

ŞEYDANUR DOĞAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KEMOKİN GEN VARYANTLARININ COVID-19
HASTALIK ŞİDDETİ ÜZERİNE ETKİSİ**

ŞEYDANUR DOĞAN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SELÇUK DAŞDEMİR**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF

Sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ'a ve bölümdeki tüm hocalarıma,

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca destekleriyle katkı sağlayan, araştırmanın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, yapabileceklerim konusunda bana cesaret veren, sabır ve ilgiyle her durumda desteğiyle yanımda olan çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Selçuk DAŞDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hastane laboratuvarlarından kan örnekleri temini için izin veren Kanuni Sultan Süleyman Hastanesi Başhekim Yardımcısı Uzm. Dr. Cemal KAZEZOĞLU'na, hastanede birçok konuda cömert yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Selen Zeliha MART KÖMÜRCÜ'ye, hasta kanlarının alınmasını sağlayan Uzm. Dr. Merve Damla KORKMAZ'a, Uzm. Dr. Sevim YAVAŞ'a, Uzm. Dr. Ebru KAYA'ya, Doç. Dr. Serkan DOĞAN'a,

Tez çalışmamın deneysel aşamasında büyük yardımları için Bursa Genetik Tanı Merkezi'nden İrem ARSLAN'a

Verilerin istatistiksel hesapları konusunda emeği ve yardımını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Hayriye ŞENTÜRK'e

Tezimin deney kısmında ve yazımı sırasındaki yardımları ve destekleri için çok değerli arkadaşlarım, biyolog Özge YILDIZ ve biyolog Damla ÇELEBİ'ye,

Hayatım boyunca beni destekleyen, güvenen ve birçok fedakarlıkla bugüne gelmemde büyük emekleri olan sevgili anneme, babama ve ağabeylerime,

En içten teşekkür, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37693

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KORONAVİRÜSLER.....	4
2.1.1. Koronavirüs Tarihçesi.....	4
2.1.2. SARS-CoV-2	5
2.1.2.1. SARS-CoV-2 Yapısı	5
2.1.2.2. SARS-CoV-2 Enfeksiyonu	7
2.1.2.3. SARS-CoV-2 ve İnflamasyon.....	8
2.2. Sitokin Fırtınası.....	11
2.3. KEMOKİNLER	12
2.3.1. Kemokinlerin Moleküler Yapısı	13
2.3.2. Kemokin Reseptörleri	14
2.3.3. Kemokinler ve İnflamasyon.....	14
2.4. Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP-1 /CCL2)	15
2.4.1. MCP-1 A-2518G Polimorfizmi	16
2.5. CC Kemokin Reseptör 2 (CCR2)	16
2.5.1. CCR2 V64I Polimorfizmi	17
2.6. CC Kemokin Reseptör 5 (CCR5)	17
2.6.1. CCR5 Delta32 ve CCR5 -2459G/A Polimorfizimleri	17
2.7. Stromal Hücre Kaynaklı Faktör-1 (SDF-1)	18
2.7.1. SDF1-3' A Polimorfizmi	19

	vi
2.8. CXCR4 Kemokin Reseptör 4 (CXCR4).....	19
2.8.1. CXCR4 C138T Polimorfizmi	19
2.9. KEMOKİNLER VE HASTALIK ŞİDDETİ	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Hasta ve Kontrol Grupları.....	22
3.2. Gereçler.....	22
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	22
3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar	23
3.3. Yöntemler	23
3.3.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu.....	23
3.3.2. DNA Saflık ve Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	24
3.3.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	24
3.3.4. CCR5 delta32 için Agaroza Jel Elektroforez Aşaması	27
3.3.5. Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Genotiplerin Belirlenmesi	28
3.3.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	29
3.3.7. Sanger Sekans (Dizi Analizi) Yöntemi.....	29
3.3.7.1. Sanger Sekans PCR.....	30
3.3.7.2. Sekans Ürünlerinin Sefadeks ile Saflaştırılması	32
3.3.7.3. Saflaştırılan Sekans Ürünlerinin Kapiller Elektroforezi	33
3.3.8. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Genotiplerin Belirlenmesi.....	33
3.3.9. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Demografik Veriler	40
4.2. Kemokin Gen Varyantlarına Ait Veriler.....	42
5. TARTIŞMA	47
KAYNAKLAR	54
FORMLAR	67
İNTEHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	71

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: PCR primerleri	25
Tablo 3-2: PCR Primer hazırlama.....	26
Tablo 3-3: PCR Master Mix	26
Tablo 3-4: PCR parametreleri	27
Tablo 3-5: Sanger Sekans PCR primer hazırlama tablosu	30
Tablo 3-6: ABI Prism Big Dye™ terminator kitindeki floresan işaretli ddNTP'ler	31
Tablo 3-7: Sanger Sekans PCR Reaksiyonu bileşenleri	31
Tablo 3-8: Sanger Sekans PCR parametreleri	32
Tablo 3-9: ABI 3130 xl Genetik Analizör cihaz özellikleri.....	33
Tablo 4-1: COVID-19 Hasta Gruplarında Yaş, Cinsiyet ortalamaları ve Aşı durumu...	40
Tablo 4-2: COVID-19 Hasta Gruplarının Komorbidite oranları	41
Tablo 4-3: COVID-19 Hasta Gruplarının Kan tahlili değerleri ve oranları.....	42
Tablo 4-4: COVID-19 hasta gruplarında MCP 1-A2518G genotip ve allel dağılımları	43
Tablo 4-5: COVID-19 hasta gruplarında CCR2-V64I genotip dağılımları	43
Tablo 4-6: COVID-19 hasta gruplarında CCR5-DELTA32 genotip dağılımları	44
Tablo 4-7: COVID-19 hasta gruplarında CCR5-A55029G genotip dağılımları.....	44
Tablo 4-8: COVID-19 hasta gruplarında SDF-1-3'A genotip dağılımları.....	45
Tablo 4-9: COVID-19 hasta gruplarında CXCR4-C138T genotip dağılımları	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: SARS-CoV-2 virüsünün genom ve virüs yapısı.....	7
Şekil 2-2: SARS-CoV-2 virüsünün konak hücreye girişi ve yaşam döngüsü.....	8
Şekil 2-3: SARS-CoV-2 virüsünün konağa girişi ve sonrasında gelişen inflamatuvar yanıtlar	9
Şekil 2-4: SARS-CoV-2 Virüsüyle meydana gelen Sitokin Fırtınası	12
Şekil 3-1: CCR5 delta32 genotiplerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü	28
Şekil 3-2: Sanger sekans yöntemi aşamaları.....	29
Şekil 3-3: COVID-19 vakasına ait heterozigot (GA) genotipli MCP-1 rs1024611 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	34
Şekil 3-4: COVID-19 vakasına ait homozigot (AA) genotipli MCP-1 rs1024611 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	35
Şekil 3-5: COVID-19 vakasına ait homozigot (GG) genotipli CCR2 rs1799864 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	35
Şekil 3-6: COVID-19 vakasına ait heterozigot (GA) genotipli CCR2 rs1799864 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	36
Şekil 3-7: COVID-19 vakasına ait homozigot (AA) genotipli CCR5 rs1799987 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	36
Şekil 3-8: COVID-19 vakasına ait heterozigot (GA) genotipli CCR5 rs1799987 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	37
Şekil 3-9: COVID-19 vakasına ait homozigot (GG) genotipli SDF-1 rs1801157 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	37
Şekil 3-10: COVID-19 vakasına ait heterozigot (GA) genotipli SDF-1 rs1801157 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	38
Şekil 3-11: COVID-19 vakasına ait homozigot (CC) genotipli CXCR4 rs2228014 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	38
Şekil 3-12: COVID-19 vakasına ait heterozigot (CT) genotipli CXCR4 rs2228014 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.....	39

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

WHO/DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

COVID-19: Coronavirus Hastalığı 2019

SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

S proteini: Başak proteini

E proteini: Zarf protein

M proteini: Membran proteini

N proteini: Nükleokapsid proteini

ACE-2: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2

TMPRSS2: Transmembran proteaz serin 2

DAMP: Hasarla İlişkili Moleküler Paternler

IL-6: İnterlökin-6

IP-10: İnterferon Gamma ile İndüklenebilir Protein 10

MIP1a: Makrofaj inflamatuvar Protein 1 alfa

MCP1: Monosit Kemotaktik Protein-1

CCR5: Kemokin Reseptör-5

CCL5: CC Motifli Kemokin Ligand 5

CCR2: Kemokin Reseptör 2

SDF-1: Stromal Hücre Kaynaklı Faktör-1

CXCR4: Kemokin Reseptör 4

HCoV: İnsan Koronavirüsü

ICTV: Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi

MERS: Orta Doğu Solunum Sendromu

2019-nCoV: 2019-yeni koronavirüs

ERGIC: Endoplazmik Retikulum-Golgi Ara Bölgesi

VLP: Virüs Benzeri Parçacık

TLR: Toll benzeri reseptörler

IFN: İnterferon

RPPA: Ters Faz Protein Diziler

BT: Bilgisayarlı Tomografi
ARDS: Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
TGF β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TNF α : Tümör nekroz faktörü
BAL: Bronkoalveolar Lavaj Sıvısı
cCKR: Konvensiyonel Kemokin Reseptörleri
kDa: Kilodalton
CC: CC Motifli Kemokin
CXC: CXC Motifli Kemokin
ELR: Glutamat-Lösin-Arginin Motifi
DARC: Duffy Antijeni Kemokin Reseptörü
LPS: Lipopolisakkaritler
G-C SF: Sistemik Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
PI3K: Fosfoinositid-3 Kinaz
HIV: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
AIDS: Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
UTR: Çevrilmemiş Bölge
SFTSV: Trombositopeni ile Şiddetli Ateş Sendrom Virüsü
RSV: Respiratuvar Sinsitiyal Virüs
EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBE: Tris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat
CRP: C-reaktif protein
CRS: Sitokin Salınımı Sendromu
FDA: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
PBMC: Periferik Kan Mononükleer Hücre
TWAS: Transkriptom Çapında İlişkilendirme Çalışması
İBH: İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
SLE: Sistemik Lupus Eritematozus
SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

ART: Antiretroviral tedavi

INR: İmmün Yanıt Vermeyen

GWAS: Genom Çapında ilişkilendirme Çalışmaları

BNV: Batı Nil Virüsü

AML: Akut Lenfoblastik Lösemi



ÖZET

Doğan Ş. Kemokin Gen Varyantlarının COVID-19 Hastalık Şiddeti Üzerine Etkisi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2022.

Tüm dünyada pandemi olarak ilan edilen COVID-19 hastalığının progresyonu ve tedavisi hakkında çok kapsamlı araştırmalar yapılmış ancak özellikle virüsün enfekte bireylerde farklı hastalık şiddetine neden olması durumu hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. İmmün profilin virüse karşı oluşturulan yanıtta önemli olduğu ve özellikle kemokinlerin COVID-19 hastalığının şiddet seyrini belirlemede önemli rol oynadığı çalışmalarda gösterilmiştir.

Biz de çalışmamıza 60 hafif, 59 şiddetli, 60 kritik COVID-19 hastası dahil ettik. MCP-1-A2518G, SDF-1-3'A, CCR5-delta32, CCR5-A55029G, CXCR4-C138T ve CCR2-V64I kemokin polimorfizmlerini inceleyerek bireylerde genetik olarak belirlenen immün sistem hücrelerinin virüse karşı oluşturduğu yanıtlar ile gelişen hastalık şiddet seyri arasında ilişki kurmayı amaçladık. Varyasyonların tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)/Sanger dizileme analizi yapıldı. Çalışmamız sonucunda MCP-1-A2518G G alleli taşıyıcılarının kritik hasta grubunda oldukça sık gözlemlendiği, GA genotipi hafif ve kritik hasta gruplarında karşılaştırıldığında kritik hasta grubunda önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde GA genotipi şiddetli hasta grubunda hafif hasta grubuna göre daha sık görüldüğü saptanmıştır. CCR2-V64I wt alleli için kritik ve hafif hasta grubu karşılaştırıldığında wt/wt genotipinin kritik hastalarda önemli ölçüde düşük olduğu görülmüştür. Benzer şekilde kritik ve şiddetli hasta grubu karşılaştırıldığında 64I/64I genotipinin kritik hasta grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. COVID-19 hastalığı şiddetiyle ilişkilendirdiğimiz diğer kemokin polimorfizmlerinde herhangi anlamlı bir sonuca ulaşamadık.

Sonuç olarak çalışma verilerimiz MCP-1-A2518G ve CCR2-V64I polimorfizmlerinin COVID-19 hastalık şiddetinin artmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, farklı popülasyonlarda gen ekspresyon seviyelerine odaklanarak yapılan daha büyük çalışmalar, bu mekanizma rolünün daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kemokinler, COVID-19 Şiddet Seyri, MCP-1, CCR2, Polimorfizm

Bu Çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37693

ABSTRACT

Dogan S. The Effect of Chemokine Gene Variants on COVID-19 Disease Severity, Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology. Degree. Istanbul. 2022.

Comprehensive research has been carried out on the progression and treatment of the COVID-19 disease, which has been declared a pandemic all over the world, but the fact that the virus causes different disease severity in infected individuals has still not been fully clarified. It has been shown in studies that the immune profile is important in the response to the virus and especially chemokines play an important role in determining the severity of the COVID-19 disease.

We included 60 mild, 59 severe and 60 critical COVID-19 patients in our study. By examining the chemokine polymorphisms of MCP-1-A2518G, SDF-1-3'A, CCR5-delta32, CCR5-A55029G, CXCR4-C138T and CCR2-V64I, the relationship between the responses of immune system cells against the virus and the severity of the disease that develops in individuals. We aimed to establish Polymerase chain reaction (PCR)/Sanger sequencing analysis was performed to detect variations. As a result of our study, it was observed that carriers of the MCP-1-A2518G G allele were observed quite frequently in the critically ill group, and the GA genotype was significantly higher in the critically ill group when compared in mild and critically ill groups. Similarly, GA genotype was found to be more common in the severe patient group than in the mild patient group. Comparing the critical and mild patient groups for the CCR2-V64I wt allele, the wt/wt genotype was found to be significantly lower in critically ill patients. Similarly, when the critical and severe patient groups were compared, it was observed that the 64I/64I genotype was significantly higher in the critically ill group. We did not find any significant results in other chemokine polymorphisms that we associate with COVID-19 disease severity.

In conclusion, our study data showed that MCP-1-A2518G and CCR2-V64I polymorphisms are associated with increased severity of COVID-19 disease. However, larger studies focusing on gene expression levels in different populations will help to better understand this mechanism role.

Keywords: Chemokines, COVID-19 Severity, MCP-1, CCR2, Polymorphism

This Study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit.
Project No: 37693

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından COVID-19 (Coronavirus Hastalığı 2019) olarak isimlendirilen SARS-CoV-2 (Şiddetli Akut Solunum Yetmezliği Sendromu-2) enfeksiyon salgını, 11 Mart 2020'de 4000'den fazla insanın ölümüne neden olmasıyla WHO tarafından pandemi olarak kabul edilmiştir. Yeni bir koronavirüs sebebiyle ortaya çıkan COVID-19 hastalığı ilk kez 2019'un aralık ayında Çin'in Wuhan kentinde görülmüştür. Oldukça bulaşıcı olan bu virüs asıl olarak solunum yolu enfeksiyonuna neden olur, bununla birlikte kuru öksürük, yorgunluk, ateş, nefes darlığı ve kas ağrısı da görülen hastalık semptomlarıdır (1).

SARS-CoV-2, Coronavirinae alt ailesi ve betakoronavirüs cinsi içerisinde yer alan tek iplikli, segmentsiz, pozitif polarite gösteren, zarflı pleomorfik RNA virüsleridir (2). Başak (S), zarf (E), membran (M), nükleokapsid(N) olmak üzere 4 yapısal proteinden oluşur. SARS-CoV2'nin viral yüzeyindeki S proteini için fonksiyonel bir reseptör olarak kabul edilen ACE-2 (Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2), akciğer epitel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve TMPRSS2(Transmembran proteaz serin 2) ile birlikte virüsün hücreye girişini sağlar. SARS-CoV-2, ACE2 ve TMPRSS2 yüzey reseptörlerine sahip hücreleri enfekte ettiğinde, virüs replikasyonuna, virüs salınmasına ve hücreden hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP) salınımına yol açar. Bunları endotel hücreleri, epitel hücreleri ve alveolar makrofajlar tanır ardından kemokinler ve pro-enflamatuar sitokinlerin (IL-6, IP-10, MIP1a, MCP-1) sentezini tetikler. Bu proteinler, makrofajları, monositleri ve T hücrelerini enflamasyon alanına yönlendirir ve daha fazla enflamasyon yanıtının oluşmasını indükler. Disfonksiyonel immün yanıtında özellikle akciğer dokusu olmak üzere çoklu organ hasarına neden olan aşırı sitokin salınımıyla birlikte sitokin fırtınasını başlatabilirler (3).

İnflamasyon yanıtın yükselmesine ve COVID-19 hastalarının klinik seyrinin şiddetlenmesine sebep olan kemokinlerin (kemotaktik sitokinler), asıl görevi hücre trafiğini düzenlemektir. Küçük heparin bağlayıcı protein olan kemokinler, yapısal olarak sitokinlerle bağlantılı geniş bir peptid ailesi üyesidir (60-100 amino asit). Kemokinler, inflamasyon ve homeostasiyi sağlamak için lökositlerin hücresel hareketlerini yönetmektedir. İnflamasyon süresince kemokinlerin salınımında önemli ölçüde artış

gözlenmektedir. İnflamasyon sürecinde kandaki kemokinler, lökositlerin dokuya geçmesini ve inflamasyon bölgesinde yoğunlaşmasını ve aktifleşmesini sağlar (4).

Virüsün dokulara verdiği zararlar ve aşırı inflamasyon yanıtıyla artan hastalık şiddeti herhangi bir yaşta sağlıklı kişilerde de gözlenebilir; ancak şiddetli hastalık durumu çoğunlukla ileri ya veya altta yatan komorbiditesi olan yetişkinlerde görülmektedir. Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nde çalışılan yaklaşık olarak 44.500 vakanın hastalık şiddeti değerlendirilmiştir. Bu vakaların:

- %81'inin klinik seyri hafif (hafif pnömoni veya pnömoni yok)
- %14'ünün klinik seyri şiddetli (örn. Hipoksi, dispne veya 2448 saatte yapılan görüntülemelerde %50'den fazla akciğer tutulumu)
- %5'inin klinik seyri kritik olarak (örn. Şok, solunum yetmezliği, veya multiorgan disfonksiyonu gibi) bildirilmiştir (5).

COVID-19 hastalığında, klinikte hastalık Şiddet seyrini hafif-şiddetli kritik olarak belirleyen ve virüs enfeksiyonunun bireyler arasında farklı immün yanıt oluşturmaya neden olabilecek genetik nedenler araştırılmaktadır (5). Yapılan çalışmalara göre bazı kemokin varyantları (CCR5, CCL2/MCP-1, CCL5\RANTES) hastalığın immünolojisiyle ve patolojisiyle ilişkili olabilmektedir.

SARS-CoV enfeksiyonu hastalarıyla yapılan bir çalışmada, şiddetli (hastaneye yatırılması gereken) COVID-19 hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılmış, inflamatuvar yanıtlarını ölçmek için CCR5 kemokin varyant analizi yapılmıştır. CCR5 kemokin reseptör ekspresyonunun azalmasına neden olan rs333 polimorfizminin COVID-19 hastalarında inflamatuvar yanıtı zayıflatarak, koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (6). COVID-19 hastalarıyla yapılan başka bir çalışmada, kemokin olan MCP-1(Monosit Kemoatraktan-1)'in rs1024611 polimorfizmine bağlı olarak, MCP-1 kemokin miktarının artmasıyla akciğer hücrelerinde aşırı enflamasyon yanıtı sonucu organ hasarı gözlenmiştir (7). Bu çalışmalar bize COVID-19 hastalığında inflamatuvar yanıt seviyelerini etkileyen kemokin ve kemokin reseptörlerinin klinik olarak farklı hastalık şiddetlerine neden olabileceğini düşündürmüştür ancak kemokin varyantı ve hastalık şiddeti ilişkisi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yapacağımız çalışmada literatürde ilk kez olarak MCP1\CCL2 (rs1024611), CCR2 (rs1799864), CCR5 (rs333, rs1799987) ve SDF-1\CXCL12 (rs1801157), CXCR4

(rs2228014) kemokin gen varyantları 18 yaş ve üstü COVID-19 hastalarında (n=180) incelenecektir. Bu kemokin varyantlarının farklı inflamasyon yanıtlarına sebep olma durumu ile klinikte hafif-şiddetli-kritik seyirli vakalar oluşması arasındaki ilişki araştırılacaktır. Böylece, hastalığın moleküler yönünün ve patogenezinin daha iyi anlaşılmasında ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine katkı sağlaması hedeflenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. KORONAVİRÜSLER

Koronavirüsler karakteristik olarak az sayıda konakçıya sahiptirler ve birçok hayvanda hastalığa sebep olabilirler. Bulaşıcı gastroenterit virüsü, kedi enfeksiyöz peritonit virüsü ve bulaşıcı bronşit virüsü önemli patojen koronavirüslerdendir. Bu virüsler hayvanlar aracılığıyla insanlara bulaştığında ciddi enfeksiyon hastalıklarına neden olurlar. Koronavirüsler farklı genomik yapılarına ve konakçı ile antijenik ilişkisine bağlı olarak çeşitli gruplara ayrılmıştır (8).

