



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**COVID-19 HASTALIĞININ ŞİDDETİ İLE İLİŞKİLİ BİYOLOJİK
BELİRTEÇLER OLARAK İNTERLÖKİN-18 VE
İNDÜKLENEBİLİR PROTEİN-10 DÜZEYLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Canberk ÇINAR
TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN - 2022



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**COVID-19 HASTALIĞININ ŞİDDETİ İLE İLİŞKİLİ BİYOLOJİK
BELİRTEÇLER OLARAK İNTERLÖKİN-18 VE
İNDÜKLENEBİLİR PROTEİN-10 DÜZEYLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Canberk ÇINAR
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından
PYO. TIP. 1904.21.008 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN - 2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde ve bu tezi hazırlamamda emeği geçen, bilgi ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum çok değerli hocam, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL'a;

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve tecrübelerini her daim bizlerle paylaşan, tez sürecimde desteğini daima hissettiğim, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ'ye;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden daima faydalandığım, meslek hayatıma çok önemli katkıları olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri değerli hocalarım Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI'ya ve Doç. Dr. Kemal BİLGİN'e;

Asistanlığım boyunca çalışmaktan ve tanışmaktan memnun olduğum asistan arkadaşlarım ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, desteklerinden dolayı değerli arkadaşlarım Arş. Grv. İlknur BIYIK'a, Uzm. Dr. Çağrı ÇOBAN'a, Dr. Muhammed Samet Emre DAŞTAN'a, Dr. Sare Kaya DAŞTAN' a, Dr. Gülşah KARACAN 'a, Arş. Grv. Kübra ÜLKER'e ve Dr. Hamza KADI' ya

Hayatım boyunca beni destekleyen, sabır ve hoşgörüsü ile her zaman yanımda olan biricik eşim Didem ÇINAR'a ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahipleri olan canım annem ve babama teşekkürlerimi sunarım.

Canberk ÇINAR

Nisan 2022

BEYAN

“Covid-19 hastalığının şiddeti ile ilişkili biyolojik belirteçler olarak İnterlökin-18 ve İndüklenebilir Protein-10 düzeylerinin değerlendirilmesi ” adlı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Canberk ÇINAR

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Sitokin fırtınasının COVID-19 patogeneğinde çoklu organ yetmezliği ve ölümün en önemli sebebi olduğu düşünülmektedir. Hafif hastalığı olan bireylere kıyasla şiddetli hastalarda proinflamatuvar sitokinlerin yüksek serum düzeyleri gözlenmiştir. İnterlökin-18, viral enfeksiyonların erken evrelerinde üretilir ve konak savunması için oldukça önemlidir. İndüklenebilir Protein-10 molekülü ise birçok çalışmada hiperkoagülasyon ve tromboz ile ilişkilendirilmiş bir moleküldür. Bu çalışmada COVID-19 hastalığının şiddetinin değerlendirilmesinde biyobelirteç olabileceği düşünülen bu iki molekülün düzeylerini klinik olarak farklı şiddetteki hasta gruplarında araştırmayı ve diğer inflamatuvar belirteçler ile ilişkisini görmeyi amaçladık.

HASTALAR VE YÖNTEM: Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 01.04.2021 ve 01.09.2021 tarihleri arasında SARS-CoV-2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu testi pozitif olan 60 hasta ve 30 sağlıklı gönüllü ile yapılmıştır. Hastalar, klinik görünümüne göre "COVID-19 tanı ve tedavi kılavuzundaki tanımlara göre gruplara ayrılmıştır. Hastalardan alınan kan örneklerindeki IL-18 ve IP-10 düzeyleri Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay yöntemi ile çalışılmıştır.

BULGULAR: Serum IL-18 ve IP-10 düzeyleri hafif-orta pnömonili hasta grubunda şiddetli pnömonili hasta grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. IP-10 düzeyi hafif-orta hasta grubunda ve kontrol grubu arasında anlamlı farklı değildir. IL-18 ve IP-10 düzeyleri ile C-Reaktif Protein, D-Dimer, Ferritin, Prokalsitonin, Nötrofil/Lenfosit düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır. IL-18 ve IP-10 düzeyleri mortalite ile ilişkili bulunamamıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ: Serum IL-18 ve IP-10 düzeyleri, hastalık şiddetini göstermede tek başlarına hayati öneme sahip değildir. Belirli zamanlarda yapılacak seri ölçümler hastalığın üzerindeki rolünü netleştirebilir. Bununla birlikte, bu bulguları doğrulamak için daha büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.

ANAHTAR KELİMELER: Sitokin fırtınası,İnterlökin-18, İndüklenebilir Protein-10

ABSTRACT

OBJECTIVE: Cytokine storm is thought to be the most important cause of multiple organ failure and death in the pathogenesis of COVID-19. High serum levels of proinflammatory cytokines have been observed in severe patients compared to individuals with mild disease. Interleukin-18 is produced in the early stages of viral infections and is very important for host defense. Induced Protein 10 molecule has been associated with hypercoagulation and thrombosis in many studies. In this study, we aimed to investigate the levels of these two molecules, which are thought to be biomarkers in the evaluation of the severity of COVID-19 disease, in patient groups with clinically different severity and to see their relationship with other inflammatory markers.

PATIENTS AND METHOD: This study was conducted at Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine Hospital between 01.04.2021 and 01.09.2021 with 60 patients with positive SARS-CoV-2 PCR test and 30 healthy volunteers. Patients were divided into groups according to the definitions in the “COVID-19 diagnosis and treatment guideline” according to their clinical appearance. IL-18 and IP-10 levels in blood samples taken from patients were studied by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay method.

RESULTS: Serum IL-18 and IP-10 levels were found to be significantly higher in the mild-moderate pneumonia patient group than in the severe pneumonia group. IP-10 level was not significantly different between mild-moderate patient group and control group. No correlation was found between IL-18 and IP-10 levels and C- reactive protein, D-dimer, ferritin, procalcitonin, neutrophil/lymphocyte levels. IL-18 and IP-10 levels were not found to be associated with mortality.

CONCLUSION: Serum IL-18 and IP-10 levels are not of vital importance in demonstrating disease severity alone. Serial measurements at specific times may better clarify its role in disease outcome. Larger studies are needed to confirm these findings.

KEYWORDS: Cytokine storm, Interleukin-18, Inducible Protein-10

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koronavirüslerin Genel Özellikleri	3
2.2. Tarihçe	3
2.3. Epidemiyoloji	4
2.4. Koronavirüslerin Yapısı ve Sınıflandırılması.....	5
2.5. Koronavirüslerin Virolojik Özellikleri	6
2.6. SARS-CoV-2 Tanı	7
2.7. SARS-CoV-2 İmmünopatogenez	9
2.7.1. Hücreye giriş ve replikasyon	9
2.7.2. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda doğal ve kazanılmış bağışıklık	10
2.7.3. Sitokin fırtınası	12
2.8. İnterlökin 18	14
2.9. Hiperkoagülasyon ve İnterferon Gama İle İndüklenen Protein-10	17
3. HASTALAR VE YÖNTEM	19
3.1. Etik Kurul Onayı:	19
3.2. Çalışmanın Özellikleri.....	19
3.3. Çalışmadan Hariç Tutulma Kriterleri	20
3.4. Laboratuvar Verileri	20
3.4.1. Reaktifler	20
3.5. IL-18 Standartlarının Hazırlanması.....	21
3.6. IL-18 Çalışma Basamakları.....	21
3.7. IP-10 Standartlarının Hazırlanması.....	23
3.8 IP-10 Çalışma Basamakları.....	23
3.9. Verilerin İstatistiksel Analizi	25

4. BULGULAR	26
4.1 Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Demografik Özellikleri	26
4.2. ELISA Yöntemi ile Çalışılan Sonuçların Değerlendirilmesi	27
4.3. IL-18 Ve IP-10 Düzeylerinin Laboratuvar Belirteçleri ile Korelasyonu.....	28
4.4. IL-18 ve IP-10 Düzeylerinin COVID-19 BT Bulgusu ile Korelasyonu.....	29
4.5. Serum IL-18 ve IP-10 Düzeylerinin Mortalite ile İlişkisi	29
4.6. Ek Hastalığa Sahip Kişilerin IL-18 ve IP-10 Düzeylerinin Değerlendirilmesi	29
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇLAR	35
7. KAYNAKLAR	36
8. EKLER	45
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	45
Ek.2 Turnitin Orjinallik Raporu	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE-2	: Angiotensin Converting Enzyme 2
ANOVA	: Tek Yönlü Varyant Analizi
AP	: Aktivatör Protein
APTT	: Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
ARDS	: Acute Respiratory Distress Syndrome
COVID-19	: Yeni Koronavirüs Hastalığı-19
CRP	: C-Reaktif Protein
CT	: Cycle Threshold
CXCL	: C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR	: C-X-C Motif Chemokine receptors
DH	: Dendritik Hücre
DM	: Diyabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELİSA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	: Endoplazmik Retikulum
FiO2	: Fraction of Inspired Oxygen
HCoV	: Human Coronavirus
HLH	: Hemofagositik Lenfohistiyositoz
HR	: Heptad Rekurrent
HRP	: Horseradish Peroxidase
HT	: Hipertansiyon
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IP-10	: İndüklenebilir Protein-10
JAK-STAT	: The Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MAS	: Makrofaj Aktivasyon Sendromu
MCP	: Monocyte Chemoattractant Protein
MERS-CoV	: Middle East respiratory syndrome
MIG	: Monosit İnduced Growth
MODS	: Multiorgan Disfonksiyon Sendromu
NAAT	: Nükleik Asit Amplifikasyon Testi
NF-κB	: Nuclear Factor kappa B
NK	: Naturel Killer
NLRP3	: Nod-Like Receptor Pyrin Domain-Containing 3
NSP	: Yapısal Olmayan Proteini
NTD	: N-Terminal Alanı
ORF	: Open Reading Frame
PAMP	: Patojenle İlişkili Moleküler Kalıplar
PaO₂	: Parsiyel Arteriyel Oksijen Basıncı
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBB	: Reseptör Bağlama Bölgesi
RNA	: Ribonükleik Asit
SARS-CoV	: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SARS-CoV-2	: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TLR	: Toll Like Reseptor
TMPRSS2	: Transmembran serin proteinaz 2
TNF	: Tumor Necrosis Factor Alpha
WBC	: White Blood Cell

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. IL-18 standartlarının hazırlanması

Tablo 2. IP-10 standartlarının hazırlanması

Tablo 3. Hastaların ve Kontrol Grubunun Hastaneye Başvuru Sırasındaki Klinik, Demografik ve Laboratuvar Özellikleri

Tablo 4. Üç grubun IL-18 ve IP-10 medyan, minimum, maksimum değerleri

Tablo 5. IL-18 ve IP-10 düzeylerinin diğer laboratuvar belirteçleri ile korelasyonu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. COVID-19 pandemisinin tarihsel akışı

Şekil 2. İnsan koronavirüslerinin sınıflandırılması

Şekil 3. SARS-CoV-2 yaşam döngüsü

Şekil 4. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda sitokin fırtınası

Şekil 5. NLRP3 inflamazomunun SARS-CoV-2 tarafından aktivasyonu

Şekil 6. IL-18 kalibrasyon eğrisi

Şekil 7. IP-10 kalibrasyon eğrisi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Koronavirus hastalığı 2019 (COVID-19), yeni bir koronavirüs olan Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirüs 2' nin (SARS-CoV-2) neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır (1). 2019 yılının sonlarında Çin'in Hubei eyaletine bağlı bir şehir olan Wuhan'da sebebi bilinmeyen pnömoni vakaları ortaya çıkmış olup bu vakaların canlı hayvan pazarları ve deniz ürünleri ile bağlantılı olduğu ilişkilendirilmiştir (2). Sekans analizi yoluyla bu tanımlanamayan pnömoni olgularının yeni bir koronavirüsten kaynaklandığı tespit edilmiş olup Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yeni tip koronavirüs (2019-nCoV) olarak tanımlanmıştır. Etkenin ismi de SARS-CoV-2 olarak güncellenmiştir (3). Enfekte kişilerin solunum sekresyonlarıyla ve temas ile bulaşabilmektedir. Kişiden kişiye çok hızlı bulaşması yayılımın önlemedeki en önemli problemdir (4). SARS-CoV-2 enfeksiyonu asemptomatik veya hafif üst solunum yolu semptomları ile yaşamı tehdit eden sepsis gibi klinik durumlara sebep olabilir (5). Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), COVID-19 patogenezinde oldukça önemlidir. ARDS' nin ana özelliklerinden biri sitokin fırtınası olup immün sistem hücreleri tarafından proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasından kaynaklanan kontrolsüz bir sistemik inflamatuvar yanıt meydana gelir. (6). Sitokin fırtınası olarak adlandırılan birçok sitokinin kontrolsüz salgılanması, klinik semptomların oluşumuyla yakından ilişkilidir; Örneğin, interferon gamma (IFN- γ) ateş, titreme, baş ağrısı, baş dönmesi ve yorgunluğa neden olabilir; Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) , ateş, genel halsizlik ve yorgunlukla birlikte grip benzeri semptomlara neden olabilir (7). SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında sitokin düzeylerinde çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bu sitokinlerle sınırlı olmamak üzere İnterlökin-6 (IL-6), IL-7, IL-18, IL-1 β , IL-10 gibi birçok sitokinin kandaki düzeylerinde artış meydana gelir. Sitokin fırtınasının COVID-19 patogenezinde çoklu organ yetmezliği, ARDS ve ölümün en önemli sebebi olduğu düşünülmüştür (8). Bu sitokinlerin düzeylerinin artmasına sebep olan en önemli ve enfeksiyona ilk yanıtta önemli bir işlevi olan protein kompleksi inflamazomdur. IL-1 ve IL-18' i içeren inflamazom aktivasyonu sonucu salınan proinflamatuvar sitokinler, hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklık sisteminin hücrelerini düzenleyerek sonraki immün olaylara öncülük eder. Doğuştan gelen bir inflamatuvar yol olan inflamazom çeşitli ligandların saptanmasının ardından sitozolde oluşan ve kaspaz-1'in aktivasyonundan sorumlu olan

multimerik bir protein kompleksidir (9). Bakteriyel enfeksiyonlardan farklı olarak viral enfeksiyonlar, ferritin ile birlikte IL-18'in yüksek serum düzeyleri ile karakterize edilir. IL-18'in rolünün belirlenmesi, aynı zamanda hiperferritinemi ve sitokin fırtınası ile de karakterize edilen COVID-19 hastalığının patogenezinine ışık tutması beklenmektedir (10). Bunun dışında COVID-19 hastalarında yapılan başka çalışmalarda venöz tromboembolizm ve kanama gibi risklerin olduğu gösterilmiştir (11). Meydana gelen sistemik inflamatuvar yanıtın mikrovasküler sistemde hasara sebep olduğu ve pıhtılaşma sisteminin anormal aktivasyonuna neden olarak sistemik küçük vaskülitlere ve yaygın mikrotromboza neden olduğu bulunmuştur (12). İnterferon-gamma inducible protein 10 (IP-10, CXCL-10) ise IFN- γ 'ya yanıt olarak birçok hücreden salgılanabilen bir proteindir. Salgılanırken monositler / makrofajlar, T hücreleri, Doğal öldürücü hücreler (NK) ve Dendritik hücreler (DH) için kemotaktik bir ajan görevi gören daha küçük bir biyoaktif proteine bölünür. IP-10 bunlara ek olarak, anjiyogenezi ve kemik iliği oluşumunu inhibe ederek antitümör aktivitesi gösterir. Hücrede kemokin reseptörü 3' ü (CXCR3) bağlayarak işlev görür (13). IP-10 endotelial iyileşmeyi engellediğinden venöz tromboz ile ilişkilendirilmiştir (14). Yapılan çalışmalarda COVID-19 hastalığının bir sonucu olarak tromboz meydana geldiği bulunmuştur. COVID-19 hastalarında tromboz gelişimi, virüsle karşılaşmadan sonra salınan sitokinler ve kemokinlere bağlı meydana gelmektedir. Bu moleküller tromboza ve mikrotrombüslere sebep olabilir (15). COVID-19 hastalığında birçok viral enfeksiyonda olduğu gibi sitokin salınımı ve hiperkoagülopati meydana gelmektedir. Özellikle yoğun bakım ihtiyacı olan kritik hastalarda bu sitokin düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu, hastalık patogenezinde etkisi olduğu ve prognostik değerinin olabileceği öne sürülmüştür (16). Bu çalışmada COVID-19 hastalığının şiddetinin değerlendirilmesinde biyobelirteç olabileceği düşünülen IL-18 düzeyleri ve hiperkoagülasyon ile ilişkili molekül olan IP-10 molekülünün düzeyleri araştırılacaktır. Bu iki molekülün klinik olarak farklı şiddetteki hasta gruplarındaki düzeylerinin akut faz reaktanları ve diğer inflamatuvar belirteçler ile ilişkisi araştırılarak COVID-19 patogenezindeki rolü incelenip bu konuda yapılacak çalışmalara katkı sağlaması beklenmektedir. Aynı zamanda COVID-19 için terapötik bir yol oluşturabilmesi beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüslerin Genel Özellikleri

