



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALL-TRANS RETİNOİK ASİT VE 1,25-DİHİDROKSİ VİTAMİN
D3'ÜN SARS-COV-2 HEDEF VE ARACI MOLEKÜLLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UĞUR ARSLANYÜREKLİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tezli Yüksek Lisans Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Gaziantep
2022



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALL-TRANS RETİNOİK ASİT VE 1,25-DİHİDROKSİ VİTAMİN
D3'ÜN SARS-COV-2 HEDEF VE ARACI MOLEKÜLLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UĞUR ARSLANYÜREKLİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tezli Yüksek Lisans Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Gaziantep
2022

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı

ALL-TRANS RETİNOİK ASİT VE 1,25-DİHİDROKSİ VİTAMİN D3'ÜN
SARS-COV-2 HEDEF VE ARACI MOLEKÜLLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Uğur ARSLANYÜREKLİ

Tez Savunma Tarihi: 05/07/2022

Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne; Bu çalışmanın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmza

Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Doç. Dr. Elif ONUR

Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

05.07.2022

UĞUR ARSLANYÜREKLİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilimsel katkısı, görüş ve önerilerinden ve tüm desteklerinden dolayı sayın hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN'e,

Tez çalışmam süresince bilgi, destek ve tecrübelerini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Emel ŞAHİN'e,

Yine deneyimleri ve bilgileri ile yardımcı olan başta Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI hocama ve bölümde görevli bütün öğretim üyelerine,

Bugünlere gelmeme vesile olan ve tüm eğitim hayatım süresince her zaman yanımda olan babam Ahmet ARSLANYÜREKLİ ve annem Leyla ARSLANYÜREKLİ' ye

Ve yanımda olduğu günden beri her konuda desteğini ve yardımını hiç esirgemeyen hayat arkadaşım, sevgili eşime,

Tez çalışmamı yapmam için maddi destek veren Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (BAPYB)'ne,

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGE VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİL LİSTESİ	IX
TABLO LİSTESİ	XII
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Koronavirüsün Tanımı ve Tarihiçesi.....	6
2.2. Koronavirüs Ailesi	8
2.3 Genom yapısı ve kodlanan proteinler	10
2.4. Koronavirüs girişi ve replikasyonu: SARS CoV 2.....	16
2.5. Sars-CoV-2 Hastalık Etkeni: Covid-19.....	19
2.5.1. Epidemiyolojisi	19
2.5.2. Bulaş yolu	20
2.5.3. Risk faktörleri.....	21
2.5.3.1. Hafif Şiddette Hastalık.....	22
2.5.3.2. Orta Şiddette Hastalık	22
2.5.3.3. Ağır Şiddette Hastalık.....	22
2.5.3.4. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS)	22
2.6. ACE2.....	22

2.7. Tmprss2	24
2.8. Tmprss11d	24
2.9. CD147	25
2.10. CD26	25
2.11. Siklofilin A (CYPA)	25
2.12. Endotel Hücresi	26
2.13. D Vitamini	27
2.13.1. D vitaminin yapısı ve etkisi	27
2.13.2. D Vitamininin İmmün Düzenleyici ve Antiviral Rolü	29
2.13.3. D Vitamininin Solunum Yolu İnfeksiyonlarındaki Rolü	30
2.13.4. D Vitamini ve COVID-19	31
2.14. A VİTAMİNİ	32
2.14.1. A vitaminin yapısı ve etkisi	32
2.14.2. A Vitamininin İmmün Düzenleyici ve Antiviral rolü	35
2.14.3. A Vitamininin Solunum Yolu İnfeksiyonlarında Rolü	36
2.14.4. A Vitamini ve COVID-19	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1 GEREÇLER.....	38
3.1.1 Hücre Hattı	38
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	38
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	38
3.2. YÖNTEMLER	39
3.2.1. Hücre Kültürü ve Aşamaları	39
3.2.1.1. Sterilizasyon Aşaması	39
3.2.1.2 Besiyerinin Hazırlanması Aşaması	39
3.2.1.3 Hücrelerin çözülmesi aşaması.....	40
3.2.1.4. Hücre Ekimi Aşaması	40

3.2.2. All-trans retinoik asit (ATRA) Çözültisinin Hazırlanması.....	40
3.2.3. 1,25-dihidroksivitamin D3 (Kalsitriol) Çözültisinin Hazırlanması.....	41
3.2.4. Hücreden RNA İzolasyonu	41
3.2.5. İzole RNA'nın Miktar ve Kalite Tayini	43
3.2.6. İzole RNA'dan cDNA Eldesi.....	43
3.2.7. Primerlerin Seçimi ve Dizayını	44
3.2.8. Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)	45
3.2.9. Hücre Proliferasyonu Deneyi (MTT deneyi)	47
3.2.10. Migrasyon (Yara İyileşmesi).....	49
3.2.11. İstatistiksel Değerlendirmeler	49
4. BULGULAR.....	51
4.1. Hücre Proliferasyonu Deney Sonucu.....	51
4.2. Yara İyileşme Deneyi Sonucu.....	52
4.3. Göreceli Gen Ekspresyon Düzeyleri.....	57
4.3.1. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası ACE2 Geninin Gen İfade Analizi	57
4.3.2. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası TTPRSS2 Geninin Gen İfade Analizi.....	59
4.3.3. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası TTPRSS11D Geninin Gen İfade Analizi.....	60
4.3.4. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası CD147 Geninin Gen İfade Analizi.....	62
4.3.5. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası CD26 Geninin Gen İfade Analizi	63
4.3.6. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası CYP11B2 Geninin Gen İfade Analizi	65
4.3.7. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası ACE2 Geninin Gen İfade Analizi.....	67
4.3.8. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası TTPRSS2 Geninin Gen İfade Analizi.....	69

4.3.9. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası TMRSS11D Geninin Gen İfade Analizi.....	71
4.3.10. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası CD147 Geninin Gen İfade Analizi.....	73
4.3.11. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası CD26 Geninin Gen İfade Analizi.....	75
4.3.12. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası CYP11B Geninin Gen İfade Analizi.....	77
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	79
6. KAYNAKLAR	84



SİMGE VE KISALTMALAR

7-DHC	7-dehidrokolestrol
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
Ang II	Anjiyotensin II
Ang-(1-7)	Anjiyotensin (1-7)
APN	Aminopeptidaz N
ARDS	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
AT1R	Anjiyotensin II reseptör tip 1
ATRA	All-Trans Retinoik Asit
Bat CoV	Yarasa türevi Koronavirüs
CAMP	Kathelesidin antimikrobiyal peptit
CoV	Koronavirüs
COVID-19	Koronavirüs Hastalığı 2019
CRABP	Hücrel Retinoik Asit-Bağlayıcı Protein
CYPA	Siklofilin A
D2 vitamini	Ergokalsiferol
D3 vitamini	Kolekalsiferol
DEFB4	Defensin β 4
DPP4	Dipeptidil Peptidaz-4
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FABP5	Yağ Asidi-Bağlayıcı Protein 5
HCoV	İnsan Koronavirüsü
HCoV-229E	İnsan Koronavirüsü 229E

HIV	İnsan İmmünyetmezlik Virüsü
HRE	Hormon Yanıt Elementi
HUVEC	İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücresi
IBV	Kuş Enfeksiyöz Bronşit Virüsü
IFN-1	İnterferon-1
INF γ	İnterferon gama
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MERS	Ortadoğu Solunum Yolu Sendromu
MHV	Fare Hepatit Virüsü
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NEP	Nötr Endopeptidaz
NO	Nitrik Oksit
NSP	Yapısal Olmayan Protein
ORF	Açık Okuma Çerçeveleri
PCP	Prolilkarboksipeptidaz
PEP	Prolilendopeptidaz
PPAR	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Reseptör
PPAR	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Reseptör
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PR	Prorenin
Pre-VD3	Öncül vitamin D3
RALDH	Retinal Dehidrojenaz
RAR	Retinoik Asit Reseptör
RARE	Retinoik Asit Yanıt Element

RAS	Renin Anjiyotensin Sistemi
RBD	Reseptör Bağlama Alanları
RBP	Retinol Bağlayıcı Protein
RSV	Respiratuar Sinsityal Virüs
RT-PCR	Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RXR	Retinoik X Reseptör
SARS-CoV-2	Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs tip 2
TGEV	Bulaşıcı Gastroentrit Virüsü
Th1	T yardımcı hücre tip 1
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TMPRSS11D	Transmebran Serin Proteaz 11D
TMPRSS2	Transmebran Serin Proteaz 2
vD3	1,25-dihidroksi Vitamin D3(Kalsitriol)
VDR	Vitamin D Reseptörü
VDRE	Vitamin D Response Element

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. CoV 'lerin taksonomik sınıflandırılması.....	9
Şekil 2.2. CoV 'lerin bir filogenetik ağacı.....	10
Şekil 2.3. Koronavirüs Elektron Mikroskopi Görüntüsü.....	11
Şekil 2.4. Koronavirüsün şematik görünümü	12
Şekil 2.5. Dört cins koronavirüsün genom yapısı.....	13
Şekil 2.6. SARS-Cov-2 Genom Yapısı	13
Şekil 2.7. SARS-CoV2'nin hücreye girişi ACE2 ve proteaz TMPRSS2 aracılığıyla olmaktadır	17
Şekil 2.8. Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs tip 2 (SARS-CoV-2) Yaşam Döngüsü	19
Şekil 2.9. Renin-anjiyotensin sisteminin şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.10. D vitamininin senteziyle meydana gelen ara ürünler	28
Şekil 2.11. 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (VD3) ve All-trans retinoik asidin (ATRA) hücre çekirdeğinde bulunan reseptörleri.....	29
Şekil 2.12. A vitamininin senteziyle meydana gelen ara ürünler	34
Şekil 4.1. 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M konsantrasyonlarında uygulanan ATRA'nın hücrelerin proliferasyon yüzdesine etkisi.	51
Şekil 4.2. 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan 1,25 dihidroksi Vitamin D3'ün hücrelerin proliferasyon yüzdesine etkisi.	52
Şekil 4.3. ATRA muamele öncesi açılan boşluk	54
Şekil 4.4. Kalsitriol muamele öncesi açılan boşluk.....	55
Şekil 4.5. Belirli konsantrasyonlarda ATRA uygulanan hücrelerin piksel olarak migrasyon aralığı.	56
Şekil 4.6. Belirli konsantrasyonlarda kalsitriol uygulanan hücrelerin piksel olarak migrasyon aralığı.	56
Şekil 4.7. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası ACE2 gen ekspresyon düzeyleri.....	58

Şekil 4.8. 48 Saatlik ATRA muamelesi sonrası ACE2 geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri.....	58
Şekil 4.9. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası TMPRSS2 gen ekspresyon düzeyleri.....	59
Şekil 4.10. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası TMPRSS2 gen ekspresyon düzeyleri.....	60
Şekil 4.11. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası TMPRSS11D gen ekspresyon düzeyleri.....	61
Şekil 4.12. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası TMPRSS11D gen ekspresyon düzeyleri.....	61
Şekil 4.13. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CD147 gen ekspresyon düzeyleri.....	62
Şekil 4.14. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CD147 gen ekspresyon düzeyleri.....	63
Şekil 4.15. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CD26 gen ekspresyon düzeyleri.....	64
Şekil 4.16. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CD26 gen ekspresyon düzeyleri.....	65
Şekil 4.17. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CYPA gen ekspresyon düzeyleri.....	66
Şekil 4.18. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CYPA gen ekspresyon düzeyleri.....	67
Şekil 4.19. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası ACE2 gen ekspresyon düzeyleri.....	68
Şekil 4.20. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası ACE2 gen ekspresyon düzeyleri.....	69
Şekil 4.21. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası TMPRSS2 gen ekspresyon düzeyleri.....	70
Şekil 4.22. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası TMPRSS2 gen ekspresyon düzeyleri.....	71
Şekil 4.23. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası TMPRSS11D gen ekspresyon düzeyleri.....	72

Şekil 4.24. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası TMRSS11D gen ekspresyon düzeyleri.....	72
Şekil 4.25. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CD147 gen ekspresyon düzeyleri.....	74
Şekil 4.26. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CD147 gen ekspresyon düzeyleri.....	74
Şekil 4.27. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CD26 gen ekspresyon düzeyleri.....	76
Şekil 4.28. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CD26 gen ekspresyon düzeyleri.....	76
Şekil 4.29. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CYP A gen ekspresyon düzeyleri.....	78
Şekil 4.30. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CYP A gen ekspresyon düzeyleri.....	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Yapısal Olmayan Proteinlerin Görevleri	14
Tablo 2.2. Yapısal Olan Proteinlerin görevleri	15
Tablo 2.3. Koronavirüs reseptörleri	16
Tablo 3.1. cDNA sentezinde gerekli komponentlerin miktarları.....	43
Tablo 3.2. cDNA sentezi reaksiyon şartları.....	44
Tablo 3.3. Hedef genlerimiz için dizayn edilen primer dizilimleri.	45
Tablo 3.4. RT-qPCR gerekli komponentlerin miktarları.....	46
Tablo 3.5. qRT-PCR reaksiyon şartları	46

ÖZET

ALL-TRANS RETİNOİK ASİT VE 1,25-DİHİDROKSİ VİTAMİN D3'ÜN SARS-COV-2 HEDEF VE ARACI MOLEKÜLLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Uğur ARSLANYÜREKLİ
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tez danışmanı: Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN
Temmuz 2022, 100 sayfa

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs tip 2 (SARS-CoV-2) yeni bir koronavirüs olup, şiddetli akut solunum yolu hastalığının (Covid-19) etkeni olan RNA virüsüdür. ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D ve CD147 SARS-CoV-2'nin aktivasyonu, enfeksiyonu ve iletimi için gerekli proteinlerdir. ACE2 reseptörleri akciğer, bağırsak, kalp ve böbrek gibi birçok dokuda bulunmaktadır. Endotel hücrelerinde de ACE2 reseptörü bulunmaktadır. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında hücrelerde başta ACE2 olmak üzere diğer aracı moleküller hastalığın seyrini belirleyebilirler. ATRA ve vD3 moleküller etkilerini hücre içinde bulunan reseptörler aracılığıyla gösteren, hücre çekirdeğinde transkripsiyonu düzenleyerek gen düzeyinde etki gösterebilen nükleer hormon reseptörleridir. Yaptığımız literatür taramasında ATRA ve vD3'ün SARS-CoV-2 enfeksiyon mekanizmasına aracılık eden molekül ekspresyonları ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, Covid-19 hastalığına sahip hastalara birçok klinikte tedavi olarak yüksek doz Vitamin D3 verilmektedir. Biz bu çalışmada nükleer hormon reseptör ligandları olarak ATRA ve vD3 uygulayacağımız endotel hücrelerinde SARS-CoV-2 ile ilişkili hücrel moleküllerin ekspresyonlarını analiz edeceğiz. Bu amaçla, endotel hücrelerinde hem ATRA hem de vD3 muamelesi sonucunda ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D, CD147, CD26, CYP11B2 gibi hedef genlerinin ifade değişimleri, hücre proliferasyonu ve migrasyonu araştırılmıştır. Bu genler SARS-CoV-2'nin hedef hücreye giriş mekanizmasının aydınlatılmasında birer potansiyel hedef olabilir. Ayrıca hedef genlerin ifadelerindeki farklı sonuçların analizleri, endotel hücrelerin gen ifade seviyesi üzerindeki etkisine dair literatüre katkıda bulunacaktır. Bunun yanında ATRA endotel hücrelerinde migrasyonu ve hücre proliferasyonunu baskılamıştır. Aynı zamanda vD3 endotel hücrelerinde migrasyonu arttırmış ve hücre proliferasyonunu ya baskılamamış ya da etkilememiştir. Bu bakımdan bulgularımız endotel hücrelerinde SARS-CoV-2'nin mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sunacak ve COVID19 hastalığının tedavisinde literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: ACE2, ATRA, SARS-CoV-2, TMPRSS2, vD3

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ALL-TRANS RETINOIC ACID AND 1,25-DIHYDROXY VITAMIN D3 ON SARS-COV-2 TARGET AND MEDIATOR MOLECULES

Uğur ARSLANYÜREKLİ

Master's Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

July 2020, 100 pages

Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) is a novel coronavirus and RNA virus that is the causative agent of severe acute respiratory disease (Covid-19). ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D and CD147 are proteins required for the activation, infection and transmission of SARS-CoV-2. ACE2 receptors are found in many tissues such as lungs, intestines, heart and kidneys. There is also an ACE2 receptor in endothelial cells. During SARS-CoV-2 infection, other intermediary molecules in the cells, especially ACE2, can determine the course of the disease. ATRA and vD3 are nuclear hormone receptors that exert their molecular effects through receptors located in the cell and can act at the gene level by regulating transcription in the cell nucleus. In our literature review, there was no study on the molecular expressions of ATRA and vD3 mediating the SARS-CoV-2 infection mechanism. In addition, patients with Covid-19 disease are given high doses of Vitamin D3 as a treatment in many clinics. In this study, we will analyze the expressions of cellular molecules associated with SARS-CoV-2 in endothelial cells where we will apply ATRA and vD3 as nuclear hormone receptor ligands. For this purpose, expression changes, cell proliferation and migration of target genes such as ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D, CD147, CD26, CYP11B were investigated as a result of both ATRA and vD3 treatment in endothelial cells. These genes could be potential targets for elucidating the mechanism by which SARS-CoV-2 enters the target cell. In addition, analyses of different results in the expression of target genes will contribute to the literature on the effect of endothelial cells on the level of gene expression. In addition, ATRA suppressed migration and cell proliferation in endothelial cells. It also increased migration in vD3 endothelial cells and did not suppress or affect cell proliferation. In this respect, our findings will contribute to the elucidation of the mechanism of SARS-CoV-2 in endothelial cells and contribute to the literature in the treatment of COVID-19 disease.

Key words: ACE2, ATRA, SARS-CoV-2, TMPRSS2, vD3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs tip 2 (SARS-CoV-2) yeni bir koronavirüs olup şiddetli akut solunum yolu hastalığının (Covid-19) etkenidir. Bu enfeksiyon damlacıklar aracılığıyla solunum yoluyla havadan bulaşmaktadır. Bulaşma oranı oldukça yüksektir. 2019'un aralık ayında Çin'in Wuhan kentinde SARS-CoV-2'nin neden olduğu bu koronavirüs hastalığının ortaya çıkmasından bu yana tüm dünyaya halen yayılmakta ve ölümlere neden olabilmektedir (1).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), damar daraltıcı etkisi olan anjiyotensin II'nin anjiyotensin (1-7)'ye dönüşmesini arttırarak kan basıncının azalmasına neden olur (2). ACE2 ve transmembran serin proteaz 2'nin (TMPRSS2), SARS-CoV-2 için hedef hücreye giriş proteinleri olduğu ve yüksek virüs bağlama kapasitelerine sahip oldukları bilinmektedir. SARS-CoV-2 virüsünün, ACE2 reseptörü aracılığıyla insan hücrelerine bağlandığı ve ilk viral girişe aracılık eden bir proteaz olan TMPRSS2 tarafından daha da kolaylaştırıldığı bilinmektedir (3). Yüksek ACE2 ve TMPRSS2 ekspresyonuna sahip hücreler, güçlü virüs bağlama kapasitesine sahiptir ve enfeksiyona karşı daha duyarlıdır (4). Yaşlılarda gençlere göre ACE2 ve TMPRSS2 protein miktarlarının arttığı bildirilmiştir (5). Ayrıca TMPRSS11D solunum epitel hücrelerinde yüksek oranda bulunur ve SARS koronavirüslerin hedef hücrelerde yüksek oranda yayılmasını sağlayabilir (6). Bunlara ek olarak, transmembran bir protein olan CD147'nin de SARS-CoV-2 için bir başka reseptör olabileceği gösterilmiştir (7).

1,25-dihidroksi Vitamin D3 (vD3, Kalsitriol) ve all-trans retinoik asit (ATRA) yağda çözünen vitaminlerden olup sırasıyla D ve A vitamin türevleridir. Moleküler etkilerini hücre içinde bulunan reseptörler aracılığıyla gösteren aktif moleküllerdir. Nükleer hormon reseptörleri, hücre çekirdeğinde transkripsiyon faktörleri olarak işlev görmektedir. Hormonal olarak düzenlenmiş hedef genlerin gen ifadesini düzenlerler. Hormonun transkripsiyon sürecindeki rolü nükleer reseptör işlevselliğini modüle etmek ve değiştirmektir. Nükleer hormon reseptör ligandları olarak vD3 ve ATRA transkripsiyonu düzenleyerek gen düzeyinde etki gösterebilmektedir. Bu ligandların reseptörleri hormon yanıt elementi (HRE) domeni içerirler ve bunun sayesinde ilgili genlerin promotör bölgelerine spesifik olarak dimerize bir şekilde bağlanabilirler.

Bu ligandların kardiyovasküler sistemde spesifik bir görevi temsil ettiği düşünülmemekle birlikte hücrelerinin bu maddelere büyüme özellikleri ve gen ekspresyonundaki değişikliklerle yanıt verdiği bilinmektedir (8).

SARS-CoV-2'nin neden olduğu Covid-19 sendromu, klinik gidişatı hakkında yeterli deneyime sahip olunamadan ortaya çıkmış yeni bir klinik tehdit olup ilişkili bulguları genelde solunum sistemine aittir. Bununla birlikte, hastaların büyük bir bölümünde kalp dokusunun hasarı ile ilgili semptomlarla karşılaşılmasıyla hastalığın kardiyovasküler nitelikleri de önemsenmeye başlanmıştır. Covid-19 hastalığından daha fazla etkilenen ve en fazla mortaliteye sahip olanların kalp ve damar hastası yaşlılar olmasından dolayı en fazla kardiyoloji uzmanları görev almaya başlamıştır (5). ACE2 reseptörleri bağırsak, böbrek, akciğer ve kalp olmak üzere pek çok dokuda yer almaktadır (9). Aynı zamanda endotel hücrelerinde de ACE2 reseptörü mevcuttur (10) ve virüse maruz kaldıktan sonra endotel hücrelerinde virüsle ilgili kalıntılar gözlemlenebilir. ACE2 proteininin virüsün girişi esnasında hücrenin içerisine alınarak bölünmesi renin anjiyotensin sistemine (RAS) etki ederek anjiyotensin II artışına neden olmaktadır. Endotel hücrelerinin enfeksiyonu sonucunda meydana gelen endotelium iltihabı, apoptozis ve RAS kararlılığında ki arızalanma; kan akışında azalma, ödem ve trombofili gibi pek çok soruna neden olabilmektedir (9).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında hücrelerde başta ACE2 olmak üzere diğer aracı moleküller hastalığın seyrini belirleyebilirler. ACE2 ve diğer reseptör ve aracı molekül ekspresyonlarını modüle edebilecek ajanların araştırılması da önem arz etmektedir. Yaptığımız literatür taramasında ATRA ve 1,25-dihidroksi vitamin D3'ün SARS-CoV-2 enfeksiyon mekanizmasına aracılık eden molekül ekspresyonları ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Şunu da belirtmek gerekir ki, Covid-19 hastalığına sahip hastalara birçok klinikte tedavi olarak yüksek doz Vitamin D3 verilmektedir. Biz bu çalışmada nükleer hormon reseptör ligandları olarak All-trans retinoik asit ve 1,25-dihidroksi vitamin D3 uygulayacağımız endotel hücrelerinde SARS-CoV-2 ile ilişkili hücresel moleküllerin ekspresyonlarını analiz edeceğiz. Ayrıca, kardiyovasküler olarak hipertansiyon/hipotansiyon dengesi ile ilişkili bir molekül olan ACE2 enziminin ekspresyon seviyelerine olabilecek bir etki sonucu bu alanda da literatüre bir katkı sağlanmış olacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada, endotel hücrelerinde SARS-CoV-2 patogenez mekanizması ile ilişkili ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D, CD26, SİKLOFİLİN A (CYPA) ve CD147 proteinlerinin ekspresyonlarına nükleer hormon reseptör ligandları olan 1,25 dihidroksi Vitamin D3 ve all trans retinoik asit (ATRA)'nın etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüsün Tanımı ve Tarihçesi

Koronavirüsler, pek çok canlıda olduğu gibi insanlara da bulaşabilen, genom boyutu olarak 26000 ile 32000 baz arasında değişen, zarflı, segmentsiz, pozitif polariteli olup diğer RNA virüs ailelerinden daha büyük genoma sahiptirler (11). ‘‘Korona’’ kelimesi, bu virüsün yüzeyinde bulunan ta benzeri çıkıntılarını ifade eden ‘‘ta’’ anlamına gelen Latince kelimedenden türemiştir.

Koronavirüslerin hayvanlarda solunum ve bağırsak hastalıklarına sebep olduğu 1930’lu yıllarından günümüze kadar bilinmektedir (12). İlk olarak tavuklarda ağır solunum yolu hastalığına neden olan kuş enfeksiyöz bronşit virüsünün (IBV) sebep olduğu kuş enfeksiyöz bronşiti enfeksiyonudur. Daha sonra ki yıllarda bulaşıcı gastroentrit virüsü (TGEV) ve fare hepatit virüsü (MHV) keşfedilmiştir (13).

İnsanları enfekte eden ilk insan Koronavirüsler (HCoV), 1960 yıllarında insan embriyonik trakeal organ kültürlerinde Tyrrell ve Bynoe tarafından B814 adlı yeni bir virüs keşfedildi. Tanımlanan bu virüs gönüllü insanların burun içine uygulanarak soğuk algınlığına benzer belirtiler görüldü (14). 1966 yıllarına gelindiğinde Hamre ve Procknow soğuk algınlığı belirtilerine benzer bulguları gösteren gönüllü insanlardan aldıkları örnekleri doku kültüründe izole ederek bu virüse insan koronavirüsü 229E (HCoV-229E) adı verildi (15).

B814 ve HCoV-229E gibi benzer virüsler etere duyarlı oldukları için bir lipit tabakayla kaplı oldukları anlaşılıyordu. McIntosh ve arkadaşları 1967 yılında insan solunum yollarından elde ettikleri örnekleri izole ederek organ kültüründe çoğaltılan etere duyarlı HCoV-OC43 virüsü gözlemlemişlerdir. Elektron mikroskopuyla incelenen B814, HCoV-229E ve HCoV-OC43 virüsleri hayvan virüsleri olan IBV, MHV ve TGEV 'e benzer morfolojilerdeydi (16). Bu virüslere 1975 yılında koronavirüs adı verilerek yeni bir cins olarak kabul edildi. Daha sonraları 1960’dan sonra bazı pozitif bilgilerin kaybolmasından dolayı 2002 yılında SARS-CoV çıkana kadar geçen sürede bilgiler bu şekilde sınırlı kaldı (17).

Koronavirüslerin 2002 yılına kadar hafif semptomlara sahip solunum yolu hastalıklarına sebep olduğu bilinmekteydi. Ancak 2002 yılında meydana gelen şiddetli akut solunum sendromu (SARS), sadece soğuk algınlığı olarak değil daha ciddi tablolara yol açan ve yüksek ölüm oranıyla önemli bir tehdit olan yeni bir koronavirüs olarak insan hayatına girmiştir (18).

SARS salgını, ilk olarak 2002 sonlarına doğru Çin'in güneyindeki Guangdong vilayetinde görülmüştür. İlk önemli epidemi ise, 2003 yılının başlarında Guangdong'un başkenti Guangzhou'da meydana gelmiştir. 2003 Mart ayında Singapur, Hanoi ve Hong Kong'da ciddi zatürre vakaları ile karşılaşılmasıyla Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) aracılığıyla dünyaya ilan edilmiştir (19). Virüsün hayvansal bir kaynaktan yayıldığı düşünülmesi ile olası kaynaklar araştırılmaya başlanmıştır. Guangdong yakınındaki canlı av hayvan pazarında küçük memelilerin (misk kedileri) benzer virüsler taşıdığı belirlenmiştir (20). Salgın Asya, Avrupa, Güney Amerika ve Kuzey Amerika'da olmak üzere 29 ülkede tespit edilmiştir. Tüm dünyada toplam 8.098 kişi enfekte olmuştur. Enfekte olanlardan 774'ü ölmüş ve ölüm oranının da %7-17 arasında olduğu belirtilmiştir (21).

SARS salgınından sonra 2003 yılında dördüncü insan koronavirüsü olan HCoV-NL63 ateş, nezle ve bronşiolit şikâyetiyle hastaneye gelen 7 aylık bir bebekten alınan örnekten özel bir yöntemle izole edildi. Bu virüs HCoV-229E virüsü ile daha benzer özellikler göstermekteydi (22). 2004 yılında Çin'in Shenzhen şehrinde 71 yaşındaki bir erkek ateş ve balgamlı öksürük şikâyetiyle hastaneye başvurdu. Hastadan alınan doku örneklerinden yapılan çalışmalardan HCoV-HKU1 adı verilen beşinci yeni bir insan koronavirüsü tanımlandı. Bu iki koronavirüsünde tanımlanmasıyla bütün dikkatlerin bu virüs ailesine yönelmesine neden oldu (23).