Memeli virüslerini kapsayan grup 1 ve grup 2 koronavirüsleridir. İnsanlarda özellikle üst solunum yolu enfeksiyonlarında %30 gibi önemli bir etkisi bulunan koronavirüsler, bu iki grup içerisinde yer alırlar (örn: HCoV-229E ve HCoV-OC43) (9). ICTV (Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi) Coronavirinae alt familyasını 4 cinse ayırmıştır. Bunlar Alfa, Beta, Gamma, Delta korona virüsleridir ve insan koronavirüsleri de bu cinsler arasında Alfa ve Beta içinde sınıflandırılmıştır (8).

Beta koronavirüslerinin son yıllarda neden olduğu pnömoni salgınları SARS ve MERS (Orta Doğu Solunum Sendromu)'dir. SARS-CoV salgını ilk olarak 2002 yılında Çin'de ortaya çıkmış ve ardından dünyaya yayılarak %11 oranında ölümle sonuçlanan enfeksiyonlara neden olmuştur. MERS-CoV salgını ise ilk olarak 2012 yılında Suudi Arabistan'da başlamıştır (1). Ardından diğer ülkelere yayılarak ciddi enfeksiyonlara yol açmıştır. 2014-2015 yıllarında artış gösteren MERS-CoV salgını, 2015 yılı mayıs ayında Suudi Arabistan'da 1016 enfekte kişi ile en yüksek vaka sayısına ulaşp 447 ölüm ile %44 ölüm oranıyla sonuçlanmıştır (10).

2.1.1. Koronavirüs Tarihçesi

İnsan koronavirüslerinin tanımlanması ilk kez Tyrell ve Bynoe'nin 1965 yılında B814 isimli bir virüsü keşfetmesiyle başlamıştır. Bu virüs soğuk algınlığı olan kişilerden alınan örneklerle elde edilen embriyonik trakeal organ kültürlerinde saptanmıştır (11). Serolojik tekniklerle yapılan çalışmalar sonucunda insan koronavirüsleri epidemiyolojisi ile ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. Koronavirüs enfeksiyonlarının ılıman iklimli bölgelerde kış ve ilkbahar aylarında daha sık görüldüğü

bildirilmiştir. Çalışma verileri, koronavirüslerin genel olarak yetişkin soğuk algınlığı vakalarına yaklaşık %15 civarında sebep olduğunu göstermiştir (12).

Koronavirüs ailesinin neden olduğu semptomlar uzun süre tam olarak saptanamadı ve yıllarca sadece soğuk algınlığına neden olan virüsler arasında sayıldı. 2002-2003 yıllarında SARS virüsünün ortaya çıkmasıyla koronavirüs ailesi daha iyi tanınmış ve ciddi klinik bulgulara neden olabileceği görülmüştür. Ayrıca SARS'tan sonra 2012 yılında MERS virüsünün de ortaya çıkmasıyla beraber koronavirüslerin bulaş yolları da daha açık hale gelmiştir, hayvandan insana ve insandan insana geçebileceği öne sürülmüştür. Çin'in Wuhan kentindeki deniz ürünleri ve çeşitli canlı hayvan satan bir pazarda 29 Aralık 2019 tarihinde pazarı ziyaret eden müşterilerde ve o gün pazar yerinde görevli 4 kişide pnömoni bulguları görülmesi ile birlikte salgın şüphesi nedeniyle Çin hükümeti gerekli araştırmaları yapmaya başlamıştır. Ve çalışmalarla birlikte hastalık nedeninin yeni bir koronavirüs tipi olduğu tespit edilmiş, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 12 Ocak 2020'de, bu yeni tip virüse 2019-nCoV (2019- yeni koronavirüs) ismini vermiştir. Bu virüsün tanımlanmasıyla birlikte tüm dünyada pandemi ilan edilmiş ve hastalığa karşı tedavi ve aşı geliştirme çalışmalarına başlanmıştır (2).

2.1.2. SARS-CoV-2

2.1.2.1. SARS-CoV-2 Yapısı

RNA yapıda, zarflı bir virüs olan SARS-CoV'nin 29.881 bp uzunluğunda ve 9860 amino asidi kodlayan genomunun karakterizasyonu için metagenomik yeni nesil dizileme tekniği kullanılmıştır. Gen fragmanlarından çeşitli yapısal ve yapısal olmayan proteinler eksprese edilir. Virüs yapısal proteinleri kodlayan S, E, M, N genleri ve yapısal olmayan proteinleri kodlayan ORF gen bölgesine sahiptir.

S Proteini

Virüsün konakçı hücrelerindeki membran reseptörlerine bağlanmasını ve virüs-konakçı hücre membranı füzyonuna katılan S proteini, konak hücresine virüs alımını kolaylaştırır. S proteini konakçı hücre yönelimini belirleyen önemli bir proteindir. S proteini temel olarak S1, S2 ilmeklerine sahiptir ve S1 proteini konakçı membran reseptörüne bağlanırken S2 proteini membran füzyonunu sağlar.

Konak hücre tropizmini belirleyen önemli viral proteindir. S proteininin S1 ve S2 ilmekleri vardır, temel olarak S1 proteini konak hücre reseptörüne bağlanmasından, S2 proteini ise membran füzyonundan sorumludur.

N Proteini

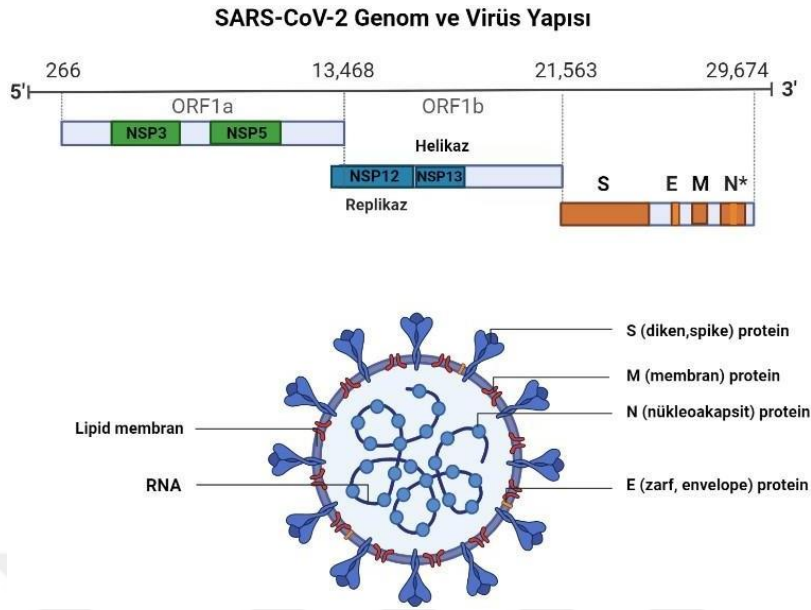
N proteini virüsün nükleokapsidini oluşturmasıyla beraber viral RNA'nın konakçı hücresinde replike ve transkribe edilmesinde görev alır. Viral genomun bağlanabilmesi için iki farklı bölgesi vardır. Replikasyon-transkripsiyon kompleksine genomun bağlanmasını kolaylaştırmak için nsp3 proteinine bağlanarak viryon yapımına yardımcı olur. Ayrıca N proteini konakçının viral enfeksiyona verdiği hücresel bağışıklık tepkisinde de önemli rol oynar. N proteini interferon agonisti olarak çalışır ve virüsün konakçı bağışıklığından kaçmasına yardım eder.

M Proteini

M proteini virüs zarf yapısını belirler ve en fazla olan yapısal proteindir. Bu protein diğer tüm yapısal proteinlerle birlikte etkileşebilir ve koronavirüs sisteminin ana düzenleyicisi olarak düşünülür. S ve M proteinlerinin etkileşimi ile S proteini ER-Golgi ara bölgesinde (ERGIC) tutularak oluşan yeni viryonlara dahil edilir ve bu protein etkileşimi viryon birleşmesi için çok önemlidir. M-N protein etkileşimi nükleokapsidi ve viryonların RNA'sını stabilize ederek viral birleşmenin tamamlanmasında rol oynar. M proteini ile E proteini birlikte viral zarfı oluşturur ve bu protein etkileşimi ile VLP üretimi ve salınımı indüklenmiş olur. Ayrıca konakçıda TLR sinyal mekanizması ile IFN-beta yolağını aktive ederek konakçının virüse karşı daha duyarlı olmasını sağlar (2,13).

E Proteini

E proteini, viral parçaların birleştirilmesi (assembly) sürecinde, virüs salımında ve hastalık patogenezinde önemli rol oynamasıyla beraber, hücre içinde çeşitli proteinlerle çalışarak çeşitli olaylarda görev alır. Özellikle tomurcuklanma ile virüsün hücre dışına salınımında önemli bir faktördür (2).



Şekil 2-1: SARS-CoV-2 virüsünün genom ve virüs yapısı

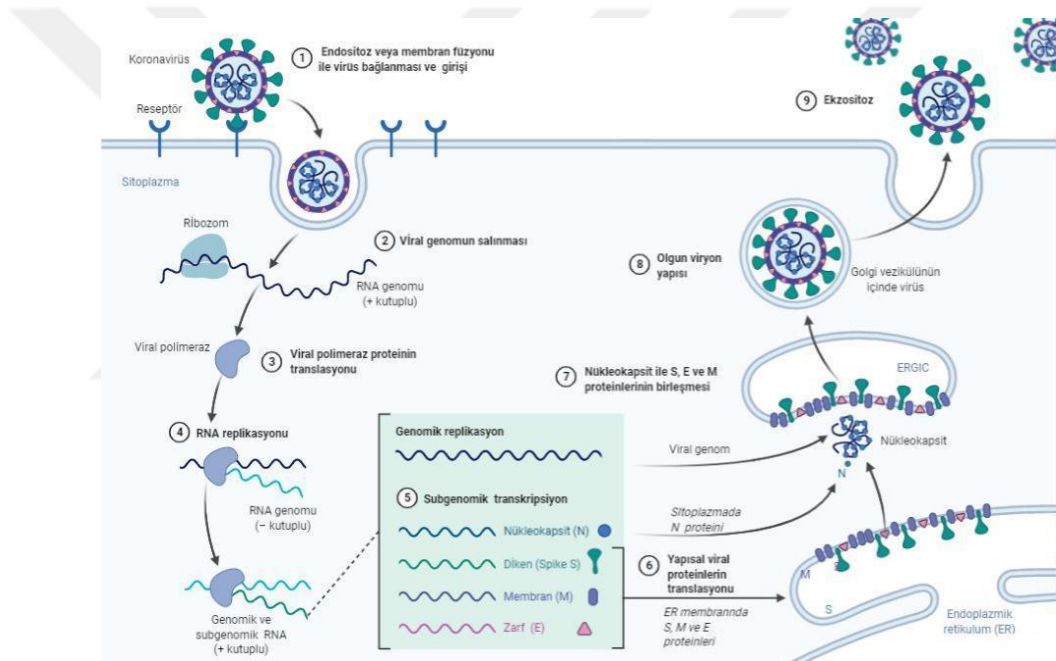
(şekil biorender.com ile tasarlanmıştır.)

2.1.2.2. SARS-CoV-2 Enfeksiyonu

Koronavirüsler de diğer virüsler gibi genom replikasyonu, soy viryonlarını çoğaltmak ve belli hastalıkları oluşturmak için konakçılara ihtiyaçları vardır. Pozitif kutuplu, yaklaşık büyüklüğü ~30 kb olan koronavirüsler çok farklı konakçıları enfekte edebilirler (14). Genel anlamda α , β , γ ve δ cinslerine ayrılan bu virüslerden α ve β cinsi sadece memeli canlıları enfekte ederler. Koronavirüs α cinsinden NL63 ve 229E virüsleri insan krup hastalığına ve soğuk algınlığına neden olur. Ayrıca SARS-CoV ve MERS-CoV virüsleri de koronavirüs β cinsine aittir (15,16).

Virüsün konak hücrelerindeki yaşam döngüsü bağlanma, hücreye giriş (penetrasyon), biyosentez, maturasyon (olgunlaşma) ve salınım olmak üzere 5 adımda gerçekleşir. Virüsler konak hücrelerinin ilgili reseptörlerine tutunduklarında (bağlanma), penetrasyon veya endositoz aracılığıyla konak hücrelerine girerler. Virüs kendi içeriğini girdiği hücreye bıraktığında, viral RNA nükleusa giderek replikasyonu başlatır. Virüs mRNA'sı, viral proteinleri oluşturmak (biyosentez) için gereklidir. Ardından olgunlaşma denilen evrede yeni viral parçacıklar oluşturularak virüs yapısı tamamlanır ve hücre dışına salınmaya hazır hale getirilir (17).

SARS-CoV-2'nin S proteinine bağlanan ve virüs için işlevsel bir reseptör olarak tanımlanan ACE2 ekspresyonlarının kalp, böbrek, akciğer, ileum ve mesanede yüksek olduğu bildirilmiştir. Özellikle akciğer epitel hücrelerinde ACE2 reseptörünün çok yüksek miktarda ekspresyonu olduğu belirtilmiştir (18). SARS-CoV-2 ACE2'ye bağlandığında spike proteini aktive olmak için sırasıyla iki aşamalı proteaz klevajına ihtiyaç duyar (19). Bu aşamada birçok farklı proteaz spike proteinini parçalayarak aktivasyonu sağlayabilir. SARS-CoV-2 S1/S2 bölgesinde bulunan furin klevaj alanı ("RPPA" dizisi) bu virüse özgü önemli özelliklerdendir ve bu bölge TMPRSS2, katepsin L gibi proteazlar ile parçalanabilir (20,21).



Şekil 2-2: SARS-CoV-2 virüsünün konak hücreye girişi ve yaşam döngüsü

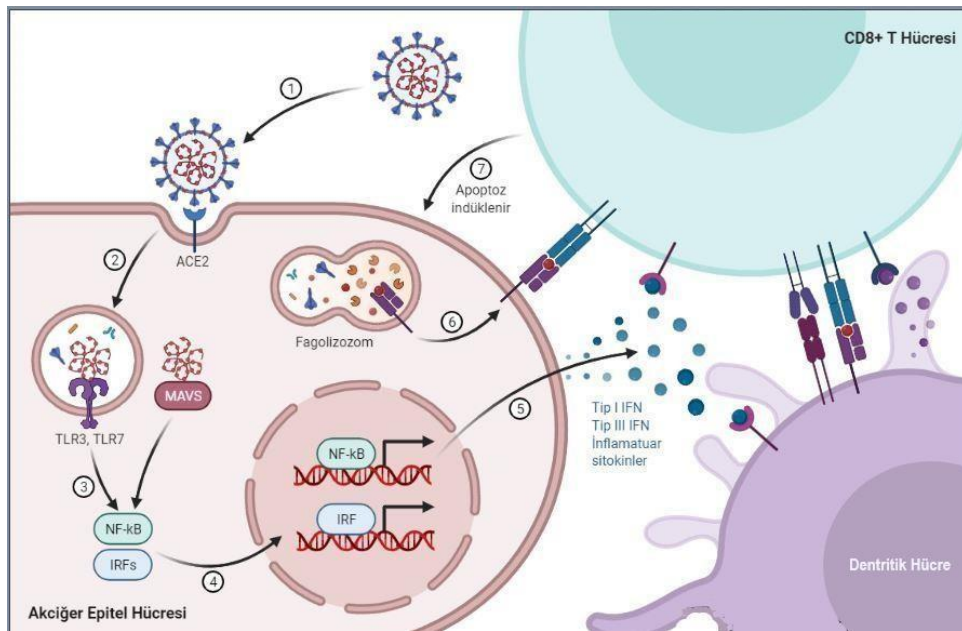
(Şekil biorender.com ile tasarlanmıştır.)

2.1.2.3. SARS-CoV-2 ve İnflamasyon

SARS-CoV-2 enfeksiyonuyla birlikte hastalarda soğuk algınlığı belirtileri, çoklu organ yetmezliği ve solunum yetmezliği gibi farklı semptomlar gelişebilir. BT (Bilgisayarlı tomografi) ile enfeksiyonun karakteristik belirtisi akciğerde buzlu cam görünümü klinik olarak hafif semptomlu kişilerde bile gözlenebilir (22). ACE2 reseptörünün akciğerde yüksek miktarda eksprese olduğu bölge alveolar boşluktaki epitel hücreleridir ve virüsün bu hücrelere girmesiyle hücreler zarar görerek yok olur.

Bu sebepten akciğer tahribatının ilk evreleri solunum sisteminin distal bölgelerinde gerçekleşmektedir (23).

Solunum sisteminin üç temel bileşeni olan epitel hücreler, dentritik hücreler ve alveolar makrofajlardır. Epitel hücrelerin belirli kısımlarında bulunan dentritik hücreler ve makrofajlar, virüsle mücadele doğal bağışıklık tepkisini oluştururlar. Ardından adaptif bağışıklık yanıtlarının başlaması için makrofajlar ve dentritik hücreler T hücrelerine antijen sunarlar. Makrofajların ve dentritik hücrelerin fagositoz edebilme yeteneği sayesinde virüs ile enfekte olmuş epitel hücreleri, dentritik hücreler veya makrofajlar ile fagosit edildikçe T hücrelerine antijen sunumu gerçekleştirilir. Antijen sunumu ile aktive olan CD8+ T hücreleri virüs ile enfekte olmuş hücreleri direkt olarak öldürebilir ve CD4+ T hücreleri B hücrelerini aktive ederek virüs spesifik antikor üretimini indükler (16). SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile erken B hücresi yanıtları IgM ve IgA üretimidir ancak bu antikorların hastalığın progresyonunu değiştirip değiştirmeyeceği hala belli değildir. Hastalığın 7-10 günlerinde üretilen IgG antikorları ise virüsün eliminasyonunu sağlayacak immün yanıtları oluşturabilir (24). Ancak bu sırada, IgG antikorlarının virüse karşı fazla miktarda üretiminin aşırı sitokin salınımına neden olmasıyla birlikte hastalardaki ölüm riskini arttırabileceği öngörülmüştür (25).



Şekil 2-3: SARS-CoV-2 virüsünün konağa girişi ve sonrasında gelişen inflammatuar yanıtlar

(Şekil Birorender.com ile tasarlanmıştır.)

Antikor üreten plazma hücreleri, sitotoksik ve yardımcı T hücreleri gibi ‘‘immün efektör’’ hücrelerden üretilen proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler ile vücuttaki inflamasyon bölgesine yönlendirilecek bağışıklık hücrelerini düzenlerler. Ancak bu proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımı aşırı miktarda arttığında ‘‘sitokin fırtınası’’ oluşabilir (26). COVID-19 hastalarında özellikle serviste yatan klinik olarak şiddetli ve yoğun bakım ünitesinde tedavi gören kritik seyirli hastalarda, sitokin fırtınası sıkça karşılaşılan bir durumdur (27). Sitokin fırtınası uzun süre devam eden hastalarda, bağışıklık sistemi bozulur ve kendi hücrelerine saldırmaya başlar. Bunun devamında da sıkça Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS) ve çoklu organ yetmezliği görülür. İmmün efektör hücrelerden salınan IFN γ , IFN α , IL-6, IL-1 β , IL-18, IL-12, IL-33, TGF β , TNF α , proinflamatuvar sitokinlerin ve CXCL8, CXCL10, CXCL9, CCL2, CCL5, CCL3 kemokinlerin sitokin fırtınası durumunda aşırı miktarda yükseldiği gözlenmiştir (26).

T yardımcı hücresi-1(Th1) aktivasyonunu sağlayan MCP-1, sitokin fırtınası sırasında oldukça fazla artar. Yapılan çalışmalara göre yoğun bakım hastalarında MCP-1'in serumdaki miktarı, yoğun bakım tedavisi gerekmeyen hastalara göre artış göstermiştir (28). Bu çalışmalardan yola çıkarak, COVID-19 hastalarında MCP-1 düzeyinin hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

2.2. COVID-19 Hastalık Şiddetini Etkileyen Faktörler

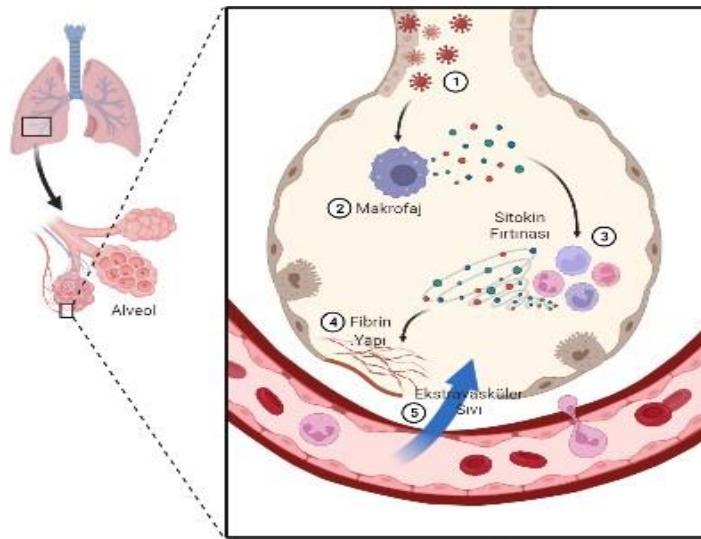
COVID-19 hastalığı semptomları genel olarak kuru öksürük, ateş, halsizlik, eklem ağrıları, boğaz ağrısı, mide bulantısı şeklinde seyreder. Ancak bazı hastalarda bu bulguların hiçbiri görülemeyebileceği gibi (asemptomatik), bazı hastalarda klinik bulgular daha şiddetli olabilmektedir, hasta oksijen tedavisi ihtiyacı duyabilmekte ve ilerleyen durumlarda kritik hastalar hayatını kaybedebilmektedir. Son zamanlarda COVID-19 ile ilgili yapılan çalışmalara göre yaşlı hastalarda ARDS geliştirme riskinin önemli derecede artmış olduğu gözlenmiştir (101). Çin’de hastanede tedavi gören 813 COVID-19 hastasının dahil edildiği çalışmada hastaların çoğunlukla erkek olduğu, hastaların yaklaşık yarısında komorbiditenin bulunduğu ve en sık komorbiditenin hipertansiyon olduğu bildirilmiştir. Bu hasta grubundan ölen hastaların istatistiğine bakıldığında diyabet ve koroner arter oranlarının yüksek olduğu saptanmıştır ayrıca yaş

faktörü, lenfopeni, artmış ALT(Alanin Aminotransferaz), D-dimer ve ferritin seviyelerinin de ölüm ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (103).