Koronavirüsler, birçok klinik semptom ile ortaya çıkabilmektedir. Üst solunum yolu enfeksiyonlarından ağır alt solunum yolu enfeksiyonlarına ve ARDS gibi çeşitli klinik durumlara yol açabilen büyük bir virüs ailesidir (17). Bu zamana kadar insanlarda bu tabloyu oluşturan dört tür CoV (HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-229E, HCoV-OC43) tanımlanmıştır. Bunun dışında yaras, fare, kedi, sığır ve köpek gibi hayvanlarda enfeksiyon yapabilen birçok koronavirüs türü bulunmaktadır. Ancak son yıllarda ortaya çıkan koronavirüsler tüm dünyaya hızla yayılmış olup oldukça önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (18).

2.2. Tarihçe

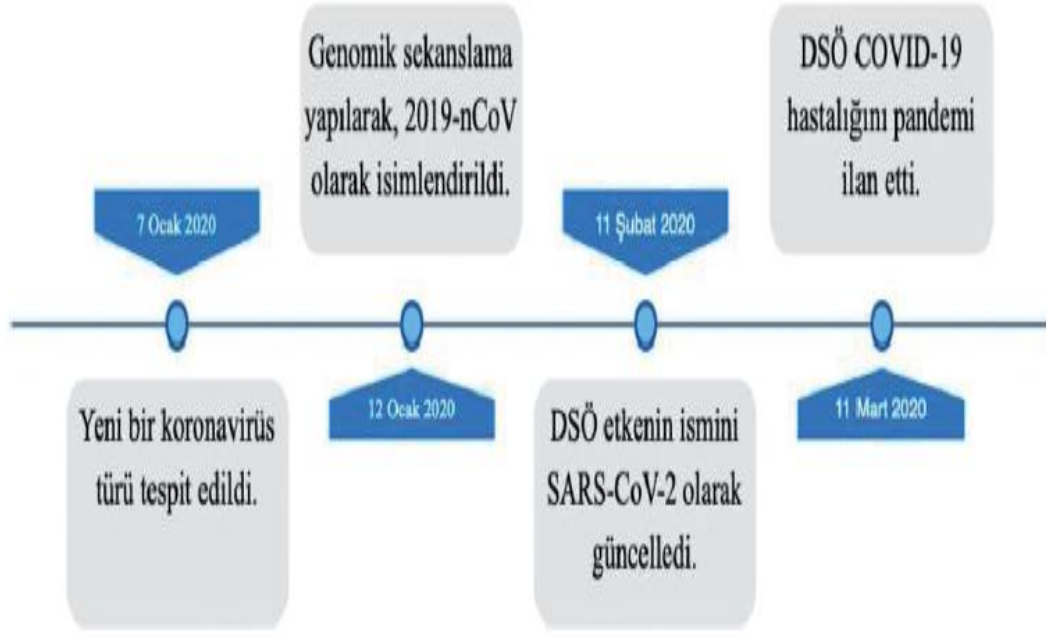
Filogenetik olarak incelendiğinde koronavirüslerin yüzyıllar öncesinde de bulunduğu bilinmekle beraber son 20 yılda insan sağlığını tehdit eder hale gelmiştir. Koronavirüsler ile ilişkili olduğu düşünülen ilk olgu 1912 yılında Almanya’da ateşi ve karın şişliği olan bir kedide tanımlanmıştır (19). 1965 yılında iki araştırmacı üst solunum yolu semptomları olan bir çocuktan izole ettikleri virüsün sağlıklı kişilerde de benzer şikayetleri oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu virüsün o güne kadar başka bir virüse benzemediği fark edilmiştir. Elektron mikroskopisinde incelendiğinde ise bu virüsün tavuklarda görülen bronşit virüsüne benzediği saptanmıştır. Bu dönemde başka iki araştırmacı üst solunum yolu şikayetleri olan kişilerin solunum yollarından izole ettikleri bir ajanı 229E olarak isimlendirmişlerdir (20). Bu viral yapıların elektron mikroskopundaki görüntülerinde protein çıkıntılarının taç şeklinde olması sebebiyle araştırmacılar bu virüslerde koronavirüs ismini kullanmaya başlamışlardır (21).

Sonraki yıllarda farelerde, tavuklarda, hindilerde, diğer kuş türlerinde, sığırlarda, birkaç yabani geviş getiren hayvanda, köpeklerde, kedilerde, tavşanlarda ve domuzlarda ciddi solunum yolu hastalıklarına, gastrointestinal, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklara neden olabildiği tespit edilmiştir. İnsanlarda ise solunum yolu hastalıklarına ve gastrointestinal yakınmalara neden olabildikleri gibi ARDS, organ yetmezlikleri, hiperkoagülasyon ve ölüm gibi ciddi tablolara neden olabilirler (22).

2.3. Epidemiyoloji

Önceki yıllarda koronavirüs türlerinin insanlarda hastalık yaptığı bilinmekteydi ve bağışıklığı yeterli kişilerde soğuk algınlığı semptomlarına sebep olmaktaydı. Bunlar dışında iki farklı koronavirüs tür bariyerini geçerek insanlarda ağır hastalık yapmış ve ölümlere neden olmuştur. Koronavirüsler 2002 senesinde insanları enfekte eden farklı bir formda ortaya çıkmıştır. İlk kez Çin'de ortaya çıkan SARS tablosunun etkenine Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) adı verilmiştir (23). Kısa süre içinde 30 ülkeye yayılarak yaklaşık 8000 kişide hastalığa yol açmış olup yaklaşık 700 kişinin ölümüne neden olmuştur (24). Yaklaşık 10 yıl sonra ise Suudi Arabistan'da solunum ve böbrek yetmezliğinden ölen bir hastadan daha önce görülmemiş bir koronavirüs izole edildi ve tespit edildiği yer itibariyle Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) adı verilmiştir (25). Ocak 2020 itibariyle yaklaşık 3000 olgu yaklaşık 30 ülkede saptanmış, toplum ölüm sayısı da 858 olarak bildirilmiştir. Nadiren de olsa MERS olguları görülmeye devam etmektedir ve SARS' a göre daha mortal olduğu görülmüştür. Bu iki virüs de zoonotik olup epidemiyolojik olarak benzerdir. Semptomatik vakaları genellikle orta ve şiddetli solunum semptomları ile ortaya çıkar ve sıklıkla şiddetli pnömoniye dönüşür. Hem SARS-CoV hem de MERS-CoV' nin dikkate değer bir ortak özelliği, toplulukta sürekli bulaşma potansiyeline sahip olmalarıdır (26).

Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaletinde 11 milyon nüfuslu büyük bir şehir olan Wuhan şehrinde sebebi bilinmeyen pnömoni vakaları bildirilmiştir. Wuhan yabani hayvan ve deniz ürünleri pazarı ile ilgisi olduğu düşünülen ilk 4 vaka, yerel hastaneler tarafından, sonradan kurulan "etiyojisi bilinmeyen pnömoni" olarak isimlendirilmiştir (27). Aralık ayı sonunda meydana gelen bu nedeni bilinmeyen pnömoni etkeni bir hafta içinde daha önce görülmemiş yeni bir koronavirüs olarak tanımlanmıştır (28). Çin hükümeti ocak ayında bu koronavirüsün genetik analizini paylaşmıştır. Ardından 2019-nCov olarak bilinen virüs SARS-CoV-2 olarak isimlendirilmiştir (29). COVID-19 DSÖ tarafından 11 Mart 2020 tarihinde pandemi olarak ilan edilmiştir (28).

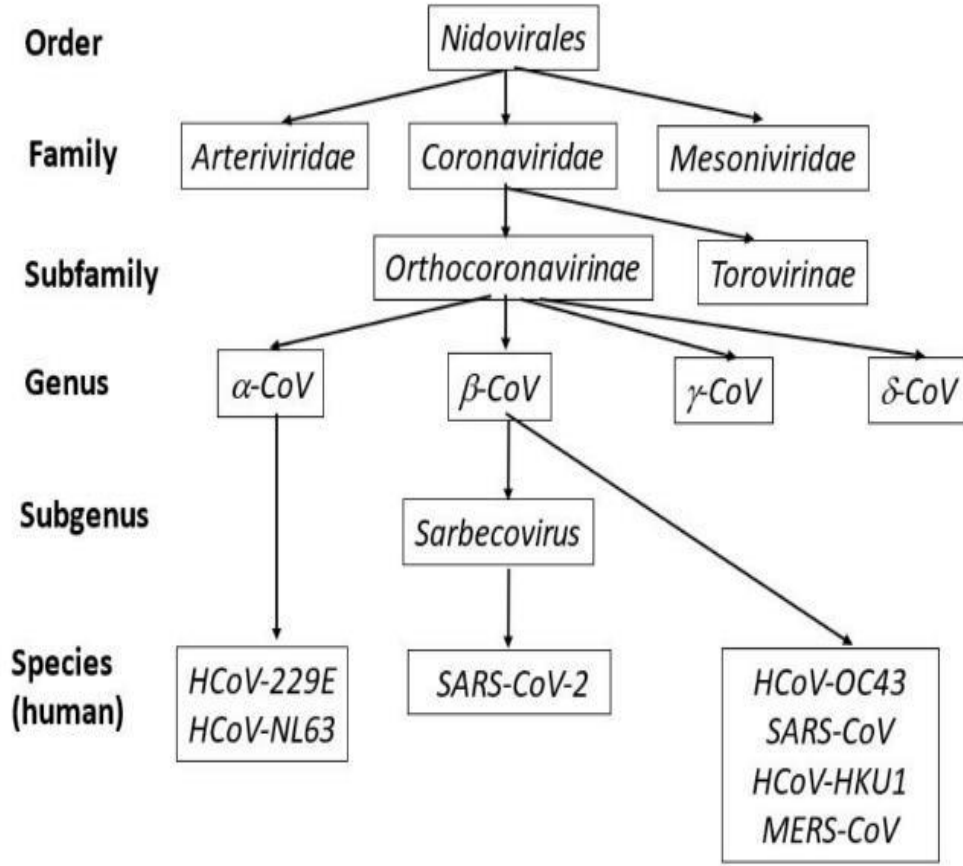


Şekil 1. COVID-19 pandemisinin tarihsel akışı (30)

2.4. Koronavirüslerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Koronavirüsler; *Coronaviridae* ailesinin bir üyesi olup *Mesoniviridae*, *Arteriviridae*, ve *Roniviridae* aileleri ile birlikte *Nidovirales* takımı içinde bulunur ve bu takım içinde en büyük grubu oluşturur. *Coronaviridae* ailesi de kendi içinde 4 cinse ayrılır; Alfa-, Beta-, Gama- ve Delta koronavirüsler (31).

Şiddetli solunum yolu enfeksiyonu ile ilişkili olabilen koronavirüslerden farklı olarak, dört yaygın insan koronavirüsü tanımlanmış olup bunlardan HCoV-229E ve HCoV-NL63 *Alphacoronavirus* cinsine ait iken HCoV-HKU1 ve HCoV-OC43 ise tıpkı salgına neden olmuş 3 koronavirüs gibi *Betacoronavirus* cinsindedir. Bu 4 insan koronavirüsü (HCoV-HKU1, HCoV-229E, HCoV-NL63 ve HCoV-OC43) genellikle hafiften orta dereceye kadar üst solunum yolu hastalığına neden olur ve insanlarda yaygın olarak görülen soğuk algınlığı vakalarının % 15 ile 30 ' unu oluşturur (32). Genom dizilimleri sekanslama yapıldığında SARS-CoV-2 ' nin MERS-CoV ile yaklaşık %50 SARS-CoV ile de yaklaşık %80 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (33).



Şekil 2. İnsan koronavirüslerinin sınıflandırılması (34)

2.5. Koronavirüslerin Virolojik Özellikleri

Boyutu yaklaşık 26-32 k baz arasında değişen koronavirüs genomu, Tüm RNA virüs aileleri arasında en büyük genoma sahiptir. Değişken sayıda (6-11) Open Reading Frame (ORF) içerir. Tüm genomun yaklaşık % 67'sini temsil eden ilk ORF, 16 yapısal olmayan proteini (nsp) kodlarken (Genomun 5' ucu), kalan ORF' ler yardımcı proteinleri ve yapısal proteinleri kodlarlar (Genomun 3' ucu). Bu nsp 'lerin vezikül oluşumu, viral replikasyon, transkripsiyon, protein kesilmesi, immün yanıtta kaçış gibi birçok hücre içi olayda görevli olduğu düşünülmektedir.

Dört ana yapısal protein; Zarf proteini (E), Spike proteini (S), Membran proteini (M) ve Nükleokapsid proteini (N). E ve N proteini tüm türlerde olmak üzere Hemagglütinin Esteraz (HE) proteinleri sadece beta koronavirüslerde bulunmaktadır (35). S proteini virüsten çıkıntı oluşturarak taç benzeri yapıları oluşturur ve virüs de ismini buradan almaktadır. Virüs ile konaktaki reseptörün bağlanmasına yardımcı olup hücre içine penetrasyonda görevlidir.

S1 alt ünitesi konaktaki reseptöre bağlanmadan sorumlu iken S2 alt ünitesi ise füzyonda görevlidir. Bu protein reseptör olarak Anjiyotensin converting enzim 2 (ACE2)'ye bağlanır, Transmembran serin proteinaz 2 (TMPRSS2) aktivitesinin de hücreye girişte büyük önem taşıdığı gösterilmiştir (36). S proteini konakçı hücrelere girişe aracılık ettiğinden bu enfeksiyona karşı gelişen antikolları nötralize etmenin ana hedefidir. Terapötik anlamda ve aşı geliştirilmesi üzerinde oldukça önemli bir yerdedir.

