TUĞÇE BOZKURT İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ 2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADA2 ENZİM DÜZEYLERİ VE AKTİVİTESİNİN, COVID-19 ENFEKSİYON ŞİDDETİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

TUĞÇE BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADA2 ENZİM DÜZEYLERİ VE AKTİVİTESİNİN, COVID-19 ENFEKSİYON ŞİDDETİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Tuğçe BOZKURT

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN: Prof. Dr. Ferah BUDAK
2. DANIŞMAN: Prof. Dr. Sara Şebnem KILIÇ GÜLTEKİN

TGA-2021-726- BAP

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum **"ADA2 Enzim Düzeyleri ve Aktivitesinin, COVID-19 Enfeksiyon Şiddeti Üzerindeki Etkisi"** adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Tuğçe Bozkurt
11.07.2023

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

11/07/2023

Adı Soyadı: Tuğçe BOZKURT
Anabilim Dalı: Tıp-İmmünoloji
Tez Konusu: ADA2 Enzim Düzeyleri ve Aktivitesinin, COVID-19 Enfeksiyon Şiddeti Üzerindeki Etkisi

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**	**AÇIKLAMA**
Tezin Boyutları	☐	☐	
Dış Kapak Sayfası	☐	☐	
İç Kapak Sayfası	☐	☐	
Kabul Onay Sayfası	☐	☐	
Sayfa Düzeni	☐	☐	
İçindekiler Sayfası	☐	☐	
Yazı Karakteri	☐	☐	
Satır Aralıkları	☐	☐	
Başlıklar	☐	☐	
Sayfa Numaraları	☐	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☐	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☐	☐	
Kaynaklar	☐	☐	

DANIŞMAN ONAYI
Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Ferah BUDAK
İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK
İÇ KAPAK
ETİK BEYANI III
TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU IV
İÇİNDEKİLER V
TÜRKÇE ÖZET VII
İNGİLİZCE ÖZET VIII
1.GİRİŞ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1.Koronavirüslere Tarihsel Bakış 3
2.2. Koronavirüs Ailesi 4
2.2.1.SARS-CoV 5
2.2.2.MERS-CoV 6
2.2.3.SARS-CoV-2 7
2.3.SARS-CoV-2 Yapısı ve Genetik Materyali 8
2.4.COVID-19 Epidemiyoloji 10
2.5.COVID-19 Patofizyolojisi 12
2.6. COVID-19 Bulaş Yolları 13
2.7.COVID-19 Klinik Bulgular 14
2.7.1. Moleküler Testler (RT-PCR) 15
2.7.2. Laboratuvar Bulguları 15
2.7.3. Radyolojik Bulgular 16
2.8. COVID-19 Tanı Kriterleri 16
2.9. SARS-CoV-2 İmmün Yanıt 17
2.10. Makrofaj Aktivasyon Sendromu 20
2.11. Tedavi 23
2.12. Adenozin Deaminaz (ADA) 24
2.12.1. ADA1 (Adenozin deaminaz-1) 27
2.12.2. ADA2 (Adenozin deaminaz-2) 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1. Hastaların Seçimi ve Çalışma Planı 30
3.2. İnsan ADA-1 ve ADA-2 (CECR1) Serum Düzeylerinin Saptanması 31
3.3. ADA Enzim Aktivitesinin Ölçümü 33
3.4. Hücre Kültürü Deneyleri 35
3.4.1. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu 35
3.4.2. Percoll Dansite Gradiyent Yöntemi 36
3.4.3. SARS-CoV-2 Spesifik Lenfositlerin Elde Edilmesi 38
3.4.4 $CD14^+$ Monosit İzolasyonu 39
3.4.5. Monosit Kültürü 40
3.4.6 SARS-CoV-2-spesifik Lenfositler ve Naif Monositler ile Eş-Kültür 40
3.4.7. M1 ve M2 Makrofaj Polarizasyonunun Akan Hücre Ölçer Yöntemiyle İncelenmesi 41
3.5. İnsan ADA ilişkili Sitokin Düzeylerinin Saptanması 42
3.6. İnsan ADA ilişkili Kemokin Düzeylerinin Saptanması 43
3.7. İstatiksel Analiz 45

4.BULGULAR 46
4.1. İnsan ADA-1 ve ADA-2 (CECR1) Serum Düzeylerinin Saptanması 48
4.2. ADA Enzim Aktivitesinin Ölçümü 49
4.3. Akan Hücre Ölçerde M1 ve M2 Değerlendirmesi 50
4.4. Hücre Kültürü Grupları ile ADA ve İzoenzimlerinin Aktivite Karşılaştırması .. 53
4.5. COVID-19 Vaka Grupları Sitokin Düzeyleri 54
4.6. COVID-19 Vaka Grupları Kemokin Düzeyleri 59
4.7. Eş-kültür Sonrası Sitokin ve Kemokin Düzeyleri 62
4.7.1. Hücre Kültürü Sitokin Düzeyleri 62
4.7.2. Hücre Kültürü Kemokin Düzeyleri 67
4.7.3. Hücre Kültürü Sitokin/Kemokin Profillerinin ADA Aktivite Korelasyonu 71
4.8.Sitokin/Kemokin profillerinin COVID-19 vaka gruplarına göre ADA aktivite Korelasyonu 75
4.9. COVID-19 Vaka Grupları Laboratuvar Parametreleri Karşılaştırılması 81
5.TARTIŞMA VE SONUÇ 82
6. KAYNAKLAR 92
7.SİMGELER VE KISALTMALAR 106
8.EKLER 109
9. TEŞEKKÜR 111
10. ÖZGEÇMİŞ 112

TÜRKÇE ÖZET

COVID-19; Aralık 2019'da Çin/Wuhan'da ortaya çıkan tüm dünyayı etkisi altına alan pandemik hastalıktır. SARS-CoV-2, bulaşıcılığı yüksek, ağır klinik tablolara sebep olabilen enfeksiyon etkenidir. Adenozin deaminaz (ADA) özellikle lenfoid dokularda bulunan, immün sistem fonksiyonlarını etkileyebilen, ADA1 ve ADA2 (CECR1) izoenzimlerine sahip bir enzimdir. ADA1 T hücre proliferasyonunu, ADA2 ise monositlerin farklılaşmasını etkileyebilmektedir.

Çalışmamızda; 41 ağır vaka, 34 hafif/orta vaka, 39 a/presemptomatik ve 6 kritik seviye yetişkin COVID-19 hastası ve 40 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Enzim aktivitesi Giusti ve Galanti yöntemi ile çalışılmıştır. 6 sağlıklı kontrolden elde edilen PKMH ve monositler ile eş-kültür deneyleri yapılmıştır. Eş-kültür sonrası elde edilen süpernatanlar ve COVID-19 hasta serumları, ELISA yöntemi ile incelenerek M1 ve M2 ilişkili sitokin/kemokin profilleri ortaya konmuştur.

ADA enzim aktiviteleri incelendiğinde en yüksek değeri kritik COVID-19 vakaları oluşturmaktadır. Sitokin/kemokin çalışmalarında; IL-6, TNF-α, IL-12, IFN-ɣ, GM-CSF, ROS, iNOS, arjinaz, IL-4, IL-10 ve M-CSF'de kritik ve ağır vakalarda artış gözlemledik. Hücre kültürü deneylerimizde ise; kritik, ağır vakalar ve in vitro COVID-19 grubunda, ADA2'in M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerle pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bunun yanında, AHÖ incelemelerinde $CD206^{+}$ $CD86^{+}$ M1-M2 miks makrofajlar COVID-19 grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak; makrofaj polarizasyonunun ADA2 ile doğrudan bağlantılı olduğu, ADA1'in ise daha düşük katkı sağladığına dair bulgular elde edilmiştir. Tüm analizlere göre, ağır COVID-19 vakalarında makrofajların M1'den M2'e yönelik bir polarizasyon gösterdiği, fakat daha çok M1-M2 karışık fenotipte heterojenik bir yapı göstermekte olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. Bu durum, COVID-19'da, ADA2'in makrofaj polarizasyonuna etkisini ve hastalık süreciyle muhtemel ilişkisini gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Adenozin deaminaz, ADA1, ADA2, COVID-19

İNGİLİZCE ÖZET

Effect of ADA2 Enzyme Levels and Activity on COVID-19 Infection Severity

COVID-19 is a pandemic disease that emerged in December 2019 in China/Wuhan and has affected the whole world. SARS-CoV-2 is the infectious agent responsible for severe clinical manifestations. Adenosine deaminase (ADA) is an enzyme primarily found in lymphoid tissues and can affect immune system functions. It has two isoforms, ADA1 and ADA2 (CECR1), which can influence T-cell proliferation and monocyte differentiation, respectively.

In our study, we included 41 severe cases, 34 mild/moderate cases, 39 asymptomatic/pre-symptomatic cases, and 6 critical adult COVID-19 patients, as well as 40 healthy individuals as the control group. The enzyme activity was measured using the Giusti and Galanti method. We performed co-culture experiments using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and monocytes isolated from 6 healthy controls. The supernatants obtained after co-culture and COVID-19 patient sera were analyzed using the ELISA method to determine the cytokine/chemokine profiles associated with M1 and M2 phenotypes.

When examining ADA enzyme activities, the highest values were observed in critical COVID-19 cases. In cytokine/chemokine studies, we observed an increase in IL-6, TNF-α, IL-12, IFN-ɣ, GM-CSF, ROS, iNOS, arginase, IL-4, IL-10, and M-CSF in critical and severe cases. In our cell culture experiments, we found that ADA2 exhibited a positive correlation with M2-associated cytokines and chemokines in critical, severe cases, and the in vitro COVID-19 group. Additionally, in flow cytometric analyses, $CD206^{+}$ $CD86^{+}$ M1-M2 mix macrophages were significantly higher in the COVID-19 group.

In conclusion, our findings suggest a direct association between macrophage polarization and ADA2, with ADA1 playing a lesser role. Based on all analyses, macrophages in severe COVID-19 cases exhibit a polarization from M1 to M2, but they also exhibit a mixed phenotype of M1 and M2, indicating heterogeneity. This implies a potential relationship between ADA2, macrophage polarization, and the disease process in COVID-19.

Keywords: Adenosine deaminase, ADA1, ADA2, COVID-19

1.GİRİŞ

COVID-19; 2019 yılının son ayında, Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıktığı düşünülen pandemik hastalıktır. Bu hastalıkta, etiyolojisi bilinmeyen 2003-SARS salgınına benzer vakaların ortaya çıktığı ve çeşitli kronik hastalıkların seyrini de etkilediği gözlemlenmiştir. Nedeni anlaşılamayan bu pnömoni çok sayıda olguya neden olmuş ve 2019-nCoV adıyla yeni koronavirüs olarak tanımlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu yeni koronavirüsü; koronavirus Hastalığı-2019 (COVID-19) olarak isimlendirmiş ve bu hastalığa neden olan patojeni akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)] olarak Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi tarafından adlandırılmıştır. Dünya üzerinde 6.938.353 ölüm dahil 767.364.883 doğrulanmış COVID-19 vaka ile yıkıcı etkiler oluşturmuştur [DSÖ, COVID-19 Güncelleme Raporu. (2023, 31 Mayıs)]. COVID-19, Mart 2020'de DSÖ tarafından küresel çapta pandemi olarak ilan edilmiştir. Yaklaşık üç yılın ardından, DSÖ 5 Mayıs 2023'te COVID-19'un küresel acil durumun sona erdiğini bildirmiştir. Virüsün, damlacık yoluyla ve ortama salınan partiküller ile yahut kontamine olmuş yüzeylerden sağlıklı kişilerin temas etmesi ile (el, ağız, burun gibi) bulaştığı tespit edilmiştir. COVID-19 hafif üst solunum yolu enfeksiyonu bulgularıyla başlayan, yüksek ateş, kuru öksürük, yorgunluk gibi belirtilere sahip olabilen bazı hastalarda baş ağrısı, tat ve koku kaybı, ishal gibi belirtiler verebilen bir hastalıktır. Hastaların bir kısmında ciddi müdahaleler gerekmezken, özellikle kronik hastalığı bulunan vakalarda ağır klinik tablolar oluşabilmekte ve yardımcı suni solunum yöntemlerine gereksinim duyulabilmektedir. Hafif vakalar için ateş düşürücü ilaçlar, bol sıvı tüketimi, istirahat gerekirken, ağır vakalarda hastane yoğun bakım şartlarında ciddi tedavi gerekmektedir.

Kan serumunda ve çoğu dokuda özellikle lenfoid dokularda bulunan ADA (adenozin deaminaz), adenozinin amin molekülünü koparark inozine katalizleyen bir enzimdir. Adenozin, insanlarda immün yanıtların geliştirilmesinde önemli rol oynar. Bu enzim bütün hücrelerde üretilir fakat lenfositlerde daha yüksek düzeyde eksprese edilir. İnsanda ADA1 ve ADA2 olarak adlandırılan izoenzimler, ADA gen kompleksinin içerisinde bulunur. ADA1, ADA aktivitesinin büyük bir kısmını

oluştursa da insan serum ve plazmasında baskın izoenzim ADA2 olarak tespit edilmiştir. ADA1'in edinsel immün sistem gelişiminde, T hücre proliferasyonunda önemli rolü bulunmaktadır. ADA2, yardımcı T hücrelerini ve proliferasyonunu uyarır. Ayrıca yapılan çalışmalarda da ADA2'nin monositlerin makrofajlara farklılaşmasını indüklediğini göstermektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda ADA, T hücre aktivasyonunun ve hücresel immünitenin spesifik olmayan bir belirteci olarak kabul edilmektedir. ADA, aynı zamanda insan dolaşım sistemindeki monositlerin makrofajlara farklılaşması için gereklidir. ADA eksikliği ve ADA ekspresyonundaki artışlar çeşitli hastalıklara yol açabilir. Adenozin eksikliği kalıtsal bir hastalıktır. Bağışıklık sistemi hastalıklarına ve ağır kombine immün yetmezlik sendromuna (severe combined immunodeficiency, SCID) neden olabilir. ADA ekspresyonundaki artış ise hemolitik anemi, meme kanseri gibi hastalıklarda rol oynayabilir. ADA izoenzimleri ADA1 ve ADA2'dir ve adenosin 'deoksiadenosin inosin ve 2 deoksiinosinosin olarak iki nükleosidi deamine eder. Adenosin ve 2'-deoksiadenozin, pürin metabolizmasının ara ürünleridir. İnsan hücrelerinde etkili moleküller olan adenosin ve 2'deoksiadenozin'nin insan anormalliklerinin saptanmasında ilişkili metabolizma rollerinin incelenmesinde önemli görülmektedir.

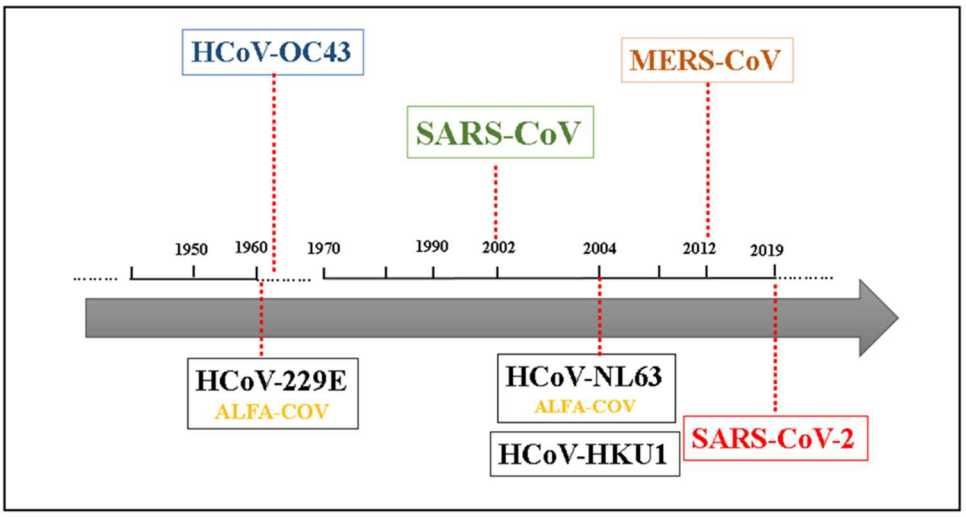
ADA enziminin, immün sistem üzerindeki çarpıcı etkileri, bu enzimin COVID-19 hastalarında nasıl bir rol aldığının incelenmesi gerekliliğini göstermektedir. Literatürde, COVID-19 ADA enzim ilişkisi ve bu enzimatik aktivitenin klinik hastalık şiddetine etkisi konusunda net bir çalışma bulunmamaktadır. Bu enzimin hastalık sürecine etkisi, enzim aktivasyonlarının değerlendirilmesi, ayrıca bu hastaların sitokin/kemokin deneyleri araştırılması önemli görünmektedir. Biz bu düşünce ile; ADA enziminin ve izoenzimlerinin olası rollerini araştırarak, sürece etkilerini değerlendirebilmeyi amaçlıyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüslere Tarihsel Bakış

Yunanca ‘pan’ (bütün) ve ‘demos’ (insanlar) tanımları ile pandemi kavramı türemiştir (Tapısız, & Kıykaç Altınbaş, 2020). Birden fazla kıta yahut geniş alanlara yayılan tüm dünyayı etkisi altına alan çok sayıda insanı etkileyerek salgına yol açan hastalık tanımıdır. Tarihte yer alan birkaç pandemi sürecinden bahsetmek mümkündür. Çiçek hastalığı, tüberküloz ve 14.yy. da çok sayıda insanın ölümüne yol açan veba tarihte yer alan pandemik hastalıklardandır. Günümüzde ise koronavirüslerin oluşturduğu COVID-19 hastalığı pandemi olarak kabul edilmektedir.

Koronavirüs ilk kez, Tyrrell ve Bynoe tarafından (1965) bir kişinin burun akıntısından virüs izole edilmesiyle üretilmiştir ve bu virüs B814 olarak adlandırılmıştır (Tyrrell, & Bynoe, 1965). Bu süreci 1966 yılında Hamre ve Procknow tarafından soğuk algınlığı olan öğrencilerin solunum yollarından izole edilen beş yeni ajan takip etmiştir. 1967 yılında Almeida, & Tyrrell, bu izolatların, kuş bronşiti virüsü ile morfolojik olarak aynı olduğunu belirtmiştir. Daha sonra virüs ile ilişkili altı virüs izole edilmiştir. Bu ajanların karakteristik morfolojisini tanımlayan "koronavirüs" olarak isimlendirilmesi 1968'de kabul edilmiştir (Kahn, & McIntosh, 2005). 20. yy’da iki insan koronavirüsü 229E (HCoV-229E) ve HCoV-OC43 tanımlanmıştır. 21 yy. da ise yaklaşık on yıl arayla Şiddetli akut solunum sendromu (SARS) ve Ortadoğu Solunum Sendromu koronavirüsü (MERS-CoV) ortaya çıkmıştır (Aimrane ve ark., 2022). SARS salgınının ardından 2004-2005 yıllarında ise HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1 insan koronavirüsleri keşfedilmiştir (Forni, Cagliani, Clerici, & Sironi, 2017). Tarihler birbirine çok uzak olmasa da birbiriyle ilişkili CoV’ların bulunabileceği öne sürülmüştür (Şekil 1). Örneğin; HCoV-NL63’ün HCoV-229E ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Graham, Donaldson, & Baric, 2013).

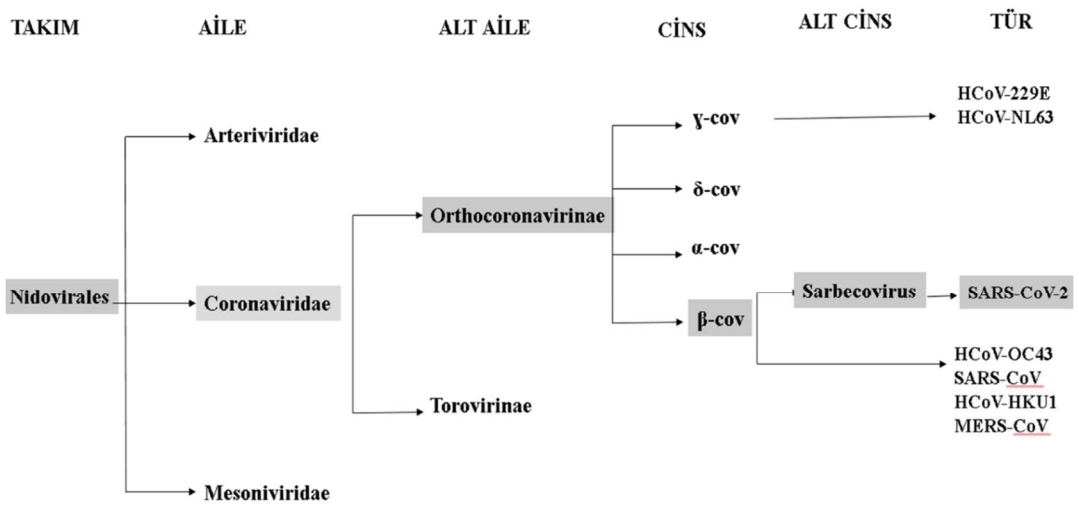


Şekil 1. İnsan Koronavirüslerin (HCoV) Zaman Çizelgesi (Forni ve ark., 2017'den uyarlanmıştır).

2.2. Koronavirüs Ailesi

Koronavirüsler 60 nm ila 140 nm çapında, pozitif yüklü RNA virüsleridir. Orthocoronavirinae alt ailesi genotipik ve serolojik olarak alfa, beta, gamma ve delta olmak üzere dört cinse ayrılır. Alfakoronavirüs ve betakoronavirüs insanları, gammakoronavirüs ve deltakoronavirüs hayvanları enfekte etmektedir (Öztan, & İşsever, 2020).

Günümüzde insanda enfeksiyona neden olan HCoV229E ve HCoV-NL63 (Alfa koronavirus), HCoV-HKU1, HCoV-OC43 (Beta koronavirus), MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome-Beta koronavirus) ve SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome-Beta koronavirus) olmak üzere yedi ayrı koronavirüs tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar SARS-CoV-2'nin Betacoronavirus ile benzerlik gösterdiğini belirlemiştir (Şekil 2). Son yirmi yılda Koronavirüsler SARS ve MERS (Orta Doğu solunum sendromu) olmak üzere iki büyük pandemiye neden olmuştur. SARS-CoV ve MERS-CoV arasında bazı benzerlikler bulunmakla birlikte klinik olarak farklılıklar bulunmaktadır (Forni ve ark., 2017).



Şekil 2. Koronavirüslerin Sınıflandırılması (Malık, 2020)

2.2.1. SARS-CoV

Şiddetli akut solunum sendromu (SARS), 2002 yılı Kasım ayından itibaren Çin'in Guangdong şehrinde gözlenmiştir. İlk vakaların, yabani av hayvanı yemleri ile temas eden hayvan işçileri olduğu ve Misk kedilerinin ara konakçı olabileceği öne sürülmüştür (Yang ve ark., 2020). 2003 yılı şubat ayında Asya'da rapor edilen SARS-CoV (SARS ile ilişkili koronavirüs) atipik pnömoni salgınına yol açan viral bir hastalıktır. SARS kişiden kişiye yakın temas ile yayılmakta ve SARS virüsünün enfekte bir kişiden (öksürük-hapşırık) üretilen damlacıkların havaya karışması ile kolay bir bulaşa neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, damlacık yayılması ile kontamine olan yüzeyler ile temas sonucunda da sağlıklı kişiler enfekte olabilmektedir.

Özetle SARS virüsü çoğunlukla hava yolu ile yayıldığı bildirilmiştir. Genellikle hafif solunum yolu semptomları ile başlayan yüksek ateş ile seyreden bu hastalık komşu ülkelere hızla yayılmıştır. 13 Mart 2003'te Dünya Sağlık Örgütü hastalık ile ilgili küresel bir uyarı yayımlamıştır. Takip eden altı ay içerisinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya çapında yaklaşık 8000 SARS vakası ve 813 ölümü bildirmiştir (Zhong ve ark., 2003).

2.2.2. MERS-CoV

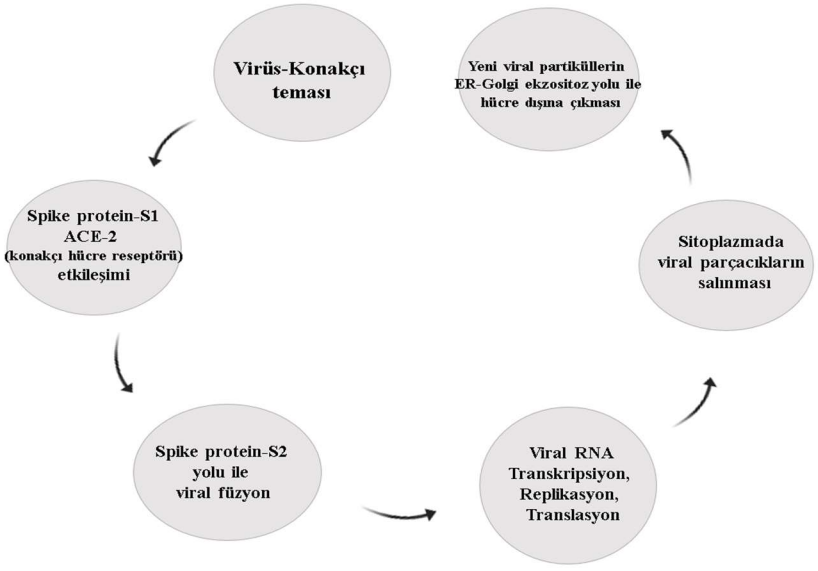
Ortadoğu Solunum Sendromu koronavirüsü [Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)], Haziran-2012'de Suudi Arabistan'da gözlenmiştir. Virüsün özellikle Orta Doğu'da bulunan tek hörgüçlü develerden insanlara doğrudan temas ile bulaştığı öne sürülmüştür (Briese ve ark., 2014). İnsanlar arasındaki bulaş ise, çoğunlukla enfekte kişilerle yakın temas ile gerçekleştiği belirtilmiştir (Mahallawi, Khabour, Zhang, Makhdoum, & Suliman, 2018).

MERS-CoV ilk olarak Eylül 2012'de tanımlanmış ve Haziran 2016'ya kadar 26 ülke içerisinde virüs ihbarı yapılmıştır. Bu süreçte DSÖ, MERS-CoV enfeksiyonu yaklaşık 1700 vaka olduğunu ve 640 kişinin yaşamını kaybettiğini bildirmiştir. Bildirilen vakaların çoğunluğunun Suudi Arabistan Krallığı'nda olduğu gözlenmiş, bunun yanı sıra Katar, Ürdün, Birleşik Arap Emirlikleri (BAE), İran, Yemen'den de vakalar bildirilmiştir. 2015-Haziran itibariyle en büyük MERS-CoV salgını Güney Kore'de ortaya çıkmıştır (Arap Yarımadası dışındaki). MERS-CoV hastalığını açıklayabilmek için hayvan çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda dağ gelinciği, kobay ve farelerin MERS-CoV'a duyarlı olmadığı gözlenmiştir. Öte yandan, DPP4 reseptörü sergileyebilen farelerin laboratuvar şartlarında üretilmesiyle, bu farelerin insan akciğerindekine benzer şekilde MERS-CoV'a tepki verdiği gösterilmiştir. Tavşanların ise MERS-CoV'a duyarlı olduğu fakat enfeksiyon ardından histopatolojik bulguların oldukça zayıf olduğu gözlenmiştir. MERS-CoV patogenezi tam açıklanamamıştır. MERS-CoV enfeksiyonu genellikle SARS-CoV'a benzer şekilde, ateş, öksürük solunum darlığı, diyare gibi semptomlar gösterdiği belirtilmiştir. MERS enfekte kişilerin kan değerlerinde lenfopeni, lökopeni, kan kreatin yüksekliği, laktat dehidrojenaz yüksekliği ve karaciğer enzim seviyelerinde bozulma gözlenmiştir (Mahallawi ve ark., 2018).

2015 MERS salgını ile ilgili 1 yıl içerisinde 182 vaka tanısı konulmuş ve 33 kişinin hayatını kaybettiği açıklanmıştır. Ülkemizde ise bir vaka bildirilmiştir. Eylül 2014'te Suudi Arabistan seyahatinde hastalığa yakalanan bir erkek hasta (42 y) Hatay'a nakil edilmiş ve Ekim 2014'te hayatını kaybetmiştir (İnal, 2016).

2.2.3. SARS-CoV-2

SARS-CoV-2; SARSCoV ve MERS-CoV gibi betakoronavirüs cinsinde yer almaktadır. Ayrıca Nidovirales takımı, Coronaviridae ailesi, Orthocoronavirinae alt ailesi içerisinde yer almaktadır. SARS-CoV ile SARS-CoV-2 arasındaki benzer özelliklerin bulunması sebebiyle bu ismi almıştır. SARS-CoV-2 genom dizileme çalışmalarında SARS-CoV ile yaklaşık %70'lik benzerlik taşımaktadır. Diğer yandan Wuhan yakınlarında bir eyalette *Rhinolophus affinis* türü yarasada bulunan Bat-CoV-RaTG13 ile de oldukça yüksek benzerlik göstermektedir. Fakat aralarındaki dizi farklılıkları nedeniyle SARS-CoV-2 ile filogenetik ilişki belirlenememektedir. Metagenomik dizileme ile *Manis javanica* türü pangolinlerde yapılan çalışmalarda betacoronavirüslere dair bazı bulgular elde edilmiştir. SARS-CoV-2 ile yaklaşık % 85'lik nükleotit sekans homolojisi göstermekte olduğu belirtilmiştir. Yine de özdeşlik konusunda kesin bir sonuca varılamamıştır (Aimrane ve ark., 2022; Ye ve ark,2020). SARS-CoV-2 yaşam döngüsü Şekil 3'te şekilde kısaca özetlenmiştir.



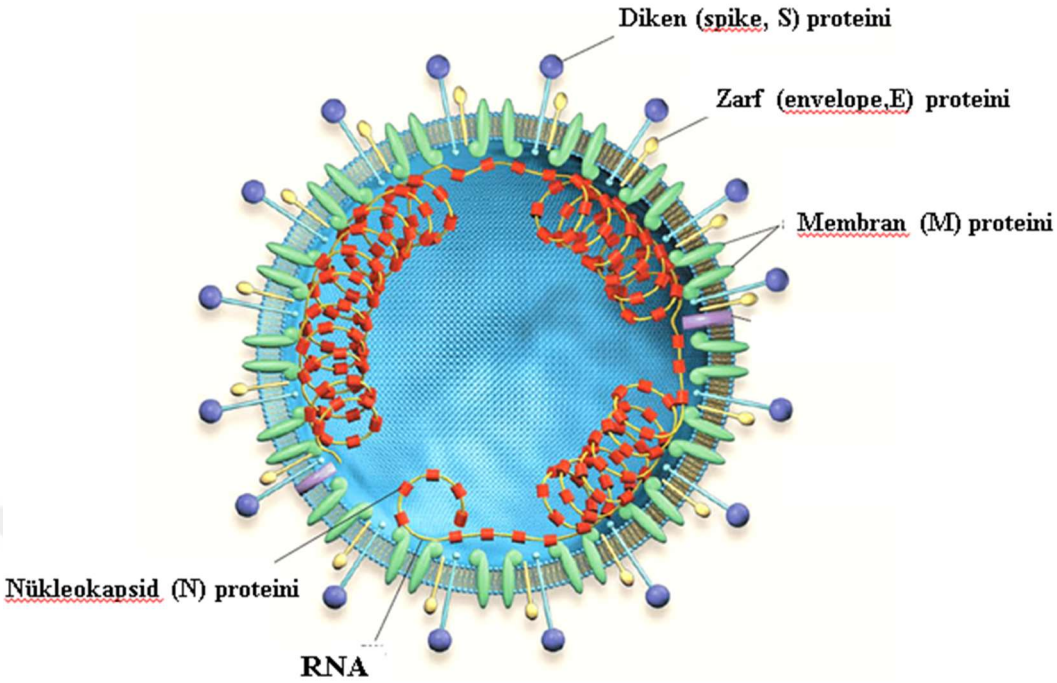
Şekil 3. SARS-CoV-2 Yaşam Döngüsü (Yılmaz, 2022'den uyarlanmıştır.)

2.3. SARS-CoV-2 Yapısı ve Genetik Materyali

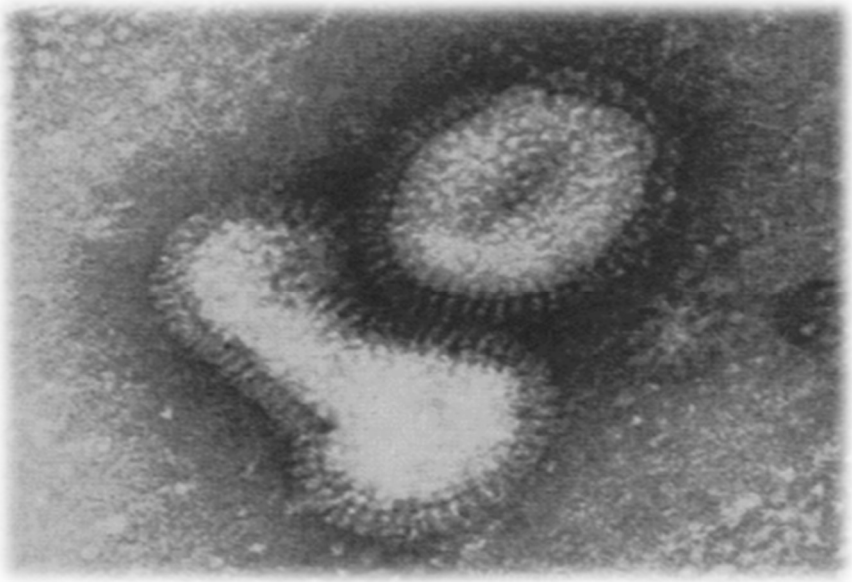
Koronavirüsler, zarflı, 26 ila 32 kb uzunluğunda tek sarmal RNA (ssRNA) virüsleridir ve RNA virüsleri içerinde en uzun genoma sahiptirler (Ge ve ark., 2020). Yaklaşık 29903 nükleotitten oluşan bu genomu bir nükleokapsid çevrelemektedir. SARS-CoV-2 parçacıklarının incelenmesi ile gerek çap uzunluğu gerek dış yüzeyinde oluşmuş çıkıntılar ile Coronaviridae ailesine uygun morfoloji sergilemektedir.

Koronavirüs genomu yapısal olarak; S (spike) protein, N (nükleokapsid) protein, M (membran) protein, E (zarf) proteinden oluşur (Şekil 4). Ayrıca veziküllerin oluşmasında ve genomun replikasyonunda görev alan yapısal olmayan proteinleri (nonstructural proteins (nsps)) ve aksesuar proteinlerini (ORF3a, ORF6, ORF7a ve b, ORF8, ORF10) de kodlamaktadır. Konağın doğal yanıtına karşı koyan aksesuar proteinleri ORF3a, ORF6, ORF7a ve b, ORF8, ORF10 de kodlamaktadır (Abdülmecit, 2020; Ağaçfidan, & Meşe, 2020).

S glikoprotein sayesinde virüs konakçı hücreye rahatça giriş yapabilmektedir. S1-amino ve S2-karboksi uçlarına sahiptir. S1 birimi hücrenin reseptörleri ile etkileşiminde, S2 birimi ise füzyona aracılık eden bir transmembran proteindir. N protein RNA genomuna bağlanır ve nükleokapsid oluşturan tek proteindir. Ayrıca hücresel yanıtta ve replikasyonda rol alır. M protein ise bu virüslerde en çok bulunan yapısal proteindir. Bir etkileşim ağı oluşturarak hücre içinde partiküllerin bir araya gelmesinde rol almaktadır. E protein ise replikasyon sürecinde çok miktarda eksprese olmaktadır ve bu proteinlerin en küçük boyutlusudur (Abdülmecit, 2020).



Şekil 4. Koronavirüs Kesitsel Modeli (Al-Kuraishy, & Al-Gareeb, 2020)

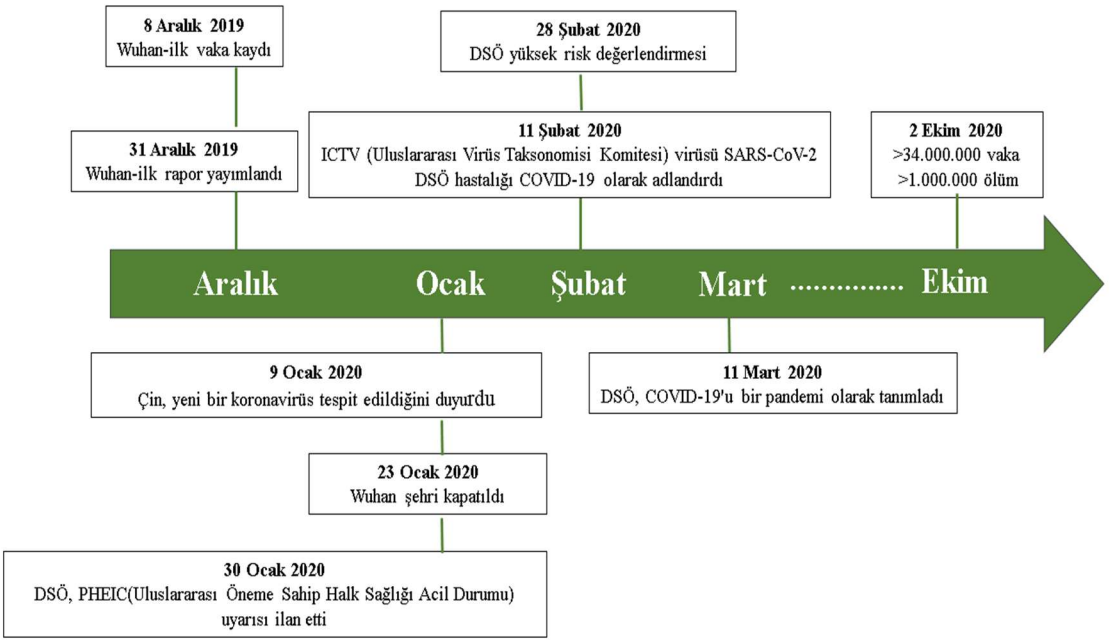


Şekil 5. Koronavirüs Elektron Mikroskobu Görüntüsü (Ağaçfidan, & Meşe, 2020)

2.4. COVID-19 Epidemiyoloji

COVID-19 ilk olarak Aralık 2019'da Çin-Wuhan'dan başlayıp hızla yayılan ve yaklaşık iki ay içerisinde DSÖ tarafından küresel olarak acil durum ilan edilen pandemik bir hastalıktır. İlk vakalar Huanan deniz ürünleri toptan satış pazarı ile bağlantı kurulmuştur (Bogoch ve ark, 2020). Aralık ayı ortalarında beş hasta solunum ve öksürük şikayetleriyle Çin-Hubei de bir hastaneye başvurdu (Ren ve ark., 2020). 31 Aralık 2019'da DSÖ Çin Ofisi tarafından bir epidemiyolojik uyarı yayımlandı ve ilişkilendirilen deniz pazarı 1 Ocak'ta kapatıldı (Şekil 6). Aynı süreçte şüphelenilen 59 vaka belirlenen bir hastaneye alındı. Bu vakalardan 41'inin enfekte olduğu belirtildi (Huang ve ark, 2020). Yaklaşık on gün sonra Çin dışında ilk vaka Taylan'dan bildirildi. ABD 21 Ocak 2020'de Wuhan'dan gelen bir kişi de ilk virüs vakasını bildirdi (Holshue ve ark, 2020). 22 Ocak 2020'de Çin'in 25 eyaletinde toplam 571 vaka bildirildi (Lu, 2020). 25 Ocak 2020 de toplam 1975 vaka 56 ölüm bildirildi (Wang, Tang, & Wei, 2020). 30 Ocak 2020'de Hindistan ilk vakasını bildirdi (Chowdhury, & Oommen, 2020). Şubat ayı ortalarında Çin'in 31 eyaletinden yaklaşık 1000'i ölümle sonuçlanan yaklaşık 52 bin vaka bildirildi (Rothan, & Byrareddy, 2020). Küresel bir salgın haline gelen COVID- 19 vakaları katlanarak arttı. DSÖ 23 Temmuz 2020'de yaklaşık 4 bin ölüm dahil yaklaşık 190 bin vaka kaydedildiğini açıkladı (Meskini ve ark., 2021). Hızla yayılan ve tüm dünyayı etkisi altına alan bu hastalık ülkemizde de 11 Mart 2020'de görülmüştür (Uğraş Dikmen, Kına, Özkan, & İlhan, 2020). Ülkemizde de vaka sayılarında artışlar gözlenmiştir.

Bu süreçte hastalara ait alt solunum yolu örnekleri ile yapılan çalışmada betakoronavirüs olduğu görülmüştür. İnsan hava yolu epitel hücrelerinden izole edilerek incelenmiş ve 2019–nCoV (2019–novel Coronavirus) olarak adlandırılmıştır.11 Şubat 2020 tarihinde bu virüse, yapılan filogenetik ve taksonomik çalışmalar sonucunda SARS–CoV2 olarak adlandırılmış, hastalık aynı tarihte "Koronavirüs hastalığı-2019 (COVID-19)" ismi ile duyurulmuştur.



Şekil 6. COVID-19 salgını önemli olaylar zaman çizelgesi (Graham ve ark., 2013'den uyarlanmıştır).