2012 yılına gelindiğinde altıncı insan koronavirüsü olan Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV)'ü tanımlanmıştır. 13 Haziran 2012 tarihinde Suudi Arabistan'ın Cidde şehrinde 60 yaşında bir erkek ateş, balgam ve nefes darlığı şikâyetiyle hastaneye yatırıldı. Hastanın balgamından alınan solunum epitel hücreleri doku kültüründe büyütülerek yeni bir koronavirüs tespit edildi. Görülen şikâyetlerin ölümcül hastalığa neden olan SARS 'a benzer özellikler göstermesi endişe vericiydi ve bu virüslerin insanlarda ne kadar ciddi rahatsızlıklara neden olduğunu insanlara

hatırlatıyordu (24,25). İkinci bir vaka ise Suudi Arabistan'a seyahat öyküsü olan bir hastanın Londra'daki bir hastaneye yatırılmasıyla aynı virüsün hastalığa neden olduğu haber edilmiştir (26). MERS-CoV, Orta Doğu, Güney Asya ve Afrika'daki birçok ülkede tek hörgüçlü develerde saptanmıştır. Virüsün kökenleri tam olarak anlaşılammış olsa da farklı virüs genomlarının analizine göre, yarasalardan ortaya çıktığı ve daha sonra develeri enfekte ettiği düşünülmektedir. Toplamda, 2012'den beri 27 ülkede yayılması nedeniyle ölüme yol açtığı bilinen 858 vaka duyurulmuştur. Hastaların %35'ten fazlası vefat etmiştir (27).

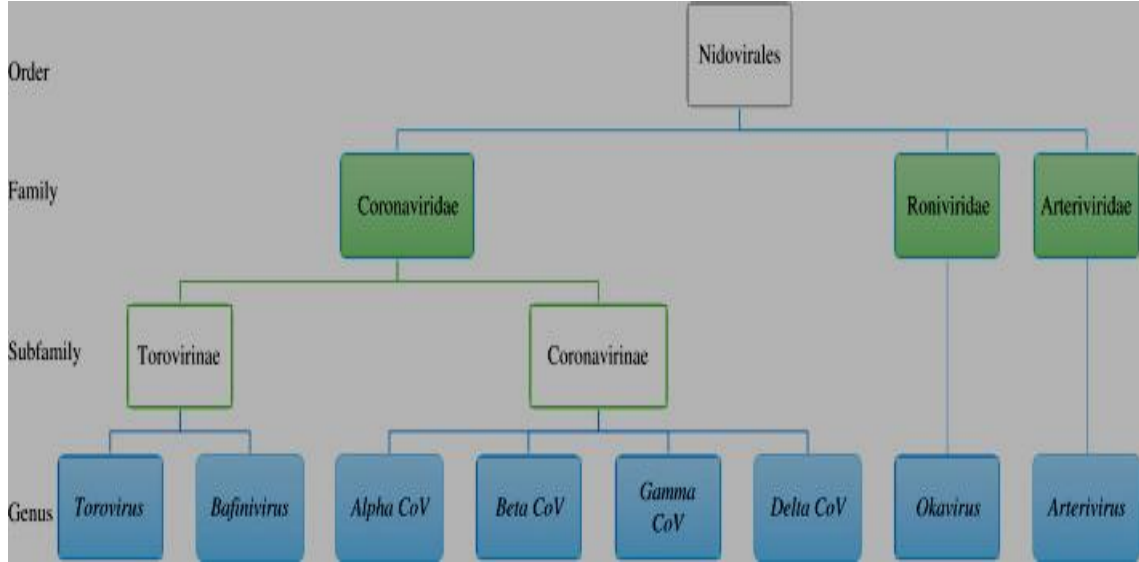
Daha sonra 2019'un aralık ayında Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi Wuhan Şehrinde nedeni tam olarak bilinmeyen bir pnömoni salgınıni haber ettiler. Vakaların çoğunun Huanan Deniz Ürünleri Toptan Satış Pazarı ile bağlantılı olduğu belirtildi. 7 Ocak 2020 tarihinde Çin Hastalık ve Kontrol Merkezi, enfekte olan hastalardan ilk olarak bir bronkoalveolar lavaj örneğinden aldıkları alt solunum yolu örneklerini izole ederek 11 Ocak 2020'de yeni virüsün genom dizilimini çıkararak daha önceki koronavirüslere benzemeyen yeni bir koronavirüs keşfettiler. İlk zamanlar 2019-nCoV olarak adlandırılan son koronavirüs, epideminin ilerleyen zamanlarında SARS-CoV-2 olarak isimlendirilmiş, virüsün neden olduğu hastalığa da Koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) ismi verilmiştir (28,29). Hastalık 3 ay gibi kısa bir zamanda Tayland, Japonya ve Güney Kore başta olmak üzere 114 ülkeye yayıldı ve 4000'den fazla can aldı. 11 Mart 2020 tarihinde DSÖ COVID-19 salgınının bir pandemi olduğunu duyurdu (30).

2.2. Koronavirüs Ailesi

Koronavirüsler, Coronaviridae ailesi virüslerinden olup insanlarda dahil yarasalar, misk kedileri, develer, köpekler, domuzlar, fareler ve kuşlar olmak üzere birçok canlı türünde tespit edilmiştir (31). Günümüze kadar keşfedilen çok sayıda koronavirüsün ve genomlarının dizilenmesinin sonuçları olarak, koronavirüslerin çeşitliliği, genomuği ve filogenisi hakkındaki bilgiler her geçen gün arttı.

Koronavirüsler, Nidovirales order içindeki Coronaviridae familyasına ait Coronavirinae sub familya bünyesinde bulunmaktadır. Coronavirinae alt ailesi, Yunan harfleri ile ifade edilen Alfa koronavirüs (α), Beta koronavirüs (β), Gama koronavirüs (γ) ve

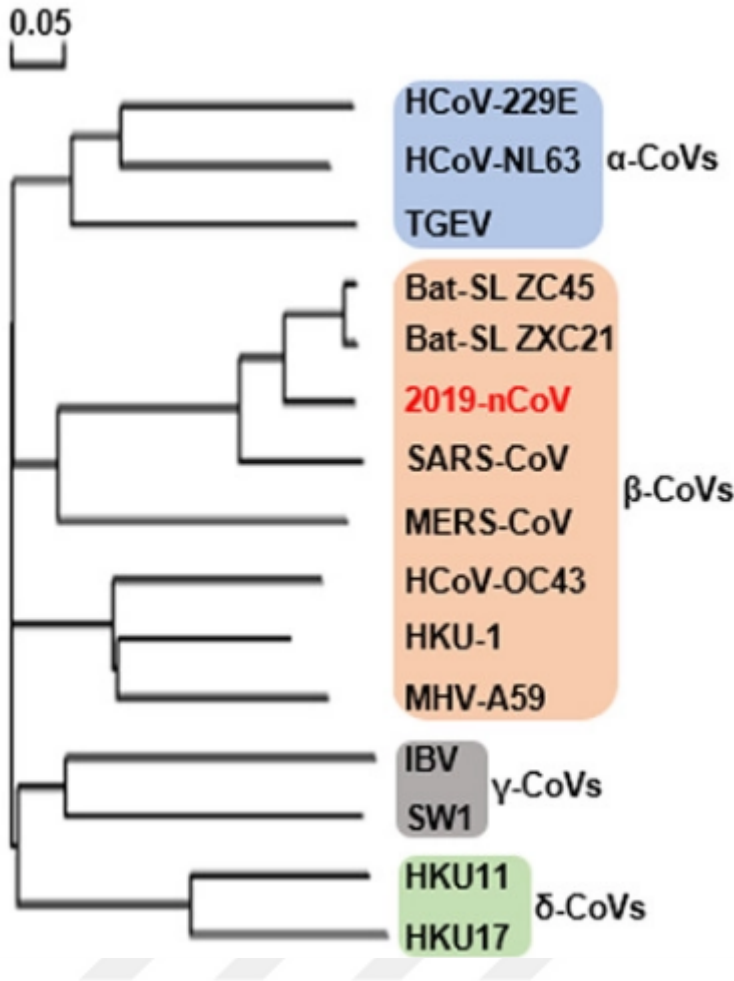
Delta koronavirüs (δ) olarak dört cinse ayrılmaktadır (32). CoV 'lerin taksonomik sınıflandırılması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. CoV 'lerin taksonomik sınıflandırılması (33)

Bugüne kadar yedi çeşit insan koronavirüs (HCoV)'ü belirlenmiş ve bunlardan iki tanesi α cinsine dahil olan HCoV 229E ve HCoV NL63, beş tanesi de β cinsine dahil olan HCoV-OC43, HCoVHKU1, SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 virüsleridir. Sadece alfa ve beta koronavirüslerin, insanı enfekte ettiği bilinmektedir. γ koronavirüsleri ve δ koronavirüsleri kuşları enfekte eder, ancak bazıları memelileri de enfekte edebilir (34). HKU1, NL63, OC43 ve 229E CoV'ler insanlarda hafif semptomlara yol açarken, SARS-CoV ve MERS-CoV ağır hastalığa neden olmaktadır (41).

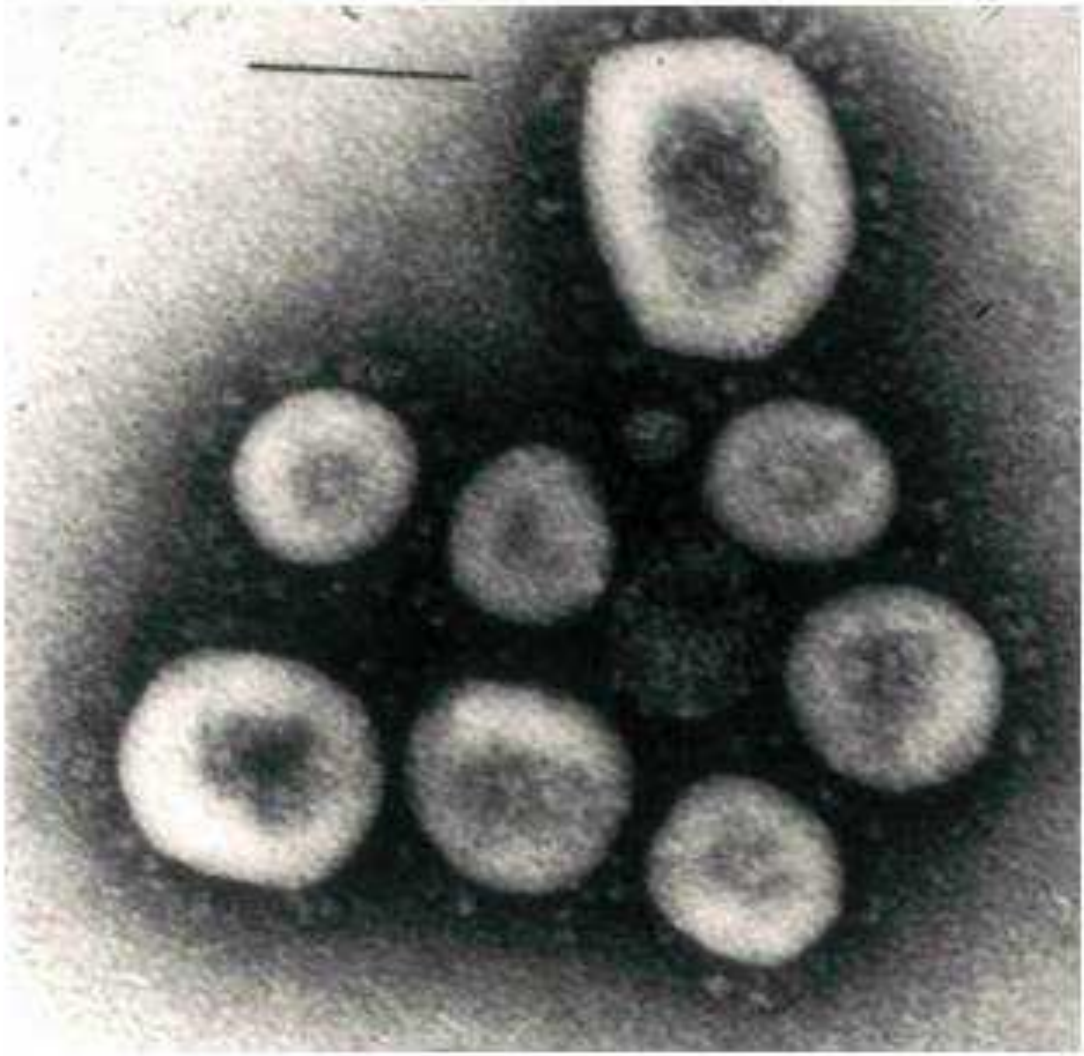
HCoV'ların çoğunun yarası rezervuarından türetildiği varsayılmıştır (45). CoV'lerin filogenetik özellikleri incelendiğinde, SARS-CoV-2'nin Betacoronavirüs cinsine ait bat-SL-CoVZC45 ve bat-SL-CoVZXC21 ile daha yakın benzerlik ve MERS-CoV ile daha uzak benzerlik gösterdiği saptanmıştır. SARS-CoV-2'nin tüm genom dizisi; Doğu Çin'in Zhoushan kentinde toplanan iki yarası kaynaklı SARS benzeri koronavirüs; bat-SL-CoVZC45 ve bat-SL-CoVZXC21 ile %88 benzerlikte ancak SARS-CoV'a %79'a yakın ve MERS-CoV'a da %50'e yakın oranda benzerlik göstermektedir (18).



Şekil 2.2. CoV 'lerin bir filogenetik ağacı (43).

2.3 Genom yapısı ve kodlanan proteinler

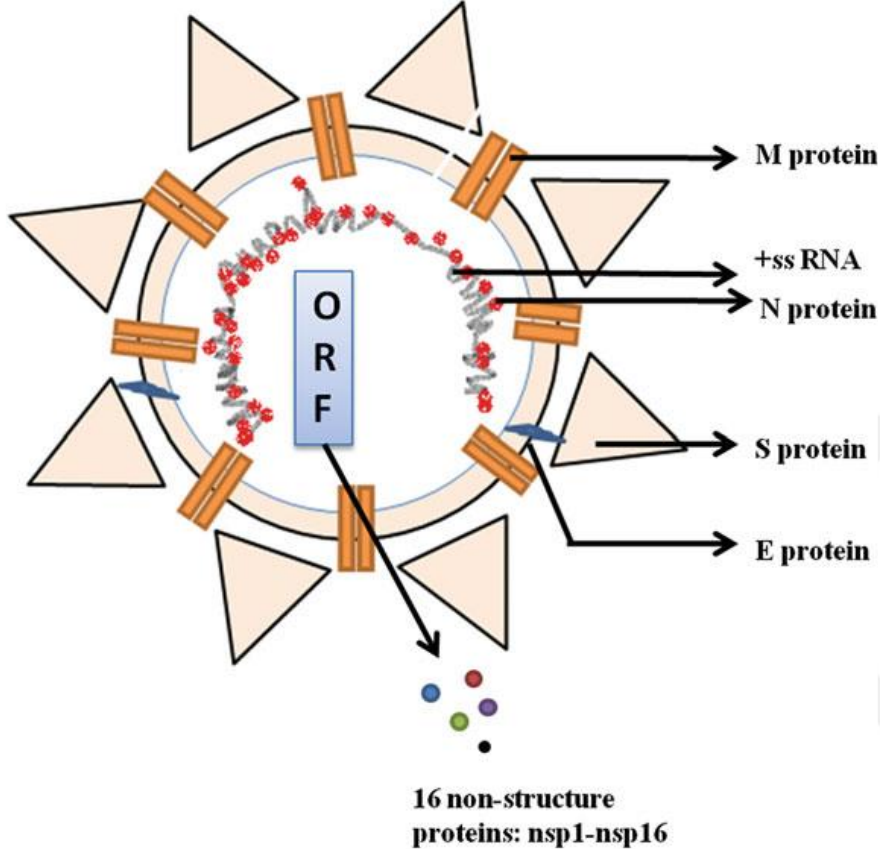
Koronavirüsler (CoV'ler), genom boyutu olarak 26000 ile 32000 baz arasında değişen, zarflı, segmentsiz, pozitif polariteli olup en büyük genoma sahip RNA virüs familyasıdır. Genomlarının büyük olması, replikasyon esnasında bağlandığı hücreye olan bağımlılığını azaltmaktadır. RNA virüslerinin DNA virüslerine göre replikasyon sırasında oluşan mutasyon oranının daha fazla olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle klonladıkları baz sayısı yükseldikçe hata etme ihtimalleri de yükselir ve sonuç olarak yeni bir mutasyonun oluşmasına sebep olur. Oluşan bu mutasyonlar virüslerin yeni hedef hücrelere bulaşma kabiliyetini artırmaktadır (11,35)



Şekil 2.3. Koronavirüs Elektron Mikroskopi Görüntüsü (36).

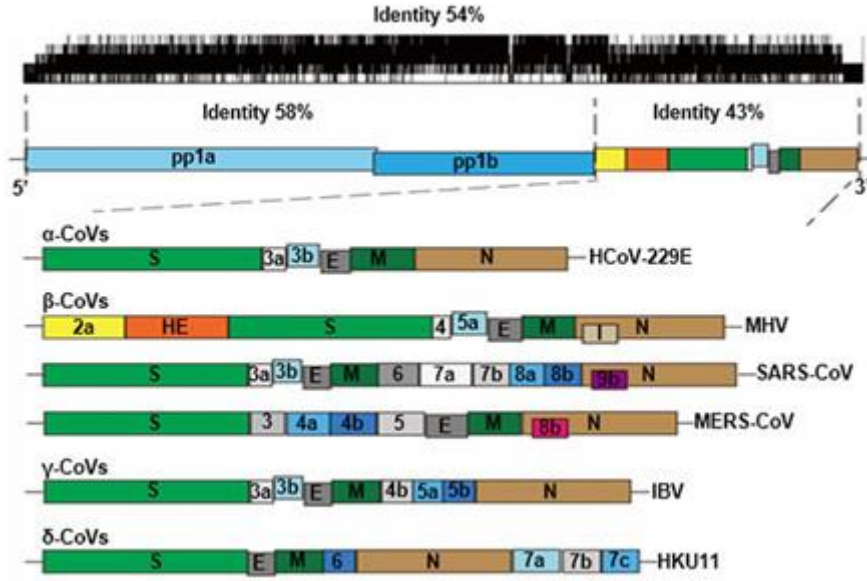
Koronavirüsler, pozitif yüklü genomlarını doğrudan kalıp olarak kullanarak yapısal olan ve yapısal olmayan proteinleri kodlar. Koronavirüslerin genomları, değişken sayıda (6-11) açık okuma çerçeveleri (ORF) içerir. Tüm genom uzunluğunun yaklaşık olarak yarısından fazlasını yapan ilk ORF'ler (ORF1a/b) 16 tane yapısal olmayan protein kodlamaktadır (nsp 1-16), fakat bu olay Gamakoronavirüsler de nsp-1 bulunmadığından dolayı farklıdır. Genomun yarısından daha azını yapan diğer ORF yerlerinden, en az dört tane yapısal protein kodlanmaktadır: nükleokapsit (N), diken-spike (S), envelope-zarf (E) ve membran (M) proteinleri. Bunlardan başka bazı koronavirüslerde bu yapısal proteinlerle birlikte, o virüse özel, Hemaglütinin Esteraz Protein (HE protein),

3a/b protein ve 4a/b proteini gibi yapısal ve ek proteinler kodlanır (37-38). Koronavirüsün şematik görünümü şekil 2.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Koronavirüsün şematik görünümü (34).

Bütün koronavirüslerin genom sekansları araştırıldığında, yapısal olmayan proteinleri kodlayan yerlerde %58, yapısal proteinleri kodlayan yerlerde %43 paralellik gösterir. Bütün genom seviyesinde ise %54 değerinde paralellik gösterir. Bu değerler, yapısal olmayan proteinlerin en çok korunduğunu, yapısal proteinlerin ise yeni konaklara uyum için daha fazla çeşitlilik gösterdiğini düşündürmektedir (37).



Şekil 2.5. Dört cins koronavirüsün genom yapısı (43).



Şekil 2.6. SARS-Cov-2 Genom Yapısı (44).

Belli proteinlerin görevleri çok eskiden bilinmekte olan koronavirüslerin proteinleri baz alınarak gösterilmektedir. Yapısal olmayan proteinler antiviral konak yanıtını bastırmak (nsp 1), RNA/DNA bağlama aktivitesi (nsp 9), RNA bağımlı RNA polimeraz (nsp 12), helikaz (nsp 13) gibi görevlerde bulunmaktadır. Yapısal olmayan proteinlerin büyük bir kısmının viral replikasyondaki işlevi belirlenmiş olmakla beraber birkaçının fonksiyonu nsp 2'de olduğu gibi hala tamamıyla bilinmemektedir. (39). Yapısal olmayan proteinlerin görevleri tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Yapısal Olmayan Proteinlerin Görevleri (34).

Yapısal Olmayan Protein (nonstructural protein-nsp)	Görevi
nsp1	IFN sinyal inhibisyonu, hücresel mRNA'ların bozulması, translasyon inhibisyonu, hücre döngüsü durdurma
nsp2	Bilinmiyor
nsp3	RNA bağlama, interferon antagonisti (IFN), doğuştan gelen bağışıklık tepkisini bloke etme
nsp4	Çift zarlı kesecik oluşumu
nsp5	Poliprotein işleme, IFN sinyalinin inhibisyonu
nsp6	Otofagozom genişlemesinin sınırlanması
nsp7	ssRNA bağlanması, nsp8 ve nsp12 ile kofaktör
nsp8	nsp7 ve nsp12 ile kofaktör
nsp9	ssRNA bağlanması, replikasyon-transkripsiyon kompleksleri (RTC'ler), dimerizasyon
nsp10	nsp14 ve nsp16 için yardımcı protein
nsp11	Bilinmiyor
nsp12	Primere bağlı RNA bağımlı RNA polimeraz
nsp13	helikaz, 5'trifosfataz
nsp14	Ekzoribonükleaz, N7- metiltransferaz
nsp15	Endoribonükleaz
nsp16	Riboz-2'-O-metiltransferaz (RNA başlığı oluşumu)

Yapısal olan dört protein, viral yapının tamamlanması, koronavirüs enfeksiyonunu bulaştırma aşamaları, virüs replikasyonu için gerekli olan insan hücrelerinin sinyal yollarının bloke edilmesi ve virüsle mücadelede yeni ilaçlar geliştirmek için önemli yere sahiptir (37,40). M proteini, virüste yapısal olarak en çok bulunan, yaklaşık 25-30 kDa boyutunda olan ve virüse şeklini verdiği düşünülen proteindir. E proteini, yaklaşık 8-12 kDa boyutunda olan, virüsün salınmasını ve toplanmasını sağlayan zar proteindir. M proteini ile E proteini, viral etkileşimde etkin bir göreve sahiptirler. N proteini nükleokapsidde bulunan tek proteindir. N proteini transkripsiyonda ve patogeneizde görev almaktadır. S proteini, koronavirüs partikülleri üzerindeki peplomerleri oluşturan bir tip glikoproteindir. Virüsün yüzeyindeki belirgin sivri yapıyı oluşturur. S proteini konakçının hücre zarına yapışmasına neden olmaktadır. Viral S proteini, S1 ve S2 olan iki bölgeden oluşur. S1 bölgesi konakçı hücre reseptörüne bağlanmak için kullanılırken, S2 bölgesi membran füzyonu için kullanılır (41,42). Yapısal olan proteinlerin görevleri tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Yapısal Olan Proteinlerin görevleri (37).

Yapısal Olan Protein	Görevi
S protein	Hedef hücrede reseptöre bağlanma Membran füzyonu Hedef hücre yöneliminin belirlenmesi ACE2 reseptörüne bağlanması
M protein	Viriyonun biçimlenmesi N proteininin istikrarı İnterferon beta (IFN- β) yolağının aktive olması Nükleokapsit-RNA bileşimini oluşturma ve sürdürme Virüsün yapısında oluşan değişimler
E protein	Viral parçaların toplanması Virüsün yapısında oluşan değişimler
N protein	Viriyonun biçimlenmesi Virüsün yapısında oluşan değişimler İnterferon uyarımını engelleme
Hemaglütinin Esteraz proteini (HE)	İçerisinde Sialik asit barındıran almaçlara bağlanma

2.4. Koronavirüs girişi ve replikasyonu: SARS CoV 2

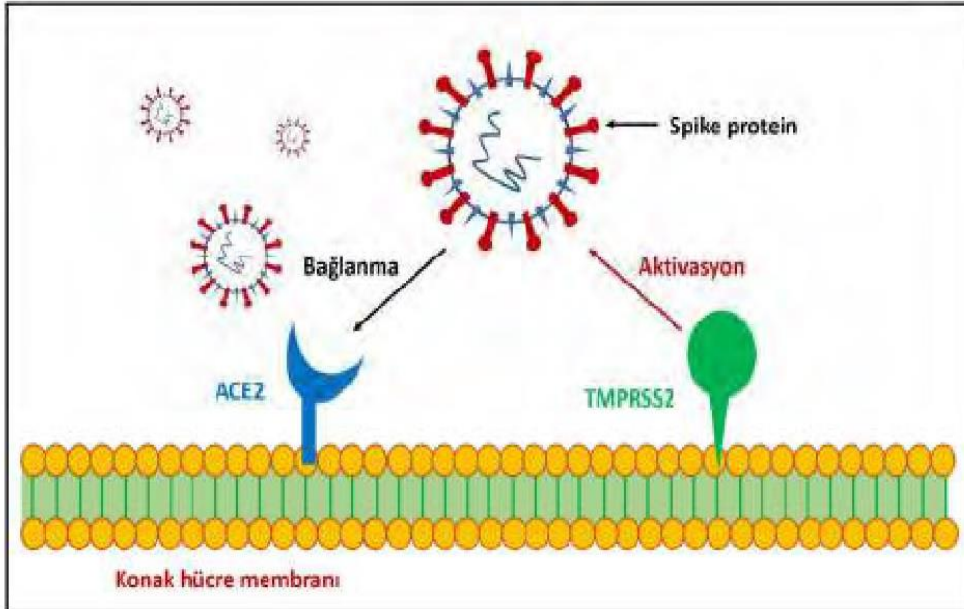
Koronavirüs enfeksiyonu, viral zarfın konak hücre zarı ile etkileşimi yoluyla başlatılır. Virionun konak hücreye ilk bağlanması, S proteini ve onun reseptörü arasındaki etkileşim ile başlatılır. Bir koronavirüs S proteininin S1 bölgesindeki reseptör bağlama alanlarının (RBD) bölgeleri virüse bağlı olarak değişir. Koronavirüsün bir konak türünü enfekte etmesi için ilk belirleyici olan S protein-reseptör etkileşimidir (46). Birçok α -koronavirüs, aminopeptidaz N (APN)'den reseptör olarak yararlanır. SARS-CoV ve HCoV-NL63 virüsleri anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2)'yi reseptör olarak kullanır. MERS-CoV virüsü ise insan hücrelerine giriş sağlamak için Dipeptidil Peptidaz-4 (DPP4)'den yararlanır. Bilinen CoV reseptörlerinin listesi tablo 2.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Koronavirüs reseptörleri

Virüs	reseptör	kaynak
Alfa koronavirüsler		
HCoV-229E	APN	[47]
HCoV-NL63	ACE2	[48]
TGEV	APN	[49]
PEDV	APN	[50]
Beta koronavirüsler		
SARS-CoV	ACE2	[51]
MERS-CoV	DPP4	[52]
SARS-CoV2	ACE2	[53]

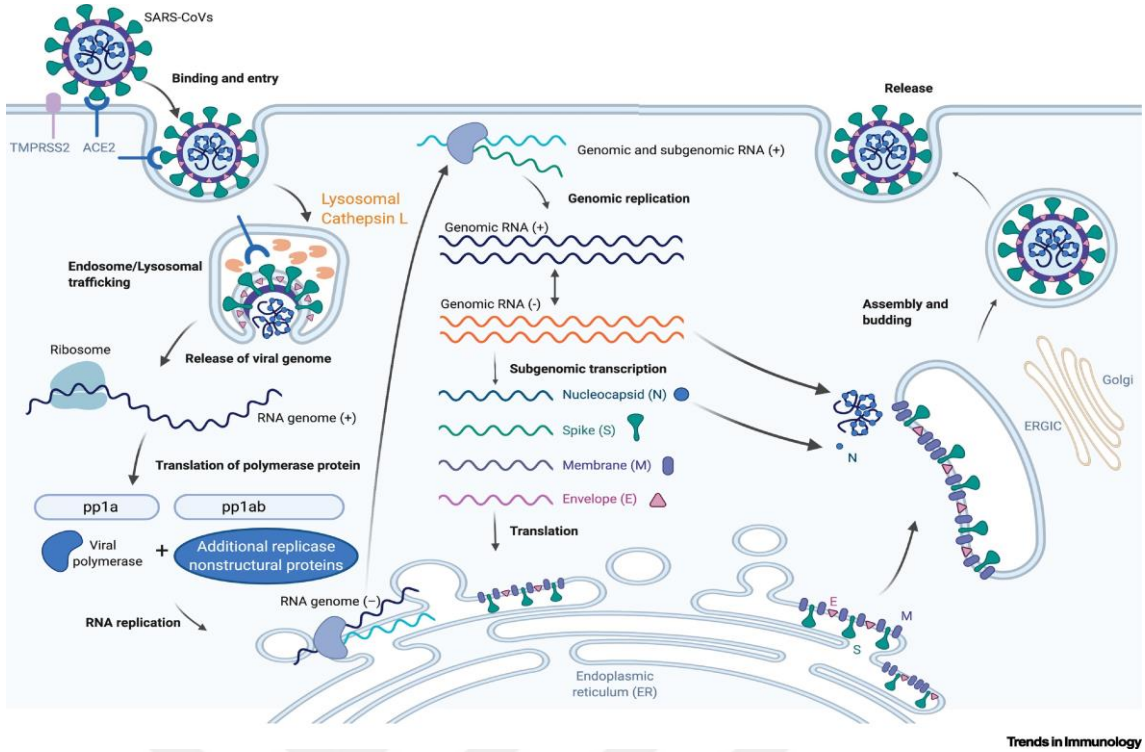
APN (aminopeptidaz N), ACE2 (anjiyotensin dönüştürücü enzim 2), DPP4 (dipeptidil peptidaz 4), HCoV (insan koronavirüsü), TGEV (bulaşıcı gastroenterit virüsü), PEDV (domuz salgın diyare virüsü).