SARS-CoV ve SARS-CoV-2 için bakıldığında Spike proteinleri arasında yaklaşık %77 oranında benzerlik bulunur, ancak bu proteinlerin reseptör bağlanma alanındaki birkaç aminoasit farklılığı bu iki koronavirüs enfeksiyonunun farklı sonuçları ve yayılım hızı arasındaki farklılığı açıklayabilir (37). M proteini ise zarf üzerinde bulunur ve viral proteinlerin birleştirilmesinde görev alır ve virüsün iskelet yapısını korur. E proteini ise virüsün içindeki en küçük yapısal protein olup virüsün salınmasında ve patogenezinde rol almaktadır.

N proteini de viral genomu korur ve onu sabit bir şekilde tutar. RNA transkripsiyonu ve replikasyonu için gerekli olan bir RNA bağlayıcı proteindir. Viral RNA genomunun paketlenmesi sırasında sarmal ribonükleoproteinlerin oluşturulmasında, transkripsiyonda viral RNA sentezinin düzenlenmesi ve enfekte hücre metabolizmasının modüle edilmesinde birçok önemli rol oynar. N proteini ayrıca enfeksiyon sırasında oldukça immünojenik ve bol miktarda eksprese edilen bir proteindir ve SARS-CoV-2 'ye karşı koruyucu immün tepkileri indükleyebilir (38).

2.6. SARS-CoV-2 Tanı

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun erken ve doğru teşhisi, pandeminin kontrolü açısından oldukça önemlidir. Diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi altın standart tanı yöntemi enfeksiyöz ajanın tanımlanmasıdır. Viral enfeksiyonlarda bu tanımlama, elektron mikroskopunda viral yapıların gösterilmesi veya virüse ait inklüzyonların görülmesiyle yapılabilir. In vitro olarak virüsün doku kültürlerinde üretilmesi gereklidir. Ancak bu yöntemler, genellikle araştırma merkezlerinde kullanılır. Ticari laboratuvarlarda, viral antijenlerin tespiti için immünoenzimatik testler veya aglütinasyon testleri ve virüs genetik materyalinin tespiti için nükleik asit

amplifikasyon testleri (NAAT) tercih edilir. Bu amplifikasyon testlerinden en sık kullanılanı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemidir. (39).

COVID-19'un rutin klinik tanısı öncelikle epidemiyolojik öyküye ve klinik bulgulara dayanır ve bilgisayarlı tomografi (BT) taraması, ve serolojik teknikler dahil olmak üzere çeşitli laboratuvar tespit yöntemleriyle doğrulanır. PZR testleri en duyarlı testlerdir ve erken viral enfeksiyonları saptamak için genellikle tercih edilen testtir. Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT- qPZR), SARS-CoV-2 tespiti için en önemli yöntem kabul edilmiştir ve şu anda popülasyonları taramak için birçok ülkede en yaygın kullanılan testlerden biridir. RT-qPZR testi, N geni, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) geni, E geni, S geni ve SARS-CoV-2'nin ORF1b veya ORF8 bölgeleri gibi farklı genleri hedefleyen geliştirilmiştir (40). RT reaksiyonu viral RNA'yı tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürür. PZR, cDNA'yı katlanarak çoğaltır ve çoğaltılan DNA, floresan probaları kullanılarak gerçek zamanlı olarak saptanır. Yeni bir DNA dizisi sentezlenirken, hibritleştirilmiş bir raportör probu (örneğin TaqMan probu) polimerazın 5' eksonükleaz aktivitesi ile bölünür ve söndürücü florofordan çıkarılır ve floresan oluşumuna neden olur. Böylece, floresan yoğunluğu DNA dizilerinin gerçek zamanlı amplifikasyonunu yansıtır ve hedef DNA'nın nicel tespiti için kullanılır. Floresan üretmek için başka bir yaygın strateji, çift sarmallı DNA (dsDNA) bağlayıcı boyalar (örneğin, SYBR Green) kullanmaktır (41). PZR testinde cycle threshold (CT) değeri saptanabilir bir düzeye ulaşmak için viral RNA'yı büyütme için gereken döngü sayısını belirtir. Bu değer, bir numunedeki viral RNA düzeyiyle ters orantılıdır (42). NAAT testleri dışında antijen testleri kullanılabilir. Antijen testleri, SARS-CoV-2 viral proteinlerinin varlığını tespit eder. Hastalığın erken evrelerinde kullanılabilir. Kısa sürede sonuç verebildikleri için hızlı tanı testleri olarak da adlandırılırlar. N proteini, klinik örneklerde fazla miktarda bulunduğu için en yaygın olarak seçilen hedef bölgedir. Genellikle NAAT'lerden daha az duyarlıdır (43). Bir diğer tanı yöntemi de antikor testleridir. Antikor testleri arasında ELISA, immünokromatografi, kemoluminesans immünoassay gibi yöntemler bulunmaktadır. Temastan sonra genellikle ilk iki haftada serokonversiyon gelişmektedir. NAAT testlerinin negatif olduğu ve COVID-19 enfeksiyonu düşünülen durumlarda tanıyı destekleyebilir. Diğer koronavirüslerle çapraz reaksiyon önemli bir sorun oluşturmakta ve IgM testlerinde yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu

testler, PZR ile tanı konulamayan hastaların tanımlanmasında, taramaya yönelik geniş kapsamlı çalışmaların yapılması, aşı çalışmalarında, enfeksiyona karşı bağışıklığın araştırılmasında, uygulanacak immün plazma tedavisinde donörlerin tespitine olanak sağlayacaktır. COVID-19 hastalarında spike proteinine karşı oluşan antikorların tespit edildiği ELISA yönteminde IgM'in 12. günde, IgG'nin 14. günde tespit edildiği belirlenmiştir (44).

2.7. SARS-CoV-2 İmmünopatogenez

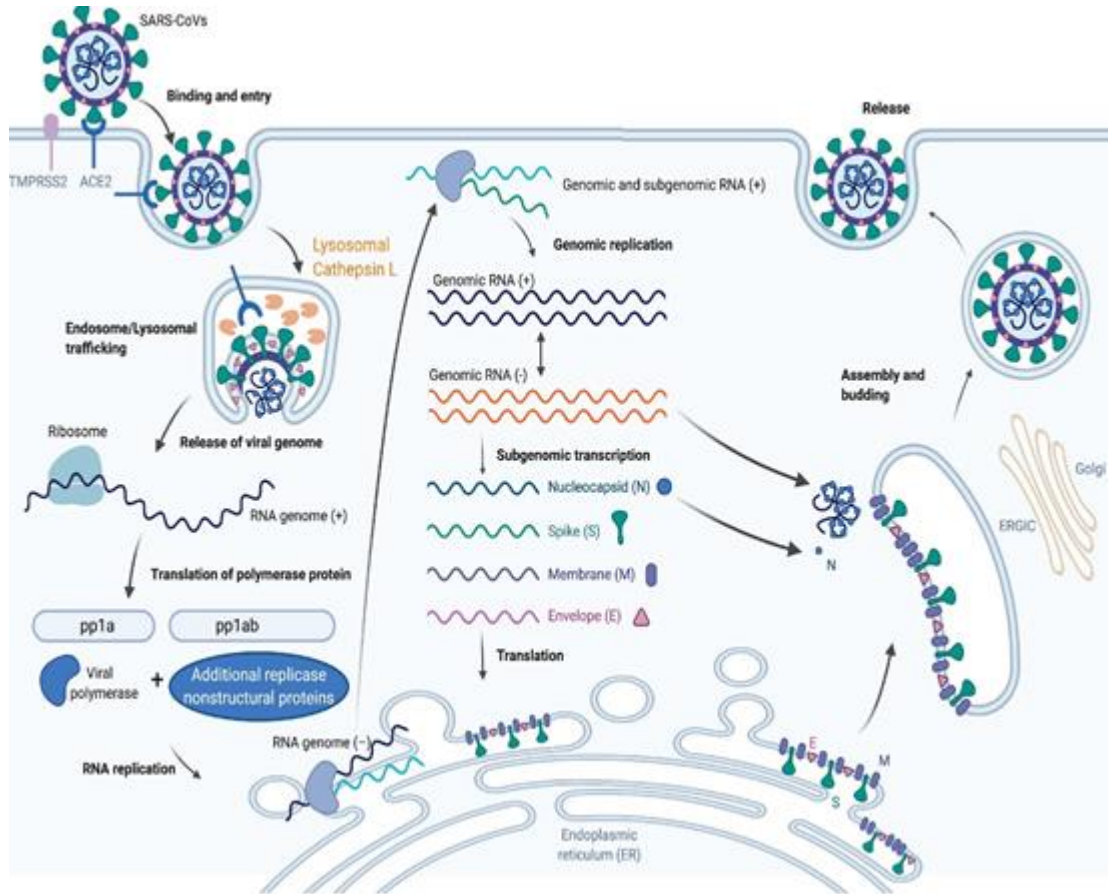
SARS-CoV-2 virüsünün sebep olduğu klinik tabloya COVID-19 adı verilir. Ateş, nefes darlığı, yorgunluk, öksürük gibi klinik semptomlara neden olur. Hastaların çoğunluğu asemptomatik veya hafif semptomlarla hastalığı geçirirken bir kısmında ise servis ve yoğun bakım yatışı gerekebilir. İleri yaş, altta yatan hastalıklar, bağışıklık sisteminin baskılanması gibi durumlar bu hastalık için kötü prognostik göstergelerdir. Virüsün patogenezini aydınlatmak ve vücutta meydana gelen olayları incelemek virüsü daha iyi tanıyıp terapötik önlemlerin geliştirilmesine rehberlik edebilir (45).

2.7.1. Hücreye giriş ve replikasyon

Tıpkı SARS-CoV ve MERS-CoV enfeksiyonlarında olduğu gibi SARS-CoV-2' de ACE-2 reseptörüne bağlanır. ACE-2 reseptörleri endotel, akciğer, kalp, bağırsak, böbrek, düz kas, beyin gibi dokularda bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında COVID-19'un sadece solunum sistemi değil sindirim sistemi, merkezi sinir sistemi, ürogenital sistem ve dolaşım sistemi gibi birçok sistem üzerinde etkisi bulunmaktadır (46).

SARS-CoV-2' nin S proteini hücreye girişte görev alır. Bu protein bilindiği üzere S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşur. S1 alt birimi hedef hücre yüzeyine bağlanmayı sağlar N-terminal alanı (NTD) ve reseptör bağlama bölgesi (RBB) içerir. S2 alt birimi de füzyon işlevinde görevlidir ve üzerinde de heptad rekurrent 1 (HR1) ve heptad rekurrent 2 (HR2) gibi alanlar bulunmaktadır. Füzyonun gerçekleşmesi için proteolitik bölünme gerekli olup bu da konakçı hücrelerinde bulunan TMPRSS2 veya furin proteazlar ile gerçekleştirilir. SARS-CoV-2'nin, SARS-CoV' dan daha yüksek afinitede ACE2 reseptörlerine bağlandığını göstermiştir. Bu da SARS-CoV-2 S proteininin kesim bölgelerinin ve aminoasit diziliminin daha fazla olması ile açıklanmaktadır. Hücreye girişte füzyon dışında endositoz ile giriş yapabildiği gösterilmiştir (47).

Virüs hücreye girince, virüs RNA'sı sitoplazmaya salınır ve ribozomlarda protein sentezi başlar ardından viral genom çoğalmaya başlar. RNA replikasyonu ile yapısal ve yardımcı proteinler üretilir sonrasında bu proteinler endoplazmik retikulum (ER) veya golgi zarına eklenir. Bu ER ve golgi kompleksine nükleokapsidin de eklenmesiyle olgun virion oluşur ve ekzositoz ile hücre dışına salınır (48). SARS-CoV-2 'nin vücutta en çok etkilediği sistem solunum sistemidir. Solunum yoluyla ve temas yoluyla bulaşan SARS-CoV-2, vücutta ilk olarak farekste ve nazal bölgede replike olup alt solunum yollarına doğru inebilirler. Hedef hücre akciğerlerde bulunan tip II pnömositlerdir. Akciğerlerde patolojik değişiklikler; genellikle ödem, eksüda ve tip II pnömositlerin yaygın reaktif hiperplazisi ile yaygın alveoler hasarıdır (24).



Şekil 3. SARS-CoV-2 yaşam döngüsü (49)

2.7.2. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda doğal ve kazanılmış bağışıklık

ACE2, virüs zarfı üzerindeki yüzeysel S glikoproteine bağlanan ortak faktördür. ACE2 reseptörü, tip II pnömositler, kalp, böbrek, gastrointestinal sistem,

karaciğer ve mesane hücrelerinde bulunabilir. Dolayısıyla bu organlar virüsün ana hedefini oluşturmaktadır. Enfekte akciğer epitel hücreleri, nötrofiller ve T lenfositler için bir kemoatraktan görevi gören IL-8 üretir. Doğal bağışıklık alveoler makrofajlar, akciğer epitel hücreleri ve nötrofiller tarafından tetiklenir.

Bir sonraki aşamada, tam immün yanıtı tamamlamak için T ve B lenfositlerini içeren kazanılmış immün yanıtlar tetiklenir. SARS-CoV-2 için ilk oluşan yanıt doğal bağışıklıktır ve bu da monosit ve makrofajlarda yer alan patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMP), Toll benzeri reseptörler (TLR), Patern tanıma reseptörleri (PRR) ile virüs RNA'sının tanınması ile ortaya çıkar. Bu da Nükleer faktör kappa B (NF-κB), aktivatör protein 1 (AP-1), Janus kinaz sinyal dönüştürücüleri (JAK/STAT) gibi transkripsiyon yollarını aktifleştirir (50).

Bu şekilde kemokinler ile Tip 1 ve 3 İnterferonların sentezi gerçekleşir. Bu kemokinler de lökosit, monosit, NK, DH gibi doğal bağışıklık hücrelerini ortama çeker. Bu hücreler IP-10, Monokine-induced-by-IFN- γ (MIG) ve Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gibi kemokinleri üreterek lenfosit göçüne yardımcı olur (51).

Dentritik hücreler doğal bağışıklık yanıtında ve kazanılmış bağışıklıkta oldukça önemli bir rol oynar. Organizmadaki en güçlü antijen sunan hücreler olarak, T ve B lenfositlerin aktivasyonunu etkin bir şekilde uyarırlar, böylece doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık arasında bir köprü konumundadır. Henüz olgunlaşmamış DH 'ler güçlü bir göç yeteneğine sahiptir ve olgunlaştıktan sonra bağışıklık yanıtının başlatılmasında ve devamında T hücrelerinin etkin bir şekilde aktivasyonunda görevlidirler. Bu sebeple bu hücrelerin olgunlaşma süreci engellendiğinde, sonraki kazanılmış immün yanıtların başlaması doğrudan etkilenir (18).