COVID-19'a karşı toplum bağışıklığı kazandırılması için son yıllarda hız kazanan aşı uygulamaları ile şiddetli hastalık belirtilerini önlenmesi ve ölüm oranlarının azaltılması hedeflenmiştir. Aşı ile birlikte bazı solunum yolu hastalıklarının geliştiğine yönelik bulgular olsa da bu veriler henüz kesinleşmemiştir. Bununla birlikte efektif bir COVID-19 aşısının hastalıkla birlikte ortaya çıkabilecek şiddetli klinik bulguları hafiflettiği görüşü savunulmaktadır (134).

2.3. Sitokin Fırtınası

Birçok patojene, virüslere karşı oluşturulan doğal ve adaptif bağışıklığın geliştirilmesinde ve düzenlenmesinde sitokin-kemokin aktivasyonu oldukça önemlidir. Ancak viral veya bakteriyel enfeksiyon sonrasında yükselen sitokin ve kemokin oranı yani hipersitokinemi ile birlikte, enfeksiyon bölgesinde oluşan inflamasyonun sistemik yayılmasıyla beraber düzensiz bir hiperinflamatuvar yanıt oluşur. Hipersitokinemide TNF ve IL-1 β gibi akut yanıtı sitokinlerin, IL-8 ve MCP-1 gibi kemotaktik sitokinlerin seviyesi oldukça yükselir. Bunun sonucunda, yüksek sitokin ve kemokin seviyeleri sonucunda endotel disfonksiyonu, damar yapısında hasar ve metabolik bozukluklar meydana gelir ve çoklu organ sistemleri de zarar görür.



Şekil 2-4: SARS-CoV-2 Virüsüyle meydana gelen Sitokin Fırtınası

1.SARS-CoV-2 virüsü akciğer hücrelerini enfekte ediyor, 2. Makrofajlar ile birlikte diğer bağışıklık hücreleri de virüsü tespit eder ve sitokinler üretir, 3. Sitokinler, lökositler gibi bağışıklık hücrelerini uyarır, daha fazla sitokin üretilir ve bu akciğer hücrelerine zarar veren bir inflamasyon döngüsü yaratır, 4. Fibrin oluşumu yoluyla hasar meydana gelebilir. 5.Zayıflamış kan damarları, ekstrasvasküler sıvının sızmasına ve akciğer boşluklarını doldurmasına izin vererek solunum yetmezliğine yol açar. (Şekil Biorender.com ile tasarlanmıştır).

SARS-CoV-2 enfeksiyonuyla beraber, dendritik hücreler ve makrofajlar, lenfositöz (lenfosit yüksekliği) ve sitokin salınımı ile beraber ilk immün yanıtın oluşmasını sağlar. Ardından, devam eden inflamatuvar yanıtta SARS-CoV-2 enfeksiyonuyla mücadele eden lenfositler yok edilmeye başlar. Bu sebepten özellikle yoğun bakım tedavisine ihtiyaç duyan kritik hastalarda, lenfosit seviyelerinin düşük olması durumuna yani lenfopeniye sıkça rastlanabilir (29). Diğer taraftan sitokin üretiminin düzensizleşmesiyle beraber immün efektör hücreler sağlıklı hücrelere ve beklendiği üzere önce akciğer hücrelerine zarar verir. Daha sonra böbrekler, kan damarları, kalp ve beyin gibi organlara da zarar verebilir. Sitokin fırtınasının hasarı ilk olarak akciğerde epitel dokunun bozulmasıyla başlar. Epitel dokunun bozulması sonucunda, akciğerler ve diğer dokular daha fazla enfeksiyona maruz kalır (30). İn vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen kanıtlara göre; enfeksiyon bölgesine toplanan T hücreleri ile indüklenen kemokinlerin bağışıklık tepkisinin gidişatını belirlemede önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (31,32).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile pro-inflamatuvar geribildirim döngüsünün sürekli pozitif olması, sitokin fırtınasına neden olan sitokin ve kemokinlerin fazla miktarda üretilmesine neden olur. COVID-19 hastalarından alınan bronkoalveolar lavaj sıvısının (BAL) incelenmesiyle CCL2, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL7, IL1 β , IL6, TNF α , CXCL8, CCL20, CXCL1, CXCL3 kemokinlerinin ve sitokinlerin aşırı eksprese olduğu birçok çalışma ile doğrulanmıştır (33-36). Bu aşırı derecede ekspresyon orta dereceli COVID-19 hastalarından ziyade kritik hastalarda daha yüksek oranda gözlenmiştir (36). Ayrıca Lucas ve arkadaşları COVID-19 sebebiyle ölen hastalarda, hastalığın erken dönemlerinde CCL1, CCL2, CCL4, CCL8, CCL21, CXCL9 seviyelerinin yükseldiğini bildirmiştir (37).

2.4. KEMOKİNLER

Kemokinlerin keşfi 1980'lerin sonlarında IL-8 (CXCL8) ve MCP-1 (CCL2)'nin tanımlanmasıyla başlamıştır (38). Ardından kemokinler üzerine yapılan çalışmalar hız

kazanmıştır ve 1990'ların başında monosit ve nötrofil moleküllerini çeken bazı kemokinler olduğu bulunmuştur. Bu keşifler, inflamasyon bölgesindeki aktif hücrelerin artmış transkriptleri ile daha da kolaylaşarak ilerlemiştir (39).

Keşfedilen kemokinlerin birçoğu, inflamatuvar yanıt sırasında lökosit yönlendirmesinde önemli rol oynadığı için inflamatuvar kemokinler olarak sınıflandırılmıştır. Ardından 1990'ların ortalarında EST (İfade Edilen Sekans Etiket) veritabanı analizleriyle birlikte 'ikinci tur' kemokin belirleme çalışmaları başlamıştır. Saptanan kemokinler inflamasyonu tetiklemiyor yapıcı bir görev üstleniyordur. Bu lenfositler, dentritik hücrelerin alt grupları için kemotaktiktir ve görevleri belirli organlar ile sınırlıdır. 'ikinci tur' kemokinlerin belirlenen işlevleri, bağışıklık sisteminin işleyişi ve organizasyonu hakkında önemli ipuçları vermiştir. Homeostatik kemokinlerin birçoğu, bağışıklık sistemi organizasyonunda önemli rol oynar: lenfosit ve dendritik hücre alt gruplarının yönlendirmesinin ve lokalizasyonunun 'ana düzenleyicileri' olarak belirlenmiştir (40,41).

Şimdiye kadar kemokinlerin işlevi için en çok bahsedilen görev lökositlerin hücre göçünü sağlamalarıdır. Ancak kemokinlerin aktivitesi yalnızca bu fonksiyonla ve bu tipleriyle sınırlı değildir. Konvensiyonel Kemokin Reseptörleri (cCKR)'nin lökositler üzerindeki etkisiyle proliferasyon, farklılaşma, sitokin üretimi, degranülasyon ve solunum patlaması gibi birçok biyolojik süreçler yönetilebilir. Ayrıca birkaç kemokin direkt olarak antimikrobiyal etkiye sahiptir. cCKR'ler, epitel hücreleri, mezenkimal hücreler, endotelial hücreler, nöronlar ve astrositler gibi lökosit olmayan birçok hücre tarafından eksprese edilebilir ve bu hücreler kemotaktik faktörlere çeşitli yanıtlar da üretebilir. Birçok kemokin, anjiyojenik etki gösteren farklı hücre alt gruplarıyla birlikte anjiyogenezin düzenlenmesinde doğrudan etkiye sahiptir. Kemokinlerin özellikle kemotaksi ile hücre hareketini yönlendirdiği bilinmektedir. Bazı durumlarda kemokinler, hücre gruplarının göçünü (toplu göç olarak isimlendirilebilir) yönetebilir ve hücre adezyonunu uyararak göç hareketinin durmasını sağlayabilir (42).

2.4.1. Kemokinlerin Moleküler Yapısı

Kemokinler genellikle 7-15 kDa moleküler ağırlığına sahip küçük protein ailesidir. Kemokinler ve reseptörleri immün hücrelerinin göçünü ve işlevlerini kontrol eder (43). Kemokinler, yapılarındaki sistein kalıntılarının bulunduğu molekülün N-terminal ucundaki yerleşimine göre alt gruplara ayrılırlar (44). Beta-kemokinleri olarak

bilinen CC kemokin genleri 17. kromozomu tarafından kodlanır. Bu kemokinler monositleri, bazofilleri, eozinofilleri, NK (doğal öldürücü) hücreleri ve T lenfositlerini indüklerler. Alfa-kemokinleri olarak bilinen CXC ailesinde, ilk iki sistein kalıntısı arasına giren bir amino asid molekülü vardır. CXC kemokin genleri 4.3-5 kromozomu tarafından kodlanır, esasen nötrofil kemotaksisini sağlayan bu kemokinler, N-terminal ucunda Glu-Leu-Arg (ELR) dizisi bulundurarak reseptör bağlanabilmesini sağlar (43).

2.4.2. Kemokin Reseptörleri

Kemokinler membran bağımlı moleküllerdir, yapılarında 7-transmembran domainleri içerir ve G-proteinleri ile çiftler oluştururlar. “G-protein-coupled protein” olarak tanımlanan kemokin reseptörleri, lökosit üzerinde eksprese olur. Kemokinler bu hedef hücreler üzerindeki G-protein-coupled reseptörlerine bağlanarak, hücre-içi sinyal mekanizmasını başlatırlar ve hücre göçü ile hücre aktivasyonu indüklenmiş olur (45).

Bugüne kadar tanımlanan 20 kemokin reseptörü farklı tipteki lökositler üzerinde eksprese olur. Bazı kemokin reseptörleri de epitel hücreler, endotel hücreleri, non-hematopoietik hücreler, nöronlar ve astrositler gibi hücreler üzerinde eksprese olmaktadır (46). Bu bulgular kemokinlerin, lökosit kemotaksisi haricinde başka önemli işlevlerinin de bulunduğu göstermektedir. Birçok kemokin birden fazla kemokine bağlanabilse de, CC kemokin reseptörleri yalnızca CC kemokinine bağlanabilir ve CXC kemokin reseptörleri de aynı şekilde yalnızca CXC kemokinine bağlanabilmektedir.

Kemokin reseptörleri, “G-protein-coupled reseptör”lerin diğer üyeleri gibi işlevsel olarak fosfolipazlarla G-proteinlerine bağlıdır. Kemokinler ayrıca 2 çeşit sinyal oluşturmayan moleküllerle de etkileşime geçebilmektedir. Bunlardan ilki, eritrosit kemokin reseptör ve DARC (Duffy antijeni kemokin reseptörü) olarak bilinmektedir. İkincisi ise, heparin sülfat proteoglikanlardır (47).

2.4.3. Kemokinler ve İnflamasyon

Akut inflamasyon, immün yanıtın başlaması için immün hücrelerin periferik bölgelerden lenfoid organlara doğru geçmesi ve efektör hücrelerin inflamasyonun olduğu alana doğru koordineli bir şekilde göçü ile tanımlanabilen karmaşık bir süreçtir. İmmün hücrelerin bu şekilde koordineli göçü, inflamasyon alanındaki hedef hücreler üzerinde bulunan inflamatuvar kemokinlerin ve ilgili reseptörlerin indüklenerek eksprese

olmasını gerektirir. Kemoatraktanlar ve immün hücreler arasındaki bu etkileşim bir dizi biyokimyasal ve hücrel düzenlenme olaylarını sağlar (43). İnflamasyon süresince kemokinlerin salınmasında önemli derecede artış gözlenmektedir. Bu sırada birçok dokuda (akciğer, beyin, deri, eklem, meninges, böbrek, gastrointestinal sistem, kan damarları) kemokinler tespit edilmiştir ve bu dokularda kemokin sentezi artışını tetikleyen önemli uyaranlar IL-1, TNF- α , IL-4, IFN- γ ve LPS'dir (47).

Kemokinler bilindiği üzere, inflamasyon sırasında kemik iliği, kan ve periferik dokular arasında doğuştan gelen immün hücre akışını kontrol eder. Aynı zamanda bu süreçte, sistemik granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) seviyelerine bağlı olarak kemik iliğinde üretilen CXCL12 kemokin ekspresyonunda azalma ve nötrofillerde üretilen CXCR4 kemokin reseptöründe de aynı şekilde azalma gözlenir. Aktive olmuş CXCR4 reseptörünün CXCR2'ye geçişi ile nötrofillerin kemik iliğinden kana salınması indüklenir (43). Kemokinler bu gibi olaylarla inflamasyon sürecinin yönetilmesinde en önemli faktörlerden biri olmaktadır.

Bazı viral patojenlere maruz kalma sonucu örneğin, SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 hastalığı sırasında CD8+T hücreleri, pulmoner interstisyuma infiltre olan toplam inflamatuvar hücrelerin %80'ini oluşturur ve enfekte olmuş hücrelerden virüsün temizlenmesinde, immün hasarın olduğu bölgeye inflamatuvar hücrelerin çağrılmasında önemli bir rol oynar. T yardımcı hücreleri de NF-kB sinyal yolağıyla proinflamatuvar sitokinler üretir. Özellikle IL-17 sitokinleri, nötrofilleri ve monositleri inflamasyon bölgesine yönlendirerek IL-1, IL-8, IL-6, IL-21, TNF- β ve MCP-1 gibi sitokin ve kemokin kaskadlarını aktive eder (48). Hastalık sürecinde özellikle MCP-1, CCL5, CXCL10, CCL3 gibi kemokinlerin ve IL1 β , IL6, TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin artış gösterdiği bilinmektedir (26).

2.5. Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP-1 /CCL2)

MCP-1, CCL2 geni tarafından kodlanır. Makrofaj ve fibroblast hücrelerinin haricinde çeşitli hücre tiplerinde eksprese olur. MCP1, monositlerin / makrofajların göçünü ve infiltrasyonunu düzenleyen önemli kemokinlerden biri olmasıyla birlikte, monositler, bellek T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler gibi diğer bazı immün hücreler için bir kemo-çekici olarak kabul edilir (49). Bu kemokin, kan akışıyla monositlerin vasküler endotelyum boyunca göç etmesi, dokuların rutin immünolojik gözetimi ve inflamasyona yanıt için gereklidir (50).

2.5.1. MCP-1 A-2518G Polimorfizmi

MCP1'i kodlayan CCL2 geni, 17. kromozomun q12 lokusunda 3 ekzonlu bir gendir (51). MCP-1 A-2518G (rs102611) polimorfizmi, MCP-1 geninin promoter bölgesinde konumlanır ve gen transkripsiyon aktivitesini arttırarak MCP-1 ekspresyon seviyelerini up-regüle eder. Böylece aşırı makrofaj aktivasyonuna, proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin artmasına neden olarak bireylerde inflamasyon sırasında immün-aracılı hasara ve organ disfonksiyonuna neden olabilir (52). MCP1 varyantlarının enfeksiyon hastalıklarıyla ve inflamatuvar hastalıklarla olan ilişkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (53-55). X. Tu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre MCP1 gen rs1024611 polimorfizminin MCP-1 kemokin miktarını arttırarak akciğer hücrelerinde aşırı monosit ve makrofaj infiltrasyonuna sebep olmasıyla SARS-CoV'de karşı duyarlılığı arttırdığını saptamıştır (7).

2.6. CC Kemokin Reseptör 2 (CCR2)

CCR2 monosit hareketliliğinde görev alan bir kemokin reseptörüdür. Hücre içi ve hücre dışı bağlantısı olan yedi transmembran alandan oluşur. Ligandlara bağlanabilen, özgüllüğü sağlayan hücre dışı N-terminalinden; hücre içi sinyalde rol alan hücre içi C terminal bölgelere sahiptir (56,57). CCR2 için, CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL12 (MCP-5, sadece fare), CCL16(HCC4, yalnızca insan), CCL13 (MCP-4) dahil olmak üzere birçok kemokin ligand olarak kabul edilebilir ancak CCL2, monosit göçünü sağlayan CCR2 sinyallemesinde en kuvvetli ligandır. Kemokin reseptörleri için çoklu ligandlar, immün savunmanın yerine getirilmesinde kemokin sistemi için kompleks regülasyon işlerin halledilebilmesini sağlarlar (58-60).

CCR2'nin monositler ve makrofajlar üzerindeki CCL2 ile bağlanması, PI3K kaskadının, Ras'ın ve lamellipodyum çıkıntısının (Muhtemel) aktivasyonu ile kemotaksiye ve monosit, makrofaj göçünün indüklenmesiyle birlikte inflamatuvar yanıtın oluşmasını sağladığı bilinmektedir (61). CCR2'nin terminal karboksi kuyruğunda bulunan amino asit sayısı farkına göre bu reseptörün CCR2A (360 aminoasit) ve CCR2B (374 aminoasit) şeklinde 2 izoformu vardır. CCR2A'nın büyük bölümü sitoplazmadadır, CCR2B ise hücre yüzeyinde konumlanmıştır. CCR2B monosit hücrelerinde baskın izoform olarak kabul edilir. Monositlerin makrofajlara farklılaşmasıyla CCR2A ve CCR2B seviyeleri azalmaktadır (51).

2.6.1. CCR2 V64I Polimorfizmi

CCR2 birçok polimorfik bölgelere sahiptir. En kapsamlı incelenen polimorfizm, 3. kromozomun 2. ekzonun'da, CCR2 geninin 190. pozisyonundaki G'nin A'ya dönüşümüne neden olan analizdir. Bu nükleotidlerdeki farklılık sonucu oluşacak olan proteinin transmembran bölgesindeki valin-64 (V) izölösün (I)' e (V64I) dönüşerek fonksiyonel olmayan, mutant bir protein oluşmuş olur (62).

Bu polimorfizm ile CCR2A izoformunun gen ekspresyonun arttığı ve yarı ömrünü uzadığı tespit edilmiştir (63). Adaptif immünetedeki görevine ek olarak CCR2- V64I varyantı, CCR5 promotör mutasyonu ile bağlantılı bir şekilde HIV hastalığı sürecini yavaşlatır ve ayrıca çalışmalar, meme kanserine karşı önemli bir koruma faktörü olabileceğini göstermiştir (64-66).

2.7. CC Kemokin Reseptör 5 (CCR5)

CCR5 geni, 3. kromozom kısa kolunda 21. bölgede bulunur. G proteinine bağlı reseptör benzeri yedi transmembran protein olduğu düşünülür ve CCR5 geni beta kemokin reseptör ailesinin bir üyesi olan CCR5 reseptörünü kodlar. CCR5, inflamasyonu indüklemekle ve inflamasyonun olduğu bölgeye lökosit sağlamakla görevlidir. Monosit, makrofaj, B hücresi ve T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CCR5, kemokinler için bir reseptör görevi görür (67). Ayrıca CCR5, başta HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü) olmak üzere makrofaj-tropik virüsün konakçı hücreleri enfekte edebilmesi için önemli bir reseptör olduğu bilinmektedir. Bu genin mutant alellerinden bazıları HIV enfeksiyonuna karşı direnç göstermesi ile ilişkilendirilmiştir (68).

Bu reseptörün ligandları olarak monosit kemoatraktan protein 2 (MCP-2), makrofaj enflamatuar protein 1 alfa (MIP-1 alfa), makrofaj enflamatuar protein 1 beta (MIP-1 beta) gösterilmiştir. Ayrıca bu genin ekspresyonu, bir promiyeloblastik hücre hattında da saptanmıştır, bu da bu proteinin, granülosit çoğalmasında ve farklılaşmasında rolü olabileceğini düşündürmüştür (67).

2.7.1. CCR5 Delta32 ve CCR5 -2459G/A Polimorfizmleri

CCR5 Δ 32 polimorfizminde, CCR-5 allelinden 32 baz çifti silinmesi anlamsız mutasyona neden olur ve oluşan premature bir stop kodonu nedeniyle daha kısa bir protein sentezlenir. Bu protein kesikli, hücre yüzeyinde saptanamayan, inflammatuar

yanıtta işlevsiz bir reseptördür. CCR5 HIV-1 enfeksiyonunda hücre girişi için kullanılan kemokin koreseptörleri arasında en önemli olanlarından biridir. CCR5 genindeki bu mutasyon sebebiyle tartışmalar olsa da; özellikle homozigot allel CCR5 Δ 32 delesyonu HIV-1 enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (69). Gómez ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada şiddetli COVID-19 hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılmış, elde edilen verilere göre hasta grubunda CCR5 Δ 32 polimorfizmine önemli ölçüde az rastlanılmıştır. Bu sebepten bu polimorfizmin SARS-CoV-2'ye karşı koruyucu etkisi olabileceği düşünülmektedir (6).