SARS-CoV-2 virüsü hedeflenen hücreye bağlanmak için en başta S proteini ile hedeflenen hücre üstünde olan ACE-2 proteini ile etkileşime girer ve buna ilaveten transmembran serin proteaz (TMPRSS2)'dan da bir diğer protein olarak yararlanır (Şekil 2.7.). Akciğerlerdeki SARS-CoV-2 hücre aktivasyonu için ACE2 tek başına ilişkili değildir. Virüs enfeksiyonunun aktivasyonu için başka hücresel faktörlerinde gerekli olduğu tahmin edilmiştir. Bu nedenle TMPRSS2 ve TMPRSS11D SARS-CoV-2'nin aktivasyonu, enfeksiyonu ve iletimi için gerekli proteinleri kodlayan genlerdir (76). Aynı zamanda katepsin L, SARS-CoV-2'nin S proteinini aktive ederek TMPRSS2'den yoksun hücrelere girişin tamamlanmasını sağlayabilir. Hücrede farklı görevleri olan TMPRSS2 proteininin görevlerinden biride virüsün hedef hücreye girişinde önemli olan reseptör olmasıdır ve aynı zamanda virüsün S2 proteininin parçalanmasını sağlayarak etkin hale gelmesinde ve viral zarfın hedef hücre zarıyla birleşmesini sağlar (3,57). S proteininin alt grubu olan S1, hedef hücre proteinine bağlandığında yapısal birleşme gerçekleşir ve S proteininin diğer alt grubu olan S2 desteğiyle viral zarf hedef hücre zarıyla birleşir (54). SARS-CoV-2'nin enfekte ettiği insanları hasta yapma gücünü kavramak amacıyla, S proteininin reseptör bağlanma alanı (RBD) araştırıldığında SARS-CoV'a göre insan ACE2'sine 10 kattan daha yüksek afinite ile bağlandığı tahmin edilmiştir (55).



Şekil 2.7. SARS-CoV2'nin hücreye girişi ACE2 ve proteaz TMPRSS2 aracılığıyla olmaktadır (37).

Virüsün hücreye girişinde viral membran açıldıktan sonra genomik RNA hücre içinde özgür hale gelir. Bütün replikasyon döngüsü hücre içinde tamamlanır ve viral genom bir şablon işlevi görerek önce yapısal olmayan proteinlerin translasyonunu gerçekleştirir. Daha sonra ORF1a ve ORF1b genomik RNA ile yapılarak sırayla pp1a ve pp1ab'ye dönüştürülür. İlk olarak oluşan pp1a ve pp1ab, yapısal olmayan 16 proteine dönüşmek için proteazlarla parçalara bölünür. Yapısal olmayan bu proteinler şablon olarak pozitif zincirli genomik RNA'dan yararlanarak bir replikasyon/transkripsiyon bileşiği yapar. Yapısal olmayan proteinlerin belli bölümü de oluşturduğu veziküller ile yeni genomları yapacak RNA'ların transkripsiyonunu yaparken bir diğer yandan da yeni viral yapısal proteinlerin translasyonunu yapar. Transkripsiyon ile oluşturulan alt genomik RNA'lar, viral bir yapı oluşturan yapısal proteinlere dönüştürülür. Yapısal olan proteinlerden N proteini endoplazmik retikulum organelinde viryonun kaynaşması esnasında pozitif polariteli olan genomik RNA ile kaynaşarak nükleoprotein yapısını meydana getirir. Geriye kalan diğer yapısal olan proteinlerde Endoplazmik retikulumda viryon yapısına dahil olur. Viral bütün yapısal proteinler Endoplazmik retikulum-Golgi ara kompleksinde (ERGIC) virüs parçacıkları şeklinde birleşerek golgi cisminden veziküller aracılığıyla gönderilirler. Olgunlaşmasını tamamlamamış parçacıklar hücre zarından ekzositozla dışarı atılırlar (Şekil 2.8.) (56,57).



Trends in Immunology

Şekil 2.8. Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs tip 2 (SARS-CoV-2) Yaşam Döngüsü (57).

2.5. Sars-CoV-2 Hastalık Etkeni: Covid-19

Covid-19, kısa zamanda pandemiye sebep olan, belirlenen türlerinden kimi hafif kimi de ağır solunum yolları hastalıklarına sebep olan koronavirüslerin daha önce görülmemiş SARS-CoV-2 cinsiyle oluşmuş bir hastalık etkenidir. CO ve VI İngilizcede Coronavirüsten, -D harfi İngilizcede hastalık manasında olan -disease kelimesinden, 19 sayısı ise hastalığın 2019 yılında görülmeye başlamasından kaynaklanmaktadır.

2.5.1. Epidemiyolojisi

31 Aralık 2019 tarihinde Çin'in Wuhan şehrinde kaynağı tamamen bilinmeyen pnömoni vakaları bildirilmiş ve vakaların çoğunun Wuhan'da deniz ürünleri şehir pazarı çalışanlarında görüldüğü saptanmıştır (58). Vakalarda nefes darlığı, ateş, yorgunluk ve akciğerlerde zatürre ile uyumlu bulgulara rastlanmıştır. Enfeksiyonun büyük ihtimalle hayvansal kökenli olduğu ve insanlara bir hastalık yolu ile bulaşmadığı ortaya atılmıştır (59).

SARS CoV-2 ile BAT-CoV virüslerinin genomları %96,3 benzerlik gösterdiğinden dolayı en yakın konakçının yarasalar olabileceği tahmin edilmektedir. Yarasa yaşam alanları insanların yaşam alanlarına yakın olmadığından virüsün insanlara büyük ihtimalle farklı bir ara konak hayvan aracılığıyla bulaştığı sanılmaktadır (60). Geçmiş yıllarda olan koronavirüs salgınlarında SARS CoV'da misk kedisi ve MERS CoV'da ise develer ara konak hayvan olarak insanlara virüsü bulaştırmışlardır. COVID-19 hastalarından izole edilen koronavirüsler ile pangolinden izole edilen koronavirüslerin genomlarında %99 benzerlik olması sebebiyle SARS CoV-2'nin ara konak hayvanının pangolinler olabileceği tahmin edilmiştir (61).

Çin dışındaki ilk olgu 13 Ocak 2020 tarihinde Tayland ülkesinde 61 yaşında olan Çinli bir kadında tespit edilmiştir. Daha sonraki zamanlarda vaka duyuran ülkelerin sayısı günden güne arttı ve şubat ayının sonlarına doğru ülkelere özgü bulaşlar meydana çıkmaya başlamıştır. 2020 yılının mart ayı başlarında Çin'de salgın hızı azalırken, Güney Kore, İran ve İtalya'da COVID-19 hastalığından kaynaklı ölümlerde artışlar görülmeye başlanmıştır. Dünyayı etkisi altına alan Covid-19'un Çin'de ortaya çıkmasının ardından tüm dünyaya yayılması, binlerce can kaybının yaşanması neden olmuştur. Bu sebeple Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) salgını, 17 Mart 2020'de pandemi ilan etmiştir. Daha sonraki zamanlarda ise ilk olarak Avrupa kıtasında, sonrasında ise Kuzey Amerika kıtasında ağır vaka yükselişleri görülmeye başlamıştır. 2020 yılının mayıs ayının başından itibaren salgın yayılmasını sürdürerek neredeyse dünyadaki bütün ülkelerde vaka bildirimleri yapılmıştır (62). Küresel olarak, 24 Ocak 2022 itibari ile DSÖ'ye bildirilen 349.641.119 onaylanmış COVID19 vakası ve toplam 5.592.266 ölüm olmuştur (63).

Ülkemizde ilk COVID-19 vakası 11 Mart 2020 tarihinde görülmüştür. İlerleyen zamanlarda ülkemizdeki vaka sayılarında dünyada olduğu gibi artış görülmeye başlamıştır. 14 Ocak 2022 itibari ile toplam vaka sayısı 10.339.097 ve toplam ölüm sayısı ise 84.445 olarak bildirilmiştir (64).

2.5.2. Bulaş yolu

İnsanların birbirlerine bulaştırması sebebiyle geniş ölçekli bir pandemiye neden olan SARS-CoV-2 virüsünün belirlenen iki temel bulaştırma yolu; solunum parçacıkları ve temastır. Solunum parçacıkları, virüsün bulaştığı insan öksürdüğünde veya aksırdığında

meydana gelir. Öksürme ve aksırmaya benzer solunum belirtileri olan insana 1 metreden az uzaklıkta temas edecek insanların enfekte olmuş solunum parçacıklarından etkilenme riski yüksektir. Bulaşma ayrıca hasta olmuş kişilerin etrafındaki yüzeylerle ilişkisi ile de olabilir (65, 66).

Havadan bulaştırma yolu, yaklaşık olarak boyutu 5 µm küçük olan parçacıklar olan damlacık içindeki virüslerden bahsettiğinden solunum parçacığı ile bulaştırma yolundan ayırılır, uzun zaman havada asıla bilinir ve 1 m'den çok uzaklıklara iletile bilinmektedir (66).

2.5.3. Risk faktörleri

SARS-CoV-2 bulaşmış hasta kişilerin %81'lik kısmında şiddetli olmayan hastalık belirtileri görülürken, hastaların %14'lük kısmında ağır hastalık belirtileri ve %5'lik kısmı olan hastalardaysa kritik hastalık belirtileri (solunum yetmezliği, şok, çoklu organ yetmezliği) ortaya çıkmaktadır. SARS-CoV-2 bulaşmış bir hastada, hastalığın şiddetinin daha çok etkili olmasını belirleyen faktörler; Enfekte olan kişilerin yaşları ve beraberinde olan hastalıklardır (67).

Şiddetli hastalık ile ölüm oranıyla ilgili görülen komorbiditeler sıra ile;

- Kalp ve kan damarları hastalıkları (%10,5)
- Şeker hastalığı (%7,3)
- KOAH (%6,3)
- Yüksek tansiyon (%6)
- Kanser
- Kronik böbrek hastalığıdır.

Çocuklarda genellikle enfeksiyonun neden olduğu semptomlar daha az görülür ve genel olarak hafif seyreder. Bazı demografik özelliklerin de ciddi hastalıkla ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Çin'de ki bir çalışmada, erkeklerde ölüm oranının daha fazla olduğu yayınlanmıştır (68).

2.5.3.1. Hafif Şiddette Hastalık

Enfekte olmuş kişilerde üst solunum yolu hastalık belirtilerinden nefes darlığının olmadığı ve genel olarak ateş, kuru öksürük, boğaz ağrısı gibi semptomlar izlene bilinmektedir. (37).

2.5.3.2. Orta Şiddette Hastalık

Ağır hastalık belirtilerinin görülmediği, ateş, öksürme ve nefes almada sıkıntı gibi solunum yolu enfeksiyonu bulgularıyla görüntülemelerde pnömoni bulgusu görülebilmektedir. Çocuklarda hızlı solunum orta dereceli pnömonide de ortaya çıkabilmektedir. COVID-19 hastalarının takibi sırasında ortaya çıkan ikincil bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar görülebilmektedir (37,69).

2.5.3.3. Ağır Şiddette Hastalık

Ağır hastalık belirtileri gösteren hastalarda ileri derecede nefes darlığı, solunum sıkıntısı belirtileri görülür. Elde edilen bulguların sonucunda hasta olan kişiler sepsis, ARDS ve septik şok bakımından takibe alınmalıdır (37).

2.5.3.4. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS)

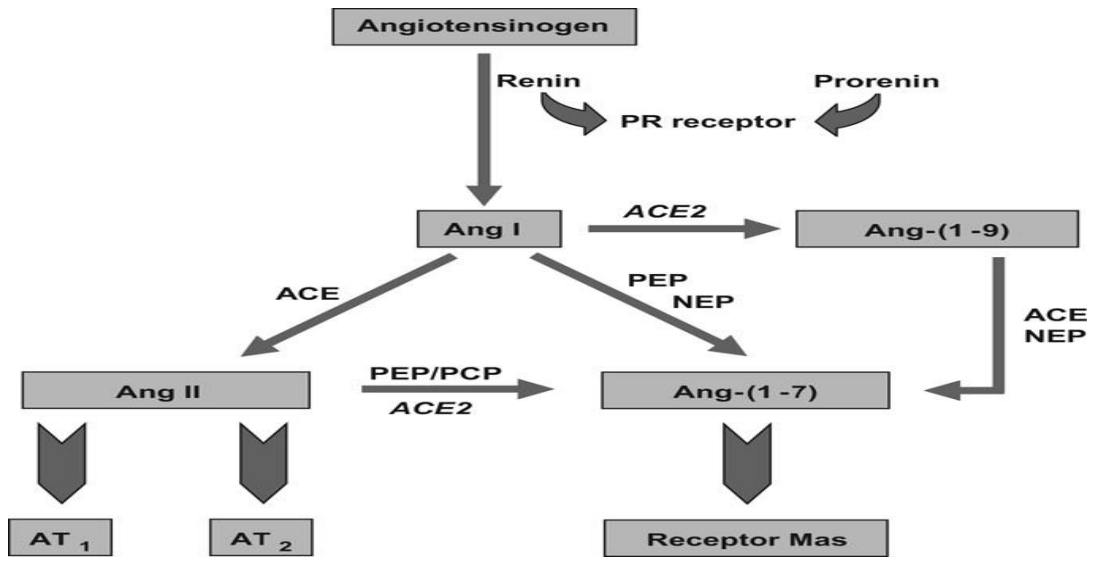
ARDS durumu genel olarak bazı parametreler ile birlikte değerlendirmeye alınır. Bunlar çoklu organ yetmezlikleri, ciddi solunum yetmezliği, septik şok ve sepsis gibi parametrelerdir (37,69).

2.6. ACE2

Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), hücre dışı alanda karboksipeptidaz aktivesine sahip bir transmembran proteindir. ACE homologu olup ACE ile %42 özdeşliğe sahip bir ektoenzimdir (2). S proteinleri, ACE2'ye yüksek afinite ile bağlanır (42). SARS-CoV ve muhtemelen SARS-CoV-2'de de ACE2 reseptörüne S proteini bağlanması ile ACE2 ekspresyonunun düşüşüne neden olduğu bilinmektedir. ACE2'deki düşüş anjiyotensin I (ang I)'i parçalayan bir enzim olan anjiyotensin dönüştürücü enzimin (ACE) artmasına neden olur. Bu nedenle artan ACE aktivitesi, akciğer hasarına yol açan ang II ve ang II reseptör tip 1 (AT1R)'in artmasını

sağlar (70). SARS-CoV-2'nin farklı klinik belirtiler gösteren birçok organı etkilemesi ACE2 reseptörlerinin geniş çapta bulunması ile açıklana bilinir (71).

ACE, Ang I'ı anjiyotensin II'ye (Ang II) parçalar. ACE2, Ang II ve Ang I'ı parçalar. ACE2 enzimi, damar daralmasına yol açan Ang II hormonunun Ang-(1-7)'ye parçalanmasını artırarak kan basıncını düşürür. ACE2'nin Ang II'den Ang (1-7) oluşumu bu enzimin en temel görevi olarak kabul edilir. Ayrıca ACE2'nin Ang I'ı parçalamasıyla oluşan Ang (1-9) daha az da olsa ACE ve NEP yoluyla Ang (1-7) dönüşümü sağlanabilir (Şekil 2.9) (2).



Şekil 2.9. Renin-anjiyotensin sisteminin şematik gösterimi. ACE, anjiyotensin dönüştürücü enzim; Ang, anjiyotensin; PCP, proliikarboksiptidaz; PEP, proliendopeptidaz; PR reseptörü, prorenin reseptörü; NEP, nötr endopeptidaz (2).

Renin anjiyotensin sistemi (RAS), hormonal olarak sıvı dengesinde ve kan basıncında modülatör rol oynayan bir sistemdir. Ang II, RAS'nin etkin bir hormonudur. Yüksek Ang II seviyeleri kalp ve böbrek fonksiyonuna zarar vermektedir. Ang (1-7) Mas reseptörünü bağlanarak aktifleşmesini sağlar ve Ang II'nin ters etkilerine yol açar. ACE ve ACE2 farklı RAS ürünlerini zıt olarak düzenleyerek tamamlayıcı görevlere sahiplerdir. Düzenleyici görevleri RAS dengesine bağlı olarak farklılık gösterebilir. Bu nedenle, ACE2'nin RAS'ın negatif bir düzenleyicisi olduğu ve ACE fonksiyonunu dengelediği görülmektedir. ACE2, Ang II oranını düşürerek ve Ang-(1-7) oranını

yükselterek ACE etkinliğini engellemektedir. Bu yüzden kalp ve kan damar hastalıklarını tedavi etmede ümit verici bir ilaç gayesi olmuştur (72). ACE2 reseptörleri bağırsak, kalp, akciğer ve böbrek gibi birçok dokuda yer almaktadır (9). Bundan başka ACE2 mRNA ekspresyon alanları, beyin zarı, hipotalamus, striyat çekirdek ve Truncus Encephali (beyin sapı)'de de bulunmaktadır (73).

2.7. TMPRSS2

Transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2), insanlarda TMPRSS2 geni tarafından kodlanan bir transmembran proteindir. İnsan solunum yolundaki viral hedef hücrelerin TMPRSS2 eksprese ettiği gösterilmiştir. İnsanlarda TMPRSS2, üst hava yollarını, bronşları ve akciğer olmak üzere epitel dokularında yaygın olarak bulunur (77). Ayrıca kornea, karaciğer, böbrek ve beyinde de bulunmaktadır (78). TMPRSS2 ile S proteini, konakçıya bulaşması için viral giriş ve yayılma için gereklidir. TMPRSS2, CoV'lerin S proteinlerini bölerek CoV enfeksiyonları için potansiyel bir hedef haline getirir. SARS-CoV-2 yayılmasının aynı zamanda TMPRSS2 aktivitesine de bağlı olduğunu gösterilmektedir (3,79). Benzer şekilde, yakın zamanda yapılan bir çalışma, SARS-CoV-2'nin hücresel girişinin aynı zamanda ACE2'ye ve TMPRSS2 bağlı olduğunu göstermektedir. İnsan dokularında ACE2 ve TMPRSS2 ekspresyonlarının bilinmesi COVID-19 hastalarında ilgili etkilerinin bilinebileceğini gösterir. SARS-CoV-2'nin bulaşmasıyla hücreye girişi, CoV'ların S proteini ve konak hücrenin ACE2 enzimi ile olur. Ayrıca ACE2 ile birlikte TMPRSS2'nin viral alım için S proteininin bölünmesine neden olması gerekir. Bu nedenle, ACE2 ve TMPRSS2'nin birlikte ifade edilmesini anlamak, insanlarda SARS-CoV-2 enfeksiyonu olasılığını belirleyebilir (78). ACE2 ve TMPRSS2'nin aynı hücrelerde eksprese edildiği durumdan farklı olarak, bu iki proteinin ayrı hücrelerde ekspresyonu, yalnızca ACE2 eksprese edildiğinde gözlemlenenin üzerinde bir seviyede virüs girişi görülmedi. Bu nedenle, ACE2, TMPRSS2 içeren bölgelere yöneldiği görüldü (4).

2.8. TMPRSS11D

Transmembran serin proteaz 11D (TMPRSS11D), insanlarda TMPRSS11D geni tarafından kodlanan integral membran proteindir (6). TMPRSS11D, TMPRSS2'den S aracılı girişte daha az etkilidir (80). TMPRSS11D (HAT), çeşitli biyolojik ve fizyolojik işlemlere katılan büyük tip II transmembran serin proteaz ailesine aittir. Solunum epitel

hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve ekspresyonu ayrıca serviks, özofagus, prostat, trakea ve akciğer dokularında da tespit edilmiştir. SARS CoV'ların hedef hücrelerde yüksek oranda yayılmasını sağlayabilir (6).

2.9. CD147

CD147, hücre membranlarının yüzeyinde yaygın olarak bulunan Basigin ve EMMPRIN olarak da bilinen bir transmembran glikoproteindir (81). İmmünglobulin üst ailesine aittir. Çeşitli faktörlerle birleşerek normal fizyolojik metabolizma ve patofizyolojik süreçlerde geniş çapta yer alabilir. CD147, aynı hücredeki molekülleri, özellikle aynı zaradaki molekülleri ve hücre dışında bulunan molekülleri tanır. CD147, çeşitli tümör dokularında ve kanserde ekspresyonu artar. CD147 sadece tümör gelişimi ile yakından ilişkili değildir, viral enfeksiyonların fonksiyon düzenlemesine de katılır. SARS-CoV-2'nin konakçı hücreleri işgal ederken bağlandığı reseptör olan ACE2'ye ek olarak, SARS-CoV-2 S proteini CD147'ye de bağlanmaktadır. Virüsten elde edilen S protein, konakçı hücre üzerindeki ACE2 veya CD147'ye bağlanarak, virüsün diğer hücreler arasında viral istilasına ve yayılmasına aracılık eder (7).

2.10. CD26

CD26, Dipeptidilpeptidaz IV (DPP4) enzimi olarak bilinen serin ekzopeptidazdır. İnsanlarda akciğer, böbrek, karaciğer, bağırsak, endotel ve bağışıklık hücreleri dahil birçok yerde bulunmaktadır. DPP4, glukozun neden olduğu pankreas insülin salgısını uyararak hiperglisemiyi iyileştirmek için yeni bir terapötik yoldur. DPP4 sadece diyabette değil ayrıca endoteldeki proinflamatuvar sinyal yollarıyla etkileşime girebilir. Ortaya çıkan kanıtlar, DPP4 inhibitörlerinin vasküler endotel üzerinde koruyucu etkiler uyguladığını göstermektedir. Ayrıca DPP4 viral enfeksiyonlarda immün düzenleyici olarak da görev yapmaktadır (142,143).

2.11.Siklofilin A (CYPA)

Siklofilin A (CYPA), Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) tarafından kodlanan bir hücre içi proteindir. Birçok yerde eksprese edilmektedir ve inflamatuvar uyaranlara yanıt olarak salgılanır. CYPA, vasküler düz kas hücrelerinde ve endotelial hücrelerde proinflamatuvar ve apoptoz sinyal yollarını uyarmaktadır (144). CYPA'nın ilk olarak akciğer kanserinde yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur. CYPA, akciğer

kanserinde proliferasyon, antiapoptoz, invazyon ve metastazın artmasında rol oynar. Akciğer kanserinin erken teşhisi ve tedavisi için önemli bir hedef olabilir (145).

2.12. Endotel Hücresi

Endotel, kan damarlarının iç bölümünde bulunan ve birçok önemli modülatör rolü olan, tabaka halinde dizili hücrelerin bulunduğu bir organdır (82). Endotel hücreleri, tüm kardiyovasküler sistemi kaplamaktadır. Endotelin, periferik damar hastalığı, felç, kalp hastalığı, diyabet, insülin direnci, kronik böbrek yetmezliği, tümör büyümesi, metastaz, venöz tromboz ve şiddetli viral enfeksiyon hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarında kritik bir rol oynadığı görülmektedir (83).

COVID-19 hastalığının belirti ve semptomlarının, karşılıklı patofizyolojik yolları işaret eden klinik endotel hücrelerinin işlev bozukluğunun fenotipine benzediğini göstermektedir. Endotel hücrelerinin işlev bozukluğunun, önceki koronavirüslerin neden olduğu enfeksiyonlar da dâhil olmak üzere çeşitli viral enfeksiyonlara aracılık ettiğine inanılmaktadır. Önceki koronavirüslerden elde edilen deneyimler, şu anda klinik öncesi ve klinik çalışmalarda test edilen SARS-CoV-2'nin patofizyolojisindeki endotel hücrelerinin işlev bozukluğunun rolüne ilişkin hipotezleri tetiklemiştir (82).

Endotel hücrelerinin işlev bozukluğu, viral enfeksiyonlar da dâhil olmak üzere ciddi bulaşıcı hastalıklarda pıhtılaşma bozukluklarına yol açar. Bu gibi durumlarda, serbest radikaller endotel hücrelerine zarar verir ve Nitrik Oksit (NO) sentezini engelleyerek endotel bariyerini bozar. Bozulan endotel bariyeri toksinlerin alttaki dokulara geçmesine neden olur. Vasküler sızıntı, viral enfeksiyonlarda endotel hücrelerinin işlev bozukluğunun önemli bir özelliğidir veya doğrudan viral ataktan ya da dolaylı olarak, uyumsuz immünolojik yanıtların aracılık ettiği aşırı endotel aktivasyonundan kaynaklanabilir (83).

Endoteli oluşturan hücrelerde de ACE2 reseptörü bulunmaktadır. Bu nedenle virüsle temas sonrası endotel hücrelerinin sitoplazmasında virüs parçacıkları görülebilir. ACE2 reseptörü, virüsün girişi esnasında hücre içerisine alınarak parçalanır. Bunun sonucunda RAS etkilenecek Ang II çoğalmasına neden olur. Endotel hücrelerinin enfeksiyonu sonucunda olan RAS dengesinin bozulması, Endotel hücre iltihabı ve apoptozis; ödem, doku hasarı, trombofili gibi pek çok soruna neden olmaktadır (9). Ang (1-7)'nin,

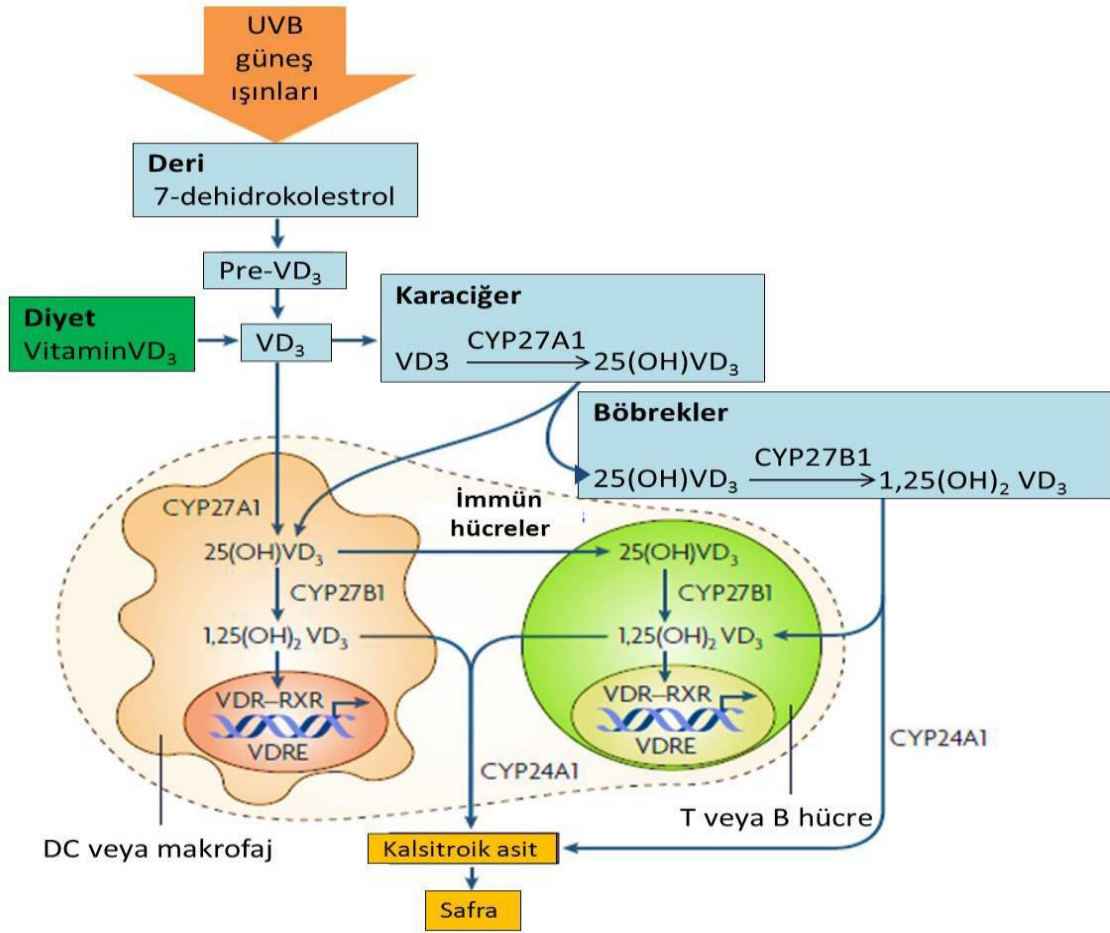
Ang II'nin potansiyel olarak zararlı etkilerinin karşı düzenlenmesiyle endotelde önemli bir koruyucu mekanizma oynayabileceğini göstermiştir (74,75). ACE2'nin endotel hücre aktivesini iyileştirebileceğini ve Ang (1-7)'nin endotel hücre aktivitesinin korunmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (75).