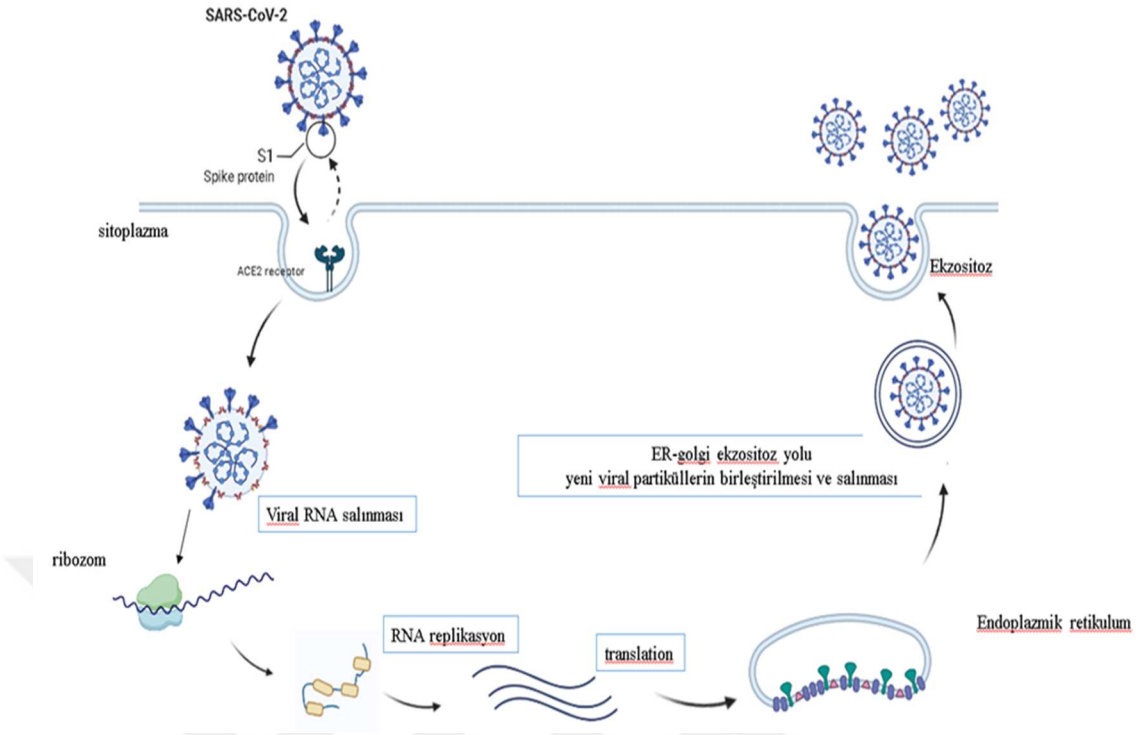
Tablo 1. Salgından yaklaşık 5 ay sonra COVID-19 vaka ve vefat bilgileri (Kartal, Balaban, & Bayraktar, 2021).

	Vaka	Vefat
Amerika	2.049.566	123.091
Avrupa	1.687.098	161.525
Asya	771.984	24.252
Afrika	81.435	2.699
Okyanusya	8.464	126
Dünya	4.598.547	311.693
Türkiye	148.067	4.096

2.5. COVID-19 Patofizyolojisi

SARS-CoV-2 konakçı hücreye ACE-2 ve TMPRSS2 (transmembran serin proteaz 2) kullanarak giriş sağlar. SARS COV-2 aynı SARS-CoV gibi ACE-2 reseptörü ile kolaylıkla bağlanarak fizyolojik fonsiyon sağlamaktadır (Şekil 8). ACE-2 ekspresyonu ne kadar yüksek ise virüs akciğer hasarını daha kolay oluşturmakta bu hasarı gittikçe güçlendirmektedir (Gök Metin, 2020).

İnsan ACE-2 reseptörü ve SARS-CoV-2 bağlantısı gibi SARS-CoV-2 aynı zamanda gelincik, misk kedisi, pangolin, köpek ve tavşan ACE-2'yi de tanımaktadır (Shi ve ark, 2020; Zhao ve ark., 2020). Fazla konakçı aralığı olsa da ACE-2'nin etkinliği ve enfeksiyon sürecine duyarlılığı değişebilmektedir. Koronavirüsün S1 birimi C-terminal ve N-terminal olarak ayrılmaktadır. Bu bölgeler farklı amino asit bölgeleri kodlarlar. C terminal alanı virüs girişinde kritik öneme sahiptir. Bu alan RBD (receptor binding domain) olarak tanımlanır (Walls ve ark., 2020). RBM (receptor binding motif) ACE-2 bağlantısına aracılık eder. Bu bağlanma aşamasında SARS-CoV-2'deki beş alan (Y455L, L486F, N493Q, D494S ve T501N52) SARS-CoV'dan farklıdır (Wan, Shang, Graham, Baric, & Li, 2020). SARS-CoV-2'nin RBM'sinde bir motif alanının insan ACE-2 ile bağlantısı SARS-CoV'dan daha sıkı olduğu bildirilmektedir. Bu durum insan ACE-2'nin N-terminal bölgesi ile iyi bir temas içerisinde olmasını sağlar. SARS-CoV-2'deki bu farklı özellikler insan ACE-2 bağlanma afinitesini arttırmaktadır (Hu, Guo, Zhou, & Zheng-Li; Shang ve ark, 2020; Wan ve ark, 2020). Beyinde ve medulla oblongatada çok miktarda ACE2 bulunmaktadır (Özer, Özer, & Yavuz, 2020). Araştırmalarda SARS-CoV-2'nin akciğer hasarının yanı sıra, kalp hasarlarına, böbrek rahatsızlıklarına da neden olduğu gösterilmiştir. Bazı COVID-19 vakalarında plazmada ACE-2 yüksekliği, akciğer hasarıyla ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark, 2020). Öyle ki SARS-CoV-2'nin solunum yollarından nöral yollara kadar ACE-2 proteinini kullanarak birçok bölgede hasar oluşturup çoklu organ yetmezliğine yol açabildiği belirtilmiştir. Çin'de hastaların yaklaşık %10'unda kalp hasarı (miyokard infarktüs veya yüksek troponin) raporlanmıştır. Hong Kong'da ise, COVID-19 geçirmiş kişilerde akciğer görüntülemelerinde hastalık sonrasında organ hasarı kalabildiği ve kapasitesinin yaklaşık yüzde 25 oranında azaldığı kaydedilmiştir (Gök Metin, 2020).



Şekil 8. SARS-COV-2 Hücre Döngüsü (Beyerstedt, Casaro, & Rangel, 2021'den uyarlanmıştır).

2.6. COVID-19 Bulaş Yolları

COVID-19'un ilk olarak Wuhan'da hayvan pazarının başlangıç noktası olduğu düşünülmüştür. Zaman geçtikçe yapılan araştırmalar hastalığın insandan insana yayıldığını göstermiştir. Özellikle hasta kişiden damlacık yoluyla (hapşırma, öksürük, konuşma vb.) havaya saçılan partiküllerin sağlıklı kişiye teması ile bulaşmakta olduğu belirlenmiştir (Uğraş Dikmen ve ark., 2020). Virüsün damlacıklarda (<çapı beş mikron olmak üzere) herhangi bir bozulma göstermediği ve bulaşıcılık sürecini devam ettirdiği gösterilmiştir (Lotfi, Hamblin, & Rezaeif, 2020). Dolaylı temas ile dış ortamdan enfekte olmuş yüzeylerden sağlıklı kişinin teması sonucu (el, ağız, burun gibi) hastalık bulaşabilmektedir. Plastik ve çelik yüzeyde bir gün boyunca virüsün canlı kalabidiği hatta bu sürenin 3 güne kadar uzayabildiği belirlenmiştir (Uğraş Dikmen ve ark., 2020).

Sağlıklı kişi virüs ile karşılaştıktan sonra 1-15 gün kuluçka süresi geçirebilmektedir. Bu sürede enfekte kişi hiç semptom göstermeyeceği gibi hafif ya da ağır şiddette belirtiler gösterebilir. Bu durum kişinin hipertansiyon, diyabet, kalp

rahatsızlıkları gibi arka planda bilinen yahut bilinmeyen hastalık durumuna göre değişkenlik gösterebilmektedir. Hafif vakalarda çoğunlukla 2 hafta içerisinde iyileşme gözlenebilirken ağır vakalarda bu durum 3-6 hafta olarak değişmektedir. Hafif vakalar için klinik tedavi gerekmez ya da daha az tedavi gerekebilirken ağır vakaların çoğunda hastane şartları hatta yoğun bakım şartlarına gereksinim duyulabilmektedir. Bu hastalığa bağlı kayıplar incelendiğinde semptom başlama sürecinden ölüme kadar yaklaşık 2-8 haftalık bir süreç gözlemlenmektedir. Yaş grupları incelendiğinde ise yenidoğandan yaşlılara kadar birçok yaş grubunu etkileyebildiği kayıtlara geçmiştir. Fakat çocuklardaki belirtilerin diğer yaş gruplarına göre daha hafif seyrettiği ve hastalığı daha kolay atlattıkları belirtilmiştir (Gök Metin, 2020). Hastalığın bu hızlı bulaş sürecinde özellikle maske kullanımı ve ortam havalandırması önem kazanmaktadır. Uygun dezenfektanlar kullanarak kişinin önce kendisini dolayısıyla çevresindeki insanları koruması ve virüsün yayılmasının sınırlanması önem kazanmaktadır (Lotfi ve ark., 2020).

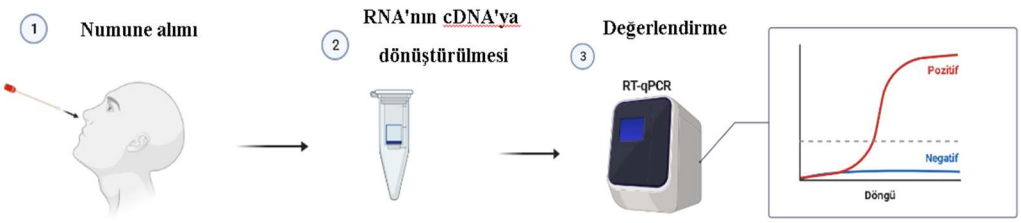
2.7. COVID-19 Klinik Bulgular

COVID-19; virüs ile karşılaşmadan sonra yaklaşık 15 gün içerisinde semptom verebilen bir hastalıktır. Bu kuluçka süresi yaklaşık 4 ila 8 gün arasında değişebilmektedir. Hastalar başvurularına daha çok ateş şikayetiyle gelmekte olup bu durumu takiben öksürük şikayetleri gözlenmiştir. Bazı hastalar da ise hiç semptom gözlenmemiştir. Ayrıca kas ve kemik ağrıları, halsizlik, diyare, boğaz ağrısı sıklıkla gözlenen diğer şikayetler arasındadır (Varghese, John, Manesh, Karthik, & Abraham, 2020). Bu semptomlar daha çok hafif pnömoni varlığında gözlemlenmiştir. Hastalığın ağırlaştığı durumlarda solunum güçlüğü, dispne ve hipoksi gelişmiştir.

Hastalık şiddeti ile ilgili karar sürecini radyolojik bulgular primer olarak etkilemektedir. Hafif bulgularda virüsün akciğer tutulumu yaklaşık yüzde 50 olarak belirlenirken, ciddi vakalarda akciğer tutulumu hızla ilerleyerek entübasyona ihtiyaç duyabilmektedir. Bu vakalarda solunum güçlüğü en üst seviyelere ulaşmaktadır (Karaca, 2020). Hastanın başvuru esnasında belirttiği şikayetler önemli olmakla birlikte tedavi sürecini şekillendiren en önemli veri laboratuvar bulguları ve radyolojik bulgulardır.

2.7.1. Moleküler Testler (RT-PCR)

Standart tanısal test polimeraz zincir reaksiyonu [Quantitative reverse transcription (RT-qPCR)] kantitatif ters transkripsiyon ile ticari PCR testleri kullanılarak SARS-CoV-2 tespitidir (Şekil 9). Nazofaringeal ve orofaringeal sürüntüler ile örnek alınır (Cascella ve ark., 2023).



Şekil 9. RT-PCR Test aşamaları

2.7.2. Laboratuvar Bulguları

COVID-19 vakalarında tam kan sayımı (Complete Blood Count (CBC), hemogram), pıhtılaşma faktörleri, CRP, ferritin, prokalsitonin gibi enflamasyon parametreleri ilk araştırılan testler arasındadır. Hastaların çoğunda lökopeni gözlendiği ayrıca lenfopeni, AST ve ALT (karaciğer enzim testi) yüksekliği, LDH (laktat dehidrogenaz) artışı, D-dimer, CRP ve ferritin değerlerindeki yükseklik kötü prognoz olarak kabul edilmiştir (Karaca,2020; Varghese ve ark., 2020). COVID-19'a bağlı ölümler ve hastalık şiddetleri değerlendirildiğinde ilk ayırt edici parametrenin lenfosit sayısı olduğu görülmektedir. Bu yönden hemogram yaygın kullanılan laboratuvar testlerinde ilk sırayı almaktadır (Ruan, Yang, Wang, Jiang & Song, 2020). Aynı zamanda yapılan birkaç çalışma da artmış nötrofil ve lökosit seviyelerine dikkat çekmektedir (Huang ve ark, 2020; Yuan ve ark., 2020; Wang ve ark, 2020). Yüksek nötrofil-lenfosit oranı COVID-19 vakaları için kötü prognoz göstergesi olabileceği bildirilmektedir (Lagunas-Rangel, 2020; Yang, Liu, Tao, & Li, 2020). CBC incelemelerinin yanı sıra bu hastalarda sıklıkla aPTT ve PT değerlerinde artış görülmektedir. Yüksek D-dimer seviyesi pıhtılaşma faktörlerindeki bu artışı, koagülopatiyi destekler niteliktedir.

2.7.3. Radyolojik Bulgular

Görüntüleme bulguları tanı ve tedavi sürecinde önemli bir role sahiptir. Akciğer grafisi akciğer tutulumu belirleyebilmek adına ortalama bir değere sahiptir. Çünkü hastalığın erken dönemlerinde görülebilen buzlu cam görüntüsü akciğer grafisi ile belirlenemeyebilmektedir (Şener Cömert, & Kıral, 2020). Özellikle bilgisayarlı tomografi (BT) yüksek duyarlılığı sebebiyle hastalığın hafif yahut ağır pnömoni ile ilişkilendirilmesinde yaygın bir tanı yöntemidir (Cascella, Rajnik, Aleem, Dulebohn, & Napoli, 2023). COVID-19 vakalarında sıklıkla bilateral tutulum görülmektedir. Hastalığın şiddetine göre değerlendirildiğinde hafif vakalarda daha çok buzlu cam opasiteleri ile karşılaşılmaktadır. Bu erken dönemde BT bulguları normal görünebilir fakat bu durum hastalığı dışlamaz (Şener Cömert, & Kıral, 2020). Hastalığın ilerleyen evrelerinde daha belirgin insterstisyel vasküler genişleme ve daha dağınık konsolidasyonlar görülmektedir. Bu vakalarda düzensiz lezyonlar, kama veya yelpaze görünümünde, yaygın bilateral asimetri ve sınırların belirsizliği görülmektedir.

2.8. COVID-19 Tanı Kriterleri

SARS-CoV-2 enfeksiyonu kişiden kişiye farklı belirtiler gösterebilmektedir. Bazı durumlarda herhangi bir semptom görülmezken, altta yatan farklı hastalık durumlarında ise daha ağır belirtilerle karşımıza çıkabilmektedir. Boğaz ağrısı, ishal, burun tıkanıklığı, bulantı, baş dönmesi, kusma, anosmi (koku kaybı), ageusia (tat kaybı) gibi birçok farklı belirti karşımıza çıkabilir. Fakat en genel semptomlar ateş %83-99), öksürük (%59-82), yorgunluk (%44-70), anoreksiya (%40-84), nefes darlığı (%31-40) ve kas ağrısı (%11-35)'dır.

Salgın sürecinin iyi yönetilebilmesi için rehber yayımlamıştır [COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Rehberi, 2020; COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Erişkin Hasta Tedavisi, 2022; WHO, Clinical management of COVID-19].

Bu rehbere göre;

Kritik COVID-19 vakaları;

- Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), sepsis, septik şok, mekanik ventilasyon veya vazopresör tedavisi gereken vakalar,

- Radyografi, BT veya akciğer ultrasonu taramalarında bilateral opasite, yüksek hacim, nodül görünümü,
- Oksijenasyon bozuklukları [(Hafif ARDS: arteryel oksijen basıncı (PaO_2)>200 mmHg; Fraction of Inspired Oxygen, (FiO_2)≤ 300 mmHg, pozitif ekspiryum sonu basınç (PEEP) veya Sürekli Pozitif Havayolu Basıncı, Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) ile ≥ 5cmH_2O; Orta ARDS: PaO_2 >100 mmHg, FiO_2 ≤ 200 mmHg (PEEP ile ≥ 5 cmH_2O); Şiddetli ARDS: PaO_2/FiO_2 ≤ 100 mmHg (PEEP ile ≥ 5 cmH2O)].

Ağır COVID-19 vakaları;

- Ateş, öksürük, kas/eklem ağrıları, nefes darlığı belirtileri (solunum hızı>30 nefes/dk; şiddetli solunum sıkıntısı; veya oda havasında SpO2 <%90)
- Radyografi, BT veya akciğer ultrasonu taramalarında bilateral yaygın pnömoni bulgusu saptanan hastalar

Hafif/Orta COVID-19 vakaları;

- Ateş, öksürük, kas/eklem ağrıları, nefes darlığı belirtileri bulunan fakat oda havası SpO2 ≥ %90 olan ciddi pnömoni belirtisi (öksürük veya nefes almada zorluk + hızlı nefes alma) bulunmayan
- Radyografi, BT veya akciğer ultrasonu taramalarında hafif-orta pnömoni bulgusu olan hastalar

Komplike olmamış COVID-19 vakaları;

- Belirtilen kriterlerin bulunmadığı (viral pnömoni veya hipoksi kanıtı olmayan) COVID-19 vaka tanımını karşılayan semptomatik hastalar sınıflandırılması ile tanımlanmaktadır.

2.9. SARS-CoV-2 İmmün Yanıt

Viral enfeksiyonlar da virüs hedef hücreye ulaştığında konakçı bu viral yükü ortadan kaldırabilmek için bir tepki oluşturur. Bu immün tepki doğal immün yanıt ve edinsel immün yanıt olarak gerçekleşir. SARS-CoV-2 hücreye girişinde ilk olarak patern tanıma reseptörleri (pattern recognition receptors, PRR)/Toll benzeri reseptörler (toll-like receptors, TLR) ile tanınır. Konakçıda doğal immün yanıt RIG-I benzeri reseptörler (RIG-I like receptor, RLR), TLR-3 ve TLR-7 gibi PRR'lerin virüsü

tanımasından sonra başlatılır (Demirci, Ünlü, Yiğin, & Zeyrek, 2020). Tek sarmallı RNA (ssRNA) molekülünü tanıyabilen TLR7 ve TLR8 özellikle bronşlarda, düz kas dokularında ve akciğerlerde üretilir (Fitzgerald, & Kagan, 2020). Çift sarmallı RNA (dsRNA) molekülünü tanıyabilen TLR3 ise benzer şekilde akciğer, alveolar ve bronşiyel epitelde salgılanır (Alexopoulou, Holt, Medzhitov, & Flavell, 2001; Bayrakal, & Baskın, 2020; Fitzgerald, & Kagan, 2020). TLR'ler, MyD88 olarak bilinen bir adaptör proteini tanıyabilirler (Alexopoulpu ve ark., 2001). Bu adaptör proteine bağımlı ya da bağımsız yoldan sinyal iletimi gerçekleştirebilirler. Bu sinyal iletiminin ardından, nükleer faktör kappa-B (nuclear factor kappa B, NFκB) ve interferon regülatör faktör-3 (Interferon Regülatör Faktör 3, IRF3)'ün aktive olmasıyla sitokin üretimi indüklenir (Demirci ve ark., 2020).

Doğal ve edinsel immün yanıt patojenlere karşı etkin bir immün yanıt oluşturmak ve konağı savunmak için koordinasyon halindedir. Doğal immün yanıt viral enfeksiyon etkeninin tanınması ve ortadan kaldırılmasında ilk müdahaledir. Çoğalmayı durdurmak, edinsel immün yanıtı uyarmak ve hücreleri bir araya toplamak için sitokinler aracılığı ile uyarım gerçekleşir. Vücutta yaygın olan monositler enfeksiyon bölgesine toplanır. T hücrelere antijen sunumu yapabilmek için makrofajlara veya dendritik hücrelere farklılaşırlar. Uyarılmış bu hücreler antijenleri T hücrelere (naif) sunarak edinsel immün yanıtı uyarmak üzere çalışır. Edinsel immün yanıtta, yardımcı T hücreleri tarafından T-bağımlı B hücrelerinin aktive edilmesi, virüse karşı antikorlar üretilmesi ve sitotoksik T hücreleri tarafından virüsün öldürülmesi gerçekleşir. Edinsel immün yanıtta T hücrelerinin rolü oldukça önemlidir. $CD4^+$ T hücrelerinin B hücresine antikor üretimi için desteği hücrelerin işlevlerini oluşturmaya yardımcıdır. $CD8^+$ T hücreler ise enfekte hücreyi hedef alır, öldürür ve bu sayede viral yükün azalmasına yardımcı olur. Burada virüsün vücuda girişinden itibaren ilerleyen süreçleri değerlendirmede T hücrelerinin rolünü anlamak oldukça değerlidir.

Bir çalışmada ağır COVID-19 vakalarında, hafif vakalara ve sağlıklı kontrollere göre T hücrelerde azalma kaydedilmiştir (Li ve ark., 2020). Bir başka çalışmada COVID-19 vakalarında sağlıklı kontrollere göre daha az $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T hücre ve NKT hücreler, ağır vakalarda ise hafif vakalara göre $CD3^+$ T hücreler ve NKT hücrelerinde azalma gözlenmiştir (Guan ve ark., 2020). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında ağır ve hafif pnömoni hastalarında her iki T hücresinin (CD4 ve CD8)

azaldığı ve lenfopeni gözlenebileceği bildirilmiştir (Jin ve ark., 2020). Azalmış lenfosit seviyesi COVID-19 hastalarının hastalık şiddeti ile güçlü şekilde ilişkilidir. Fakat 2009 yılında farklı bir pandemi de lenfopeni durumu ile ölüm oranı arasındaki korelasyon sebebiyle lenfopeni COVID-19 için spesifik bir özellik olarak tanımlanamamaktadır (Salimi-Jeda ve ark., 2021).

$CD4^+$ ve $CD8^+$ hücreler immün sistemdeki rollerine göre birden fazla gruba ayrılır. $CD4^+$ hücreler Th1, Th2, Th17, Th22; $CD8^+$ hücreler ise Tc1, Tc2, Tc17, Tc22 altgruplarını içerir. Viral enfeksiyonlarda özellikle Treg hücreler enfeksiyonun kontrol altına alınması için virüse ait T hücre yanıtlarının oluşumunda oldukça önemlidir. Ekibimiz ile COVID-19 vakalarında yetişkin ve çocuk hastalarda bu hücre alt gruplarını analiz ettiğimiz bir çalışmamızda; çocuk hastalarda (0-12) sağlıklı kontrollerine kıyasla Tc22 hücrelerinde artış ve yetişkinlerde Th22 ve Tc22'nin COVID-19 vakalarında sağlıklı kontrollere göre arttığı görülmüştür (Çağan ve ark., 2022). Bir çalışmada yetişkin COVID-19 vakalarında Treg'lerin hastalık şiddeti ile arttığı bildirilmiştir. Başka bazı çalışmalarda, $CD25^{high}$ $CD127^{low}$ hücrelerin COVID-19 hastalarında arttığı (Biasi ve ark, 2020), bir başka çalışma da bu hücre alt gruplarının ağır vakalarda hafif vakalara kıyasla artış gözlendiğini belirtmiştir (Peña ve ark, 2021). Bir çalışmada, Treglerin ağır vakalarda sağlıklı kontrollere göre oldukça yüksek artışı dikkat çekmiştir (Neumann ve ark, 2020). Bu sonuçlar ile ters bulgular elde eden çalışmalar da bildirilmektedir. Bir çalışmada, COVID-19 vakalarında $CD25^{high}CD127^{low}$ hücrelerde azalma olduğunu belirtirmiştir (Qin ve ark, 2020). Bir başka çalışmada ağır ve hafif COVID-19 vakalarında Treg alt gruplarında yüzdesel azalma olduğunu belirtmiştir (Liu, Xu, & Lin, 2020). Ayrıca bir çalışmada, non-Treg (nTreg) yüzdesinin ağır vakalarda sağlıklı kontrol grubuna göre oldukça yüksek oranda arttığı ve bu hastalarda iyileşme döneminin ardından bu hücrelerde azalma olduğu bildirilmiştir. Timus kaynaklı $Helios^+$ Treglerin FoxP3 ile ifadesi immün sistemde baskılayıcı bir etki oluşturabilir. Ekibimizin yaptığı bir başka çalışmada $Helios^+$ $FoxP3^+$ Treg hücrelerin COVID-19 vakalarında sağlıklı gruba göre artışı ve ayrıca bu hücrelerin hastalık sürecinin ilerlemesine bir etken olabileceği belirtilmiştir (Simsek ve ark., 2022). Treg polarizasyonunu TGF-β ve FoxP3 destekleyebilir, ADO-A2A adenozin reseptörü etkileşiminin de TGF-β üretimde artışa neden olabilir. Bu durum, eATP'nin ADO dönüşümünde etkili CD39 ve CD73'e dikkat çekmektedir

(Allard, Allard, & Stagg, 2020; Sriram, & Insel, 2021). Ekibimizin yaptığı çalışmada; immün sistem de homeostazı sağlamak için ATP ve ADP'nin metabolizmasında kritik rol oynayan, aşırı immün tepkileri önlemeye yardımcı CD39 eksprese eden Treg hücrelerin genç hastalar arasında yapılan analizlerinde yaş ile orantılı olarak düşüş gösterdiği belirtilmiştir (Simsek ve ark., 2022).

Ekibimizin yaptığı; COVID-19 hastalık şiddetinde $CD8^+$ sitotoksik T lenfosit alt gruplarını analiz edilen bir diğer çalışmamızda ağır COVID-19 vakalarında EM1 (efektör Memory 1) hücrelerin azaldığı, sitotoksik aktivitesi yüksek olan $CD45RA^-$ $CCR7^-CD27^-CD28^-$ EM3 efektör bellek hücre alt grubunun ise artış gösterdiği tespit edilmiştir (Kızmaz ve ark., 2022).

Hümoral immün yanıt kapsamındaki B hücrelerin etkin yanıtı ve enfeksiyon etkeniyle tekrar karşılaşmada hızlı yanıtı oldukça önemlidir. Hastalık etkeni ile ilk etkileşimde bellek B hücreler oluşur ve ardından plazma hücreleri gelişir. Bu şekilde hastalığa karşı uzun süreli ve güçlü bir yanıt sağlanır. Kendi laboratuvarımızda COVID-19 hastalarında B hücre alt gruplarını analiz ettiğimiz bir çalışmamızda, Th1, Th17 cevaplarını süprese eden $CD24^{high}CD38^{high}$ hücreler hafif vakalarda sağlıklı kontrollere göre artış gösterirken, ağır vakalarda azalmıştır. IL-10 üreten $CD24^{high}CD27^{poz}$ hücrelerimiz ve $CD21^+$ $CD27^+$ yüksek proliferatif bellek B hücreleri sağlıklı kontrol grubuna göre ağır pnömoni ve hafif pnömoni hastalarında azalmış bulundu. $CD24^{int}CD38^{int}$ matür B hücreler ise ağır vakalarda sağlıklı kontrole göre artmıştır. $CD24^{high}CD38^{neg}$ bellek B hücreler hasta gruplarında sağlıklı kontrole göre daha düşük, iyileşme döneminde hastalık anına göre artmış bulundu. $CD24^-$ $CD38^{high}$ plazmablast hücrelerinin erişkinlerde hastalık şiddetinin artışına paralel olarak arttığı saptandı. Bitkin B hücrelerin komplike olmamış, hafif pnömonili ve ağır pnömonili hastalarda sağlıklı kontrole göre arttığı görüldü. Hastalık dönemindeki bu artışın iyileşmiş hafif pnömoni ve ağır pnömoni olgularda azaldığı saptandı (Ursavaş, & Akalın, 2021).

2.10. Makrofaj Aktivasyon Sendromu

COVID-19 enfeksiyonunda monosit/makrofaj fenotip değişiklikleri oluşabilmektedir. Lökosit alt kümesi olan monositler kemik iliğinden köken alır ve makrofajlara farklılaşabilirler. Mevcut viral enfeksiyonun sınırlandırılması ve

yayılmasının önlenmesine ya da patojenin öldürülmesine etki eden bu hücreler immün yanıt için önemli bir etken oluşturur. Yerleştikleri yere göre farklı isimlendirilen makrofajlar; deride ‘’langerhans’’, beyinde ‘’mikroglia’’, akciğerde ‘’alveolar’’, karaciğerde ‘’kuppfer’’ hücreleri olarak adlandırılırlar. Enflamasyon sürecinde uyaranlar değiştikçe makrofaj yanıtlarında farklılıklar oluşur. Makrofaj polarizasyonu genel olarak; klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar (CAM, M1) ve alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar (AAM, M2) olarak adlandırılırlar. Bu makrofajlar, morfolojik olarak farklılık gösterirler. M1 makrofajlar daha büyük, düz ve yuvarlak şekile sahipken, M2 makrofajlar yumurta şekilli ya da yana uzamış sivri hücreler olarak görünüm sergiler. Ayrıca M2 makrofajlar; M2a, M2b, M2c ve M2d olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadır (Wang ve ark., 2020). M1 ve M2 makrofajlar normal şartlarda denge halinde bulunurlar. Herhangi bir koşul değişiminde bu durumla savaşmak yahut düzeltmek üzere farklılaşırlar. M1 makrofajlar, enfeksiyon ve doku hasarı gibi durumlarda pro-enflamatuvar yanıt sağlar. M1 makrofajlar, pro-enflamatuvar sitokinlerin (TNF-α, IL-1β, IL-6) üretimini artırarak enflamatuvar yanıtı sağlarlar. Bu sitokinler, enflamasyonun başlatılmasında ve diğer bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Enfekte hücreleri tanıyarak sitokinler ve reaktif oksijen, azot türleri gibi antimikrobiyal moleküller üretirler ve enfeksiyonla mücadelede etkin rol oynarlar. M1 makrofajlar doku hasarı durumunda onarıma yardımcı rol oynasa da aşırı aktivasyonunda bu hasarın artmasına ve kronik enflamasyona da neden olabilir. Özetle M1 makrofajlar patolojik durumlara hızlı ve güçlü yanıt vererek savunmaya yardımcı bir rol izler fakat aşırı aktivasyonu otoimmün hastalıklar dahil kronik enflamatuvar bozukluklara da yol açabilir. M2 makrofajlar ise immün sistem düzenlenmesinde anti-enflamatuvar yanıt sağlar. IL-4 veya IL-13 gibi sitokinlerin etkisi M2a makrofajları aktive eder. M2a makrofajlar; doku iyileşmesine yardımcıdır ve enflamasyonun sona ermesine katkıda bulunur. Ayrıca Th2 yanıtları ile ilişkilidirler ve immün sistemin dengelenmesinde yardımcı rol alırlar. IL-1β ve lipopolisakkart (LPS) gibi uyarıcıların etkisiyle M2b makrofajlarının aktivasyonu gerçekleşir. Bu makrofajlar enflamasyonu baskılar ve immün regülasyonda görev alırlar. IL-10 gibi anti-enflamatuar sitokinlerin etkisi ile M2c makrofajlar uyarılır. M2c makrofajlar, doku onarımı ve immünsüpresyonda görev alırlar. Genel olarak M2 makrofajlar enflamasyonun kontrolü, doku onarımı ve immün sistem dengeleme

fonksiyonları ile koruyucu bir rol alırlar. Makrofaj aktivasyon sendromu (MAS), immün sistemin aşırı aktivasyonuyla doku ve organlarda harabiyete neden olan yaşamı tehdit eden ciddi bir durumdur. COVID-19 vakalarında da aşırı sitokin üretimi MAS'a benzer klinik bulgular gösterir. COVID-19 MAS bağlantılı enflamasyonda MAS'a bağlı sitokin fırtınasının hastalığın gelişiminde olumsuz etki gösterdiği yapılan çalışmalarla literatürde yer almıştır (Çakır, Gürsoy, & Topçuoğlu, 2020).

Sitokin fırtınası sırasında interferon gamma (IFN-γ), Tümör Nekroz Faktör (TNF) ve İnterlökin 1, 6, 18 ve 33 (IL-1, IL-6, IL-18, IL-33) gibi çok sayıda sitokin uyarısıyla makrofaj aktivasyonu gerçekleşir. Bu durum immün yanıtın artışına ve çoklu organ disfonksiyonuna neden olur. Bu durumun kontrol altına alınabilmesi için immün sistem anti-enflamatuvar sitokinler salgılamaya başlar. Enflamasyonun devamında değişken uyarılara karşın makrofajların yanıtlarında farklılıklar meydana gelir ve bu farklılıklar M1 makrofajlar ve M2 makrofajlar olarak adlandırılır. M1 makrofajlar için IFN-γ ve TNF-α belirli sitokinlerdir. M2 makrofajlar ise anti-enflamatuvar özelliktedir ve Th2 immün yanıtı teşvik edebilir (Rostam, Reynolds, Alexander, Gadegaard & Ghaemmaghami, 2017). Makrofajlar immün yanıtı karşılayacak şekilde değişim sergilemektedir. İmmün yanıtın enflamasyona verdiği yanıttaki bu farklılıklar hastalığın seyrini etkiler ve hafif/orta veya ağır hastalık oluşumuna yol açar. MAS açısından ayırıcı tanı hastalık sürecinde önem arz etmektedir (Atay, 2020). SARS-CoV-2 enfeksiyonu, yoğun bir enflamatuvar yanıtı tetikler ve başlıca IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ sitokinlerinin hızlı salınımına yol açar. Akciğer hasarının ana mekanizması sitokinlerin etkisiyle nötrofillerin enflamasyon alanına gelerek aktivasyonu aracılığı ile gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda hafif/orta COVID-19 vakalarında sağlıklı gruba kıyasla daha yüksek GM-CSF, IL-9, IFN-γ, IL-6, IL-1β, IL-10, G-CSF, IL-7, makrofaj enflamatuvar protein-1a [Macrophage inflammatory protein (MIP-1a)], TNF-α ekspresyonu görülmüştür. IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α ağır vakalarda daha yüksek ekspresyonu olduğu belirtilmiştir. Ağır vakalarda IL-6/IFN-γ oranındaki artış, immünpatolojik sitokin cevabı için bir göstergedir. Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS)'nin patofizyolojisinde ROS, NETozis, sitokin salınımı ve nötrofil aktivasyonu oldukça önemlidir (İnal, Duman, & Kurtaran, 2020). PARC (CCL18) ve TARC (CCL17) immün sistem hücreleri arası iletişimde ve hedef bölgelere geçişlerinde rol alan sinyal

moleküllerdir. PARC özellikle akciğer dokusundan salınan, enflamasyon durumlarında artabilen, TARC ise T lenfositlerin aktivasyonu ile ilişkilendirilen bir kemokin moleküldür (Frutos ve ark., 2021). TARC bazı dokularda düşük ifade edilirken enflamasyon durumlarında düzeyi artabilmekte ve CCR4 reseptörüyle etkileşim kurarak T lenfositleri hedef bölgelere yönlendirmektedir. (Machura ve ark., 2011). CCL24, özellikle eozinofillerde, bazofillerde ve T lenfositler gibi immün sistem hücrelerinde ifade edilen, alerjik ve enflamatuvar durumlarda artabilen kemoatraktan olarak çalışır (Ahmadi, Hassanshahi, Khorramdelazad, Zainodini, & Koochakzadeh 2016; Liacouras ve ark., 2011). İmmün sistemde hücre fonksiyonlarında arjinaz da görev almaktadır. Arjinin'in ornitin ve üreye dönüştüren arjinaz enziminin iki izoformu vardır. Arjinaz 1, karaciğer ve diğer bazı dokularda bulunur ve özellikle üre döngüsünde yer alır. Arjinaz 2 özellikle böbrekte ve diğer dokularda bulunur ve hücresel enerji metabolizmasında görev alır. Arjinaz NK hücrelerde ve sitotoksik T hücrelerde bulunur. Aktivasyonu arjinin tüketimine yol açar ve sitotoksisiteyi ve hücresel yanıtları etkiler. Ayrıca T lenfosit proliferasyonu, sitokin üretimlerini de etkileyebilir. (Ljubisavljevic ve ark., 2012; Yang, & Ming, 2006).

2.11. Tedavi

Ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanmış olan COVID-19 tedavi rehberine göre uygun protokoller izlenmektedir. Uygulanan tüm protokollere göre tedavi belli ana başlıklar çerçevesinde gerçekleşmektedir. Bireyin hastane başvurusu ile yapılan ayırıcı tanı yöntemlerinin ardından vaka sınıflandırılmalarına göre tedavi yöntemleri belirlenmektedir. Pnömoni saptanmayan komplike olmamış vaka sınıflandırmasında kişiye antibiyotik tedavisi önerilmez ve izolasyon yöntemi ile evde takip önerilir. Pnömoni varlığında ise hastalık şiddetine göre bireyler ya evde takip halinde ya da hastane şartlarında tedavi altına alınmaktadırlar. Salgının başlangıcında farklı hastalıklar için ruhsatlandırılmış, virüse karşı etkisi belirlenen ilaçların kullanımı birçok ülkede kabul görmüştür. Favipiravir, remdesivir, lopinavir-ritonavir, hidroksiklorokin bu ilaçlar arasındadır. Salgının başlangıcında kabul görse de ilerleyen süreçlerde mevcut veriler güncellenmiştir. Hidroksiklorokin ve lopinavir/ritonavir'in etkinliğinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Remdesivir'in ağır COVID-19 vakalarında etkin olduğu, favipiravir'in ise semptom süreçlerini kısalttığı

bu sebeple hekimin uygun görmesi halinde kullanımı önerilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2022).

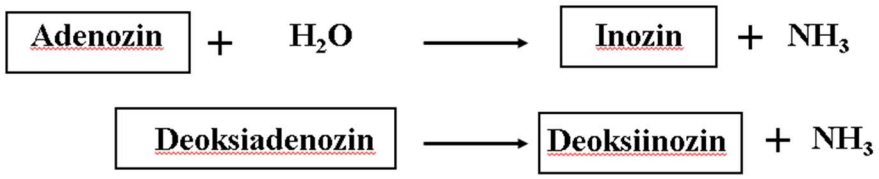
COVID-19 tedavisi için birçok araştırma yapılmıştır. Ağır hastalar için özellikle IL-1 ve IL-6 yüksek olduğu durumlarda sitokin antagonistlerinin kullanımı önerilmektedir (Şener, 2020). Geniş bir spektrumu olan, klinikte çoğunlukla hepatit tedavisi sırasında kullanılan IFN-α SARS-CoV-2 çoğalmasını baskıladığı bildirilmektedir (Mutlu, Uygun, & Erden, 2020; Stockman, Bellamy, & Garner, 2006).

Daha önceleri ortaya çıkmış olan koronavirüs salgınlarında ebola tedavisinde kullanılan Remdesivir'in viral polimerazı baskıladığı bildirilmiştir (Agostini ve ark.,2018; Aşker, 2021; Pascarella ve ark.,2020). Daha çok romatoid artrit ilacı olarak bilinen Anakinra IL-1 antogonistidir. Bu ilacın sitokin fırtınası görülen ağır COVID-19 vakalarında güvenli bir seçenek olabileceği belirtilmektedir. Yine romatoid artrit hastalarında kullanılan IL-6 reseptör antagonisti tocilizumab ve sarilumab COVID-19 hastalarında etkili olduğu bildirilen ilaçlardandır. Viral enfeksiyonlarda ve kanserde PD-1 (programlı ölüm ligandı-1) inhibitörü olarak kullanılan pembrolizubab ve nivolumab viral yükü azaltabileceği bildirilen ilaçlar arasındadır (Aşker, 2021).

Virüs ile temasın gerçekleştiği durumlarda ilk olarak virüsün yayılmasını kontrol altına alabilmek, baskılamak ya da kontrolsüz ilerleyebilen enflamatuvar yanıtın düzenlenmesi gereklidir. Bir diğer tedavi ise virüs ile temasın ardından iyileşmiş hastalardan elde edilen immün plazma yöntemidir. Bu yöntem ile amaç, virüse karşı antikor oluşturmuş bireylerden elde edilen plazma ile hasta kişiye nakli ve bu nakil sonucunda virüs nötralizasyonu sağlayabilmektir (Uğuz, & Eşkut, 2020).

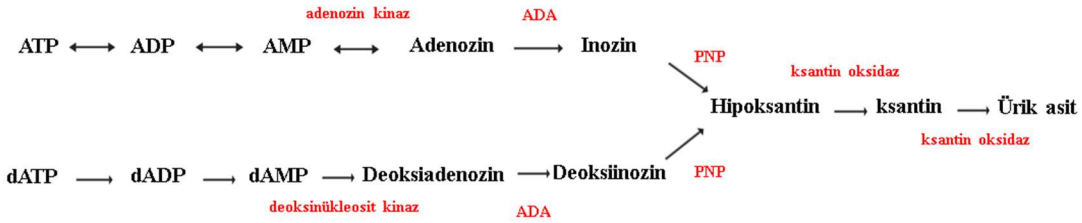
2.12. Adenozin Deaminaz (ADA)

Adenozin deaminaz (ADA, EC 3.5.4.4) pürin metabolizmasında anahtar bir enzimdir. Amin grubunun koparılmasıyla adenozinin inozine, 2'-deoksiadenozinin ise 2'-deoksiinosine ve amonyağa dönüşümünü katalizleyen bir enzim olarak bilinir. (Conway, & Cooke, 1939; Cortés ve ark., 2015)



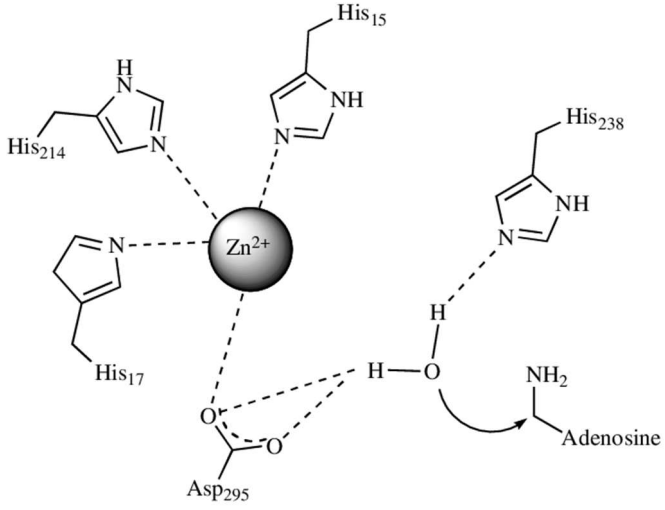
Şekil 10. ADA pürin metabolizma yolunun kısa gösterimi

ADA aktivitesindeki değişkenlikler metabolik substratların birikimine yol açar. Bu durum hücresel fonksiyon üzerinde ciddi etkilerle sonuçlanabilir. Genel ADA pürin yolu aşağıdaki şekil 11'de gösterilmiştir (Whitmore, & Gaspar, 2016).