CCR5 gen promotöründe SNP'leri (tek nükleotid polimorfizmleri) inceleyen in vitro çalışmalarla, genin -2459 konumundaki nükleotidde A (adenin) bazı içeren allellerin (numaralandırılma, nükleotid 59029'daki başlangıç metiyonine göre yapılmıştır. GenBank erişim numarası U95626); G (guanin) içeren nükleotide sahip allellere göre daha yüksek seviyede CCR5 promotör etkinliği gösterdiği bildirilmiştir (70,71). Bununla birlikte bu çalışmalar, HIV enfeksiyonu olan ve bu polimorfizm için A alleli homozigot (-2459A/A) hastaların, G alleli homozigot (-2459G/G) hastalara göre AIDS (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu) hastalığı sürecinin daha hızlı ilerlediğine dair sonuçlarla birlikte daha da desteklenmiştir (70,72-74).

2.8. Stromal Hücre Kaynaklı Faktör-1 (SDF-1)

CXCL12 olarak da bilinen ayrıca en çok çalışma yapılan kemokinlerden biri stromal hücre kaynaklı faktör 1 alfadır (SDF-1 α). Alternatif uç birleştirme mekanizmasıyla beraber eklenen mRNA'lar ile bu proteinin üç farklı protein izoformu bulunmaktadır: SDF-1 α , SDF-1 β ve SDF-1 γ . Özellikle nöron hücrelerinde SDF-1 α sentezlenmektedir. Yapılan çoğu araştırma da SDF-1 α 'yı çalışmıştır. 67 amino aside sahip bu kemokinin başlarda yalnızca CXCR4 reseptörü için efektif olduğu zannediliyordu. Ancak son zamanlarda CXCL12 için başka bir reseptör olarak tanımlanan CXCR7 bulunmuştur.

CXCL12'nin CXCR4 reseptörüne bağlanması immün sistemde hücre sağkalımı, hücre içi kalsiyum artışı, hücre proliferasyonu, kemotaksis, gen transkripsiyonu ile ilgili sinyal yollarını indükleyerek hücre içi sinyalleri başlatır. CXCR4 kemokini hemapoetik kök hücreler, epitelyal ve endotelyal hücreler, lenfositler ve kanser hücreleri gibi farklı hücre çeşitlerinde eksprese edilir. CXCR4/CXCL12 ligand-reseptör bağlantısı ile anjiyogenez, metastaz ve hücre hayatta kalma olayları kontrol

edilmektedir. Ayrıca CXCL12, immün sistemdeki görevlerinin haricinde merkezi sinir sisteminde önemli roller üstlenir.

2.8.1. SDF1-3' A Polimorfizmi

SDF-1 geni, 10 kb uzunluğundadır ve 10q11.1 kromozomunda konumlanmaktadır. Burada bulunan önemli bir polimorfizm G801A (rs1801157), SDF-1 geninin 3'UTR (çevrilmemiş bölge)'sinde bulunan 801. baz çiftinde guanin bazının adenin ile yer değişmesi sonucu meydana gelir (75). Bununla birlikte bu değişim, SDF üretiminin yukarı doğru düzenlenmesine (76) ve dolayısıyla CXCR4 ifadesinin aşağı doğru düzenlenmesine neden olur (77). HIV ile ilgili Taylandlı kadınlarla yapılan bir çalışmada SDF1-3'A polimorfizminde artış gösteren SDF1 kemokininin CXCR4 reseptörüne bağlanmada HIV-1 ile rekabet ettiği ve enfeksiyonu inhibe ettiği görülmüştür (78).

2.9. CXC Kemokin Reseptör 4 (CXCR4)

Periferik kan hücrelerinden lökositlerde ilk kez tanımlanan CXCR4(79), epitelyal, endotelyal, lenfosit hücrelerinde, hematopoietik kök hücrelerde ve kanser hücreleri gibi birçok hücre çeşitlerinde yüksek düzeyde ekspresyonu olan 7- transmembran G-protein bağlı bir reseptördür (80). CXCR4, bağışıklık yanıtlarında, kan hücrelerinin yapımında (hematopoez) gibi iyi bilinen işlevlerine (81) ek olarak; nörogenez (82), kardiyogenez (83), vasküler formasyon (84) ve germ hücresi gelişimi süreci (85) gibi daha birçok fizyolojik olaylarda önemli bir görev üstlenmiştir.

CXCR4 ligandı olan CXCL12, CXCR4-CXCR7 heterodimerlerine bağlanarak çeşitli sinyalleşmelerin aktivasyonunu sağlarken bazı sinyalleri de inhibe edebilir. Böylece proliferasyon, hücre göçü ve hücrelerin hayatta kalma süreçlerinde görev alır (80).

2.9.1. CXCR4 C138T Polimorfizmi

CXCR4 geni 2q2 kromozomu üzerinde bulunur. Buradaki 138. Kodonda sitozin ile timinin yer değiştirmesiyle meydana gelen SNP sonucu rs2228014 (C/T) polimorfizmi oluşur (86).

Bu polimorfizm sonucu CXCR4 genindeki ekspresyonda herhangi bir değişiklik olmasa da Kishima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre meme kanserinin olduğu mikroçevrede bu protein ekspresyonunun artış gösterdiği bildirilmiştir (87). Ve daha

birçok çalışmada bu polimorfizmin kanser ve kalp hastalıklarıyla ilişkisi doğrulanmıştır (88,89).

2.10. KEMOKİNLER VE HASTALIK ŞİDDETİ

Kemokinler bağışıklık sürecinde kemotaksis, lenfoid organ gelişimi düzenlenmesi, T hücresi farklılaşması ve metastaz olaylarında olduğu gibi birçok süreçte görev alırlar. Kemokinler bağışıklık mekanizmasının düzenlenmesinde önemli görevler üstlenir ve yapılarında meydana gelen bazı değişiklikler bağışıklık yanıtlarının değişmesine neden olabilir. Bu durum bazı hastalıklara karşı koruyucu olsa da birçok hastalıkta inflamasyon yanıtlarının düzensizleşmesine ve hastalık şiddetinin artmasına neden olur. Viral hastalıklar göz önüne alındığında, viral replikasyon seviyeleri ve konak bağışık tepkisi hastalık şiddetini belirleyen etmenler arasında gösterilmiştir (90,91). Konak bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde birçok immün hücrenin inflamasyon bölgesinde organizasyonu sağlayan kemokinlerin, kandaki seviyeleri hastalık durumunu etkilemektedir.

Kenelerden bulaşan, yüksek ateş ve trombositopeniye neden olan hastalık etmeni SFTSV (Trombositopeni ile Şiddetli Ateş Sendrom Virüsü) virüsü, enfekte ettiği hastalarda asemptomatik durumdan çok şiddetli hastalığa kadar değişebilen klinik tabloya sahiptir. Bu hastalık şiddetini etkileyen etmenler arasında kanda artmış olan kemokin miktarı önemli bir yer tutar. CXC10 kemokin miktarının hastalığın şiddetini etkileyen bir faktör olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (92).

Diğer bir viral hastalık etmeni olan RSV (Respiratuvar Sinsitiyal Virüs), özellikle bebeklerde ve yaşlılarda sık rastlanılan, bronşiyolit ve pnömoni gibi solunum yolu hastalıklarına neden olur. Enfeksiyonla beraber artan sitokin ve kemokin miktarının akciğerlerde mukus birikmesine ve bununla beraber akciğer fonksiyon bozukluklarına neden olduğu belirtilmiştir. CCR4, CXCR3, CCL17 ve CXC10 kemokin miktarının şiddetli hastalarda artış gösterdiği bildirilmiştir (93).

Son zamanlarda birçok çalışma ile beraber COVID-19 hastalığı ve hastalığın şiddetini belirleyen etmenler araştırılmaktadır. Bu konuda bağışıklık hücresi yanıtları ve özellikle kemokin miktarı belirleyici unsurlar arasındadır. Bu kemokinlerden CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL7, CXCL10, CCL20, CCL3 ve CX3CL1 seviyeleri hastalığın seyrini belirlemede rol oynayan önemli faktörlerden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (94,95).

Yapacağımız bu çalışmada COVID-19 hastalarında (n=180) MCP1\CCL2 (rs1024611), CCR2 (rs1799864), CCR5 (rs333, rs1799987) ve SDF-1\CXCL12 (rs1801157), CXCR4 (rs222014) kemokin gen varyantları incelenecektir. Klinik açıdan hafif, şiddetli ve kritik hastalarda bu kemokinler araştırılarak hastalık şiddeti üzerinde varyantların etkisi analiz edilecektir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Grupları

Bu çalışma 2020-2021 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'da ve Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya COVID-19 hasta grubu olarak Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi COVID-19 polikliniği takipli 60 hasta, Enfeksiyon Hastalıkları COVID-19 Servisi takipli 59 hasta ve Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi takipli 60 hasta dahil edilmiştir.

Çalışma için İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23.02.2021 tarihli 2021/04 sayılı etik kurul onayı alındı. Çalışma için hafif-şiddetli- riskli klinik seyirli COVID-19 hastalarından 6 ml kan örneği (EDTA'lı mor tüpe) alındı. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara çalışma ile ilgili bilgi verildi ve imzalı onamları alındı. Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi COVID-19 Laboratuvarında gerçekleştirildi ve DNA'lar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında uygun koşullarda (-20°C'de) muhafaza edildi. Hastalara ait demografik ve klinik veriler hasta takip ve gönüllü takip formlarına kaydedildi.

3.2. Gereçler

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Santrifüj Heraus (Nüve)

Spektrofotometre (Thermo scientific)

Mini Santrifüj (Heraeus)

Vortex (Nuve 110)

Derin dondurucu (-20° C), (Arçelik)

Buzdolabı (+4° C), (Arçelik)

PCR cihazı (Sensoquest Labcycler)

Hassas Terazı (Weightlab wl-3002)

Otomatik Pipet (10,100 ve 1000µl'lik) Ependorf

3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

Mikrosantrifüj tüpleri, 2 ve 1,5 ml (Axygen)

50 ml steril falkon tüp (Axygen)

Pipet uçları (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) (Axygen)

99% etil alkol (Sigma)

Invitrogene® DNA Ekstraksiyon Kiti

GML ExoSAP

ABI Prism Big Dye™ terminator Sekans Kiti

3.3. Yöntemler

3.3.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

- Invitrogene® DNA Ekstraksiyon Kiti (Lizis solüsyonu, Yıkama solüsyonu I, Yıkama solüsyonu II, Proteinase K, RNAase A, Elution Buffer)
- Mikrosantrifüj tüpleri, 2 ve 1,5 ml
- Mikrosantrifüj – Mikro 120 Hettich
- Vorteks
- Su banyosu
- +4°C/ -20 °C buzdolabı
- Nanodrop Spektrofotometre

Solüsyonların Hazırlanışı

- Yıkama solüsyonu I'e 11 mL %96 etanol eklendi
- Yıkama solüsyonu II' 44 mL %96 etanol eklendi

Protokol

- 1) 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kan konuldu. Üzerine 20 µl Proteinaz K ve 20 µl RNAaz A eklenerek 10 saniye vortekslendi. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

- 2) İnkübasyondan sonra, tüpe 200 µl Lizis solüsyonu eklendi ve 30 saniye vortekslendi, ardından su banyosunda 55 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
- 3) İnkübasyondan sonra tüpe 200 µl ethanol eklenir ve 5 sn vortexlenir.
- 4) 640 µl karışım spin kolona yüklendi. 10000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı ve kolonu yeni bir tüpe yerleştirildi.
- 5) 500 µl yıkama solüsyonu I kolona eklendi. 10000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvıyı içeren alt tüp atıldı ve kolon yeni bir tüpe yerleştirildi.
- 6) 500 µl yıkama solüsyonu II kolona eklendi. 15000 g’de 3 dakika santrifüj edildi. Sıvıyı içeren alt tüp atıldı.
- 7) Kolon steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Kolonun tam ortasına 70 µl Elüsyon buffer eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
- 8) Kolon 1 dakika boyunca 15000 g’de santrifüjlendi. Sonuç olarak alt sıvıda DNA elde edildi.

3.3.2. DNA Safılık ve Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Tüm izole edilmiş DNA konsantrasyonları nanospektrofotometrede ölçüldü (260 ve 280 nm’lerde) ve A260/280 nm 1.8-2.0 arasında olan DNA’lar saf olarak kabul edildi. DNA konsantrasyonları hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu (ng/}\mu\text{l)}: \text{Sulandırma katsayısı (100)} \times A_{260} \times 50$$

3.3.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

- PCR MIX
- Primer Mix
- GC solüsyonu
- Su
- Taq DNA polimeraz
- PCR tüpleri
- Pipet ucu (10 µl, 100 µl ve 1000 µl)
- Otomatik Pipet (10 µl, 100 µl ve 1000 µl)
- PCR Thermal Cycler (Sensoquest Labcycler)

Primerlerin Hazırlanması

SNP aranan bölgenin dışını kapsayacak şekilde uygun uzunluklarda Forward (F) ve Reverse (R) primerler tasarlandı (Tablo 3.1). Bu primerler ile izole edilen DNA'lar PCR yöntemi ile çoğaltıldı

Tablo 3-1: PCR primerleri

Lokus	PCR primer Dizini (5'-3')	SNP	Primer boyu	Amplikon boyutu (bp)
rs1024611-F	ACTTCTCTCACGCCAGCACT	rs1024611-SNP	20bp	170
rs1024611-R	GAAAGTGACTTGGCCTTTGC			
rs1801157-F	CTGGGCAAAGCCTAGTGAAG	rs1801157-SNP	20bp	209
rs1801157-R	AGAACGTGGAGGATGTGGAG			
rs333-F	TGTTTGCGTCTCTCCCAG	rs333SNP	18bp	233bp
rs333-R	CACAGCCCTGTGCCTCTT			
rs1799987-F	ATTGGGTGGTGAGCATCTGT	rs1799987-SNP	20bp	209bp
rs1799987-R	CAAGATCACAGGGCTTTTCAA			
rs2228014-F	CCGTGGCAAACCTGGTACTTT	rs2228014-SNP	20bp	188bp
rs2228014-R	GACGCCAACATAGACCACCT			
rs1799864-F	CGGTGCTCCCTGTCATAAAT	rs1799864-SNP	20bp	244bp
rs1799864-R	CCCAAAGACCCACTCATTTG			

Liyofilize halde alınan PCR primerler üzerine saf su eklenerek (Tablo 3.2) 400 µl'lik stok çözeltiler hazırlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3-2: PCR Primer hazırlama

Ürün	miktar
rs1024611 F+R	80 µl + 80 µl
rs1801157 F+R	80 µl + 80 µl
rs333 F+R	80 µl + 80 µl
rs1799987 F+R	80 µl + 80 µl
rs2228014 F+R	80 µl + 80 µl
rs1799864 F+R	80 µl + 80 µl
Su	320 µl

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR master mix'in (karışım) hazırlanması için gerekli kimyasallar Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3-3: PCR Master Mix

PCR bileşenleri	Miktar
PCR Mix	10 µl
Primer Mix	1 µl
GC Buffer	2 µl
Su	4 µl
DNA (20ng)	2 µl
Taq.polimeraz	0,2 µl

PCR master mix hazırlandıktan sonra aşağıda verilen süre ve sıcaklıklarda PCR reaksiyonu PCR cihazında (Thermal Cycler) gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3-4: PCR parametreleri

Sıcaklık	Zaman (35 döngü)
95 ° C	10dk.
95 ° C	30sn.
60 ° C	1dk.
72 ° C	30sn.
72 ° C	7dk.

3.3.4. CCR5 delta32 için Agaroze Jel Elektrophorez Aşaması

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

- Agaroze (Genaxxon)
- Etidyum Bromür (10 mg/ml) (Biomatik)
- ddH₂O (WISENT)
- 1X Tris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat (TBE) Tamponu
- DNA marker (100bp, Genaxxon)
- 6X DNA Loading Dye Buffer (Genaxxon)
- Hassas terazi (Weightlab)
- Cam Erlenmeyer (100ml,500ml)
- Mikrodalga fırın (İnoksan)
- UV transilluminator (Maestrogen)
- Elektrophorez (LABNET)

Kimyasalların Hazırlanışı

- 10 gram etidyum bromür tartılarak steril ddH₂O ile 10 mililitreye tamamlandı.
- 1X TBE tamponu 10X TBE (WISSENT)'den 10 ml ve 90 ml dH₂O karıştırılarak elde edilir.

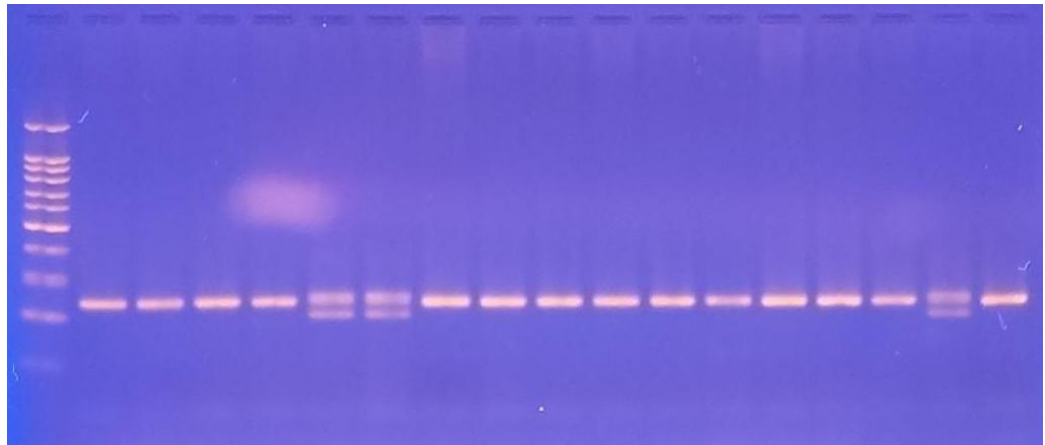
Protokol

100 ml 1X TBE içerisine hassas terazide ölçülen 3 gr agaroz eklenerek karıştırılır. Bu karışım mikrodalga fırında 20-30 saniye ısıtılıp tekrar karıştırılır, sıvı tamamen homojen olduğunda soğuması için beklenir. Yeterince soğuyan karışıma 10 µl etidyum bromür eklenir tekrar karıştırılır ardından tarak yerleştirilmiş jel küvetine dökülür soğuması ve jel formunu alması beklenir. Bu sırada elektroforez düzeneğine dökülmek üzere 1X TBE, ddH₂O ve etidyum bromür karıştırılarak bir tampon hazırlanır. Soğuyan jelden tarak çıkarılarak elektroforez düzeneğine kuyucuklar negatif kutbuna gelecek şekilde yerleştirilir. Jelin ilk kuyucuğuna DNA Marker eklenir ardından 1 µl 6X DNA Loading Dye Buffer ve 5 µl DNA örnekleri karıştırılarak sırayla kuyucuklara eklenir. Elektroforez cihazı 110 V, 50-70 mA, 45 dakika şeklinde ayarlanarak jelde yürütme işlemi yapılır.

3.3.5. Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Genotiplerin Belirlenmesi

Elektroforez ile yürütme tamamlandıktan sonra CCR5 gen lokusuna ait bantlar UV altında görüntülenip ve genotipleme yapılmıştır. I alleli 234 bp, D alleli 201 ve 33 bp da bant vermektedir (Şekil 3-1).

50 bp marker II II ID ID II II II II II II II II ID II



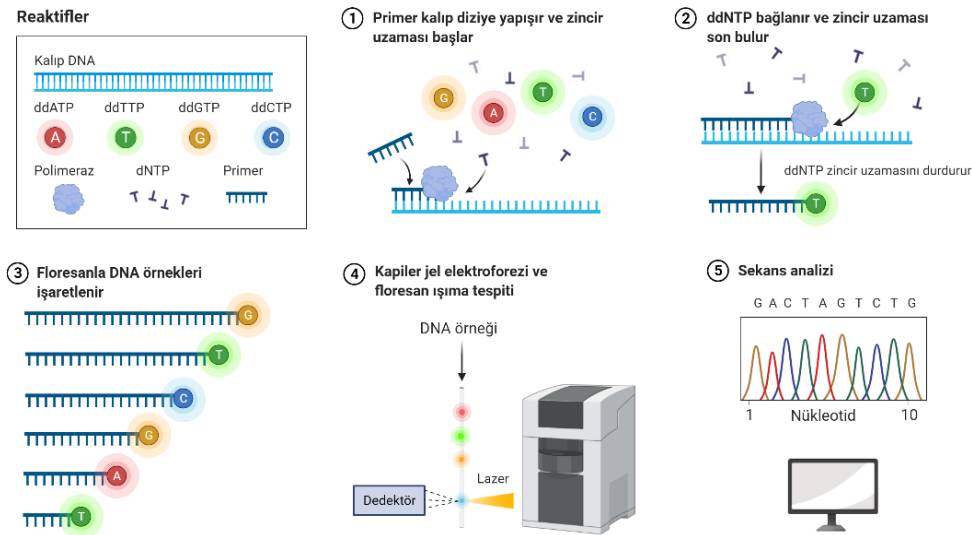
Şekil 3-1: CCR5 delta32 genotiplerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü

3.3.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR amplifikasyonundan sonra floresan işaretli bağlanmamış ddNTP'leri etkisiz hale getirmek için PCR ürünü-ExoSAP karışımı hazırlandı. 5 µL PCR ürünü üzerine 3 µL GML ExoSAP eklendi. Karışım PCR cihazı (Thermal Cycler) içine konularak; 37°C'de 30 dakika, 80°C'de 15 dakika sıcaklıkta inkübe edildi.

3.3.7. Sanger Sekans (Dizi Analizi) Yöntemi

Sanger sekans yöntemi DNA fragmentinin baz dizisini belirleyen, zincir sonlandırma reaksiyonu olarak bilinen gold standart yöntemidir. Bu yöntemde, hedef DNA birçok kez kopyalanmakta ve nükleotidler floresan bir boya ile işaretlenmektedir. Analiz için DNA molekülleri 4 ayrı tüpe eklenir ve nükleotidler restriksiyon enzimleri ile parçalanır (kırılır). Kırılmış olan DNA parçasının pozisyonuna göre (5'-pozisyonu) floresan işaretli ve boyları birbirinden farklı DNA fragmanları elde edilir. Elde edilen DNA dizileri jel elektroforez yardımıyla büyüklüklerine göre ayrılırak floresan işaretli farklı renklerle işaretlenip okunmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3-2: Sanger sekans yöntemi aşamaları

(Şekil Biorender.com ile tasarlanmıştır.)