2.13. D Vitamini

2.13.1. D vitaminin yapısı ve etkisi

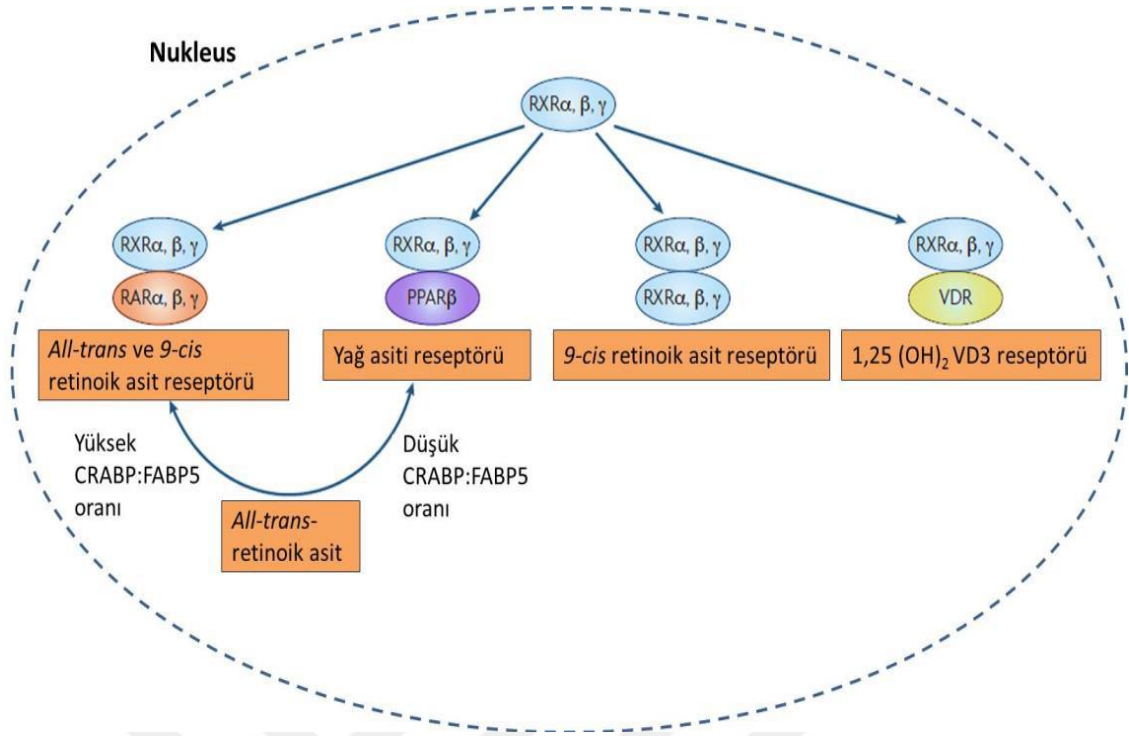
D vitamini, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında etkin bir vitamin olarak ilk kez raşitizm hastalığında tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda D vitamini ile ilgili yapılan çalışmalarla, D vitamini reseptörlerinin bulunmasıyla steroid hormonla aynı tesirde vücutsal dengenin sağlanmasında ve bazı hastalıklarda önemli bir yerinin olduğu bulunmuştur (84).

D vitamini, çeşitli besin kaynaklarından elde edildiği gibi vücutta da sentezlenebilmektedir. Vitamin D2 (ergokalsiferol) ve vitamin D3 (kolekalsiferol) olarak gıdalardan iki şekilde alınabilmektedir. D vitamini, ciltteki 7-dehidrokolestrolün (7-DHC) morötesi güneş ışınlarıyla etkileşimi ile öncül vitamin D3 (pre-VD3) şekline dönüşür (85). Vitamin D3 (vD3), gıdalarla ya da güneş ışınları ile deride meydana geldikten sonra karaciğerde sitokrom P450 proteinle (CYP27A1) dolanımda olan 25-dihidroksivitamin D3'e [25(OH)VD3] dönüştürülür. Böbrekte ise sitokrom P450 proteinle (CYP27B1) en etkin formu olarak işlev gösteren 1,25-dihidroksivitamin D3 (1,25(OH)₂VD₃)'e çevrilir. Daha sonra CYP24A1 enzimi ile 1,25(OH)₂VD₃ aktif olmayan forma (kalsitroik asit) dönüşerek safra ile atılır (86). Vitamin D3, bazı organlarda (karaciğer ve böbrek) sentezlenmekle birlikte immün sistem hücreleri ile de sentezlenebilirler. Aktif olan T ve B hücreler CYP24A1 enzimi ile vitamin D3 üretiminin sonuncu basamağı olan kalsitroik asit şekli oluşur. Aynı şekilde makrofajlar ve dendritik hücrelerde ki CYP24A1 enzimi vD3'ü kalsitroik aside dönüştürür (Şekil-2.10) (86.87.88).



Şekil 2.10. D vitamininin senteziyle meydana gelen ara ürünler (86).

VD₃, lenfosit, monosit ve dendritik hücrelerinin nükleusunda bulunan vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak biyolojik etkinliğini yerine getirir. Bu reseptöre bağlanmasının ardından, VDR, üç ana izoformu olan retinoik X reseptör (RXR α , β , γ) üyeleri ile kompleks oluşturur. Bu transkripsiyonel faktörler gerekli genlerin transkripsiyonunu başlatan yerlerinde bulunan vitamin D yanıt bölgelerine (VDRE) bağlanarak transkripsiyonel düzenleme oluşur (Şekil 2.11.) (86).



Şekil 2.11. 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (VD3) ve All-trans retinoik asidin (ATRA) hücre çekirdeğinde bulunan reseptörleri. VDR, D vitamini reseptörü; PPAR, peroksizom proliferatör ile aktive edici reseptör; RXR, retinoik X reseptör; CRABP, hücrel retinoik asit bağlayıcı protein; RAR, retinoik asit reseptör; FABP5, yağ asidi-bağlayıcı protein 5 (86).

2.13.2. D Vitamininin İmmün Düzenleyici ve Antiviral Rolü

Vitamin D'nin aktif şekli olan kalsitriol, kemik sağlığı ve kalsiyum-fosfor metabolizmasının öneminin anlaşılmasından sonra son dönemlerde; paratiroid hormon salgısını, adaptif bağışıklığı ve hücre çoğalmasını engeller. Aynı zamanda insülin salgılanmasını, doğuştan gelen bağışıklığı desteklemek ve hücrel farklılaşmayı uyarmak gibi birçok immün düzenleyici olarak biyolojik etki gösterir (89). Aktif olan D vitamini, 300'ün üzerinde genin ifadesine genomik yolak aracılığıyla etki yaptığı bilinmektedir (90).

Neredeyse tüm bağışıklık hücrelerinde; monositler, B lenfositler, T lenfositler, makrofajlar ve DC gibi antijen sunan hücrelerde de VDR bulunur. VDR reseptörü doğal ve sonradan edinilen bağışıklığın düzenleyicisi olarak görev üstlenir (91). Vitamin D, katelesidin (LL37), defensin β 4 (DEFB4, HBD2) gibi komşu makrofaj hücrelerinde ve diğer immün hücrelerde antimikrobiyal peptidlerin ekspresyonunu artırarak doğal

bağışıklıkta rol alırlar (92). Katelisidin antimikrobiyal peptit (CAMP/LL37), T lenfositleri, monositler ve nötrofilleri enfekte edici alanlara toplar ve enfekte olan hücrelerin programlı hücre ölümüne yönlendirir. HIV-1, influenza virüsleri, rotavirüs ve Hepatit C Virüsü (HCV) gibi değişik virüsler üzerinde kuvvetli bir antiviral etkisinin olduğu açıklanmıştır (93,94). Antimikrobiyal peptit LL37, Toll benzeri reseptör 3 (TLR3) ile viral dsRNA (double-stranded RNA)'yı tanır. TLR'nin aktivasyonu hücre içindeki virüs parçacıklarına karşı antimikrobiyal aktiviteyi ifade eder. Makrofajlar ile eksprese edilen TLR aktivasyonu, VDR ve vitamin D-1-hidroksilaz enzim etkinliğini artırarak katelesidin oluşumuna neden olur ve Mycobacterium tuberculosisin hücre içinde yok edilmesini teşvik eder (92).

Vitamin D'nin değişik mekanizmalarla enfekte olan hücrelerde otofaji ve apoptozu artırma niteliği belirtilmiştir (95). Vitamin D, doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile kısmen ikaz edilen sitokin fırtınasını eksilterek hücrel bağışıklığı yükseltir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, COVID- 19'dakine benzer bakteriyel ve viral enfeksiyonlara cevap olarak hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar sitokinleri oluşturur (96). D vitamini muamelesi ile makrofajlardan salınan proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu düşer ve antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu artar (97). D vitamini, adaptif bağışıklığın bir modülatörüdür; 1,25 (OH)2D3, T yardımcı hücre tip 1 (Th1) cevabı, öncelikle IL-2 ve interferon gama (INF γ) gibi enflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılayarak azaltır. Ayrıca, 1,25 (OH)2D3, T yardımcı tip 2 (Th2) hücreleri tarafından, sitokin üretimini arttırıp Th1 hücrelerinin dolaylı baskılanmasına yardımcı olur ve regülatör T hücrelerin uyarılmasını arttırıp enflamatuvar süreçleri baskılar (98).

2.13.3. D Vitamininin Solunum Yolu Enfeksiyonlarındaki Rolü

Yapılan çalışmalar enfeksiyonel hastalıklarda fazla düzeylerde vitamin D'nin daha iyi öngörü ve sonuç ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Bazı çalışmalarda ise D vitamini eksikliğinin akut solunum sistemi hastalıkları riskini arttırdığı bildirilmiştir. Bunlar; kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), kistik fibrozis ve interstisiyal akciğer hastalığıdır. Bunlardan başka influenza ve mikobakteriyum tüberkülozis enfeksiyonu riskinide arttırmaktadır. Akut solunum yolu enfeksiyonlarında önleyici ve terapötik ajan gibi davranan D vitaminin yararlı etkileri yapılan deneylerle doğrulanmıştır (99,100). Yapılan deneyler vitamin D eksikliği ile verem yaygınlığı arasında pozitif korelasyon

olduğunu işaret etmektedir. İspanya’da yapılan bir deneyde, gebelikteki fazla D vitamini seviyesiyle bebeklerin ilk bir yaşında solunum yolu rahatsızlıkları daha az görünmektedir, ama bu çocukluk dönemi astım ve hırıltı yaygınlığını etkilememektedir (100). Başka bir çalışmada fazla düzeylerde D vitamininin, bleomisin orijinli akciğer fibroz fare modelinde pulmoner fibroblast hücreleri ile oluşturulan proenflamatuar sitokinlerin interlökin 1 beta düzeylerini düşürerek pulmoner fibrozu düşürdüğü belirtilmiştir (101).

Son çalışmalarda, çeşitli yayınlarda D vitamininin solunum yolu hastalık riskini düşürmede olabilecek yararlı tesirleri üzerine yoğunlaşıldığı görülmektedir. Vitamin D, hastalık riskini farklı ayrı düzeneklerle azaltabilmektedir. Bu mekanizmalardan öncelikle katelesidin ve defensinlerin induksiyonu ya da transkripsiyonu ile viral çoğalma hızının ve proenflamatuar sitokin konsantrasyonlarının düşürülmesi ve antienflamatuar sitokin konsantrasyonlarının yükseltilmesidir. Proenflamatuar sitokin konsantrasyonlarının düşürülmesi inflamasyonu, akciğerlerin hasar görmesini ve zatürre ilerlemesini azaltır. Çalışma sonuçları kalsitriolun, ACE I ve ACE II ekspresyonunu ayarlayarak lipopolisakkarit orijinli akciğer tahribatından önleyici sonuçlara ait olduğu bildirilmektedir (85,102).

Kayıtlarda çeşitli veriler olmak üzere çeşitli yayınlarda D vitamini seviyesinin sepsis, zatürre, ARDS, kalp yetmezliği ve şeker hastalığı oluşma riskleriyle zıt ilişki gösterdiği, hava kirliliği ve sigara kullanıcılığının vitamin D seviyelerini düşürdüğü gösterilmektedir. (85).

2.13.4. D Vitamini ve COVID-19

Vitamin D, COVID-19 boyunca en çok konuşulan vitaminlerden birisi haline gelmiştir. D vitamininin soğuk algınlığı riskini azalttığı kanıtlanmıştır. D vitamininin COVID-19’da dâhil olmak üzere belli viral solunum yolu enfeksiyonlarında faydalar gösterdiği göz önüne alınması nedeniyle COVID-19’u engellemek ve tedavi etmek için vitamin D alınması tavsiye edilmiştir (103,104). D vitamininin COVID-19 ile alakalı olarak gündeme gelmesinin bir diğer nedeni öncelikle T lenfositlerine verdiği cevapla alakalıdır. Bakteriyel veya viral enfeksiyon durumunda bağışıklık sistemi antienflamatuar ve proenflamatuar sitokinler üreterek cevap verir. Bu sitokinlerin fazla üretilmesiyle meydana gelen sitokin fırtınası ise COVID- 19’un şiddetine bağlanmakta

ve COVID-19 orijinli ölümlerin büyük sebebi olduğu belirtilmektedir (105). Bundan başka sistem olarak da vitamin D'nin ACE-2 ekspresyonunu çoğaltarak ve pulmoner vazokonstriksiyonu düşürerek COVID-19 şiddetini hafifletebileceği düşünülmüştür (106).

Vitamin D, kış aylarında yeterince üretilmediği için COVID-19'a bağlı ölüm oranının Kuzey Yarımküre'de Güney Yarımküre'ye göre daha fazla olması durumu D vitamini eksikliğiyle alakalı olabileceğini düşündürmüştür. Avrupa'nın Kuzeyindeki ülkelerde ölüm oranının düşük olması ise vitamin D takviyesi kullanımının fazla olmasıyla ilişkilendirilmiştir (107).

İsviçre'de yapılan bir deneyde COVID-19 hastası olan ve olmayan toplam 107 hastadan elde edilen veriler değerlendirilerek vitamin D seviyeleri ölçülmüştür. Bunlardan SARS CoV-2 testi pozitif olan 27 hastanın testi pozitif olmayan 80 hastanın D vitamini sonuçları karşılaştırıldığında pozitif olanlarda D vitamini seviyesinin düştüğü görülmüştür. Ayrıca 70 yaşını geçmiş kişilerde bu farkın daha fazla olduğu bildirilmiştir (108).

Güney Asya ülkelerinde farklı üç hastanenin veri deposu taranarak, SARS-CoV-2 bulaşması ile ilgili 212 vakada hastalığın gidişatı ile ilgili araştırma yapılmıştır. Araştırma sonunda D vitamini desteğinin, klinik sonuçlara göre COVID-19 hastalarını, serum 25 (OH)D düzeyine dayanarak tedavisine yardımcı olduğu görülmüştür (109).

Endonezya da COVID-19 hastası olan 780 vakadan yapılan çalışmada D vitamini düzeyleri düşük olan yaşlı ve erkeklerin ölüm oranının fazla olduğu belirtilmiştir. (110).

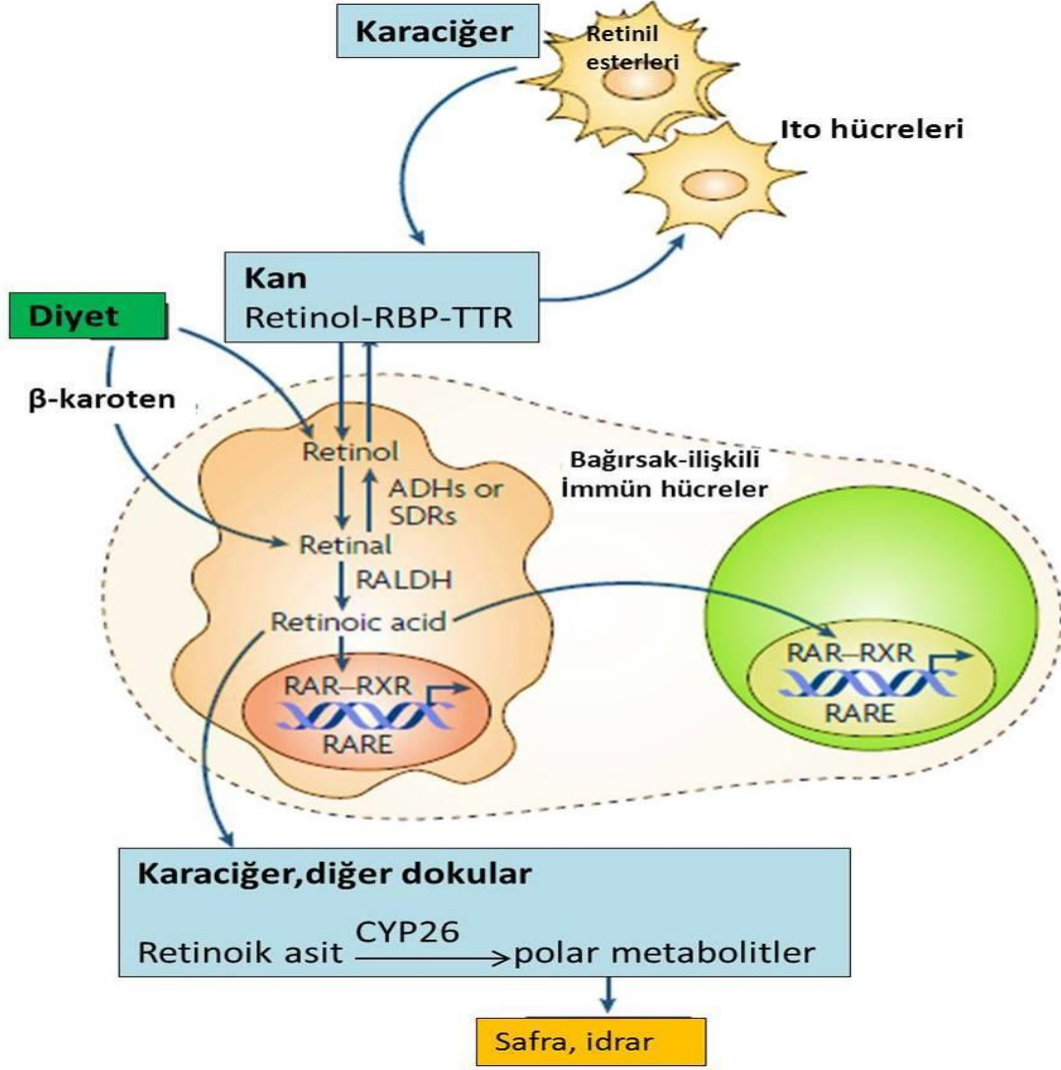
2.14. A VİTAMİNİ

2.14.1. A vitaminin yapısı ve etkisi

A vitamini, çok sayıda ilgili bileşik için genel bir terimdir. Genel olarak retinoidler olarak isimlendirilir. A vitamini yaşam boyunca kritik öneme sahiptir. Üreme, embriyonik gelişim, büyüme, hücresel farklılaşma ve çoğalma, epitelyal hücresel bütünlüğün korunması, bağışıklık fonksiyonu ve görme fonksiyonlarında önemli fonksiyonlara sahip bir mikro besin ögesidir (111).

A vitamini, provitamin A karotenoidleri olarak diyetten elde edilir. A vitamini, yumurta, karaciğer, tereyağı, süt ve güçlendirilmiş tahıllar gibi gıdalarda uzun zincirli retinol yağ asitleri (retinil esterler) olarak, havuç, ıspanak, karalâhana, balkabağı ve kabak gibi sebzelerden provitamin A karotenoidleri (örneğin, β -karoten, α -karoten ve β -kriptoksantin) ya da all trans retinol formunda elde edilir (112).

All-trans-retinol, karaciğerde yer alan ito hücrelerinde depolanmak için retinil esterlerine dönüştürülür. SDR (kısa zincirli dehidrojenaz/redüktaz) ya da ADH (alkol dehidrojenaz) enzimleri yardımıyla All-trans-retinol veya β -karoten all-trans-retinal'a dönüşür. Oluşan All-trans-retinal bir diğer form olan all-trans-retinoik aside (ATRA) dönüşmek için retinal dehidrojenaz (RALDH) enzimini kullanır. Retinoik asit, retinoik asit reseptörüne (RAR) bağlanarak bağışıklık hücrelerine etki eder. Retinoik asit karaciğerde ve diğer dokularda CYP26 enzimi tarafından parçalanarak safra ve idrarla atılır. (Şekil 2.12) (86,113).



Şekil 2.12. A vitamininin senteziyle meydana gelen ara ürünler (86).

ATRA, RAR ailesinin 3 çeşit formu olan α (alfa), β (beta) ve γ (gama)'ya hücre çekirdeğinde bağlanarak RXR proteini ile heterodimer bir yapı meydana gelir. Bu oluşan heterodimer yapı daha sonra hedef genlerin promotör bölgelerinde yer alan retinoik asit yanıt elementine (RARE) bağlanarak transkripsiyonel düzenlenme meydana gelir. RXR proteini, bir diğer nükleer reseptörler olan peroksizom proliferatörüyle aktive olan reseptör (PPAR) ile de heterodimer yapabilir (Şekil 2.11). (86,114).

ATRA, direk PPAR ile bağlanarak da RXR heterodimerizasyonu ile bağlantı yapabilir. RAR veya PPAR β yoluyla sinyalleşme meydana gelip gelmediği hücrel retinoik asit bağlayıcı proteinlerin (CRABP'lerin) yağ asidi bağlayıcı protein 5 (FABP5'e) oranına

bağlıdır. CRABP oranının FABP5'e oranına göre yüksek olması ile ATRA formunun RAR'a bağlanması desteklenir. Gerçekleşen desteklenme neticesinde hücrelerdeki gelişme engellenerek apoptoz meydana gelir. Ya da CRABP oranının FABP5'e oranına göre düşük olması ile ATRA formunun PPAR'a bağlanması desteklenerek canlılık korunur (Şekil 2.11) (86).

2.14.2. A Vitamininin İmmün Düzenleyici ve Antiviral rolü

A vitamini, bağışıklık sisteminde görev üstlenerek bağışıklık sisteminin büyümesine neden olan anti-enfektif vitamin olarak da tanınmaktadır. Aynı zamanda A Vitamini çeşitli enfeksiyonel hastalıkları iyileştirmede tedavi edici bir reaksiyon göstermektedir. A vitamini doğal bağışıklık sisteminde bulunan hücrelerin gelişiminde ve görevlerinin düzenlenmesinde etkin görevler üstlenmiştir (115). A vitamini, çeşitli hücrelerin (makrofaj, NK ve T hücreleri) miktarını ve işlevini arttırmaktadır. Aynı zamanda nötrofillerin matürasyonunu hızlandırmakta ve B hücrelerinin işlevini düzeltmektedir (116). Bunların yanı sıra yapılan deneylerde bağışıklık sisteminin işlevinin A vitamini ile düzenlenmesinin viral enfeksiyon hastalıklarında enfeksiyonun çeşidine göre hastalık halini ve ölüm oranı düşürdüğü bildirilmiştir (117).

Literatür taramasında A vitamininin kızamık, sıtma, diyare, tüberküloz, HIV ve akut solunum yolu virüslerine benzer farklı virüsler hakkında verimi araştırılmıştır (118,119). A vitamini alımının, norovirüs, influenza, hepatit B virüsü (HBV), kızamık ve sitomegalovirüs gibi birçok virüsün çoğalmasında direkt azaltıcı rolünün olduğu saptanmıştır (120,121).

A vitamini yetersizliği, RSV virüsüyle ilgili enfeksiyonların çoğalmasıyla alakalı olduğu görülmüştür. Bundan başka, A vitamini desteği verilen çocuklarda kızamık ve zatürre enfeksiyonuyla alakalı ölüm oranında büyük bir düşüş görülmüştür (122). Kızamık virüsünün çoğalmasını önleyen retinoidlerin etkili olduğu sistem, sağlıklı hücrelerin doğuştan gelen bağışıklık reaksiyonunu arttırması ile ifade edilmektedir (123).

ATRA, mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) sinyal yolunu uyarmak için nötrofillerin nükleusunda RAR üstünde etki gösterir. Gerçekleşen bu etkiyle, nötrofil hücre dışı tuzaklarını ve hücrel toksiteyi yükselterek çoklu tümör hücrelerinin etkin

bir biçimde öldürülmesine neden olur (115). Bu sebeple, ATRA'nın doğal bağışıklık yapısını farklılaşmasında, olgunlaşmasında ve fonksiyonunun düzenlenmesinde etkili olmaktadır. Retinoik asitler çeşitli yolları (sitotoksik, fagositoz) aktif ederek NK-T hücrelerinin aktivasyonu ile patojen saldırısına cevap vermektedir (115,124). Bu durumla alakalı olarak, A vitamini düşüklüğünün nötrofillerin, makrofajların T ve B lenfositlerin inhibe edilmiş işleviyle ilgili olduğu bildirilmiştir (124). Bundan sebeple, retinoidlerin salgılanmayı teşvik ettiği ve IFN-1'in reaksiyonunu kuvvetlendirdiğini işaret eden bulgular yer almaktadır (121).

2.14.3. A Vitamininin Solunum Yolu Enfeksiyonlarında Rolü

Solunum yolu enfeksiyonları dünya çapında etkin bir morbidite ve mortalite sebebidir. A Vitamini eksikliği, dünyadaki en yaygın beslenme ile ilgili sağlık sorunlarından biri olup bebeklerde ve küçük çocuklarda ciddi solunum yolu enfeksiyonlarının gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Subklinik seviyelerde bile A Vitamini eksikliği, solunum yolu hastalıklarının insidansının ve ciddiyetinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (125,126).

Yapılan bazı çalışmalarda solunum yolu hastalığının genel beslenme durumundan ziyade A vitamini durumuyla daha yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. (129). A vitamini eksikliği, siliyer epitel hücrelerinin skuamöz epitel ile değiştirildiği solunum epitelinin skuamöz metaplazisine neden olmaktadır. Aynı zamanda bu durum mukus üretiminde bir azalmaya neden olur. Bunlar patojenlerin yayılma riskini artırabilecek nedenlerdendir (125). A vitamini durumunun mukozal bağışıklık sistemi ve solunum yolu viral enfeksiyonuna direnç üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir (125).

Bulgulara göre özellikle solunum yolu enfeksiyonları, çocuklarda karaciğerde depolanan A Vitamini depolarının tükenmesiyle ilişkilendirilmiştir (127). Plazma A vitamini düzeyi düşük kişilerde tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları daha sık görülmektedir ve bu gelişmekte olan ülkelerdeki temel sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Bunlara ilaveten, bulaşıcı hastalıklar ve özellikle solunum yolu sırasında, plazma retinol seviyeleri düşerek enfeksiyona karşı artan bir duyarlılığı uyarılmaktadır (128). Bu nedenle gelişmekte olan ülkelere bebeklere A vitamini takviyesi yapılır ve genellikle takviyelerin faydalı olduğu ve solunum yolu enfeksiyonlarını azalttığı kabul edilmektedir (130).

Yapılan bir diğer deneyde A vitamini yetersizliğinin dđnya genelinde önemli akut alt solunum yolu enfeksiyonlarının başta gelen sebebi olan RSV virđs enfeksiyonunun ilerlemesinde ciddi bir risk faktörü haline geldiği belirlenmiştir (131).

2.14.4. A Vitamini ve COVID-19

A vitamininin tüm koronavirđs çeşitleri hakkında olan reaksiyonu deney hayvanlarıyla yapılan birtakım incelemelerle araştırılmıştır. A vitamini bakımından eksik bir gıda tüketen tavukların, koronavirđs çeşitlerinden olan IBV virđsü ile enfekte edilmesi neticesinde A vitamini bakımından yeterli gıda tüketen tavuklara karşı IBV virđs enfeksiyonunu daha şiddetli geçirdikleri yayınlanmıştır (132).

COVID-19 hastaları, tipik olarak retinol tükenmesi ve bozulmuş retinoid sinyalleme nedeniyle gelişen A vitamini eksikliğine benzeyen birden fazla belirti ve bulgu gösterir. Örneğin, COVID-19'un bazı laboratuvar ve radyolojik görüntüleme bulguları, klinik gözlemleri ve semptomları A vitamini eksikliği ile benzerlik göstermektedir. Bağışıklık sistemi, merkezi sinir sistemi ve gözlerdeki değişiklikler ve özellikle koku ve tat bozukluğu gibi bu belirti ve semptomların çoğu A vitamini eksikliğinde de çok yaygındır (133,135)

Bağışıklık, solunum, merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler, sindirim sistemleri, böbrek, böbreküstü bezi, koku, tat, işitme, görme ve denge bozuklukları ile ilgili birçok COVID-19 belirtisi retinoid sinyal bozuklukları ile ilişkilidir (133,134,137). RALDH enzim aktivitesi, ATRA sentezi, RA reseptörleri ve CYP450 enzimleri gibi RA metabolizmasında önemli olan enzimler ve moleküller, ciddi COVID-19 hastalarında önemli ölçüde etkilenen ve hasar gören organ sistemlerinde yüksek oranda bulunduğu gibi hemen hemen tüm organ sistemlerinde de bulunmaktadır. RA sinyal bozuklukları, COVID-19'da görülenlere benzer yaygın ve şiddetli semptomlara ve belirtilere neden olabilir (136,137). Bu nedenle A vitaminin COVID-19 salgınını iyileştirmede ve akciğer enfeksiyonunu engellemek için ümit verici bir yöntem olabileceği belirtilmiştir (138).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

3.1.1 Hücre Hattı

Tez çalışmasında insan göbek kordonu veni endotel hücresi (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- -20 °C Buzdolabı (Arçelik)
- -80 °C Buzdolabı (Nüve)
- Class II type biological safety cabinets (Nuair, USA)
- CO₂ inkübatör (Thermo Scientific, USA)
- Floresans mikroskobu (Olympus U-RFL-T)
- Işık mikroskobu (Leica, USA)
- Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- PCR cihazı (Sensoquest, Germany)
- RT-PCR Rotor-Gene cihazı Q (Qiagen, Germany)
- Soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific, USA)
- Spectrophotometer ND-1000 (Nanodrop, USA)
- Su banyosu (Mettler)
- Vorteks ve Mini santrifüj (Eppendorf)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- BrightGreen 2X qPCR Kiti (Abm, Katalog no: MasterMix-S)
- Calcitriol (Cayman, Katalog No:71820)
- DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma, Katalog no: RNBH8958)
- DMSO- Dimetil sülfoksit (Sigma, Katalog no: PHR1309)
- EBM- Endothelial Basal Medium (Lonza, Katalog no: CC-3121)

- EGM- Endothelial Growth Medium (Cell, Katalog No: 211-500)
- FBS- FetalBovine Serum (Serox, Katalog no: SRX181H-500)
- HCl (Sigma, Katalog no: K21218914)
- MTT (Sigma, Katalog no:M5655)
- Onscript cDNA Synthesis Kit (Abm, Katalog no: G234)
- Retinoic Acid (Sigma Katalog No: SLCB4143)
- RNA izolasyon Kiti (Bio Basic, Katalog no:BS1361)
- RPMI 1640 (Biowest, Katalog No: MS00OC1009)
- Tripsin (Thermofisher, Katalog No:25.200.056)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü ve Aşamaları

Çalışmamızda ticari firmadan alarak kullandığımız HUVEC (insan göbek kordonu ven endotel hücreleri) hücreleri ile ilgili araştırma Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarında yer alan hücre kültürü laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.1.1. Sterilizasyon Aşaması

Çalışmaya başlanmadan önce laminar kabin, %70'lik etil alkol ve 45 dk UV ışık kullanılarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Kullanılacak malzemeler %70'lik etil alkolle temizlenerek laminar kabin içerisine alınmıştır.

