Yan, K., Xiao, F., Shao, J. and Zhou, W. 2020. Neonatal early-onset infection with SARS-CoV-2 in 33 neonates born to mothers with COVID-19 in Wuhan, China. JAMA Pediatrics, 174(7): 722-725.

Zhou, Y., Wang, W., Sun, Y., Qian, W., Liu, Z., Wang, R. and Zhang, X. 2020. The prevalence and risk factors of psychological disturbances of frontline medical staff in china under the COVID-19 epidemic: workload should be concerned. Journal of Affective Disorders, 277: 510-514.

Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., Hao, J. and Han, Z. 2020. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. Frontiers of Medicine, 14: 185-192.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Taisir Ali Yasir ALBOHWALA

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Mazaya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013-2017