3.3.7.1. Sanger Sekans PCR

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

- Applied Biosystems™ BigDye® Terminator Sekans Kiti (BigDye Terminator Mix, 5X sekans Buffer)

- PCR tüpleri
- Pipet ucu (10 µl, 100 µl)
- Otomatik Pipet (10 µl, 100 µl)
- 96 kuyucuklu PCR Plate
- PCR Thermal Cycler

Primerlerin Hazırlanması

Sanger sekans PCR'ı için gerekli liyoflize haldeki rs1024611, rs1801157, rs1799987, rs2228014 ve rs1799864 gen varyantalarına özgü Forward (F) ve Reverse (R) primerler Tablo 3.5'te gösterilen şekilde sulandırılarak hazırlandı.

Tablo 3-5: Sanger Sekans PCR primer hazırlama tablosu

Ürün	Miktar	Su
rs1024611 –F	20 µl	380 µl
rs1024611- R	20 µl	380 µl
rs1801157 -F	20 µl	380 µl
rs1801157 -R	20 µl	380 µl
rs1799987 -F	20 µl	380 µl
rs1799987- R	20 µl	380 µl
rs2228014 -F	20 µl	380 µl
rs2228014 –R	20 µl	380 µl
rs1799864 -F	20 µl	380 µl
rs1799864 -R	20 µl	380 µl

Sanger Sekans PCR Reaksiyonu

İçeriğinde her baz değişimi için farklı floresan boyalı ddNTP bulunan BigDye® Terminator Sekans Kiti kullanıldı (Tablo 3.6).

Tablo 3-6: ABI Prism Big Dye™ terminator kitindeki floresan işaretli ddNTP'ler

ddNTP	Boya	Sinyal rengi
A	dR6G	Yeşil
C	dTAMRA™	Siyah
G	dR110	Mavi
T(U)	dROX™	Kırmızı

Sekans probe karışımı ve reaksiyonu için gerekli malzemeler Tablo 3.6'da verilmiştir. Sekans reaksiyonu gereken malzemeler Tablo 3.7'de verilen miktarlarda 96 kuyucuklu PCR plate'ine konuldu.

Tablo 3-7: Sanger Sekans PCR Reaksiyonu bileşenleri

PCR bileşenleri	Miktar
BigDye Terminator Mix	1 µL
5X sekans Buffer	2 µL
Forward veya Reverse primer	2 µL
Su	3 µL
ExoSAP ürünü	2 µL
Toplam	10 µL

Hazırlanan sekans reaksiyon karışımı Tablo 3.8’de belirtilen program kullanılarak PCR cihazına konuldu.

Tablo 3-8: Sanger Sekans PCR parametreleri

Sıcaklık	Süre
96° C	1 dk.
96° C	10 sn
50° C	5 sn 25 döngü
60° C	4 dk.
4 ° C	sonsuz

3.3.7.2. Sekans Ürünlerinin Sefadeks ile Saflaştırılması

Sekans PCR reaksiyonu sonrası elde edilen ürünler aşağıdaki protokole göre sefadeks karışımı ile saflaştırıldı.

- 1) 13,5 ml suya 1,5 gr. Sefadeks eklendi. Karışım vortekslendi ve homojen hale gelene kadar karıştırıldı
- 2) Karışım 30 dk. +4 derecede buzdolapta bekletildi
- 3) Çalışmadan 5dk. önce oda sıcaklığına çıkartıldı
- 4) 700 µL Sefadeks karışımı kolona konuldu, 1700 rpm’de 2 dk. santrifüj edildi
- 5) Altaki sıvı atıldı ve örnekler yüklendi
- 6) 4700 rpm’de 2dk. daha santrifuj edildi ve tüplerin altındaki saklama kolanlarına saflaştırılmış örnek toplandı.

3.3.7.3. Saflaştırılan Sekans Ürünlerinin Kapiller Elektrofrez

Sefadeks ile saflaştırılan PCR ürünleri kapiller elektrofrez işlemi için ABI 3130 xl Genetik Analizör cihazına yerleştirildi ve DNA dizi analizi yapıldı. Dizi analiz cihazının spesifik özellikleri Tablo 3.9’da gösterilmiştir.

Tablo 3-9: ABI 3130 xl Genetik Analizör cihaz özellikleri

Parametre	POP-7 ile yapılan yürütme
Polimer	POP-7TM
Running Buffer	Applied Biosystems 3XXX/3XXXxl Running Buffer with EDTA
Capillary Array	36sm
Run File	RapidSeq36_POP7_1
Mobility	KB_3XXX_POP7_BDTv3.mob
Basecaller	KB.bcp

3.3.8. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Genotiplerin Belirlenmesi

Sekans cihazındaki kapiller elektrofrez sonlandığında elde edilen DNA dizi analizi sonuçları GeneMapper Software (Thermo Fisher Sci.) programı kullanılarak kromotogram verisi haline getirildi. DNA kromotogram verileri sekanslanan DNA dizisini her bir nükleotide özgü floresan boyaların (Tablo 3.6) etkisi ile oluşan farklı renkteki pikler (A: Yeşil, C: Siyah, G: Mavi, T: Kırmızı) halinde göstermektedir. DNA ürünleri F ve R primerler kullanılarak her iki yönden (5’ ve 3’) dizilendi. Sonuçlar her iki yöndeki diziyi de değerlendirilerek belirlendi. Örnekler istenilen gen varyantına ait SNP bölgesinde okunan nükleotide ait pikin rengine, sayısına ve uzunluğuna bakılarak homozigot ya da heterozigot olarak değerlendirildi (Şekil 3.4). Heterozigot olan örneklerde farklı renklerde iki pik olduğu görüldü.

rs1024611 -SNP (A/G): C alleli: Mavi pik, T alleli: Kırmızı pik

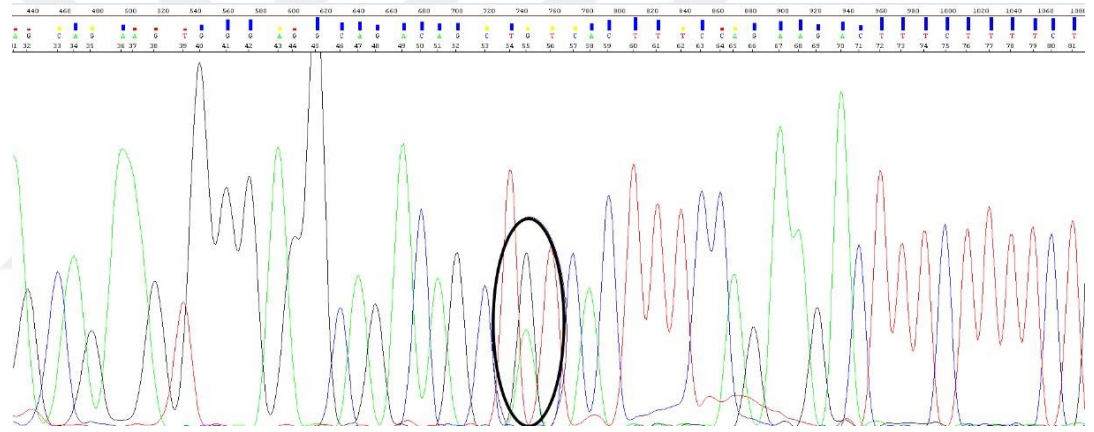
rs1801157 -SNP (G/A): G Aleli Siyah pik, A alleli: Yeşil pik

rs1799987 –SNP (A/C): A alleli: Yeşil pik, C alleli: Mavi pik

rs2228014 –SNP (C/T): C alleli: Mavi pik, T alleli: Kırmızı pik

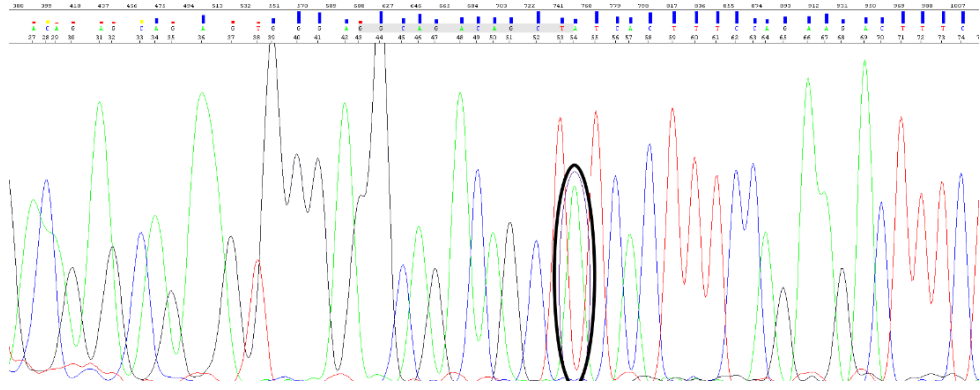
rs1799864 –SNP (G/A): G alleli: Siyah pik, A alleli: Yeşil pik

MCP-1 rs1024611 gen varyantının bir COVID-19 vakasına ait heterozigot ve homozigot genotiplerinin Sanger kromatogram görüntüleri aşağıda Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3-3: COVID-19 vakasına ait heterozigot (GA) genotipli MCP-1 rs1024611 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

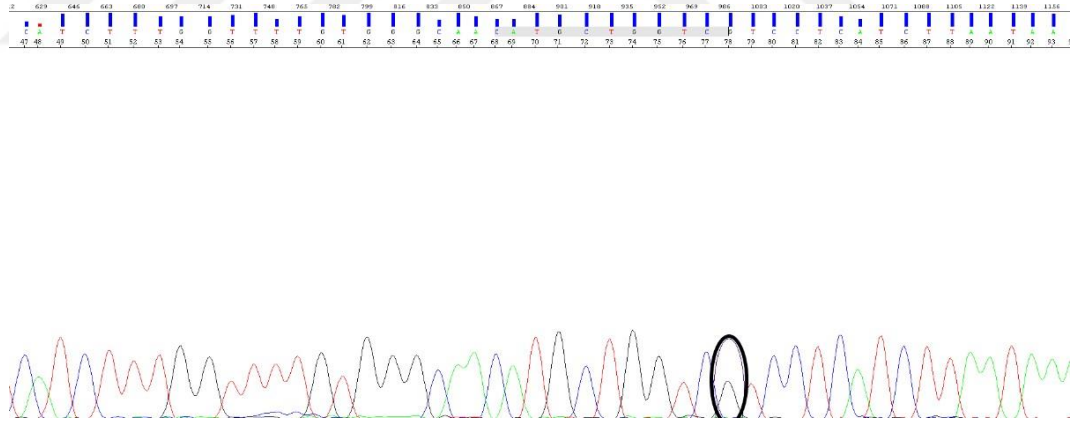
G alleli: siyah, A alleli: yeşil



Şekil 3-4: COVID-19 vakasına ait homozigot (AA) genotipli MCP-1 rs1024611 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

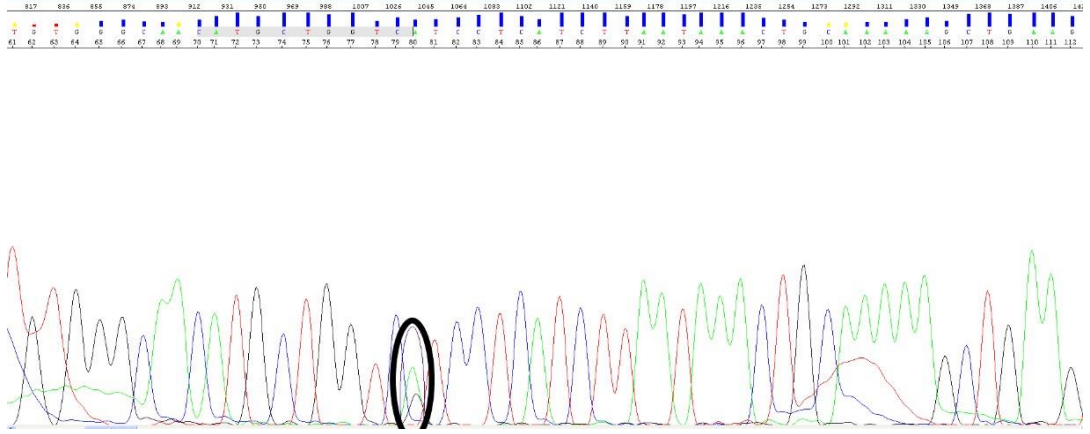
A alleli: yeşil

CCR2 rs1799864 gen varyantının bir COVID-19 vakasına ait heterozigot ve homozigot genotiplerinin Sanger kromatogram görüntüleri aşağıda Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'de verilmiştir.



Şekil 3-5: COVID-19 vakasına ait homozigot (GG) genotipli CCR2 rs1799864 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

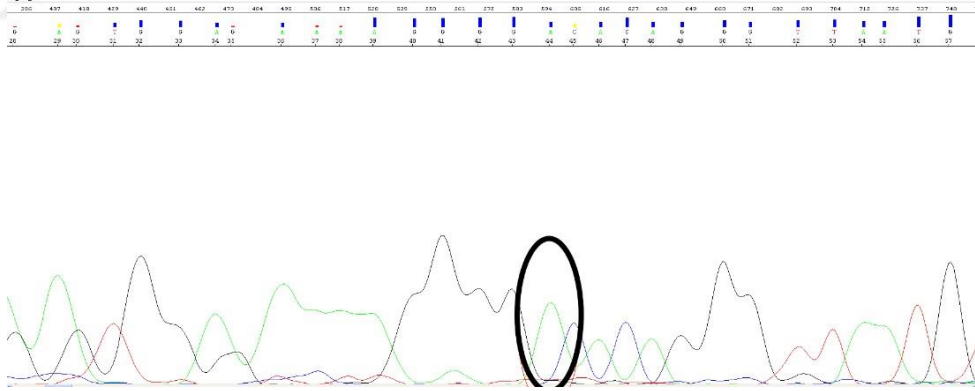
G alleli: siyah



Şekil 3-6: COVID-19 vakasına ait heterozigot (GA) genotipli CCR2 rs1799864 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

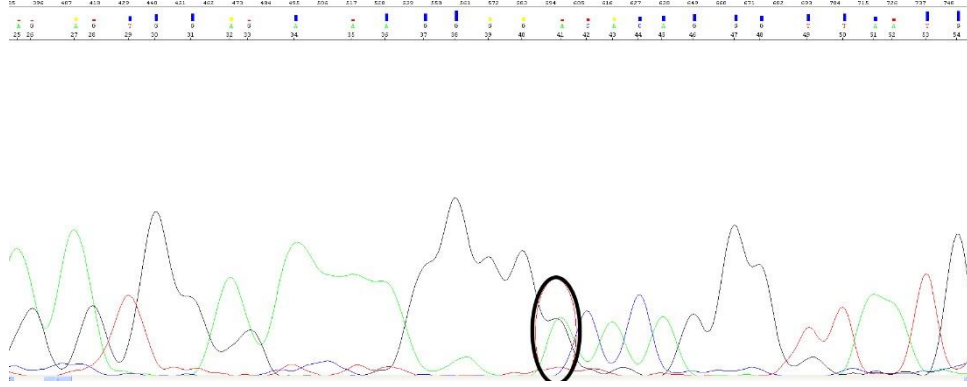
G alleli: siyah, A alleli: yeşil

CCR5 1799987 gen varyantının bir COVID-19 vakasına ait heterozigot ve homozigot genotiplerinin Sanger kromatogram görüntüleri aşağıda Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3-7: COVID-19 vakasına ait homozigot (AA) genotipli CCR5 rs1799987 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

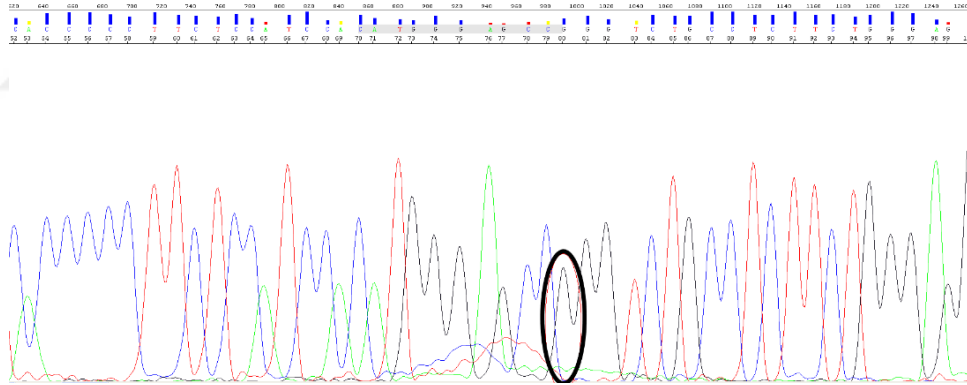
A alleli: yeşil



Şekil 3-8: COVID-19 vakasına ait heterozigot (GA) genotipli CCR5 rs1799987 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

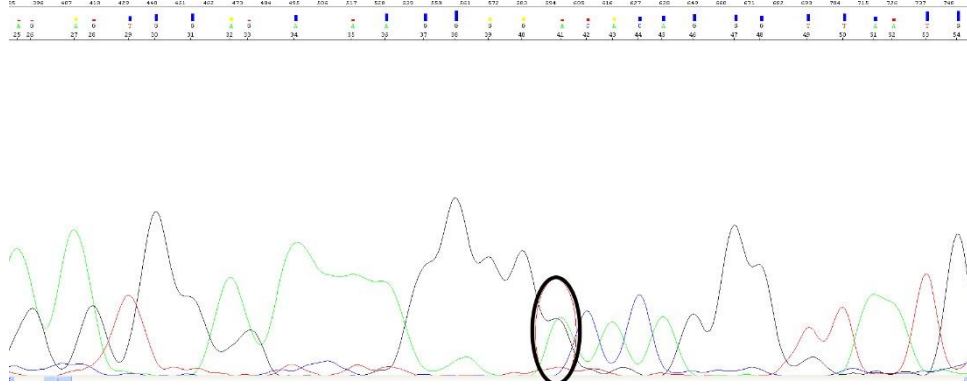
A alleli: yeşil, G alleli: siyah

SDF-1 rs1801157 gen varyantının bir COVID-19 vakasına ait heterozigot ve homozigot genotiplerinin Sanger kromatogram görüntüleri aşağıda Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’de verilmiştir.



Şekil 3-9: COVID-19 vakasına ait homozigot (GG) genotipli SDF-1 rs1801157 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

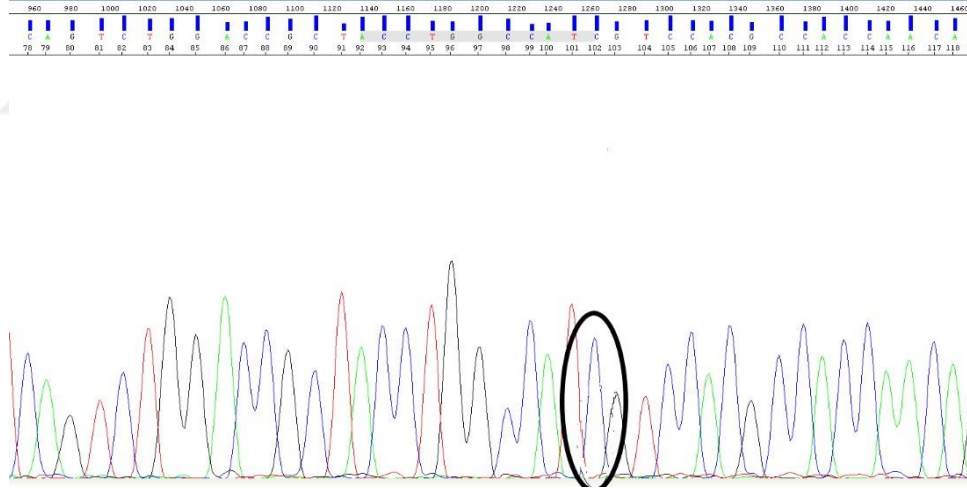
G alleli: siyah



Şekil 3-10: COVID-19 vakasına ait heterozigot (GA) genotipli SDF-1 rs1801157 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

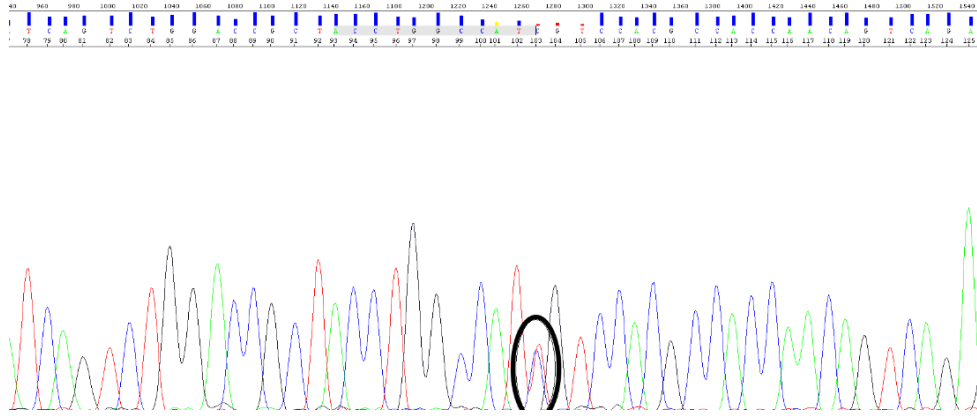
G alleli: siyah, A alleli: yeşil

CXCR4 rs2228014 gen varyantının bir COVID-19 vakasına ait heterozigot ve homozigot genotiplerinin Sanger kromatogram görüntüleri aşağıda Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3-11: COVID-19 vakasına ait homozigot (CC) genotipli CXCR4 rs2228014 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

C alleli: mavi



Şekil 3-12: COVID-19 vakasına ait heterozigot (CT) genotipli CXCR4 rs2228014 gen varyantı Sanger kromatogram görüntüsü.