3.2.1.2 Besiyerinin Hazırlanması Aşaması

Hücreleri kültür kaplarında büyötmek için gerekli olan besiyeri için kullanılan malzemeler kullanılmadan önce su banyosunun içinde (yaklaşık 10 dak) 37°C'ye ısıtıldı.

Besiyeri için kullanılan maddelerin miktarları ve oranları:

- 50 ml % 10 FBS
- 5ml % 1 Penicillin/Streptomycin (Antibiyotik)
- 5ml % 1 L-Glutamine
- 500ml DMEM-F12/RPMI 1640
- 500 ml EBM

3.2.1.3 Hücrelerin çözülmesi aşaması

Dondurulmuş hücreler sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra 37°C'de çözdürülerek laminar kabin içerisinde DMEM/RPMI 1640 besiyerine hücreler eklendikten sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü ve süpernatant atıldı.

Çöktürülen hücreler hafifçe el yardımı ile vurularak homojenize edilerek 5ml DMEM-F12/RPMI 1640 besiyeri eklenen 25 cm²'lik flaska eklenerek kültüre edildi. Flaskın kapağı hafif açık olacak şekilde 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortam olan inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Her 12 saatte bir kontrol edilerek her iki günde bir mediumları değiştirilmiştir.

Hücreler 25 cm²'lik flaskın yüzeyinin tümünü kapladıktan sonra flask içindeki besiyeri atılarak flask yüzeyine tutunmuş haldeki hücreler 2 ml HBSS ile yıkandıktan sonra HBSS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 1ml tripsin-EDTA eklenerek yaklaşık 2-3 dk inkübatörde bekletilerek mikroskop altında flask yüzeyine yapışmış haldeki hücrelerin ayrılıp ayrılmadıklarına bakılmıştır. Mikroskop altında flaskın yüzeyinden hücrelerin kalkması gözlendikten sonra besiyeri eklenerek falkon tüpe alınmıştır.

Hücreler falkon tüpe aktarıldıktan sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Çöktürülen hücreler hafifçe el yardımı ile vurularak homojenize edilerek 10-12 ml besiyeri eklenerek 75 cm²'lik flaska aktarıldı. 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortam olan inkübatörde hücrelerin %75-80 doluluk oranına ulaşarak çoğalması için inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin çoğalması tamamlandıktan sonra gerekli plaklara deney gruplarını oluşturmak için hücre ekimi yapılmıştır.

3.2.1.4. Hücre Ekimi Aşaması

Hücreler 75 cm²'lik flaslarda %80-90 oranında çoğalınca, tripsin muamelesiyle kaldırılıp 6 kuyucuklu petrilere 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir.

3.2.2. All-trans retinoik asit (ATRA) Çözeltilisinin Hazırlanması

Aracı firmadan toz şeklinde alınan 50 mg ATRA, laminar kabin içerisinde hafif karanlık ortamda üzerine konsantrasyonu 132,8 mM olacak şekilde 1250 µl DMSO eklenerek

stok çözelti oluşturuldu. Oluşan stok çözelti daha sonra kullanılmak üzere alikotlanarak -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.3. 1,25-dihidroksivitamin D3 (Kalsitriol) Çözeltisinin Hazırlanması

Aracı firmadan toz şeklinde alınan 50 mg Kalsitriol, laminar kabin içerisinde üzerine konsantrasyonu $12 \times 10^4 \mu\text{M}$ olacak şekilde 1 ml saf etanol eklenerek stok çözelti oluşturuldu ve oluşan stok çözelti daha sonra kullanılmak üzere alikotlanarak -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.4. Hücreden RNA İzolasyonu

6 kuyucuklu petrilere ekimi gerçekleştirilen HUVEC hücre hattının besiyerine DMSO/Etanol ile seyreltilmiş ATRA ve Kalsitriol belirlenen konsantrasyonlarda eklenerek deney grupları oluşturuldu. ATRA ve Kalsitriol uygulanacak gruplar kendi içinde 24 ve 48 saat olacak şekilde ayarlandı. 24 ve 48 saatlik her grup kendi içinde 8 gruba ayrıldı.

All-trans retinoik asit (ATRA) ve Kalsitriolün hücrelere uygulanması:

Gruplar:

Grup 1: 24 saatlik uygulama grupları;

ATRA 24 saatlik uygulama grubu;

1. Grup: Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. Grup: 0,1 μM ATRA uygulanacak hücreler
3. Grup: 0,5 μM ATRA uygulanacak hücreler
4. Grup: 1 μM ATRA uygulanacak hücreler

Kalsitriol 24 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. Grup: 1 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
3. Grup: 5 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
4. Grup: 10 nM kalsitriol uygulanacak hücreler

Grup 2: 48 saatlik uygulama grupları;

ATRA 48 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. Grup: 0,1 μ M ATRA uygulanacak hücreler
3. Grup: 0,5 μ M ATRA uygulanacak hücreler
4. Grup: 1 μ M ATRA uygulanacak hücreler

Kalsitriol 48 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. Grup: 1 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
3. Grup: 5 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
4. Grup: 10 nM kalsitriol uygulanacak hücreler

ATRA ve kalsitriol uygulanan gruptaki hücreler 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortam olan inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

24 saat ve 48 saat sonunda oluşturulan bu 16 gruptan RNA izolasyonu için, Biobasic RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. Kitin iş akış şeması temel alınarak RNA izole edildi.

RNA izole protokolü aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

1. Hücreler, ATRA ve kalsitriol muamele ile istenilen sürenin sonunda (24 saat veya 48 saat sonra) tripsin muamelesiyle kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 15 ml'lik falkonlara eklenerek 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve üzerine 450 μ l RLT eklendi ve pipetaj yapıldı.
3. Üzerine 1X (225 μ l) etanol eklendi ve ters çevrilerek karıştırıldı.
4. Oluşan tüm süspansiyon filtreli tüpe konulup, oda sıcaklığında 12000 g'de 30 saniye santrifüjlenir. Altaki tüpte biriken sıvı uzaklaştırılır.
5. Filtreli kısma 500 μ l Buffer RW Solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 12000 g'de 30 saniye santrifüjlenir. Altaki tüpte biriken sıvı uzaklaştırılır.

6. Filtreli kısma 500 µl RPE Solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 12000 g'de 30 saniye santrifüjlenir.
7. Alttaki tüpte biriken sıvı uzaklaştırılır ve tekrar hiçbir şey eklenmeden 12000 g'de 30 saniye santrifüjlenir.
8. Kolonlar yeni 1,5 ml'lik toplama tüplerine koyuldu.
9. 1,5 ml'lik falkon tüpüne alınan kolonun filtreli kısmından 50 µl RNase bulunmayan su eklenerek 2 dk oda sıcaklığında inkübasyona alındı.
10. 12000 g'de 30 saniye santrifüj yapılarak total RNA elde edilmiştir.
11. Elde edilen RNA'lardan ölçümü yapılmak üzere 2 µl alındı ve geri kalan kısım -80°C 'de saklanmak üzere kaldırıldı.

3.2.5. İzole RNA'nın Miktar ve Kalite Tayini

RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA örneklerinin miktar ve kalitesinin belirlenmesi amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bunun için NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer cihazı kullanılarak ölçüm yapıldı.

3.2.6. İzole RNA'dan cDNA Eldesi

İzole edilerek elde edilen RNA örneklerinden cDNA elde etmek için OneScript® Plus cDNA Sentez kiti kullanıldı. Tepkimeye girecek RNA'lar eşit konsantrasyonlara ayarlandı. Kitin iş akış şeması tablo 3.1. temel alınarak cDNA elde etme işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. cDNA sentezinde gerekli komponentlerin miktarları

Bileşenler	miktar (µl)
5x RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Primers	1 µl
OneScript Plus RTase	1 µl
Total RNA	13 µl
Toplam	20 µl

Belirtilen miktarlarda karışımlar ile hazırlanan numuneler Sensquest PCR cihazında Tablo 3.2.'de gösterilen reaksiyon şartlarıyla RT-PCR tepkimesi yapılmıştır.

Tablo 3.2. cDNA sentezi reaksiyon şartları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)
İnkübasyon	25	10
Enzim aktivasyonu	50	30
Enzim inaktivasyonu	85	5

Elde edilen cDNA örnekleri, 5µl miktarında eşit miktarlarda dağıtılacak şekilde 0,2 ml'lik PCR tüplerine koyularak -80 °C'de kaldırılmıştır.

3.2.7. Primerlerin Seçimi ve Dizaynı

Primerlerin seçimi ve dizaynı yapılırken genin ifade seviyesini anlamak için kodlanan bölgelerin herhangi bir bölgesinde planlanabilmektedir. Primerler, NCBI veri deposu kullanılarak planlanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Seçilen genler için primerler ticari olarak temin edilmiştir. Tasarımı yapılarak kullanılacak primerlerin ileri ve geri primer dizilimleri tablo 3.3.'de gösterilmiştir. Referans gen olarak beta aktin geni seçilmiştir.

Tablo 3.3. Hedef genlerimiz için dizayn edilen primer dizilimleri.

* F: Forward “ileri” primer, R: Reverse “geri” primer

Gen ismi	Simgesi	Primer dizisi
Actin Beta	ACTB-F	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	ACTB-R	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2	ACE2-F	TCCATTGGTCTTCTGTACCCCG
	ACE2-R	AGACCATCCACCTCCACTTCTC
Transmembrane serine protease 2	TMPRSS2-F	CCTCTAACTGGTGTGATGGCGT
	TMPRSS2-R	TGCCAGGACTTCCTCTGAGATG
Transmembraneserine protease 11D	TMPRSS11D-F	GGAGCCATCTTGTCTGGAATGC
	TMPRSS11D-R	AACCAAAGCCGCCGTGAGTCTT
Emmprin	CD147-F	GGCTGTGAAGTCGTCAGAACAC
	CD147--R	ACCTGCTCTCGGAGCCGTTCA
DipeptidilpeptidazIV (DPP4)	CD26-F	AAAGGCACCTGGGAAGTCATCG
	CD26-R	CAGCTCACAACCTGAGGCATGTC
Cyclophilin A	CYPA A-F	GGCAAATGCTGGACCCAACACA
	CYPA A-R	TGCTGGTCTTGCCATTCTGGA

3.2.8. Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

HUVEC’lerin gen anlatımı farklılıklarının belirlenmesi için seçilen genlerin primerleri, cDNA’lar kullanarak RT-qPCR’da çoğaltıldı. Bunun için ticari olarak temin edilen

BrightGreen 2x qPCR Kiti kullanıldı. Çalışma tablo 3.4. gösterilen miktarlarda karışım yapılarak Rotor Gene Real -Time PCR cihazında çalışılmıştır.

Tablo 3.4. RT-qPCR gerekli komponentlerin miktarları

Bileşenler	miktar (µl)
BrightGreen Mastermix	5 µl
İleri primer (10 µM)	0,25 µl
Geri primer (10 µM)	0,25 µl
Rnaz/Dnaz içermeyen su	3,5 µl
cDNA (50 ng)	1 µl
Toplam	10 µl

qRT-PCR tepkime koşulları tablo 3.5. gösterilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.5. qRT-PCR reaksiyon şartları

	Sıcaklık (°C)	Süre(sn)	Döngü Sayısı
Enzim aktivasyonu	95	300	
Denaturasyon	95	15	} 40 döngü
Primer bağlanması/uzama	60	60	

Çalışma sonunda qRT-PCR çalışması ile elde edilen Ct değerleri kullanılarak beta aktin genine ait Ct değerlerine göre istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR ile elde edilen gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analiz yapılırken $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change-katlı değişim) formülü kullanılmıştır. Ct (cycle threshold), qRT-PCR deneylerinde Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktaya verilen isimdir.

$$\Delta Ct = \text{Hedef Gen} - \text{Referans Gen}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen}) - \text{Kontrol } \Delta Ct (\text{referans gen}))}$$

3.2.9. Hücre Proliferasyonu Deneyi (MTT deneyi)

MTT 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür, hücre canlılığı miktarı hakkında fikir veren ölü hücre miktarı hakkında fikir vermeyen kolorimetrik ölçüme dayalı bir analiz yöntemidir.

MTT ticari olarak toz formunda satıcı firmadan temin edildi. MTT deneyi çalışması aşağıdaki aşamalar şeklinde yapıldı. Bu çalışma 3 kez tekrarlandı.

1. Çalışma, 24 ve 48 saat olmak üzere iki grup olacak şekilde iki ayrı 96 kuyucuklu petrinin 8 kuyucuğuna 5×10^4 /kuyucuk hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
2. Hücreler çoğalıp %60-70 doluluk oranına ulaştığında besiyeri uzaklaştırılıp FBS içermeyen eklendi.
3. Yaklaşık 5-6 saat inkübasyondan sonra 24 saatlik ve 48 saatlik gruplardaki hücelere daha önce belirlenen konsantrasyonlarda ATRA ve kalsitriol ilaçları muamelesi yapıldı.

Gruplar:

Grup 1: 24 saatlik uygulama grupları

ATRA 24 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. Grup: 0,1 μ M ATRA uygulanacak hücreler
3. Grup: 0,5 μ M ATRA uygulanacak hücreler
4. Grup: 1 μ M ATRA uygulanacak hücreler

Kalsitriol 24 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. Grup: 1 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
3. Grup: 5 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
4. Grup: 10 nM kalsitriol uygulanacak hücreler

Grup 2: 48 saatlik uygulama grupları

ATRA 48 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. Grup: 0,1 μ M ATRA uygulanacak hücreler
3. Grup: 0,5 μ M ATRA uygulanacak hücreler
4. Grup: 1 μ M ATRA uygulanacak hücreler

Kalsitriol 48 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. Grup: 1 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
3. Grup: 5 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
4. Grup: 10 nM kalsitriol uygulanacak hücreler

4. MTT tozu HBSS ile 5 mg/ml olacak şekilde sulandırılarak stok solüsyonu hazırlandı.
5. 500 μ l asidik izopropanolda 0.04 M olacak şekilde HCl hazırlandı.
6. Hücreler yaklaşık 24. ve 48. saatlik inkübasyondan sonra HBSS ile yıkandı.
7. MTT stok solüsyonu çıkarılarak 1/10 oranında HBSS ile sulandırıldı.
8. Sulandırılan MTT çalışma solüsyonundan her kuyuya 150 μ l eklenip 37 °C'de hücreler mavi renge dönüşüp kristal form oluşana kadar yaklaşık 2-3 saat inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyon sonunda inkübatörden alınan hücrelerden MTT çalışma solüsyonu uzaklaştırıldı.
10. Daha sonra her kuyuya 160 μ l asidik izopropanol eklenerek yeterli miktarda pipetaj yapıldı.
11. Örnekler Kuyulardan alınarak 1,5 ml'lik ependorflara alındı ve 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı.
12. Santrifüj sonunda süpernatant bölümden 250 μ l çekilerek 24 kuyucuklu ölçüm kaplarına aktarıldı.
13. 24 kuyulu ölçüm kapları 570 nm dalga boyunda Multiscan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazına koyularak okutuldu.

3.2.10. Migrasyon (Yara İyileşmesi)

Hücre migrasyonu, hücre göçünü laboratuvar ortamında ölçmek için kullanılan bir metottur. Tam olarak hücre tabakasına bir çizik çekilerek oluşturulan boşluğun kapanma zamanının izlenmesi deneyidir. Açılan yaraların iyileşme sürecini takip edebilmek için belirli zamanlarda mikroskop altında görüntüler alınır ve yaranın iyileşme süreci takip edilerek görüntüler karşılaştırılır.

12 kuyucuklu petrilere ekilen hücreler %100 doluluğa ulaştıktan sonra kuyucukların tam ortasından 1000 µl'lik pipet ucu yardımıyla dik bir çizgi çekilerek boşluk oluşturuldu.

1. Çizgi çekildikten sonra kalkan hücreler medium ile ortamdaki uzaklaştırıldı.
2. Önceden belirlenen konsantrasyonlarda ATRA ve kalsitriol ilaç muamelesi yapıldı.

1. Kontrol, %0.01 DMSO uygulanacak hücreler
2. 0,1 µM ATRA uygulanacak hücreler
3. 0,5 µM ATRA uygulanacak hücreler
4. 1 µM ATRA uygulanacak hücreler
5. 1 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
6. 5 nM kalsitriol uygulanacak hücreler
7. 10 nM kalsitriol uygulanacak hücreler

3. Belirli zaman aralıklarında mikroskop altında görüntüler alınarak yaranın iyileşme süreci takip edilerek görüntüler karşılaştırıldı.
4. Çekilen görüntüler Image J programı kullanılarak analiz yapıldı. Açılan boşluklar program ile ölçülerek aralarındaki yara iyileşme süresindeki farklar saptandı. Yara iyileşme süresindeki farklılıklar belirlenerek geçen zamana göre sonuçlar değerlendirildi.

3.2.11. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmadan elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 7.02 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Birbirinden bağımsız 3 deney tekrarının hesaplanmasıyla elde edilen verilerin ortalama ve standart sapma (SD) değerleri

tanımlayıcı istatistiklerden Column Statistics ile yapıldı. MTT sonuçları, gen ifade düzeylerinin değerlendirilmesi ve yara iyileşmesi sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılmasında, student t-test ve one-way ANOVA çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için $p < 0.05$ 'ten küçük değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

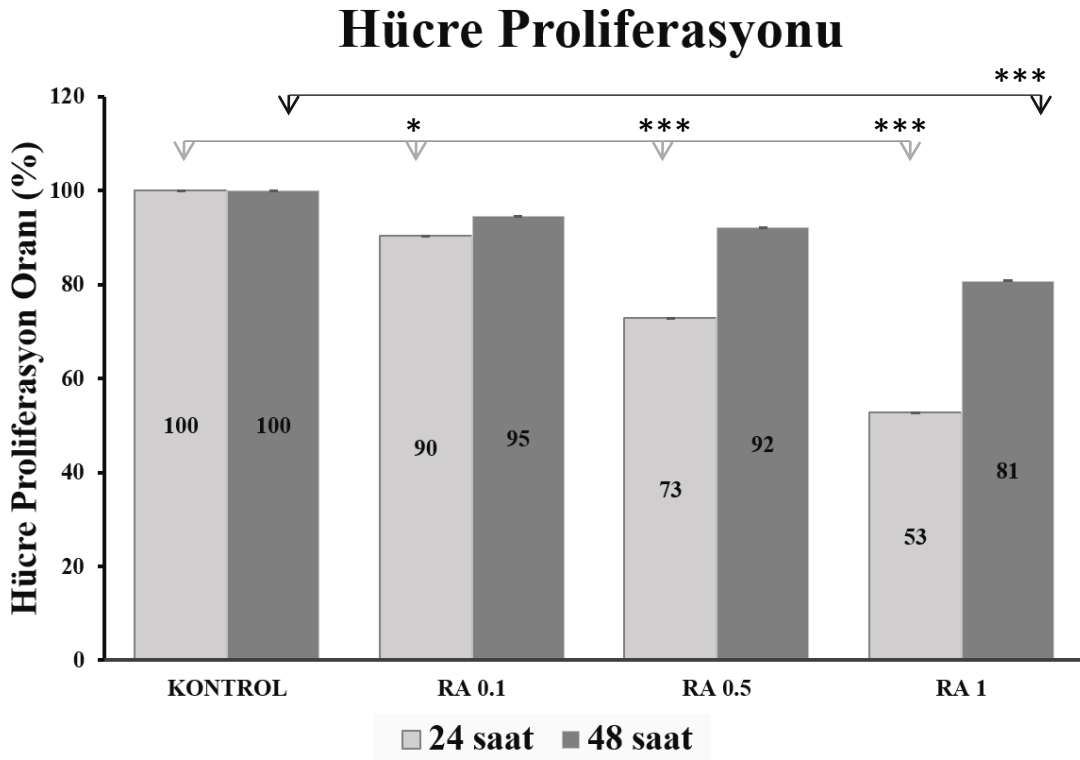


4. BULGULAR

4.1. Hücre Proliferasyonu Deney Sonucu

Hücre proliferasyon deney çalışması sonunda HUVEC hücre hattında ATRA ve kalsitriol muamelesi yapılmayan kontrol grubu, 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M konsantrasyonlarında uygulanan ATRA ve 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan kalsitriol muamelesi yapılan deney grupları oluşturuldu.

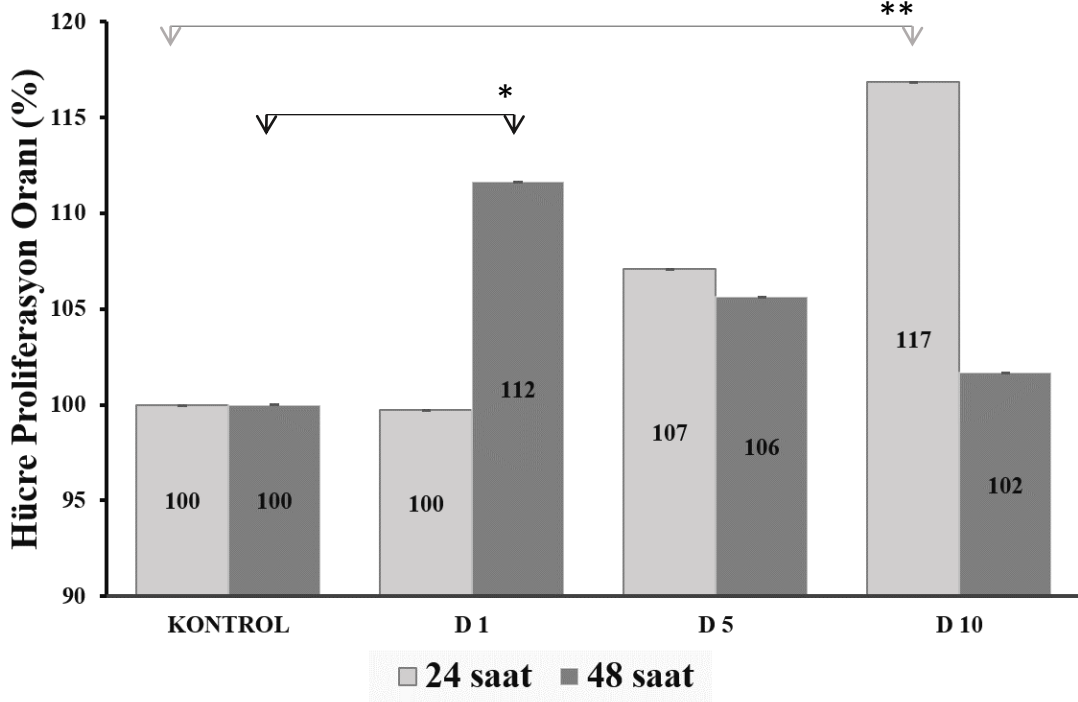
Belirli konsantrasyonlarda uygulanan (0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M) ATRA'nın 24 saatlik sürede kontrole göre hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermiştir. ATRA ilacının 48 saatlik sürede kontrole göre 0,1 μ M ve 0,5 μ M dozlarda uygulanan hücrelerin proliferasyonunu ne baskılamış ne de artırmıştır. 1 μ M doz uygulanan hücrelerin proliferasyonunun baskılandığı görülmüştür (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M konsantrasyonlarında uygulanan ATRA'nın hücrelerin proliferasyon yüzdesine etkisi.

Kalsitriol ilacının 24 saatlik sürelerde kontrole göre 1 nM ve 5 nM dozlarda uygulanan hücrelerin proliferasyonunu ne baskılamış ne de artırmıştır. 10 nM doz uygulanan kalsitriolün hücrelerin proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir. 48 saatlik sürede kalsitriolün kontrole göre 1 nM dozunun hücre proliferasyonunu arttırdığı, 5 ve 10 nM dozların ise hücrenin proliferasyonunu ne baskılamış ne de artırmıştır (Şekil 4.2.).

Hücre Proliferasyonu



Şekil 4.2. 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan 1,25 dihidroksi Vitamin D3'ün hücrelerin proliferasyon yüzdesine etkisi.

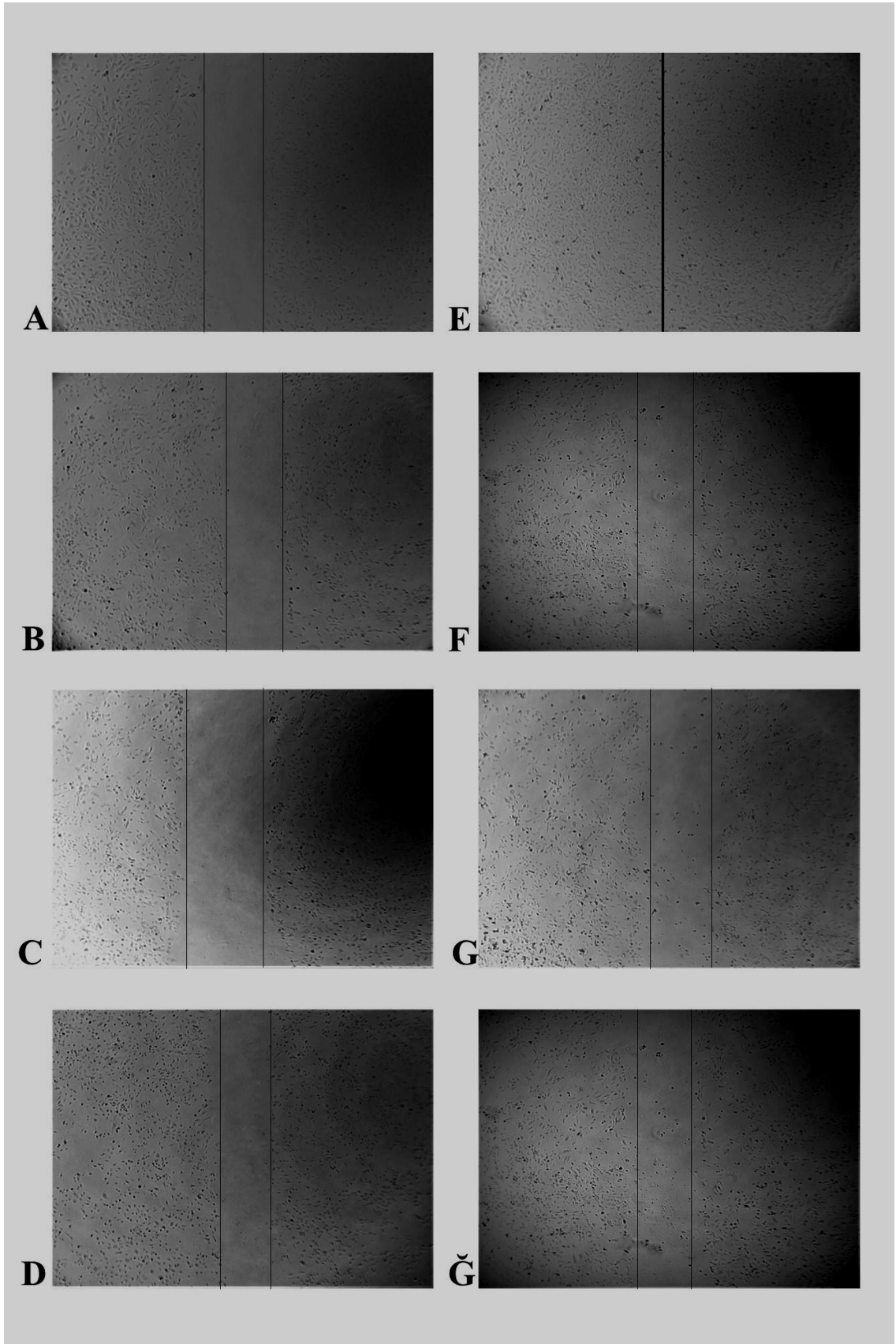
4.2. Yara İyileşme Deneyi Sonucu

Yara iyileşme deneyi çalışması için ATRA ve kalsitriol muamelesi yapılmayan kontrol grubu, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM konsantrasyonlarında uygulanan ATRA ve 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan kalsitriol muamelesi yapılan deney gruplarına ayrıldı.