T lenfositleri mikroorganizmalara karşı mücadelede çok önemli rol oynar. CD4+ T lenfositleri, T lenfosit bağımlı B hücrelerini aktive ederek virüse özgü antikorların oluşumunda görevlidir. CD8+ T lenfositleri ise sitotoksik lenfositler olarak bilinir ve viral enfekte hücreleri direk olarak öldürebilir. CD8 + T hücreleri, SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda akciğerdeki inflamatuvar hücrelerin çok büyük bir kısmını oluşturur ve enfekte hücrelerdeki koronavirüslerin temizlenmesinde ve bağışıklık yanıtının indüklenmesinde önemli bir rol oynar. Akciğere bu göç sonrasında COVID-19 hastalarında CD8 + ve CD4 + T lenfositlerin önemli ölçüde azaldığı buna bağlı

lenfopeni gözleendiği bildirilmiştir (52). CD4 + T hücreleri ayrıca NF-kB sinyal yolu aracılığıyla IL-17, IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF-β ve MIP-1α (macrophage inflammatory protein-1alfa) proinflatuar sitokinlerin üretim basamakların aktive eder (53).

COVID-19 hastalarında B hücre yanıtları ise semptom başlangıcından yaklaşık 1 hafta sonra T hücre yanıtları ile eşzamanlı olarak ortaya çıkar. SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan hastalarda, B hücre yanıtları ilk önce N proteinine karşı meydana gelir. Semptom başlangıcından sonraki 4-8 gün içinde, S proteinine karşı antikor yanıtları bulunur (54). MERS-CoV için yapılmış çalışmalarda S proteini üzerindeki bazı bölgelerin yüksek antijenik özelliklerinin olduğu bulunmuştur. COVID-19 enfeksiyonunda IgM ve IgG tipi antikorlar oluşmaktadır.

Antikor yanıtının meydana gelmesi, hastalığın iyileşmesiyle yaklaşık aynı dönemde olmaktadır. İlk 15 gün içinde hastaların yaklaşık %95'inde IgM tespit edilirken IgG tipi antikorlar ise 15 günden sonraki dönemde artmakta olup birinci aydan sonra hemem hemen tüm hastalarda bulunabilmektedir. IgM tipi antikorlar sitokin salınımı ve kompleman aktivasyonu ile ilişkili olup IgG tipi antikorlar ise FcR eksprese eden aracılığıyla etkili olmaktadır. Özellikle S proteininin reseptör bağlanma bölgesine karşı gelişen spesifik antikorların virüsün nötralizasyonda oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (55). Ağır hastalığı olan COVID-19 hastalarında, virüse özgü antikorların, antikora bağlı geliştirme adı verilen bir süreç yoluyla hiperinflamasyon, sitokin fırtınası ve lenfositlerin tükenmesinin patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (56).

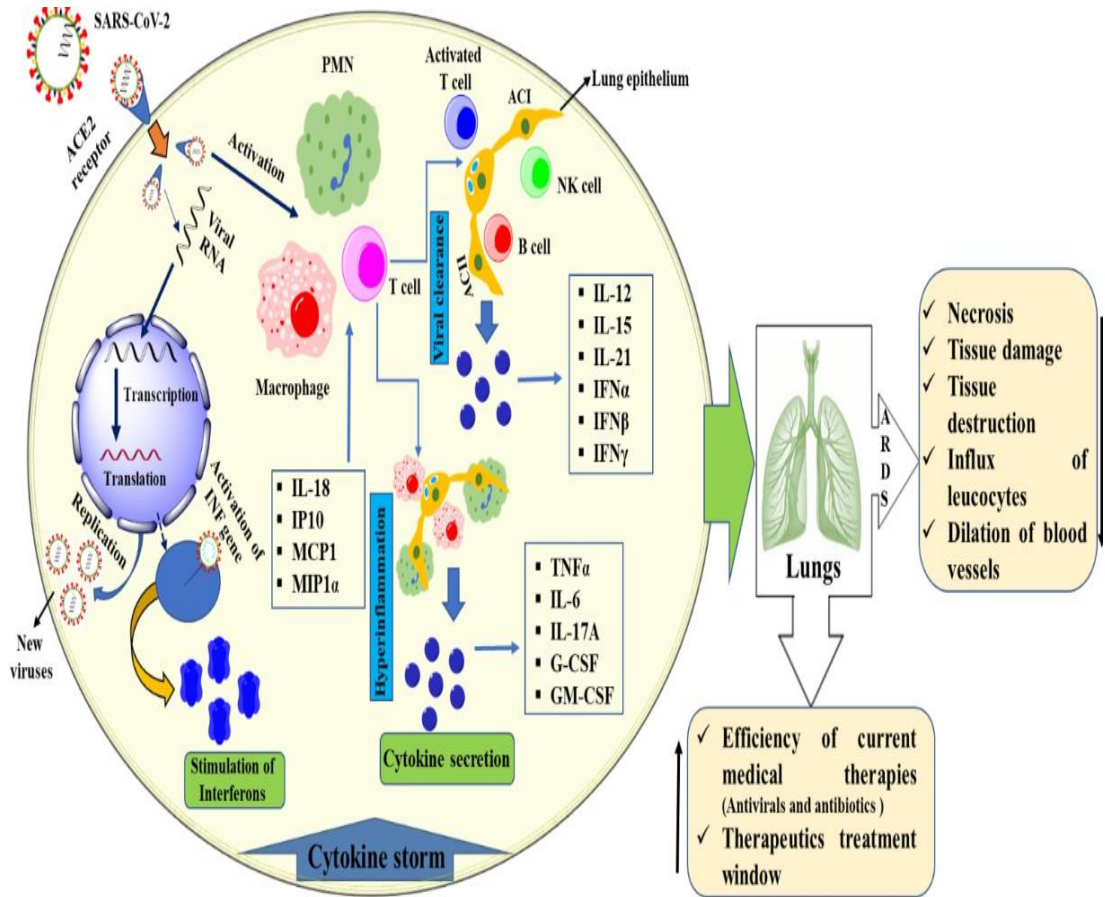
2.7.3. Sitokin fırtınası

Sitokin salınım sendromu olarak da adlandırılan çoklu sitokinlerin salgılanması, klinik semptomların gelişimi ile yakından ilişkilidir. Hastalık seyrine göre COVID-19 hastaları kabaca iki gruba ayrılabilir; genellikle iyileşen asemptomatik veya hafif vakalar ile servis ve yoğun bakım ünitesine yatış gerektiren, başta solunum yetmezliği olmak üzere çoklu organ yetmezliği geliştiren ciddi vakalar (57). COVID-19' da ARDS ve multiorgan disfonksiyon sendromu (MODS) ortaya çıkabilir. Sepsis ve MODS gelişimi öncelikle sitokin salınımı ile nötrofil ve sitotoksik lenfositlerin yol açtığı endotelial hasar ile başlar ardından bu inflamasyonun artarak devam etmesi

sonucu parankimal hasar gelişmesi ve bu hasarın tüm organ sistemine yayılması ile devam eder. Nötrofillerin sitokinler aracılığıyla inflamasyon alanına gelmesi ve aktivasyonu, pulmoner endotel hasarını başlatan ana mekanizmadır (24).

Proinflamatuvar sitokinler, kazanılmış immün yanıtı aktive ederek birçok viral enfeksiyonda olduğu gibi COVID-19 'da patogenezinde kilit rol oynar. Kontrolsüz bir anti-inflamatuvar yanıt olduğunda, hastalığın seyrinde akciğer dokusunun tutulmasına ve birden fazla organda sistemik bir yanıt oluşmasına neden olabilir. İmmün sistemin farklı kolları arasındaki denge hastalık etkenlerinin temizlenmesine yardımcı olurken, dengesizlik hali ise doku hasarı ile sonuçlanabilir (1).

Özellikle ağır SARS-CoV-2 vakaları incelendiğinde makrofaj aktivasyon sendromu (MAS) bulguları görülmüştür. MAS, hemofagositik lenfohistiyositoz (HLH)'un bir alt tipidir. Ateş, lenfadenopati, hepatosplenomegali, hiperferritinemi, fibrinolitik tüketim koagülopatisi bulgular meydana gelir ve sepsis benzeri klinik ortaya çıkar. MAS, Otoimmün hastalıklar ile ilişkili veya enfeksiyonlarla tetiklenebilen sekonder HLH tipi olup ağır SARS-CoV-2 hastalarında bu tablo meydana gelir. IFN- γ , IL-6, IL-1, IL-8, IL-10, TNF- α , CCL5, CXCL8 ve CXCL-10, MAS gelişiminden sorumlu önemli sitokin ve kemokinler olup serum düzeyleri ağır hasta grubunda artmış bulunmuştur. Bunlar arasında en çok çalışılanı, hem hafif hem de şiddetli COVID-19 hastalarında artan ve ARDS'li hastalarda pulmoner infiltrasyon alanı ile ilişkili olan IL-6'dır (58). Birçok viral enfeksiyonda olduğu gibi SARS-CoV-2 enfeksiyonunun ilk aşamalarında IFN yanıtı gelişir ve bu yanıt antiviral immünitede anahtar basamaktır. Primer yanıtın geciktiği ve tip I IFN'un yanıtının yeterli olmaması durumunda sitokinlerin kontrolsüz salındığı sekonder yanıt gelişir ve sitokin fırtınası artarak ilerler (59).



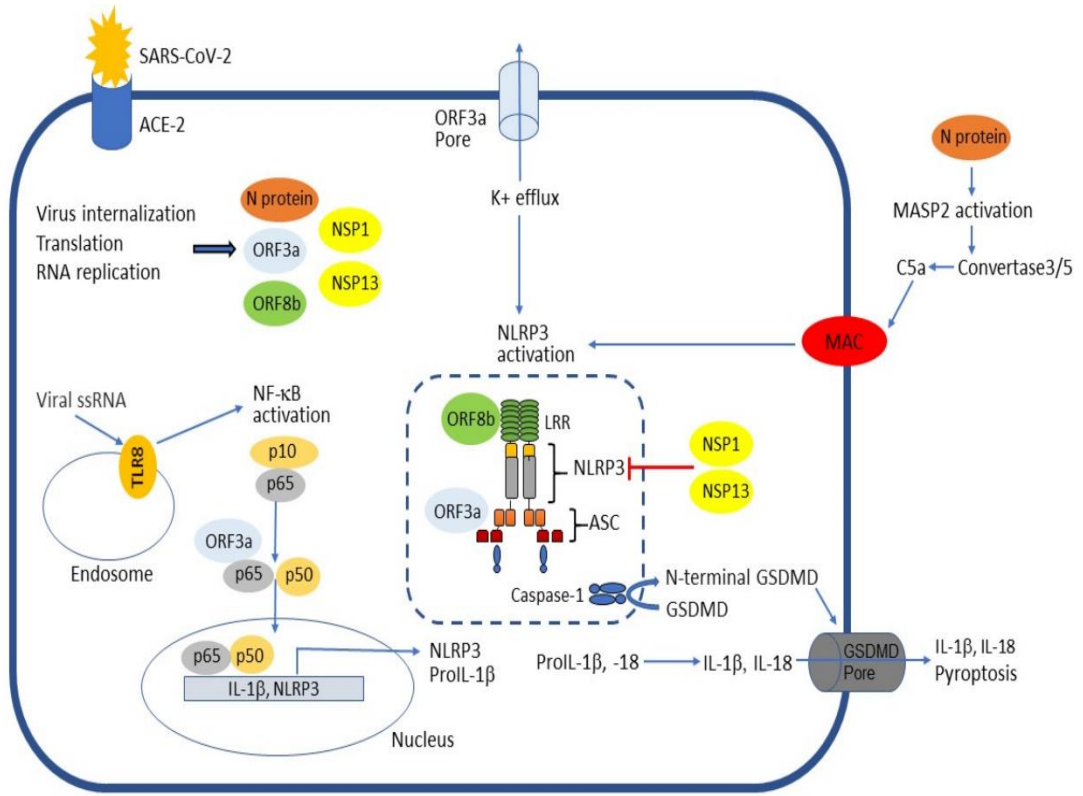
Şekil 4. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda sitokin fırtınası (6)

2.8. İnterlökin 18

COVID-19 ‘da IL-1 ailesine ait proinflamatuvar sitokinlerinde ve IL-6 gibi diğer sitokinlerde bir artış meydana gelmektedir. IL-18, IL-1 ailesinin bir üyesidir. İnaktif bir öncü olarak sentezlenir ve kaspaz-1 tarafından aktif şekline dönüştürülür. IL-18 öncüsü (Pro-IL-18), monositlerin, makrofajların ve dendritik hücrelerin sitoplazmasında ve ayrıca endotel hücrelerinde, keratinositlerde ve gastrointestinal sistemin bağırsak epitel hücrelerinde yapısal olarak bulunur (60). IL-18 ilk olarak karaciğerin Kupffer hücrelerini uyaran *Propionibacterium acnes* ile ön tedaviyi takiben intraperitoneal endotoksin sonrasında farelerin serumunda izole edilen “IFN- γ indükleyici faktör” olarak tanımlanmıştır. Fare karaciğerlerinden saflaştırma ve “IFN- γ indükleyici faktör” ün moleküler klonlanması ile bu isim IL-1 ailesi ve özellikle IL-1 β ile çeşitli şekillerde ilişkili görünen IL-18 olarak değiştirilmiştir. İnsan IL-18 ve IL-1 β sadece %15 sekans homolojisini paylaşıyorlar da ortak bir β -katlı tabaka yapısını paylaşırlar.

IL -18, IL-1 β 'ye benzer şekilde, bir sinyal peptidi olmayan ve biyolojik olarak aktif hale gelmek için kaspaz 1 aracılı bölünmeye ihtiyaç duyan aktif olmayan bir öncü olarak sentezlenir. Farklı reseptörlere bağlanmasına rağmen, IL-1 β ve IL-18 aynı sinyal yollarını kullanır. Ancak, bu önemli benzerliklerin dışında, IL-18 ve IL-1 β 'nin farklı bir biyolojiye sahip olduğu görülmektedir (61).

Viral enfeksiyonların çok erken evrelerinde makrofajlar tarafından IL-18 üretilir ve optimal konak savunması için kritik kabul edilen IL-6 ve IFN-y yapımını indükler (62). IL-1 β öncüsü (pro-IL-1 β) ve pro-IL-18 normalde aktif değildir ve biyolojik olarak aktif sitokin formuna geçmesi için proteolitik bölünme gereklidir. Proteolitik bölünme inflamazom olarak adlandırılan protein kompleksleri yoluyla kaspaz-1 aktivasyonuna bağlıdır (10). SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında oluşan hücre içi stres sonucu Nod-like receptor pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflamazomu aktiveleşir. Bu aktivasyon sonucu olarak procaspaz-1, aktif efektör proteaz kaspaz-1'e dönüştürülür, bu daha sonra pro-IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin aktif formu IL-1 β 'e dönüşür. IL-18 de aktif formuna bu şekilde dönüşür bunun dışında IL-6, TNF, prostaglandinler ve lökotrienler gibi inflamasyonun diğer araçları da tetiklenir. Bu aktivasyon sonucu piropitoz olarak adlandırılan programlanmış hücre ölümü gerçekleşir (63). Daha önce yapılmış çalışmalarda SARS-CoV ve MERS-CoV enfeksiyonlarında ARDS 'nin oluşumunda NLRP3 inflamazom aktivasyonunun önemi belirtilmiştir (64). NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve devamındaki sitokin üretimine bağlı olarak meydana gelen inflamasyonun çok güçlü bir potansiyeli bulunmaktadır. Bu kaskadın inhibisyonu ile COVID-19 'da meydana gelen doku hasarının azaltılabileceği düşünülmektedir (65).