Şekil 11. ADA pürin metabolizma yolu genel gösterimi (Whitmore, & Gaspar, 2016)

İnsan genomundaki ADA, 20q13.11 kromozomunda bulunur (Rüstemoglu ve ark., 2016). ADA yapısı 8 alfa (α) periferde ve 8 beta (β) merkezde olmak üzere alfa-beta kompleksinden oluşan monomerik bir proteindir. Merkezinde bir çinko (Zn) kofaktörü barındırır. ADA'nın atomik yapısı Şekil 12'de gösterilmiştir (Wilson, Rudolph, & Quiocho, 1991).



Şekil 12. ADA'nın atomik yapısı (Antonioli ve ark., 2012)

ADA'nın birçok dokuda bulunması ve sistem içerisindeki yaygınlığı sebebiyle eksikliğinde metabolit yol bozulmakta ve ciddi sonuçlarla karşılaşılmaktadır (Ferrua, Brigida, & Aiuti, 2010; Whitmore, & Gaspar, 2016). Adenozinin geniş etkileri farklı yolaklar üzerinden gerçekleşir. Hücre yüzeyi G-protein ve adenozin bağlantısı ardından, adenozinin 4 alt reseptörü devreye girer. Bu reseptörlerin hepsi büyüme ve farklılaşmalarını mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ile gerçekleştirir (Demeli, Bayrak, & Pehlivanoğlu, 2022). Siklik adenozin monofosfatın (cAMP) hücre içi indüksiyonu A2A ve A2B reseptörleri ile gerçekleştirilirken, A1 ve A3 alt reseptörler inhibisyonda görev alır (Churov, & Zhulai, 2021). Hücre içi adenozin, adenozin kinaz reseptörleri (ADK) ile kontrol edilir. Hücre dışı ATP'nin AMP dönüşümünde ise CD39 ve CD73 etki eder. CD39 (ektonükleosit trifosfat difosfohidrolaz-1) ve CD73 (ekto-5'- nükleotidaz) birer ektonükleazdır. T regülatör hücreler (Treg), doğal öldürücü hücreler (NK), B hücreler gibi bazı hücreler ise her ikisini de taşıyabilirler. Ayrıca tümör hücrelerinde yapılan bazı çalışmalar göstermiştir ki, adenozin seviyelerinin artması, ASH aracılı T hücre aktivasyon yolunda engel oluşturabilmekte ve dendritik hücre (DC) aktivitesini de düzenleyebilmektedir. A2BR yolunda adenozin oluşumundan makrofajlar da etkilenebilmekte ve fenotip proenflamatuvardan antienflamatuvara geçiş gösterebilmektedir. Bu şekilde etkileşim yoğunluğu tümör tedavisinde, CD39-CD73-Adenozin yollarının kullanılabileceğini göstermektedir (Churov, & Zhulai, 2021). ADA enzimi lenfositlerin farklılaşmasında ve proliferasyonunda önemli etkilere sahiptir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda ADA, T hücre aktivasyonunun ve hücresel immünitenin non-spesifik bir belirteci olarak kabul edilmektedir. ADA aynı zamanda insan dolaşım sistemindeki monositlerin makrofajlara olgunlaşması için önemlidir (Zavialov ve ark., 2010). T hücrelerde B hücrelere oranla daha fazladır. Bu sebeplerle ADA hücresel immünite için önemli bir ayıraçtır (Hatipoğlu ve ark., 2003). ADA eksikliği ve ADA ekspresyonundaki artışlar çeşitli hastalıklara yol açabilir. Adenozin eksikliği kalıtsal bir hastalıktır. ADA eksikliği T ve B hücrelerde gelişim bozuklukları oluşturabilir ve kombine immün yetmezlik sendromuna (SCID) neden olabilir (Sauer, Brigida, Carriglio, & Aiuti, 2012). ADA seviyelerindeki değişiklikler; tüberküloz (Garcia-Zamalloa, & Taboada-Gomez, 2012; Krenke, & Korczyński, 2010), Sistemik lupus eritematozus (Hitoglu ve

ark., 2001; Saghiri ve ark., 2012), romatoid artrit (Zamani, Jamali, & Jamali, 2012), koroner arter hastalığı (Tang, Ma, Dong, Liu, & Liu, 2006), multipl skleroz (Vivekanandhan, Soundararajan, Tripathi, & Maheshwari, 2005), pankreas hastalıkları (İbiş ve ark., 2007) gibi birçok farklı hastalıkta tanımlanmıştır. Toksik etki oluşturabilen moleküller adenosin ve 2'deoksiadenozin'nin insan anormalliklerinin saptanmasında önemli görülmektedir (Gakis, 1996; Fox, & Kelley, 1978). İnsanda ADA, optimal pH, substrat bağlanma paterni ve molekül ağırlıkları dikkate alındığında 2 izoenzimden oluşur. Bu izoenzimler ADA1 ve ADA2 olarak isimlendirilmiştir.

2.12.1. ADA1 (Adenozin deaminaz-1)

ADA izozimlerinden biri olan adenosin deaminaz-1 (ADA1), 20q13.12 kromozomunda bulunur ve düşük bir molekül ağırlığına sahip 41 kDa monomerdir. ADA1'in optimal pH'si 7–7,5 ve Km'si (michaelis sabiti) 5,2 × 10-5 M'dır (Gakis, 1996). ADA1, Adenozini deaminleyerek inosin üretimi sağlar. Böylece hücre içi ve hücre dışı adenosin seviyelerini düzenler (Gary ve ark., 2020). ADA1 genel bir ifadeye sahiptir. Özellikle lenfositler ve eritrositler olmak üzere çoğu dokuda bulunabilir (Meyts, & Aksentijevich, 2018). ADA1, ADA aktivitesinin yüksek oranından sorumludur. Pürin metabolizma yolunun hem hücre içi hem de CD26 yoluyla hücre yüzeylerine bağlanabilen bir ektoenzimdir (Meyts, & Aksentijevich, 2018; Tardif ve ark., 2019).

ADA1, substratlar bakımından (Ado-dAdo) ADA2'ye göre daha yüksek afiniteye sahiptir. Kısmen homolog olan bu iki proteinin farklı yapı ve işleve sahip olduğu düşünülmektedir (Schrader, Pollara, & Meuwissen., 1978). ADA1'in ilk rolü, bu substratların zararlı türevlerini yok etmek ve hücreleri apoptozdan korumaktır. Ayrıca ADA1 T lenfositler aracılı immün yanıt düzenlenmesinde önemli bir rol almaktadır (Kutryb-Zajac ve ark., 2021). Yüksek Ado seviyelerinin lenfosit aktivasyonu üzerinde inhibe edici etkisi bildirilmektedir. Bu şekilde, kalıtsal mutasyonlar aracılığıyla ADA1 yokluğu SCID (şiddetli kombine immün yetmezlik) gibi ciddi immün yetmezlik hastalıklarıyla sonuçlanmaktadır (Hershfield, 2005).

2.12.2. ADA2 (Adenozin deaminaz-2)

ADA2; kedigözü sendromu kritik bölge proteini 1 (Cat Eye Syndrome Chromosome Region 1, CECR1) olarak da isimlendirilir. 22q11.1 kromozomunda bulunur ve 59 kDa monomer ya da homodimer yapıdadır. ADA2, ADA1'e göre çok daha yüksek michaelis sabitine sahiptir (200×10^{-5} M) ve optimal pH'si 6,9'dur (Gakis, 1996; Meyts, & Aksentijevich, 2018). Daha önce bahsedilen CD26-ADA1 kompleksinde durum ADA2 de daha farklıdır. ADA1 ile bağlanan CD26 ADA2 ile bağlanmamaktadır (Dong ve ark., 1996; Richard ve ark., 2000). Ayrıca ADA-1 $CD16^-$ monositlerine bağlanırken, ADA-2'nin $CD16^+$ monositlere, nötrofillere, B ve NK hücrelerine bağlandığı da belirtilmektedir (Kaljas ve ark., 2017). Miyeloid hücrelerde yüksek oranda eksprese edilen ADA2, makrofajlar ve dendritik hücrelere farklılaşan aktive monositlerden üretilir (Iwaki-Egawa, Yamamoto, & Watanabe, 2006; Zavialov ve ark., 2010). ADA-2'nin insan serumunda baskın izoenzim olduğu ve monosit-makrofaj kökenli olduğu belirtilmektedir (Kutryb-Zajac ve ark., 2021). Enflamatuvar yanıt oluşumunda miyeloid hücreler tarafından ADA2 salınmaktadır. Bu hastalarda bazı hücre dışı sıvılarında yüksek ADA-2 seviyeleri bulunmaktadır. ADA2 aktivitesindeki bu değişiklikler otoimmün hastalıklar, kronik hepatit, AIDS, crohn hastalıklarında görülebilmektedir (Fernández ve ark., 2000; Iwaki-Egawa ve ark., 2006; Niedzwicki ve ark., 1991; Sari, Taysi, Yilmaz, & Bakan, 2003; Tsuboi ve ark., 1995; Valadbeigi, Saghiri, Ebrahimi-Rad, Khatami, & Akhbari, 2019; Valdés, San José, Alvarez, & Valle, 1996). Genel olarak ADA2 aktivitesi iltihaplanma, hipoksi, onkogenez gibi durumlarda daha yüksek görülmektedir. ADA2 eksikliği ile karakterize DADA2 (Adenozin Deaminaz 2 Eksikliği) hastalarında; B hücrelerde oluşan değişkenlikler bu proteinin edinsel immün yanıttaki rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Caorsi, Penco, Schena, & Gattorno, 2016). Ayrıca ADA2 eksikliğinin M1 makrofaj polarizasyonuna yönelim ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Meyts, & Aksentijevich, 2018; Watanabe ve ark., 2019).

ADA2 aktivitesi; EHNA [eritro-9-(2-hidroksi-3-nonil)adenin] varlığında, tADA(total-ADA) aktivitesinden ADA1 aktivitesi çıkartılarak hesaplanır. EHNA; ADA1'e bağlanan fakat ADA2'ye bağlanmayan bilinen tek ADA1 inhibitörüdür (Gao ve ark., 2020; Schrader, Pollara, & Meuwissen, 1978).

ADA enziminin, biyolojik rollerine dair oldukça ilgi çekici özellikleri

bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında COVID-19 hastalık şiddetinde ADA enziminin ve izoenzimlerinin rolünü araştırmanın önem arzettiği görülmektedir. COVID-19/ ADA enzim ilişkisi, hastalık şiddetinde ADA ve izoenzimlerinin aktivasyonun araştırılması, bu hastalardan sitokin/kemokin profillerin incelenmesi gerekli görülmüştür. Ayrıca ADA'nın COVID-19 hastalık şiddeti ve M1/M2 polarizasyonu üzerinde nasıl bir rol aldığı incelenerek hastalığın immunopatogenezinde makrofajların potansiyel rollerine dair literatüre katkı sunmak amaçlanmıştır. Çalışmamızın, COVID-19 tanı, tedavi ve takibine yeni bakış açıları kazandıracağına inanmaktayız.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastaların Seçimi ve Çalışma Planı

Çalışma için, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran COVID-19 hastalarından rutin kontroller sırasında yapılan tetkikler için alınan kanlarından arta kalanlar kullanıldı. Sağlıklı kontrol grubu için ise Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezine kan vermek üzere gelen donörlerden kan alımı sırasında 7 ml kan örnekleri alındı. Hastalara ve sağlıklı kontrol grubuna ait kan örnekleri serumları ayrıldıktan sonra -20°C'de derin dondurucuda saklandı. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı (16.09.2020 Karar no: 2020-16/10).

Çalışmadaki hasta grupları, belirtilen anabilim dallarında tanısı konmuş kritik, ağır vaka, hafif/orta vaka ve a/presemptomatik vakalar olarak belirlendi. İlgili birimlere başvuran 41 ağır vaka (22 erkek ve 19 kadın), 36 hafif/orta vaka (19 erkek ve 17 kadın), 37 a/presemptomatik (17 kadın ve 20 erkek) ve 6 kritik seviye (4 erkek ve 2 kadın) olmak üzere toplam 120 yetişkin COVID-19 hastası ve 40 sağlıklı kontrol grubu (16 erkek ve 24 kadın) olmak üzere toplam 160 kişi çalışmaya alındı. Hastalara ait demografik bilgiler (yaş, cinsiyet vb) kayıt altına alındı. Bu tanı ve sınıflandırma hastanın klinik semptomlarına ve laboratuvar değerlendirmelerine göre yapıldı. Öncelikle hastaların klinik özellikleri değerlendirilerek enfeksiyonun yaygın belirtileri (nefes darlığı, öksürük, ateş) ve halsizlik, eklem ağrıları, baş ağrısı, burun akıntısı, tat ve koku kaybı gibi diğer semptomlar incelenmiştir. Bu tür semptomlarla hastanemize başvuran kişilerin burun ve boğaz ardından alınmış sürüntü örneklerinin RT-PCR (reverse transckripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu) çalışması ile pozitif sonuç veren kişiler hasta olarak değerlendirilip sınflandırmaya dahil edilmiştir.

18 yaş ve üzerindeki hastalar, klinik tanısı konulmuş kritik, ağır, orta/hafif vaka ve a/presemptomatik COVID-19 hastaları, bilgilendirilmiş hasta onam formu vermiş olan kişiler ve COVID-19 haricinde herhangi bir hastalığı olmayan kişiler hasta grubunda çalışmaya dahil edilmiştir. Sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubu ise 18 yaş ve üzerindeki kan merkezine donör adayı olarak başvuran, bilinen hastalığı olmayan kişiler, bilgilendirilmiş sağlıklı onam formu vermiş olan kişilerdir.

3.2. İnsan ADA-1 ve ADA-2 (CECR1) Serum Düzeylerinin Saptanması

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından ADA-1 ve ADA-2 (CECR1) serum düzeylerinin saptanması için ticari olarak satılan kit (Sunred bio-teknoloji, Çin) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma için bu gruplara ait serum örnekleri kullanıldı. Deneyler kit üreticisi ticari firmanın önerdiği protokol üzerinden gerçekleştirildi.



Şekil 13. ADA serum düzeyi çalışması

Uygulanan deney protokolü şu şekildedir:

Standart hazırlanması

Orijinal standart, standart dilüsyon solüsyonu ile önerilen seyreltme gradyanı ile seyreltildi.

(1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32)

- Standart kuyularına 50 uL standart örnekleri eklendi.
- Test kuyularına örneklerden 40 uL eklendi.
- Örnek kuyularına 10 uL CECR1 antikoru eklendi.
- Tüm kuyulara 50 uL streptavidin-HRP eklendi.
- 37 °C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı.
- 50 uL chromogen solution A ve 50 uL chromogen solution B eklendi.

- 37 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 50 uL stop solüsyonu eklendi ve ardından 450 nm de ölçümler kayıt edildi. (Chromate, model 4300, USA)

Standartlar ve hasta serumları aşağıda belirtilen şekilde planlanmıştır (Tablo 2, 3):

Tablo 2. Serum Düzeyi Çalışma planı 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standart	Standart	K1	A3	A11	H1	H9	H17	P7	P15	S5	S13
B	Standart 1/2	Standart 1/2	K2	A4	A12	H2	H10	H18	P8	P16	S6	S14
C	Standart 1/4	Standart 1/4	K3	A5	A13	H3	H11	P1	P9	P17	S7	S15
D	Standart 1/8	Standart 1/8	K4	A6	A14	H4	H12	P2	P10	P18	S8	S16
E	Standart 1/16	Standart 1/16	K5	A7	A15	H5	H13	P3	P11	S1	S9	S17
F	Standart 1/32	Standart 1/32	K6	A8	A16	H6	H14	P4	P12	S2	S10	S18
G	Boş	Boş	A1	A9	A17	H7	H15	P5	P13	S3	S11	S19
H	Boş	Boş	A2	A10	A18	H8	H16	P6	P14	S4	S12	S20

K: Kritik A: Ağır Pnömoni H: Hafif Pnömoni P: a/presemptomatik S: Sağlıklı Kontrol

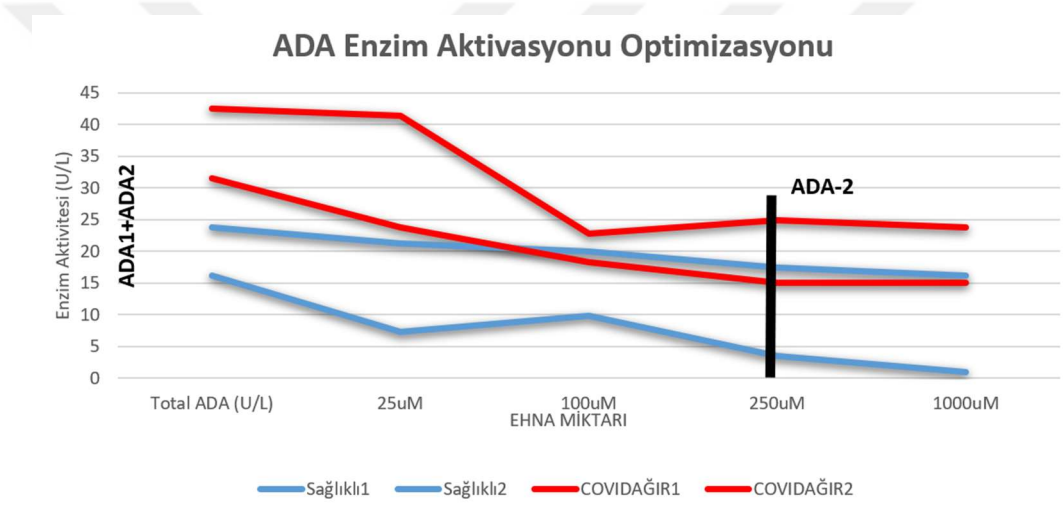
Tablo 3. Serum Düzeyi Çalışma planı 2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standart	Standart	A19	A27	A35	H20	H28	H36	P26	P34	S25	S33
B	Standart 1/2	Standart 1/2	A20	A28	A36	H21	H29	P19	P27	P35	S26	S34
C	Standart 1/4	Standart 1/4	A21	A29	A37	H22	H30	P20	P28	P36	S27	S35
D	Standart 1/8	Standart 1/8	A22	A30	A38	H23	H31	P21	P29	P37	S28	S36
E	Standart 1/16	Standart 1/16	A23	A31	A39	H24	H32	P22	P30	S21	S29	S37
F	Standart 1/32	Standart 1/32	A24	A32	A40	H25	H33	P23	P31	S22	S30	S38
G	Boş	Boş	A25	A33	A41	H26	H34	P24	P32	S23	S31	S39
H	Boş	Boş	A26	A34	H19	H27	H35	P25	P33	S24	S32	S40

K: Kritik A: Ağır Pnömoni H: Hafif Pnömoni P: a/presemptomatik S: Sağlıklı Kontrol

3.3. ADA Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından ADA enzim aktivitesinin ölçümü için ticari olarak satılan kit (Elabscience) kullanılarak gerçekleştirildi. ADA1 ve ADA2 ölçümleri aynı protokol üzerinden ilerlemiştir. ADA2'ye özgü enzim aktivitesini ölçmek için ADA1 aktivitesini inhibe eden eritro-9-(2-hidroksi-3-nonil) adenin (EHNA) kullanıldı. Serum ADA1 aktivitesi ise total ADA aktivitesinden ADA2 aktivitesinin çıkarılmasıyla hesaplandı. EHNA için optimizasyon deneyleri yapılmış ve mevcut literatür bilgileri de göz önünde bulundurularak 250 µM EHNA solüsyonu kullanıldı (Şekil 14).



Şekil 14. EHNA optimizasyon grafiği

Ticari olarak temin edilen 1 mgr EHNA solüsyonu (Cayman chemical company, EHNA hydrochloride) firma önerisi doğrultusunda 1 mgr için 1000 ult distile su ile karıştırılarak hazırlandı. 250 µM EHNA solüsyonu hazırlamak için 12 ult distile su + 1 ult EHNA solüsyonu kullanıldı. Doğru karşılaştırma yapılabilmesi adına her kit içerisinde ölçülen hasta örneği kadar aynı hastalara ait EHNA dilüe solüsyon ile kullanıldı. EHNA-serum dilüsyonu 19 ult hasta serumuna 1 ult 250 µM EHNA solüsyonu eklenerek hazırlandı. Absorbans ölçümü 550 nm'de; Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Labarotuvarında bulunan spektrometre-Biotek, Quant, USA-kullanıldı. Deneyler kit üreticisi ticari firmanın önerdiği protokol üzerinden gerçekleştirildi.

Uygulanan deney protokolü şu şekildedir:

- Standart hazırlanması

1 mmol/L standart distile su ile önerilen seyreltme gradyanı ile seyreltildi.

0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0 mmol/L

- Örnek Ölçümü

1- Standart kuyu: standart kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda 10 uL standart eklendi

Örnek kuyu: Örnek kuyularına 10 uL numune eklendi.

2- Her kuyuya 180 uL Reaktif 1 eklendi.

3- Her kuyuya 90 uL Reaktif 2 eklendi.

4- 37 °C'de 7 dakika inkübe edildi.

5- Mikroplak okuyucu ile 550 nm'de numune kuyularının OD değerlerini ölçüldü (Biotek, Quant, USA). Değerler A_1 olarak kaydedildi.

6- 37 °C'de 10 dakika inkübe etmeye devam edildi. Microplate okuyucu ile 550 nm'de numune kuyularının OD değerlerini ölçüldü. Değerler A_2 olarak kaydedildi.

Standartlar ve hasta serumları aşağıda belirtilen şekilde planlanmıştır (Tablo ve tüm hasta grupları aynı çalışma tablosu ile tekrarlanmıştır.

Tablo 4. Enzim aktivitesi Çalışma Planı:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1.0 mmol/L	STD 1.0 mmol/L	K1	A3	H1	P1	S1	K1+ EHNA	A3+ EHNA	H1+ EHNA	P1+ EHNA	S1+ EHNA
B	STD 0.8 mmol/L	STD 0.8 mmol/L	K2	A4	H2	P2	S2	K2+ EHNA	A4+ EHNA	H2+ EHNA	P2+ EHNA	S2+ EHNA
C	STD 0.7 mmol/L	STD 0.7 mmol/L	K3	A5	H3	P3	S3	K3+ EHNA	A5+ EHNA	H3+ EHNA	P3+ EHNA	S3+ EHNA
D	STD 0.6 mmol/L	STD 0.6 mmol/L	K4	A6	H4	P4	S4	K4+ EHNA	A6+ EHNA	H4+ EHNA	P4+ EHNA	S4+ EHNA
E	STD 0.5 mmol/L	STD 0.5 mmol/L	K5	A7	H5	P5	S5	K5+ EHNA	A7+ EHNA	H5+ EHNA	P5+ EHNA	S5+ EHNA
F	STD 0.4 mmol/L	STD 0.4 mmol/L	K6	A8	H6	P6	S6	K6+ EHNA	A8+ EHNA	H6+ EHNA	P6+ EHNA	S6+ EHNA
G	STD 0.2 mmol/L	STD 0.2 mmol/L	A1	A9	H7	P7	S7	A1+ EHNA	A9+ EHNA	H7+ EHNA	P7+ EHNA	S7+ EHNA
H	Boş	Boş	A2	A10	H8	P8	S8	A2+ EHNA	A10+ EHNA	H8+ EHNA	P8+ EHNA	S8+ EHNA

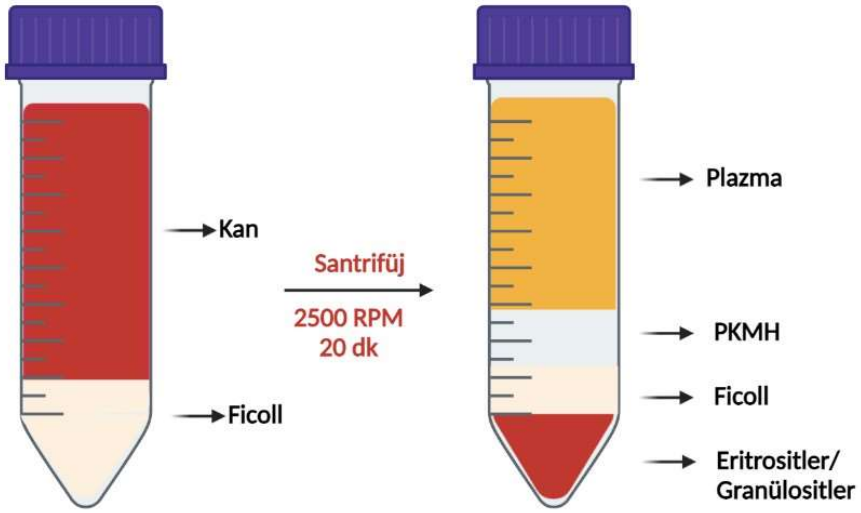
K: Kritik A: Ağır Pnömoni H: Hafif Pnömoni P: a/presemptomatik S: Sağlıklı Kontrol

3.4. Hücre Kültürü Deneyleri

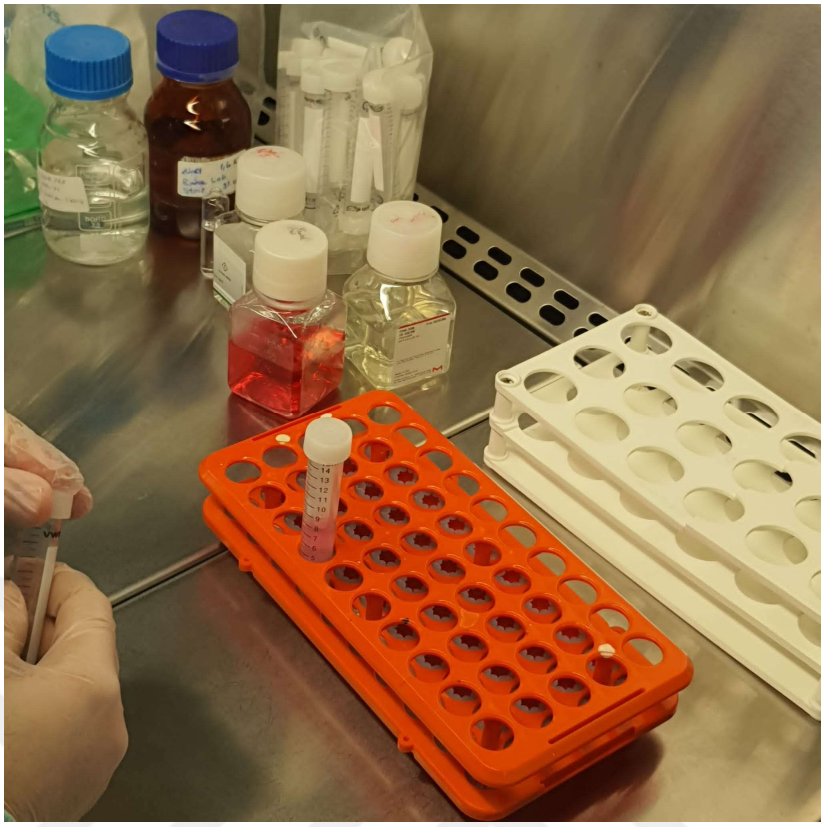
Hücre kültürü deneylerine, tam kan sayımında herhangi bir anomaliye sahip olmayan ve hasta seçimi bölümünde açıkça tanımlanan şekilde 6 adet sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir.

3.4.1. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

Periferik kan örnekleri sağlıklı gönüllülerden taze olarak antikoagülanlı tüplere alındı. Sonrasında bekletilmeden, dansite gradiyent (Ficoll-Paque, Capricorn, Almanya) yöntemiyle, 2000 RPM'da 20 dakika santrifüj edilerek, mononükleer hücrelere (PKMH) ayrıldı. Yöntem, seyreltilmiş kanın Ficoll çözeltisi (1.077 g/ml) üzerine yayılması, ardından santrifüj ve yıkama aşamalarını kapsamaktadır (Şekil 15).



Şekil 15. Ficoll yöntemi ile PKMH izolasyonu



Şekil 16. PKMH izolasyonu

3.4.2. Percoll Dansite Gradiyent Yöntemi

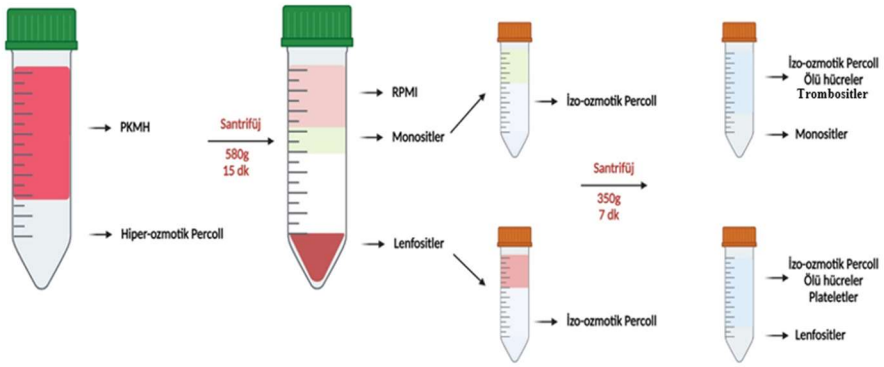
Periferik kan hücrelerinden $CD14^{+}$ monositlerin izolasyonu ve monositçe-zayıf lenfositlerin eldesi için dansite gradiyent yöntemi (Percoll-Sigma, USA) kullanıldı. İzolasyonun ilk basamağında, hiper-ozmotik ve izo-ozmotik Percoll çözeltileri hazırlandı. Lenfositlerin, uyarımı 48-72 saat sürdüğünden, iki aşama birbirinden farklı günlerde (monosit izolasyonundan 2-3 gün önce) yapıldı (Şekil 17).

Hiper-ozmotik Percoll çözeltisi (her 50 ml çözelti için)

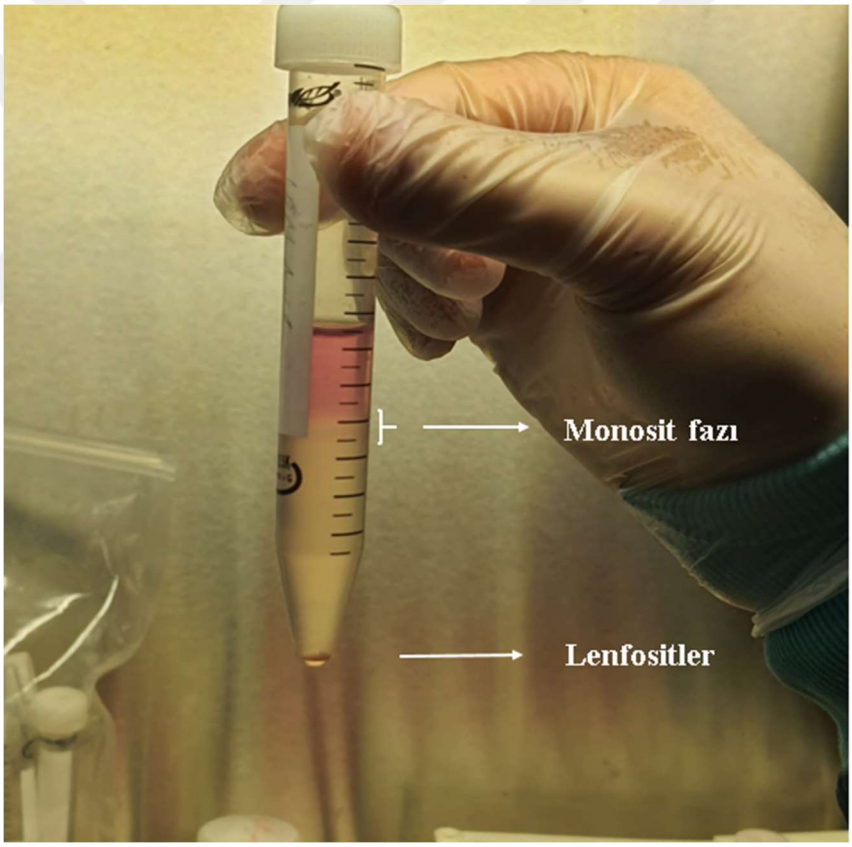
- 24,5 ml Percoll
- 20,5 ml distile su
- 5 ml 1,6 M NaCl

İzo-ozmotik Percoll çözeltisi (her 50 ml çözelti için)

- 20,75 ml Percoll
- 24,25 ml distile su
- 5 ml 1,5 M NaCl



Şekil 17. PKMH hücrelerden percoll dansite gradiyent yöntemi ile lenfosit ve monosit izolasyonu



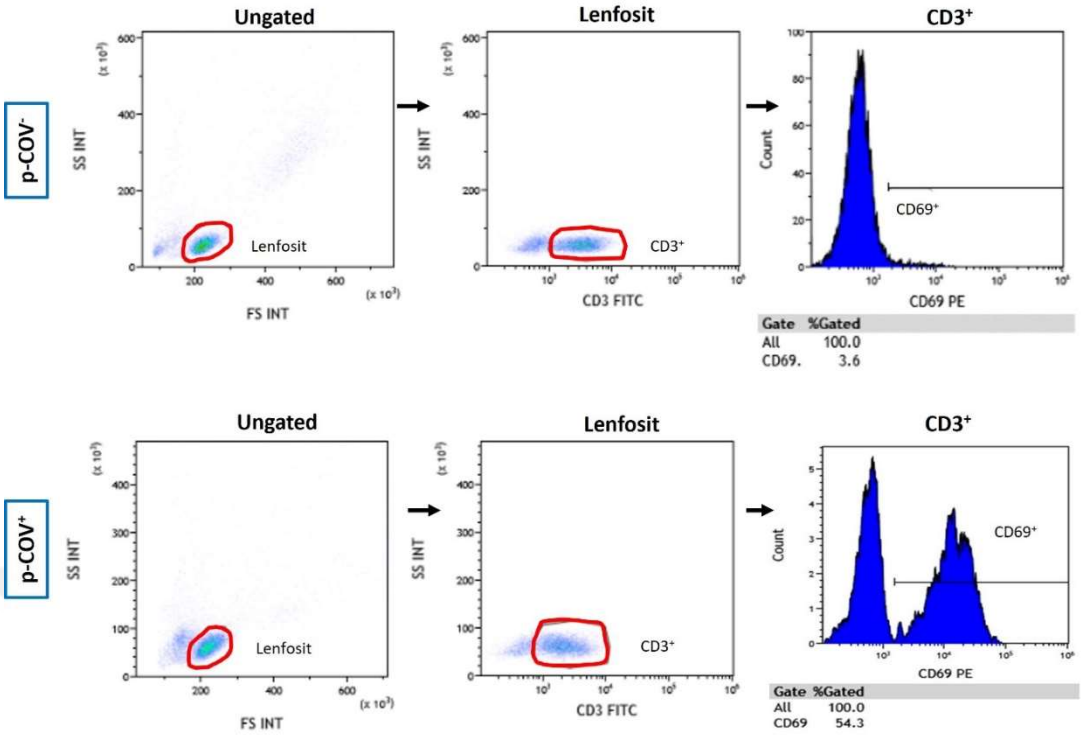
Şekil 18. PKMH hücrelerden percoll dansite gradiyent yöntemi ile monositlerin ayırılması

3.4.3. SARS-CoV-2 Spesifik Lenfositlerin Elde Edilmesi

PKMH'lerin izolasyonunun (Bölüm 3.4.1) ardından, hücrelerin sayı ve canlılık oranları analiz edildi. PKMH'ler, hiper-ozmotik Percoll çözeltisi üzerine yayıldı. Sonrasında 580g'de 15 dakika santrifüj edildi. Tüplerin alt-fazında (yaklaşık son 4ml) olan kısmı alınarak 350g'de 7 dakika ikinci kez santrifüj edildi. Böylece PKMH'ler, lenfositlerce zengin, monositlerden zayıf hale getirildi. Elde edilen lenfositlerin sayımı yapıldı.

SARS-CoV-2 mediumu hazırlanması aşamasında ilk olarak, AB kan grubuna sahip 4 COVID-19 ağır vakadan alınan ve viral yükü hücre kültürüne uygun şekilde optimize edilen serum örnekleri eşit oranlarda karıştırıldı (sCOV). Bununla birlikte, SARS-CoV-2 (wild type) yapısal (S, M, N, E) ve yapısal olmayan proteinlerden kaynaklanan 9 ila 22 a.a uzunluğunda 88 peptid içeren peptid havuzu (p-COV) ticari olarak temin edildi [PepTivator SARS-CoV-2 Select-premium grade (6 nmol)].
Elde edilen lenfositler, kuyu başı $1x10^6$ hücre olarak 96-kuyucuklu plaklara, 2mM L-glutamin, 100U/ml penisilin, 100mg/ml streptomisin ile birlikte %10 sCOV ile zenginleştirilmiş RPMI-1640 eklendi. Elde edilen örnekler kuyu başı 2 ul p-COV ile uyarıldı. Plaklar 20 saat (37^0C ve %5 CO_2) inkübe edildi. Kuyular, inkübasyonun 20. saatinde, medium değişimi yapılmadan, ikinci kez 2 ul p-COV ile uyarıldı. Örnekler 24 saatlik ikinci bir inkübasyona bırakıldı. Lenfosit aktivasyonu tayini için Akan Hücre Ölçer'de CD69 ekspresyonu incelendi. Aktivasyonu yeterli görülmeyen örnek grupları, medium değişimi olmaksızın 24 saatlik üçüncü bir pCOV uyarımına tabi tutuldu. Hücrelerin sayımı ve canlılığı için Thoma lamı kullanıldı (Tripan Mavisi ve Turk Solüsyonu). Canlılığı %95'den az olan örnek grupları ile ileri bir çalışma yapılmadı. Çalışmanın ileri aşamasında kullanılacak olan kontrol lenfositleri, %10 otoserum eşliğinde, kültürün başladığı anda ve tek seferde olmak üzere M1 kontrol için LPS [5 μg/ml, (Thermo Fischer, ABD)] ve M2 kontrol için IL-4 [20ng/ml, (Thermo Fischer, ABD)] ile uyarıldı. Uyarımsız lenfositlere ise (unstimüle kontrol) herhangi bir ajan eklenmedi. Tüm kontrol lenfositleri, SARS-CoV-2-spesifik T hücreler ile (2-3 gün) aynı süre ve şartlarda kültüre alındı.

Sağlıklı donörlere ait periferik kan örneklerinden izole edilen lenfositlerin p-COV ile uyarımı sonrasında T lenfositlerin aktivasyonu AHÖ`de değerlendirildi ve CD69 ekspresyonu ≥%50 olan lenfositler eş kültüre alındı (Şekil 19).

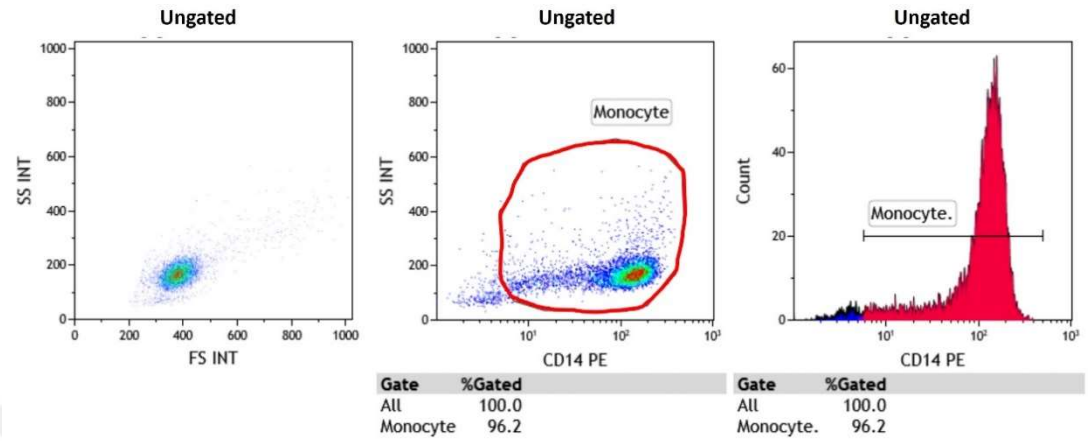


Şekil 19. p-COV ile uyarılmış ($pCOV^+$) ve uyarılmamış ($pCOV^-$) T hücrelerde CD69 aktivasyon belirteçinin analizi

3.4.4 $CD14^+$ Monosit İzolasyonu

T hücre kültürünün başlatılmasından itibaren 2-3 gün sonra monosit izolasyonu işlemlerine başlandı. İkinci kez, PKMH izolasyonu (40-50 x 10^6) yapıldı. Elde edilen PKMH'ler, hiper-ozmotik Percoll çözeltisi üzerine yayıldı ve 580 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Sanrifüj sonrası inter-faz bölgesi Pasteur pipeti yardımıyla toplandı. İnterfaz bölgesinin altında kalan kısım monositçe-zayıf lenfosit bölgesidir. Monositler için örnek tüpleri birleştirildi ve RPMI-1640 eklenerek, 350g'de 7 dakika santrifüje alındı. Santrifüj sonrası süpernatan kısmı atıldı ve pellet kısmına RPMI-1640 eklenerek hücre sayımı yapıldı. Monositlerin platelet ve ölü hücrelerden ayrılması için ikinci bir aşama uygulandı. İzole edilen monositler, izo-ozmotik Percoll çözeltisi üzerine yayılarak, 350 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatan atılır ve pellet kısmına RPMI-1640 eklenerek 350 g'de 7 dakika ikinci bir santrifüj edilerek monositler elde edildi. Hücre sayımı yapıldı, bunun yanında hücrelerin canlılığı (Tripan Mavisi ve Turk Solüsyonu) teyit edildi. Canlılığı %95'den az olan örneklerle ileri bir çalışma yapılmadı. Hücre sayımının ardından AHÖ değerlendirmesi

yapılarak CD14 eksprese eden hücrelerin saflığı kontrol edildi (Şekil 20). Saflık oranı %85'in altında olan örnekler ile ileri bir çalışma yapılmadı.