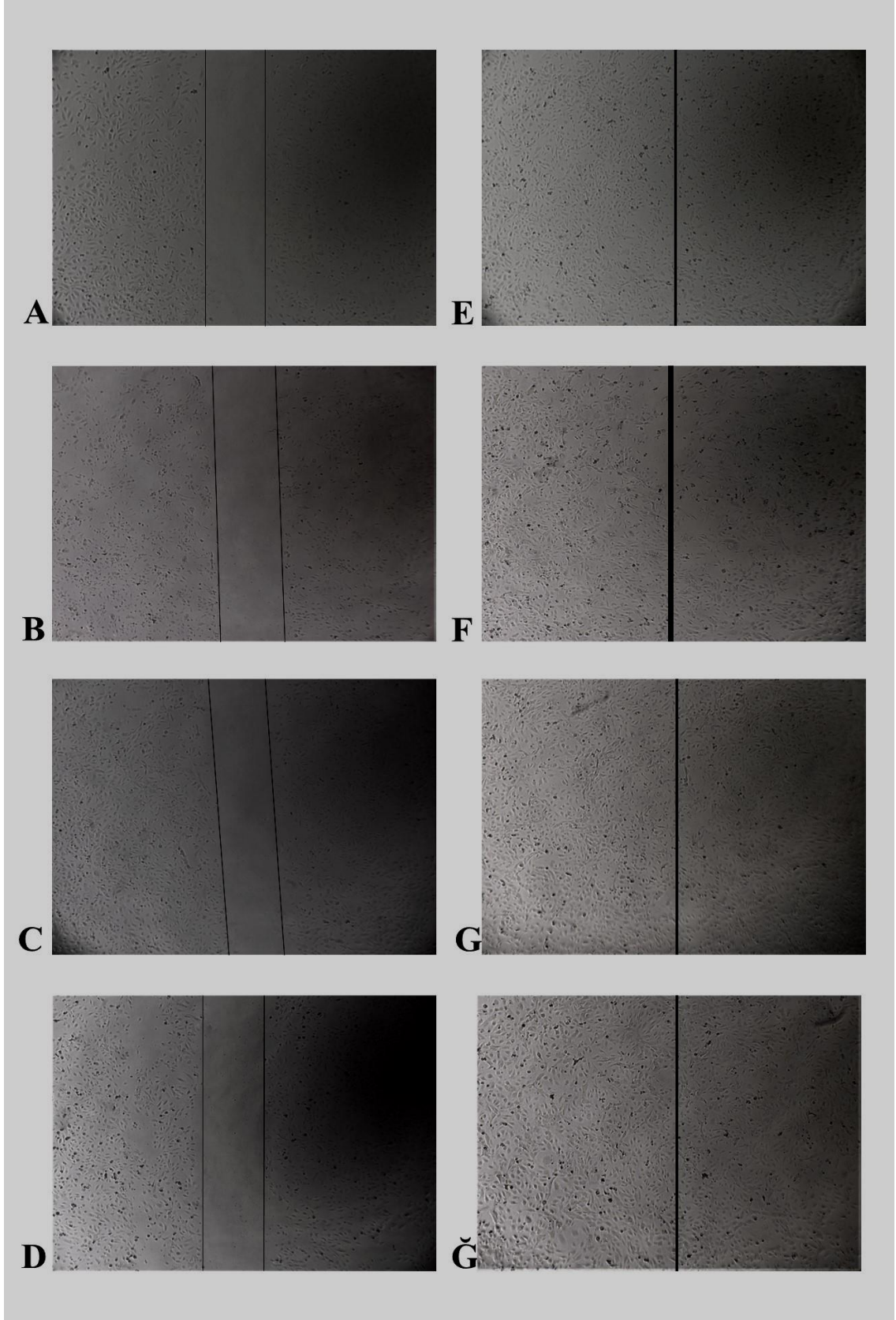
12 kuyucuklu petrilere ekilen hücreler %100 doluluğa ulaştıktan sonra kuyucukların tam ortasından 1000 µl'lik pipet ucu yardımıyla dik bir çizgi çekilerek boşluk açıldı. Açılan bu boşlukların dolması belirli aralıklarla mikroskop altında

takibe alındı. Belirli saat Aralıkları (0. ve 48. saat) sonunda mikroskop görüntüleri alındı (Şekil 4.3. ve şekil 4.4.). Alınan görüntülerde ATRA'nın uygulanan konsantrasyonlarının kontrole göre hücre migrasyonunu baskıladığını gözlemledik. 0,5 μM ve 1 μM dozlar arasında anlamlılık bulunmamıştır (Şekil 4.5.). Aynı zamanda belirli dozlarda uygulanan kalsitriolün hücre migrasyonunu artırdığı gözlemlendi. Ayrıca, kalsitriolün konsantrasyon artışına bağlı olarak da hücre migrasyonunu arttırdığını gözlemledik (Şekil 4.6.).

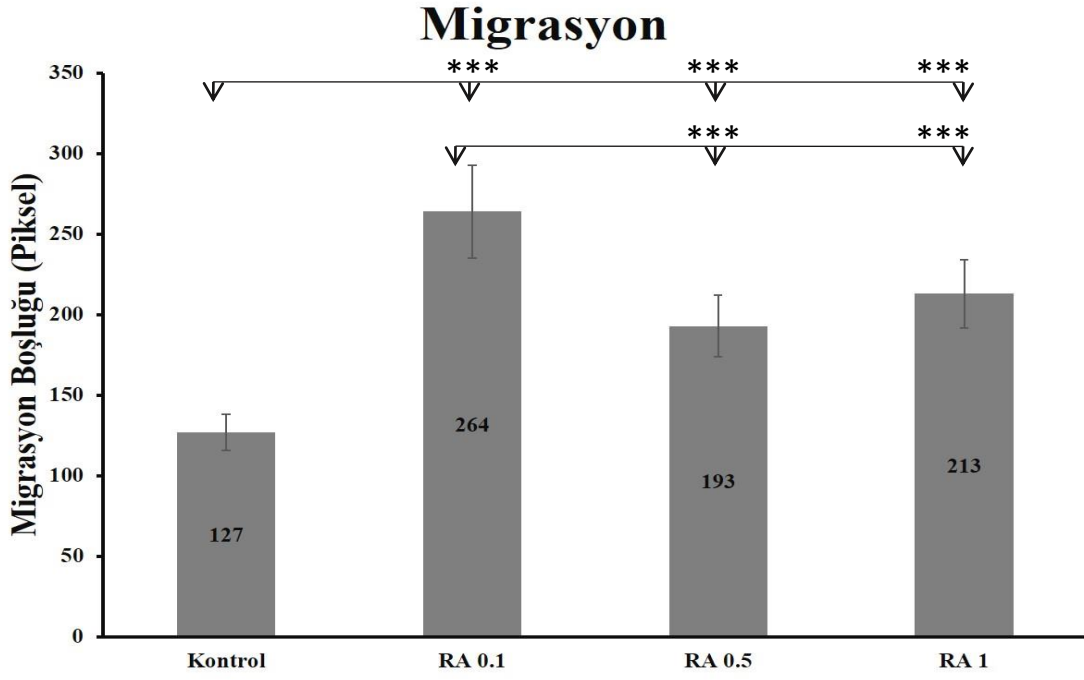




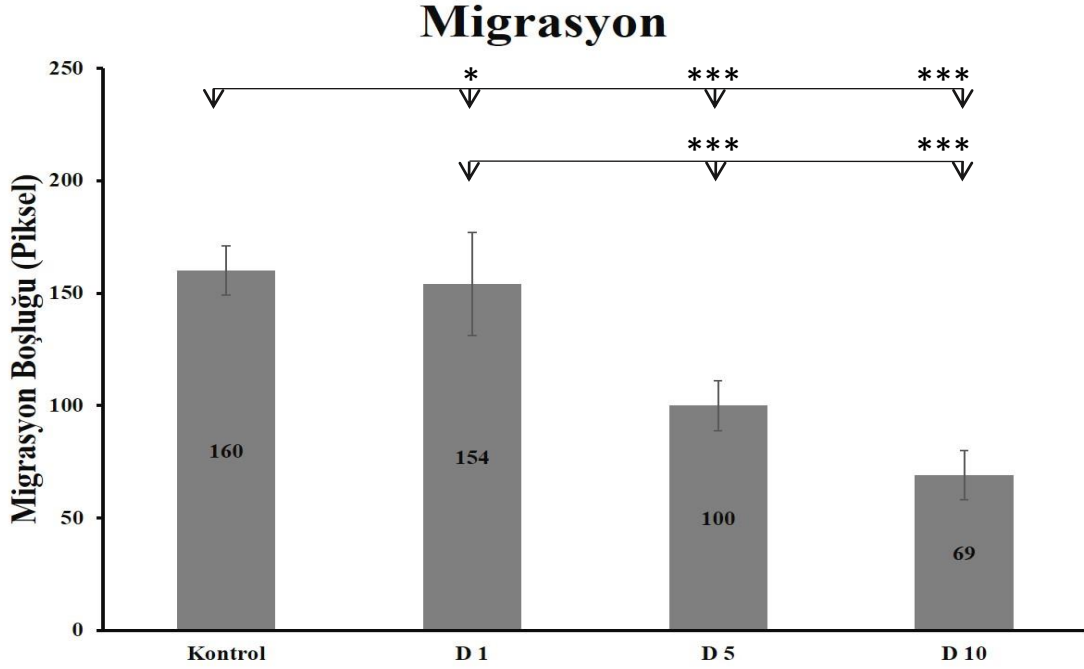
Şekil 4.3. ATRA muamele öncesi açılan boşluk A) Kontrol B) 0,1 μM C) 0,5 μM D) 1 μM ATRA'nın migrasyona etkisi. E) kontrol F) 0,1 μM G) 0,5 μM Ğ) 1 μM



Şekil 4.4.Kalsitriol muamele öncesi açılan boşluk A)Kontrol B)1 nM C)5 nM D)10 nM. Kalsitriolun migrasyona etkisi. E) kontrol F) 1 nM G) 5 nM Ğ) 10 nM



Şekil 4.5. Belirli konsantrasyonlarda ATRA uygulanan hücrelerin piksel olarak migrasyon aralığı.



Şekil 4.6. Belirli konsantrasyonlarda kalsitriol uygulanan hücrelerin piksel olarak migrasyon aralığı.

4.3. Göreceli Gen Ekspresyon Düzeyleri

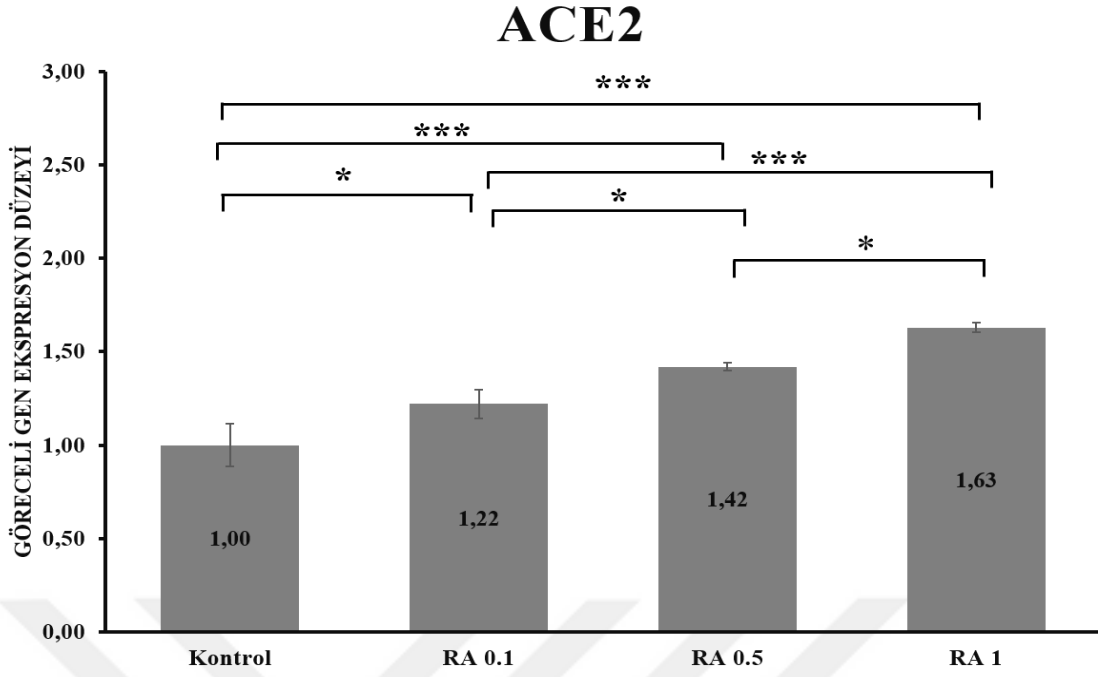
ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D, CD147, CD26 ve CYP4A genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimi incelemek amacıyla, 6 kuyucuklu petri kaplarında 24 ve 48 saatlik olmak üzere iki ana grup ayarlandı. Belirlenen iki ana grup altında, ATRA ve kalsitriol muamelesi yapılmayan kontrol grubu, 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM konsantrasyonlarında uygulanan ATRA ve 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan kalsitriol muamelesi yapılan deney grupları oluşturuldu. Elde edilen total RNA'lerden ticari kitler ile cDNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak qRT-PCR cihazında genlerin ekspresyon düzeyleri tarandı.

4.3.1. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası ACE2 Geninin Gen İfade Analizi

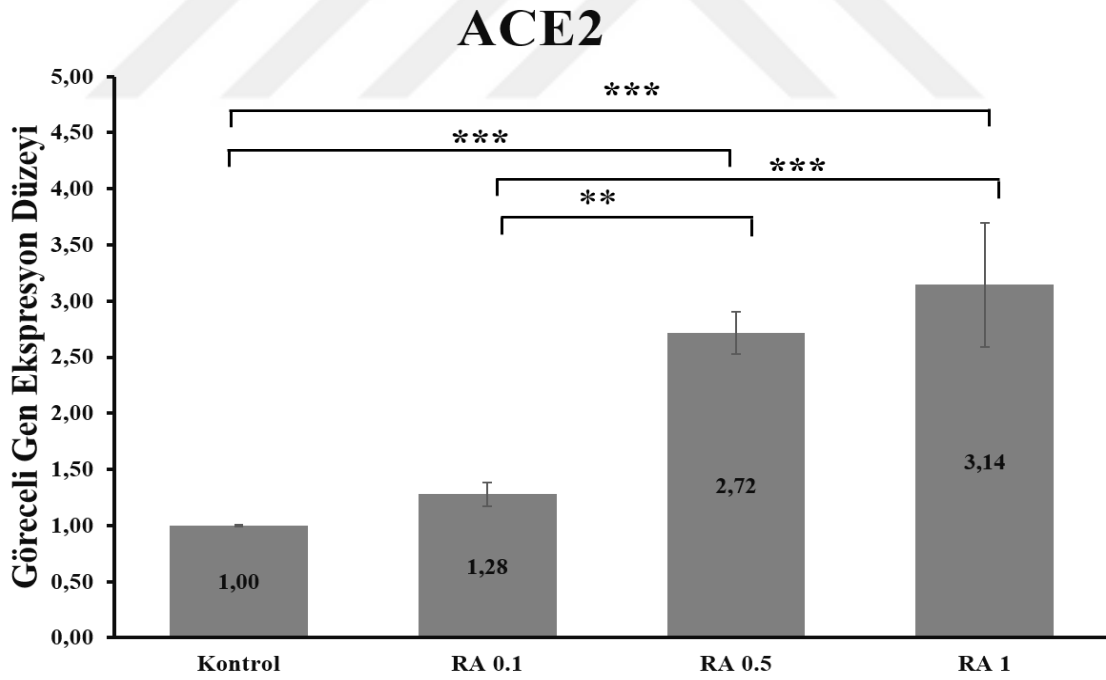
HUVEC hücre hattına 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM konsantrasyonlarında uygulanan ATRA'nın ACE2 gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre ACE2 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak artışlar gözlenmiştir. Ayrıca ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da ACE2 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak artışlar bulunmuştur (Şekil 4.7.).

Diğer grup olan 48 saatlik deney grubunda, belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre ACE2 gen ifade seviyesinde anlamlı artışlar görülmüştür. Diğer taraftan ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da ACE2 gen ifade düzeyinde artışlar olmuştur (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası ACE2 gen ekspresyon düzeyleri. (* ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$)



Şekil 4.8. 48 Saatlik ATRA muamelesi sonrası ACE2 geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri. (** ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.001$)

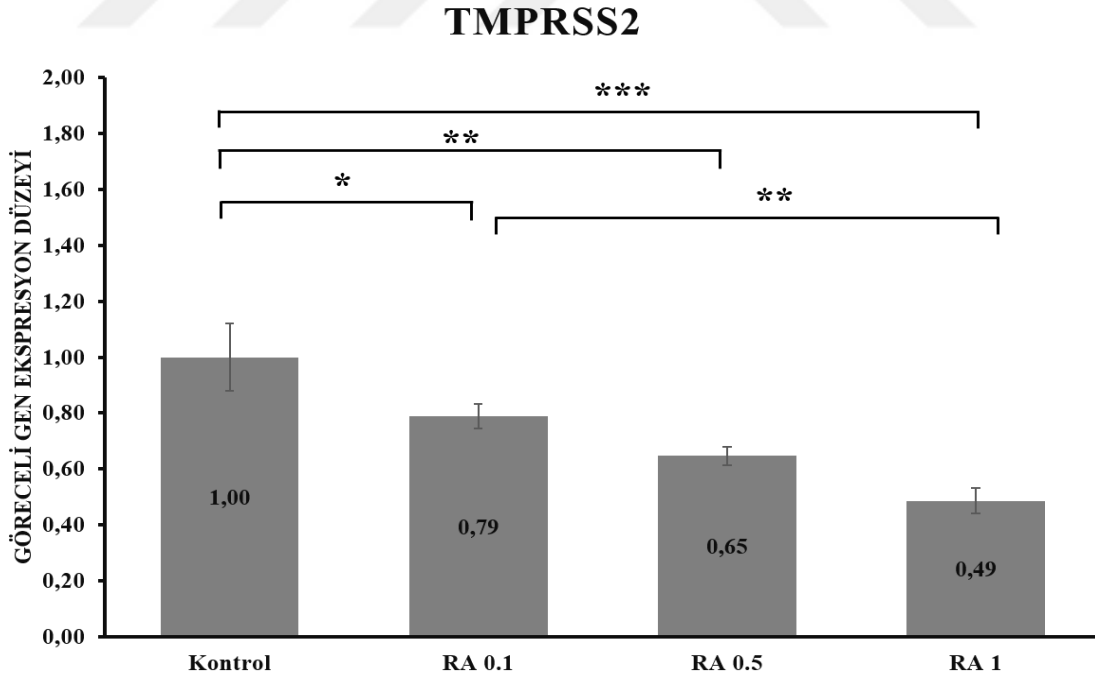
4.3.2. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası TPRSS2 Geninin Gen İfade Analizi

HUVEC hücre hattına 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M konsantrasyonlarında uygulanan ATRA'nın TPRSS2 gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

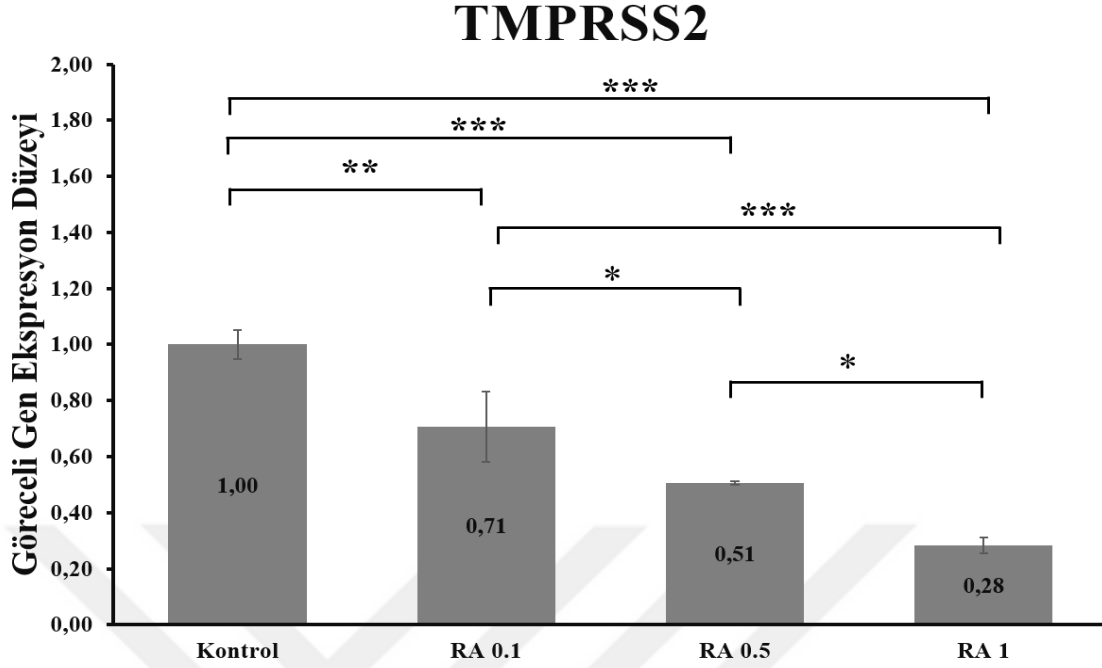
24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre TPRSS2 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler gözlenmiştir. Ayrıca ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da TPRSS2 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak düşüşler bulunmuştur (Şekil 4.9.).

24 saatlik deney grubunda 0,1 μ M ve 0,5 μ M konsantrasyonlarda uygulanan ATRA muamelesi karşılaştırılmasında hücrelerde gen ifade düzeyi anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.9.).

48 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre TPRSS2 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler tespit edilmiştir. Ayrıca ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da TPRSS2 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak düşüşler görülmüştür (Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası TPRSS2 gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$)



Şekil 4.10. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası TMPRSS2 gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$)

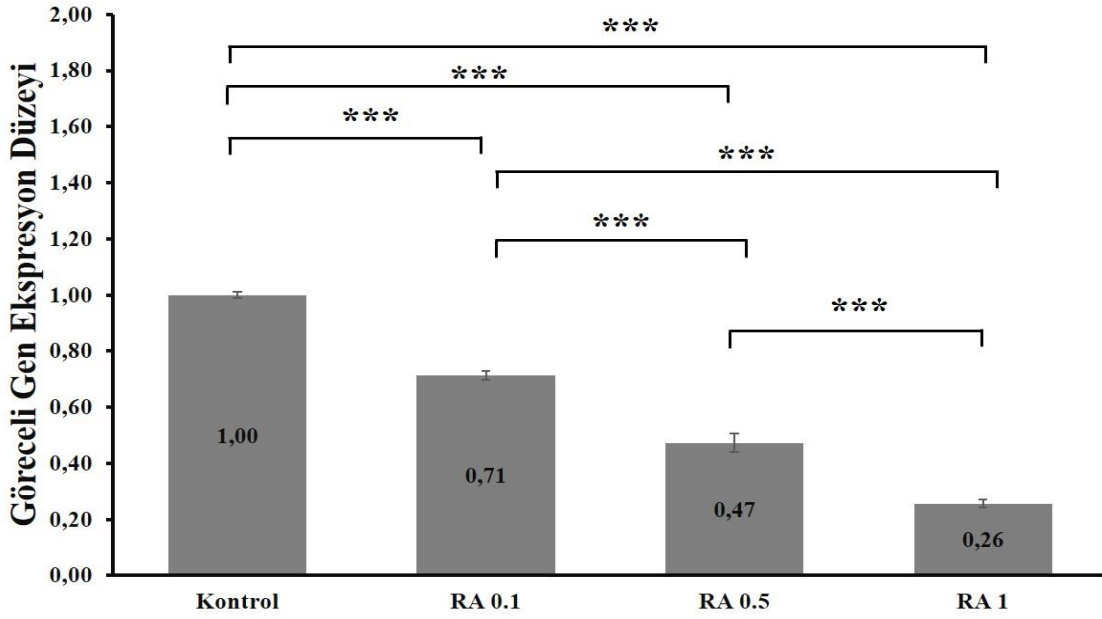
4.3.3. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası TPRSS11D Geninin Gen İfade Analizi

HUVEC hücre hattına 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM konsantrasyonlarında uygulanan ATRA'nın TMPRSS11D gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre TMPRSS11D gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak düşüşler gözlenmiştir. Öte yandan ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da TMPRSS11D gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler olmuştur (Şekil 4.11.).

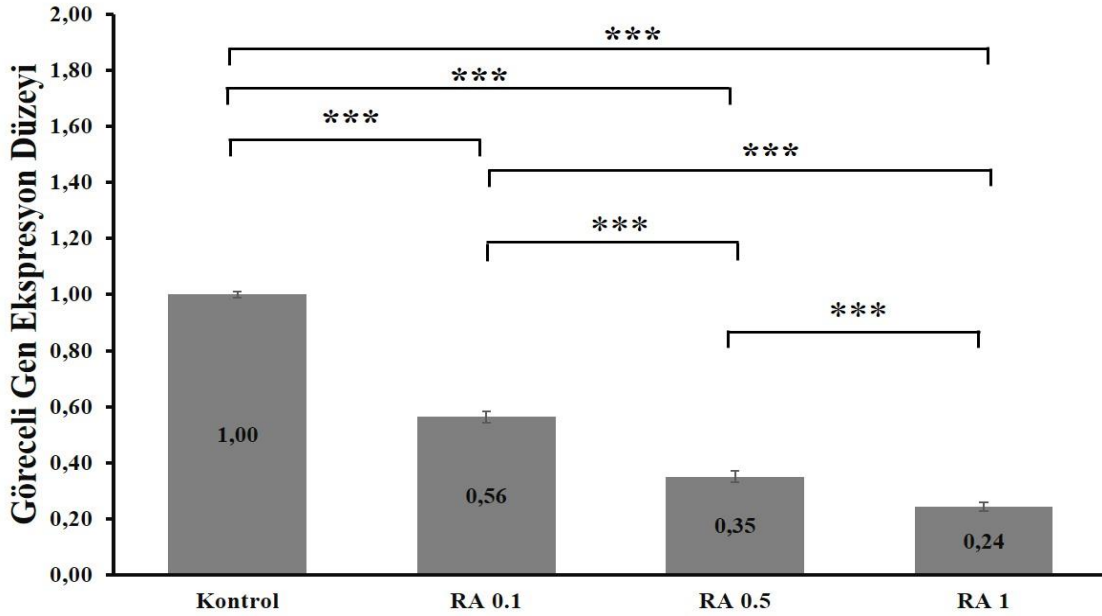
Diğer grup olan 48 saatlik deney grubunda, belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre TMPRSS11D gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler bulunmuştur. Ayrıca ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da TMPRSS11D gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler görüldü (Şekil 4.12.).

TMPRSS11D



Şekil 4.11. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası TMPRSS11D gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$)

TMPRSS11D



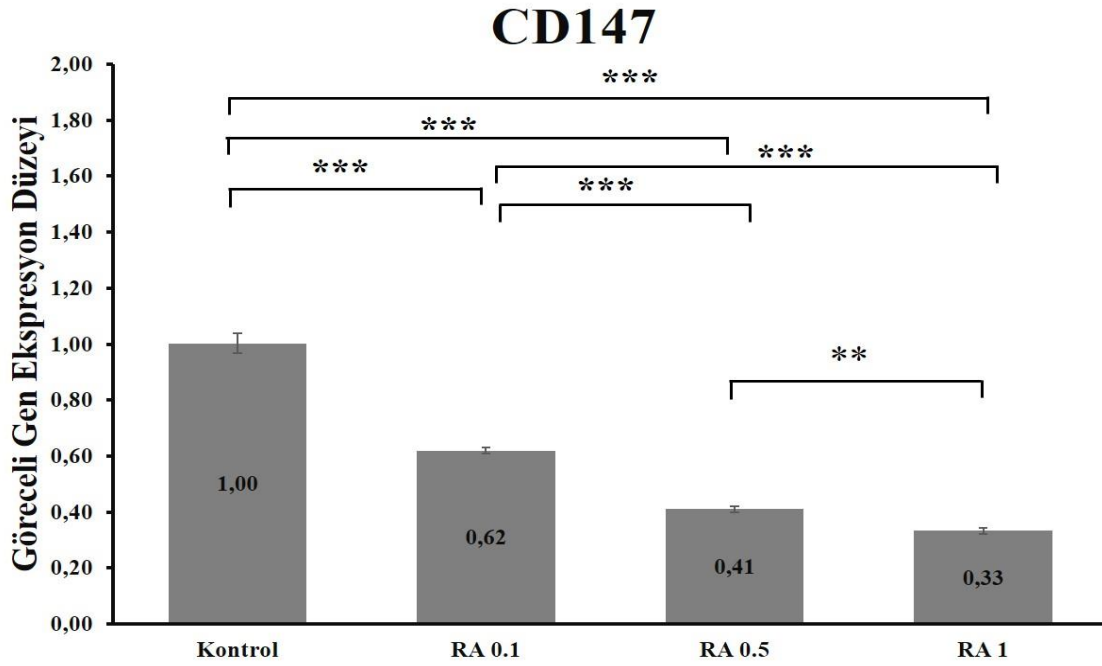
Şekil 4.12. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası TMPRSS11D gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$)

4.3.4. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası CD147 Geninin Gen İfade Analizi

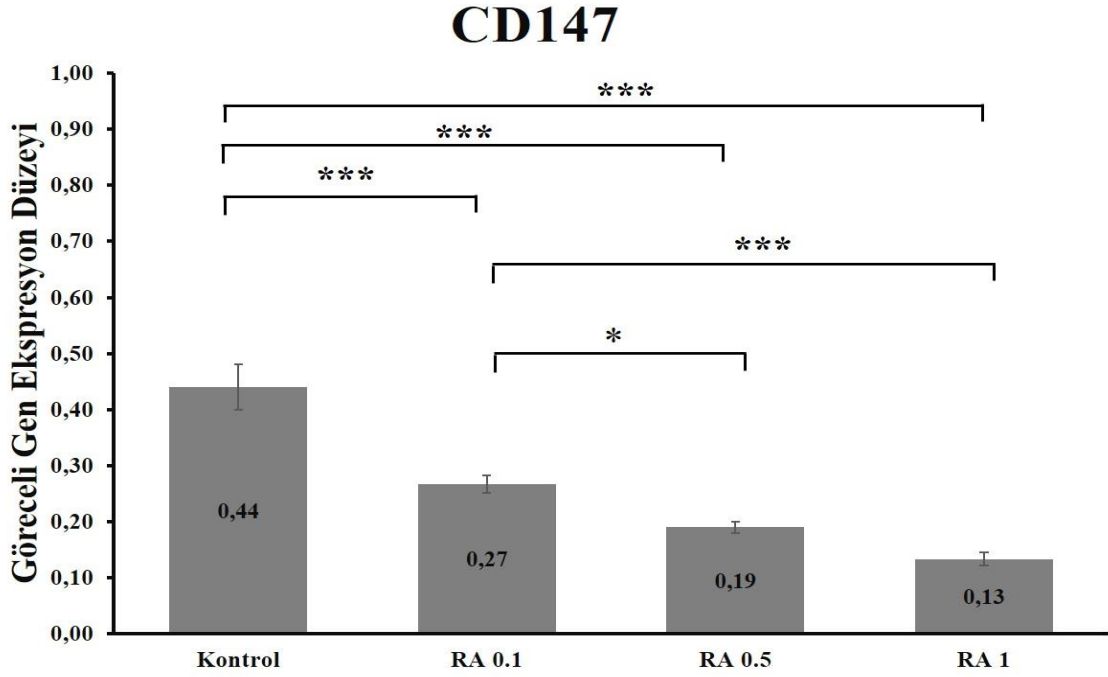
HUVEC hücre hattına 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M konsantrasyonlarında uygulanan ATRA'nın CD147 gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD147 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler tespit edilmiştir. Ayrıca ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da CD147 gen ifade düzeyinde istatistiksel düşüşler görüldü (Şekil 4.13.).