Şekil 5. NLRP3 inflamazomunun SARS-CoV-2 tarafından aktivasyonu (66)

IL-18 düzensizliği ve fazla salınımı birçok çalışmada çeşitli otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (67). COVID-19 hastaları ile yapılan bir çalışmada yüksek IL-18, IL-6, Laktat dehidrogenaz (LDH) ve kaspaz düzeylerinin hastalık ve kötü klinik sonuçlar ile ilişkili olduğu bulunmuştur (68). Viral enfeksiyonlarda IL-18 salınımı, viral enfeksiyonlarda sıklıkla meydana gelen hiperferritinemiye açıklayarak ferritinin yükselmesine neden olur. IL-18' in daha önce belirtildiği gibi IFN-y'nin uyarılması yoluyla hücre içi mikrobiyal ajanlara karşı konak savunmasında çok önemli bir rol oynayan Th1 yanıtlarını da uyardığı bilinmektedir. Buna karşılık, bakteriyel enfeksiyonlar yaygın olarak geniş bir IL-1β salınımı ile ilişkilidir, dolayısıyla IL-6'nın indüklenmesi yoluyla karaciğerden CRP salgılanmasını uyarılır. CRP ise bakterilerin fagosite edilmesinde erken konak savunmasında önemli bir rol oynar. IL-1β ayrıca hücre dışı bakterilere karşı Th17 bağışıklık tepkisini de uyarır. COVID-19 hastalığında en çok araştırılan sitokinlerden olan IL-6 ve önemli bir belirteç olan CRP düzeylerinin birbiri ile oldukça ilişkili olduğu IL-18 ve ferritin düzeylerinin ise birbiri ile daha korele olduğu bulunmuştur. IL-18 ve ferritin düzeylerinin hastalık şiddeti ile ilişkisinin

önemi vurgulanmış olup viral enfeksiyonlara daha özgül biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür (10).

IL-18'in rolünün belirlenmesi, aynı zamanda hiperferritinemi ve sitokin fırtınası ile karakterize olan COVID-19'un patogenezi katkısında bulunması beklenmektedir. Ayrıca, IL-18'in kandaki düzeyinin prognozu tahmin etmede bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği düşünülebilir (8).

2.9. Hiperkoagülasyon ve İnterferon Gama İle İndüklenen Protein-10

COVID-19 da meydana gelen sitokin fırtınası dışında ağır hasta gruplarında yaygın damar içi koagülopati (DIC) tablosu da meydana gelebilmektedir. SARS-CoV enfeksiyonu sırasında trombositopeni, trombositoz ve uzun süreli aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) saptanmış olup günümüzdeki veriler ışığında COVID-19'da da pıhtılaşma bozukluğunun meydana geldiği ve ağır vakalarda görülme sıklığının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ek olarak, COVID-19 tanısı konan hastalarda trombotik komplikasyonlar, mortaliteye katkıda bulunan önemli bir sonuç olarak ortaya çıkmaktadır (69).

Pulmoner emboli, COVID-19'un en yaygın trombotik belirtisidir. Çeşitli klinik raporlar, özellikle akciğer otopsilerinde olmak üzere COVID-19 hastalarında mikrotrombüs varlığını göstermiştir. Bu klinik durumun pulmoner damarlarda endotel disfonksiyonu sonucu tromboz kaskadının tetiklenmesi sonucu olduğu düşünülmektedir. COVID-19 hastalarındaki artmış fibrinojen, D-dimer, azalmış antitrombin gibi test sonuçlarının olması da bu pıhtılaşma durumunu göstermektedir (70). Daha önceden yapılan çalışmalarda trombozla ilişkili olduğu düşünülen sitokin ve kemokinler bulunmuştur. IP-10 bunlardan birisidir (71). IP-10, birçok hücre tipi tarafından salgılanabilir ve IFN- γ 'ya cevap olarak salınır. Bu birçok immün hücre için (T hücreleri, NK hücreleri, monositler/makrofajlar ve dendritik hücreler) kemotaktik olarak görev yapar. IP-10, anjiyogenezi inhibe eder ve endotel iyileşmesini bozabilir bu sebeple birçok çalışmada tromboz ile ilişkilendirilmiştir (14).

COVID-19 seyrinde yoğun bakım ihtiyacı olan hastalarda daha yüksek konsantrasyonlarda IP-10 ve TNF- α düzeyleri izlenmiştir. Yapılan deneysel ve hastaların katıldığı çalışmalarda serum, bronşiyal örnekler veya nazal sekresyonlarda inceleme yapıldığında IP-10 düzeylerinin, viral enfeksiyonlara bağlı akut solunum

yolu enfeksiyonunun şiddeti ve süresi ile tutarlı bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada yoğun bakıma alınan COVID-19 hastalarında IL-1B, IFN γ dışında IP-10 serum düzeylerinin daha yüksek olduğunu bulunması SARS-CoV-2'ye bağlı immun yanıtı, SARS-CoV enfeksiyonlarından ayırmaktadır (72). SARS-CoV ve SARS-CoV-2'nin immün profillerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise IP-10 molekülünün SARS-CoV-2 enfeksiyonunda SARS-CoV' a göre daha fazla upregüle olduğu bildirilmiştir (73).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı:

Tez çalışmasına dair etik kurul onayı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 30.12.2020 tarihli 2020/732 karar nolu mikrobiyoloji çalışması olarak verilmiştir. Etik kurul onayı EK-1'de verilmiştir. COVID-19 araştırma onayı da Sağlık Bakanlığı'ndan alınmıştır (Onay no: 2020-12-10T10_20_16).

3.2. Çalışmanın Özellikleri

Bu çalışma prospektif kohort olarak planlanmış olup, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 01.04.2021 ve 01.09.2021 tarihleri arasında COVID-19 polikliniğine başvuran ve COVID-19 servis ve yoğun bakımlarında yatmakta olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Nazofarengeal/orofarengeal sürüntü örneklerinde SARS-CoV-2 PZR testi pozitif olan 60 hasta ve son bir hafta içinde temaslı izleminde olmayan ve COVID-19 semptomları görülmeyen 30 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalar, klinik görünümüne göre “COVID-19 tanı ve tedavi kılavuzundaki” (74) tanımlara göre gruplara ayrılmıştır; Ateş, kas/eklem ağrıları, öksürük ve boğaz ağrısı gibi semptomları olup solunum sıkıntısı olmayan (dakika solunum sayısı <24 , SpO₂ >93 oda havasında), akciğer filmi ve/veya akciğer tomografisi normal olan hastalar ile ateş, kas/eklem ağrıları, öksürük ve boğaz ağrısı gibi bulguları olup, solunum sayısı <30 /dakika olan, oda havasında SpO₂ >90 üzerinde olan ve akciğer grafisinde veya tomografisinde hafif-orta pnömoni bulgusu olan (Akciğer görüntülemesinde bilateral yaygın (>50) tutulumu olmayan) hastalar 1. grup hastalar olarak belirlenmiştir. Bu grup hafif-orta pnömonili hastalar olarak sınıflandırılmıştır.

Şiddetli pnömonisi olup nefes darlığı ve solunum hızı dakikada ≥ 30 nefes; dinlenirken ve ortam havasını solurken oksijen saturasyonu <93 ; arteriyel oksijen parsiyel basıncı (PaO₂) / oksijen konsantrasyonu (FiO₂) ≤ 300 mmHg ve akciğer parankiminin ≥ 50 'sinin tutulumunu gösteren BT görüntüleri olanlar (Akciğer görüntülemesinde bilateral yaygın pnömoni bulgusu saptanan) 2. grup hastalar olarak belirlenmiş olup şiddetli pnömonili hastalar olarak sınıflandırılmıştır. COVID-19 benzeri semptomlara

sahip olmayanlar ve son bir hafta içinde temaslı olmayan sağlıklı gönüllüler ise 3. grubu oluşturmuştur.

Çalışmaya dahil ettiğimiz hastalardan periferal kan örnekleri başvuru sırasında veya yatış yapıldığında alınmıştır. Özellikle kanların ilk tanı veya yatış esnasında alınmasına özen gösterilmiştir. Periferal kan örnekleri mikrobiyoloji laboratuvarında 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası serumlar çalışılincaya kadar -80 °C' lik dolaplarda saklanmıştır. Klinik veriler gruplar arasında karşılaştırılmıştır. COVID-19 ile ilgili hastalık özellikleri, ek hastalıkların varlığı, diğer laboratuvar sonuçları ve radyolojik incelemelerle ilgili veriler elektronik hastane kayıtlarından toplanmıştır. Çalışmaya katılan hastalardan ve sağlıklı gönüllü kişilerden aydınlatılmış onam alınmıştır. Bütün hastalardan periferal kan örnekleri alınırken ilk yatış anında veya yatış yapılmayan hastalarda da tedavi başlanmadan önce kan numunelerinin alınmasına özen gösterilmiştir. Hastaların aynı gün istenen diğer laboratuvar parametreleri de hastanemiz HBYS sisteminden takip edilmiştir.

3.3. Çalışmadan Hariç Tutulma Kriterleri

Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen kişiler, 18 yaşından küçük kişiler, gebeler çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.4. Laboratuvar Verileri

Serum IP-10 ve IL-18 düzeyleri, kullanılarak Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi kullanılarak üreticilerin talimatlarına göre Bioassay Technology Laboratuvarı Human Interleukin 18 ELISA Kiti ve Bioassay Technology Laboratuvarı Human Interferon Gamma Induced Protein 10kDa ELISA test kiti ile ölçülmüştür.

3.4.1. Reaktifler

1. Antikor kaplı ELISA mikrotitrasyon plate (96 kuyucuklu)
2. Standart solüsyon
3. Standart dilüent
4. Streptavidin-HRP konjugat reaktifi
5. Stop solüsyonu
6. Substrat solüsyonu A

7. Substrat solüsyonu B
8. Yıkama solüsyonu (25x)
9. Biotinlenmiş Anti-human IL-18 ve IP-10 antikor solüsyonu
10. Kullanıcı talimatı

3.4.2. Kit dışındaki malzemeler

ELISA reader ve inkübatör
Otomatik pipet ve pipet uçları
Distile su

3.5. IL-18 Standartlarının Hazırlanması

Öncelikle +4°C’ de bulunan test kiti oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. 25 kat konsantre yıkama solüsyonu 500 ml distile su ile sulandırıldı. IL-18 çalışması için test kitinde yer alan 128 ng/L konsantrasyonunda standard solüsyonundan 120 µL alınıp, üzerine 120 µL standard diluent eklenerek konsantrasyonu 64 ng/L olan Standard No.5 hazırlandı. Ardından bu çözelti kullanılarak seri dilüsyonlar ile 32 ng/L, 16 ng/L, 8 ng/L ve 4 ng/L konsantrasyonlarda kontrol solüsyonları hazırlandı. Test kiti çalışma prosedüründe zero standard (0 ng/mL) olarak adlandırılan standarda ise sadece dilüent eklendi.

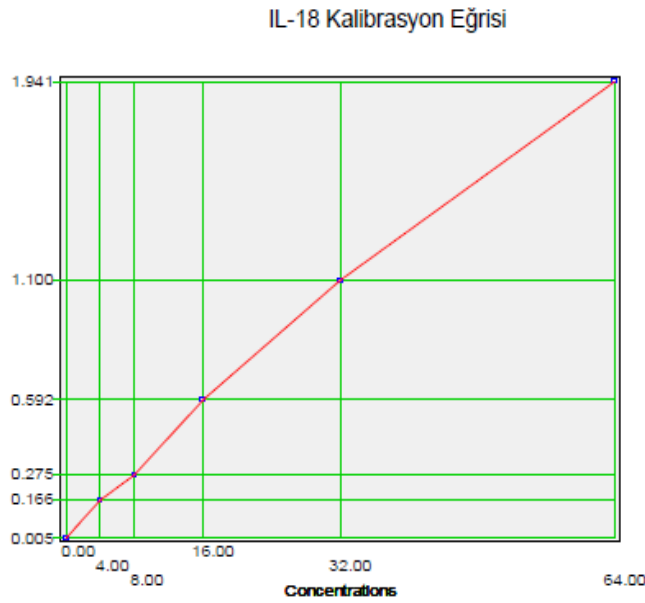
Tablo 1. IL-18 standartlarının hazırlanması

IL-18		
64 ng/L	Standart No.5	120 µl Orijinal Standart + 120 µl Standart Dilüent
32 ng/L	Standart No.4	120 µl Orijinal Standart No.5 + 120 µl Standart Dilüent
16 ng/L	Standart No.3	120 µl Orijinal Standart No.4 + 120 µl Standart Dilüent
8 ng/L	Standart No.2	120 µl Orijinal Standart No.3+ 120 µl Standart Dilüent
4 ng/L	Standart No.1	120 µl Orijinal Standart No.2+ 120 µl Standart Dilüent

3.6. IL-18 Çalışma Basamakları

1. Dondurularak saklanmış hasta serumları oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiştir.
2. Test kitinden çıkan 96 kuyucuklu plağın ilk 5 kuyucuğuna sırasıyla 64ng/L, 32ng/L, 16 ng/L, 8 ng/L ve 4 ng/L konsantrasyonlarda kontrol solüsyonları 50 µl eklendi. 6. kuyucuk ise zero standart olarak belirlendiği için bu kuyucuğa sadece dilüent eklendi.

3. Standard solüsyonların dışındaki kuyucukların her birine hasta serumlarından 40 µl eklendi. Ardından bu kuyucuklara 10'ar µl biotinle işaretlenmiş IL-18 antikorü eklendi.
4. Ardından 50 µl streptavidin-HRP, zero standard dışındaki tüm kuyucuklara eklenip kapatma kağıdı ile plağın üzeri kapatılıp. 60 dk boyunca 37 °C 'de inkübe edildi.
5. İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklar 25 kat dilüe edilmiş yıkama solüsyonu ile 5 kez otomatik yıkama cihazında yıkandı.
6. Bu işlem sonrası tüm kuyucuklara 50 µl substrat solüsyon A ve 50 µl substrat solüsyon B eklenip 10 dk karanlık bir ortamda inkübe edildi.
7. İşlem sonunda tüm kuyucuklara 50µl stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonu eklendikten sonra ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda, boş kuyucuk 0 kabul edilerek tüm kuyucukların optik dansiteleri ölçüldü.
8. Çalışılan IL-18 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 6) .



Standard				
<i>Kind</i>	<i>OD mean</i>	<i>CV</i>	<i>Conc. Nom.</i>	<i>Conc. Calc.</i>
Std1	0.005		0	0.00
Std2	0.166		4	4.00
Std3	0.275		8	8.00
Std4	0.592		16	16.00
Std5	1.100		32	32.00
Std6	1.941		64	64.00

Şekil 6. IL-18 kalibrasyon eğrisi

3.7. IP-10 Standartlarının Hazırlanması

Analiz öncesi +4°C bulunan test kiti ölçüm öncesi oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. 25 kat konsantre yıkama solüsyonu 500 ml distile su ile sulandırıldı. IP-10 çalışması için test kitinde yer alan 1280 ng/L konsatrayonunda standard solüsyonundan 120 µL alınıp, üzerine 120 µL standard diluent eklenerek konsantrasyonu 640 ng/L olan Standard No.5 hazırlandı.

Bu çözelti kullanılarak seri dilüsyonlar ile 320 ng/L, 160 ng/L, 80 ng/L ve 40 ng/L konsantrasyonlarda kontrol solüsyonları hazırlandı. Test kiti çalışma prosedüründe zero standard (0 ng/mL) olarak adlandırılan standarda ise sadece dilüent eklendi.