C alleli: mavi, T alleli: kırmızı

3.3.9. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Statistic Packet of Social Science (SPSS 21.0) yazılım programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı analizler ve tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılmıştır. Verilerin istatistiksel analizinde sürekli veriler normallik dağılımı için Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak test edildi. Normal dağılımda olan verilerin ortalama $\pm$ standart sapmaları kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar One-Way Anova ile yapıldı. Normal dağılımda olmayan veriler için medyan kullanıldı. Hastalar içinde veri gruplarının oluşturulmasında normal dağılıma uygun olmayan verilerin grup arası sayısal karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Hasta gruplarında kategorik verilerin değerlendirilmesinde ki-kare ve Fisher'ın kesin testi kullanıldı. P değerleri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4 BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

Çalışmamızda COVID-19 hasta grubu %54,7 erkeklerden ve 39,7 kadınlardan oluşmakta, hastaların yaşları 18-91 arasında olup, ortalama yaş $52,9 \pm 14,1$ 'dir. COVID-19 hastalarından klinik olarak hafif hasta grubunun %56,6'sı kadın, %43,3'ü erkektir, yaş aralığı 21-75 arasında olup, ortalama yaş $46 \pm 13,8$ 'dir. Şiddetli hasta grubunun %44,1'i kadın, %55,9'u erkektir, yaş aralığı 18-77 arasında değişmekte ve yaş ortalamaları $53,1 \pm 13,3$ 'dür. Kritik hasta grubunun %35'i kadın, %65'i erkektir, yaş aralığı 28-91 arasında değişmekte ve ortalama yaşları $59,5 \pm 15,1$ olarak hesaplanmıştır.

Çalışmaya dahil edilmiş tüm hasta gruplarının yaş, cinsiyet ve aşı durumuna göre yüzde ve ortalama±standart sapma değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: COVID-19 Hasta Gruplarında Yaş, Cinsiyet ortalamaları ve Aşı durumu

Veriler	Toplam (n=179)	Hafif (n=60)	Şiddetli (n=59)	Kritik (n=60)	p Değer i
Yaş (Ortalama±SH,yıl)	52.9 ± 14.1	46 ± 13.8	53.1 ± 13.3	59.5 ± 15.1	Haf. vs Şid. p:0.038* Haf. vs Krit.p:0.0001* Şid.vs Krit. p:0.023*
CİNSİYET					
Kadın, n(%)	71 39,7%	34 56,6%	26 44,1%	21 35%	Haf. vs Şid.p>0.05
Erkek, n(%)	98 54,7%	26 43,3%	33 55,9%	39 65%	Haf. vs Krit.p >0.05 Şid. vs Krit. p >0.05
AŞI					
Aşı olmuş, n(%)	18 10,1%	0 0,0%	10 16,6%	8 13,3%	Haf. vs Şid. p<0.001*
Aşı olmamış, n(%)	161 89,9%	60 100,0%	49 83,1%	52 86,6%	Haf. vs Krit p=0.0061* Şid. vs. Krit. p>0.05

COVID-19 hastaları arasında hafif, şiddetli ve kritik hasta grupları komorbiditeler açısından karşılaştırıldığında; hiperkolesterol için hafif ve şiddetli hasta gruplar karşılaştırmasında anlamlı sonuç elde edilmiştir (p:0,027). Sindirim sistemleri hastalıklarında şiddetli ve kritik hasta grubu karşılaştırmasında anlamlı sonuç elde edilmiştir (p:0,019). Diğer hastalıklar açısından hasta grupları arasındaki karşılaştırmada herhangi bir anlamlı sonuç elde edilememiştir(p>0,05). Çalışmaya dahil edilmiş tüm hasta gruplarının komorbidite değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4-2: COVID-19 Hasta Gruplarının Komorbidite oranları

Veriler	Toplam (n=179)	Hafif (n=60)	Şiddetli (n=59)	Kritik (n=60)	p Değeri
Komorbidite					
Var, n(%)	124 69,3%	38 63,3%	46 77,9%	40 66,6%	Haf. vs Şid. p>0,05
Yok, n(%)	55 30,7%	22 36,6%	13 22,1%	20 33,3%	Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Diyabet	46 25,7%	11 18,3%	20 3,9%	15 25%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Hipertansiyon	46 25,7%	11 18,3%	19 33,2%	16 26,6%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Hiperkolesterol	8 4,5%	0 0,0%	5 8,5%	3 5,0%	Haf. vs Şid. p=0,027* Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Kronik Solunum Yolu Hastalıkları	20 11,2%	4 6,6%	5 8,5%	11 18,3%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Kalp Hastalıkları	14 7,8%	2 3,3%	3 5,1%	9 15%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Böbrek Yetmezliği	15 8,4%	3 5,0%	3 5,1%	9 15%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Benign Prostat Hiperplazisi	10 5,6%	1 1,6%	3 5,1%	6 10%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Kanser	10 5,6%	4 6,6%	5 8,5%	1 1,6%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Nörolojik Hastalıklar	26 14,5%	9 16,6%	11 18,6%	6 10%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
Sindirim Sistemi Hastalıkları	30 16,7%	8 13,3%	16 27,1%	6 10%	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p=0,019*

COVID-19 hastaları arasında hafif, şiddetli ve kritik hasta grupları kan tahlili sonuçları açısından karşılaştırıldığında D-dimer, lenfosit, CRP, ferritin değerleri için istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p<0,05$). Ancak hemoglobin, lökosit ve trombosit değerleri anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p\geq 0,05$). Çalışmaya dahil edilmiş tüm hasta gruplarının kan tahlili değerleri Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4-3: COVID-19 Hasta Gruplarının Kan tahlili değerleri ve oranları

Parametreler median (IQR)	Hafif (n=60)	Şiddetli (n=59)	Kritik (n=60)	p Değeri
D-dimer (µg/mL)	0,6±0,6	0,9±0,9	9,7±12,7	Haf. vs Şid. p<0,001* Haf. vs Krit. p<0,05* Şid.vs Krit. p<0,001*
Hemoglobin (gr/dL)	13,2±1,9	13±2	12,2±2,2	p:0,05
Lenfosit (x10 ⁹ /L)	2,2±3,6	1,3±0,8	0,8±0,4	Haf. vs Şid. p<0,001* Haf. vs Krit. p<0,05* Şid.vs Krit. p<0,001*
Lökosit (x10 ⁹ /L)	6,7±3,1	7,5±3,3	13,2±7	p:0,05
Trombosit (x10 ⁹ /L)	229±112	250±110	245±117,4	Haf. vs Şid. p>0,05 Haf. vs Krit. p>0,05 Şid.vs Krit. p>0,05
CRP (mg/L)	34,4±40,7	63,6±58,2	132,3±107,9	Haf. vs Şid. p <0,001* Haf. vs Krit. p<0,05* Şid.vs Krit. p<0,001*
Ferritin (mg/mL)	234±215,2	607,6±622,9	1272,7±1675,1	Haf. vs Şid. p<0,001* Haf. vs Krit. p<0,001* Şid.vs Krit. p<0,001*

4.2. Kemokin Gen Varyantlarına Ait Veriler

MCP-1-A2518G (rs1024611) polimorfizminde klinik açıdan hafif-şiddetli-kritik COVID-19 hasta grupları karşılaştırıldığında, hasta genotipleri (p<0.0001) ve allelleri (p:0.003) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4-4: COVID-19 hasta gruplarında MCP-1-A2518G genotip ve allel dağılımları

MCP-1-A2518G GENOTİPLERİ	HAFİF	ŞİDDETLİ	KRİTİK
	N:60	N:59	N:60
AA	36(%60)	22(%37,2)	14(%23,3)
AG	24(%40)	37(%62,7)	46(%76,7)
GG	0(%0)	0(%0)	0(%0)
ALLELLER			
A	96(%80)	81(%68,6)	74(%61,7)
G	24(%20)	37(%31,4)	46(%38,3)

CCR2-V64I (rs1799864) genotip oranları açısından, COVID-19 kritik hasta ve hafif hasta grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında önemli derecede fark tespit edilmiştir(p:0.032). Aynı şekilde allelik açıdan da kritik hasta ve hafif hasta grubu arasında anlamlı bir fark vardır (p=0.034) (Tablo 4.5).

Tablo 4-5: COVID-19 hasta gruplarında CCR2-V64I genotip dağılımları

CCR2-V64I GENOTİPLERİ	HAFİF	ŞİDDETLİ	KRİTİK
	N:60	N:59	N:60
WT/WT	46(%76,7)	47(%79,6)	35(%58,3)
WT/64I	11(%18,3)	12(%20,3)	20(%33,3)
64I/64I	3(%5)	0(%0)	5(%8,3)
ALLELLER			
WT	103(%85,8)	106(%89,8)	90(%75)
64I	17(%14,2)	12(%10,2)	30(%25)

Hafif-şiddetli-kritik hasta grupları karşılaştırıldığında CCR5-delta32 (rs333) polimorfizmi genotip ve allelleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p<0,05) (Tablo 4.6)

Tablo 4-6: COVID-19 hasta gruplarında CCR5-DELTA32 genotip dağılımları

CCR5-DELTA32 GENOTİPLERİ	HAFİF	ŞİDDETLİ	KRİTİK
	N:60	N:59	N:60
II	55(%91,7)	57(%96,6)	55(%91,7)
ID	5(%8,3)	2(%3,4)	5(%8,3)
DD	0(%0)	0(%0)	0(%0)
ALLELLER			
I	115(%95,8)	116(%98,3)	115(%95,8)
D	5(%4,2)	2(%1,7)	5(%4,2)

CCR5-A55029G (1799987) polimorfizminde COVID-19 hasta grupları karşılaştırıldığında genotip ve allel dağılımları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılamamıştır ($p<0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4-7: COVID-19 hasta gruplarında CCR5-A55029G genotip dağılımları

CCR5-A55029G GENOTİPLERİ	HAFİF	ŞİDDETLİ	KRİTİK
	N:60	N:59	N:60
AA	12(%20)	6(%10,2)	12(%20)
AG	26(%43,3)	33(%55,9)	28(%46,7)
GG	22(%36,7)	20(%33,9)	20(%33,3)
ALLELLER			
A	50(%41,7)	45(%38,1)	52(%43,3)
G	70(%58,3)	73(%59,3)	68(%56,7)

COVID-19 hasta grupları arasında yapılan karşılaştırmada SDF-1-3'A (rs1801157) genotipi ve allel dağılımlarında önemli bir fark bulunamamıştır ($p<0,05$) (Tablo 4.8).

Tablo 4-8: COVID-19 hasta gruplarında SDF-1-3'A genotip dağılımları

SDF-1-3'A GENOTİPLERİ	HAFİF	ŞİDDETLİ	KRİTİK
	N:60	N:59	N:60
GG	33(%55)	29(%49,2)	32(%53,3)
GA	25(%41,7)	25(%42,4)	25(%41,7)
AA	2(%3,3)	5(%8,5)	3(%5)
ALLELLER			
G	91(%75,8)	83(%70,3)	89(%74,2)
A	29(%24,2)	35(%29,7)	31(%25,8)

COVID-19 hastaları hafif-şiddetli-kritik hasta grupları karşılaştırıldığında CXCR4-C138T (rs2228014) genotip ve allellerde istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.9).

Tablo 4-9: COVID-19 hasta gruplarında CXCR4-C138T genotip dağılımları

CXCR4-C138T GENOTİPLERİ	HAFİF	ŞİDDETLİ	KRİTİK
	N:60	N:59	N:60
CC	53(%88,3)	50(%84,7)	44(%73,3)
CT	7(%11,7)	9(%15,3)	16(%26,7)
TT	0(%0)	0(%0)	0(%0)
ALLELLER			
C	113(%94,2)	109(%92,4)	104(%86,7)
T	7(%5,8)	9(%7,6)	16(%13,3)

MCP-1-A2518G GA genotipi hafif ve kritik hasta gruplarında karşılaştırıldığında, kritik hasta grubunda önemli derecede yüksek olduğu ve hastalık riskini arttırabileceği sonucuna varılmıştır ($p<0.0001$, OR:4.929, %95CI:2.239-10.866). Benzer şekilde GA genotipi şiddetli hasta grubunda hafif hasta grubuna göre daha sık görülmüştür ve böylece bu allelin hastalık şiddetini arttırdığına dair veriler çoğalmıştır

($p:0.021$, $OR=2.523$, $\%95CI:1.205-5.280$) ancak GA genotipi için şiddetli ve kritik hasta grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). G alleli için kritik ve hafif hasta grubu arasında yapılan karşılaştırmada G allelinin kritik hasta grubunda önemli ölçüde yüksek olduğu ve hastalık şiddetinin artması yönünde etkili olduğu tespit edilmiştir ($p:0.003$; $\%95CI:1.393-4.438$, $OR:2.486$). Ancak G alleli için kritik-şiddetli ve şiddetli-hafif hasta grupları arasındaki karşılaştırmada anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p>0,05$).

CCR2-V64I wt/wt genotipi için kritik ve hafif hasta grubu karşılaştırıldığında wt/wt genotipinin kritik hastalarda önemli ölçüde düşük olduğu görülmüştür ($p:0.032$, $OR:1.314$, $\%95CI: 1.018-1.697$). Benzer şekilde kritik ve şiddetli hasta grubu karşılaştırıldığında 64I/64I genotipinin kritik hasta grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu ($p:0.023$, $OR: 0.917$, $\%95CI: 0.849-0.989$) böylece bu genotipin hastalık şiddetini arttırabileceği ve wt/wt genotipinin anlamlı derecede düşük olduğu dolayısıyla hastalığa karşı koruma sağlayabileceği saptanmıştır ($p:0.012$, $OR: 2.049$, $\%95CI:1.139- 3.635$).

Ayrıca alleller bakımından yapılan karşılaştırmada kritik hasta grubundaki 64I alleli hafif hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek gözlenmiştir ($p: 0.034$, $OR: 2.020$, $\%95CI: 1.045-3.903$). Kritik ve şiddetli hasta grubu karşılaştırıldığında da benzer şekilde kritik hastalarda 64I alleleline şiddetli hastalara göre daha sık rastanılmıştır ($p:0.003$, $OR:2.944$, $\%95CI:1.424-6.087$). Böylece 64I allelinin hastalık şiddetini arttırdığı tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

SARS-CoV-2 virüs yüklü damlacıkların konaklar tarafından solunmasıyla bulaşabildiği gibi çapraz-bulaş yoluyla kontamine olmuş yüzeylere temas sonrasında burun, ağız ve göze dokunmak ile de bulaşabilir (96). Bulaş sonrası hastalık sürecinde değişik semptomlar görülebilir ve birçok farklı organ ve sistem etkilenebilir. COVID-19 hastalığının progresyonu virüs varyantı, viral replikasyon seviyeleri ve önemli ölçüde konak bağışıklığına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (97).

COVID-19 hastalığı gelişiminde oldukça önemli bir payı bulunan konak bağışıklığı, bireylerin diyabet, kalp hastalığı, böbrek hastalıkları gibi herhangi bir komorbiditesinin olup olmadığına, aşı olup olmadığına ve yaşına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Yaşlanmayla beraber bağışıklık sisteminde iki ana değişim meydana gelir. Bunlardan birincisi olan immün-yaşlanma ile birlikte patojen tanıma sistemi, pro-inflamatuar sinyal oluşturma ve patojen eliminasyonu süreçleri düzensizleşmeye başlar. Bir diğeri de “inflamm-aging” olarak tanımlanır ve bu durum aşırı aktif ancak etkisiz bir bağışıklık sistemine neden olur (98). Bu bilgilerden yola çıkarak, yaşlı COVID-19 hastalarının virüs ile karşılaşan hücrelerinde pro-inflamatuar sinyallerin geç veya yetersiz oluşması sonucunda enfeksiyonun ilerlemesi ve aşırı aktif durumda olabilen bağışıklık yanıtları ile de yaşlı hastalarda sık rastlanılan sitokin fırtınası durumu açıklanabilir (99).

Konak bağışıklığının hastalık seyri üzerindeki etkileri araştırmak amacıyla yapılan son çalışmalarda viral hasara ek olarak metabolik bozukluklar ve kontrolsüz inflamasyonun COVID-19 hastalığının şiddetli seyrinde ilerlemesine neden olabileceği ileri sürülmüştür (100). Buradan yola çıkılarak C-reaktif protein (CRP), D-dimer, ferritin, nötrofil-lenfosit oranının yüksek olması (101-103) ve artmış inflammatuar sitokin ve kemokin seviyeleri gibi inflammatuar belirteçlerin artmış seviyeleri şiddetli COVID-19 hastalığıyla ilişkilendirilmiştir (28).

Sitokinlerin SARS-CoV-2 ile mücadeledeki rolü ve hastalık ilerleyişindeki olumlu ve olumsuz etkileri birçok çalışmada araştırılmıştır. Kontrollü ilerleyen inflammatuar yanıtlarda viral eliminasyon için oldukça önemli olan bu küçük moleküller, inflamasyonda kontrolsüz ve aşırı artış gösterdiğinde sitokin salınımı sendromu (CRS) ile benzer “sitokin fırtınası”nı meydana getirebilir. Bu durum sonucunda birçok doku

ve organ hasarı meydana gelebilir. Sitokin fırtınasını önlemek amacıyla FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı “Tocilizumab, Leronlimab” gibi sitokin, sitokin reseptör ve kemokin, kemokin reseptör inhibitör ilaçlarının kullanılmasının artmış inflamatuvar yanıtın dengelenmesinde etkili olduğu gözlenmiştir (104,105).

Kemokinlerin bölgesel ve sistemik olarak indüklenmesi viral pnömoni oluşum süreciyle ve hastalık şiddeti ile ilişkilendirilmiştir. Bazı çalışmalarda, özellikle belirli kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin hastalığın ilerleyiş sürecinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (106,107).

Virüs enfeksiyonu sonrasında immün hücrelerin, sitokin ve kemokin gibi sinyal molekülleri aracılığıyla enfeksiyon bölgesine yönlendirilip toplanmasıyla virüs eliminasyonu sağlanmış olur. Ancak enfeksiyon esnasında IFN’lerin salınımının gecikmesiyle virüse karşı oluşturulacak immün yanıtlar da gecikir. Bununla beraber, sitokin ve kemokin miktarındaki hızlı yükseliş nötrofiller ve monositler gibi birçok immün hücreleri indükleyerek inflamatuvar hücrelerin akciğer epiteline ve dokularına aşırı infiltrasyonuna neden olur. Bu artmış infiltrasyon sonucu akciğer dokusunda geçirgenlik bozulur böylece akciğer hasarı, pnömoni meydana gelir. MERS ve SARS enfeksiyonlarında hastalık sürecinin temelinde, enfekte olmuş hücrelerin aşırı tepkisi yer almaktadır (108,106).

Kemokin aktivasyonunun COVID-19 hastalık patogeneze olan etkisi çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Birçok kemokin araştırılmış ve bilim insanları tarafından kemokinlerin bu hastalıkla olan ilişkisini doğrulayan sonuçlar ortaya konmuştur. Bu çalışmalara örnek olarak, Yang et al. %58’i erkek olan COVID-19 hastalarını orta-şiddetli-kritik olmak üzere 3 gruba ayırmıştır, incelediği gruplarda CXCL10/IP-10 ve MCP-3 kemokin miktarlarını kritik hasta grubunda en yüksek ve onun ardından şiddetli hasta grubunda yüksek olarak ölçmüşlerdir (109). Zhou et al. ise çalışmasında CXCL17 kemokininin SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonrasında bazı hastalarda yüksek oranda sentezlendiğini, dentritik hücrelerin ve monositlerin akciğerde aşırı birikmesine neden olarak hastalarda pnömoni oluşumunda önemli bir yeri olduğunu savunmaktadır (33).

Ayrıca yapılan bir diğer çalışmada COVID-19 hastalarının ve kontrol grubunun BAL sıvısı ve Periferik Kan Mononükleer Hücre (PBMC) örnekleri karşılaştırılmıştır. Analize göre CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1A, CCL4/MIP1B, CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCL8 ve CXCL10/IP-10 kemokin ekspresyonlarının COVID-19 hastalarının BALF

örneklerinde kontrole kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak, CCR2 ve CCR5 kemokin reseptörü seviyelerinin de yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber bu veriler, enfeksiyonun neden olduğu sitokin-kemokin miktarındaki artışın hastalık şiddetiyle ilişkili olarak sitokin fırtınasına neden olabileceğini göstermektedir (110).

Kemokin ekspresyonunun artmasına hem viral hem de konak kaynaklı faktörler neden olabilir. Konak kaynaklı faktörler arasından konak genetiğinin hastalık progresyonu üzerindeki etkisi birçok çalışmaya konu olmuş ancak bu konu hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Örnek olarak; İngiltere’de 2,244 kritik COVID-19 hastasıyla birlikte yapılan Transkriptom Çapında İlişkilendirme Çalışması (TWAS)’nda hastaların tam kan örneklerinde ve akciğer dokusunda Ekspresyon Nicel Özellik Lokus (eQTL) analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda akciğer dokusunda CCR2, CCR3 ve CXCR6 kemokinlerini kodlayan gen ekspresyonları ve COVID-19 hastalık şiddeti arasında önemli bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir (111).