48 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD147 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler gözlenmiştir. Ayrıca ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da CD147 gen ifade düzeyinde istatistiksel düşüşler tespit edilmiştir (Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CD147 gen ekspresyon düzeyleri. (** ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.001$)



Şekil 4.14. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CD147 gen ekspresyon düzeyleri. (* ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.001$)

4.3.5. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası CD26 Geninin Gen İfade Analizi

HUVEC hücre hattına 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM konsantrasyonlarında uygulanan ATRA'nın CD26 gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

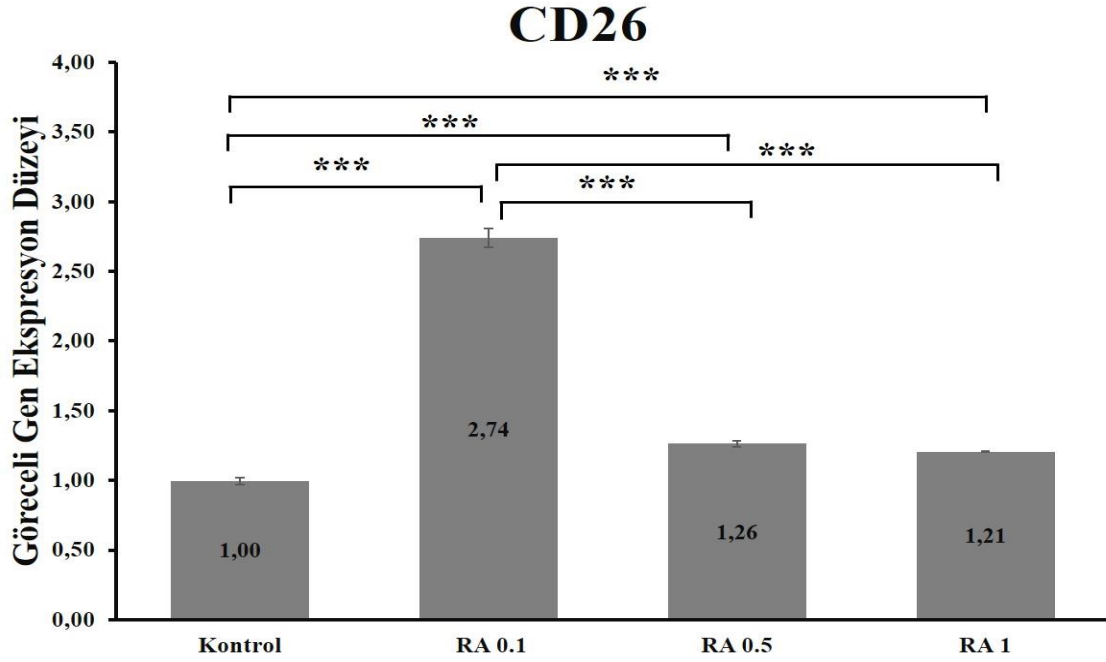
24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD26 gen ifade düzeyinde istatistiksel artışlar görülmüştür. 0,1 μM konsantrasyonunda 0,5 μM ve 1 μM konsantrasyonlara göre daha fazla gen ifade seviyesinde artış olmuştur (Şekil 4.15.).

24 saatlik deney grubunda 0,5 μM ve 1 μM konsantrasyonlarda uygulanan ATRA muamelesinin karşılaştırılması sonucunda hücrelerde gen ifade düzeyi anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.15.).

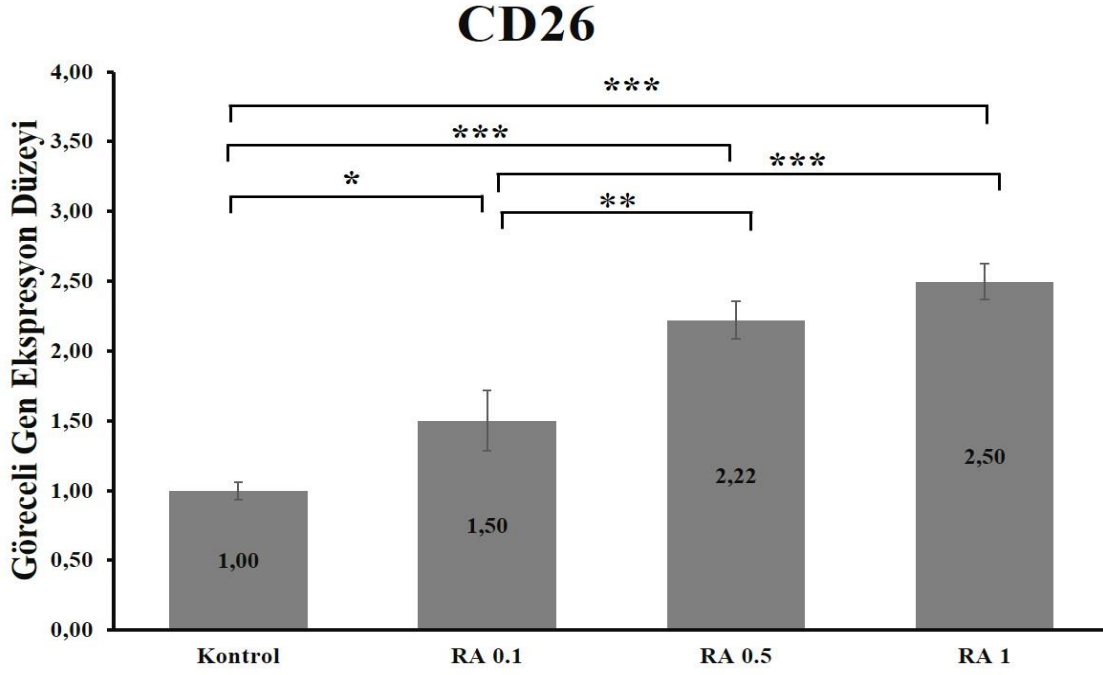
48 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD26 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak artışlar gözlenmiştir.

Diğer taraftan ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da CD26 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak artışlar olmuştur (Şekil 4.16.).

48 saatlik deney grubunda 0,5 µM ve 1 µM konsantrasyonlarda uygulanan ATRA muamelesinde hücrelerde gen ifade düzeyi anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.16.).



Şekil 4.15. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CD26 gen ekspresyon düzeyleri. (***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, $p < 0.001$)



Şekil 4.16. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CD26 gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$)

4.3.6. HUVEC Hücre Hattına ATRA Muamelesi Sonrası CYPA Geninin Gen İfade Analizi

HUVEC hücre hattına 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM konsantrasyonlarında uygulanan ATRA'nın CYPA gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

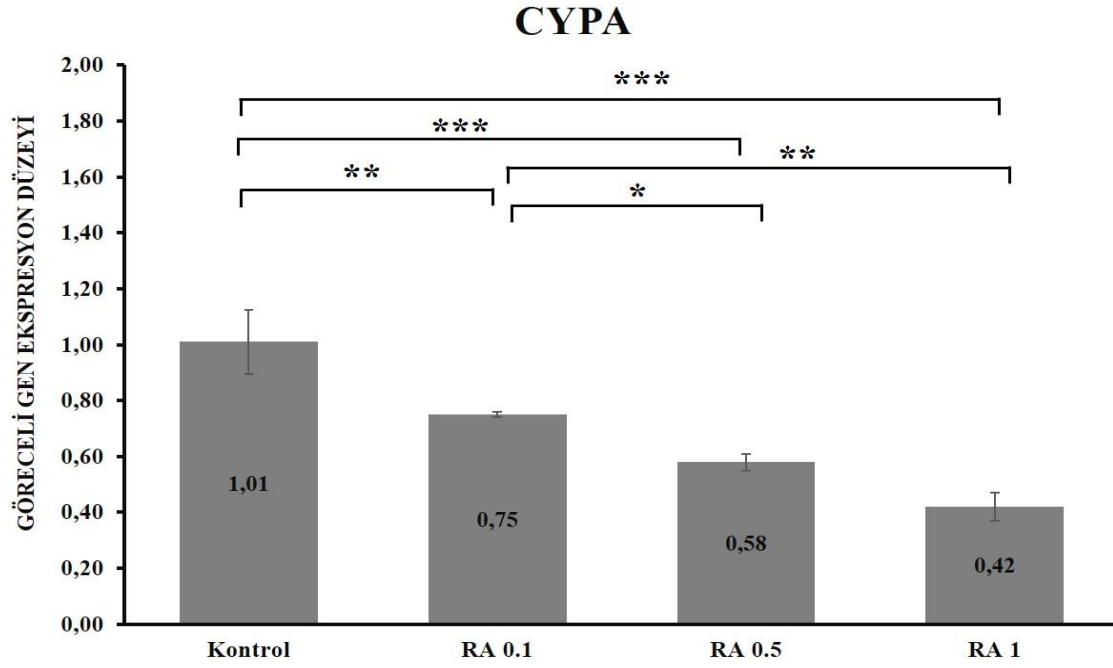
24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CYPA gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler olmuştur. Bununla birlikte ATRA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak da CYPA gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler gözlemlendi (Şekil 4.17.).

24 saatlik deney grubunda 0,5 μM ve 0,1 μM konsantrasyonlarda uygulanan ATRA muamelesi karşılaştırılması sonucunda hücrelerde gen ifade düzeyi anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.17.).

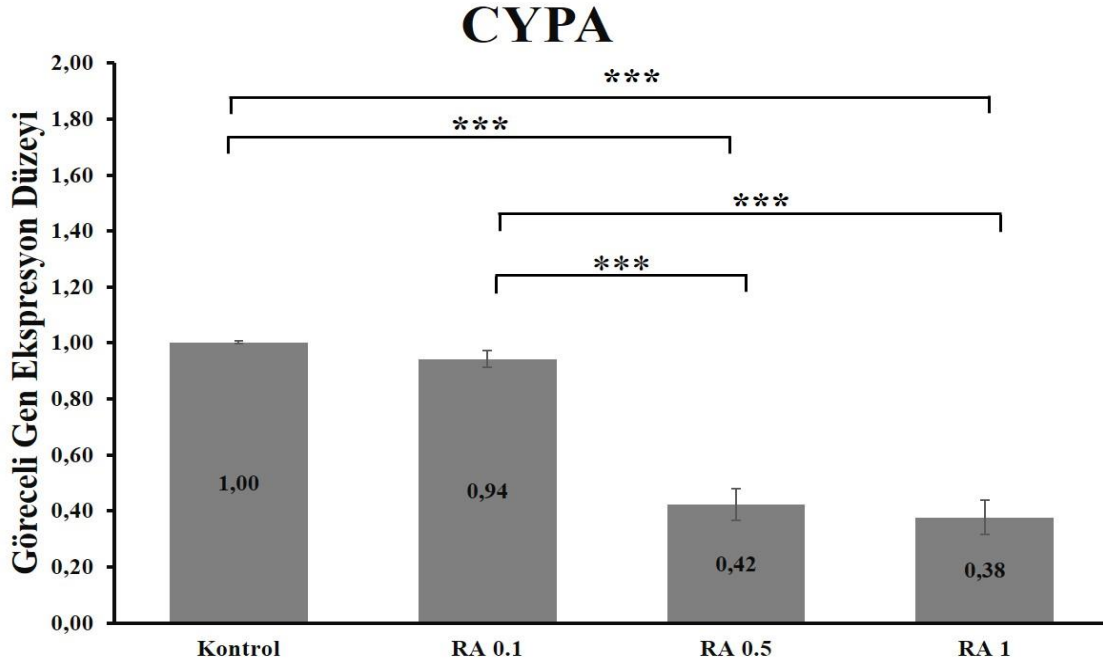
48 saatlik deney grubunda 0,5 μM ve 1 μM konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CYPA gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler

gözenmiştir. 0,1 µM konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CYPA gen ifade düzeyi anlamlı görülmemiştir (Şekil 4.18.).

Aynı zamanda 0,5 µM ve 1 µM konsantrasyonları birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.17. 24 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CYPA gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$)



Şekil 4.18. 48 Saatlik deney grubuna ATRA muamelesi sonrası CYPA gen ekspresyon düzeyleri. (***: ATRA uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, $p < 0.001$)

4.3.7. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası ACE2 Geninin Gen İfade Analizi

HUVEC hücre hattına 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan Kalsitriolun ACE2 gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

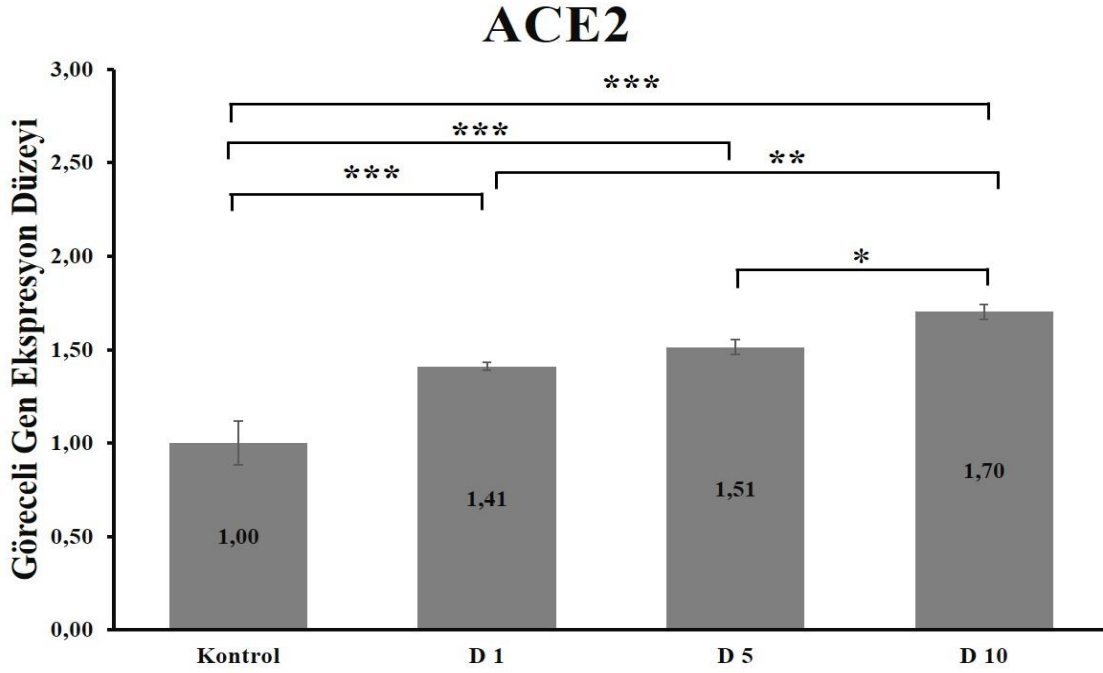
24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre ACE2 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak artışlar görülmüştür. İlâveten kalsitriolun konsantrasyon artışına bağlı olarak da ACE2 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak artışlar bulunmuştur (Şekil 4.19.).

24 saatlik deney grubunda 1 nM ve 5 nM konsantrasyonların birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık görülmemiştir (Şekil 4.19.).

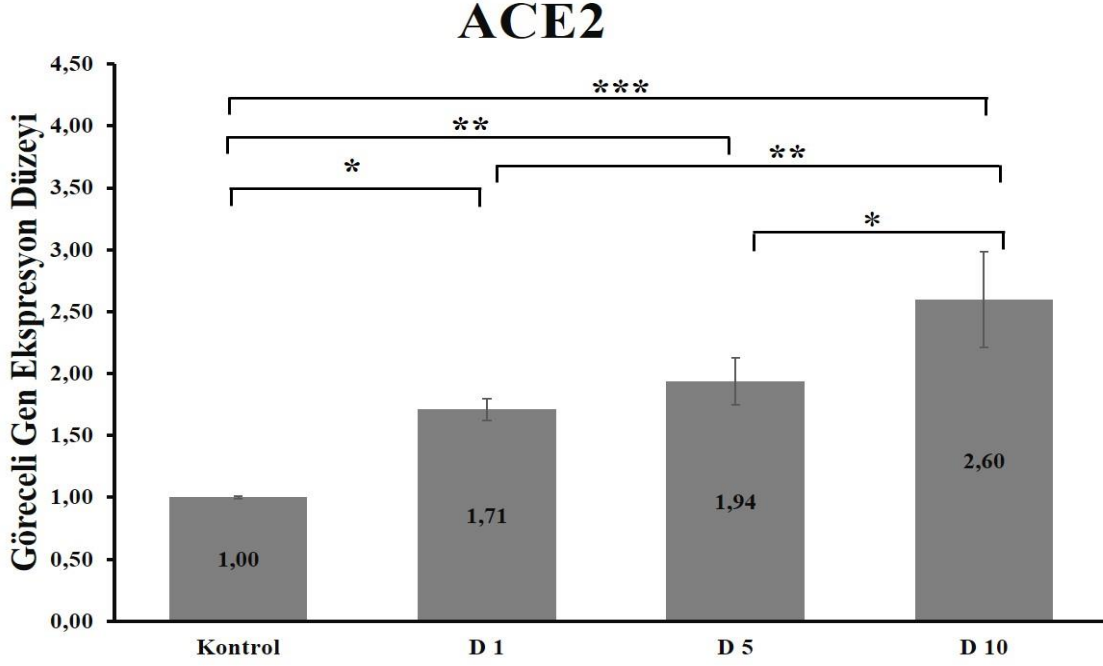
Bir diğer grup olan 48 saatlik deney grubunda, belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre ACE2 gen ifade düzeyinde anlamlı artışlar

tespit edilmiştir. Ayrıca kalsitriolün konsantrasyon artışına bağlı olarak da ACE2 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak artışlar olmuştur (Şekil 4.20.).

48 saatlik deney grubunda 1 nM ve 5 nM konsantrasyonların birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık görülmemiştir (Şekil 4.20.).



Şekil 4.19. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası ACE2 gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$)



Şekil 4.20. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası ACE2 gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$)

4.3.8. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası TMPRSS2 Geninin Gen İfade Analizi

HUVEC hücre hattına 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan kalsitriolün TMPRSS2 gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

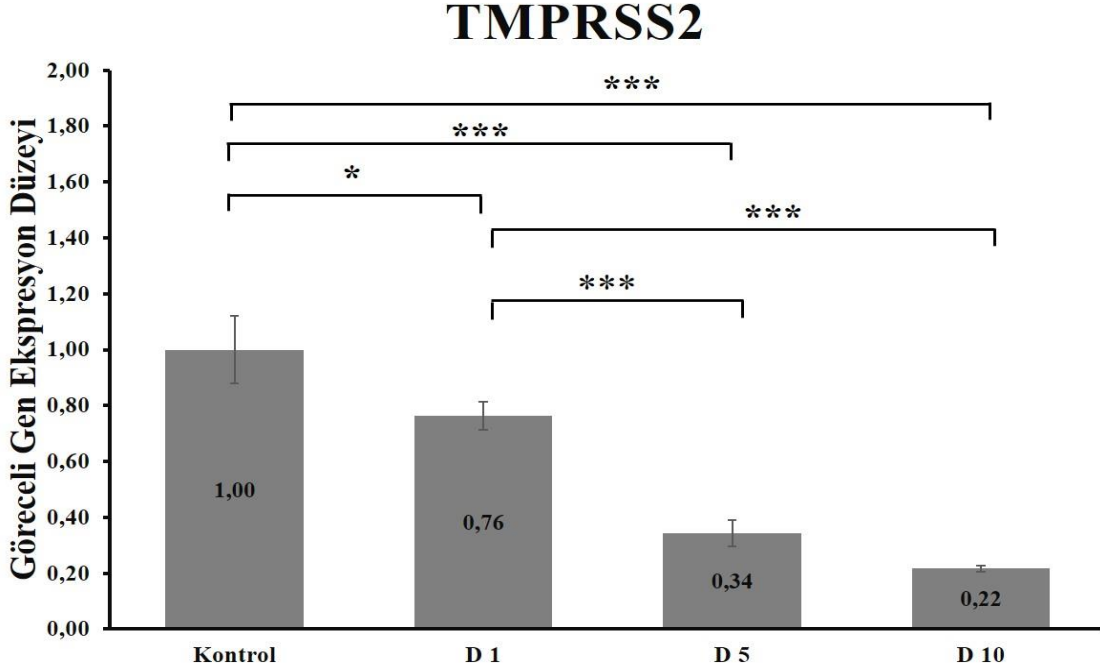
24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre TMPRSS2 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler görülmüştür. Ayrıca kalsitriolün konsantrasyon artışına bağlı olarak da TMPRSS2 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak azalmalar olmuştur (Şekil 4.21.).

24 saatlik deney grubunda 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlarının birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır (Şekil 4.21.).

48 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre TMPRSS2 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler tespit

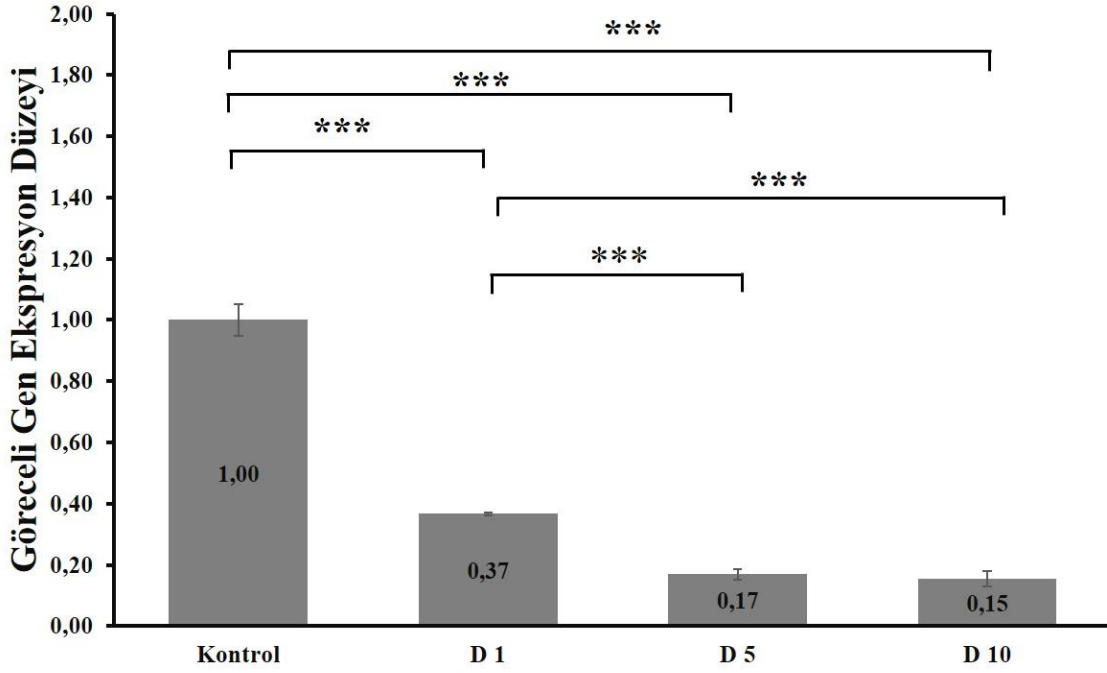
edilmiştir. Ayrıca kalsitriolün konsantrasyon artışına bağlı olarak da TMPRSS2 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler olmuştur (Şekil 4.22.).

48 saatlik deney grubunda 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlarının birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık görülmemiştir (Şekil 4.22.).



Şekil 4.21. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası TMPRSS2 gen ekspresyon düzeyleri. (* ve ***: kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$)

TMPRSS2



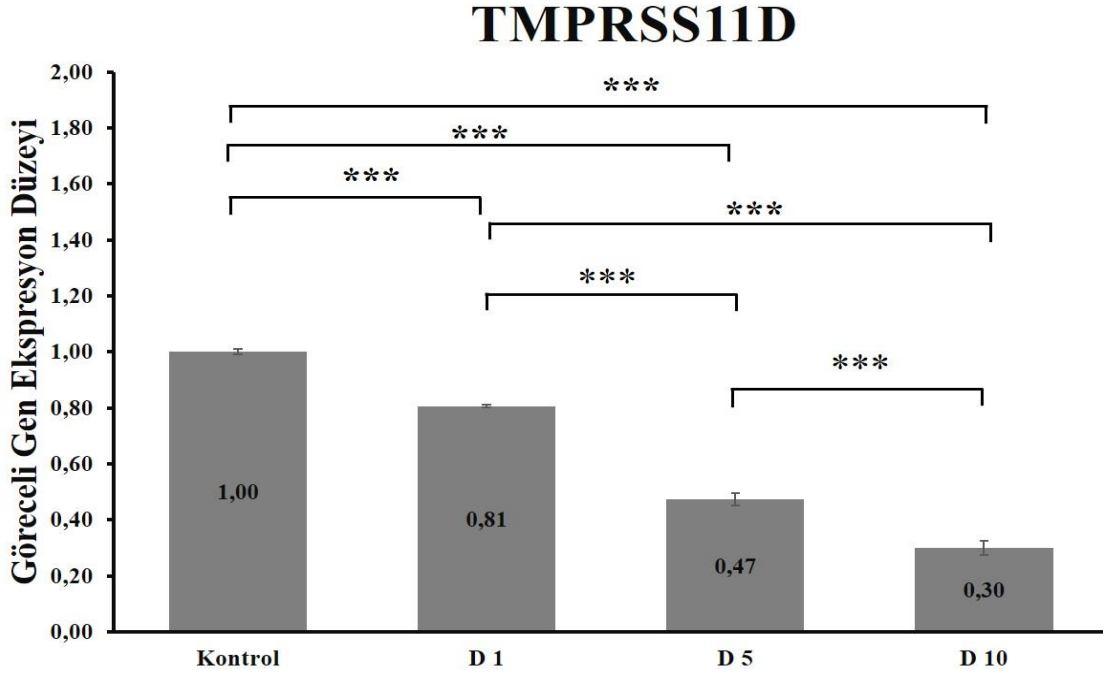
Şekil 4.22. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası TMPRSS2 gen ekspresyon düzeyleri. (***: Kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, $p < 0,001$)

4.3.9. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası TMPRSS11D Geninin Gen İfade Analizi

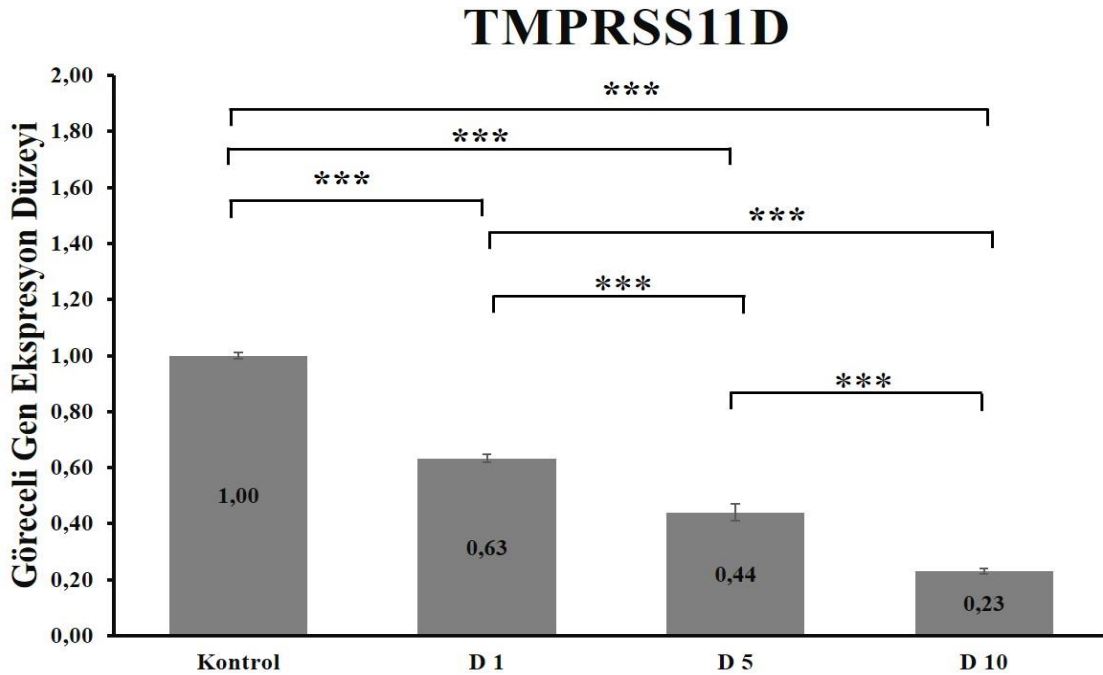
HUVEC hücre hattına 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan kalsitriolün TMPRSS11D gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre TMPRSS11D gen ifade düzeyinde istatistiksel bir şekilde düşüşler gözlenmiştir. Öte yandan kalsitriolün konsantrasyon artışına bağlı olarak da TMPRSS11D gen ifade düzeyinde anlamlı olarak azalmalar olmuştur (Şekil 4.23).