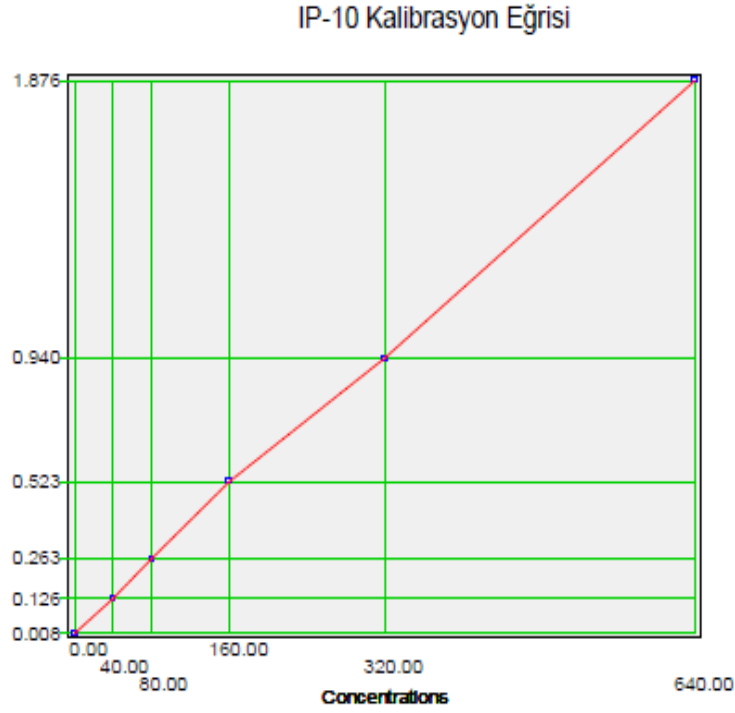
Tablo 2. IP-10 standartlarının hazırlanması

IP-10		
640 ng/L	Standart No.5	120 µl Orijinal Standart + 120 µl Standart Dilüent
320 ng/L	Standart No.4	120 µl Orijinal Standart No.5 + 120 µl Standart Dilüent
160 ng/L	Standart No.3	120 µl Orijinal Standart No.4 + 120 µl Standart Dilüent
80 ng/L	Standart No.2	120 µl Orijinal Standart No.3+ 120 µl Standart Dilüent
40 ng/L	Standart No.1	120 µl Orijinal Standart No.2+ 120 µl Standart Dilüent

3.8 IP-10 Çalışma Basamakları

1. Dondurularak saklanmış hasta serumları oda sıcaklığında çözülmüştür.
2. Test kitinde yer alan 96 kuyucuklu plağın ilk 5 kuyucuğuna sırasıyla 640 ng/L, 320 ng/L, 160 ng/L, 80 ng/L ve 40 ng/L konsantrasyonlarda kontrol solüsyonları 50 µl eklendi. 6. kuyucuk ise zero standart olarak belirlendiği için bu kuyucuğa sadece dilüent eklendi.
3. Standard solüsyonların dışındaki kuyucukların her birine hasta serumlarından 40 µl eklendi. Ardından bu kuyucuklara 10'ar µl biotinle işaretlenmiş IP-10 antikoru eklendi.
4. Ardından 50 µl streptavidin-HRP zero standart dışındaki tüm kuyucuklara eklenip kapatma kağıdı ile plağın üzeri kapatılıp 60 dk boyunca 37 °C 'de inkübe edildi.
5. İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklar 25 kat dilüe edilmiş yıkama solüsyonu ile 5 kez otomatik yıkama cihazında yıkandı.
6. Bu işlem sonrası tüm kuyucuklara 50 µl substrat solüsyon A ve 50 µl substrat solüsyon B eklenip 10 dk karanlık bir ortamda inkübe edildi.

7. İşlem sonunda tüm kuyucuklara 50µl stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonu eklendikten sonra ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda, boş kuyucuk 0 kabul edilerek tüm kuyucukların optik dansiteleri ölçüldü.
8. Çalışılan IP-10 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 7) .



Standard				
Kind	OD mean	CV	Conc. Nom.	Conc. Calc.
Std1	0.008		0	0.00
Std2	0.126		40	40.00
Std3	0.263		80	80.00
Std4	0.523		160	160.00
Std5	0.940		320	320.00
Std6	1.876		640	640.00

Şekil 7. IP-10 kalibrasyon eğrisi

Bu çalışmada araştırdığımız IL-18 ve IP-10 serum düzeyleri testin güvenilirliğini artırmak amacıyla aynı hastalar ve aynı ELİSA kiti kullanılarak tekrar çalışılmıştır. Birinci ve ikinci çalışmada sonuçlar istatistiksel olarak birbiriyle benzer olup ikinci çalışmaya ait veriler kullanılmıştır.

3.9. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışma verileri Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 22.0 aracılığıyla değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler medyan \pm standart sapma (minimum-maksimum) olarak sunuldu. Değişkenlerin değerlendirilmesinde Pearson Ki-Kare Testi ve Fisher Kesin Olasılık Testi uygulandı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk Testi kullanılarak incelendi. Normal dağılıma uymadığı belirlenen değişkenler için iki bağımsız grup arasındaki istatistiksel farklılıklarda Mann-Whitney U Testi, üç bağımsız grup arasında istatistiksel farklılıklarda ise Kruskal Wallis Testi istatistiksel yöntem olarak kullanıldı. Normal dağılıma uyduğu saptanan değişkenler için; iki bağımsız grup arasında Student's T Testi, üç bağımsız grup arasında ise Tek Yönlü Varyant Analizi (ANOVA) kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişki Spearman Korelasyon Testi ile değerlendirildi. İstatistik anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Demografik Özellikleri

Çalışma gruplarının %56,7 si erkek bireylerden oluşmaktadır (Her grup için; 13K,17E). Cinsiyet açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p<0,05$). Hafif-orta pnömonili hasta grubunun yaş ortalaması 48,7 dir. Şiddetli pnömonisi olan hasta grubunun yaş ortalaması 61,8 dir. Sağlıklı gönüllüleri yaş ortalaması ise 54,06 dür. Her grup için yaşların medyan değerleri, minimum ve maksimum değerleri Tablo 3 de verilmiştir.

Çalışmanın ilk grubunu oluşturan hastalar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi COVID-19 tanı ve tedavi polikliniğine ateş, öksürük gibi şikayetlerle başvuran veya hastanemiz COVID-19 servislerinde yatan hafif-orta pnömonili veya pnömonisi olmayan hastalardan seçilmiştir. Bu gruptaki kişilerde ek hastalık olarak; 4 hastada hipertansiyon (HT), 2 hastada astım, 1 hastada koroner arter hastalığı (KAH), 1 hastada HT ve Diyabetes mellitus (DM), 1 hastada KAH ve HT birlikteliği mevcuttu. Şiddetli pnömonili gruba dahil edilen 30 hasta ise hastanemiz COVID-19 yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastalardan oluşmaktadır. Bu gruptaki hastalarda ek hastalık olarak; 2 hastada HT, 2 hastada DM, 3 hastada KAH, 3 hastada KOAH, KAH ve HT birlikteliği, 2 hastada KAH ve HT birlikteliği, 2 hastada HT ve DM birlikteliği, 2 hastada DM ve KAH birlikteliği, 1 hastada DM, KAH, HT birlikteliği ve 1 hastada DM, Kronik böbrek yetmezliği (KBY) birlikteliği mevcuttu. Bu hastalar özellikle serviste yatıp klinik olarak kötüleşen veya dış merkezde tanı alıp ardından yoğun bakım ünitesine yatış yapılan hastalar olduğu için kan numunelerinin birçoğunun tedavi altında iken alınabilmesi mümkün olmuştur.

Kontrol grubu ise 30 sağlıklı gönüllüden oluşmaktadır. Sağlıklı gruptaki kişiler seçilirken hasta gruplarının yaş ortalamasına benzer yaştaki kişilerin seçilmesine dikkat edilmiştir. Bu hastalarda ise ek hastalık olarak; 2 hastada DM, 2 hastada HT, 2 hastada DM ve HT birlikteliği mevcuttu. Sağlıklı grubu kişilerden kan numunesi alınırken herhangi bir akut enfeksiyon bulgusunun (Ateş, öksürük, ishal, kas ağrısı, idrar yaparken yanma vs.) olmamasına ve son 1 hafta içinde COVID-19 temaslı izleminde olmamasına özen gösterilmiştir.

Tablo 3. Hastaların ve Kontrol Grubunun Hastaneye Başvuru Sırasındaki Klinik, Demografik ve Laboratuvar Özellikleri

	Hafif-orta Pnömoni	Şiddetli Pnömoni	Sağlıklı Gönüllü
Yaş, Yıl	48,5 (25-80)	62 (35-80)	53 (28-87)
Erkek cinsiyet (%)	17 (%56,7)	17 (%56,7)	17 (%56,7)
Komorbidite (%)	9 (%30)	18 (%60)	6 (%20)
Hemoglobin (g/dL)	13,25 (9,9-17,2)	10,4 (5,1-30,5)	-
WBC (bin/μL)	5,68 (2,89-19,58)	10,9 (4,5-33,4)	-
Trombosit (bin/μL)	199,5 (68-342)	206 (26-365)	-
Lenfosit (bin/μL)	1,135 (0-2,76)	0,72 (0,15-3,06)	-
Nötrofil/ Lenfosit	2,7 (0,9-17)	13,6 (2,55-90,2)	-
CRP (mg/L)	29,5 (0,6-390)	86,4 (3-240)	-
D-Dimer (ng/ml)	465 (132-1906)	1525 (244-10000)	-
Ferritin (ng/ml)	334 (4,94-3273)	761 (148-8285)	-
Prokalsitonin (ng/ml)	0,045 (0,01-0,9)	0,23 (0,02-33,37)	-

4.2. ELISA Yöntemi ile Çalışılan Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda IL-18 düzeyleri açısından üç grup arasında da anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Hafif-orta pnömonili ve pnömonisi olmayan hastalardan oluşan ilk gruptaki kişilerin serum IL-18 düzeyleri incelendiğinde şiddetli pnömoniye sahip ikinci grup hastalardan istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur ($p=0,012$). Sağlıklı grup olarak belirlediğimiz üçüncü grupta ise serum IL-18 düzeyleri hafif-orta pnömonisi olan hasta grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p =0,046$). Sağlıklı grup ile şiddetli hasta grubu karşılaştırıldığında ise sağlıklı grupta yine anlamlı olarak yüksek sonuçlar elde edilmiştir ($p=0,00$).

IP-10 için bakıldığında hafif-orta pnömonili hasta grubunda şiddetli pnömonisi olan hasta grubuna göre daha yüksek serum düzeyleri tespit edilmiştir ($p=0,00$). Hafif-orta pnömonili hasta grubu ile sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p =0,064$). Ancak şiddetli pnömonili hasta grubunda IP-10 düzeyleri sağlıklı gruba göre anlamlı seviyede düşük bulunmuştur ($p=0,00$) . IP-10 düzeyleri de IL-18 düzeyleri gibi pnömoninin ve ağır hastalığın şiddeti ile birlikte artmamıştır.

Tablo 4. Üç grubun IL-18 ve IP-10 medyan, minimum, maksimum değerleri

	Hafif-Orta Pnömoni	Şiddetli Pnömoni	Sağlıklı Gönüllü
IL-18 medyan (min.-max.) (ng/L)	17,5500 (8,60 ±75,90)	14,500 (1,10 ± 69,20)	22,2500 (7,70 ± 69,00)
IP-10medyan (min.- max.) (ng/L)	219,000 (131,30 ± 931,90)	138,8500 (14,000±718,50)	257,300 (168,20±518,10)

4.3. IL-18 Ve IP-10 Düzeylerinin Laboratuvar Belirteçleri ile Korelasyonu

Hafif-orta ve şiddetli pnömonili hasta gruplarında hastaların hemoglobin, beyaz kan hücresi (WBC), trombosit, lenfosit, nötrofil/lenfosit, CRP, D-Dimer, ferritin, prokalsitonin düzeyleri ile serum IL-18 ve IP-10 arasındaki korelasyon varlığı incelenmiştir. Her iki grup kendi içinde incelendiğinde bu belirteçlerin IL-18 ve IP-10 düzeyleri ile korele olmadığı bulunmuştur. Hafif-orta pnömonili ve şiddetli pnömonili hasta gruplarının lenfosit düzeyleri de karşılaştırılmıştır. Lenfosit düzeylerinin hafif-orta pnömonisi olan grupta şiddetli pnömonisi olan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (p=0,012). Kontrol grubu için alınan örneklerde sadece IL-18 ve IP-10 düzeyleri araştırılmıştır. Bu sebeple hemoglobin, wbc, trombosit, lenfosit, nötrofil/ lenfosit, CRP, D-Dimer, ferritin, prokalsitonin düzeyleri ile korelasyon olup olmadığı incelenememiştir.

Tablo 5. IL-18 ve IP-10 düzeylerinin diğer laboratuvar belirteçleri ile korelasyonu

	IL-18 Hafif-orta pnömoni	IL-18 Şiddetli pnömoni	IP-10 Hafif-orta pnömoni	IP-10 Şiddetli pnömoni
	Spearma P n's rho	Spearma P n's rho	Spearma P n's rho	Spearma P n's rho
Hemoglobin	-0,66 0,73	-0,22 0,910	-0,99 0,602	0,129 0,496
Wbc	-0,78 0,683	-0,181 0,338	-0,37 0,845	-0,286 0,125
Trombosit	-0,247 0,188	-0,135 0,476	0,208 0,269	-0,307 0,098
Lenfosit	-0,12 0,951	-0,065 0,731	-0,68 0,722	0,131 0,491
Nötrofil/ Lenfosit	-0,110 0,562	-0,167 0,379	0,5 0,795	-0,232 0,217
CRP	-0,235 0,211	0,100 0,601	-0,294 0,115	0,133 0,483
D-Dimer	-0,127 0,505	-0,132 0,488	-0,152 0,423	-0,256 0,173
Ferritin	-0,163 0,426	-0,048 0,803	-0,143 0,485	-0,40 0,837
Prokalsitonin	-0,070 0,770	-0,170 0,369	0,055 0,819	-0,166 0,380

4.4. IL-18 ve IP-10 Düzeylerinin COVID-19 BT Bulgusu ile Korelasyonu

Klinik olarak hafif-orta pnömonisi olan 1. grup hastaların 22 tanesinde orta ve hafif düzeyde (akciğer parankiminin %50 sinden azının tutulduğu) COVID-19 pnömonisi ile uyumlu bulgular mevcuttu. 8 hastada ise herhangi bir BT bulgusu mevcut değildi. Şiddetli pnömonisi olan 2. grupta ise tüm hastalarda BT pozitifliği mevcuttu (akciğer parankiminin %50 sinden fazlasının tutulduğu, yaygın tutulum).

BT bulgusu olan ve BT bulgusu olmayan hafif-orta pnömonili grup hastalarda IL-18 ve IP-10 düzeyleri arasındaki korelasyon araştırılmıştır. BT pozitifliğinin varlığı ile bu belirteçler arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır (IL-18 için $p=0,302$ IP-10 için $p=0,673$). Şiddetli pnömonisi olan hasta grubunda ise tüm hastalarda yaygın BT tutulumu mevcut olduğu için grup içinde IL-18 ve IP-10 düzeyleri arasında korelasyon varlığı araştırılmamıştır.