Şekil 20. Percol ile monosit izolasyonu sonrası CD14 saflık kontrolü

3.4.5. Monosit Kültürü

Monositlerin saflığının ve canlılığının teyit edilmesi üzerine, $1x10^6$ hücre 24-kuyucuklu plaklara aktarıldı ve 2mM L-glutamin (Lonza, İsviçre), 100U/ml penisilin, 100mg/ml streptomisin eşliğinde serumsuz-RPMI-1640 ile süspanse edildi. 4 saatlik (37^0C, %5 CO_2) kültür sonunda adherent olmayan hücreler toplandı ve sayımı yapıldı. Monositler, eş-kültür koşullarına hazır hale getirildi.

3.4.6 SARS-CoV-2-spesifik Lenfositler ve Naif Monositler ile Eş-Kültür

SARS-CoV-2-spesifik lenfositler, kontrol lenfositleri ve unstimüle lenfositler ile naif monositler eş kültüre alındı. Her bir lenfosit için 2 adet monosit olacak şekilde (1:2) kültür dizayn edildi. Kuyu başı $5x10^5$ lenfosit, monosit plaklarına eklendi. Eş-kültür deneylerinde karşılaştırma grupları, M1-kontrol (LPS), M2-kontrol (IL-4) ve unstimüle gruplardan oluşmaktadır. Fitohemaglutinin (PHA, Capricorn, Almanya) ve M-CSF (Miltenyi Biotec, Almanya) bütün gruplarda, T hücre proliferasyonunun devamlılığı için kullanıldı. SARS-CoV-2 grubunda %10 sCOV ile zenginleştirilmiş RPMI-1640, diğer gruplarda ise %10 otoserum ile zenginleştirilmiş RPMI-1640 kullanıldı. Her bir kuyucuğa, 2 mM L-glutamin, 100U/ml penisilin ve 100mg/ml streptomisin eşlik etti. Kuyucaklara özgü uyarımlar aşağıda özetlenmiştir.

1.Grup- Unstimüle

- PHA (T hücre optimal proliferasyonu) 5 µg/ml
- M-CSF (Makrofaj Büyüme Faktörü) 40 ng/ml

2.Grup M1-Kontrol

- PHA (Phytohemagglutinin) (T hücre optimal proliferasyonu) 5 µg/ml
- M-CSF (Makrofaj Büyüme Faktörü) 40 ng/ml
-LPS (M1-uyarıcı faktör) 5 µg/ml

3.Grup p-COV

- PHA (Phytohemagglutinin) (T hücre optimal proliferasyonu) 5 µg/ml
- M-CSF (Makrofaj Büyüme Faktörü) 40 ng/ml
-p-COV (SARS-CoV-2 peptid havuzu) 2 ug/ml

4.Grup M2-Kontrol

- PHA (Phytohemagglutinin) (T hücre optimal proliferasyonu) 5 µg/ml
- M-CSF (Makrofaj Büyüme Faktörü) 40 ng/ml
-IL-4 (M2-uyarıcı faktör) 20 ng/ml

Eş-kültürün 0. gününde yukarıda belirtilen gruplara özgü mitojenler ve uyarıcılar, ilgili kuyucuklara belirtilen miktarlarda eklendi. Eş-kültür 7-9 gün boyunca (37^0C, %5 CO_2) sürdürüldü. Eş-kültürde, her üç günde bir besiyeri değişimi yapılmış ve uyarımlar tekrar edildi. Makrofajların hücre morfolojisi, faz-kontrast mikroskobu (Olympus RFLT50, Japonya) ile takip edildi. Eş-kültür sonunda hücreler, AHÖ analizi için nazikçe toplandı. Kültür süpernatanları ise, ELISA analizleri için -80^0C'de saklandı.

3.4.7. M1 ve M2 Makrofaj Polarizasyonunun Akan Hücre Ölçer Yöntemiyle İncelenmesi

SARS-CoV-2-spesifik lenfositler ile naif monositlerin eş kültürü sonrasında makrofaj polarizasyonunu AHÖ ile analiz edildi. Her eş kültür için, biri izotipik kontrol olmak üzere üç akan hücre ölçer tüpü hazırlandı. Tüplere 100`er uL hücreler eklendi. Birinci tüpe izotipik kontrol antikorları, ikinci tüpe canlılık belirteci olarak Propidium iodide, üçüncü tüpe ise makrofaj alt gruplarının analizi için CD45-KrO, CD14-A700, CD80-APC, CD86-A750, CD200R-PE ve CD206-PB monoklonal

antikorları uygun miktarlarda eklendi. 15 dk oda ısısında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüplere 350 uL isoflow solüsyonu (Immunotech / Coulter, Fransa) eklendi ve AHÖ`de (Novious EX, Beckman Coulter, Fransa) değerlendirildi. Makrofaj polarizasyonu, Kaluza yazılımı (Beckman Coulter, Fransa) kullanılarak analiz edildi.

3.5. İnsan ADA ilişkili Sitokin Düzeylerinin Saptanması

Çalışmada; kritik hasta grubundan 6 hasta, ağır 14 vaka, hafif/orta 14 vaka, a/presemptomatik 14 vaka olmak üzere toplam 48 hasta çalışmaya alınmıştır. Sağlıklı kontrol grubundan ise 14 kişi çalışmaya dahil edildi. Kültür deneylerinde çalışılan 6 sağlıklı kontrol grubunun eş-kültür sonrası süpernatantları da eklendi. M1-ilişkili sitokinler, IL-6, IL-12, TNF-α, IL-18, IFN-γ, GM-CSF ve M2-ilişkili sitokinler, IL-4, IL-10 ve M-CSF ticari ELISA kitleri (Sunred bio-teknoloji, Çin) kullanılarak çalışıldı. Deneyler kit üreticisi ticari firmanın önerdiği protokol üzerinden gerçekleştirildi.
Uygulanan deney protokolü şu şekildedir:
Standart hazırlanması
Orijinal standart, standart dilüsyon solüsyonu ile önerilen seyreltme gradyanı ile seyreltildi.
(1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32)

- Standart kuyularına 50 uL standart örnekleri eklendi.
- Test kuyularına örneklerden 40 uL eklendi.
- Örnek kuyularına 10 uL CECR1 antikoru eklendi.
- Tüm kuyulara 50 uL streptavidin-HRP eklendi.
- 37 °C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı.
- 50 uL chromogen solution A ve 50 uL chromogen solution B eklendi.
- 37 °C'de 10 dk inkibasyona bırakıldı.
- 50 uL stop solüsyonu eklendi ve ardından 450 nm de ölçümler kayıt edildi.

(Chromate, model 4300, USA)
Standartlar ve hasta serumları aşağıda belirtilen şekilde planlanmıştır (Tablo 5):

Tablo 5. Sitokin Çalışma Planı:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD	STD	K1	A3	A11	H5	H13	P7	S1	S9	SP1-P-COV	SP4+IL-4
B	STD ½	STD ½	K2	A4	A12	H6	H14	P8	S2	S10	SP2+LPS	SP4-P-COV
C	STD ¼	STD ¼	K3	A5	A13	H7	P1	P9	S3	S11	SP2+IL-4	SP5+LPS
D	STD 1/8	STD 1/8	K4	A6	A14	H8	P2	10	S4	S12	SP2-P-COV	SP5+IL-4
E	STD 1/16	STD 1/16	K5	A7	H1	H9	P3	P11	S5	S13	SP3+LPS	SP5-P-COV
F	STD 1/32	STD 1/32	K6	A8	H2	H10	P4	P12	S6	S14	SP3+IL-4	SP6+LPS
G	Dilüent	Dilüent	A1	A9	H3	H11	P5	P13	S7	SP1+LPS	SP3-P-COV	SP6+IL-4
H	Boş	Boş	A2	A10	H4	H12	P6	P14	S8	SP1+IL-4	SP4+LPS	SP6-P-COV

K: Kritik A: Ağır Pnömoni H: Hafif Pnömoni P: a/presemptomatik S: Sağlıklı Kontrol SP: süpernatant

3.6. İnsan ADA ilişkili Kemokin Düzeylerinin Saptanması

Çalışmada; kritik hasta grubundan 6 hasta, ağır 14 vaka, hafif/orta 14 vaka, a/presemptomatik 14 vaka olmak üzere toplam 48 hasta çalışmaya alınmıştır. Sağlıklı kontrol grubundan ise 14 kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Kültür deneylerinde çalışılan 6 sağlıklı kontrol grubunun eş-kültür sonrası süpernatantları da eklenmiştir. M1-ilişkili kemokin ve kemokin endükleyiciler CXCL-10, ROS, INOS ve M2-ilişkili kemokin ve kemokin endükleyiciler CCL18, TARC (CCL17), CCL24, CXCL-9, Arginase ticari ELISA kitleri (Sunred bio-teknoloji) kullanılarak çalışılmıştır. Deneyler kit üreticisi ticari firmanın önerdiği protokol üzerinden gerçekleştirilmiştir. Uygulanan deney protokolü şu şekildedir:

Standart hazırlanması

Orijinal standart, standart dilüsyon solüsyonu ile önerilen seyreltme gradyanı ile seyreltilmiştir.

(1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32)

- Standart kuyularına 50 uL standart örnekleri eklendi.
- Test kuyularına örneklerden 40 uL eklendi.

- Örnek kuyularına 10 uL CECR1 antikoru eklendi.
- Tüm kuyulara 50 uL streptavidin-HRP eklendi.
- 37 C de 60 dk inkübasyona bırakıldı.
- 50 uL chromogen solution A ve 50 uL chromogen solution B eklendi.
- 37 C de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 50 uL stop solüsyonu eklendi ve ardından 450 nm de ölçümler kayıt edildi (Chromate, model 4300, USA).

Standartlar ve hasta serumları aşağıda belirtilen şekilde planlanmıştır (Tablo 6):

Tablo 6. Kemokin Çalışma Planı:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD	STD	K1	A3	A11	H5	H13	P7	S1	S9	SP1-P-COV	SP4+IL-4
B	STD 1/2	STD 1/2	K2	A4	A12	H6	H14	P8	S2	S10	SP2+LPS	SP4-P-COV
C	STD 1/4	STD 1/4	K3	A5	A13	H7	P1	P9	S3	S11	SP2+IL-4	SP5+LPS
D	STD 1/8	STD 1/8	K4	A6	A14	H8	P2	10	S4	S12	SP2-P-COV	SP5+IL-4
E	STD 1/16	STD 1/16	K5	A7	H1	H9	P3	P11	S5	S13	SP3+LPS	SP5-P-COV
F	STD 1/32	STD 1/32	K6	A8	H2	H10	P4	P12	S6	S14	SP3+IL-4	SP6+LPS
G	Dilüent	Dilüent	A1	A9	H3	H11	P5	P13	S7	SP1+LPS	SP3-P-COV	SP6+IL-4
H	Boş	Boş	A2	A10	H4	H12	P6	P14	S8	SP1+IL-4	SP4+LPS	SP6-P-COV

K: Kritik A: Ağır Pnömoni H: Hafif Pnömoni P: a/presemptomatik S: Sağlıklı Kontrol SP: süpernatant

3.7. İstatiksel Analiz

Bu çalışmada, tüm istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics Software (Windows Version 28.0 için. Armonk, NY: IBM Corp.) kullanılarak yapılmıştır. Değerlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık çizelgeleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov-Shapiro-Wilk testleri) değerlendirildi. Veriler aksi belirtilmediği sürece, ortalama± SEM olarak gösterildi. Parametrik dağılım gösteren verilerde çoklu grup karşılaştırmalarında ANOVA testi ve post-hoc Tukey HSD testi kullanıldı. Parametrik dağılıma sahip olmayan gruplarda, çoklu grup karşılaştırmaları için, Kruskal-Wallis testi ve post-hoc Dunn testi kullanıldı. Parametrik olmayan, ikili grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney testi kullanıldı. Kategorik değişken verileri, $\chi 2$ veya Fisher exact testi kullanılarak karşılaştırıldı. Korelasyon analizlerinde, Gaussian dağılımı temel alınarak, Pearson korelasyon testi kullanıldı. Pearson korelasyon testine göre, $p<0,05$ ve korelasyon katsayısı (R), 0 ile 0,3 arasında ise zayıf korelasyon, 0.3 ile 0.7 arasındaki değerler orta korelasyon ve 0.7 ile 1 arasındaki değerler güçlü korelasyon olarak kabul edildi. Tüm analizlerde $p <0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerin görselleştirilmesinde, GraphPad Prism (Windosw, ver.9.5.1) ve Origin Pro (Windows, ver.2023b) programları kullanıldı.

4. BULGULAR

COVID-19 hastalarından; 41 ağır vaka, 36 hafif/orta vaka, 37 a/presemptomatik ve 6 kritik seviye yetişkin hasta olmak üzere toplam 120 hasta ve 40 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya alındı. Hastaların ve kontrol grubunun cinsiyet, yaş ortalaması ve komobidite bilgileri tablo 7'de, vaka gruplarına ait laboratuvar verileri tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Vaka Gruplarına göre Demografik Veri Tablosu

	A/Pre-semptomatik (n=37)		Hafif (n=36)		Ağır (n=41)		Kritik (n=6)		Total COV-19 (n=120)		Sağlıklı Kontrol (n=40)		p değeri
Cinsiyet (%)	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	
	20 (54)	17 (45,9)	19 (52,7)	17 (47,3)	22 (53,7)	19 (46,3)	4 (66,7)	2 (33,3)	65 (54,2)	55 (45,8)	16 (40)	24 (60)	0,938
Yaş Ortalama ±SD	45,40±16,56		58,17±9,54		59,01±14,22		62,16±10,43		54,68±14,93		36,47±10,65		<0,01[a1, a2]
Komorbidite													
Hipertansiyon (%)	1 (2,7)		5 (13,9)		11 (26,8)		1 (16,7)		18 (15)		-		0,03[b1]
Diyabet (%)	3 (8,1)		4 (11,1)		5 (12,2)		1 (16,7)		13 (10,8)		-		0,902
Kardiyovasküler hastalık (%)	3 (8,1)		3 (8,3)		4 (9,8)		1 (16,7)		11 (9,2)		-		0,918
Kronik Akciğer hastalığı (%)	2 (5,4)		2 (5,6)		5 (12,2)		1 (16,7)		10 (8,3)				0,568
Diğer (%)	3 (8,1)		5 (13,9)		12 (29,2)		2 (33,3)		5 (18,3)		-		0,221
Semptomlar (ilk başvuru)													
Ateş (%)	5 (13,5)		9 (25,0)		25 (61,0)		4 (66,7)		43 (35,8)		-		<0,01[c1, c2,c3]
Öksürük (%)	4 (10,8)		20 (55,6)		23 (56,1)		5 (83,3)		52 (43,3)		-		<0,01[a1]
Solunum sıkıntısı (%)	4 (10,8)		15 (41,7)		27 (65,9)		5 (83,3)		21 (42,5)		-		<0,01[a1]
Miyalji (%)	0 (0,0)		11 (30,6)		8 (19,5)		1 (16,7)		20 (16,7)		-		0,005[b2]
Mekanik ventilazyon ihtiyacı(%)	-		-		24 (58,5)		6 (100)		30 (25)		-		-

Total COV-19: Total COVID-19
[a1]A/presemptomatik vs Hafif, Ağır ve Kritik, [a2]Sağlıklı Kontrol vs Hafif, Ağır ve Kritik
[b1]A/presemptomatik vs Ağır, [b2] A/presemptomatik vs Hafif
[c1]Ağır vs Hafif, [c2]Ağır vs A/presemptomatik, [c3] Kritik vs A/presemptomatik, [c4] Ağır vs Kritik, [c5] Hafif vs Kritik

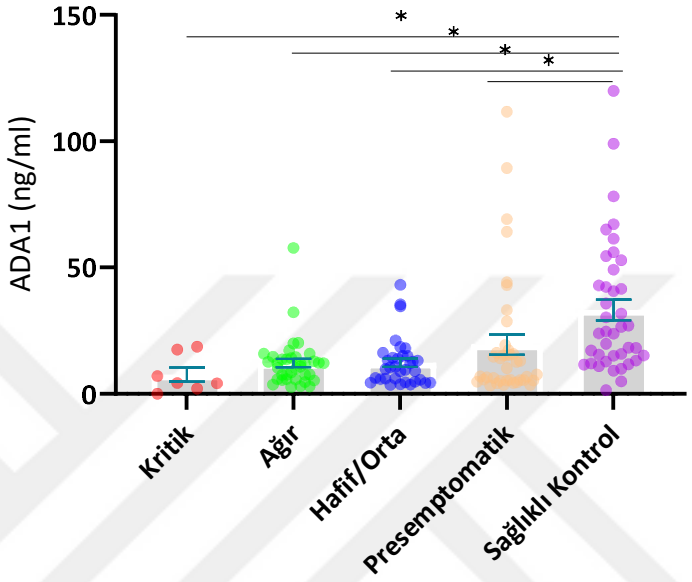
Tablo 8. Vaka Gruplarına göre Laboratuvar Bulguları Veri Tablosu

	Normal Aralık	A/presemptomatik	Hafif	Ağır	Kritik	Total COV-19	p değeri
Lökosit (K/µL)	*4.5- 11*	8,3 (3,2- 17,8)	6,2 (2,9- 11,9)	7,4 (2,6- 20,39)	6,2 (3,3-10,5)	7,4 (2,6 – 20,3)	0,694
Nötrofil (K/µL)	*2- 6,9*	5,6 (1.7- 14,2)	5,9 (1.7- 10,4)	6,45 (2.0- 17,5)	5,1 (2,1-9,4)	6,1 (1,7-17,5)	0,444
Lenfosit (K/µL)	*1.3- 3,8*	1,6 (0.8- 3,4)	0,94 (0,3- 3,3)	0,73 (0,4- 1,6)	0,79 (0,67-1,2)	1.3 (0,3- 3,4)	0,02[a1]
Trombosit (K/µL)	*145- 400*	212 (125- 376)	184 (62,5-309)	113,55 (8,4- 342,8)	129,2 (19,9-245,7)	184 (8,4-376)	0,02[a1]
Monosit (K/µL)	*0.2- 0.95*	0,6 (0,26- 1,15)	0,37 (0,07- 0,7)	0,45 (0,04- 0,8)	0,23 (0,16-0,48)	0,45 (0,04-1,15)	<0,001[a1]
CRP (mg/L)	*<5*	5,55 (2-56)	50,5 (2-178)	149,8 (18,5- 357,5)	78,35 (13,6-168,7)	46,7 (2.0 -357,5)	<0,001 [a1]
Prokalsitonin (ng/mL)	*<0.08*	0,02 (0-0,01)	0,16 (0,01-0,63)	0,44 (0.04-22,64)	0,68 (0,04-11,67)	0,07 (0-22,64)	<0,001[a1]
ALT (U/L)	*9-57*	22 (4-184)	23 (10- 52)	39 (6 – 153)	19,5 (15-95)	26 (4- 184)	0,238
AST (U/L)	*13-30*	28 (15-168)	37 (19- 50)	49 (19 - 211)	32,5 (19-252)	34 (15-252)	<0,001[b1, c1]
Laktik asit dehidrogenaz (LDH) (U/L)	*125-243*	221 (135-692)	349 (142- 677)	439,5 (214 – 739)	520 (283-1887)	391 (135- 1887)	0,001 [a1, c1, c5]
Ferritin (µg/L)	*15-260*	155 (19- 875)	1341 (58- 4504)	1414 (358 – 3068)	2395 (679-19,095)	723 (19 – 19095)	<0,001[a1, c1, c4, c5]
D-dimer (µg/mL)	*<0.55*	0,4 (0,17- 5,78)	0,8 (0,35 – 3,67)	2,29 (0,43- 39,72)	1,93 (0,35-10,01)	1,13 (0,17 – 39,72)	0,001[a1]

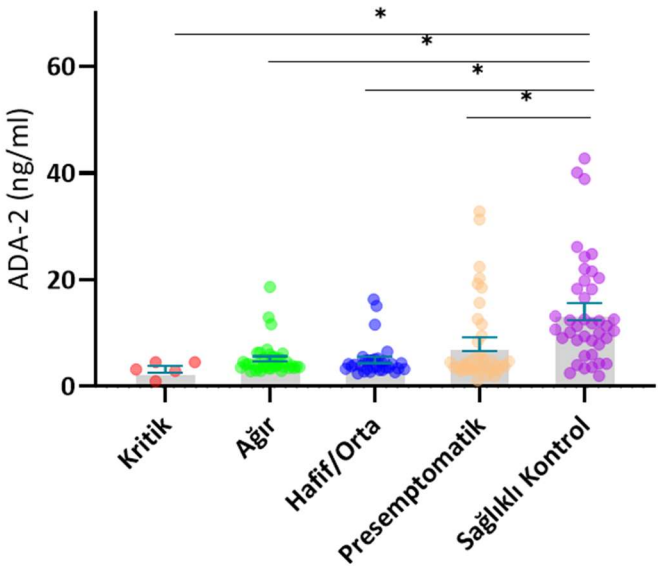
Total COV-19: Total COVID-19
[a1]A/presemptomatik vs Hafif, Ağır ve Kritik,
[a2]Sağlıklı Kontrol vs Hafif, Ağır ve Kritik
[b1]A/presemptomatik vs Ağır, [b2] A/presemptomatik vs Hafif
[c1]Ağır vs Hafif, [c2]Ağır vs A/presemptomatik, [c3] Kritik vs A/presemptomatik, [c4] Ağır vs Kritik, [c5] Hafif vs Kritik

4.1. İnsan ADA-1 ve ADA-2 (CECR1) Serum Düzeylerinin Saptanması

Serum ADA1 ve ADA2 düzeylerinin ölçümü incelendiğinde sağlıklı kontrol grubu hem ADA1 hem de ADA2 de COVID-19 hastalarına göre daha yüksek değerlere sahipti (Tablo 21, 22).



Şekil 21. ADA1 Serum Miktarları (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



Şekil 22. ADA2 Serum Miktarları (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

4.2. ADA Enzim Aktivitesinin Ölçümü

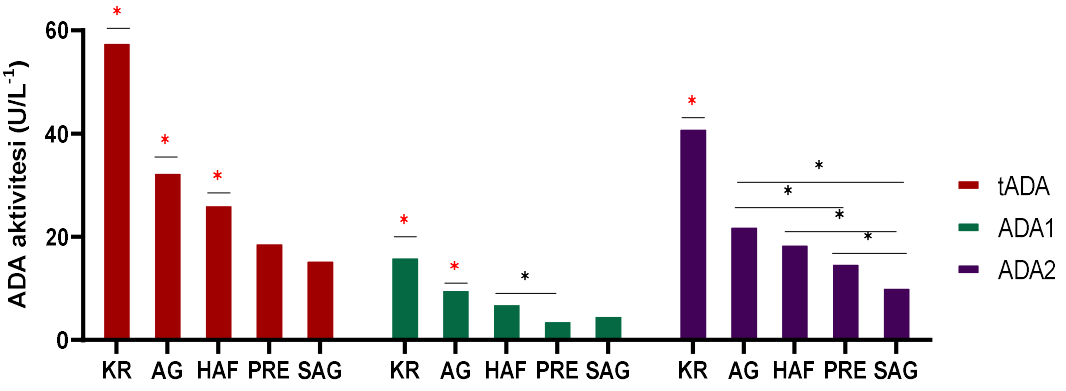
Enzim aktivite deneylerinde ADA2'ye özgü enzim aktivitesini ölçmek için ADA1 aktivitesini inhibe eden eritro-9-(2-hidroksi-3-nonil) adenin (EHNA) kullanılmıştır. Serum ADA1 aktivitesi ise total ADA aktivitesinden ADA2 aktivitesinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

Aktivite deney sonuçlarımızda; total ADA, ADA1 ve ADA2 için en yüksek değeri kritik COVID-19 vakaları oluşturmaktadır. Total ADA, ADA1 ve ADA2 aktivitesi; hastalık şiddetine göre anlamlı derecede artış göstermektedir.

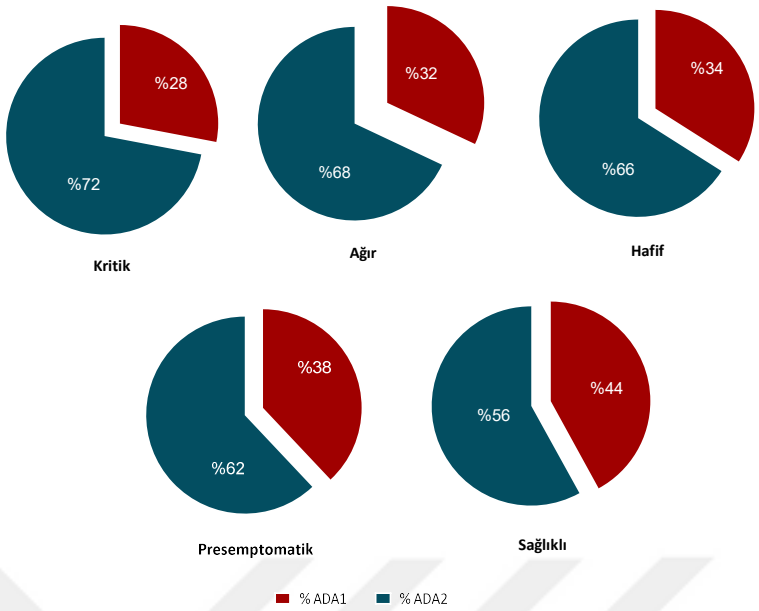
Total ADA aktivitesi açısından; sağlıklı kontrol grubu, a/presemptomatik, ağır vakalar ve kritik vakalara göre anlamlı derecede azalmıştır. A/Presemptomatik vakalar, hafif vakalara, ağır ve kritik vakalara göre anlamlı derecede azalmıştır. Hafif vakalarda, ağır ve kritik vakalara göre daha düşük aktivite bulunmuştur. Ağır vakalarda ise kritik vakalara göre anlamlı derecede daha düşük aktiviteye sahiptir.

ADA1 aktivitesi açısından; sağlıklı kontrol grubu, ağır vakalar ve kritik vakalara göre anlamlı derecede azalmıştır. Presemptomatik vakalar, hafif, ağır ve kritik vakalara göre anlamlı derecede azalmıştır. Hafif vakalarda ağır ve kritik vakalara göre daha düşük aktivite bulunmuştur. Ağır vakalarda ise kritik vakalara göre anlamlı derecede daha düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 23).

ADA2 aktivitesi açısından; sağlıklı kontrol grubu, presemptomatik, hafif, ağır ve kritik vakalara göre anlamlı derecede azalmıştır. Presemptomatik vakalar, ağır ve kritik vakalara göre anlamlı derecede azalmıştır. Ağır vakalarda ise kritik vakalara göre anlamlı derecede daha düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 23).



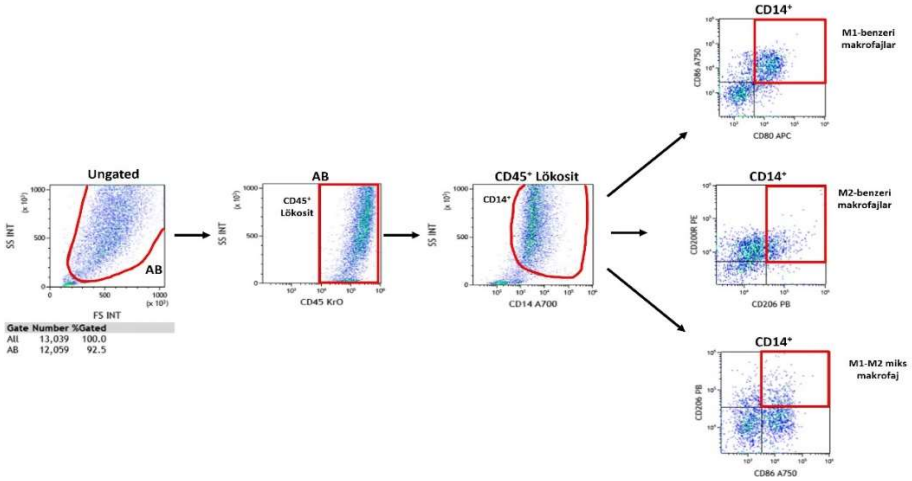
Şekil 23. COVID-19 Vaka Grupları; Total ADA, ADA1 ve ADA2 Serum Enzim Aktivitesi (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)



Şekil 24. COVID-19 Vaka Gruplarına göre ADA1 ve ADA2 Enzim Aktiviteleri

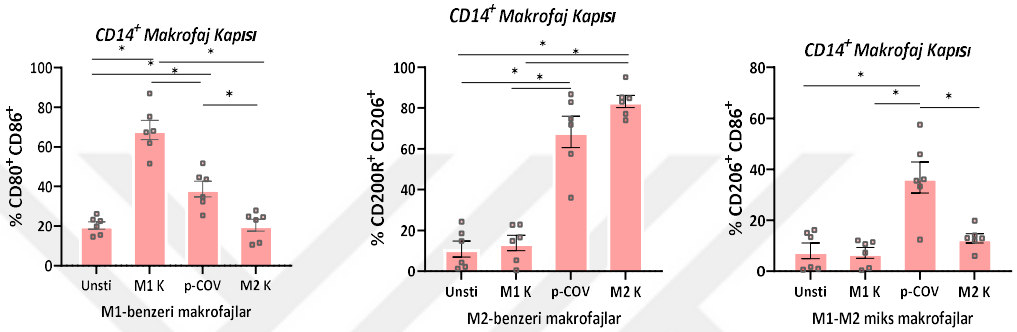
4.3. Akan Hücre Ölçerde M1 ve M2 Değerlendirmesi

Makrofaj alt kümelerini tanımlamak için kapılama stratejisi şekil 25'de gösterilmiştir. Debris'ler, SS-INT ve FS-INT parametreleri kullanılarak dışlandı. Sırasıyla CD45 pozitif lökositler ve CD14 pozitif monosit/makrofajlar kapılandı. Makrofajlar CD80, CD86, CD200R ve CD206 ekspresyonlarına göre M1-benzeri makrofajlar ($CD80^{+}CD86^{+}$), M2-benzeri makrofajlar ($CD200R^{+}CD206^{+}$) ve M1-M2 miks makrofajlar ($CD86^{+}CD206^{+}$) olarak alt kümelere ayrıldı (Şekil 25).



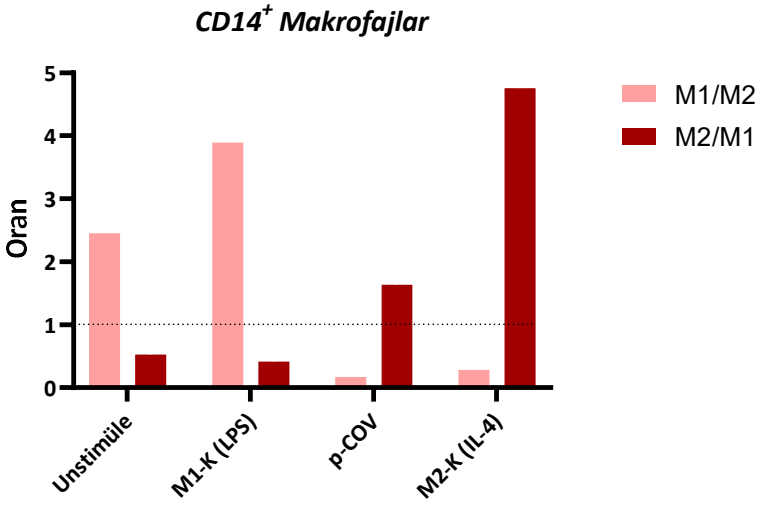
Şekil 25. Akan hücre ölçerde makrofaj alt grupları kapılama stratejisi.

Hücre kültürü süpernatanlarından CD80, CD86, CD200R, CD206 belirteçleri ile yapılan analizlerde; M1 belirteci olarak $CD80^{+}CD86^{+}$ AHÖ analizinde; M1 kontrol; unstimule, p-COV ve M2 kontrole göre artış gösterirken, p-COV ise M2 kontrole göre anlamlı derecede artış göstermiştir. M2 belirteci olarak $CD200R^{+}CD206^{+}$ analizinde ise hem M2 kontrol hem de p-COV, M1 kontrol ve unstimuleye göre artış göstermiştir. $CD206^{+}$ $CD86^{+}$ M1/M2 mix fenotipde ise p-COV diğer gruplara göre anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 26).



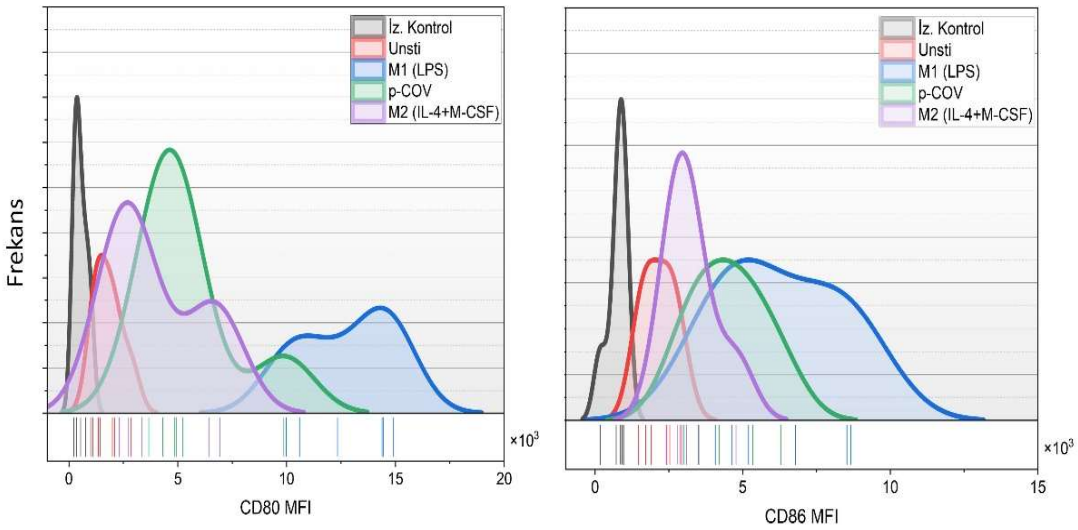
Şekil 26. Hücre kültürü gruplar arası M1/M2 profilinin AHÖ analizi (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005).

$CD80^{+}CD86^{+}$/$CD200R^{+}CD206^{+}$ (M1/M2) ve $CD200R^{+}CD206^{+}$/$CD80^{+}CD86^{+}$ (M2/M1) analizlerine göre; unstimule ve M1 kontrolde M1/M2 oranı daha yüksek iken, p-COV ve M2 kontrolde M2/M1 oranının daha baskın olduğu bulunmuştur (Şekil 27).

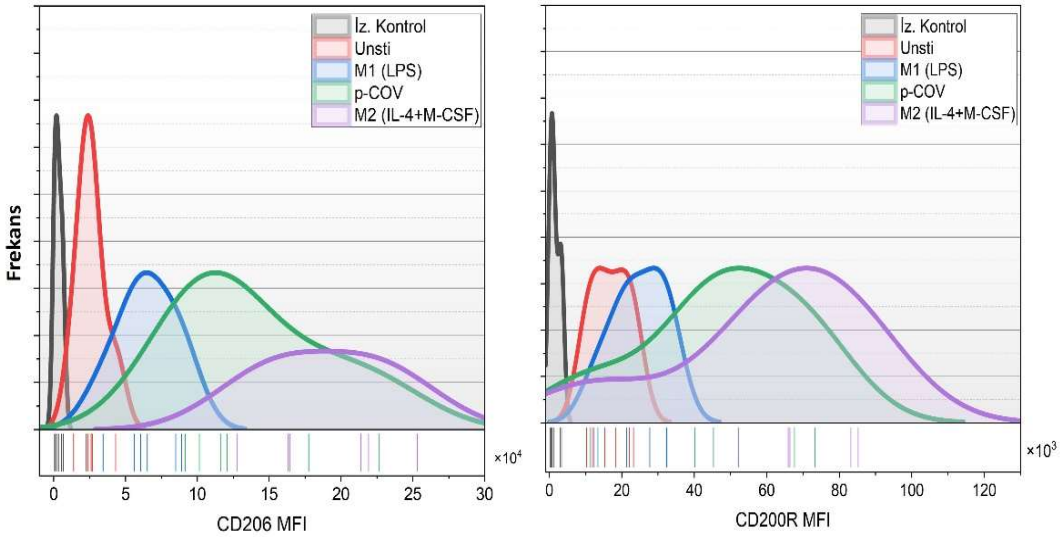


Şekil 27. Hücre kültürü sonuçlarına göre M1/M2 oranları

Eş-kültür deneyleri sonrasında MFI (mean fluorescence intensity) analizlerinde, M1 ilişkili belirteçlerin, M1 kontrole göre daha düşük seviyede olduğu görülürken (Şekil 28), M2 ilişkili belirteçlerin M2 kontrole yakın seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 29).

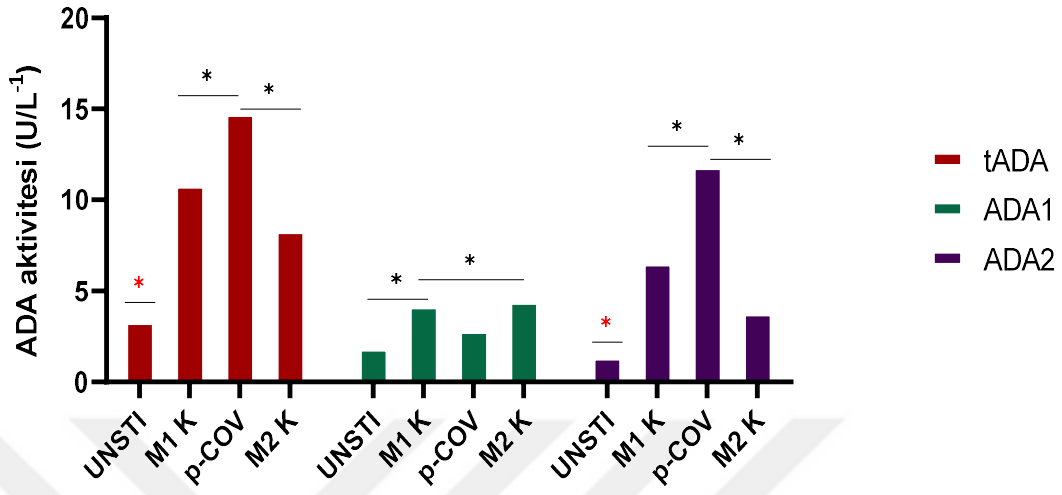


Şekil 28. Hücre kültürü sonuçlarına göre M1 ilişkili belirteçlere ait MFI değerleri

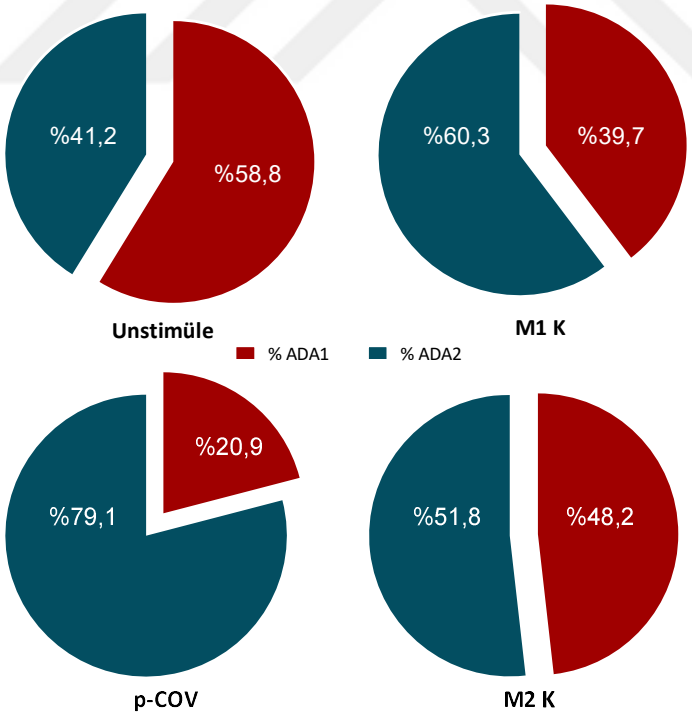


Şekil 29. Hücre kültürü sonuçlarına göre M2 ilişkili belirteçlere ait MFI değerleri

4.4. Hücre Kültürü Grupları ile ADA ve İzoenzimlerinin Aktivite Karşılaştırması



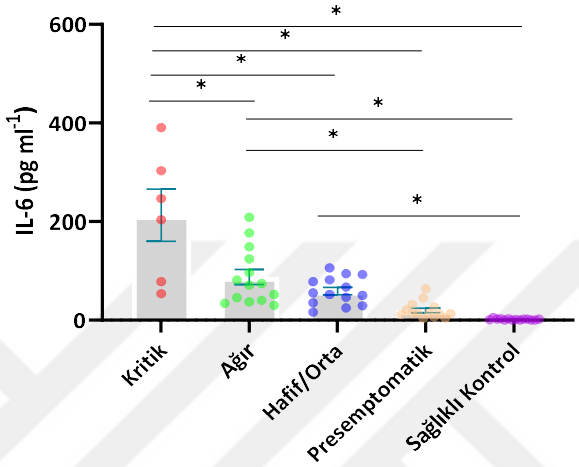
Şekil 30. Hücre kültürü gruplar arası ADA aktivite karşılaştırılması (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)



Şekil 31. Hücre kültürü gruplarında ADA1 ve ADA2 aktivite miktarları

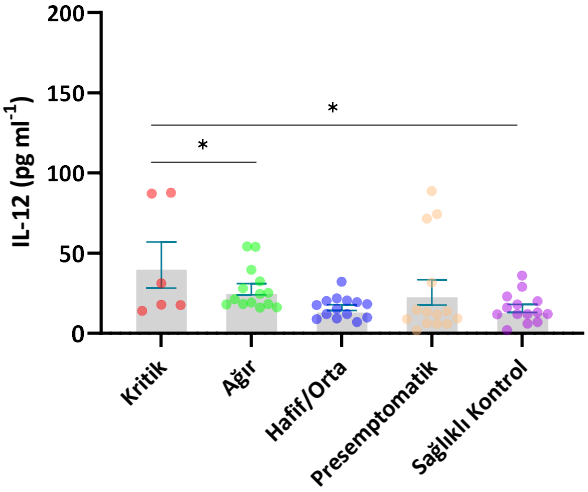
4.5. COVID-19 Vaka Grupları Sitokin Düzeyleri

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile IL-6 düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar diğer gruplara göre, ağır vakalar presemptomatik ve sağlıklı kontrol grubuna göre, hafif/orta vakalar ise sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 32).