CCL2(MCP-1) A-2518G polimorfizmi, CCL2 gen ekspresyonunun artmasına böylelikle Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) ve İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (İBH) gibi inflamuar hastalıklarda inflamatuvar mekanizmasının fazlaca indüklenmesine neden olur (112,113). Brown ve ark. bu polimorfizmin SLE hastalığı ile ilişkisini incelerken Kafkasyalı ve Afrika-Amerikan hasta ve kontrol grubuyla çalışmıştır. CCL-2 A-2518G genotipinin Afrika-Amerika grubu için herhangi bir risk teşkil etmediğini ancak bu polimorfizmin Kafkasya grubu SLE hastalarında daha fazla rastlanıldığını ve hastalık riski oluşturabileceğini belirtmişlerdir.

Bu varyantın SARS virüs enfeksiyonu ile ilişkisini konu alan çalışmalar da yapılmıştır. Smatti ve ark. tarafından kapsamlı bir şekilde yapılan çoklu-populasyonda genetik varyant analizinde Avrupalı, Afrikalı ve Doğu Asyalı toplumlarda SARS-CoV-2 virüsüne karşı duyarlılıkla ve hastalık şiddetiyle ilişkilendirilebilecek 10 gen, 74 SNP incelenmiştir. CCL2 risk varyantı (G, rs1024611) özellikle Doğu Asya grubunda diğerlerine kıyasla yüksek oranda görülmüşken, Katar grubunda düşük olduğu gibi Afrika grubunda da en düşük yüzdede kaydedilmiştir (114). Hong Kong’da 495 Çinli SARS vakasıyla yapılan bir çalışmada ise bu CCL2 varyantının SARS enfeksiyonuna karşı yatkınlıkla ilişkilendirilemediği sonucuna varmışlardır (115) Biz de bu çalışmada CCL2 A-2518G polimorfizminin şiddetli ve kritik hastalarda hastalığı hafif geçirenlere

nazaran oldukça sık rastlanıldığına ve böylece hastalık için risk varyantı olabileceğini belirledik.

CCL2 ile beraber birçok kemokinin reseptörü olabilen CCR2, immün hücrelerin sinyal mekanizmalarında görev alır ve viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtlarında önemli rol oynar. CCR2-V64I polimorfizmi sonucu oluşan mutant proteinin CCR2 biyolojik aktivitesini değiştirerek bazı hastalıklarda önemli rol oynayabileceği bilinmektedir. E. Yeregui ve ark. 2 yıl boyunca ART (Antiretroviral tedavi) tedavisi alan ve sonunda HIV virüsünü baskılayabilen 502 HIV hastasıyla yaptığı çalışmada, immün iyileşmenin prognostik işaretlerini belirlemeyi amaçlamıştır. Çalışma sonunda ise immün yanıt vermeyen (INR) hastalarda saptanan CCR2 rs1799864_814 ekspresyonunun plazmadaki RANTES(CCL5) konsantrasyonunu etkileyebileceği bildirilmiştir. Böylelikle bu varyantın, HIV hastalarında kemokinlerin reseptöre bağlanma potansiyelini etkileyerek virüse karşı oluşturulan immün yanıtları farklılaştırabileceği öne sürülmüştür (116)

İngiltere’de 208 yoğun bakım servisinden 2.244 kritik COVID-19 hastasıyla yapılan GWAS (Genom Çapında ilişkilendirme Çalışmaları) çalışmalarında, bu enfeksiyonda kritik rol oynayan çeşitli gen bölgeleri saptanmıştır. Özellikle 3p21.31 lokusunda bulunan CCR2 ve CCR5 dahil olmak üzere bilinen 17 protein kodlayan gen, COVID-19 hastalık riskiyle bağdaştırılan varyantları içermektedir. GWAS sonucuyla birlikte yapılan TWAS analiziyle birlikte incelenen varyantların CCR2 ile birlikte birkaç kemokin reseptörünün daha ekspresyonunu etkilediği belirlenmiştir. Bunların içinde CCR2 ekspresyonu, bu hastalık için tanımlanan risk varyantları ilişkileri arasında en güçlü bağlantıyı göstermektedir. Bu hastaların dolaşım sistemindeki monositlerinde artmış CCR2 ekspresyonunun yanı sıra BAL sıvılarında da aşırı artmış CCL2 seviyesi gözlenmiş ve bu durum CCR2 ekspresyonu yapan monositlerin aşırı infiltrasyonu ile beraber akciğer inflamasyonunun şiddetlenebileceği hipotezini desteklemektedir (111,117). Yaptığımız bu çalışmada biz de CCR2-V64I polimorfizmini üç hasta grubumuzda karşılaştırmamızı yaptık. Sonuç olarak hafif hastalarda wt/wt genotipine kritik hastalara göre daha sık rastlanıldığı ve şiddetli hastalarda kritik hastalara göre wt/wt genotipinin daha fazla; 64I/64I genotipinin ise daha az rastlanılır olduğu böylece bu polimorfizmin COVID-19 hastalığı için risk faktörü olabileceğini bulmuş olduk.

CCR5, birçok kemokin için reseptör olmasının yanı sıra viral enfeksiyonlarda virüsler için reseptör gördüğü ve hastalık progresyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Özellikle CCR5Δ32 varyantının çeşitli viral hastalıklarla olan ilişkisi yapılan çalışmalarla belirlenmektedir. HIV virüsünün konak CD4+ T hücresine girişinde önemli bir ko-reseptör olan CCR5, Δ32 varyantıyla birlikte bu reseptörün hücre yüzeyinde az veya hiç sentezlenmemesi sonucu HIV virüsüne karşı önemli bir koruma sağladığı birçok çalışmada gösterilmiştir (118). Ayrıca Batı Nil Virüsü (BNV) ile CCR5Δ32'nin hastalık yatkınlığı ve hastalık süreciyle ilgili yapılan araştırmalar sonucu farklı bulgular elde edilmesine rağmen; güçlü populasyonla yapılan bir çalışmada homozigot Δ32 varyantının semptomatik BNV gelişme riskinin artışıyla doğrudan bir bağlantısı olduğu gösterilmiştir (119). Benzer şekilde İnfluenza A alt grubu H1N1 virüsü ile CCR5Δ32 varyantı ilişkisi için farklı görüşler bulunmakla birlikte, bu varyantın İspanyollarda H1N1 için hastalık şiddetini arttırdığı hatta ölümle sonuçlanan vakalarla önemli ilişkisinin bulunduğu dair çalışmalar yapılmıştır (120,121). Son yıllarda COVID-19 üzerine yapılan çalışmalarda da sıkça CCR5Δ32 incelenmiştir. İspanya'da CCR5'in hastalık şiddeti üzerindeki etkisinin tespit edilmesi amacıyla 353'ü yoğun bakım tedavisi görmekte olan toplamda 801 hastanede yatışı bulunan COVID-19 hastasıyla çalışılmıştır. Δ32 varyantının kontrol grubunda hastalara kıyasla daha yüksek oranda gözleendiği ve benzer şekilde bu varyantın yoğun bakım ihtiyacı bulunmayan kişilerde yoğun bakım ihtiyacı olan kişilere göre daha yüksek oranda gözlenmiştir (122). Hubacek ve ark. yaptığı çalışmada CCR5Δ32 varyant sıklığını tespit etmek amacıyla

386 Çek COVID-19 hasta grubu ile 2,404 Çek kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Hastalardan 164'ü asemptomatik, 252'si semptomatik olarak belirlenmiş ve analiz sonuçlarına göre Δ32 varyant oranı asemptomatik hasta grubunda, semptomatik hasta grubuna kıyasla önemli derece yüksek gözlenmiştir (123). Bu çalışmalara göre CCR5Δ32'in COVID-19'a karşı tam koruma sağlamasa da şiddetli hastalık semptomları riskini azaltabileceğini söyleyebiliriz. Ancak diğer taraftan Cantalupo ve ark. İtalya'da hastanede yatan COVID-19 hastalarıyla İtalyan kontrol grubunu kıyaslamış, WES (Tüm Ekzom Dizileme) ve GWAS analiz sonuçlarında Δ32 varyantı için iki grup arasında anlamlı bir fark saptamamıştır (124). Diğer yandan Almanya'da klinik bulgularına ulaşabildikleri 4758 COVID-19 vakasında asemptomatik, solunum yolu enfeksiyonu bulunan semptomatik ve solunum ihtiyacıyla hastanede tedavi gören hasta gruplarını

CCR5Δ32 varyant oranının saptanması amacıyla karşılaştırma yapılmıştır. Çalışma sonunda hasta grupları arasında anlamlı bir fark gözlenememiştir (125).

CCR5 -2459G/A (rs1799987) varyantı ile birlikte CCR5 ekspresyonu seviyesinde farklılık meydana gelir ve böylece bu polimorfizmi bazı hastalıklarla özellikle virüs enfeksiyonlarıyla ilişkilendiren çalışmalar yapılmıştır. HIV ile yapılan çalışmalarda 2459G varyantının CCR5 ekspresyon seviyesini azalttığından virüs yayılım hızını da azalttığı belirtilmiştir (126). Bir diğer viral çalışmada da benzer şekilde 2459G varyantının RSV- bağlantılı bronşiolit ile ilişkili olabileceği saptanmıştır (127). Bizim çalışmamızda ise bahsedilen CCR5 polimorfizmleri ile COVID-19 hasta grupları arasında hem genotip açısından hem de allellik açısından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

CXCR4 kemokininin kemokin reseptörü SDF-1(CXCL12) kemokini bağlayabilir ve bu etkileşimle beraber pre-B hücresi büyümesinin indüklenmesi, lenf düğümlerine yerleşimi ve gelişimi sağlandığı bilinmektedir (128,129)

CXCL12 G801A polimorfizmiyle beraber artan kemokin miktarının bazı otoimmün hastalıklarla da ilişkisini saptamak amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Wu ve ark. 422 SLE hastasında incelediği bu polimorfizmde G/G allellerinin hastalarda ışık hassasiyetini, böbrek hasarını ve nükleozomlara karşı üretilen antikor miktarını arttırabileceğini ayrıca aynı genotipli sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında G/G allellerinin CXCL12α miktarını da arttırdığı görülmüştür. Sonuç olarak bu polimorfizmin G/G genotipinin SLE hastalığı için risk oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir (130).

CXCR4'ün HIV virüsü için ko-reseptör olmasından dolayı Petersen ve ark. Afrika grubu 257 HIV-1 seropozitif hastada CXCL12 G801A polimorfizmi ve CXR4 için mutasyon taraması yapmışlardır. Çalışma sonucunda G801A mutasyonunun HIV-1 enfeksiyonu riskini arttırabileceği savunulurken; incelenen CXCR4 C138T varyantıyla bu enfeksiyon arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır (131).

CXCR4 kemokin reseptörünün özellikle CXCL12 ligandıyla birlikte birçok kanser araştırmalarında da yer aldığı bilinmektedir. Meme kanseri araştırmasında Tayvanlı kadınlarla yapılan çalışmada CXCL12 bağlantılı genler incelenmiştir ve rs2228014-1801157 (CXCR4-CXCL12) gen kombinasyonlarında CC-GG genotiplerinin kanser riskini azalttığı sonucuna ulaşmışlardır (132). Benzer şekilde 466 AML (Akut Lenfoblastik Lösemi) hastasıyla yapılan çalışmada CXCR4 ekspresyonunun ve

CXCL12 G801A polimorfizminin hastalıktaki risk faktörü ve metastazındaki rolü incelenmiştir. AML hastalarında CXCR4 rs2228014 polimorfizminin oldukça yaygın görülmesiyle birlikte CXCL12 rs1801157 polimorfizmi için sağlıklı bireylerle yapılan karşılaştırmada önemli bir fark bulunamamıştır (133).

Biz de bu polimorfizmleri COVID-19 hastalarında ilk olarak inceledik. Yaptığımız çalışmada klinik olarak hafif, şiddetli ve kritik COVID-19 hastaları arasındaki kemokine bağlı hastalık şiddeti karşılaştırmasında CCR5-Delta32, CCR5-2459G/A, SDF-1-3'A ve CXCR4-C138T kemokin ve kemokin reseptörü varyantları için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Çalışma sonucunda ilk kez COVID-19 hastalığı için belirlenen klinik olarak hafif, şiddetli ve kritik hasta grubunda incelenen MCP-1-A2518G gen polimorfizminin Türk toplumunda hastalığın ağır seyretmesi yönünde risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Ayrıca CCR2-V64I gen polimorfizminde ise özellikle hafif-kritik ve şiddetli-kritik hasta COVID-19 hasta grubu arasında yapılan karşılaştırmada bu polimorfizmin allelik açıdan hastalık şiddetini arttırabileceği yönünde istatistiksel sonuç elde edilmiştir. COVID-19 hastalığında gelişen çeşitli klinik bulguların hem çevresel hem de kalıtsal sebepleri araştırılmış ancak nedenleri hala tam olarak belirlenememiştir. Konakta oluşan inflamatuvar yanıtlara bağlı olarak hastalık şiddet seyrinin önemli ölçüde değiştiğinin belirlenmiştir. Bu inflamatuvar yanıtların farklılaşmasına neden olan genetik faktörlerin saptanması, COVID-19 hastalığı semptomlarının hafifletilmesine veya hastalığın önlenmesine yönelik çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Çöl M, Güneş G. COVID-19 Salgınına Genel Bir Bakış. İçinde Memikoğlu KO, Genç V, editörler. *COVID-19*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 2020. pp. 7-14. Erişim adresi: <http://www.medicine.ankara.edu.tr/wp/content/uploads/sites/121/2020/05/COVID-19-Kitap.pdf>
2. Evren E, Us E. COVID-19 Etkeni. İçinde Memikoğlu KO, Genç V, editörler. *COVID-19*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 2020. pp. 15-22. Erişim adresi: <http://www.medicine.ankara.edu.tr/wp/content/uploads/sites/121/2020/05/COVID-19-Kitap.pdf>
3. Soyöz M, Kılıçaslan Ayna T, Pirim İ. İmmünolojik açıdan COVID-19 enfeksiyonuna bakış. *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi*. 2020;30(Ek sayı):101-11
4. Çağlar M, Kansu E. Kemokinler, Kemokin Reseptörleri ve İnflamasyon. *ANKEM Derg* 2004; 18 (Ek 2):164-168
5. Çınar G, Birengel MS. Genel Klinik Özellikler. İçinde Memikoğlu KO, Genç V, editörler. *COVID-19*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 2020. pp. 49-53. Erişim adresi: <http://www.medicine.ankara.edu.tr/wp/content/uploads/sites/121/2020/05/COVID-19-Kitap.pdf>
6. Gómez J, Cuesta-Llavona E, Albaiceta GM, et al. The CCR5-delta32 variant might explain part of the association between COVID-19 and the chemokine-receptor gene cluster. *MedRxiv* 2020.
7. Tu X, Chong WP, Zhai Y, et al. Functional polymorphisms of the CCL2 and MBL genes cumulatively increase susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Infect* 2015;71(1): 101-109.
8. Yücel B, Ala Görmez A. SARS-Corona Virüsüne Genel Bakış. *Türkiye Teknoloji ve Uygulamalı Bilimler Dergisi*. 2019; 2(1): 32-39.

9. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*. 2003;300(5624):1394-1399.
10. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet*. 2015;386(9997):995-1007.
11. Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*. 1966;1(7428):76-77.
12. McIntosh K, Kapikian AZ, Turner HC, Hartley JW, Parrott RH, Chanock RM. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am J Epidemiol*. 1970;91(6):585-592.
13. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol J*. 2019;16(1):69. Published 2019 May 27.
14. Siddell SG, Ziebuhr J, Snijder EJ. Coronaviruses, toroviruses, and arteriviruses. İçinde Mahy BWJ, Ter Meulen V, editörler, *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Hodder Arnold, London. 2005. pp. 823-856
15. Cui J, Li F, Shi Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol*. 2019;17:181–192.
16. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol*. 2020; 215: 108427.
17. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*. 2003;77(16):8801-8811.
18. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*. 2020;14(2):185-192.
19. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(14):5871-5876. doi:10.1073/pnas.0809524106
20. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein [Cell'de yayınlanan düzeltme görünüyor. 2020 Ara 10;183(6):1735]. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6.

21. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*. 2012;4(6):1011-1033. doi:10.3390/v4061011
22. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-1720.
23. Jia HP, Look DC, Shi L, et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol*. 2005;79(23):14614-14621.
24. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489-1501.e15.
25. Zhang B, Zhou X, Zhu C, et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. *Front Mol Biosci*. 2020;7:157. Published 2020 Jul 3. doi:10.3389/fmolb.2020.00157
26. Coperchini F, Chiovato L, Croce L, Magri F, Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;53:25-32. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.05.003
27. Zhang C, Wu Z, Li JW, Zhao H, Wang GQ. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(5):105954. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105954
28. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [published correction appears in Lancet. 2020 Jan 30;:]. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
29. Diao B, Wang C, Tan Y, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11:827. Published 2020 May 1.
30. Bhaskar S, Sinha A, Banach M, et al. Cytokine Storm in COVID-19-Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches: The REPROGRAM Consortium Position Paper. *Front Immunol*. 2020;11:1648. Published 2020 Jul 10.

31. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?. *Immunology*. 2008;123(3):326-338.
32. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(5):a016303. Published 2015 Jan 29.
33. Zhou Z, Ren L, Zhang L, et al. Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):883-890.e2.
34. Liao M, Liu Y, Yuan J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):842-844.
35. Chua, R. L., Lukassen, S., Trump, S., Hennig, B. P., Wendisch, D., Pott, F., et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nature Biotechnology*, 38(8), 970- 979.
36. Chi Y, Ge Y, Wu B, et al. Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. *J Infect Dis*. 2020;222(5):746-754.
37. Lucas C, Wong P, Klein J, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584(7821):463-469.
38. Tang P, Wang JM. Chemokines: the past, the present and the future. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(4):295-298.
39. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4903-4908.
40. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. 2004;25(2):75-84.
41. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*. 2006;7(12):243.
42. Hughes CE, Nibbs R. A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*. 2018; 285(16), 2944–2971.
43. Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(3):469-473.

44. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today*. 2000;21(9):418-420.
45. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*. 1997;15: 675–705
46. Wenzel UO, Stahi RAK. Chemokines, renal disease and HIV infection. *Nephron*. 1999;81: 5–16
47. Çağlar M, Kansu E. Kemokinler, kemokin reseptörleri ve inflamasyon. *ANKEM Dergisi*. 2004;18(Ek2):164- 8.
48. Li, G, Fan, Y, Lai, Y, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020; 92: 424– 432.
49. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313- 326.
50. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-774. Published 2011 Oct 10.
51. Navratilova Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006;150(2):191-204.
52. Narter F, Bireller ES, Engin C, Catmakas T, Narter F, Ergen A, Cakmakoglu B. Distribution of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 A 2518G) and chemokine receptor (CCR2-V64I) gene variants in hyperbilirubinemic newborns . *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(8): 14075–14079
53. Ganachari M, Guio H, Zhao N, Flores-Villanueva PO. Host gene-encoded severe lung TB: from genes to the potential pathways. *Genes Immun*. 2012;13(8):605- 620.
54. Malafronte P, Vieira JM Jr, Pereira AC, Krieger JE, Barros RT, Woronik V. Association of the MCP-1 -2518 A/G polymorphism and no association of its receptor CCR2 -64 V/I polymorphism with lupus nephritis. *J Rheumatol*. 2010;37(4):776-782.
55. Park HJ, Lee HS. Monocyte chemoattractant protein 1 polymorphism interaction with spirulina immunomodulatory effects in healthy Korean elderly: A 16 week, double-blind randomized clinical trial. *Nutr Res Pract*. 2017 Aug;11(4):290-299.

56. Montecclaro FS, Charo IF. The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1 α receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *J Biol Chem*. 1996; 271: 19084–19092.
57. Montecclaro FS, Charo IF. The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. Receptor activation by a pseudo-tethered ligand. *J Biol Chem*. 1997; 272: 23186–23190.
58. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Jr., Broxmeyer HE, et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2552–2561.
59. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 12053–12058.
60. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, et al. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med*. 1998; 187: 601–608.
61. De Paula VS, Gomes NS, Lima LG, et al. Structural basis for the interaction of human β -defensin 6 and its putative chemokine receptor CCR2 and breast cancer microvesicles. *J Mol Biol*. 2013;425(22):4479–4495.
62. Apostolakis S, Baritaki S, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Panutsopoulos D, Spandidos DA. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease. *Thromb Res*. 2007;119(1):63–71.
63. Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS*. 2004;18(5):729–738.
64. Kostrikis LG, Huang YX, Moore JP, et al. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med*. 1998;4(3):350–3.
65. Barmania F, Pepper M. C–C chemokine receptor type five (CCR5): an emerging target for the control of HIV infection. *Appl Transl Genomics*. 2013; 2:3–16.