4.5. Serum IL-18 ve IP-10 Düzeylerinin Mortalite ile İlişkisi

Çalışma süreci boyunca hafif-orta pnömonisi olan grupta 1 kişi (%3,3) ex olmuştur. Şiddetli pnömonili grupta ise 17 kişi (%56,7) hastalık seyri sürecinde ex olmuştur. Ex olan hastaların serum IL-18 ve IP-10 düzeyleri ile ex olmayan hastalardaki düzeyleri karşılaştırılmıştır. Her iki grup da kendi içlerinde değerlendirildiğinde ex olan hastaların sitokin düzeyleri sağ kalanlardan daha yüksek olarak bulunamamıştır. IL-18 ve IP-10 serum düzeylerinin mortalite ile ilişkisi bulunamamıştır (1. Grupta IL-18 için $p=0,94$, IP-10 için $p=0,295$. 2. Grupta IL-18 için $p=0,149$, IP-10 için $p=0,325$).

4.6. Ek Hastalığa Sahip Kişilerin IL-18 ve IP-10 Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Hafif-orta pnömonili grupta 9 kişi ek hastalığa sahipti. Şiddetli pnömonili grupta ise 18 kişi ek hastalığa sahipti. Ek hastalığa sahip kişilerle ek hastalığa sahip olmayan sadece COVID-19 tanısı olan bireylerin IL-18 ve IP-10 düzeyleri her iki grup için de incelenmiş olup anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde, hafif-orta pnömonisi olan grupta ek hastalığı olan bireyler ile ek hastalığa sahip olmayan bireylerin IL-18 ve IP-10 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (IL-18 için; $p=0,99$, IP-10 için $p=0,128$). Şiddetli pnömonisi olan grupta da ek hastalığa sahip bireyler ile ek hastalığa sahip olmayan bireylerin IL-18 ve IP-10 düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktu (IL-18 için; $p=0,137$, IP-10 için; $p=0,127$).

5. TARTIŞMA

COVID-19, SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu, asemptomatik veya hafif semptomlardan akut solunum sıkıntısı sendromuna dönüşebilen inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalık şiddetini yönlendiren moleküler mekanizmalar belirsizliğini koruyor olsa da, IL-6 ve LDH gibi inflamatuvar mediyatörlerin şiddetli vakalarla klinik ilişkisi, hiperinflamasyonun klinik sonucun merkezinde olduğunu düşündürmektedir (75). Bu nedenle sitokinlerin ölçümü, hastalığın ilerlemesinin bir göstergesi olabilir ve tedavi için daha kesin yaklaşımlar sağlayabilir (1).

Şiddetli COVID-19 vakaları, nihayetinde organ yetmezliğine ve hastanın ölümüne yol açabilecek güçlü bir inflamatuvar süreç ile karakterizedir. İnflamatuvar süreçlerin indüklenmesi, sıklıkla farklı uyarılara yanıt olarak sitozolde toplanan protein platformları olan inflamatuvar süreçlerin devreye girmesini gerektirir. Bu platformlardan bir tanesi NLRP3 inflamazomudur (76). IL-1 süper ailesinin bir üyesi olan IL-18, yapısal olarak IL-1 β 'ya benzeyen bir proinflamatuvar sitokindir. IL-18, IFN-y üretimini teşvik eder ve güçlü bir Th1 yanıtını indükler. Fizyolojik koşullarda IL-18, endojen inhibitör IL-18 bağlayıcı protein (IL-18BP) tarafından düzenlenir ve IL-18'in aktivitesi dengelenir. Birkaç inflamatuvar hastalıkta IL-18 aktivitesinin dengesiz olduğu ve IL-18BP ile IL-18 nötralizasyonunun yetersiz olduğu bildirilmektedir. IL-18, bir Th1 sitokin olarak IFN-y üretimini indüklemek için IL-12 ile sinerjistik olarak hareket eder ve IL-18, IL-4 ve IL-13 gibi T helper 2 (Th2) sitokinlerinin üretimini indüklemek için ise tek başına hareket eder. Ek olarak, IL-18 tek başına NK hücre aktivitesini ve FAS ligand ekspresyonunu artırır. Son yıllarda IL-18'in biyolojik ve patolojik rolleri birçok hastalıkta incelenmiştir (77). Orta ve şiddetli COVID-19 hastalarının postmortem materyalleri incelendiğinde aktif NLRP3 inflamasyonu bulunmuştur. Bu da NLRP3 inflamazomunun SARS-CoV-2 enfeksiyonuna yanıt olarak aktive olduğu ve COVID-19 hastalarında aktif olduğunu düşündürmektedir (78). SARS-CoV-2 patolojilerinin gelişiminde birçok hücrede eksprese edilen güçlü bir proinflamatuvar sistem olan NLRP3 inflamazom varlığı akılda tutulmalıdır (79). NLRP3 iltihabı, mikrobiyal patojenler, inflamatuvar hastalıklar, kanser ve metabolik ve otoimmün bozukluklar dahil olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde yer almıştır ve ayrıca çeşitli böbrek hastalıklarında yer almıştır (77).

Önceki çalışmalarda, SARS-CoV' un NLRP3 inflamasyonunu aktive ettiği ve iyon kanalı oluşturan E proteini ve aynı zamanda SARS-CoV-2'nin yapısal bileşenleri olan ORF8b ile insan makrofajları tarafından IL-18 üretimini indüklediği gösterilmiştir (80). SARS-CoV enfeksiyonunda, IL-18 düzeylerinin, sağlıklı deneklerdekilere kıyasla önemli ölçüde yükseldiği ve IL-6 ile IL-8 dahil olmak üzere diğer birçok sitokin artan düzeyleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ek olarak, IL-18 konsantrasyonları, hayatta kalanlara kıyasla hayatta kalmayanlarda önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (60). Dolaşımdaki IL-18 düzeylerinin ateşin başlamasından 4-6 gün sonra zirve yaptığı ve nekahet döneminde normale döndüğü de rapor edilmiştir. Ancak IL-18'in SARS-CoV üzerindeki rolünü araştıran çalışmalarda çelişkili sonuçlar da ortaya çıkmıştır. ARDS'li SARS hastalarında IL-18'in akciğer dokusu ekspresyonu büyük ölçüde artmış olmasına rağmen serum konsantrasyonlarının düşük olduğu bildirilmiştir (81). Birçok bakteriyel enfeksiyondan farklı olarak, viral enfeksiyonlar yaygın olarak artan dolaşımdaki ferritin konsantrasyonları ile birlikte proinflamatuvar sitokin IL-18'in yüksek serum konsantrasyonları ile karakterize edilir. Sağlıklı yetişkinlerde IL-18, 200 pg/mL'den daha düşük konsantrasyonlarda ölçülmektedir ve özellikle ferritin ile korelasyonu bilinmektedir (10). Rodrigues ve ark.'ın 124 COVID-19 hastası ve sağlıklı gönüllü kişiler ile yaptığı bir çalışmada, şiddetli hasta grubunda, hafif ve orta şiddetli gruba göre daha yüksek IL-18 düzeyleri bulunmuştur. IL-18 düzeylerinin IL-6 ve CRP düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ex olan hastalarda ise hayatta kalanlara kıyasla daha yüksek IL-18 düzeyleri rapor edilmiştir. IL-18 düzeylerinin hastaların komorbiditelerinden ve bakteriyel koenfeksiyonlar, nefropati, obezite, cinsiyet, serebrovasküler olay, pnömopati, immün yetmezlik ve neoplazi dahil klinik parametrelerden etkilenip etkilenmediğini değerlendirilmiş ve anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. IL-18 düzeylerinin incelenen tüm gruplarda günler içinde azaldığı ve normal düzeye indiği gözlenmiştir. (78). Satış ve ark. yaptığı bir çalışmada ise IL-18 düzeylerinin kötü prognozu yüksek oranda öngören IL-6'ya göre, ferritin ve prokalsitonin ile daha iyi korelasyon gösterdiği bunların arasında IL-6 ve IL-18 arasında zayıf korelasyon bulunduğu belirtilmiştir. Bu da her iki yolun bağımsız işlevini düşündürmektedir. Ayrıca, organ hasarını yansıtan biyokimyasal belirteçler için IL-18'in IL-6'dan daha iyi korelasyon gösterdiğine dikkat çekilmiştir (8).

Chi ve ark. yaptığı bir çalışmada COVID-19 enfeksiyonuna sahip asemptomatik, hafif, orta ve şiddetli vakalar dahil 74 hastadan oluşan bir kohort çalışmasında IL-6, IL-7, IL-10, IL-18, G-CSF, M-CSF, MCP-1, MCP-3, IP-10, MIG ve MIP-1 α düzeyleri hastalık şiddeti ile ilişkili olarak bulunmuştur. IL-18 düzeylerinde asemptomatik hastalar ile sağlıklı grup arasında bir anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Hafif-orta grup hastalarda ise ağır grup hastalara göre daha yüksek IL-18 ve IP-10 düzeyleri tespit edilmiştir. Semptomatik vakalardaki sitokin düzeyleri semptom başlangıcından itibaren geçen süre ile analiz edilmiş ve COVID-19'un şiddeti ile ilişkili bulunan birçok sitokinin yaklaşık 6-8 gün sonra (hastalığın akut fazı) zirveye ulaştığı tespit edilmiş ve ardından serum düzeylerinde düşüş gözlenmiştir (82).

Zhang ve ark. yaptığı bir çalışmada IL-1 β , IL-6 ve IL-18'in COVID-19 hastalarının pulmoner makrofajlarındaki düzeylerinin kontrol donörlerinden daha yüksek oranda eksprese edildiğini ortaya çıkarmıştır (83). Yang ve ark. yaptığı bir çalışmada ise COVID-19 hastalarında 30 farklı sitokin düzeyleri araştırılmıştır. ARDS gelişen hastalarda ARDS gelişmeyenlere göre IP-10, MCP-3, HGF, MIG, IL-1 α ve MIP-1 α ekspresyon düzeylerinin Murray skorlarının yüksek olduğu ve pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuş olup IL-1 α , IL-2 α , IL-6, IL-10, IL-18, M-CSF ve IFN- γ düzeylerinin Murray skorları anlamlı olsa da daha zayıf korelasyon gösterdiği bulunmuştur (84). ARDS' li COVID-19 hastaları ile bakteriyel sepsisli hastalarda TNF, IL-6 ve IL-8 düzeylerinin incelendiği bir çalışmada ise ARDS' li COVID-19 hastalarında plazma sitokin seviyelerinin bakteriyel sepsisli hastalara kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada ARDS' li COVID-19 hastalarında bakteriyel sepsis hastalarına göre lenfosit sayıları da düşük bulunmuş olup araştırılan sitokinlerle korele olduğunu bulunmuştur. Bu bulguların muhtemelen ciddi pulmoner hasarlanmanın varlığına rağmen genel hastalık şiddetinin düşük olmasından kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir. Bu ön analizin bulguları, COVID-19'un sitokin fırtınası ile karakterize edilemeyebileceğini düşündürmektedir (85).

Biz çalışmamızda IL-18 düzeylerini hafif-orta pnömonili grupta, şiddetli pnömonili hasta grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulduk. Birçok çalışmada IL-18 düzeylerinin ağır yani şiddetli pnömonili hasta grubunda yükselmiş olduğu ve prognostik bir belirteç olabileceği belirtilmiş olsa da bizim sonuçlarımıza benzer bulgular da mevcuttur.

Serum IL-18 düzeyinin COVID-19 şiddeti ve diğer inflamatuvar belirteçlerin yanı sıra hayati organ hasarını yansıtan biyokimyasal belirteçlerle önemli bir korelasyona sahip olmadığını bulduk.

Çalışmamızda araştırılan bir diğer belirteç ise IP-10 'du. COVID-19 ile ilgili birçok çalışma hastaların ciddi bir tromboembolizm riski altında olduğunu göstermektedir (11). Chen ve ark. COVID-19 hastalarında yaptığı bir çalışmada IP-10 düzeylerinin diğer inflamatuvar sitokinlerle (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF- α) ve D-dimer, PT zamanı gibi koagülasyon parametreleri ile korele olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada kritik hastaların serumunda hem IP-10 hem de MCP-1 düzeyinin ağır hastalardakinden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar IP-10 molekülünün hastalık şiddeti ile ilişkili bir molekül olabileceğini düşündürmüştür (14).

Farklı klinik şiddete sahip COVID-19 hastaları ile yapılan çalışmada IP-10 ve MCP-3 düzeyinin kritik hastalarda ağır hasta grubuna göre daha yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur. Bu sitokinlerin COVID-19'un hastalık ilerlemesi için öngörücü olarak kullanılıp kullanılamayacağını daha da analiz edilmiştir. Hastalık şiddeti ve prognozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Kritik hastalarda yüksek IP-10 düzeylerinin uzun süre yüksek düzeylerini koruduğu ancak hafif, orta ve ağır grupta 10. Günden sonra düşüş gösterdiği bulunmuştur. COVID-19 'da hastalığın erken evresinde IP-10 düzeylerinin saptanması, spesifik tedavi stratejisinin formüle edilmesi için faydalı bilgiler sağlayabileceği vurgulanmıştır. IP-10'un COVID-19 progresyonunun öngörülmesi için iyi bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceği ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu belirtilmiştir (84).

Chi ve ark. 'nın COVID-19 hastalarında sitokin ve kemokin düzeylerini araştırdığı bir çalışmada asemptomatik ve semptomatik hastalarda IP-10 düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, IP-10, IL-10 ve IL-7'nin şüpheli vakalar ve yakın temaslılar arasında asemptomatik enfeksiyonların belirlenmesine yardımcı olabileceğini göstermiştir. Klinik olarak orta grup olarak belirlenen hastalarda ise hafif kliniğe göre daha yüksek IP-10 düzeyleri bulunmuştur.

Bu sonuçlar IP-10 düzeyinin klinik semptomların öngörücüsü olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, COVID-19 ile iyileşen bireylerde serum sitokin ve kemokin konsantrasyonları normal düzeylere düşmüştür. Bu sonuçlar, SARS-CoV-2'nin neden

olduğu proinflatuar sitokin ve kemokin üretimini sadece semptomatik hastalarda değil, klinik semptomu olmayan olgularda da gözlendiğini ve iyileşme sonrasında normale döndüğünü göstermiştir. Bu bulgular, sitokinlerin ve kemokinlerin SARS-CoV-2 enfeksiyonunun "habercileri" olarak hizmet edebileceğini ve COVID-19'un tüm aşamalarında patogenezi ve sonuçları anlamamıza katkıda bulunabileceğini göstermektedir (82).

Biz çalışmamızda ise kontrol grubu olarak belirlediğimiz sağlıklı kişilerle orta-hafif kliniğe sahip kişiler arasında anlamlı bir fark bulamadık. Orta-hafif kliniğe sahip kişilerde ise literatürden farklı olarak şiddetli hasta grubuna göre daha yüksek IP-10 düzeyleri tespit ettik. Bu sonuç bu sitokinlerin daha erken dönemde yükselip 10. günden sonra düzeylerinin düşmesine bağlı ortaya çıkmış olabilir (78). Ayrıca çalışmamızda hastaların D-dimer, prokalsitonin, ferritin gibi belirteçlerle korelasyonu karşılaştırılmış herhangi bir korelasyon bulunamamıştır. IP-10 düzeyinin, klinik şiddeti ve mortaliteyi öngörmeye etkili olmadığı bulunmuştur.