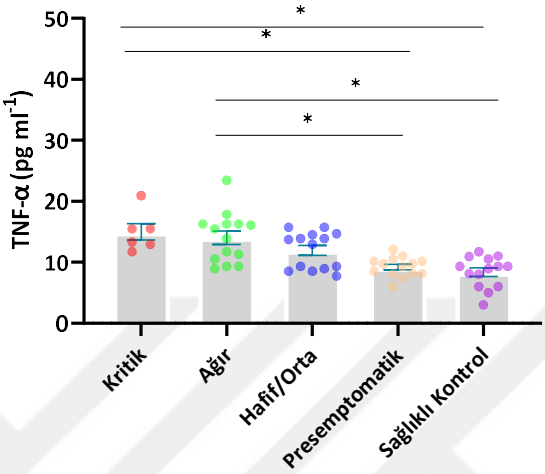
Şekil 32. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol IL-6 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile IL-12 düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar ağır vakalara ve sağlıklı kontrole göre artış göstermiştir (Şekil 33).



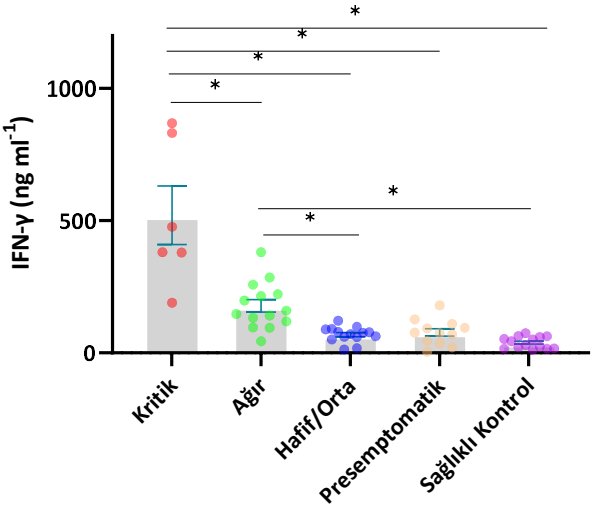
Şekil 33. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol IL-12 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile TNF-α düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar presemptomatik vakalara ve sağlıklı kontrole göre, ağır vakalar presemptomatik ve sağlıklı kontrolle göre artış göstermiştir (Şekil 34).



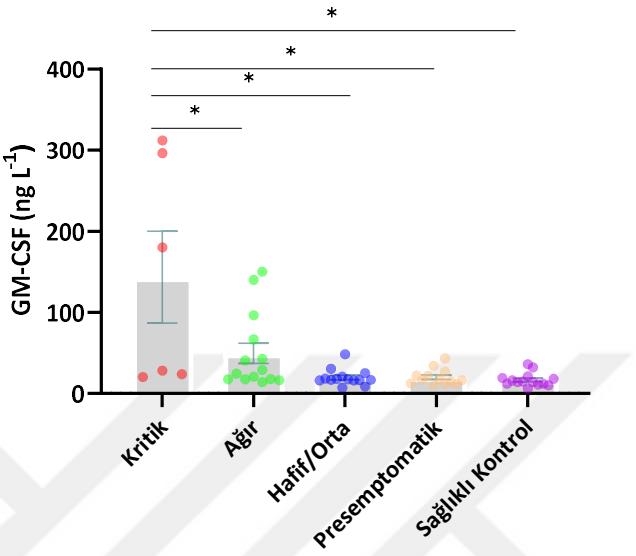
Şekil 34. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol TNF-α Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile IFN-γ düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar diğer gruplara göre, ağır vakalar ise hafif/orta ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 35).



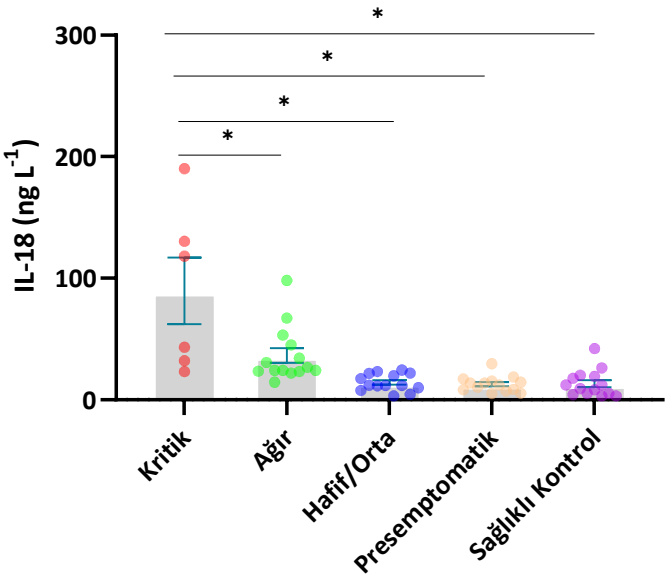
Şekil 35. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol IFN-γ Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile GM-CSF düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar diğer gruplara göre anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 36).



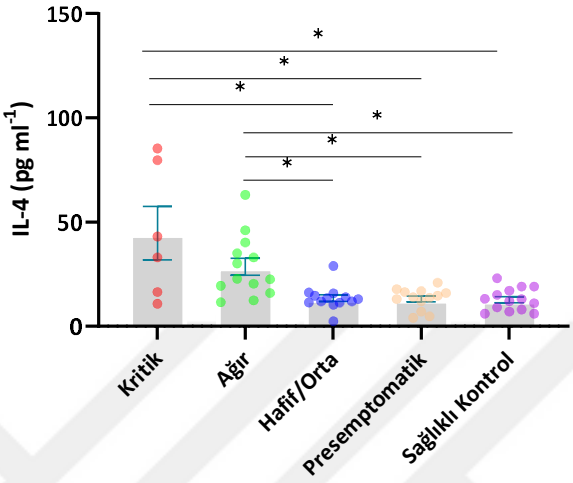
Şekil 36. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol GM-CSF düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile IL-18 düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar diğer gruplara göre anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 37).



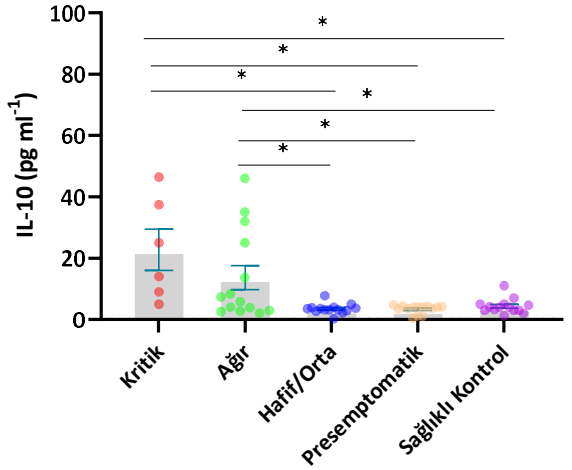
Şekil 37. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol IL-18 düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile IL-4 düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar ve ağır vakalar, hafif/orta, presemptomatik ve sağlıklı kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 38).



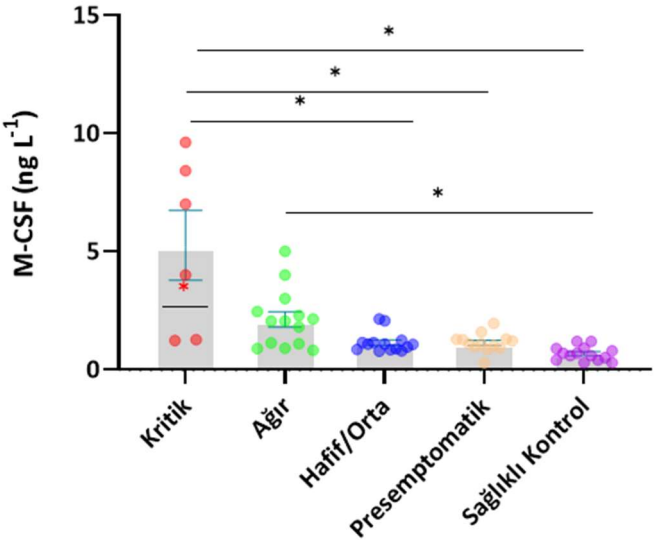
Şekil 38. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol IL-4 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar ve ağır vakalar, hafif/orta ve presemptomatik vakalara ve sağlıklı kontrollere göre artış göstermiştir (Şekil 39).



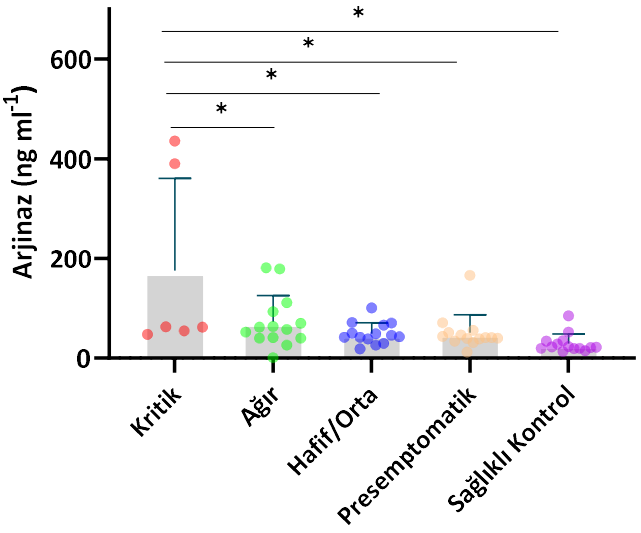
Şekil 39. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol IL-10 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile M-CSF düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar hafif/orta, presemptomatik ve sağlıklı kontrol grubuna göre, ağır vakalar ise sağlıklı kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 40).



Şekil 40. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol M-CSF Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

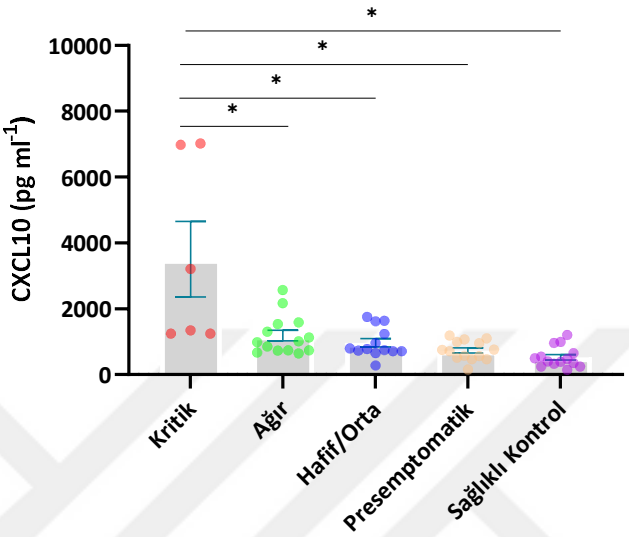
COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile arjinaz düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar diğer gruplara göre anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 41).



Şekil 41. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol Arjinaz Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

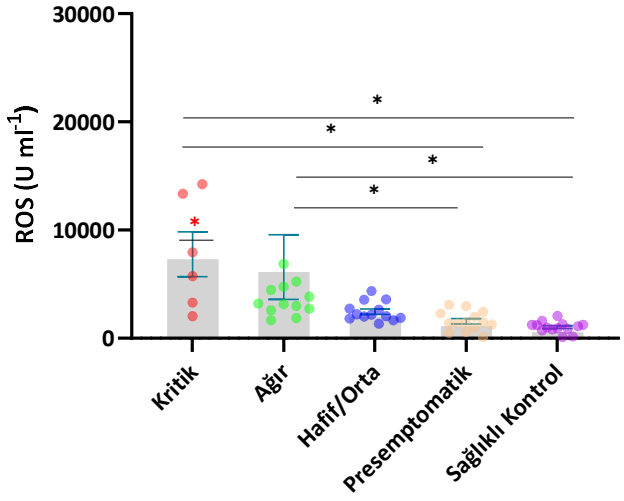
4.6. COVID-19 Vaka Grupları Kemokin Düzeyleri

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile CXCL10 düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar diğer gruplara göre artış göstermiştir (Şekil 42).



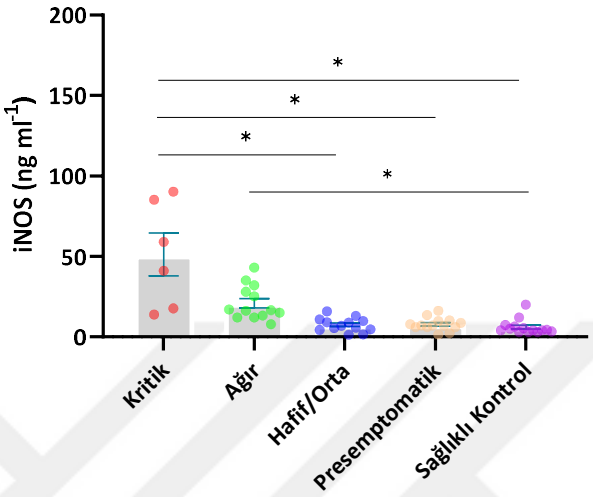
Şekil 42. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol CXCL10 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile ROS düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar ve ağır vakalar presemptomatik ve sağlıklı kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 43).



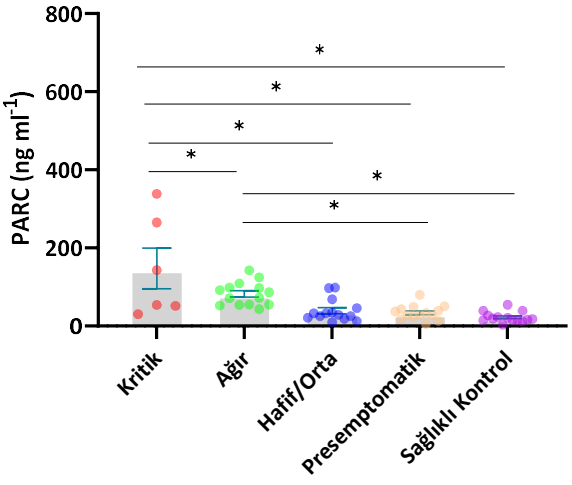
Şekil 43. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol ROS Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile iNOS düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar hafif/orta, presemptomatik ve sağlıklı kontrol grubuna göre, ağır vakalar ise sağlıklı kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 44).



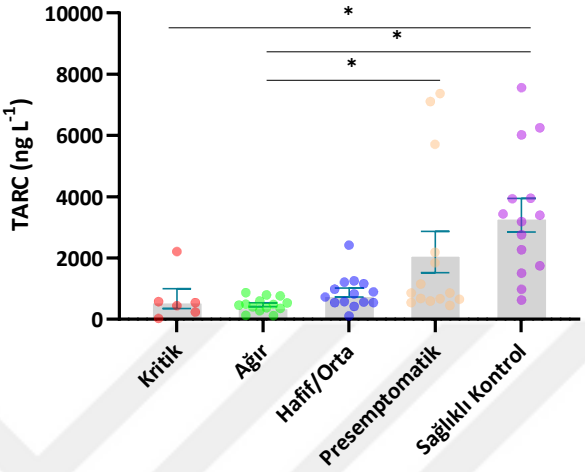
Şekil 44. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol iNOS Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile PARC (CCL18) düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar diğer gruplara göre, ağır vakalar ise presemptomatik vakalara ve sağlıklı kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 45).



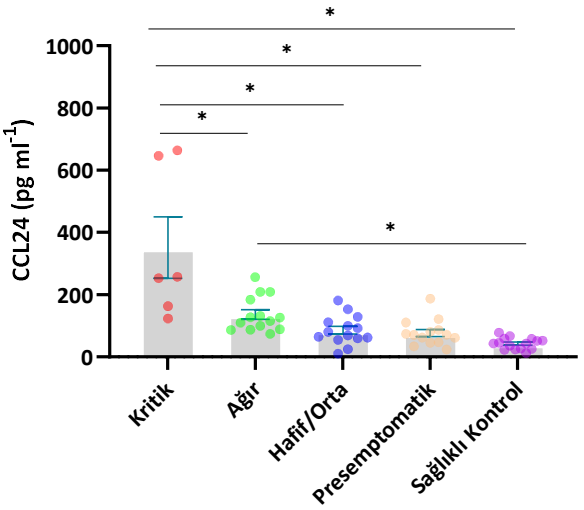
Şekil 45. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol PARC (CCL18) Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile TARC (CCL17) düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar sağlıklı kontrol grubuna göre, ağır vakalar ise presemptomatik ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 46).



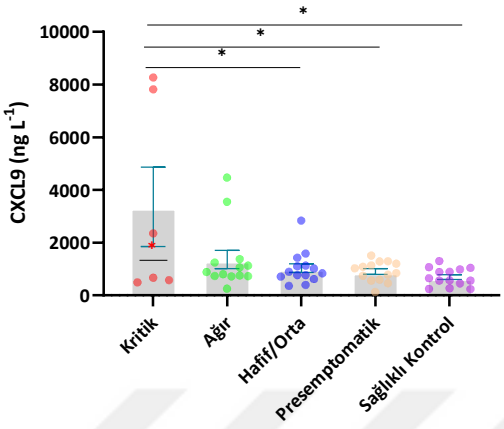
Şekil 46. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol TARC (CCL17) Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile CCL24 düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar diğer gruplara göre, ağır vakalar ise sağlıklı kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 47).



Şekil 47. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol CCL24 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

COVID-19 kritik vakalar, ağır, hafif/orta, presemptomatik vakalar, sağlıklı kontrol grubu ile CXCL9 düzeyleri karşılaştırıldığında; kritik vakalar, hafif/orta, presemptomatik vakalar ve sağlıklı kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 48).



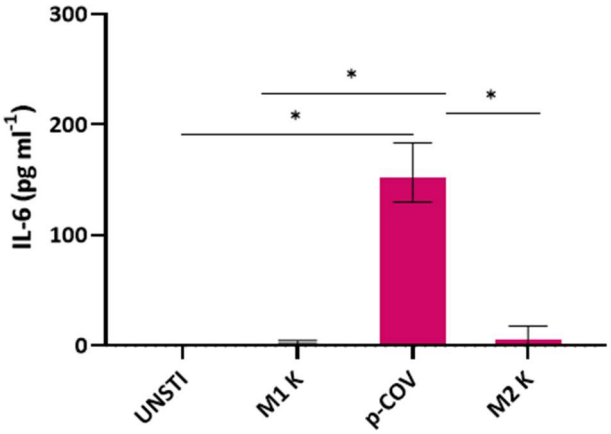
Şekil 48. COVID-19 Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol CXCL9 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

4.7. Eş-kültür Sonrası Sitokin ve Kemokin Düzeyleri

Hücre kültürü sonrası ELISA yöntemiyle çalışılan süpernatanlar, M1 ve M2 ilişkili sitokin/kemokin profilleri analiz edildi.

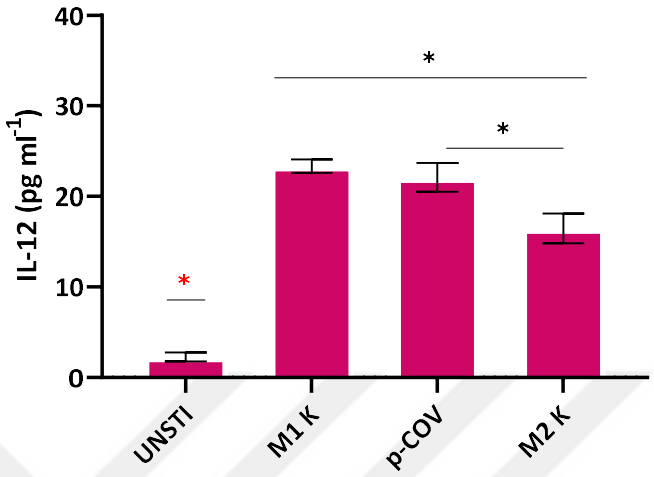
4.7.1. Hücre Kültürü Sitokin Düzeyleri

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar IL-6 düzeyleri karşılaştırıldığında, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV, M1 ve M2 kontrole göre anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 49).



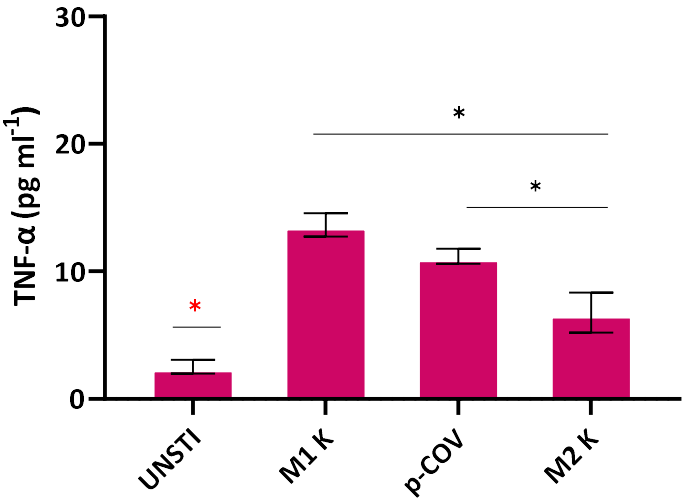
Şekil 49. Kültür Süpernatan IL-6 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar IL-12 düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre azalmıştır (Şekil 50).



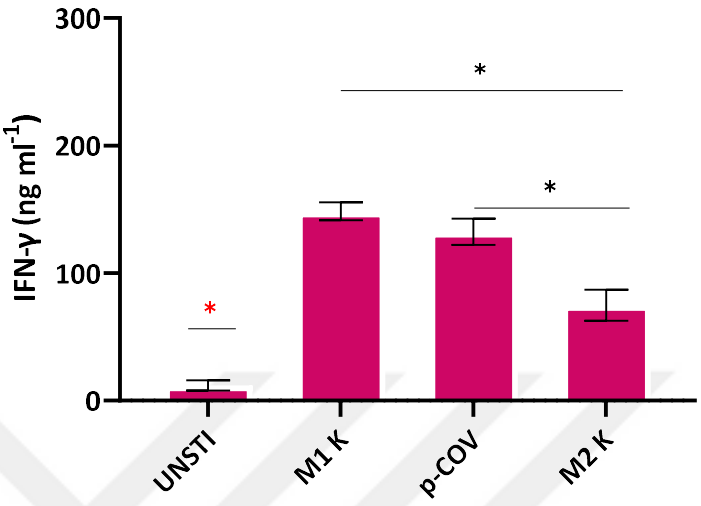
Şekil 50. Kültür Süpernatan IL-12 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar TNF-α düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre azalmıştır (Şekil 51).



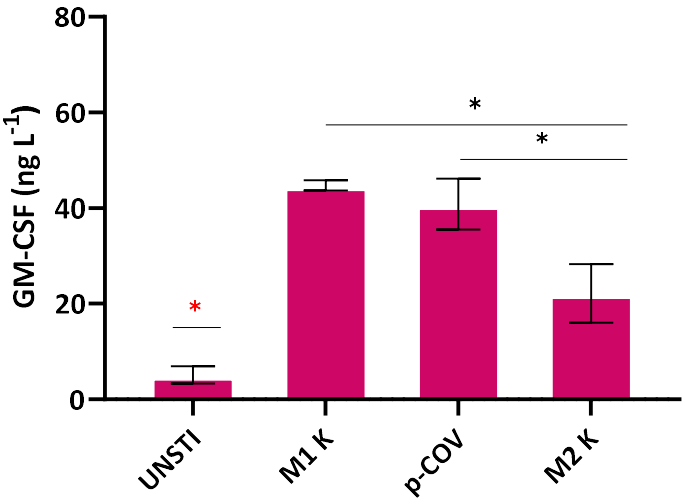
Şekil 51. Kültür Süpernatan TNF-α Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar IFN-γ düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre azalmıştır (Şekil 52).



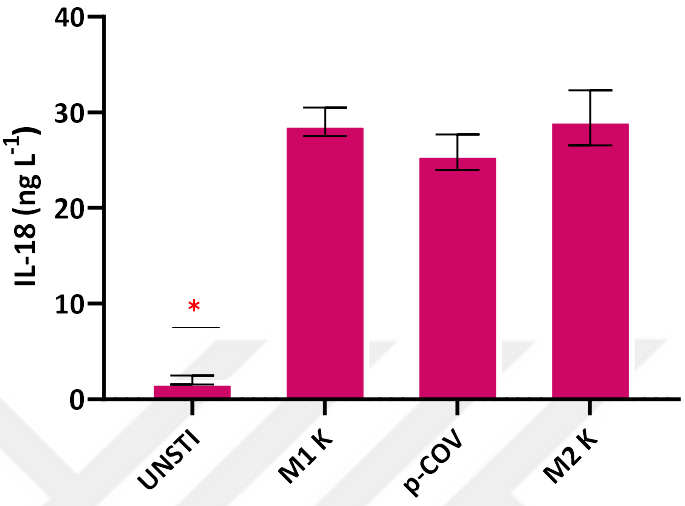
Şekil 52. Kültür Süpernatan IFN-γ Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar GM-CSF düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV kuyusu süpernatanı ve M1 kontrole göre azalmıştır (Şekil 53).



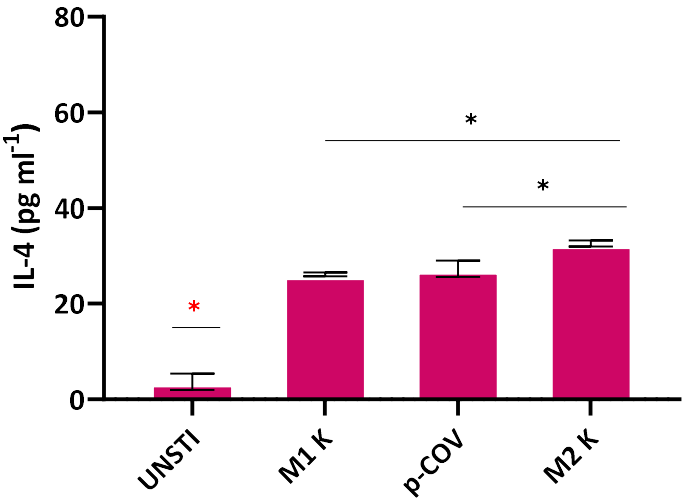
Şekil 53. Kültür Süpernatan GM-CSF Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar IL-18 düzeyleri karşılaştırıldığında, M1 ve M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV değerleri artış eğilimdedir fakat istatistiksel anlam yoktur (Şekil 54).



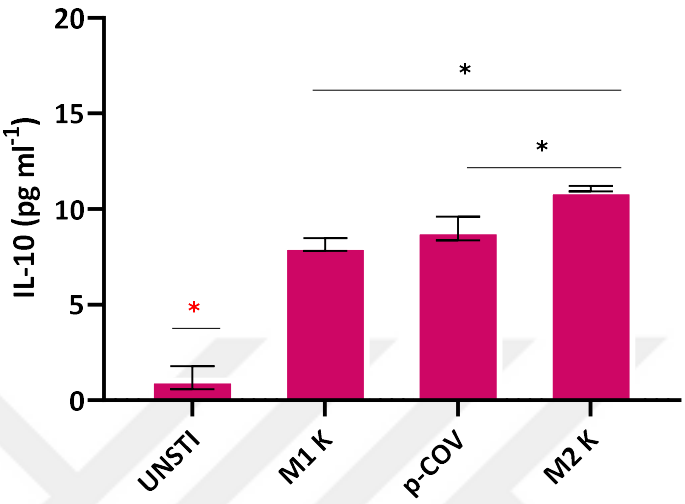
Şekil 54. Kültür Süpernatan IL-18 Düzeyleri (*: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut; p<0,005)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar IL-4 düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre artmıştır (Şekil 55).



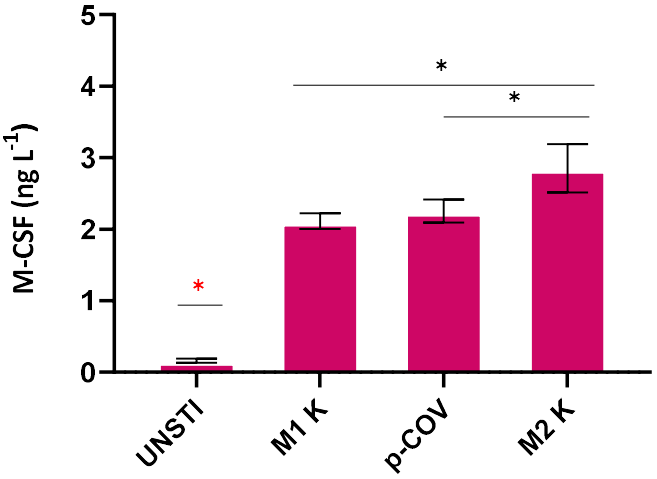
Şekil 55. Kültür Süpernatan IL-4 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre artmıştır (Şekil 56).



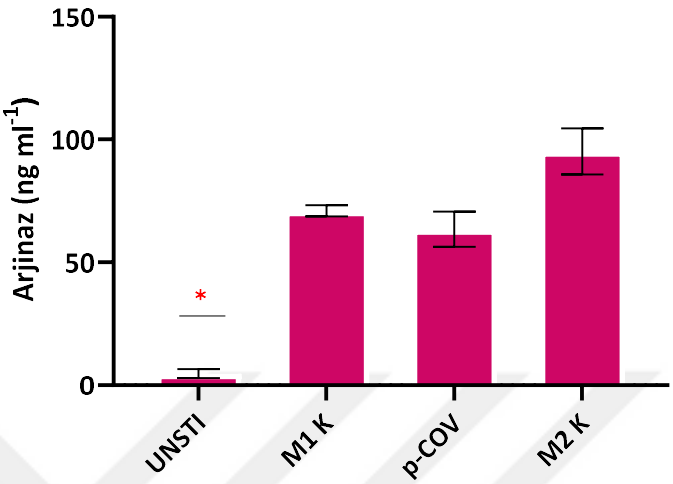
Şekil 56. Kültür Süpernatan IL-10 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar M-CSF düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre artmıştır (Şekil 57).



Şekil 57. Kültür Süpernatan M-CSF Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

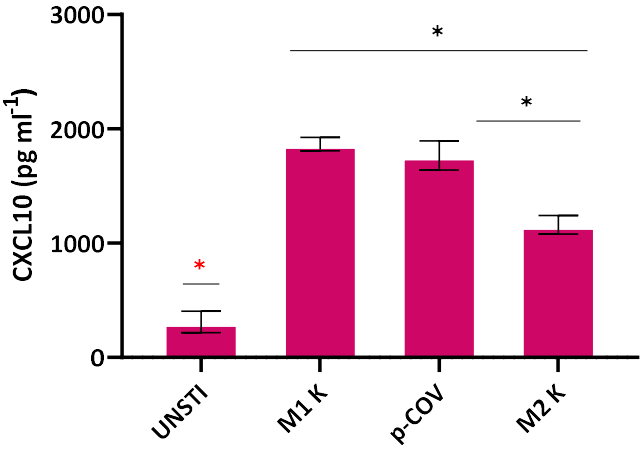
Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar arjinaz düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre artış eğilimdedir fakat istatistiksel anlam yoktur (Şekil 58).



Şekil 58. Kültür Süpernatan Arjinaz Düzeyleri (*: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut, p<0,005)

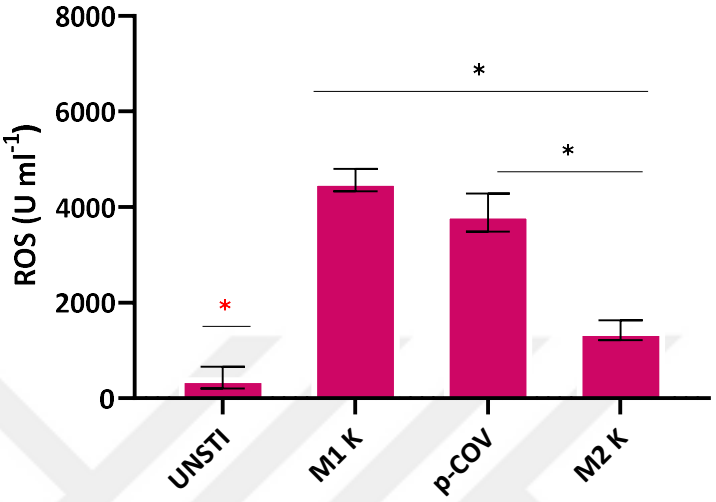
4.7.2. Hücre Kültürü Kemokin Düzeyleri

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar CXC10 düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre azalmıştır (Şekil 59).



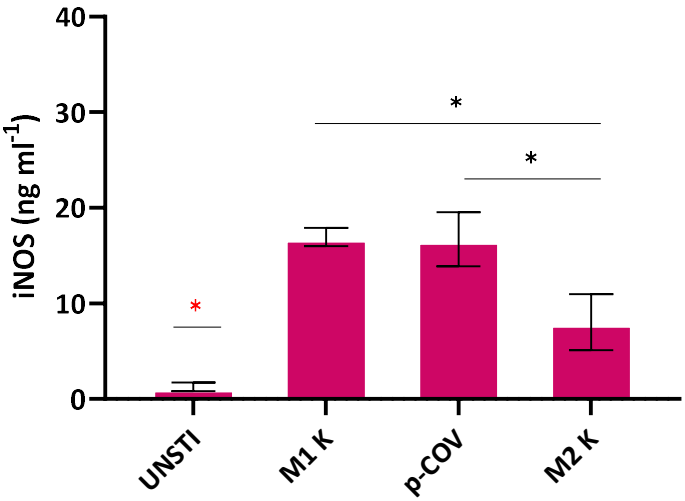
Şekil 59. Kültür Süpernatan CXCL10 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar ROS düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre azalmıştır (Şekil 60).



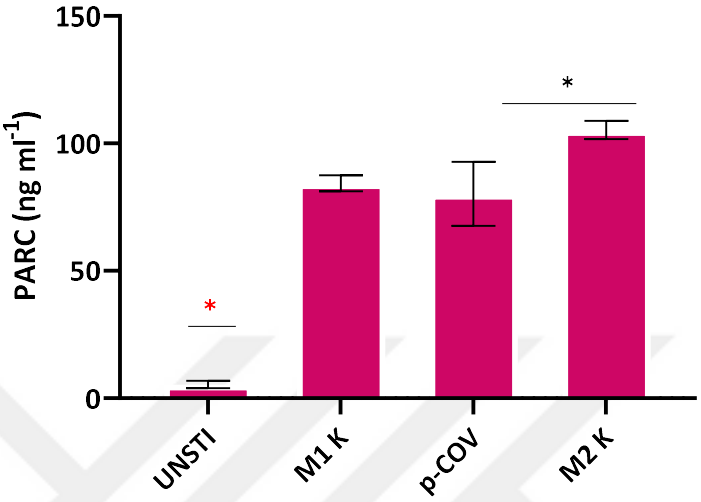
Şekil 60. Kültür Süpernatan ROS Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar iNOS düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre azalmıştır (Şekil 61).



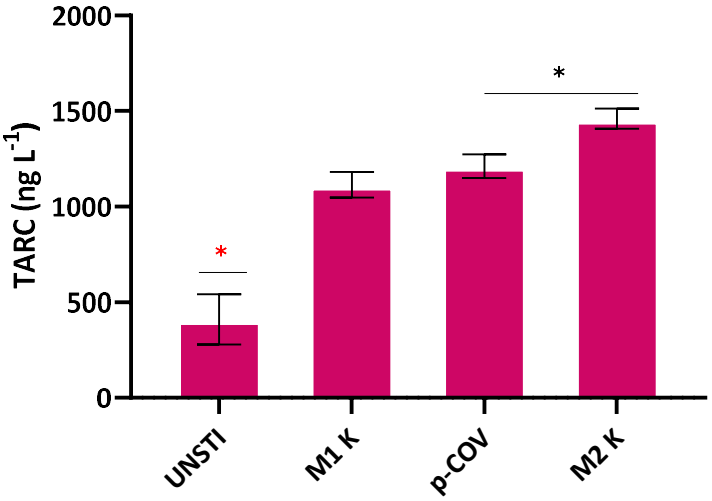
Şekil 61. Kültür Süpernatan iNOS Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar PARC (CCL18) düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV'a göre artmıştır (Şekil 62).



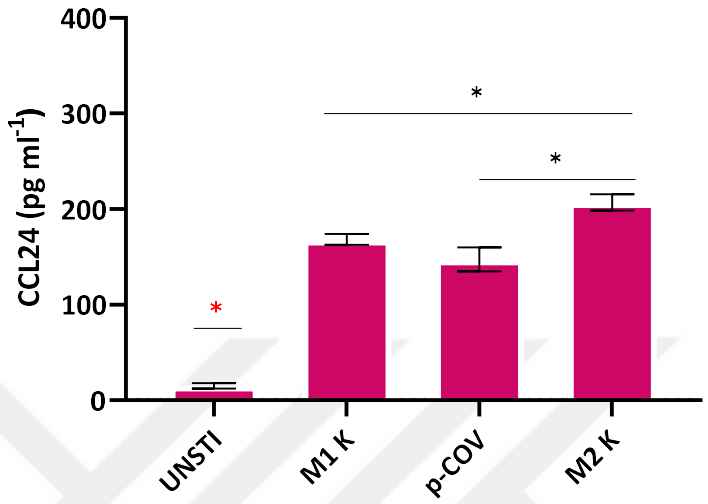
Şekil 62. Kültür Süpernatan PARC (CCL18) Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar TARC (CCL17) düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV'a göre artmıştır (Şekil 63).



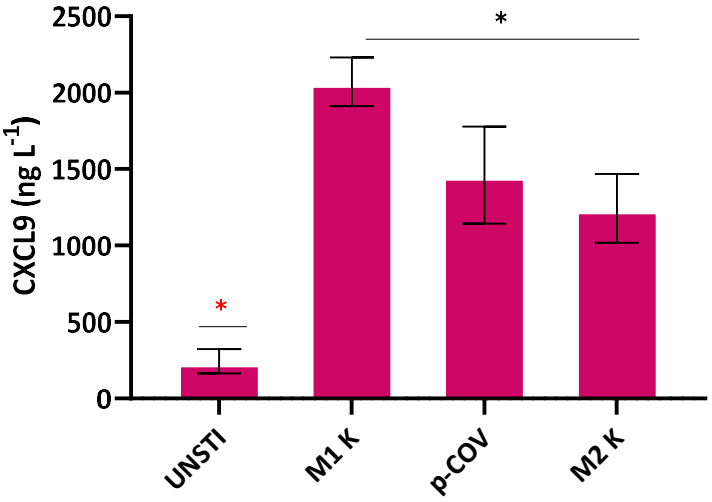
Şekil 63. Kültür Süpernatan TARC(CCL17) Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar CCL24 düzeyleri karşılaştırıldığında, M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV ve M1 kontrole göre artmıştır (Şekil 64).



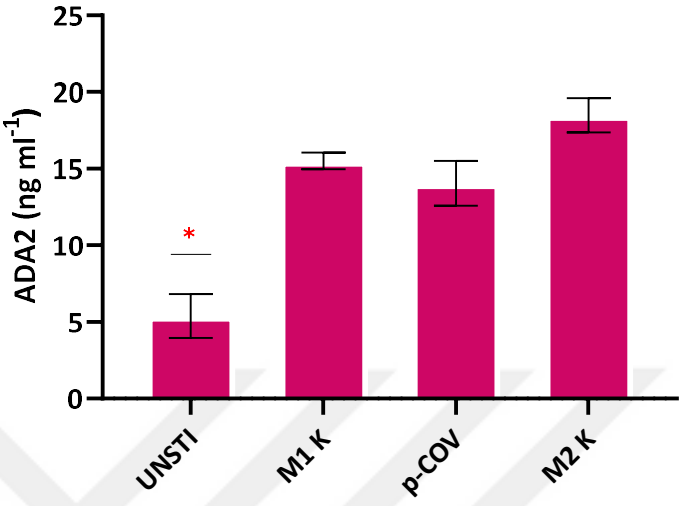
Şekil 64. Kültür Süpernatan CCL24 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar CXCL9 düzeyleri karşılaştırıldığında, M1 kontrol, M2 kontrole göre artmıştır (Şekil 65).