66. Zafiropoulos A, Crikas N, Passam AM, Spandidos DA. Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet.* 2004;41(5).
67. RefSeq tarafından sağlanmıştır. Tem 2015. 6 Eylül 2021'de güncellenmiştir. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/genes/1234/>
68. Ni J, Wang D, Wang S. The CCR5-Delta32 Genetic Polymorphism and HIV-1 Infection Susceptibility: a Meta-analysis. *Open Med (Wars).* 2018;13:467-474. Published 2018 Oct 16.
69. Vangelista L, Vento S. The Expanding Therapeutic Perspective of CCR5 Blockade. *Front Immunol.* 2018; 8: 1981. Published 2018 Jan 12.
70. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet.* 1998;352(9131):866-870.
71. Mummidi S, Bamshad M, Ahuja SS, et al. Evolution of human and non-human primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. Potential roles for haplotype and mRNA diversity, differential haplotype-specific transcriptional activity, and altered transcription factor binding to polymorphic nucleotides in the pathogenesis of HIV-1 and simian immunodeficiency virus. *J Biol Chem.* 2000;275(25):18946-18961.
72. Martin MP, Dean M, Smith MW, et al. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science.* 1998;282(5395):1907- 1911.
73. An P, Martin MP, Nelson GW, et al. Influence of CCR5 promoter haplotypes on AIDS progression in African-Americans. *AIDS.* 2000;14(14):2117-2122.
74. Ometto L, Bertorelle R, Mainardi M, et al. Polymorphisms in the CCR5 promoter region influence disease progression in perinatally human immunodeficiency virus type 1-infected children. *J Infect Dis.* 2001;183(5):814- 818.
75. Tong X, Ma Y, Deng H, et al. The SDF-1 rs1801157 Polymorphism is Associated with Cancer Risk: An Update Pooled Analysis and FPRP Test of 17,876 Participants. *Sci Rep.* 2016;6:27466. Published 2016 Jun 6.
76. van Rij RP, Broersen S, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of

- HIV-1 infection [published correction appears in *AIDS* 2002 Nov 8;16(16):2239]. *AIDS*. 1998;12(9):F85-F90.
77. Amara A, Gall SL, Schwartz O, et al. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med*. 1997;186(1):139-146.
 78. Tiensiwakul P. Stromal cell-derived factor (SDF) 1-3'A polymorphism may play a role in resistance to HIV-1 infection in seronegative high-risk Thais. *Intervirology*. 2004;47(2):87-92.
 79. Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem*. 1994;269(1):232-237.
 80. Pozzobon T, Goldoni G, Viola A, Molon B. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol Lett*. 2016;177:6-15.
 81. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595-599.
 82. Cui L, Qu H, Xiao T, Zhao M, Jolkkonen J, Zhao C. Stromal cell-derived factor-1 and its receptor CXCR4 in adult neurogenesis after cerebral ischemia. *Restor Neurol Neurosci*. 2013;31(3):239-251.
 83. Agarwal U, Ghalayini W, Dong F, et al. Role of cardiac myocyte CXCR4 expression in development and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Res*. 2010;107(5):667-676.
 84. Sainz J, Sata M. CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(2):263-265.
 85. Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(1):37-49.
 86. Federspiel B, Melhado IG, Duncan AM, et al. Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics*. 1993;16(3):707-712.

87. Okuyama Kishima M, Brajão de Oliveira K, Ariza CB, et al. Genetic Polymorphism and Expression of CXCR4 in Breast Cancer. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2015;2015:289510.
88. Wu Y, Zhang C, Xu W, et al. CXC motif chemokine receptor 4 gene polymorphism and cancer risk. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(49):e5317.
89. Runmin G, Jiamei J, Zhiliang J, et al. Genetic variation of CXCR4 and risk of coronary artery disease: epidemiological study and functional validation of CRISPR/Cas9 system. *Oncotarget*. 2017;9(18):14077-14083. Published 2017 Dec 15.
90. Chang XL, Webb GM, Wu HL, et al. Antibody-based CCR5 blockade protects Macaques from mucosal SHIV transmission. *Nat Commun*. 2021;12(1):3343. Published 2021 Jun 7.
91. Zhang YZ, He YW, Dai YA, et al. Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome. *Clin Infect Dis*. 2012;54(4):527-533.
92. Deng B, Zhang S, Geng Y, et al. Cytokine and chemokine levels in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *PLoS One*. 2012;7(7):e41365.
93. Vojvoda V, Savić Mlakar A, Jergović M, et al. The increased type-1 and type-2 chemokine levels in children with acute RSV infection alter the development of adaptive immune responses. *Biomed Res Int*. 2014;2014:750521.
94. Xu ZS, Shu T, Kang L, et al. Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):100. Published 2020 Jun 19.
95. Hue S, Beldi-Ferchiou A, Bendib I, et al. Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(11):1509-1519.
96. Tharayil A, Rajakumari R, Mozetic M, Primc G, Thomas S. Contact transmission of SARS-CoV-2 on fomite surfaces: surface survival and risk reduction. *Interface Focus*. 2021;12(1):20210042. Published 2021 Dec 10.
97. Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. 2021;184(7):1671-1692.

98. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:244-254.
99. Mueller AL, McNamara MS, Sinclair DA. Why does COVID-19 disproportionately affect older people?. *Aging (Albany NY).* 2020;12(10):9959-9981.
100. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages [published correction appears in *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun 2;:]. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):355-362.
101. Wu C, Chen X, Cai Y, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China [published correction appears in *JAMA Intern Med.* 2020 Jul 1;180(7):1031]. *JAMA Intern Med.* 2020;180(7):934-943.
102. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China [published correction appears in *Intensive Care Med.* 2020 Apr 6;:]. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):846-848.
103. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study [published correction appears in *Lancet.* 2020 Mar 28;395(10229):1038] [published correction appears in *Lancet.* 2020 Mar 28;395(10229):1038]. *Lancet.* 2020;395(10229):1054-1062.
104. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med.* 2020;26(10):1636-1643.
105. Hutchings CJ. Mini-review: antibody therapeutics targeting G protein-coupled receptors and ion channels. *Antib Ther.* 2020;3(4):257-264. Published 2020 Dec 9.
106. Castelli V, Cimini A, Ferri C. Cytokine Storm in COVID-19: "When You Come Out of the Storm, You Won't Be the Same Person Who Walked in". *Front Immunol.* 2020;11:2132. Published 2020 Sep 2.
107. Chu H, Chan JF, Wang Y, et al. Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex

- Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1400-1409.
108. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe*. 2016;19(2):181-193.
 109. Yang Y, Shen C, Li J, et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(1):119-127.e4.
 110. Xiong Y, Liu Y, Cao L, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):761-770.
 111. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature*. 2021;591(7848):92-98.
 112. Brown KS, Nackos E, Morthala S, Jensen LE, Whitehead AS, Von Feldt JM. Monocyte chemoattractant protein-1: plasma concentrations and A(-2518)G promoter polymorphism of its gene in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2007;34(4):740-746.
 113. Li YW, Yang CQ, Xiao YL, et al. The -A2518G polymorphism in the MCP-1 gene and inflammatory bowel disease risk: A meta-analysis. *J Dig Dis*. 2015;16(4):177-185.
 114. Smatti MK, Al-Sarraj YA, Albagha O, Yassine HM. Host Genetic Variants Potentially Associated With SARS-CoV-2: A Multi-Population Analysis. *Front Genet*. 2020;11:578523. Published 2020 Oct 2.
 115. Lau YL, Peiris JS. Association of cytokine and chemokine gene polymorphisms with severe acute respiratory syndrome. *Hong Kong Med J*. 2009;15 Suppl 2:43-46.
 116. Yeregui E, Viladés C, Domingo P, et al. High circulating SDF-1 and MCP-1 levels and genetic variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic signature of immune recovery status in treated HIV-positive patients. *EBioMedicine*. 2020;62:103077.
 117. Schmiedel BJ, Chandra V, Rocha J, et al. COVID-19 genetic risk variants are associated with expression of multiple genes in diverse immune cell types. Preprint. *bioRxiv*. 2020;2020.12.01.407429. Published 2020 Dec 2.

118. Ellwanger JH, Kulmann-Leal B, Kaminski VL, Rodrigues AG, Bragatte MAS, Chies JAB. Beyond HIV infection: Neglected and varied impacts of CCR5 and CCR5 Δ 32 on viral diseases. *Virus Res.* 2020;286:198040.
119. Lim JK, Louie CY, Glaser C, et al. Genetic deficiency of chemokine receptor CCR5 is a strong risk factor for symptomatic West Nile virus infection: a meta-analysis of 4 cohorts in the US epidemic. *J Infect Dis.* 2008;197(2):262-265.
120. Falcon A, Cuevas MT, Rodriguez-Frandsen A, et al. CCR5 deficiency predisposes to fatal outcome in influenza virus infection. *J Gen Virol.* 2015;96(8):2074-2078.
121. Keynan Y, Juno J, Meyers A, et al. Chemokine receptor 5 Δ 32 allele in patients with severe pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(10):1621-1622.
122. Cuesta-Llavona E, Gómez J, Albaiceta GM, et al. Variant-genetic and transcript-expression analysis showed a role for the chemokine-receptor CCR5 in COVID-19 severity. *Int Immunopharmacol.* 2021;98:107825.
123. Hubacek JA, Dusek L, Majek O, et al. CCR5Delta32 deletion as a protective factor in Czech first-wave COVID-19 subjects. *Physiol Res.* 2021;70(1):111- 115.
124. Cantalupo S, Lasorsa VA, Russo R, et al. Regulatory Noncoding and Predicted Pathogenic Coding Variants of CCR5 Predispose to Severe COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10):5372. Published 2021 May 20.
125. Bernas SN, Baldauf H, Wendler S, et al. CCR5 Δ 32 mutations do not determine COVID-19 disease course. *Int J Infect Dis.* 2021;105:653-655.
126. Mehlotra RK. CCR5 Promoter Polymorphism -2459G > A: Forgotten or Ignored?. *Cells.* 2019;8(7):651. Published 2019 Jun 28.
127. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Moore C, Sharland M, Kwiatkowski D. Variants of the chemokine receptor CCR5 are associated with severe bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 2003;188(6):904-907.
128. Matsusaka S, Cao S, Hanna DL, et al. CXCR4 polymorphism predicts progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab-based chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2017;17(6):543-550.

129. Pansy K, Feichtinger J, Ehall B, et al. The *CXCR4-CXCL12*-Axis Is of Prognostic Relevance in DLBCL and Its Antagonists Exert Pro-Apoptotic Effects In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):4740. Published 2019 Sep 24.
130. Wu FX, Luo XY, Wu LJ, et al. Association of chemokine CXCL12-3'G801A polymorphism with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. *Lupus*. 2012;21(6):604-610.
131. Petersen DC, Glashoff RH, Shrestha S, et al. Risk for HIV-1 infection associated with a common CXCL12 (SDF1) polymorphism and CXCR4 variation in an African population. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40(5):521-526.
132. Lin GT, Tseng HF, Yang CH, et al. Combinational polymorphisms of seven CXCL12-related genes are protective against breast cancer in Taiwan. *OMICS*. 2009;13(2):165-172.
133. Zheng Q, Shuai X, Ye Y, et al. The role of polymorphisms of stromal-derived factor-1 and CXC receptor 4 in acute myeloid leukemia and leukemia cell dissemination. *Gene*. 2016;588(2):103-108.
134. Hodgson SH, Mansatta K, Mallett G, Harris V, Emary KRW, Pollard AJ. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(2): e26-e35.

FORMLAR

18 YAŞ VE ÜSTÜ GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

“KEMOKİN GEN VARYANTLARININ COVID-19 HASTALIK ŞİDDETİ ÜZERİNE ETKİSİ” adlı çalışma, genetik bir araştırmadır. Koronavirüs hastalığı ve ona neden olabilecek süreçlerle ilgili bir çalışmadır. Bu çalışmada PCR testi pozitif Covid-19 hastalarında, oluşan farklı inflamatuvar yanıtlar sonucunda, klinikte hafif-şiddetli-kritik vakaların gözlenmesine neden olabilecek kemokin varyantları incelenerek hastalık açısından riskli bireyleri belirlemede fayda sağlayacağını düşündüğümüz kemokin gen varyantları taranacaktır. Böylece bu gen polimorfizmlerinin hastalığın şiddetini etkilemedeki değeri belirlenerek hastalığın genetiğini aydınlatmak, hastalığın gelişim sürecini tanımlamaya yardımcı olmak ve hastalığın etiyojisi için yeni belirleyicilerin geliştirilmesine katkı sağlamak hedeflenmektedir.

Hasta grubu, 18 yaş ve üzeri bireylerden oluşacaktır. Bu çalışma için sizden bir kereye mahsus olarak iki tüp kan alınacaktır. Alınacak olan bu kan materyali laboratuvarımızda çalışılacaktır, başka bir araştırmada kullanılmayacaktır ve yurtdışı gönderimi olmayacaktır. Bu çalışmada alınan kandan önce İstanbul Üniversitesi Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi TÜSEB Covid-19 PCR Tanı Merkezi Laboratuvarı’nda DNA elde edilecek. Ardından İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Bilimler Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında çalışma protokolüne uygun şekilde genetik analizlere tabi tutulacaktır. Aynı zamanda kan örneklerinden elde edilecek serumdan ise protein düzeylerine bakılacaktır. Bu araştırma neticesinde genlerdeki olası değişimler belirlenecek ve koronavirüs hastalığı genetiğine ışık tutulacaktır.

Araştırmada yer alacağınız öngörülen süre maksimum 7 ay olacaktır. Araştırmaya katılması beklenen katılımcı sayısı 180 hasta bireydir. Bu araştırma ile ilgili sizin herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Araştırma boyunca sizden bir maddi katkı talebi olmayacaktır. Bağlı olduğunuz sağlık kurumuna (SGK) herhangi bir ücret ödetilmeyecektir. Çalışmadan ayrıldığınız takdirde tedavinizde bir aksama olmayacaktır. Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz

halinde yararınıza engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere ulaşılabilir ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır. Siz, bu bilgilendirilmiş olur formunu imzalamakla bunu kabul etmiş olacaksınız. Ayrıca sizinle ilgili kayıtlar da gizli tutulacaktır. Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda size derhal haber verilecektir. Yürümekte olan çalışmaların genel sonuçları hakkında Doç. Dr. Selçuk DAŞDEMİR'den bilgi alabilir ve bu doktora 0 212 4142000 numaradan 31207 nolu iç hat telefon numarasından ulaşabilirsiniz.

“KEMOKİN GEN VARYANTLARININ COVID-19 HASTALIK ŞİDDETİ ÜZERİNE ETKİSİ” başlıklı çalışmayla ilgili, gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda genetik/biyolojik incelemeler yapılmak üzere kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak projeden ayrılabilirim bilerek kan vermeyi, dolayısı ile adı geçen bilimsel projeye destek veriyorum.

Adı-Soyadı: İmzası:

Açıklamaları yapan/örneği alan araştırmacının:

Adı-Soyadı: İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı: İmzası:

Tarih:...../...../.....

06.12.2020

Gmail - Bilimsel Araştırma Başvurusu



Şeydanur Doğan <dgn.seydanur@gmail.com>

Bilimsel Araştırma Başvurusu

1 mesaj

Bilimsel Araştırma Başvurusu <portal@saglik.gov.tr>
 Yanıtlatma Adresi: ncreply@portal.saglik.gov.tr
 Alıcı: dgn.seydanur@gmail.com

28 Kasım 2020 15:10

Sayın İlgili,

Bilimsel Araştırma Platformuna yapmış olduğunuz başvuru değerlendirilmiştir.

Değerlendirme Sonucu aşağıdaki gibidir.

Onay Durumu : Bu çalışmayı yapmanız Bakanlığımızca uygun görülmüştür.

Araştırmanızın gerektirdiği diğer tüm süreçleri (etik kurul, faz çalışması ,diğer izinler vb.) tamamlamanız gerekmektedir.

Açıklama :

Form Adı : Şeydanur DOĞAN -2020-11-26T16_58_21

Başvuru Formu için tıklayınız.

Başvuru Formunuzu <https://bilimselarastirma.saglik.gov.tr/> adresinden görüntüleyebilirsiniz.

İlginiz ve katkılarınızdan dolayı teşekkür ederiz.

T.C. Sağlık Bakanlığı

Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü

Not: Bu ileti Bilimsel Araştırmanızın Değerlendirilmesinin tamamlanması nedeniyle sistem tarafından otomatik gönderilmiştir. Lütfen bu iletiyi cevaplamayınız.

YASAL UYAR

Bu e-postanın içerdiği bilgiler (ederi de dahil olmak üzere) gizlidir. T.C. Sağlık Bakanlığı onayı olmaksızın içeriği kopyalanmaz, üçüncü kişilere açıklanmaz veya iletilmez. Bu mesajın gönderilmek istendiği kişi çağırılır (ya da bu e-postayı yanlışlıkla aldysanız), lütfen yollayan kişiye haberdar ediniz ve mesajı sistemimizden siliniz. T.C. Sağlık Bakanlığı bu mesajın içerdiği bilgilerin doğruluğu veya eksiksiz olduğu konusunda bir garanti vermemektedir. Bu nedenle, bilgilerin ne şekilde olursa olsun içeriğinden, iletiminden, alınmasından ve saklanmasından T.C. Sağlık Bakanlığı sorumlu değildir. Bu mesajın içeriği yazınıza atılır, T.C. Sağlık Bakanlığı'na gönderilmez.

Bu e-posta bizim tüm bilgisayar virüslerine karşı taranmıştır.

DISCLAIMER

This e-mail (including any attachments) may contain confidential and/or privileged information. Copying, disclosure or distribution of the material in this e-mail without the permission of Ministry of Health of Turkey is strictly forbidden. If you are not the intended recipient (or have received this e-mail in error), please notify the sender and delete e-mail from your system immediately. Ministry of Health of Turkey makes no warranty as to the accuracy or completeness of any information contained in this message and hereby excludes any liability of any kind for the information contained therein or for the information transmission, reception, storage or use of such in any way whatsoever. Any opinions expressed in this message are those of the author and may not necessarily reflect the opinions of Ministry of Health of Turkey.

This e-mail has been scanned for all computer viruses known to us.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=6013e4ce69&view=pt&search=all&simlthd=thread-P%3A1584605979149649623&simlth=msg-f%3A1584605...> 1/1

COVID-19 VAKA BİLGİ FORMU

		2019 Yeni Koronavirüs Enfeksiyonu (COVID-19) VAKA BİLGİ FORMU		Geliştirme Tarihi: 05.02.2020 Sayfa: 1/1	
		Formun doldurulma tarihi:/...../20.....			
HASTA KİMLİK BİLGİLERİ	İl Adı:			TC Kimlik/Pasaport No:	
	Adı ve Soyadı:			Mesleği:	
	Doğum Tarihi:/...../.....			Halen yaptığınız iş:	
	Cinsiyeti: ☐ Erkek ☐ Kadın			Çep Telefonu:	
	İkamet Adresi:			Ev Telefonu:	
VAKA TİPİ	☐ Ayaktan ☐ Yatatan ☐ Yatan ☐ Servis (.....) ☐ Servis (.....)			Yatış tarihi:/...../20.....	
	☐ Servis (.....) ☐ Servis (.....)			Yatış tarihi:/...../20.....	
	Solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle mi hastaneye yatırıldı? (Hayır ise yatış nedenini yazınız)				
☐ Evet ☐ Hayır					
Klinik Belirtiler/Bulgular	İlk Semptomun Başlama Tarihi:/...../20.....			☐ Solunum Sıkıntısı ☐ Boğaz Ağrısı	
	☐ Ateş (..... °C) ☐ Öksürük ☐ Baş Ağrısı ☐ Kusma			☐ Halsizlik ☐ Karın Ağrısı	
RİSK FAKTÖRLERİ	☐ Diğer belirti ve bulgular (Belirtiniz):				
	☐ Kardiyovasküler hastalık (Belirtiniz):				
	☐ Kronik respiratuar hastalık (Belirtiniz):				
	☐ DM (Belirtiniz):				
	☐ Kanser (Belirtiniz):				
☐ Hipertansiyon ☐ Halen gebe (..... haftalık / aylık) ☐ Sigara kullanımı (..... paket gün / yıl)					
☐ Diğer hastalıklar (Belirtiniz):					
EPİDEMİYOLOJİK İLİŞKİLER	☐ Eşlik eden komplikasyon (Belirtiniz):				
	☐ Evet ☐ Hayır ☐ Bilinmiyor				
	Çevresinde benzer hastalık tablosu olan kişi var mı? ☐ Evet ☐ Hayır ☐ Bilinmiyor				
	Semptomların başlamasından önceki 14 gün içinde, aile bireyleri veya kendisi Türkiye dışındaki bir ülkede bulunma/bekleme var mı? ☐ Evet ☐ Hayır ☐ Bilinmiyor				
	Seyahat öyküsü var ise, gittiği yer/yerler:				
LABORATUVAR SONUÇ BİLGİLERİ	Örnek cinsi (Seçiniz):				
	☐ Kanlı burun ve boğaz sürüntüsü ☐ Nazofaringeal/nazal aspirat ☐ Balgam				
	☐ Boğaz sürüntüsü ☐ Burun sürüntüsü				
	☐ Nazofaringeal sürüntü ☐ Trakeal aspirat				
	☐ Diğer (Belirtiniz):				
Fiziksel Examinasyon	Göğüs muayenesi:				
	Diğer fiziksel muayene bulguları:				
HEKİMİN KURUMUNUN BİLGİLERİ	Kurum adı:			İmza:	
	Hekim Adı, Soyadı:				
	Tel No:				
	E-posta:				
T.C. Sağlık Bakanlığı Dış Hekimliği bagim.covid19@bagbik.gov.tr www.bagbik.gov.tr Tüm belgiler 100% dijital ortamda yapılmıştır.					







İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KEMOKİN GEN VARYANTLARININ COVID-19 HASTALIK ŞİDDETİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 12	% 4	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 2
3	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Howe, Charles L., Reghann G. LaFrance-Corey, Rhianna S. Sundsbak, Brian M. Sauer, Stephanie J. LaFrance, Eric J. Buenz, and William F. Schmalstieg. "Hippocampal protection in mice with an attenuated inflammatory monocyte response to acute CNS picornavirus infection", Scientific Reports, 2012. Yayın	<% 1
6	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<% 1