Bulgularımızın yorumlanmasında aşığıdaki sınırlamalar dikkate alınmalıdır. Birincisi, SARS-CoV-2 PZR testi pozitif vakaları yakalayıp negatifleşmeden örnek almanın zorluğu nedeniyle denek sayısı sınırlıydı. Çalışmaya dahil edilen hastalarda SARS-CoV-2 PZR testi pozitif saptandıktan sonra kan örneği alınmaya çalışılmış olsa da şiddetli pnömonisi olan yoğun bakım hastaları, COVID-19 tanısı alıp ardından klinik durumu kötüleşen veya dış merkezden hastanemize sevk edilen hastalar olduğundan dolayı kan örnekleri PZR pozitifliğinin daha ileri dönemlerinde alınmıştır. İkinci olarak çalışmaya dahil edilen hastalardan sadece bir kez kan örneği alınmış olup günlük olarak sitokin düzeyleri incelenememiştir. Bunlar dışında hastaların semptomlarının kaçınıcı günü hastaneye başvurduğu bilinmediği için çalışmamızda kalitatif PZR sonucu verilmiştir bu sebeple viral yüklerin sitokin düzeyleri ile korelasyonuna bakılmamıştır. Ayrıca çalışmamızda serum dışında özellikle akciğer kaynaklı örneklerde bu sitokin seviyelerinin bakılmamış olması da çalışmamızı sınırlandıran durumlardan birisidir. Bu nedenle, bu immünolojik tepkileri doğrulamak için viral ve hasta faktörlerinin tam katılımını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

- Serum IL-18 ve IP-10 konsantrasyonları, hastalık şiddeti, görüntüleme tetkikleri ve mortalitenin yanı sıra hayati organ hasarını göstermede tek başına hayati öneme sahip değildir.
- Hafif ve ağır hasta grubundaki serum düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek değildi.
- Ağır hasta grubundaki serum IL-18 ve IP-10 düzeylerinin düşük olmasının sebebi olarak bu sitokinlerin 6-8. Günde pik yapıp ardından düşüşe geçmesi ile ilgili olabilir.
- Serum IL-18 ve IP-10 düzeylerini sadece başvuru sırasında ölçülmüştür. Belirli zaman periyotlarıyla seri ölçümler hastalığın sonucu üzerindeki rolünü daha iyi netleştirebilir.
- IL-18 fonksiyonlarını nötralize eden ve serbest, biyolojik olarak aktif IL-18'in plazma konsantrasyonlarını azaltan IL-18BP düzeylerinin ölçülmesi hastalığın patogeneze katkıda bulunabilir.
- COVID-19 hastalarında IL-18 ve IP-10 düzeylerinin serum dışındaki materyallerde de (Örneğin; akciğer dokusu veya balgam) incelenmesi daha doğru sonuçlar verebilir.
- Bununla birlikte, bu bulguları doğrulamak için daha büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Ghazavi A, Ganji A, Keshavarzian N, Rabiemajd S, Mosayebi G. Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. *Cytokine*. 2021;137:155323.
2. Zhang W, Zhao Y, Zhang F, Wang Q, Li T, Liu Z, et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China. *Clinical Immunology*. 2020;214:108393.
3. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses*. 2020;12(4):372.
4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric R, Groot RJD, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. 2020.
5. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *Jama*. 2020;324(8):782-93.
6. Nile SH, Nile A, Qiu J, Li L, Jia X, Kai G. COVID-19: Pathogenesis, cytokine storm and therapeutic potential of interferons. *Cytokine & growth factor reviews*. 2020;53:66-70.
7. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlöber HA, Schlaak M, et al. Cytokine release syndrome. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):1-14.
8. Satış H, Özger HS, Yıldız PA, Hızıl K, Gulbahar Ö, Erbaş G, et al. Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. *Cytokine*. 2021;137:155302.
9. Zalinger ZB, Elliott R, Weiss SR. Role of the inflammasome-related cytokines Il-1 and Il-18 during infection with murine coronavirus. *Journal of neurovirology*. 2017;23(6):845-54.

10. Slaats J, Ten Oever J, van de Veerdonk FL, Netea MG. IL-1 β /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: distinct inflammatory programs in infections. *PLoS pathogens*. 2016;12(12):e1005973.
11. Wang T, Chen R, Liu C, Liang W, Guan W, Tang R, et al. Attention should be paid to venous thromboembolism prophylaxis in the management of COVID-19. *The Lancet Haematology*. 2020;7(5):e362-e3.
12. Tian S, Hu W, Niu L, Liu H, Xu H, Xiao S-Y. Pulmonary pathology of early-phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *Journal of thoracic oncology*. 2020;15(5):700-4.
13. van den Borne P, Quax PH, Hoefler IE, Pasterkamp G. The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. *BioMed research international*. 2014;2014.
14. Chen Y, Wang J, Liu C, Su L, Zhang D, Fan J, et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Molecular Medicine*. 2020;26(1):1-12.
15. Wichmann D, Sperhake J-P, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. *Annals of internal medicine*. 2020;173(4):268-77.
16. AYHANCI T, ALTINDİŞ M. COVID-19 İmmünopatogenezi ve Sitokin Fırtınası. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*. 2020;4:65-9.
17. ERYILMAZ E, KEŞLİ R. SARS KORONAVİRÜS-2 (SARS-CoV-2) VİROLOJİK ÖZELLİKLERİ VE DİĞER KORONAVİRÜSLERDEN FARKI. *Selçuk Sağlık Dergisi.1(Covid-19 Özel):1-9*.
18. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *Journal of medical virology*. 2020;92(4):424-32.
19. Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(12):836-48.

20. Jahangir MA, Muheem A, Rizvi MF. Coronavirus (COVID-19): history, current knowledge and pipeline medications. *International Journal of Pharmaceutics & Pharmacology*. 2020;4(1).
21. Cyranoski D. Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *Nature*. 2020:22-6.
22. Gürlevik SL. Koronavirüsler ve Yeni Koronavirüs SARS-CoV-2. *Cocuk Enfeksiyon Dergisi*. 2020;14(1):46-8.
23. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*. 2020.
24. DUMAN ZG, İNAL AS, Kurtaran B. SARS-CoV-2 Mikrobiyoloji ve Patogenez. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*.29(Özel Sayı):11-23.
25. Weston S, Frieman M. COVID-19: knowns, unknowns, and questions. *mSphere* 5: e00203-20. 2020.
26. Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *The Lancet*. 2020;395(10225):689-97.
27. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *New England journal of medicine*. 2020.
28. Organization WH. Novel Coronavirus (2019-nCoV(: situation report, 3. 2020.
29. of the International CSG. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*. 2020;5(4):536.
30. Tanriverdi ES, Yakupoğulları Y, Otlu B. COVID-19 etkeninin özellikleri. *Çiçek C*, editör *Mikrobiyoloji ve COVID-19*. 2020;1:7-14.
31. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*. 2015:1-23.

32. Liu DX, Liang JQ, Fung TS. Human coronavirus-229E,-OC43,-NL63, and-HKU1. Reference Module in Life Sciences. 2020.
33. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*. 2020;395(10224):565-74.
34. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*. 2020;42(1):3-11.
35. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell host & microbe*. 2020;27(3):325-8.
36. Dhamad AE, Rhida MAA. COVID-19: molecular and serological detection methods. *PeerJ*. 2020;8:e10180.
37. Prates ET, Garvin MR, Pavicic M, Jones P, Shah M, Demerdash O, et al. Potential pathogenicity determinants identified from structural proteomics of SARS-CoV and SARS-CoV-2. *Molecular Biology and Evolution*. 2021;38(2):702-15.
38. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2020;10(7):1228-38.
39. Goudouris ES. Laboratory diagnosis of COVID-19☆. *Jornal de pediatria*. 2021;97:7-12.
40. Rai P, Kumar BK, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021:1-15.
41. Feng W, Newbigging AM, Le C, Pang B, Peng H, Cao Y, et al. Molecular diagnosis of COVID-19: challenges and research needs. *Analytical chemistry*. 2020;92(15):10196-209.
42. Lai CK, Lam W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and biophysical research communications*. 2021;538:226-30.

43. Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, Vauloup-Fellous C, Morand-Joubert L, Roque-Afonso A-M, et al. Evaluation of a rapid diagnostic assay for detection of SARS-CoV-2 antigen in nasopharyngeal swabs. *Journal of clinical microbiology*. 2020;58(8):e00977-20.
44. Bozdayı G, Çağlar K, Fidan I. COVID-19 Pandemisi: Tıbbi Viroloji Laboratuvarının Rolü. *GMJ*. 2020;31:251-4.
45. Martines RB, Ritter JM, Matkovic E, Gary J, Bollweg BC, Bullock H, et al. Pathology and pathogenesis of SARS-CoV-2 associated with fatal coronavirus disease, United States. *Emerging infectious diseases*. 2020;26(9):2005.
46. Zhang Y, Geng X, Tan Y, Li Q, Xu C, Xu J, et al. New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020:110195.
47. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*. 2020;181(2):271-80. e8.
48. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2020;10(2):102-8.
49. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in immunology*. 2020;41(12):1100-15.
50. Yazdanpanah F, Hamblin MR, Rezaei N. The immune system and COVID-19: Friend or foe? *Life sciences*. 2020:117900.
51. García LF. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 2020;11(1441).
52. Cecere TE, Todd SM, LeRoith T. Regulatory T cells in arterivirus and coronavirus infections: do they protect against disease or enhance it? *Viruses*. 2012;4(5):833-46.
53. Manni ML, Robinson KM, Alcorn JF. A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection. *Expert review of respiratory medicine*. 2014;8(1):25-42.

54. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LF. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(6):363-74.
55. MAVİ D, İNKAYA AÇ. COVID-19: İmmün Patogenez. *FLORA*. 2020;25(28).
56. Tetro JA. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? *Microbes and infection*. 2020;22(2):72-3.
57. Guan W-j, Ni Z-y, Hu Y, Liang W-h, Ou C-q, He J-x, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine*. 2020;382(18):1708-20.
58. Ravelli A. Macrophage activation syndrome. *Current opinion in rheumatology*. 2002;14(5):548-52.
59. BAYRAKAL V. COVID-19 ve Doğal İmmün Sistem Cevabı.
60. Vecchié A, Bonaventura A, Toldo S, Dagna L, Dinarello CA, Abbate A. IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? *Journal of Cellular Physiology*. 2021;236(3):1638-57.
61. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunological reviews*. 2018;281(1):138-53.
62. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V. High IL-6/IFN- γ ratio could be associated with severe disease in COVID-19 patients. *Journal of medical virology*. 2020;92(10):1789-90.
63. Mangan MS, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018;17(8):588-606.
64. Grailer JJ, Canning BA, Kalbitz M, Haggadone MD, Dhond RM, Andjelkovic AV, et al. Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. *The journal of immunology*. 2014;192(12):5974-83.
65. Shah A. Novel coronavirus-induced NLRP3 inflammasome activation: a potential drug target in the treatment of COVID-19. *Frontiers in immunology*. 2020;11.

66. Kaivola J, Nyman TA, Matikainen S. Inflammasomes and SARS-CoV-2 Infection. *Viruses*. 2021;13(12):2513.
67. Boraschi D, Dinarello CA. IL-18 in autoimmunity. *European cytokine network*. 2006;17(4):224-52.
68. Rodrigues TS, Sa KS, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasome activation in COVID-19 patients. *medRxiv*. 2020.
69. Zhou X, Cheng Z, Luo L, Zhu Y, Lin W, Ming Z, et al. DIC in COVID-19. *Thrombosis Research*. 2021.
70. Abou-Ismaïl MY, Diamond A, Kapoor S, Arafah Y, Nayak L. The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. *Thrombosis research*. 2020.
71. Lupieri A, Smirnova NF, Solinhac R, Malet N, Benamar M, Saoudi A, et al. Smooth muscle cells-derived CXCL10 prevents endothelial healing through PI3K γ -dependent T cells response. *Cardiovascular research*. 2020;116(2):438-49.
72. Coperchini F, Chiovato L, Croce L, Magri F, Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine & growth factor reviews*. 2020;53:25-32.
73. Chu H, Chan JF-W, Wang Y, Yuen TT-T, Chai Y, Hou Y, et al. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(6):1400-9.
74. <https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/depo/algoritmalar/COVID19-PLKACILHASTAYONETIMI.pdf> 2021 [
75. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*. 2020;395(10223):497-506.

76. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inerra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature medicine*. 2015;21(3):248-55.
77. Hirooka Y, Nozaki Y. Interleukin-18 in inflammatory kidney disease. *Frontiers in Medicine*. 2021;8:193.
78. Rodrigues TS, de Sá KS, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *Journal of Experimental Medicine*. 2021;218(3).
79. Ratajczak MZ, Kucia M. SARS-CoV-2 infection and overactivation of Nlrp3 inflammasome as a trigger of cytokine “storm” and risk factor for damage of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2020;34(7):1726-9.
80. Shah A. Novel coronavirus-induced NLRP3 inflammasome activation: a potential drug target in the treatment of COVID-19. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1021.
81. SARS BGoNRPf. Dynamic changes in blood cytokine levels as clinical indicators in severe acute respiratory syndrome. *Chinese medical journal*. 2003;116(09):1283-7.
82. Chi Y, Ge Y, Wu B, Zhang W, Wu T, Wen T, et al. Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China. *The Journal of infectious diseases*. 2020;222(5):746-54.
83. Zhang J, Wu H, Yao X, Zhang D, Zhou Y, Fu B, et al. Pyroptotic macrophages stimulate the SARS-CoV-2-associated cytokine storm. *Cellular & molecular immunology*. 2021;18(5):1305-7.
84. Yang Y, Shen C, Li J, Yuan J, Wei J, Huang F, et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;146(1):119-27. e4.

85. Kox M, Waalders NJ, Kooistra EJ, Gerretsen J, Pickkers P. Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. *Jama*. 2020;324(15):1565-7.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/863

31.12.2020

Sayın Dr Öğretim Üyesi Demet Gür Vural

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Covid-19 hastalığının şiddeti ile ilişkili biyolojik belirteçler olarak İnterlökin-18 (IL-18) ve İndüklenbilir protein (IP-10) düzeylerinin değerlendirilmesi başlıklı OMÜ KAİK 2020/732 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması / nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekeçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 30.12.2020 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Ek.2 Turnitin Orjinallik Raporu

COVID-19 HASTALIĞININ ŞİDDETI İLE İLİŞKİLİ BİYOLOJİK BELİRTEÇLER OLARAK İNTERLÖKİN-18 VE İNDÜKLENEBİLİR PROTEİN-10 DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 14	% 13	% 6	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet Kaynağı	% 2
2	acikerisim.ohu.edu.tr Internet Kaynağı	% 1
3	dergipark.org.tr Internet Kaynağı	% 1
4	acikerisim.uludag.edu.tr Internet Kaynağı	% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Kaynağı	% 1
6	www.mobil-ed.net Internet Kaynağı	% 1
7	9lib.net Internet Kaynağı	% 1
8	medicaljournal.gazi.edu.tr Internet Kaynağı	<% 1