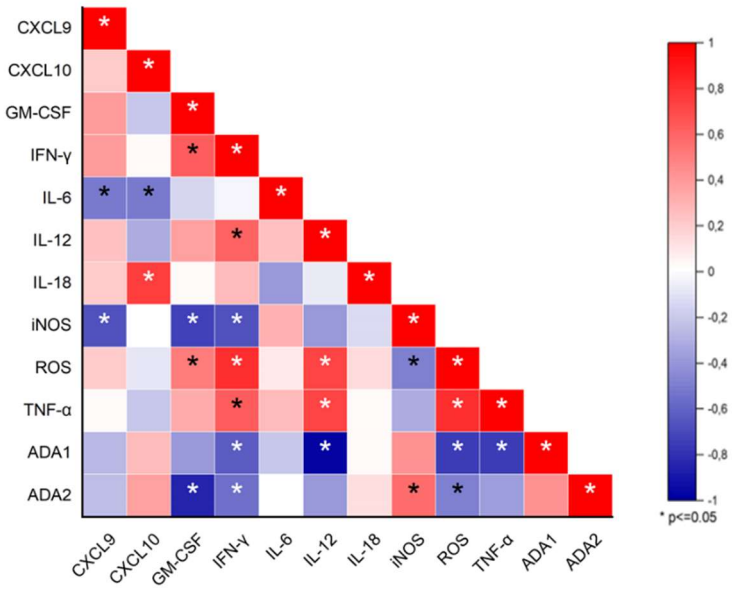
Şekil 65. Kültür Süpernatan CXCL9 Düzeyleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir p<0,005; *: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut)

Sağlıklı kontrol eş-kültür çalışmaları sonrası elde edilen süpernatanlar ADA2 düzeyleri karşılaştırıldığında, M1 ve M2 kontrol, COVID antijeni ile uyarılan p-CoV değerleri artış eğilimdedir fakat istatistiksel anlam yoktur (Şekil 66).

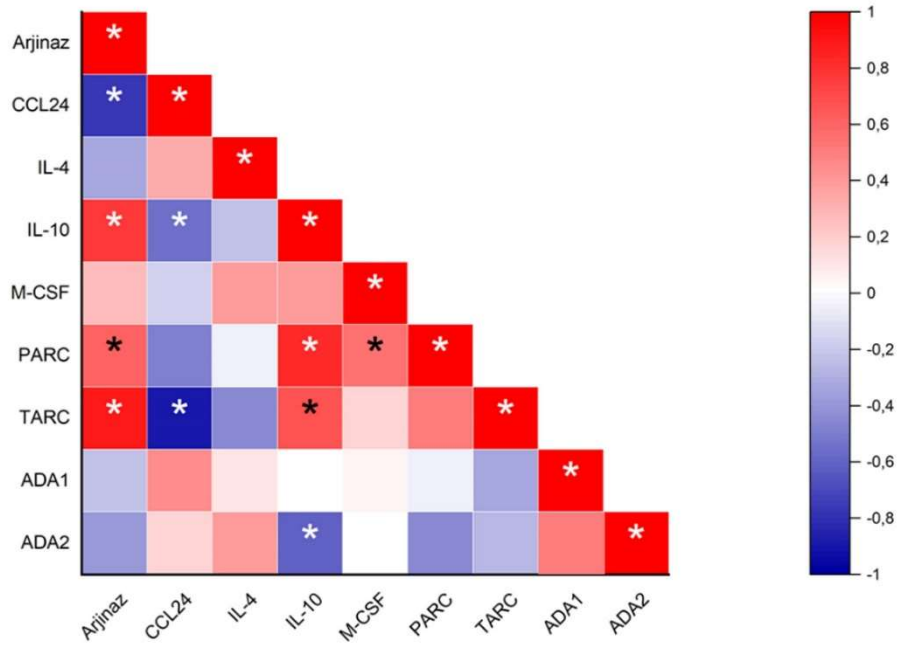


Şekil 66. Kültür Süpernatan ADA2 Düzeyleri (*: tüm gruplarla istatistiksel anlam mevcut; p<0,005)

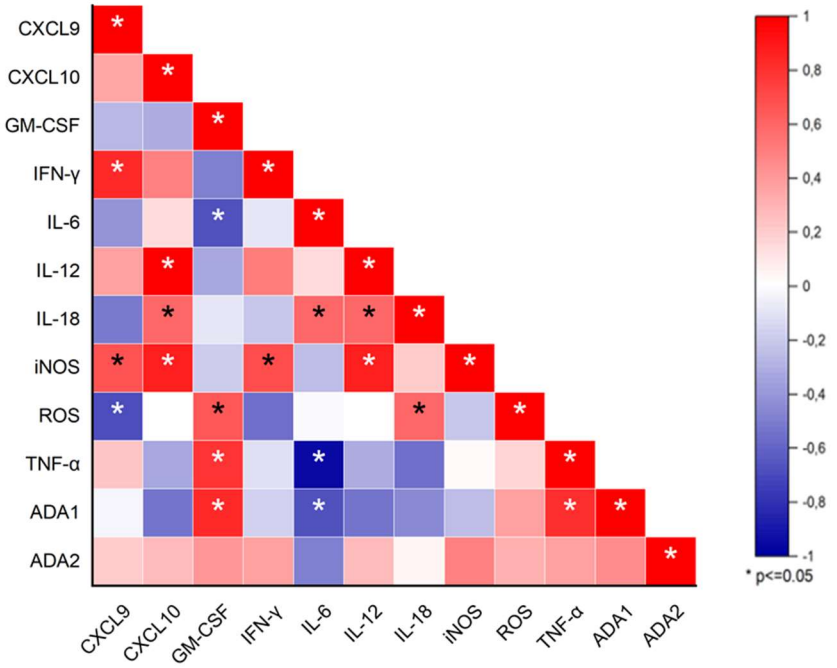
4.7.3. Hücre Kültürü Sitokin/Kemokin Profillerinin ADA Aktivite Korelasyonu



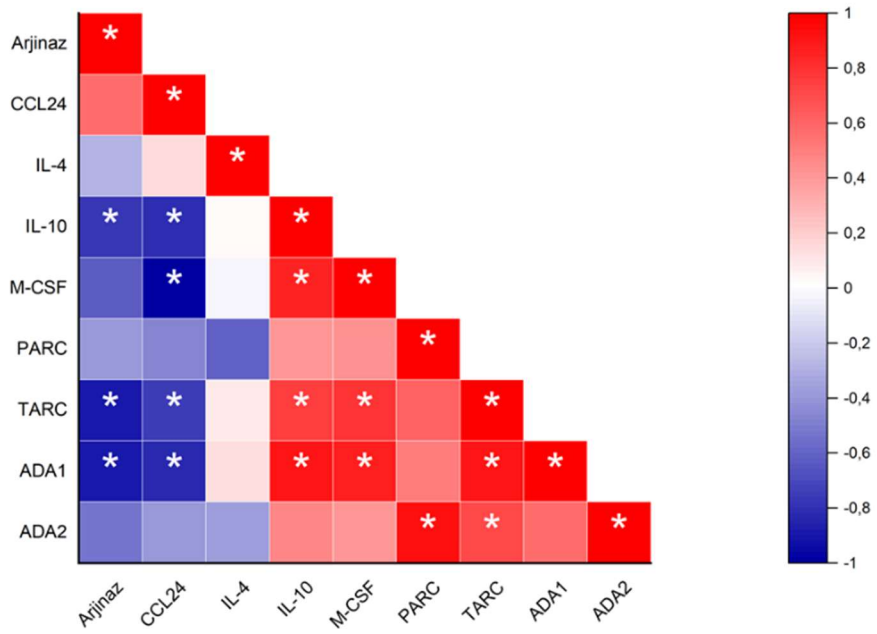
Şekil 67. Hücre kültürü Unstimule-M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



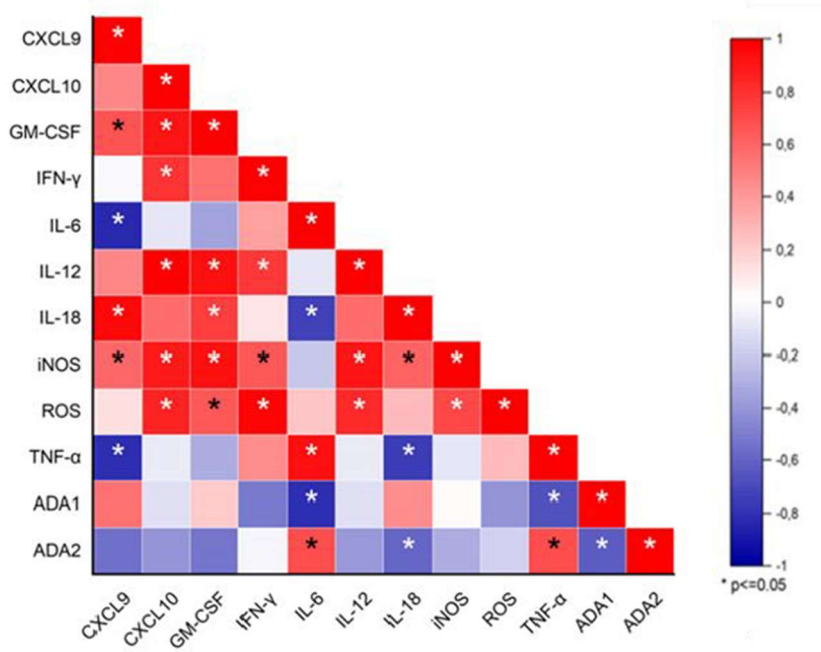
Şekil 68. Hücre kültürü Unstimule-M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



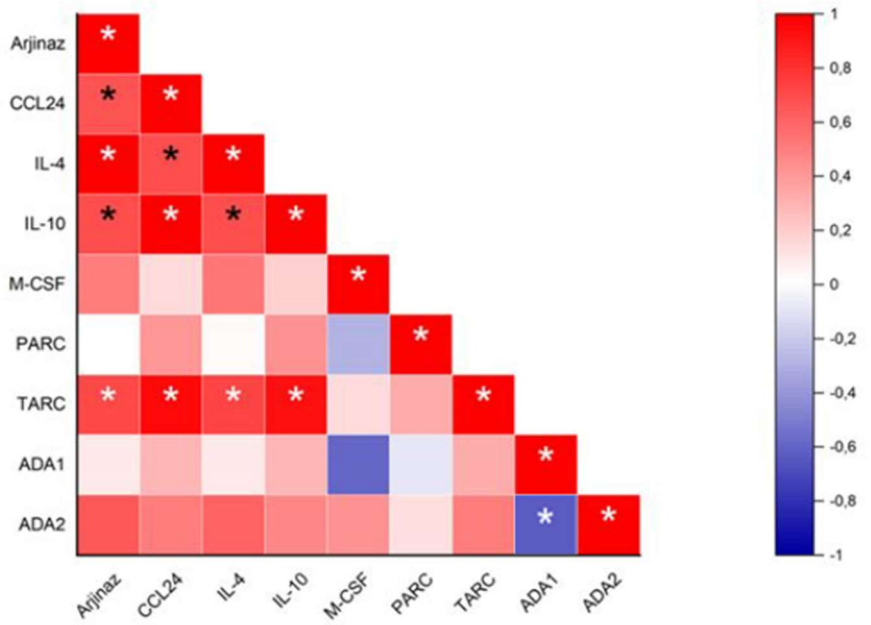
Şekil 69. Hücre kültürü M1 kontrol ve M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



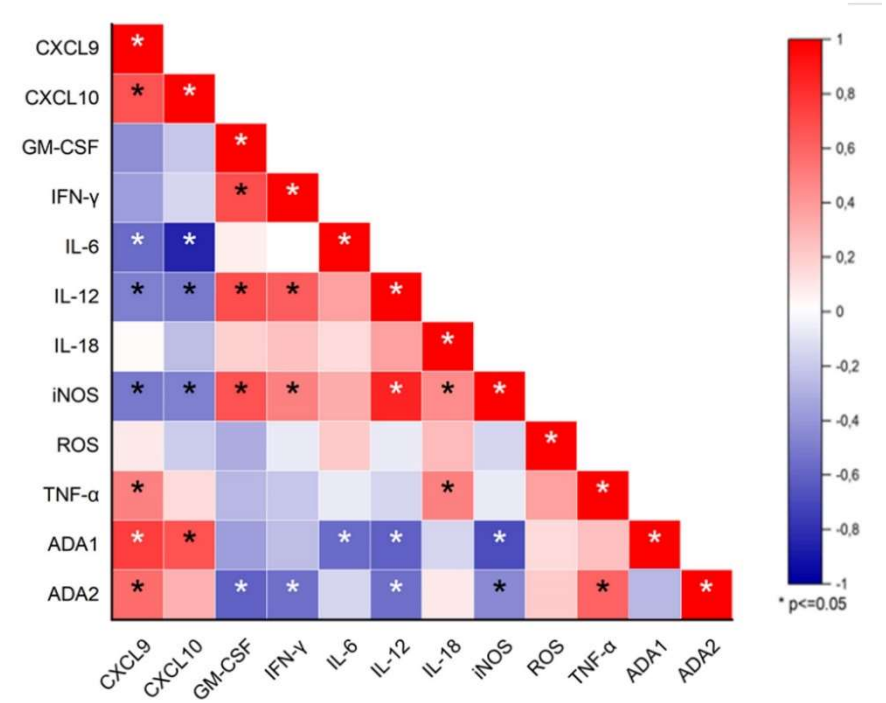
Şekil 70. Hücre kültürü M1 kontrol ve M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



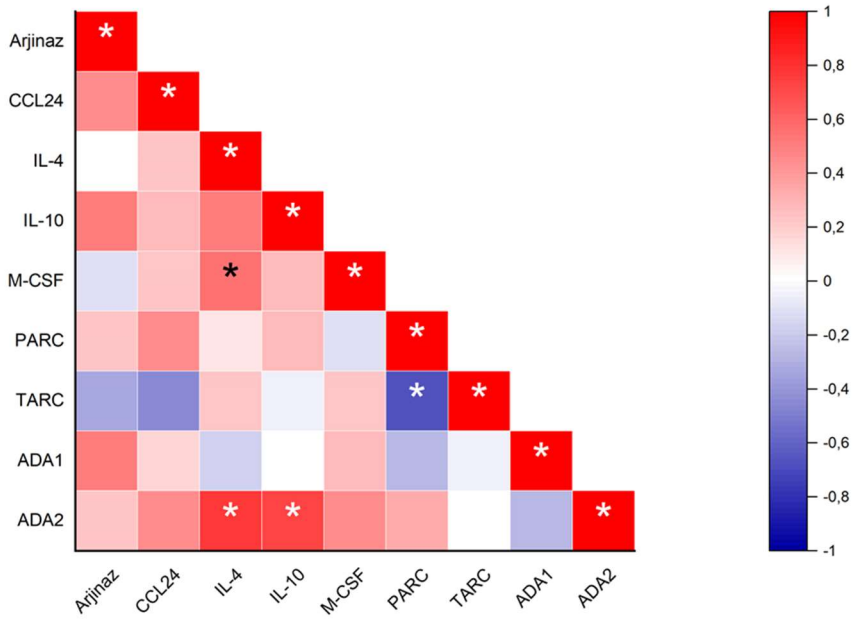
Şekil 71. Hücre kültürü pCOV ve M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



Şekil 72. Hücre kültürü pCOV ve M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

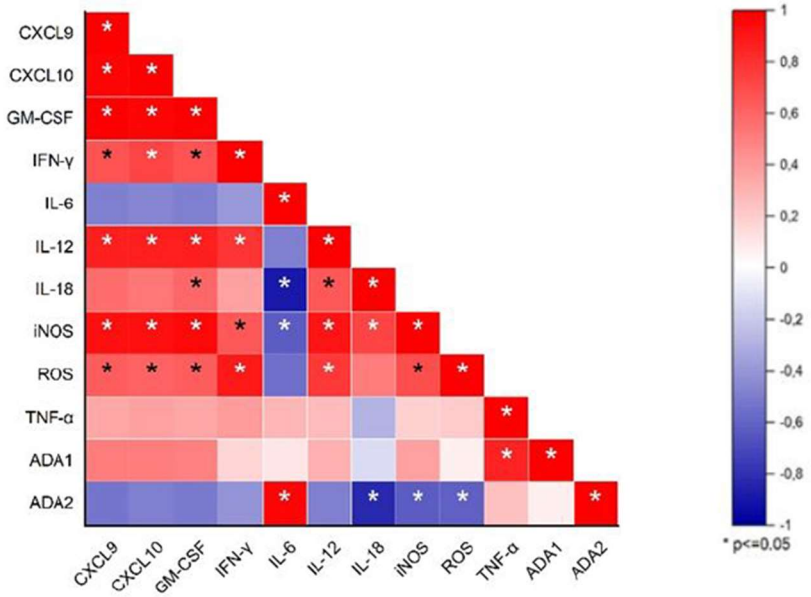


Şekil 73. Hücre kültürü M2 kontrol ve M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

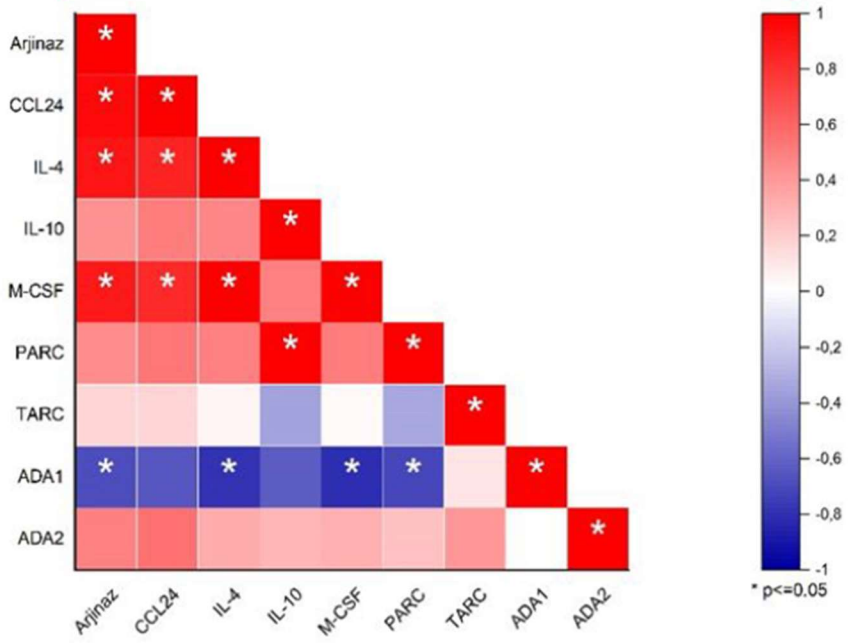


Şekil 74. Hücre kültürü M2 kontrol ve M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

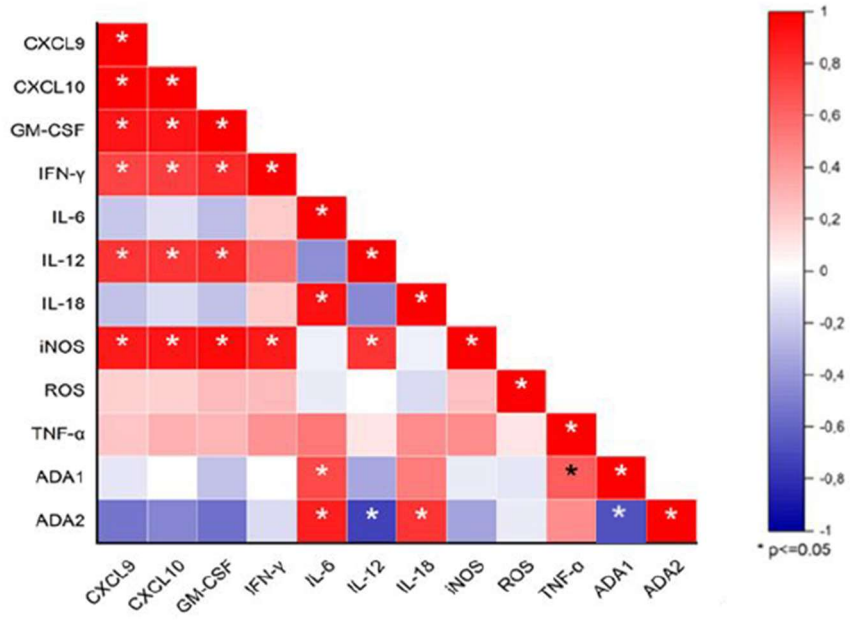
4.8.Sitokin/Kemokin profillerinin COVID-19 vaka gruplarına göre ADA aktivite Korelasyonu



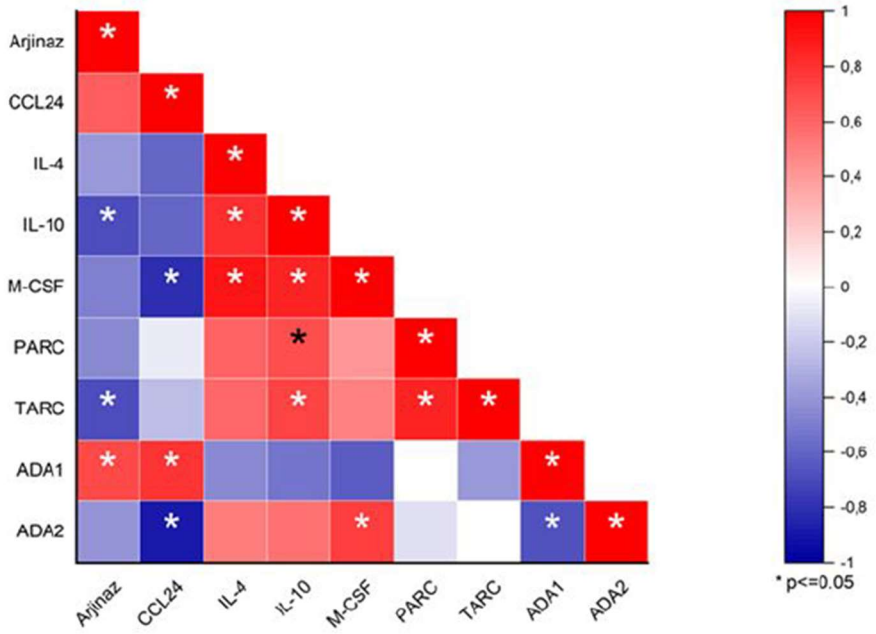
Şekil 75. Kritik vakalarda M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



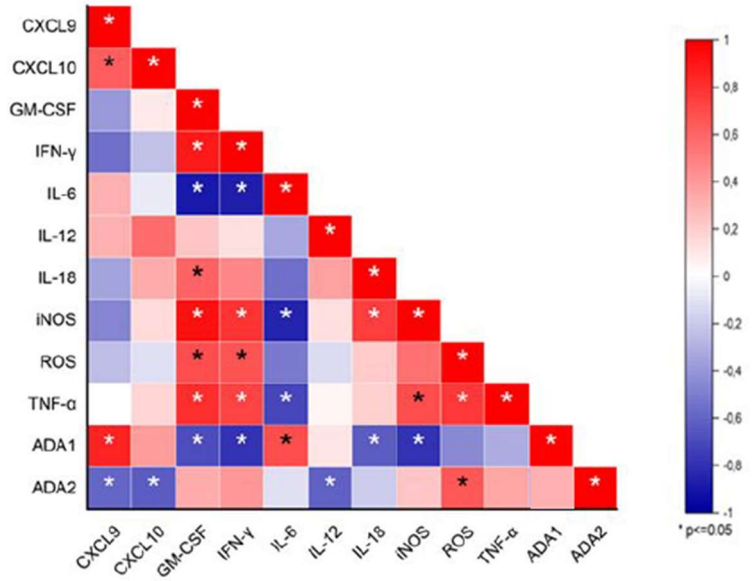
Şekil 76. Kritik vakalarda M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



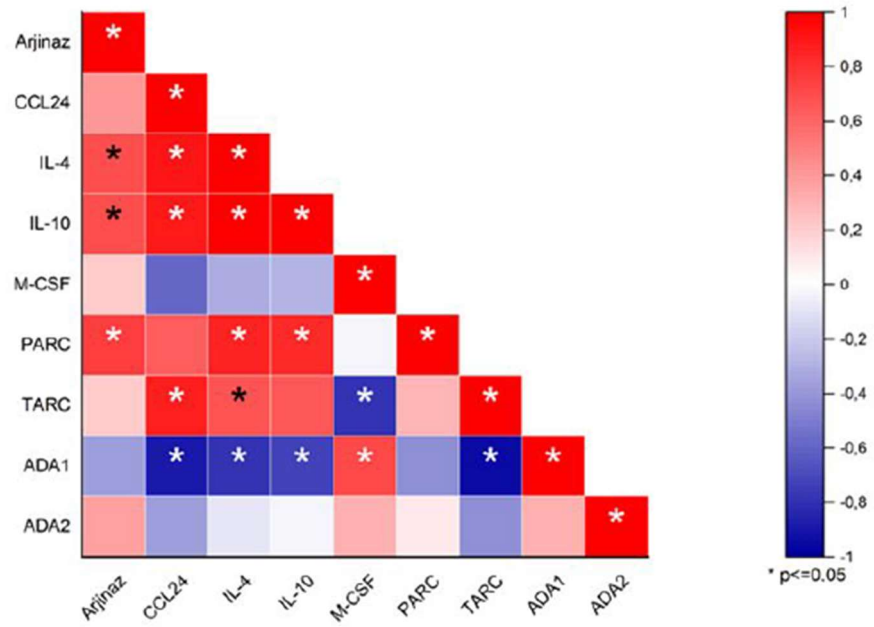
Şekil 77. Ağır vakalarda M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



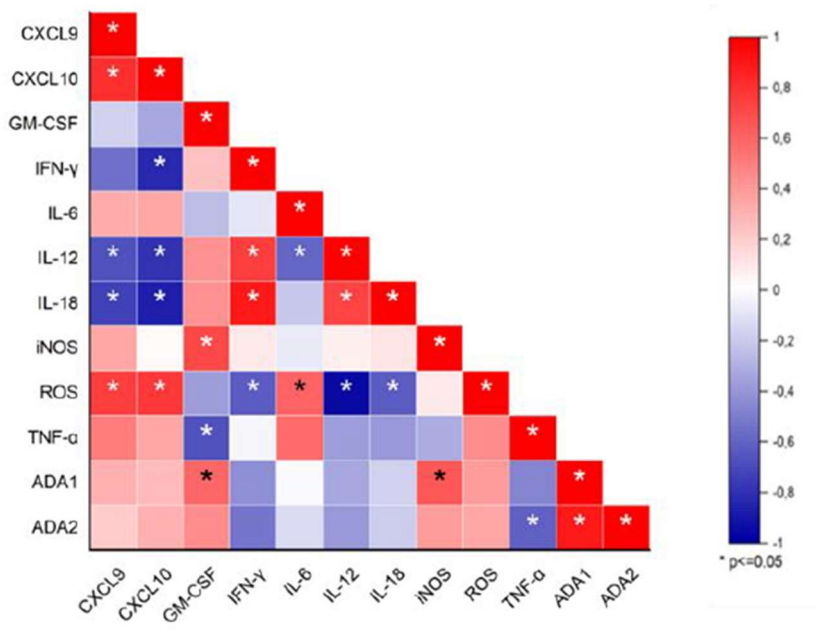
Şekil 78. Ağır vakalarda M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



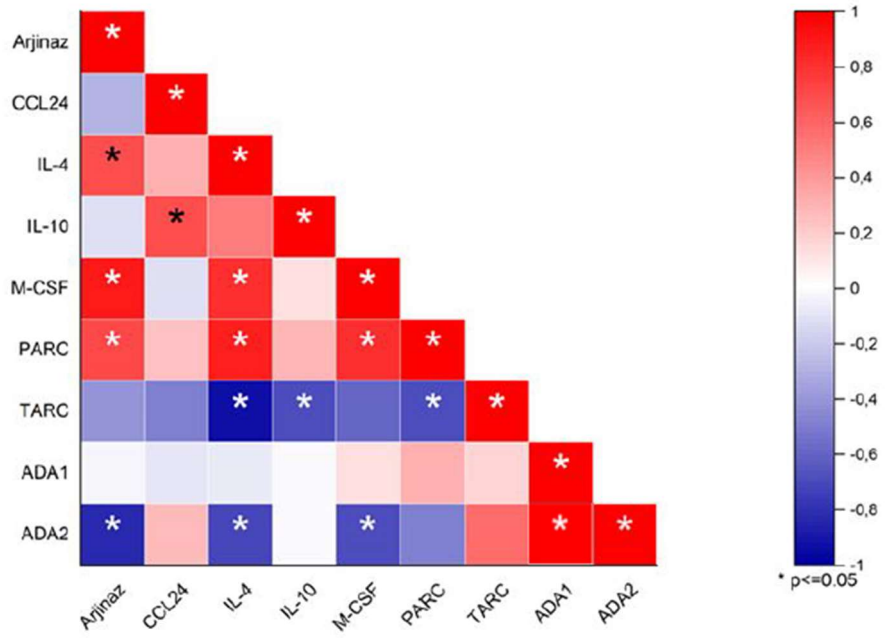
Şekil 79. Hafif/orta vakalarda M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



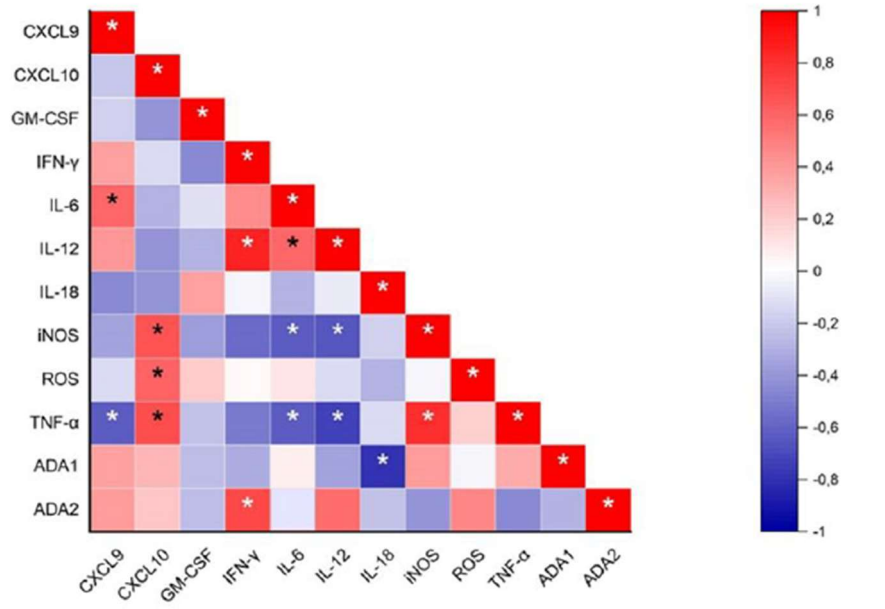
Şekil 80. Hafif/orta vakalarda M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



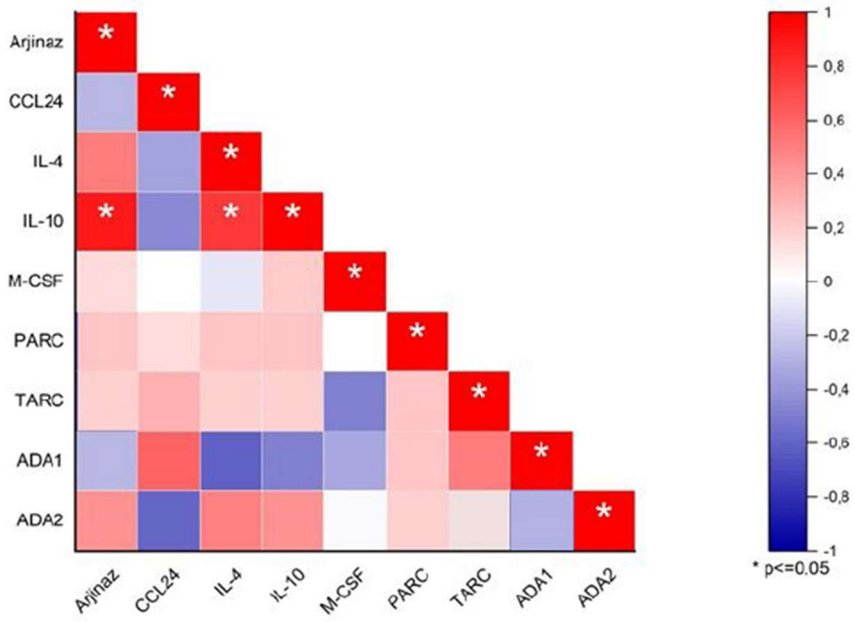
Şekil 81. Presemptomatik vakalarda M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



Şekil 82. Presemptomatik vakalarda M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

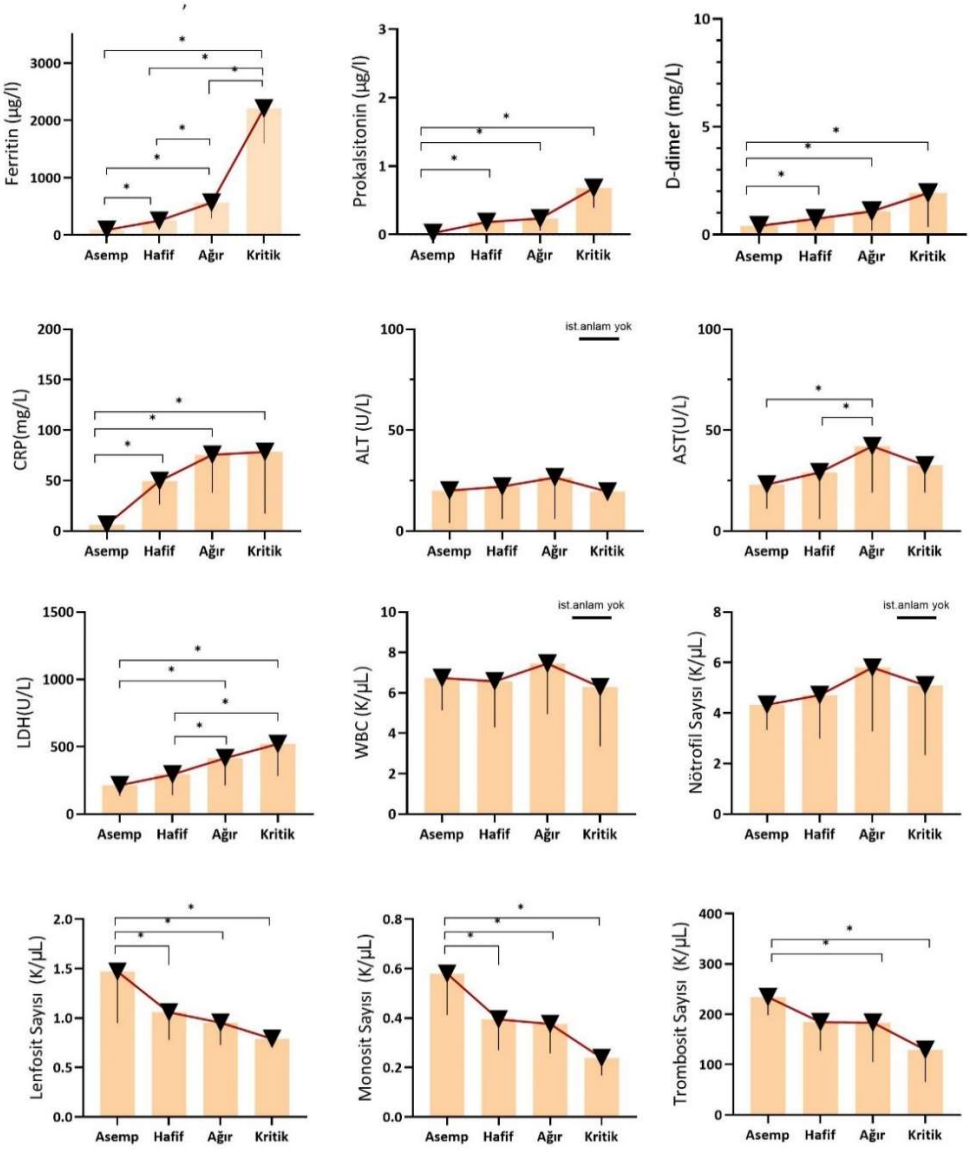


Şekil 83. Sağlıklı kontrol M1 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)



Şekil 84. Sağlıklı kontrol M2 ilişkili sitokin ve kemokinlerin ADA aktivite korelasyonu (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

4.9. COVID-19 Vaka Grupları Laboratuvar Parametreleri Karşılaştırılması



Şekil 85. Laboratuvar bulguları analizleri (*:istatistiksel anlamı göstermektedir, p<0,005)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

COVID-19 tüm dünyayı etkisi altına alan, bulaşıcılık seviyesi yüksek, pandemiye neden olan bir hastalıktır. SARS-CoV-2 virüsünün etkileri, daha önceki yıllarda ortaya çıkmış, diğer koronavirüslerle karşılaştırmaları yapılmıştır. Uzun yıllardır hayatımızda görülen bu virüs cinsinin yıkıcı etkileri, bu virüse karşı olan immün yanıtlar üzerine birçok araştırma yapılmıştır. SARS-CoV-2 için konak-viral etkileşimleri sırasında viral nükloekapsid yapı konakçı hücre zarında kalır. Antijen sunan hücreler tarafından lenfositlere sunum gerçekleştirilir. SARS-CoV-2 yoğun bir enflamatuvar yanıtı tetikler. Başlıca IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-ɣ gibi sitokinlerin hızlı salınımına yol açabilir. Bu sitokinlerin hızlı salınımı hastalarda koagülopati, organ fonksiyon bozuklukları gibi ciddi etkilere neden olabilmektedir. İmmün sistemin çok yönlü karmaşası ağır sonuçlara yol açabilmektedir.

Adenozin deaminaz (ADA) özellikle lenfoid dokularda bulunan, immün sistem gelişiminde önemli bir enzimdir. Serumda ve vücudun birçok dokusunda yaygın olarak bulunur. ADA ekspresyonundaki artışlar ya da eksiklikler birçok farklı hastalıkta da tanımlanmıştır. İnsanda ADA1 ve ADA2 (CECR1) olarak adlandırılan izoenzimler, ADA gen kompleksi içerisinde bulunur. ADA1 T hücre proliferasyonunu, ADA2 ise monositlerin farklılaşmasını etkileyebilmektedir. Ayrıca ADA1 ve ADA2 immün sistem hücrelerine farklı şekilde bağlanmaktadır. ADA1 genellikle CD26 [dipeptidil peptidaz IV (DPP4)] eksprese eden hücrelere bağlanırken, ADA2 bu bağlanmayı proteoglikanlar veya henüz bilinmeyen farklı reseptörler yoluyla gerçekleştirir (Gao ve ark., 2022). İmmün sistem hücrelerini yakından etkileyen bu enzimin ADA1 ve ADA2 izoenzimleri fonksiyonları bakımından önem arzetmektedir. Hücresel immünitenin non-spesifik belirteci olabileceği belirtilen ADA'nın farklı hastalık şiddetine sahip COVID-19 vakalarında düzeylerini ve enzim aktivitesini araştırmak, sitokin/kemokin profilleri incelenerek makrofaj polarizasyonundaki etkisini ve COVID-19 patogenezindeki rolünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bir çalışmada; sistemik lupus eritematozus (SLE), miyastenia gravis (MG), ankilozan spondilit (AS), romatoid artrit (RA) gibi otoimmün hastalıklarda total-ADA (tADA) ve ADA2 aktivitesine bakılmıştır. Bu çalışmaya göre; hasta grubunda tADA ve ADA2 aktivitesinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

ADA enzim aktivitesindeki bu artışın MAS'ın belirteci olabileceği bildirilmiştir (Gao, Wang, Lin, & Dong, 2022). Başka bir çalışmada farklı kanser türlerinde plazma ADA1 ve ADA2 aktivitesi incelendiğinde ADA2 aktivitesinin kanser hastalarında daha yüksek olduğu bulunmuştur. ADA1 ve ADA2'nin farklı görevler alabileceği, birbirine zıt fonksiyonlar gösterebileceği ve ADA2'nin kanserde koruyucu bir görevde olabileceği bildirilmiştir (Gao ve ark., 2022). Literatürdeki bilgilere göre ayrıca akut lenfoblastik lösemi, akut hepatit gibi hücresel immünite uyarıcı hastalıklarda ADA1 aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Nakamachi ve ark., 2003; Ratech, Martiniuk, Borer, & Rappaport, 1988).

ADA aktivitesinin serumda artışı, kronik kulak burun boğaz (KBB) enfeksiyonlarında (Santosh, Renukananda, & Abhilash, 2016), tifo hastalarında (Mishra, Gupta, Ali, Nath, & Chandra, 1994), jüvenil idiopatik artrit de (Ziaee, Amiran, Moradinejad, & Haghi-Ashtiani, 2013), mesane kanseri hastalarında (Pirinççi ve ark., 2012), kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarında (Ghaderi ve ark., 2016) tespit edilmiştir (Franco-Martinez ve ark., 2021). Genel ifadeyle baktığımızda, adenozin değerindeki değişkenlik sonucunda bazı immün sistem bozukluklukları ile karşılaşılabilmektedir. ADA'nın, adenozin/deoksiadenozini, inozin/deoksiinozine dönüşümünü katalizlediği bilinmektedir. Eksik ADA aktivasyonunda, adenozinin inozine dönüştürülememesinden dolayı hücre dışı adenozin birikmesine neden olur. Bu durum, doğal bağışıklıkta olağan nötrofil hücre dışı tuzak (NET) oluşumunda artışa ve düzensiz NETozis'e etki etmektedir. Ayrıca makrofajların M1 polarizasyonuna, enflamatuvar sitokinlerin artışına yol açar (Signa ve ark., 2022). DADA2 hastalarının kan örneklerinde ve deri biyopsilerinde proenflamatuvar sitokinlerde artış gözlenmiştir ve ADA2 eksikliğinin M1 makrofaj polarizasyonuna yönelim olduğu bildirilmiştir (Contractor, Bhavsar, Joshi, Pujara, & Shukla, 2022; Meyts, & Aksentijevich, 2018). Tüberküloz plevral efüzyon (TPE) hastalarında plevral ADA'nın ve izoenzim aktivitelerinin arttığı ve ADA2'nin tADA aktivitesinin büyük kısmını oluşturduğu, ayrıca hastalara tanı konulmasındaki önemi belirtmektedir (Zeng ve ark., 2022). Kronik enflamatuvar hastalığı olan primer sjögren sendromu (pSS) hastalarında da serum tADA aktivitesinin sağlıklı kontrollere kıyasla arttığı ve ADA'nın hastalığın artışında önemli bir etki oluşturduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2023). Yetişkin still hastalığında (AOSD) tADA aktivitesinin sağlıklı kontrollere göre artış gösterdiği ve

bu hastalarda tedavi sonrası değerlerde ADA'nın azaldığı belirtilmiştir. ADA'nın AOSD hastalarının tanı ve tedavi sürecinde biyobelirteç olabileceği de belirtilmektedir (Xu ve ark., 2022). İmmün aracılı hastalıklarda yapılan bir çalışmada ADA2 aktivitesi ve MAS bulgularıyla karşılaştırma analizleri yapılmıştır. Çalışmaya göre; sistemik jüvenil idiyopatik artrit (JIA) hastalarında sağlıklı kontrollere göre yükselmiş ADA2 aktivitesi tespit edilmiştir. MAS belirteçlerine göre yapılan analizlerde, MAS'lı JIA hastalarında MAS bulgusu olmayanlara göre daha yüksek ADA2 seviyesi bildirilmiştir. ADA2'nin yüksek güven aralığında MAS belirteci olarak kullanımı önerilmiştir. Öte yandan diğer MAS belirteçleri incelendiğinde IL-18, IFN- γ, CXCL9, ferritin ile ADA2 aktivitesi arasında da ilişki bulunmuştur (Lee ve ark., 2020). Başka bir çalışmada hemofagositik lenfohistiyositoz (HLH), lenfoma ilişkili hemofagositik sendromlu (LAHS), enfeksiyon ilişkili hemofagositik sendromlu (IAHS) ve MAS'lı hastalarda serum ADA düzeyleri incelenmiştir. Tüm hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre önemli derecede yüksek ADA seviyesi görülmüştür (Chen ve ark., 2015). ADA'nın SCID hastalarında olduğu gibi işlev eksikliklerinde, deoksiadenozin zararlı nükleosit olarak tanımlanmaktadır ve bu hastalarda fazla miktarlarda atılır. Bir fare peritoneal makrofaj çalışmasında, makrofaj ilişkili pürin atılımı araştırılmıştır. Tek çekirdekli fagositik sistem makrofajlar ADA eksikliği olan hastalarda adenosin ve deoksiadenozin için kaynak oluşturduğu öne sürülmüştür (Chan, 1979).

Öte yandan, ADA aktivitesi ve konsantrasyon miktarları açısından herhangi bir korelasyon görülmedi. Bu durumda ADA enziminin yapısal bir değişiklik geçirmiş olduğu düşünülebilir. ADA aktivasyonunu arttıran bazı proteinler ve koenzimler normalden fazla olabilir. Bu durum da ADA, substratları daha hızlı ve verimli işlemesi gerçekleşebilir. Ayrıca post-translasyonel modifikasyonlar da göz önüne alınabilir. Fosforilasyon gibi modifikasyonlar, ADA'nın aktivitesini artırabilir ve enzimin substratlara daha etkin bir şekilde bağlanmasını sağlayabilir. Ek olarak, konsantrasyon miktarlarındaki azalma, ADA üzerinde farklı düzenleyici mekanizmalar ile gerçekleşiyor olabilir. ADA'nın, CD26 [dipeptidyl peptidaz IV, (DPP-IV)] olarak bilinen yüzey molekülü ile etkileşimi sonucunda, ADA substratlarına daha iyi erişebilir ve enzim aktivitesini artırabilir. Öte yandan, ADA'nın lenfosit ve ADA2'nin monosit/makrofaj kökeni ele alındığında, ADA konsantrasyonu azalıyor iken aktivitenin artıyor oluşu, COVID-19 vakalarında görülen lenfopeni ve monosit

sayılarında önemli azalmalar sonucunda mevcut enzimin Ado-dAdo dönüştürmek için daha fazla çalışıyor olabilir. Yine de konsantrasyon miktarı açısındaan daha fazla ve ek çalışmaya ihtiyaç vardır.

SLE, MAS, RA, Crohn hastalığı ve kronik hepatitli hastalarda yapılan çalışmalarda ADA2 seviyelerinin daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bu hastalarda ADA2 eksikliğinin, artmış pro-enflamatuvar sitokinlerle ve M1 ile ilişkilendirilmiştir (Zoccolillo ve ark., 2021). Tüberkülozlu hastalarda ADA2 ve pro-enflamatuvar sitokin olan IFN-ɣ düzeyleri yüksek bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada IFN-ɣ ve ADA2 arasındaki ilişki kültür deneylerinde incelenmiştir. IFN-ɣ'nın ADA2 düzeyini azaltabildiği ve makrofajların salgıladığı ADA2'nin tADA'nın tek enzimi olduğu gözlemlenmiştir. Hücre içerikleri analiz edildiğinde tADA'nın IFN-ɣ'dan oldukça az etkilendiği belirtilmiştir (Zavialov ve ark., 2010). Başka bir çalışmada ise; COVID-19 hastalık şiddetine göre ADA aktivite karşılaştırması yapılmıştır. Bu çalışmada, ADA aktivitesi ağır COVID-19 vakalarında hafif COVID-19 vakalarına ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Ağırlaşan hastalık sürecinde, akciğerde ölmekte olan hücrelerden ADA salınımının ilişkisi olduğu ve ADA'nın bu tabloya eşlik ettiği belirtilmektedir. Ayrıca bu hastalarda ADA seviyelerinin ölçümünün teşhis sürecindeki önemi de bildirilmektedir (Al Talib, 2022). Biz de çalışmamızda benzer şekilde tADA aktivitesini, ADA1 ve ADA2 izoenzim aktivitelerini hastalık şiddetine göre artmış gözlemledik. ADA'nın lenfoid dokularda yoğun şekilde bulunması sebebiyle, enzim aktivasyonun yoğun enflamatuvar şartlarda artıyor olduğu sonucuna ulaşılabilir. Kültür süpernatanlarımızın ADA aktivitesi incelendiğinde, COVID-19 grubunda ADA2'nin bariz şekilde tüm gruplardan (M1-K, M2-K, Unstimüle) daha yüksek olduğu gözlendi. İlginç şekilde ADA1'de ise kontrol gruplarında daha yüksek bir aktivite söz konusuydu. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen verilere göre, COVID-19 grubunda toplam ADA aktivitesinin, %79'unu ADA2'nin oluşturduğu gözlendi. Bu sonuç hem kritik (%72) hem de ağır vakalarda (%68) ki şartlara oldukça benzer olduğu izlendi. Hem *in vitro* oluşturulan COVID-19 ortamı, hem de COVID-19'un kritik ve ağır vakalarından elde edilen bu sonuçlara göre, ADA2'nin COVID-19'da hastalığın seyrine doğrudan müdahil olduğu bulgusuna ulaşılabilir.

Ağır COVID-19 vakalarında akciğerlerde ciddi enflamasyon sonucu ARDS

gelişme riski vardır. ARDS durumunda, enflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı, akciğer hasarını ve enflamasyonu artırabilir. Bu da ARDS'nin şiddetini tetikleyebilir. Yapılan çalışmalar ARDS patogenezinde makrofaj polarizasyonunun önemine işaret etmektedir (Chen ve ark., 2020). ARDS'li vakalarda, özellikle akciğerlerde makrofajlar oldukça heterojeniktir, M2 tipinde makrofajlar M1'e dönüşebilir, süreç geliştikçe M1 makrofajları tekrar M2 makrofajlarına dönüşebilir (Huang, Xiu, Zhang, & Zhang, 2018). Sitokin fırtınası veya hipersitokinemi, genel olarak immün sistemin kontrolsüz yanıtlarını ifade etmektedir. Sitokin fırtınası sırasında, normale göre fazla eksprese edilmiş sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve immün sistem hücreleri enflamasyon bölgesine girer. COVID-19'da, TNF-α ve IL-6 sitokin fırtınasında ana sitokinler olarak tanımlanır (Kovalchuk ve ark., 2021) Hızlı müdahale edilemediğinde organ yetmezliğine ve hatta ölümle sonuçlanabilen ARDS gelişimine neden olabilmektedir (Ragab, Eldin, Taeimah, Khattab, & Salem, 2020). Ağır COVID-19 vakalarında enflamasyonun şiddetli olduğu durumlar MAS'a veya MAS'la ilişkili ya da ilişkisiz sitokin fırtınası adı verilen ciddi durumlara yol açabilmektedir (Gürsoy ve ark., 2021).

ARDS genel olarak IL-6, TNF-α ve IL-1 yüksekliği ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca COVID-19 vakalarında CCL2, IL-8, IL-17, IL-6, IL-1β, IL-2 seviyelerinde de artış olduğu bildirilmiştir (McGonagle ve ark., 2020). Çin merkezli çalışmalarda iyileşmiş ve kaybedilmiş COVID-19 vakaları arasında veri analiz çalışması yapılmıştır. Bu çalışmaya göre; ölüm vakalarında IL-6 seviyelerinde önemli derecede artış görülmüştür (Ruan ve ark., 2020). Farklı bir analiz çalışmasında ise ağır vakalarda daha hafif vakalara göre IL-6, IL-10 ve TNF- α seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2020). Bir çalışmada yoğun bakım desteğine ihtiyaç duyacak düzeydeki COVID-19 vakalarında GM-CSF, IL-7, IL-2, TNF-α, IL-6'nın hastalığın kötüleşmesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada; ARDS'li COVID-19 ve COVID-19 olmayan ARDS'li hastaların plazmalarında bazı sitokin ölçümleri yapılmıştır. Bu çalışmaya göre; ARDS'li COVID-19 grubu COVID-19 olmayan ARDS grubuna göre CCL5, CXCL10, CXCL2, IL-10 ve GM-CSF'de artış gözlemlenmiştir (Blot ve ark., 2020). Farklı bir çalışmada ise IL-6 ve CXCL-10'un önemi vurgulanırken, COVID-19 hastalık şiddetinde hastalığın devamı IL-6, CXCL10

ve makrofajların birliğiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Coperchini, Chiovate, & Rotondi, 2021).

İmmün sistemde enfeksiyonlara karşı önemli bir rol alan nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından üretilir. Nitrik oksit (NO), L-arginin isimli aminoasitten, üç farklı nitrik oksit sentaz enzimi ile üretilir. Endotel üzerindeki endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronlardaki nitrik oksit sentezi nöronal nitrik oksit sentaza (nNOS) göre iNOS daha fazla NO üretebilir. Bu durum da enfllamasyonda, hücresel iletişimde önemli bir rol oynar. Napoli de yapılan bir çalışmada da IL-10, IL-6 ve iNOS seviyelerinde hastalık şiddetiyle artış bildirilmiştir (Gelzo ve ark., 2022). SARS-CoV-2 virüsü vücuda girdiğinde immün sistem uyarılır ve hücrelerden ROS üretimi de gerçekleşebilir. Enflamasyon, doku hasarları, oksidatif stres gibi durumlarda ROS üretiminde artış gözlenebilir. COVID-19 enfeksiyonunda virüsün neden olduğu hücresel hasar oluşur ve hücrelerin elektron akışını etkileyebilir. Bu durumda ROS üretimi artabilmektedir. Çalışmalar COVID-19 sürecinde ROS'un immün yanıttaki önemli rollerine ilişkin çalışmalar mevcuttur (Camp, Bai, Gonullu, Nayak, & Abu-Soud, 2021; Lymperaki ve ark., 2022). İmmün sistemde hücreler arası iletişimde önemli sinyal moleküllerinden olan pulmoner aktivasyon düzenleyen kemokin [Pulmonary and activation-regulated chemokine (kemokin ligandı, PARC, CCL18)] bazı akciğer hastalıklarında kötü progronoz süreci ile ilişkilendirilmiştir (Zong ve ark., 2021). Tümüs ve aktivasyon düzenleyici kemokin [thymus- and activation-regulated chemokine (kemokin ligandı, TARC, CCL17)] ise alerjik astım, dermatit gibi hastalıklarda araştırılmış ve atopik dermatitli hastalarda serum TARC konsantrasyonunda artış bildirilmiştir (Machura ve ark., 2011). Alerjik ve enflamatuvar durumlarda artabilen CCL24; alerjik astım, atopik dermatit ve eozinofilik esofajit gibi hastalıklarda incelenmiş ve bu hastalarda CCL24 düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Ahmadi ve ark., 2016). Aktivasyonuyla arjinin tüketimine yol açan arjinaz, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklardaki aktivite artışı araştırma konusu olmuştur (Ljubisavljevic ve ark., 2012; Yang, & Ming, 2006).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunda monosit/makrofaj sayılarında değişiklik hastalığın şiddetiyle ilişkilendirilir (Meidaninikjeh ve ark., 2021). Ancak hangi tip ve özellikte makrofajlar, hastalığın şiddetinde etkili olur? COVID-19 vakalarında genel olarak hangi tip makrofajların baskın olduğuna dair bazı spekülasyonlar yapılsa da

yeterli kanıt sunulamamıştır. Bazı çalışmalarda M1 ile ilişkilendirilen sitokin ve kemokinlerin artışına bağlı olarak M1 fenotipindeki makrofajların hastalığın prognozunda rol alabileceği bildirilirken (Buonaguro, Puzanov, & Ascierto, 2020; Liao ve ark., 2020), sitokin fırtınasında sıklıkla gözlenen pulmoner fibrozun M2 makrofajlarla ilişkili olabileceğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Gracia-Hernandez, Sotomayor, & Villagra, 2020). Ancak makrofajların alt tiplerine dair literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bir çalışmada, akciğer biyopsilerinde M1 makrofajların, monositlerin ve nötrofillerin akciğerlere yoğun şekilde infiltre olduğu gösterilmiştir (Desterke, Turhan, Bennaceur-Griscelli, & Griscelli, 2020). Öte yandan, makrofajların COVID-19'da plastisitesine vurgu yapan bir başka çalışmada, yoğun makrofaj infiltrasyonunun M2'e yönelimde etkili olabileceğine dair bazı kanıtlar sunulmuştur (Wang ve ark., 2020). Bir diğer çalışmada ise, COVID-19 hastalarında periferal kan kökenli monositlerin ekspresyon analizleri yapılmıştır (Zhang ve ark., 2021). Bu monositlerin hem M1 hem de M2 makrofajları ile karakterize edilen sitokinleri eksprese edebildiği gösterilmiştir. ADA enzim aktivitesinde bulduğumuz bulgular, makrofajların COVID-19'da hastalığın şiddetine önemli ölçüde dahil olabileceğine dair güçlü bir perspektif sunmuştur. Biz bu çalışmada, COVID-19 'un farklı şiddetlerinde ve *in vitro* kültür ortamında M1 ve M2 makrofajlarıyla ilişkilendirilen pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar özellikteki sitokin ve kemokinleri inceledik. Bunun yanında COVID-19 mikroortamında, sağlıklı monositlerin spontane olarak hangi makrofaj tipine polarize olabileceğine dair çalışmalar yürüttük.

Çalışmamızda M1 ile ilişkilendirelebilecek pro-enflamatuvar karakterdeki, IL-6, TNF-α, IL-12, IFN-ɣ, GM-CSF, ROS, iNOS, sitokin ve ajanlarda kritik ve ağır vakalarda anlamlı artışlar gözlemledik. İlginç şekilde, M2 ile ilişkilendirilebilecek, Arjinaz, IL-4, IL-10 ve M-CSF'de kritik ve ağır vakalarda daha yüksek seviyelerde gözlendi. Hücre kültürü deneylerimizde ise COVID-19 grubu incelemesinde, karşılaştırdığımızda, M1-ilişkili proenflamatuvar sitokin, kemokin ve diğer moleküllerin genellikle M1-kontrol grubuyla benzer profilde olduğunu gözlemledik. Öte yandan, M2-ilişkili IL-4, IL-10, TARC, PARC ve CCL24 M2-kontrolde COVID-19 grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek olmasına rağmen, M1-kontrole göre daha yüksek bulunmuştur. Öte yandan, COVID-19 grubunda IL-6 diğer gruplara göre

anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kümülatif bir bakış açısıyla bakıldığı zaman, *in vitro* COVID-19 grubu, hem pro-enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar sitokin, kemokin ve moleküllerde M1 ve M2 kontrol arasında kendine yer bulmuştur. Bu durum, M1 ve M2'nin her ikisinin de COVID-19'da hastalığın şiddetine katkıda bulunabileceğine dair önemli bir kanıt sunmaktadır.

Bu çalışmada ve diğer bazı çalışmalarda ADA aktivitesinin COVID-19'da artışı bildirilmiştir (Al Talib, 2022). COVID-19'da ADA'nın makrofaj polarizyonunda rolünün olup olmadığı üzerine herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu doğrultuda yapılan, ADA izoenzimleri ile M1 ve M2 ilişkili sitokin, kemokin ve diğer moleküllerin korelasyon analizlerinde ilginç bulgulara ulaşılmıştır. Ağır ve kritik vakalarda, *in vitro* COVID-19 grubuna benzer fakat aynı olmayan şekilde sitokin ve kemokin korelasyonları gözlenmiştir. M1-ilişkili sitokin ve kemokinler, ADA2 aktivasyonuyla ters korelasyon içinde gözlenmiştir. Yalnızca IL-6 ve TNF-α, ADA2 ile pozitif korelasyon içerisinde gözlenmiştir. Kritik vakalarda da IL-6 ve TNF-α, ADA2 ile pozitif bir korelasyon göstermesine rağmen aynı zamanda ADA1 ile de göstermektedir. Öte yandan ADA1 ve ADA2 *in vitro* olarak ters korelasyon içerisindeyken, ağır ve kritik vakalarda pozitif korelasyon gözlenmektedir. Bu durum, kritik ve ağır vakalarda, ADA1 aktivasyonunun da hastalık şiddetinden etkilendiğini göstermektedir. Öte yandan, ADA2 aktivasyonun IL-6 ve TNF-α istisnası dışında diğer M1-ilişkili proenflamatuvar sitokin ve kemokinlerle ters korelasyon içerisinde olması ADA2'nin M2 yönlendirmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Destekler şekilde, M2-ilişkili sitokin ve kemokinler ile korelasyonlar incelendiğinde, ADA2 hem *in vitro* COVID-19 grubunda hemde kritik COVID-19 vakalarında M2-ilişkili sitokin ve kemokinlerle pozitif korelasyon içerisinde bulundu. Farklı olarak, ADA1 kritik vakalarda neredeyse bütün M2-ilişkili sitokin ve kemokinlerle ters korelasyon içerisindeydi. Ağır vakalarda da M2 açısından benzerlik gözlenmesine rağmen, arjinaz ve CCL24, kritik ve *in vitro* COVID-19 grubundan farklı olarak, ADA2 ile ters korelasyon içerisindeydi. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlara göre makrofajlarla ADA2 doğrudan ilişkilendirilebilirken, ADA1'in M1 ve M2 polarizasyonuna katkısının düşük olduğu bulgusuna ulaşılabilir. Farklı şekilde, *in vitro* COVID-19 grubunda da ADA1, M2-ilişkili ve sitokinlerle pozitif korelasyon içerisinde bulundu. Bununa birlikte, arjinaz ve CCL24 ağır vakalarda artmasına

rağmen, ADA2 ile ters ve ADA1 ile pozitif korelasyon içerisindeydi. Bu durum, *in vitro* COVID-19 ve ağır COVID-19 vakalarında, M1 ve M2 makrofajlarının heterojenik ve plastisitesi yüksek bir biçimde bulunduğunu gösterebilir. Bu bulgu, AHÖ analizlerimiz ile oldukça tutarlı görünmektedir. Hücre kültürü çalışmalarının sonunda yaptığımız AHÖ incelemesine göre, makrofaj popülasyonu içerisindeki $CD80^+$ $CD86^+$ M1- benzeri makrofajlar, COVID-19 grubunda, M1 kontrolden anlamlı derecede daha düşük, M2-kontrolden ise anlamlı derecede yüksek bulundu. $CD206^+$ $CD200R^+$ M2-benzeri makrofajlar incelendiğinde ise, M2-kontrolle benzer bir profil gözlendi. AHÖ'deki en ilginç bulgu ise, $CD206^+$ $CD86^+$ makrofajları incelendiğinde gözlendi, unstimüle, M1-kontrol ve M2-kontrol grubunda istatiksel açıdan herhangi bir anlam bulunmazken, COVID-19 grubunda bu hücreler anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu durum, *in vitro* COVID-19'da M1 ve M2 heterojenik bir popülasyon olduğuna dair ikinci bir kanıt sunmaktadır. Yapılan korelasyon çalışmalarında, ağır ve kritik COVID-19 gruplarıyla oldukça benzer bir profil gösteren *in vitro* COVID-19 grubunda gözlenen heterojenik fenotip makrofajların, diğer bulgularla birlikte göz önüne alındığında ağır ve kritik vakalarda da gözlenmesi yüksek bir olasılık olarak görünmektedir. Özellikle ADA2'nin, COVID-19'da hastalık ilişkisi ve *in vitro* incelemelerde gözlemlediğimiz anlamlı artışı, makrofaj ilişkili sitokin ve kemokinlerle anlamlı korelasyonları ve AHÖ incelemesi göz önünde bulundurulduğunda, makrofaj polarizasyonuna doğrudan dahil olduğu ve hastalık prognozuyla muhtemel bir ilişkisi olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Laboratuvar bulguları açısından COVID-19'da hastalık şiddetinin artışı CRP ve ferritin değerlerinin anormal artışı ve D-Dimer seviyelerinde yükseklik, lenfosit seviyelerinde değişiklikler ile ilişkilendirilebilmektedir (McGonagle ve ark., 2020; Singhal, 2020). Pıhtılaşma faktörleri, karaciğer fonksiyon testleri gibi laboratuvar bulgularında görülen farklılıklar MAS ilişkili görülse de bu durumun altta yatan farklı sebepleri de olabilmektedir (McGonagle ve ark., 2020). Eski koronavirüs süreçlerinde yapılan çalışmalarda; kan monosit ve nötrofil sayılarında artış ve ayrıca IFN-ɣ yanıtlarında azalma bildirilmiştir (Falcone ve ark., 2020). Mutlak nötrofilin lenfosit sayısına bölünmesi ile bulunan NLR miktarı ağır COVID-19'da daha yüksek orandadır. Yüksek NLR miktarı bazı durumlar için ciddi bir risk faktörü olabilmektedir (Ragab ve ark., 2020). Bizde çalışmamızda monosit, lenfosit ve trombosit miktarları

hastalık seyrinde azalırken, ferritin, prokalsitonin, CRP ve D-Dimer miktarlarının hastalığın ağırlaşması ile arttığını görmekteyiz. AST ve ALT karaciğer enzim değerlerinde en yüksek grubu ağır vakalar oluştururken, LDH için kritik hastalarda yüksek anlam kaydedilmiştir.

Sonuç olarak, ADA1 ve ADA2 enzim aktivitesinin, COVID-19'da hastalık şiddetiyle arttığı gözlenmiştir. M1 ve M2 ilişkili sitokin, kemokin ve diğer moleküller analiz edildiğinde ağır ve kritik vakalarda neredeyse tamamı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bunun yanında, ağır ve kritik vakalarda, M1 ve M2 ilişkili sitokin ve kemokinler ADA2 ile pozitif korelasyon içerisinde bulunmuştur. Bunu destekler nitelikte, *in vitro* COVID-19 grubunda M1 ve M2 ilişkili sitokin ve kemokinler, ADA2 ile korelasyon içerisinde bulunmuştur. Ağır ve kritik COVID-19 vakaları ve *in vitro* COVID-19 grubunun oldukça benzer bir M1/M2 imzasına sahip olduğu gözlenmiştir. AHÖ değerlendirmelerinde, *in vitro* COVID-19 grubu, M1-benzeri makrofajlarda ($CD80^+$ $CD86^+$) M1 kontrolden anlamlı derecede düşüktür, M2-benzeri makrofajlarda (CD206+ CD200R+) ise M2-kontrol grubundan istatiksel olarak farksızdır. İlginç şekilde, M1-M2 miks makrofajlar *in vitro* COVID-19 grubu ($CD86^+$ $CD206^+$) hem M1-kontrol hem de M2-kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Buna göre, tüm analizlerimiz ele alındığında, COVID-19 ağır vakalarında makrofajlarda M1'den M2'e yönelik bir polarizasyonun eşlik ettiği, M1 ve M2'den farklı bir fenotipte karışık bir popülasyon (M1-M2) olduğuna dair bulgular elde edildi. Sağlıklı, presemptomatik ve hafif COVID-19 vakaları da düşünüldüğünde, ağır COVID-19 vakalarının iyi prognoza dönmesi ADA2 aktivitesinin düşmesi ve M1-M2 makrofaj miks fenotipinin M1'e yönelmesi ile, kötü prognoza dönmesinin ise ADA2 aktivitesinin artış ve M2 fenotipine yönelmesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abdülmecit, U. (2020).SARS-COV2: Genom Yapısı ve Yaşam Döngüsü. *Yüksek İhtisas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, *1*, 8-11.Erişim Adresi: https://dergi.yuksekihtisasuniversitesi.edu.tr/dosya1/JYIU_C1S1_8-11.pdf

Agostini, M. L., Andres, E. L., Sims, A. C., Graham, R. L., Sheahan, T. P., Lu, X., ... & Denison, M. R. (2018). Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease. *American Society for Microbiology*, 9(2), e00221-18. DOI: https://doi.org/10.1128/mbio.00221-18

Ahmadi, Z., Hassanshahi, G., Khorramdelazad, H., Zainodini, N., & Koochakzadeh, L. (2016). An overlook to the characteristics and roles played by eotaxin network in the pathophysiology of food allergies: allergic asthma and atopic dermatitis. *Inflammation*, 39, 1253-1267. DOI: https://doi.org/10.1007/s10753-016-0303-9

Aimrane, A., Laaradia, M. A., Sereno, D., Perrin, P., Draoui, A., Bougadir, B., ... & Kahime, K. (2022). Insight intoCOVID-19's epidemiology, pathology, and treatment. *Heliyon*, e08799. DOI: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08799

Al Talib, H. M. (2022). The Role of Adenosine Deaminase Levels in The Diagnosis of COVID-19 Infection. *HIV Nursing*, *22*(2), 3217-3220.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., & Medzhitov, R. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-κB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732. DOI: https://doi.org/10.1038/35099560

Al-Kuraishy, H. M., & Al-Gareeb, A. I. (2020). From SARS-CoV to nCoV-2019: Ruction and argument. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 15(COVID-19). DOI: https://doi.org/10.5812/archcid.102624

Almeida, J. D., & Tyrrell, D. A. (1967). The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *Journal of General Virology*, *1*(2), 175-178. DOI: https://doi.org/10.1099/0022-1317-1-2-175

Antonioli, L., Colucci, R., La Motta, C., Tuccori, M., Awwad, O., Da Settimo, F., ... & Fornai, M. (2012). Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Current Drug Targets*, 13(6), 842-862. DOI: https://doi.org/10.2174/138945012800564095

Aşker, S. Dünya'da ve Türkiye'de COVID-19'un Tedavisi. COVID-19 Güncel Yaklaşım (1.baskı) içinde (s.1-8). Ankara: Akademisyen Kitabevi.

Atay, Ö. (2020). Sars-Cov-2 ImmunopathogenesIs And PossIble AntI-Inflammatory Treatment OptIons. *Selcuk Medical Journal*, 36(3), 264-273. DOI: https://doi.org/10.30733/std.2020.01469

Bayrakal, V. & Baskın, H., COVID-19 ve doğal immün sistem cevabı. İmmünoloji ve COVID-19 (1.baskı) içinde (s.1-8). Ankara: Türkiye Klinikleri.

Beyerstedt, S., Casaro, E. B., & Rangel, É. B. (2021). COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40, 905-919. DOI: https://doi.org/10.1007/s10096-020-04138-6

Blot, M., Jacquier, M., Aho Glele, L. S., Beltramo, G., Nguyen, M., Bonniaud, P., ...

& Charles, P. E. (2020). CXCL10 could drive longer duration of mechanical ventilation during COVID-19 ARDS. *Critical Care*, 24(1), 1-15. DOI: https://doi.org/10.1186/s13054-021-03559-9

Bogoch, I. I., Watts, A., Thomas-Bachli, A., Huber, C., Kraemer, M. U., & Khan, K. (2020). Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *Journal of travel medicine*, 27(2), taaa008. DOI: https://doi.org/10.1093/jtm/taaa008

Briese, T., Mishra, N., Jain, K., Zalmout, I. S., Jabado, O. J., Karesh, W. B., ... & Lipkin, W. I. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus quasispecies that include homologues of human isolates revealed through whole-genome analysis and virus cultured from dromedary camels in Saudi Arabia. *American Society for Microbiology*, 5(3), e01146-14. DOI: https://doi.org/10.1128/mbio.01146-14

Buonaguro, F. M., Puzanov, I., & Ascierto, P. A. (2020). Anti-IL6R role in treatment of COVID-19-related ARDS. *Journal of Translational Medicine*, 18, 1-2. DOI: https://doi.org/10.1186/s12967-020-02333-9

Cagan, E., Tezcan, G., Simsek, A., Kizmaz, M. A., Dombaz, F., Asan, A., ... & Budak, F. (2022). The age-dependent role of th22, tc22, and tc17 cells in the severity of pneumonia in covid-19 immunopathogenesis. *Viral immunology*, *35*(4), 318-327. DOI: https://doi.org/10.1089/vim.2021.0132

Camp, O. G., Bai, D., Gonullu, D. C., Nayak, N., & Abu-Soud, H. M. (2021). Melatonin interferes with COVID-19 at several distinct ROS-related steps. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 223, 111546. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111546

Caorsi, R., Penco, F., Schena, F., & Gattorno, M. (2016). Monogenic polyarteritis: the lesson of ADA2 deficiency. *Pediatric Rheumatology*, 14(1), 1-16.DOI: https://doi.org/10.1186/s12969-016-0111-7

Cascella, M., Rajnik, M., Aleem, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2022). Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). *Statpearls*.

Chan, T. S. (1979). Purine excretion by mouse peritoneal macrophages lacking adenosine deaminase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(2), 925-929. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.925

Chen, G., Wu, D. I., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., ... & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2620-2629. DOI: https://doi.org/10.1172/JCI137244

Chen, W., Zhang, S., Zhang, W., Yang, X., Xu, J., Qiu, H., ... & Li, J. (2015). Elevated serum adenosine deaminase levels in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37(4), 544-550. DOI: https://doi.org/10.1111/ijlh.12334

Chen, X., Tang, J., Shuai, W., Meng, J., Feng, J., & Han, Z. (2020). Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Inflammation Research*, *69*, 883-895. DOI: https://doi.org/10.1007/s00011-020-01378-2

Chowdhury, S. D., & Oommen, A. M. (2020). Epidemiology of COVID-19. *Journal of Digestive Endoscopy*, 11(01), 03-07. DOI: https://doi.org/10.1055/s-0040-1712187

Churov, A., & Zhulai, G. (2021). Targeting adenosine and regulatory T cells in cancer

immunotherapy. *Human Immunology*, 82(4), 270-278. DOI: https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.12.005

Contractor, R. A., Bhavsar, Y. D., Joshi, A. P., Pujara, N. N., Shukla, D. M., Contractor, R., ... & Shukla, D. (2022). A Rare Genetic Mutation Leading to a Deficiency of Adenosine Deaminase 2 Enzyme in a Long-Standing Case of Cutaneous Polyarteritis Nodosa: A Case Report. *Cureus*, 14(10). DOI: https://doi.org/10.7759/cureus.30295

Conway, E. J., & Cooke, R. (1939). The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. *Biochemical Journal*, 33(4), 479. DOI: https://doi.org/10.1042/bj0330479

Coperchini, F., Chiovato, L., & Rotondi, M. (2021). Interleukin-6, CXCL10 and infiltrating macrophages in COVID-19-related cytokine storm: not one for all but all for one!. *Frontiers in immunology*, 12, 668507. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.668507

Cortés, A., Gracia, E., Moreno, E., Mallol, J., Lluís, C., Canela, E. I., & Casadó, V. (2015). Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. *Medicinal Research Reviews*, 35(1), 85-125. DOI: https://doi.org/10.1002/med.21324

Cömert, S. Ş., & Kıral, N. (2020). COVID-19 Pnömonisinin Radyolojik Bulguları. *Southern Clinics of Istanbul Eurasia*. 2020(31), 16-22. DOI: https://doi.org/10.14744/scie.2020.96158

Çakır, T., Gürsoy, C., & Topçuoğlu, N. (2020). Yoğun Bakımda COVID-19 Seyrinde Makrofaj Aktivasyon Sendromu Gelişen Olgu: Olgu Sunumu. *Turkish Journal of Intensive Care*. 2020(18), 57-60, DOI:https://doi.org/10.4274/tybd.galenos.020.80299

De Biasi, S., Meschiari, M., Gibellini, L. et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nature Communications* 11, 3434 (2020). DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4

de Frutos, L. L., Serrano-Gonzalo, I., Menendez-Jandula, B., Franco-Garcia, E., Lahoz, C., Latre, P., ... & Giraldo, P. (2021). Assessment of Macrophage Inflammatory Biomarkers and Neutrophil Extracellular Traps Associated Proteins in COVID-19 Patients. *Blood*, 138, 4193. DOI: https://doi.org/10.1182/blood-2021-148166

Demeli, M., Bayrak, S., & Pehlivanoğlu, B. (2022). Adenozinin Uyku-Uyanıklık Döngüsündeki Etkileri. *Journal of Turkish Sleep Medicine*, 9, 190-198. DOI: https://doi.org/10.4274/jtsm.galenos.2022.36349

Demirci, M., Unlü, O., Yigin, A., & Yildiz Zeyrek, F. (2020). Pathogenesis of SARS-CoV-2 and Immune Response in COVID-19. *Turk Mikrobiyoloji Cemiyet Dergisi*, 50(4), 183-91. DOI: https://doi.org/10.5222/TMCD.2020.183

Desterke, C., Turhan, A. G., Bennaceur-Griscelli, A., & Griscelli, F. (2020). PPARγ cistrome repression during activation of lung monocyte-macrophages in severe COVID-19. *Iscience*, 23(10), 101611. DOI: https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101611

Dikmen, A. U., Mediha, K. I. N. A., Özkan, S., & İlhan, M. N. (2020). COVID-19 epidemiyolojisi: Pandemiden ne öğrendik. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 4, 29-36. DOI: https://doi.org/10.34084/bshr.715153

Dong, R. P., Kameoka, J., Hegen, M., Tanaka, T., Xu, Y., Schlossman, S. F., & Morimoto, C. (1996). Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 156(4), 1349-1355. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.156.4.1349

Falcone, C., Caracciolo, M., Correale, P., Macheda, S., Vadalà, E. G., La Scala, S., ... & De Lorenzo, A. (2020). Can adenosine fight COVID-19 acute respiratory distress syndrome? *Journal of Clinical Medicine*, *9*(9), 3045. DOI: https://doi.org/10.3390/jcm9093045

Fernández, E., Rodrigo, L., Riestra, S., García, S., Gutiérrez, F., & Ocio, G. (2000). Adenosine deaminase isoenzymes and neopterin in liver cirrhosis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 30(2), 181-186. DOI: https://doi.org/1097/00004836-200003000-00011

Ferrua, F., Brigida, I., & Aiuti, A. (2010). Update on gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(6), 551-556. DOI: https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32833fea85

Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*, 180(6), 1044-1066. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041

Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). Molecular evolution of human coronavirus genomes. *Trends in Microbiology*, 25(1), 35-48. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001

Fox, I. H., & Kelley, W. N. (1978). The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Annual Review of Biochemistry*, 47(1), 655-686. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.003255

Franco-Martínez, L., Tecles, F., Torres-Cantero, A., Bernal, E., San Lázaro, I., Alcaraz, M. J., ... & Cerón, J. J. (2021). Analytical validation of an automated assay for the measurement of adenosine deaminase (ADA) and its isoenzymes in saliva and a pilot evaluation of their changes in patients with SARS-CoV-2 infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *59*(9), 1592-1599. DOI: https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0324

Gakis, C. (1996). Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *European Respiratory Journal*, 9(4), 632-633. DOI: https://doi.org/10.1183/09031936.96.09040632

Galván-Peña, S., Leon, J., Chowdhary, K., Michelson, D. A., Vijaykumar, B., Yang, L., ... & Benoist, C. (2021). Profound Treg perturbations correlate with COVID-19 severity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(37), e2111315118. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2111315118

Gao, Z. W., Li, R. C., Wang, H. P., Ma, H. H., Zhang, H. Z., Lin, F., & Dong, K. (2020). Diagnostic value of serum adenosine deaminase and its isoenzymes for autoimmune liver disease. *Hepatitis Monthly*, 20(1). 1-6 DOI: https://doi.org/10.5812/hepatmon.98811

Gao, Z. W., Wang, X., Lin, F., & Dong, K. (2022). Total adenosine deaminase highly correlated with adenosine deaminase 2 activity in serum. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 81(2), e30-e30. DOI: http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217007

Gao, Z. W., Yang, L., Liu, C., Wang, X., Guo, W. T., Zhang, H. Z., & Dong, K. (2022).

Distinct Roles of Adenosine Deaminase Isoenzymes ADA1 and ADA2: A Pan-Cancer Analysis. *Frontiers in Immunology*, 13 (903461), 1-12. DOI: http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.903461

Garcia-Zamalloa, A., & Taboada-Gomez, J. (2012). Diagnostic accuracy of adenosine deaminase and lymphocyte proportion in pleural fluid for tuberculous pleurisy in different prevalence scenarios. *PloS One*, 7(6), e38729. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038729

Gary, E., O'Connor, M., Chakhtoura, M., Tardif, V., Kumova, O. K., Malherbe, D. C., ... & Haddad, E. K. (2020). Adenosine deaminase-1 enhances germinal center formation and functional antibody responses to HIV-1 Envelope DNA and protein vaccines. *Vaccine*, *38*(22), 3821-3831. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.03.047

Ge, H., Wang, X., Yuan, X., Xiao, G., Wang, C., Deng, T., ... & Xiao, X. (2020). The epidemiology and clinical information about COVID-19. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39, 1011-1019. DOI: https://doi.org/10.1007/s10096-020-03874-z

Gelzo, M., Scialò, F., Cacciapuoti, S., Pinchera, B., De Rosa, A., Cernera, G., ... & Castaldo, G. (2022). Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS): Why a Different Production in COVID-19 Patients of the Two Waves?. *Viruses*, 14(3), 534. DOI: https://doi.org/10.3390/v14030534

Ghaderi, B., Amini, S., Maroofi, F., Jalali, C., Javanmardi, M., Roshani, D., & Abdi, M. (2016). Adenosine deaminase activity in chronic lymphocytic leukemia and healthy subjects. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 9(3). DOI: https://doi.org/10.17795/ijcp-5069

Gracia-Hernandez, M., Sotomayor, E. M., & Villagra, A. (2020). Targeting macrophages as a therapeutic option in coronavirus disease 2019. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 577571. DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2020.577571

Graham, R., Donaldson, E. & Baric, R. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology,* 11, 836–848 (2013). DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro3143

Guan, J., Wei, X., Qin, S., Liu, X., Jiang, Y., Chen, Y., ... & Lin, X. (2020). Continuous tracking of COVID-19 patients' immune status. *International Immunopharmacology*, 89, 107034. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107034

Gürsoy, B., Sürmeli, C. D., Alkan, M., Satıcı, C., Altunok, E. S., Kamat, S., ... & Börü, A. (2021). Cytokine storm in severe COVID-19 pneumonia. *Journal of Medical Virology*, 93(9), 5474-5480. DOI: https://doi.org/10.1002/jmv.27068

Hatipoğlu, K., Yüksekol, İ., Özkan, M., Balkan, A., Tozkoparan, E., Bedirhan, İ., ... & Demirci, N. (2003). Tüberküloz Tanısında Serum Adenozin Deaminaz Ölçümünün Önemi. *Gülhane Tıp Dergisi (GTD*), 45(2), 165-168. Erişim Adresi: https://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_32613/GMJ-45-165-En.pdf

Hershfield, M. S. (2005). New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *European Journal of Immunology*, 35(1), 25-30. DOI: https://doi.org/10.1002/eji.200425738

Hitoglou, S., Hatzistilianou, M., Gougoustamou, D., Athanassiadou, F., Kotsis, A., &

Catriu, D. (2001). Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, 20, 411-416. DOI: https://doi.org/10.1007/s100670170005

Holshue, M. L., DeBolt, C., Lindquist, S., Lofy, K. H., Wiesman, J., Bruce, H., ... & Pillai, S. K. (2020). First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*, 382(10), 929-936. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191

Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141-154. DOI: https://doi.org/10.1038/s41579-022-00711-2

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... & Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497-506. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5

Huang, X., Xiu, H., Zhang, S., & Zhang, G. (2018). The role of macrophages in the pathogenesis of ALI/ARDS. *Mediators of Inflammation,* 2018(126493), 1-8. DOI: https://doi.org/10.1155/2018/1264913

Iwaki-Egawa, S., Yamamoto, T., & Watanabe, Y. (2006). Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. 387(3), 319-321 DOI: https://doi.org/10.1515/BC.2006.042

İnal, S. (2016). Middle east respiratory syndrome-coronavirus (mers-cov) enfeksiyonu: Ortadoğu solunum yetmezliği sendromu-koronavirüs enfeksiyonu. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 32, 37-45. DOI: https://doi.org/10.5222/otd.2016.037

İnal, A. S., Duman, Z. G., & Kurtaran, B. (2020). SARS-CoV-2 Mikrobiyoloji ve Patogenez. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 29(Özel Sayı), 11-23.

Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., & Duan, G. (2020). Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses*, 12(4), 372. DOI: https://doi.org/10.3390/v12040372

Kahn, J. S., & McIntosh, K. (2005). History and recent advances in coronavirus discovery. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24(11), S223-S227. DOI: https://doi.org/10.1097/01.inf.0000188166.17324.60

Kaljas, Y., Liu, C., Skaldin, M., Wu, C., Zhou, Q., Lu, Y., ... & Zavialov, A. V. (2017). Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 555-570. DOI: https://doi.org/10.1007/s00018-016-2357-0

Karaca, B. (2020). Erişkin yaş grubunda Covid-19 klinik bulguları. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 4, 85-90. DOI: https://doi.org/10.34084/bshr.724904

Kartal, E., Balaban, M. E., & Bayraktar, B. (2021). Küresel COVID-19 Salgınının Dünyada ve Türkiye'de Değişen Durumu ve Kümeleme Analizi. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine,* 84(1), 9-19. DOI: https://doi.org/10.26650/IUITFD.2020.0077

Kizmaz, M. A., Simsek, A., Bozkurt, T., Cagan, E., Dombaz, F., Tezcan, G., ... & Budak, F. (2023). Effector memory T cell subset CD45RA− CCR7− CD27− CD28− EM3 increases in direct proportion to the disease severity of COVID-19. *Scandinavian journal of immunology*, *97*(1), e13217. DOI:

https://doi.org/10.1111/sji.13217
Kovalchuk, A., Wang, B., Li, D., Rodriguez-Juarez, R., Ilnytskyy, S., Kovalchuk, I., & Kovalchuk, O. (2021). Fighting the storm: could novel anti-TNFα and anti-IL-6 C. sativa cultivars tame cytokine storm in COVID-19?. *Aging* (Albany NY), 13(2), 1571. DOI: https://doi.org/10.18632/aging.202500
Köklü, S., Yilmaz, F. M., Başar, Ö., Yilmaz, G., Yüksel, O., Yildrim, E., & Öztürk, Z. A. (2007). Serum adenosine deaminase levels in pancreatic diseases. *Pancreatology*, 7(5-6), 526-530. DOI: https://doi.org/10.18632/aging.202500
Krenke, R., & Korczynski, P. (2010). Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 16(4), 367-375. DOI: https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32833a7154
Kutryb-Zajac, B., Harasim, G., Jedrzejewska, A., Krol, O., Braczko, A., Jablonska, P., ... & Smolenski, R. T. (2021). Macrophage-derived adenosine deaminase 2 correlates with m2 macrophage phenotype in triple negative breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3764. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms22073764
Lagunas-Rangel, F. A. (2020). Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 1733. DOI: https://doi.org/10.1002/jmv.25819
Lee, P. Y., Schulert, G. S., Canna, S. W., Huang, Y., Sundel, J., Li, Y., ... & Nigrovic, P. A. (2020). Adenosine deaminase 2 as a biomarker of macrophage activation syndrome in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(2), 225-231. DOI: https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216030
Li, M., Guo, W., Dong, Y., Wang, X., Dai, D., Liu, X., ... & Hu, D. (2020). Elevated exhaustion levels of NK and $CD8^+$ T cells as indicators for progression and prognosis of COVID-19 disease. *Frontiers in immunology*, 11, 580237. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.580237
Liacouras, C. A., Furuta, G. T., Hirano, I., Atkins, D., Attwood, S. E., Bonis, P. A., ... & Aceves, S. S. (2011). Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(1), 3-20. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.040
Liao, M., Liu, Y., Yuan, J. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26, 842–844 (2020). DOI: https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9
Liu, L., Xu, L., & Lin, C. (2020). T cell response in patients with COVID-19. *Blood Science*, 2(03), 76-78. DOI: https://doi.org/10.1097/BS9.0000000000000050
Liu, Y., Yan, L. M., Wan, L., Xiang, T. X., Le, A., Liu, J. M., ... & Zhang, W. (2020). Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(6), 656-657. DOI: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30232-2
Ljubisavljevic, S., Stojanovic, I., Pavlovic, R., Sokolovic, D., Pavlovic, D., Cvetkovic, T., & Stevanovic, I. (2012). Modulation of nitric oxide synthase by arginase and methylated arginines during the acute phase of experimental multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 318(1-2), 106-111. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.03.015

Lotfi, M., Hamblin, M. R., & Rezaei, N. (2020). COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clinica chimica acta*, 508, 254-266. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.044

Lu, H. (2020). Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). *Bioscience Trends*, 14(1), 69-71. DOI: https://doi.org/10.5582/bst.2020.01020

Lymperaki, E., Kazeli, K., Variti, G., Gerothanasi, M., Gkinoudis, A., Tsamesidis, I., & Vagdatli, E. (2022). Potential Role of Certain Biomarkers Such as Vitamin B12, ROS, Albumin, as Early Predictors for Prognosis of COVID-19 Outcomes. *Medicines*, 9(6), 36. DOI: https://doi.org/10.3390/medicines9060036

Machura, E., Rusek-Zychma, M., Jachimowicz, M., Wrzask, M., Mazur, B., & Kasperska-Zajac, A. (2012). Serum TARC and CTACK concentrations in children with atopic dermatitis, allergic asthma, and urticaria. *Pediatric Allergy and Immunology*, 23(3), 278-284. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01225.x

Mahallawi, W. H., Khabour, O. F., Zhang, Q., Makhdoum, H. M., & Suliman, B. A. (2018). MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokine profile. *Cytokine*, 104, 8-13. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.01.025

Malik, Y. A. (2020). Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*, 42(1), 3-11. Erişim Adresi: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32342926/

McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A., & Bridgewood, C. (2020). The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmunity reviews*, *19*(6), 102537. DOI: https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537

Meidaninikjeh, S., Sabouni, N., Marzouni, H. Z., Bengar, S., Khalili, A., & Jafari, R. (2021). Monocytes and macrophages in COVID-19: Friends and foes. *Life sciences*, *269*, 119010. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.119010

Meskini, M., Rami, M. R., Maroofi, P., Ghosh, S., Siadat, S. D., & Sheikhpour, M. (2021). An overview on the epidemiology and immunology of COVID-19. *Journal of Infection and Public Health*, *14*(10), 1284-1298. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.07.021

METİN, Z. G. (2020). COVID-19 hastalığının fizyopatolojisi ve holistik hemşirelik yaklaşımı. *Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*, 7(Özel Sayı), 15-24. DOI: https://doi.org/10.31125/hunhemsire.775658

Meyts, I., Aksentijevich, I. Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (DADA2): Updates on the Phenotype, Genetics, Pathogenesis, and Treatment. *Journal of Clinical Immunology* 38, 569–578 (2018). DOI: https://doi.org/10.1007/s10875-018-0525-8

Mishra, O. P., Gupta, B. L., Ali, Z., Nath, G., & Chandra, L. (1994). Adenosine deaminase activity in typhoid fever. *Indian pediatrics*, 31, 1379-1379. Erişim Adresi: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7896337/

Mustafa, U. Ğ. U. Z., & EŞKUT, B. (2020). Covid 19 enfeksiyon tedavisi. *Medical Research Reports*, 3(Özel Sayı), 17-31. Erişim Adresi: https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1224034

MUTLU, O., UYGUN, İ., & ERDEN, F. (2020). Koronavirüs hastalığı (COVID-19) tedavisinde kullanılan ilaçlar. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*,

6(3), 167-173. DOI: https://doi.org/10.30934/kusbed.761170
Nakamachi, Y., Koshiba, M., Nakazawa, T., Hatachi, S., Saura, R., Kurosaka, M., ... & Kumagai, S. (2003). Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, 48(3), 668-674. DOI: https://doi.org/10.1002/art.10956
Neumann, J., Prezzemolo, T., Vanderbeke, L., Roca, C. P., Gerbaux, M., Janssens, S., ... & Yserbyt, J. (2020). Increased IL-10-producing regulatory T cells are characteristic of severe cases of COVID-19. *Clinical & Translational Immunology*, 9(11), e1204. DOI: https://doi.org/10.1002/cti2.1204
Niedzwicki, J. G., Kouttab, N. M., Mayer, K. H., Carpenter, C. C., Parks Jr, R. E., Abushanab, E., & Abernethy, D. R. (1991). Plasma adenosine deaminase2: a marker for human immunodeficiency virus infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes,* 4(2), 178-182. Erişim Adresi: https://journals.lww.com/jaids/abstract/1991/02000/plasma_adenosine_deaminase2__a_marker_for_human.12.aspx
Özer, F., Özer, C., & Yavuz, H. (2020). COVID-19 ve Odyovestibüler Sistem. Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi, 28(2), 56-60. DOI: https://doi.org/10.24179/kbbbbc.2020-77087
Öztan, G., & İşsever, H. (2020). Yeni Koronavirüsün (Covid-19) Moleküler Yapısı ve Genomik Karakterizasyonu. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 3(2), 61-71. DOI: https://doi.org/10.26650/jarhs2020-726533
Pascarella, G., Strumia, A., Piliego, C., Bruno, F., Del Buono, R., Costa, F., ... & Agrò, F. E. (2020). COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *Journal of Internal Medicine*, 288(2), 192-206. DOI: https://doi.org/10.1111/joim.13091
Pirinççi, N., Geçit, I., Güneş, M., Yüksel, M. B., Kaba, M., Tanık, S., ... & Aslan, M. (2012). Serum adenosine deaminase, catalase and carbonic anhydrase activities in patients with bladder cancer. *Clinics*, *67*, 1443-1446. DOI: https://doi.org/10.6061/clinics/2012(12)15
Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., ... & Tian, D. S. (2020). Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases*, 71(15), 762-768. DOI: https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248
Ragab, D., Salah Eldin, H., Taeimah, M., Khattab, R., & Salem, R. (2020). The COVID-19 cytokine storm; what we know so far. *Frontiers in immunology*, 1446. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446
Ratech, H., Martiniuk, F., Borer, W. Z., & Rappaport, H. (1988). Differential expression of adenosine deaminase isozymes in acute leukemia. *Blood*, *72*(5), 1627-1632. DOI: https://doi.org/10.1182/blood.V72.5.1627.1627
Ren, L. L., Wang, Y. M., Wu, Z. Q., Xiang, Z. C., Guo, L., Xu, T., ... & Wang, J. W. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chinese medical journal*, 133(09), 1015-1024. DOI: https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722.
Richard, E., Arredondo-Vega, F. X., Santisteban, I., Kelly, S. J., Patel, D. D., & Hershfield, M. S. (2000). The binding site of human adenosine deaminase for CD26/Dipeptidyl peptidase IV: the Arg142Gln mutation impairs binding to cd26 but does not cause immune deficiency. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(9), 1223-1236. DOI: https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1223

Rostam, H. M., Reynolds, P. M., Alexander, M. R., Gadegaard, N., & Ghaemmaghami, A. M. (2017). Image based machine learning for identification of macrophage subsets. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-03780-z

Rothan, H. A., & Byrareddy, S. N. (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*, 109, 102433. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433

Ruan, Q., Yang, K., Wang, W. et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Medicine* 46, 846–848 (2020). DOI: https://doi.org/10.1007/s00134-020-05991-x

Rustemoglu, A., Cumurcu, B. E., Nursal, A. F., Balkan, M., Uzun, M., & Yigit, S. (2016). Adenosine Deaminase Gene G22a Polymorphism as a Risk Factor for Schizophrenia in Turkish Population/Türk Populasyonunda Sizofreni Hastaligi Için Bir Risk Faktörü Olarak Adenozin Deaminaz Geni G22a Polimorfizmi. *Dicle Tip Dergisi*, 43(2), 218. DOI: https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2016.02.0670

Saghiri, R., Ghashghai, N., Movaseghi, S. et al. Serum adenosine deaminase activity in patients with systemic lupus erythematosus: a study based on ADA1 and ADA2 isoenzymes pattern. *Rheumatology International* 32, 1633–1638 (2012). DOI: https://doi.org/10.1007/s00296-011-1836-8

Salimi-Jeda, A., Abbassi, S., Mousavizadeh, A., Esghaie, M., Bokharaei-Salim, F., Jeddi, F., ... & Abdoli, A. (2021). SARS-CoV-2: Current trends in emerging variants, pathogenesis, immune responses, potential therapeutic, and vaccine development strategies. *International Immunopharmacology*, 101, 108232. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108232

Santosh, U. P., Renukananda, G. S., & Abhilash, S. (2016). Role of adenosine deaminase in common chronic ENT infections. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(3), MC01. DOI: https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18452.7347

Sari, R. A., Taysi, S., Yilmaz, O., & Bakan, N. (2003). Correlation of serum levels of adenosine deaminase activity and its isoenzymes with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 21(1), 87-90. Erişim Adresi: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12673895/

Sauer, A. V., Brigida, I., Carriglio, N., & Aiuti, A. (2012). Autoimmune dysregulation and purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Frontiers in Immunology*, 3, 265. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00265

Schrader, W. P., Pollara, B., & Meuwissen, H. J. (1978). Characterization of the residual adenosine deaminating activity in the spleen of a patient with combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(1), 446-450. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.446

Sevim, M. E. Ş. E., & Ağaçfidan, A. (2020). Coronavirus: genel Özellikler ve güncel Yaklaşım. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 3(S1), 14-23. DOI: https://doi.org/10.26650/JARHS2020-S1-0002

Shang, J., Ye, G., Shi, K. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581, 221–224 (2020). DOI: https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y

Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., ... & Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016-1020. DOI: https://doi.org/10.1126/science.abb7015

Signa, S., Bertoni, A., Penco, F., Caorsi, R., Cafaro, A., Cangemi, G., ... & Schena, F. (2022). Adenosine deaminase 2 deficiency (DADA2): a crosstalk between innate and adaptive immunity. *Frontiers in Immunology*, 13. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.935957

Simsek, A., Kizmaz, M. A., Cagan, E., Dombaz, F., Tezcan, G., Asan, A., ... & Budak, F. (2022). Assessment of CD39 expression in regulatory T-cell subsets by disease severity in adult and juvenile COVID-19 cases. *Journal of Medical Virology*, 94(5), 2089-2101. DOI: https://doi.org/10.1002/jmv.27593

Singhal, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *The Indian Journal of Pediatrics* 87, 281–286 (2020). DOI: https://doi.org/10.1007/s12098-020-03263-6

Sriram, K., & Insel, P. A. (2021). Inflammation and thrombosis in COVID-19 pathophysiology: proteinase-activated and purinergic receptors as drivers and candidate therapeutic targets. *Physiological Reviews*, 101(2), 545-567. DOI: https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2020

Stockman, L. J., Bellamy, R., & Garner, P. (2006). SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS medicine*, 3(9), e343. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030343

Şener, A. (2020). COVİD-19 (SARS Cov-2) Tedavisi. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 4, 97-104. DOI: https://doi.org/10.34084/bshr.721426

T.C Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün yayımladığı (COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) *Erişkin Hasta Tedavisi*, 2022. Erişim Adresi: https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/43095/0/covid19rehberieriskinhastayonetimivetedavi-12042022pdf.pdf

T.C Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün yayınladığı (COVID-19 Enfeksiyonu Genel Bilgiler, Epidemiyolojisi, Tanı ve Tedavi Rehberi, Ekim 2020. Erişim Adresi: https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/39551/0/covid-19rehberigenelbilgilerepidemiyolojivetanipdf.pdf

Tang, R., Ma, C., Dong, J., Liu, X., & Liu, X. (2006). Does adenosine deaminase play a key role in coronary artery disease. *Medical Hypotheses*, 67(2), 371-374. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.01.038

Tapısız, Ö. L. & Kiykac Altinbas, S. (2020). Mikroorganizmalar mavi gezegende bizden çok önce vardı: Pandemiler tarihi . *Türk Kadın Sağlığı ve Neonatoloji Dergisi* , 2 (2) , 53-69 . Retrieved from https://dergipark.org.tr/en/pub/etlikzubeyde/issue/54965/753715

Tardif, V., Muir, R., Cubas, R. et al. Adenosine deaminase-1 delineates human follicular helper T cell function and is altered with HIV. *Nature Communications* 10, 823 (2019). DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-019-08801-1

Tsuboi, I., Sagawa, K., Shichijo, S., Yokoyama, M. M., Ou, D. W., & Wiederhold, M. D. (1995). Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 and human immunodeficiency virus type 1 infections. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 2(5), 626-630. DOI: https://doi.org/10.1128/cdli.2.5.626-630.1995

Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1965). Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *British Medical Journal*, 1(5448), 1467. DOI: https://doi.org/10.1136/bmj.1.5448.1467

Ursavaş A., & Akalın H. (Ed.). (2021). COVID-19. Bursa: Medyay Yayınları

Valadbeigi, S., Saghiri, R., Ebrahimi-Rad, M., Khatami, S., & Akhbari, H. (2019). Adenosine deaminase activity and HLA-DRB as diagnostic markers for rheumatoid arthritis. *Current Rheumatology Reviews*, 15(1), 44-49. DOI: https://doi.org/10.2174/1573397114666180406101239

Valdes, L., San Jose, E., Alvarez, D., & Valle, J. M. (1996). Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *European Respiratory Journal*, 9(4), 747-751. DOI: https://doi.org/10.1183/09031936.96.09040747

Varghese, G. M., John, R., Manesh, A., Karthik, R., & Abraham, O. C. (2020). Clinical management of COVID-19. *The Indian Journal of Medical Research*, 151(5), 401. DOI: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_957_20

Vivekanandhan, S., Soundararajan, C.C., Tripathi, M. et al. Adenosine Deaminase and 5′Nucleotidase Activities in Peripheral Blood T Cells of Multiple Sclerosis Patients. *Neurochemical Research* 30, 453–456 (2005). DOI: https://doi.org/10.1007/s11064-005-2680-6

Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058

Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of virology*, 94(7), e00127-20. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.00127-20

Wang, C., Xie, J., Zhao, L., Fei, X., Zhang, H., Tan, Y., ... & Bian, X. W. (2020). Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. *EBio Medicine*, 57, 102833. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102833

Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., ... & Peng, Z. (2020). Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *Jama*, 323(11), 1061-1069. DOI: https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585

Wang, W., Tang, J., & Wei, F. (2020). Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 441-447. DOI: https://doi.org/10.1002/jmv.25689

Wang, Y., Zhao, M., Liu, S. et al. Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death & Disease* 11, 924 (2020). DOI: https://doi.org/10.1038/s41419-020-03127-z

Watanabe, N., Gao, S., Kajigaya, S., Diamond, C., Alemu, L., Ombrello, A., & Young, N. S. (2019). Analysis of deficiency of adenosine deaminase 2 pathogenesis based on single cell RNA sequencing of monocytes. *Blood*, 134, 2317. DOI: https://doi.org/10.1002/JLB.3HI0220-119RR

Whitmore, K. V., & Gaspar, H. B. (2016). Adenosine deaminase deficiency–more than just an immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, 7, 314. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00314

WHO, Clinical management of COVID-19, 2020

Wilson, D. K., Rudolph, F. B., & Quiocho, F. A. (1991). Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science*, 252(5010), 1278-1284. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1925539

World Health Organization coronavirus disease dashboard, COVID-19 Güncelleme Raporu. (2023,21 Mayıs). Erişim Adresi: https://covid19.who.int/

Xu, Z., Geng, L., Guo, L. et al. Increased serum adenosine deaminase activity in patients with adult-onset Still's disease. *BMC Immunology* 23, 4 (2022). DOI: https://doi.org/10.1186/s12865-022-00477-5

Yang, A. P., Liu, J. P., Tao, W. Q., & Li, H. M. (2020). The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients. *International Immunopharmacology*, 84, 106504. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106504

Yang, Y., Peng, F., Wang, R., Guan, K., Jiang, T., Xu, G., ... & Chang, C. (2020). The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *Journal of Autoimmunity*, 109, 102434. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102434

Yang, Z., & Ming, X. F. (2006). Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Current Hypertension Reports*, 8(1), 54-59. DOI: https://doi.org/10.1007/s11906-006-0041-8

Ye, Z. W., Yuan, S., Yuen, K. S., Fung, S. Y., Chan, C. P., & Jin, D. Y. (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *International Journal of Biological Sciences*, 16(10), 1686. DOI: https://doi.org/10.7150/ijbs.45472

Yılmaz, Y. (2022). Yoğun bakımda yatan COVID-19 hastalarında akut böbrek yetmezliği insidansı ve COVID-19 hastalığının şiddetiyle ilişkisi. [Yayınlanmamış Tıpta uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Şehir Hastanesi, Anesteziyoloji ve reanimasyon kliniği] Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Yuan, J., Zou, R., Zeng, L. et al. The correlation between viral clearance and biochemical outcomes of 94 COVID-19 infected discharged patients. *Inflammation Research* 69, 599–606 (2020). DOI: https://doi.org/10.1007/s00011-020-01342-0

Zamani, B., Jamali, R. & Jamali, A. Serum adenosine deaminase may predict disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 32, 1967–1975 (2012). DOI: https://doi.org/10.1007/s00296-011-1912-0

Zavialov, A. V., Gracia, E., Glaichenhaus, N., Franco, R., Zavialov, A. V., & Lauvau, G. (2010). Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(2), 279-290. DOI: https://doi.org/10.1189/jlb.1109764

Zeng, T., Ling, B., Hu, X., Wang, S., Qiao, W., Gao, L., ... & Li, D. (2022). The Value of Adenosine Deaminase 2 in the Detection of Tuberculous Pleural Effusion: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Canadian Respiratory Journal*, *2022*. DOI: https://doi.org/10.1155/2022/7078652

Zhang, D., Guo, R., Lei, L., Liu, H., Wang, Y., Wang, Y., ... & Hu, J. (2021). Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes.

Journal of Leukocyte Biology, 109(1), 13-22. DOI: https://doi.org/10.1002/JLB.4HI0720-470R

Zhang, H., Ye, H., Xu, Z., Dong, K., Wang, Y., Geng, L., & Wang, S. (2023). Correlation of serum adenosine deaminase activity with disease activity in patients with primary Sjögren's syndrome. *Immunology Letters*. DOI: https://doi.org/10.1016/j.imlet.2023.04.010

Zhao, X., Chen, D., Szabla, R., Zheng, M., Li, G., Du, P., ... & Lin, H. (2020). Broad and differential animal angiotensin-converting enzyme 2 receptor usage by SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, 94(18), e00940-20. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.00940-20

Zhong, N. S., Zheng, B. J., Li, Y. M., Poon, L. L. M., Xie, Z. H., Chan, K. H., ... & Guan, Y. (2003). Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet*, 362(9393), 1353-1358. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14630-2

Ziaee, V., Amiran, A., Moradinejad, M. H., & Haghi-Ashtiani, M. T. (2013). Evaluation of serum adenosine deaminase changes before and after treatment in patients with systemic lupus erythematosus, Henoch-Schonlein purpura and juvenile idiopathic arthritis. *Annals of Paediatric Rheumatology*, *2*(1), 21. DOI: https://doi.org/10.5455/apr.021820131558

Zoccolillo, M., Brigida, I., Barzaghi, F., Scala, S., Hernández, R. J., Basso-Ricci, L., ... & Mortellaro, A. (2021). Lentiviral correction of enzymatic activity restrains macrophage inflammation in adenosine deaminase 2 deficiency. *Blood Advances*, 5(16), 3174-3187. DOI: https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003811

Zong, M., Zheng, L., Zhou, H., Lu, L., He, L., Wu, X., ... & Liu, Z. (2021). TGF-β and CCL18 as Indicators for Predicting and Monitoring the Development of Pulmonary Fibrosis in Patients with COVID-19. Research Square. Preprint (v.2). DOI: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-97834/v2

7.SİMGELER VE KISALTMALAR

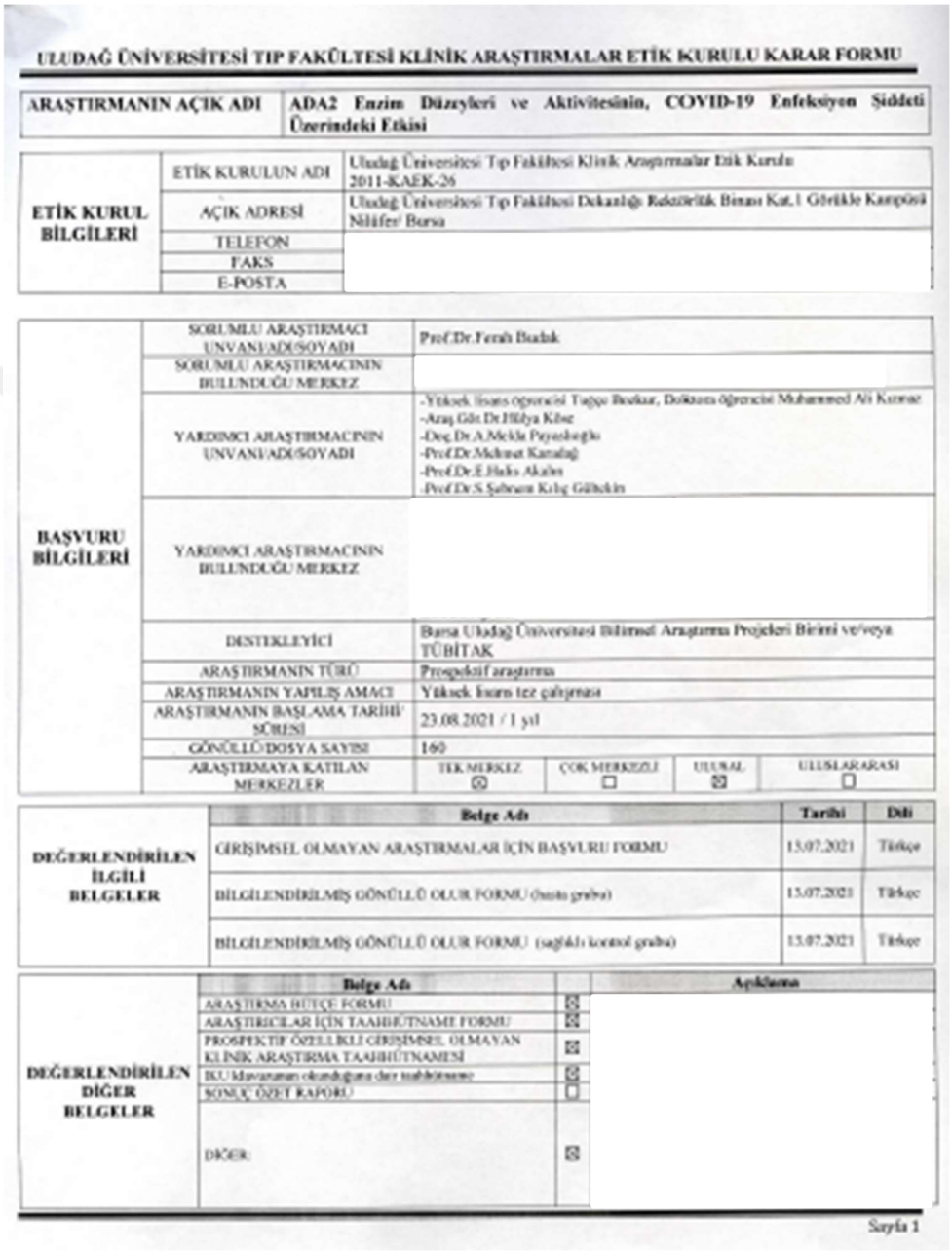
ACE-2 :anjiyotensin dönüştürücü enzim II (angiotensin converting enzyme-2)
ADA :adenozin deaminaz
ADA1 : adenozin deaminaz 1
ADA2 : adenozin deaminaz 2
ADO : adenozin
ARDS : akut solunum sıkıntısı sendromu (acute respiratory distress syndrome)
AST : aspartat transaminaz
ALT : alanin transaminaz
AOSD : yetişkin still hastalığı (adult-onset still's disease)
aPTT : aktif parsiyel tromboplastin zamanı testi
BT : bilgisayarlı tomografi
cAMP : Sıklik adenozin monofosfat
CBC : tam kan sayımı (complete blood count)
CCL : kemokin ligandı
CCR4 :kemokin reseptörü tip 4
CECR1 : kedi gözü sendromu kritik bölge proteini 1 (Cat eye syndrome critical region protein 1)
CD26 : cluster of differentiation 26
CPAP :Sürekli Pozitif Havayolu Basıncı (Continuous Positive Airway Pressure)
CRP : C-reaktif protein
CXCL : kemokin ligandı
dAdo : deoksiadenozin (deoxyadenosine)
DC : dendritik hücre
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
DPP4 : dipeptidil peptidaz-4
dsRNA : çift sarmallı RNA (double-stranded RNA)
EHNA : eritro-9-(2-hidroksi-3-nonil)
ELISA : enzim bağlı immünosorbent analizi
eNOS : endotelyal nitrik oksit sentaz
FiO_2 : alınan havanın oksijen yüzdesi (fraction of inspired oxygen)
GM-CSF : granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
G-CSF :granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte colony-stimulating factor)
HCoV : insan koronavirüsü (human coronavirus)
HLH :hemofagositik lenfohistiyositoz
IAHS : enfeksiyon ilişkili hemofagositik sendromlu
IFN-γ :interferon gamma
IL : interlökin
IRF3 : interferon regülatör faktör-3
iNOS : nitrik oksit sentaz
JIA : jüvenil idiyopatik artrit
kDa : kilodalton
Km : michaelis sabiti
LAHS : lenfoma ilişkili hemofagositik sendrom

LDH : laktat dehidrogenaz
MAS : makrofaj aktivasyon sendromu
MAPK : mitojen aktive edici protein kinaz (mitogen-activated protein kinase)
MERS-CoV: Ortadoğu Solunum Sendromu koronavirüsü (Middle East respiratory syndrome)
MIP-1a : makrofaj enflamatuvar protein-1a (macrophage inflammatory protein)
Ml : mililitre
NFκB : nükleer faktör kappa-B
NK : doğal öldürücü hücre (natural killer)
NLR : nötrofil lenfosit oranı
nNOS : nöronal nitrik oksit sentaz
NO: nitrik oksit
PARC : pulmoner aktivasyon düzenleyen kemokin [Pulmonary and activation-regulated chemokine (kemokin ligandı, CCL18)]
PaO_2 : arteryel oksijen basıncı
PBMC :periferik kan mononükleer hücre, PKMH (peripheral blood mononuclear cell)
PEEP : pozitif ekspiryum sonu basınç
PD-1 : programlı ölüm ligandı-1
PKMH : periferik kan mononükleer hücre
PRR : patern tanıma reseptörleri
pSS : primer sjögren sendromu
PT :protrombin zamanı
RA : romatoid artrit
RLR :RIG-I benzeri reseptörler (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors)
RBD : reseptör bağlanma alanı (receptor binding domain)
RBM : reseptör bağlanma motifi (receptor binding motif)
RNA : ribonükleikasit
ROS : reaktif oksijen türleri
RT-qPCR : polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative reverse transcription)
tADA : total-adenozin deaminaz
TARC : tümüs ve aktivasyon düzenleyici kemokin [thymus- and activation-regulated chemokine (kemokin ligandı, CCL17)]
Th : yardımcı T hücre (T helper)
TLR : toll benzeri reseptörler (toll like receptor)
TMPRSS2 : transmembran serin proteaz 2
TNF : tümör nekroz faktör
TPE : tüberküloz plevral efüzyon
SARS-CoV :şiddetli akut solunum yolu sendromu (severe acute respiratory syndrome)
SARS-CoV-2 : akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 (acute respiratory syndrome coronavirus 2)
SCID :kombine immün yetmezlik sendromu (Severe combined immunodeficiency)
SLE : sistemik lupus eritematozus
ssRNA : tek sarmal RNA (single-strand RNA)
Zn : çinko

WHO **:** Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
µm **:** mikrometre
µl **:** mikrolitre

8.EKLER

Etik Kurul Kararı **EK-1**



ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	ADA2 Enzim Düzeyleri ve Aktivitesinin, COVID-19 Enfeksiyon Şiddeti Üzerindeki Etkisi

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26
	AÇIK ADRESİ	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.1 Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Ferah Budak
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Yüksek lisans öğrencisi Tuğçe Bozkur, Doktora öğrencisi Muhammed Ali Kumaz -Araş.Gör.Dr.Hilâya Kibar -Doç.Dr.A.Melda Payaslıoğlu -Prof.Dr.Mehmet Karadağ -Prof.Dr.E.Hale Akalın -Prof.Dr.S.Şebnem Kılıç Gülhekim
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	
	DESTEKLEYİCİ	Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve/veya TÜBİTAK
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif araştırma
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez çalışması
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	23.08.2021 / 1 yıl
	GÖNÜLLÜ DOSYA SAYISI	160
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ / ÇOK MERKEZLİ ☐ / ULUSAL ☒ / ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Dili
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	13.07.2021	Türkçe
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (hasta grubu)	13.07.2021	Türkçe
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (sağlıklı kontrol grubu)	13.07.2021	Türkçe

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	☒	
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	☒	
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	☒	
	BÜ idarecinin okuduğuna dair taahhütnamesi	☒	
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐	
	DİĞER:	☒	

Sayfa 1

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**ADA2 Enzim Düzeyleri ve Aktivitesinin, COVID-19 Enfeksiyon Şiddeti Üzerindeki Etkisi**

KARAR BİLGİLERİ

Karar No: 2021-10/24 **Tarih: 28 Temmuz 2021**

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelendi.

1-Araştırmanın başvurusu dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna,

2-Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kaşesi bulunan "Onam" formlarının kullanılması ve bu formun çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına,

3-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine,

4-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırıcılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

ÜYELER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.M.Sertaç YILMAZ Üye	Farmakoloji		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji		E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☒	
Doç.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Doç.Dr.Özen ÖZ GÜL Üye	İç Hastalıkları Endokr.ve Metab.		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Av. Ahmet BAYRAM	Hukuk		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Tolga MUHTAR Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	

*.Toplantıda Bulunma

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimin her anında öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra manevi desteği ile yanımda olan, azmi ve insani değerleriyle örnek aldığım, her daim daha iyi olabilmemiz için sabırla çalışan ve destekleyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ferah BUDAK'a,

Proje sürecimizin oluşumunde değerli fikirleriyle katkı sağlayan, eğitim sürecim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile destek olan eş danışman hocam Prof. Dr. Sara Şebnem KILIÇ GÜLTEKİN'e,

İmmünoloji Anabilim Dalı'nda akademik sürecimde katkılarını esirgemeyen İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL hocama,

Tez çalışmamda örnek temini sürecimdeki yardımlarından ve desteklerinden dolayı Doç.Dr. Eren ÇAĞAN'a,

Eğitim sürecimin her anında yanımda olan, zorluğu da mutluluğu da beraber paylaştığımız, birlikte çalışmamızı şans saydığım ve mutluluk duyduğum çok sevgili ekip arkadaşlarım Abdurrahman ŞİMŞEK ve Muhammed Ali KIZMAZ'a,

Manevi desteğini her zaman hissettiğim çok değerli arkadaşım Mediha GÜNEŞ'e,

Tez sürecim boyunca değerli katkıları ve destekleri ile her daim yanımda olan Figen AYMAK ve Deniz GÜLKAYA'ya,

Tüm İmmünoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmamız için örnek vererek katkı sağlayan tüm gönüllülerimize,

Sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuğçe Bozkurt

Haziran 2023

10. ÖZGEÇMİŞ

AD-SOYAD: Tuğçe BOZKURT

EĞİTİM:

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ| 2020-Halen
İmmünoloji Yüksek Lisans-Tıp Fakültesi
Bursa, TÜRKİYE

DENİZLİ PAMUKKALE UNİVERSİTESİ | 2006-2010
Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Denizli, TÜRKİYE

DENEYİM:

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA HASTANESİ
Biyolog, 2018- Halen
BOZOK ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA HASTANESİ
Biyolog, 2013-2018
DENIZLI PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA HASTANESİ
Biyolog, 2010-2013

SERTİFİKALAR:

Aralık 2020: 25. Ulusal İmmünoloji Kongresi, İstanbul Türkiye
Eylül,2021: Uluslararası Avrupa İmmünoloji Kongresi, Belgrad Sırbistan
Ekim, 2022: 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC-V), İzmir, Türkiye
Ekim, 2022: 8.Klinik İmmünoloji Kongresi, Antalya Türkiye
Mayıs, 2023: 9.Klinik İmmünoloji Kongresi, Antalya, Türkiye

YAYINLAR:

Kizmaz, M. A., Şimşek, A., Bozkurt, T., Cagan, E., Dombaz, F., Tezcan, G., ... Asan, A.(2023). Effector memory T cell subset CD45RA−CCR7−CD27−CD28− EM3 increases in direct proportion to the disease severity of COVID-19. Scandinavian Journal of Immunology, vol.97, no.1.

Yazici, D., Cagan, E., Tan, G., Li, M., Do, E., Kucukkase, O. C., Simsek, A., Kizmaz, M. A., Bozkurt, T., Aydin, T., Heider, A., Rückert, B., Brüggen, M. C., Dhir, R., O'Mahony, L., Akdis, M., Nadeau, K. C., Budak, F., Akdis, C. A., & Ogulur, I. (2023). Disrupted epithelial permeability as a predictor of severe COVID-19 development. *Allergy*, 10.1111/all.15800. Advance online publication. https://doi.org/10.1111/all.15800

BİLDİRİLER:

Sözlü Sunum

Köse, H., Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Bozkurt, T., Öztürk, F., Budak, F., Sarıcaoğlu, H.(2023). Juvenil Skleroderma Tanılı Çocuk Hastalarda İnterferon Gen Ekspresyonu ve Hastalık Aktivasyon İlişkisinin Araştırılması. 19. Ulusal Uludağ Pediatri Kış Kongresi, Bursa, Turkey (**Sözlü Bildiri Birincilik Ödülü)**

Bozkurt, T., Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Çağan, E., Köse, H., Işkın, A. E., Şenbuz, T (2022). Regulation of Humoral Immune Response Differs from COVID-19 in MIS-C cases. 8.Klinik İmmünoloji Kongresi, Antalya, Turkey

Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Bozkurt, T., Çağan, E., & Budak, F., (2022). Analysis of helper (Th) and cytotoxic T cell (Tc) subsets in MIS-C 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, İzmir, Turkey

Demir, H. İ., Kızmaz, M. A., Yıldız, A., Şimşek, A., Bozkurt, T., Çeşmeci, Y., Oruç, A.(2022). The Effects of Hypoosmolar Mılıeu in Hyponatremia on the Immüne System. 39. Ulusal Nefroloji Kongresi, Antalya, Turkey

Poster Sunum

Bozkurt T, Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Çağan, E., Köse H., Kılıç S.Ş., Budak, F. (2022). ADA1 ve ADA2 Enzim Düzeyleri ve Aktivitesinin COVID-19 Şiddeti Üzerindeki Etkisi. 9. Klinik İmmünoloji Kongresi, Antalya, Turkey

Işkın, A. E., Yıldız, A., Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Bozkurt, T., Demir, H. İ., ... Oruç, A.(2022). The Role of Irisin in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. 39. Ulusal Nefroloji Kongresi, Antalya, Turkey

Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Bozkurt, T., Çağan, E., Işkın, A. E., Şenbuz, T., ... Budak, F.(2022). MIS-C ve COVID-19'da Yardımcı (Th) ve Sitotoksik T Hücre (Tc) Alt Gruplarındaki Farklılıklar. 8. Klinik İmmünoloji Kongresi, Antalya, Turkey

Kızmaz, M. A., Şimşek, A., Bozkurt, T., Çağan, E., Köse, H., Işkın, A. E., ... Şenbuz, T.(2022). Sitotoksik T ve Treg hücre alt grupları ile Tükenmiş (exhausted) T hücrelerinin MIS-C patogenezindeki rolleri. 88. Klinik İmmünoloji Kongresi, Antalya, Turkey

Işkın, A. E., Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Bozkurt, T., Çağan, E., Köse, H., ... Şenbuz, T.(2022). COVID-19'da İmmün Sistem Hücrelerden Kökenlenen Eksozomların Değişimi. 8. Klinik İmmünoloji Kongresi, Antalya, Turkey

Demir, H. İ., Kızmaz, M. A., Yıldız, A., Şimşek, A., Bozkurt, T., Çeşmeci, Y., Oruç, A (2022). The effects of hypoosmolar milieu in hyponatremia on the immune system. 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, İzmir, Turkey

Işkın, A. E., Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Bozkurt, T., Çağan, E., Köse, H., Şenbuz, T (2022). Altered Immune Cell-Derived Exosomes in COVID-19 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, İzmir, Turkey

Bozkurt, T., Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Çağan, E., Köse, H., Işkın, A. E., Şenbuz, T (2022). Poorly regulated humoral immune responses in MIS-C .5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, İzmir,

Turkey

Kızmaz, M. A., Şimşek, A., Bozkurt, T., Çağan, E., Köse, H., Işkın, A. E., ... Şenbuz, T.(2022). The role of cytotoxic T and Treg cell subsets and exhausted T cells in the pathogenesis of MIS-C . 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, İzmir, Turkey

Şenbuz, T., Kızmaz, M. A., Şimşek, A., Bozkurt, T., Tezcan, G., Işkın, A. E., ... Budak, F.(2022). Regulation of NLRP3 inflammasome-related gene expressions in the progression to chronicity in brucellosis with bone joint involvement. 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, İzmir, Turkey

Köse, H., Şimşek, A., Kızmaz, M. A., Bozkurt, T., Öztürk, F., Budak, F., ... Sarıcaoğlu, H.(2022). Relationship Interferon Signalization and Disease Activation in Patients with Juvenile Scleroderma. . 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, İzmir, Turkey

Öğülür, İ., Yazıcı, D., Çağan, E., Aydın, T., Küçükkase, O., Manru, L., ... Do, E.(2022). Novel biomarkers of disrupted gut permeability in severe COVID-19 patients. World Allergy Congress 2022, İstanbul, Turkey

Öğülür, İ., Yazıcı, D., Çağan, E., Aydın, T., Küçükkase, O. C., Li, M., ... Do, E.(2022). Novel biomarkers of disrupted gut permeability in severe COVID-19 patients. EAACI Summer Symposium on Epithelial Barriers and Microbiome, Zürich, Switzerland

Öğülür, İ., Yazıcı, D., Çağan, E., Aydın, T., Küçükkase, O. C., Li, M., ... Do, E.(2022). Novel biomarkers of disrupted gut permeability in severe COVID-19 patients. World Immune Regulation Meeting XVI, Zürich, Switzerland