48 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre TMPRSS11D gen ifade düzeyinde anlamlı olarak azalışlar gözlenmiştir. Ayrıca kalsitriol konsantrasyon artışına bağlı olarak da TMPRSS11D gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24.).



Şekil 4.23. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası TMPRSS11D gen ekspresyon düzeyleri. (***: Kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, $p < 0.001$)



Şekil 4.24. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası TMPRSS11D gen ekspresyon düzeyleri. (***: Kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, $p < 0.001$)

4.3.10. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası CD147 Geninin Gen İfade Analizi

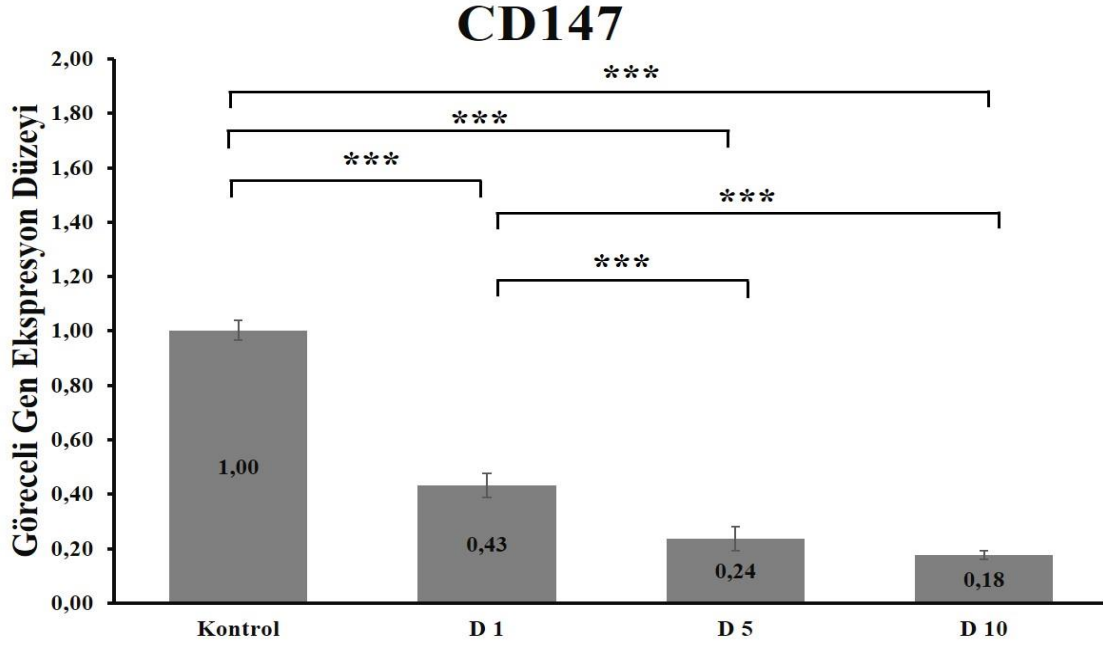
HUVEC hücre hattına 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan kalsitriolün CD147 gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD147 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan kalsitriolün konsantrasyon artışına bağlı olarak da CD147 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak düşüşler gözlemlendi (Şekil 4.25.).

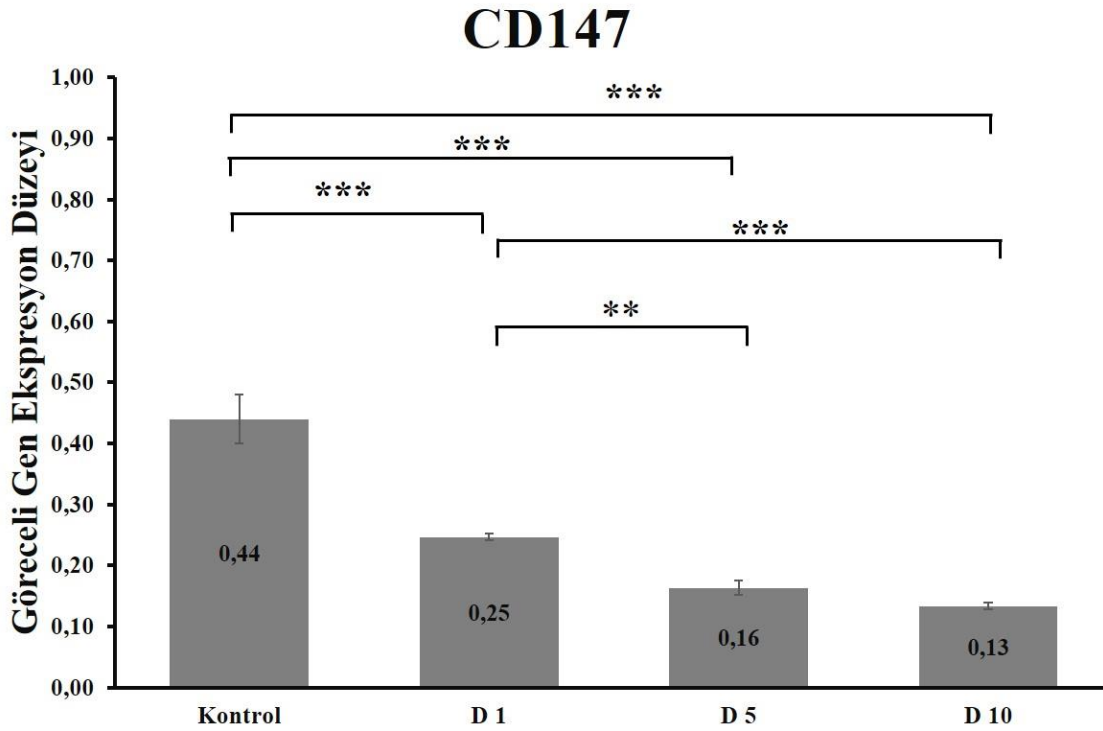
24 saatlik deney grubunun 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlarının birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.25.).

48 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD147 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler görülmüştür. Bununla birlikte kalsitriolün konsantrasyon artışına bağlı olarak da CD147 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler olmuştur (Şekil 4.26.).

48 saatlik deney grubunda 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlarının birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır (Şekil 4.26.).



Şekil 4.25. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CD147 gen ekspresyon düzeyleri. (***: Kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, $p < 0.001$)



Şekil 4.26. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CD147 gen ekspresyon düzeyleri. (** ve ***: Kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.001$)

4.3.11. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası CD26 Geninin Gen İfade Analizi

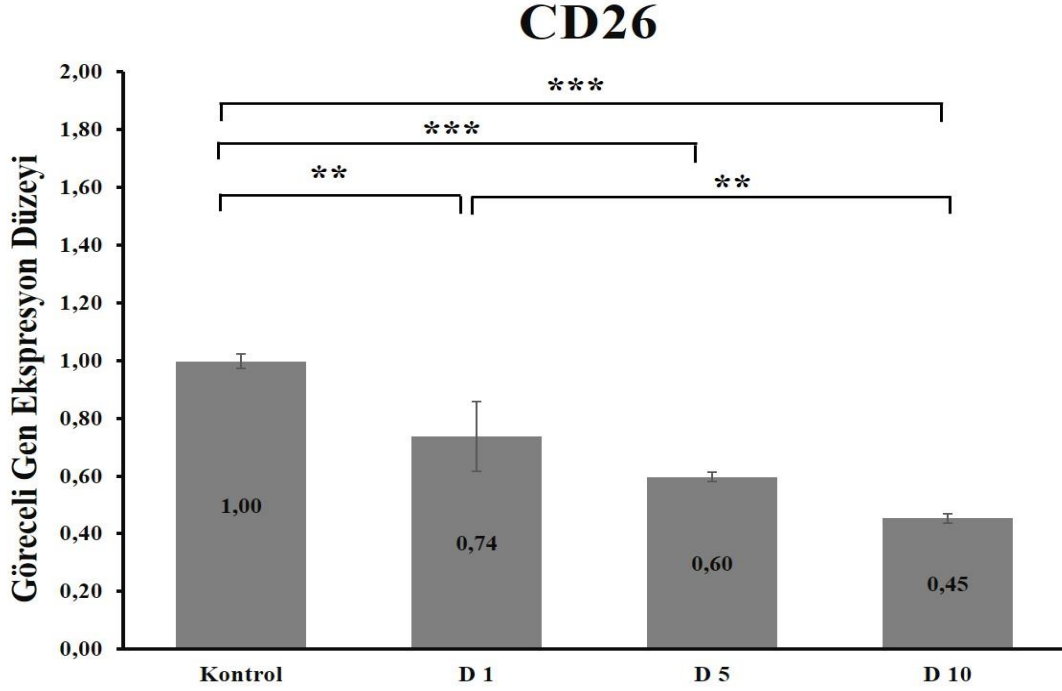
HUVEC hücre hattına 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan kalsitriolün CD26 gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

24 saatlik deney grubunda belirli konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD26 gen ifade düzeyinde istatistiksel şekilde düşüşler gözlenmiştir. Diğer yandan kalsitriolün konsantrasyon artışına bağlı olarak da CD26 gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüşler görüldü (Şekil 4.27.).

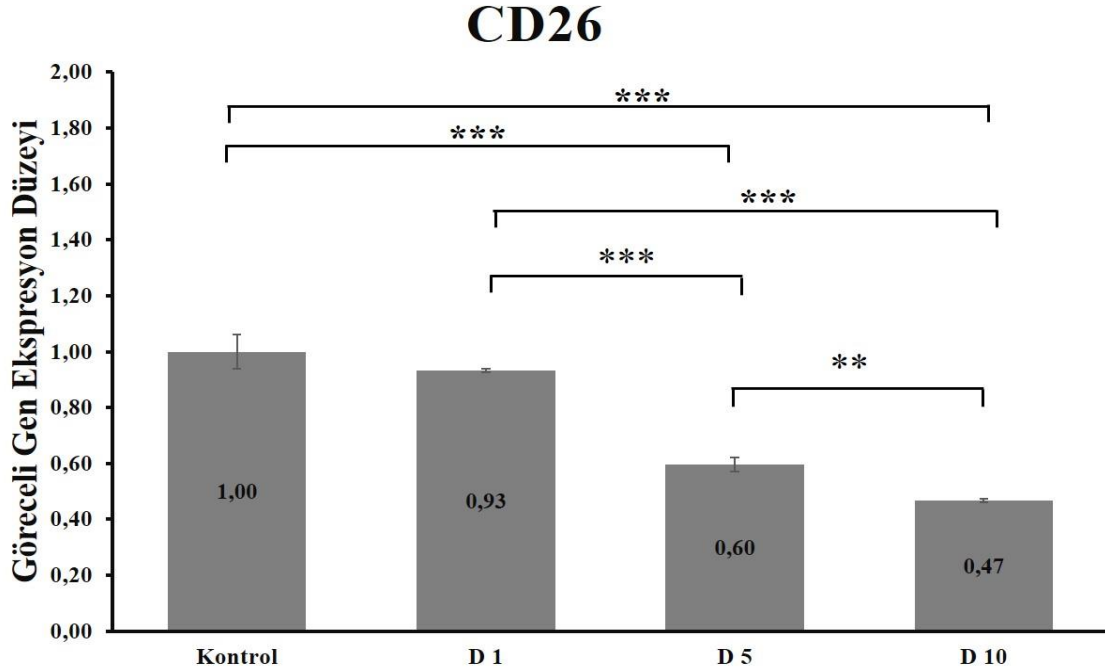
24 saatlik deney grubunda 1 nM ve 5 nM konsantrasyonlarının birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır (Şekil 4.27.).

48 saatlik deney grubunda 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD26 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak düşüşler olmuştur (Şekil 4.28).

48 saatlik deney grubunda 1 nM konsantrasyonunun kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CD26 gen ifade düzeyinde herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CD26 gen ekspresyon düzeyleri. (** ve ***: kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.001$)



Şekil 4.28. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CD26 gen ekspresyon düzeyleri. (** ve ***: Kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.001$)

4.3.12. HUVEC Hücre Hattına Kalsitriol Muamelesi Sonrası CYPA Geninin Gen İfade Analizi

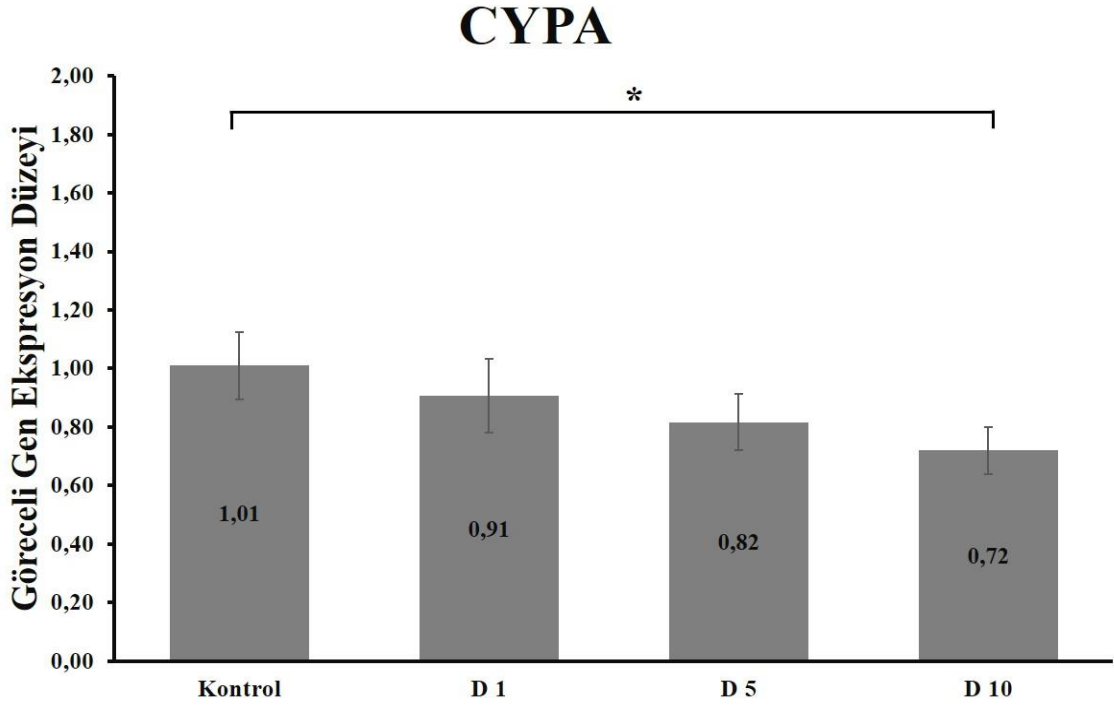
HUVEC hücre hattına 1 nM, 5 nM, 10 nM konsantrasyonlarında uygulanan kalsitriolün CYPA gen ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.

24 saatlik deney grubunda 10 nM konsantrasyon kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CYPA gen ifade düzeyinde anlamlı olarak düşüş gözlenmiştir. 1 nM ve 5 nM kontrole göre CYPA gen ifade düzeyinde herhangi bir anlamlılık görülmemiştir (Şekil 4.29.).

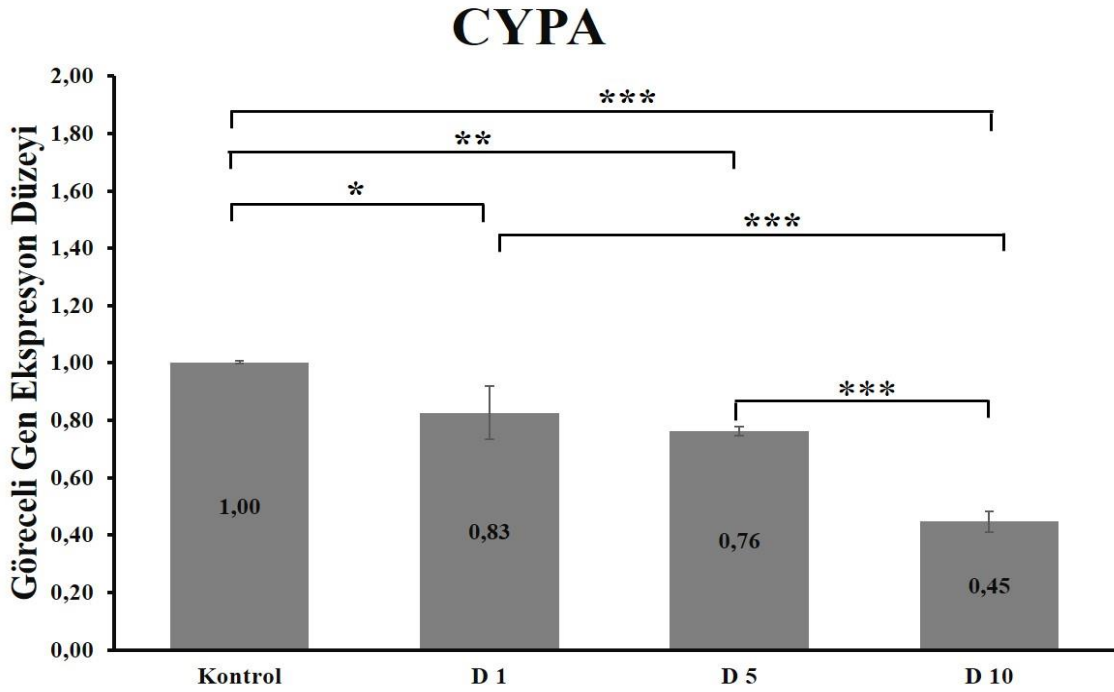
24 saatlik deney grubunun 1 nM, 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlarının birbirlerine kıyasla gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır (Şekil 4.29.).

48 saatlik deney grubunda 1 nM, 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlarda kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre CYPA gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak düşüşler gözlenmiştir (Şekil 4.30.).

48 saatlik deney grubunda 1 nM ve 5 nM konsantrasyonlarının birbirlerine karşı gen ifade düzeylerinde herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.30.).



Şekil 4.29. 24 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CYPA gen ekspresyon düzeyleri. (*: Kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.05$)



Şekil 4.30. 48 Saatlik deney grubuna kalsitriol muamelesi sonrası CYPA gen ekspresyon düzeyleri. (*, ** ve ***: kalsitriol uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs tip 2 (SARS-CoV-2) yeni ortaya çıkan koronavirüs olup şiddetli akut solunum yolu hastalığının (Covid-19) etkenidir. Salgından daha çok etkilenen ve mortalitesi daha fazla olan topluluk, kardiyovasküler hastalıkları bulunan yaşlılar olmuştur (1,5).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2), transmembran serin proteaz 11D (TMPRSS11D) ve CD147 SARS-CoV-2 için hedef hücreye giriş proteinleri olduğu gösterilmiştir (3,6,7). ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D ve CD147 gibi aracı moleküller COVID-19 hastalığının seyrini belirleyebilirler. Bu nedenle aracı moleküllerle yapılacak çalışmaların önemi ortaya çıkmaktadır.

Endotel hücreleri, bütün kardiyovasküler sistemi kaplayan bir organdır. Kalp, kronik böbrek yetmezliği gibi birçok hastalıkta olduğu gibi virüslerden kaynaklanan enfeksiyon hastalıklarında da önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bugüne kadar ki tüm koronavirüslerden elde edilen bulguların endotel hücrelerin işlev bozukluğuna benzer bulgular gösterdiği bildirilmiştir (82,83).

Nükleer hormon reseptör ligandları olan 1,25 dihidroksi Vitamin D3(kalsitriol) ve all trans retinoik asit (ATRA) sırasıyla D ve A vitamin türevleridir. Yapılan birçok çalışmada D vitamininin enfeksiyon hastalıkları ile ters orantılı olarak hastalık riskini arttırdığı veya azalttığı bildirilmiştir (99,100). A vitamini takviyesiyle ilgili yapılan çalışmalarda A vitamininin bazı virüslerin çoğalmasını azalttığı veya durdurduğu gösterilmiştir (120,121).

Yaptığımız çalışmada, Endotel hücrelerinde SARS-CoV-2 patogenezi mekanizması ile ilişkili seçtiğimiz genler olan ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D, CD147, Siklofilin A (CYPA), CD26 proteinlerinin ekspresyonlarına nükleer hormon reseptör ligandları olan 1,25 dihidroksi Vitamin D3 ve all trans retinoik asit (ATRA)'nın etkisini araştırdık. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler ışığında literatüre bir katkı sağlanmış olacaktır.

ACE2, pandemi boyunca koronavirüslerin S proteinleri aracılığıyla hedef hücreye girmek için kullandığı en çok öne çıkan reseptör olmuştur. ACE2 reseptörüne S proteini bağlanması ACE2'nin düşüşüne neden olduğu bilinmektedir. Bunun sonucunda ACE2'deki düşüş anjiyotensin dönüştürücü enzimin (ACE) artmasına neden olmaktadır. ACE2'ye zıt çalışan ACE'nin artan miktarı, damar daraltıcı olan anjiyotensin II (Ang II)'nin artması sağlamaktadır. ACE'nin bir dengeleyicisi olan ACE2 Ang II'nin anjiyotensin (1-7)'ye parçalanmasını hızlandırarak kan basıncını düşürür (2, 42, 70). Yue Hui Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada ACE2 ve Ang (1-7)'nin endotel hücre fonksiyonunu koruduğu ve inflamatuvar yanıtı inhibe ederek erken aterosklerozu önlediği bildirilmiştir (75). Yaptığımız çalışmada HUVEC hücre hattına ATRA ve kalsitriol muamelesi ile ACE2 gen ekspresyon düzeylerini araştırdık. HUVEC'lere 24 saat ve 48 saatlik gruplarda ATRA'nın uygulanan tüm konsantrasyonlarının muamelesi sonucunda ACE2 geninin ekspresyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.7, Şekil 4.8). Aynı zamanda HUVEC'lere 24 saat ve 48 saatlik gruplarda kalsitriolun uygulanan tüm konsantrasyonlarının muamelesi sonucunda ACE2 geninin ekspresyonunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olarak arttırmıştır (Şekil 4.19, Şekil 4.20). Çalışmamızda ATRA ve kalsitriolun ACE2 geninin ekspresyonunu arttırması SARS CoV-2'nin girişi için olumsuz gibi gözükse de endotelin koruyuculuğu için olumlu bir sonuçtur. Artan ACE2 miktarı ACE etkinliğini engellemektedir. Bu yüzden kalp ve kan damar hastalıklarını tedavi etmede ümit verici bir ilaç gayesi olmuştur.

Yaptığımız literatür taramasında endotel hücrelerinde ATRA ve Kalsitriolun TMPRSS2, TMPRSS11D, CD147, Siklofilin A (CYPA) genlerinin ekspresyonuyla ilgili yaptığımız çalışmaya benzer çalışmaya rastlanılmamıştır.

TMPRSS2, insanlarda TMPRSS2 geni tarafından kodlanan bir transmembran proteindir. TMPRSS2, koronavirüslerin hedef hücreye giriş için gerekli olan bir diğer reseptördür. Yapılan bir araştırmada, SARS-CoV-2'nin hücresel girişinin ACE2 de olduğu gibi TMPRSS2'ye de bağlı olduğunu göstermektedir (77, 78). Francesca Benedetti ve Ark. yaptıkları çalışmada HUVEC hücrelerinde TMPRSS2'nin mRNA ekspresyon seviyelerinin düşük olduğunu göstermişlerdir (139). ATRA muamelesi uygulanan 24 saat ve 48 saatlik gruplarda TMPRSS2 geninin ekspresyonu kontrole göre istatistiksel bir şekilde anlamlı olarak düşmüştür. 24 saatlik gruplarda ATRA'nın

0,1 μM ve 0,5 μM konsantrasyonları birbirleri ile anlamlı görülmemiştir. (Şekil 4.9, Şekil 4.10.). Kalsitriol muamelesi uygulanan 24 saat ve 48 saatlik gruplarda TMPRSS2 geninin ekspresyonu kontrole göre azalmıştır. Tüm gruplarda 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlar arasında anlamlılık görülmemiştir (Şekil 4.21, Şekil 4.22).

TMPRSS11D, çeşitli biyolojik ve fizyolojik işlemlerde görev alan integral membran proteinidir. TMPRSS11D, TMPRSS2'ye göre viral girişte daha az etkili bir reseptördür. Solunum epitel hücrelerinde yüksek oranda bulunmaktadır. Bu nedenle viral yayılımın artmasında etkili olabilir (6, 80). Mai Kishimoto ve Ark. yaptıkları çalışmada TMPRSS11D'nin hücelere viral girişi ve ardından SARS-CoV-2 replikasyonunu kolaylaştırdığını göstermişlerdir (140). 24 ve 48 saatlik gruplara uyguladığımız ATRA ve kalsitriol muamelesi sonucunda TMPRSS11D gen ekspresyonunda azalmalar görülmüştür. Ayrıca konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak azalmıştır (Şekil 4.11-12, Şekil 4.23-24).

CD147, bir transmembran glikoproteindir. CD147, tümör dokularında, kanserde ve viral enfeksiyonlarda ekspresyonu artmaktadır. Virüsün yayılmasında etkili olan bir diğer reseptör olan CD147 virüsün diğer hücreler arasında viral istilasına ve yayılmasına aracılık eder (7). Yaptığımız çalışmada tüm gruplarda ATRA ve kalsitriol ile muamele edilen hücrelerde konsantrasyon artışıyla doğru orantılı olarak CD147 geninin ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşler olduğunu gösterdik (Şekil 4.13-14, Şekil 4.25-26).

CD26, Dipeptidilpeptidaz IV (DPP4) enzimi olarak bilinen serin ekzopeptidazdır. İnsanlarda akciğer, böbrek, karaciğer, bağırsak, endotel ve bağışıklık hücreleri dâhil birçok yerde bulunmaktadır. DPP4 glukozun neden olduğu pankreas insülin salgısını uyararak hiperglisemiye iyileştirmek için yeni bir terapötik yoldur. DPP4 sadece diyabette değil ayrıca endoteldeki proinflamatuvar sinyal yollarıyla etkileşime girebilir. Ortaya çıkan kanıtlar, DPP4 inhibitörlerinin vasküler endotel üzerinde koruyucu etkiler uyguladığını göstermektedir. Ayrıca DPP4 viral enfeksiyonlarda immün düzenleyici olarak görev yapmaktadır (141,142). ATRA verdiğimiz HUVEC hücre hatlarında tüm gruplarda CD26 gen ekspresyonlarında artış olmuştur. 24 saatlik grupta 0,1 μM konsantrasyonunun 0,5 μM ve 1 μM konsantrasyonlara göre daha fazla gen ekspresyonu sağladığı görülmüştür (Şekil 4.15, Şekil 4.16). Kalsitriol verdiğimiz HUVEC hücre

hatlarında 24 saatlik grupta konsantrasyon artışına bağlı olarak kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olmuştur. Diğer yandan 48 saatlik deney grubunda kontrole göre 5 nM ve 10 nM konsantrasyonlarda anlamlı azalmalar görülmüştür. 48 saatlik deney grubunda kontrole göre 1 nM konsantrasyonunda anlamlı artış veya azalma görülmemiştir (Şekil 4.27, Şekil 4.28).

CYPA, birçok yerde eksprese edilen hücre içi proteindir. Endotelyal hücrelerde proinflamatuvar ve apoptoz sinyal yollarını uyardığı bildirilmiştir (143,144). ATRA verdiğimiz 24 saatlik grupta CYPA gen ekspresyonu azalmıştır. 48 saatlik deney grubunda 0,5 µM ve 1 µM konsantrasyonlarda gen ekspresyon seviyesinde azalmalar görülmüştür. 48 saatlik deney grubunda 0,1 µM konsantrasyonunda anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Kalsitriol ile muamele edilen HUVEC’de 24 saatlik grupta 10 nM konsantrasyonda azalma görülürken 1 nM ve 5 nM konsantrasyonda herhangi bir anlamlılık görülmedi. 48 saatlik grupta tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak azalma olmuştur (Şekil 4.29, Şekil 4.30). CYPA ile ilgili çalışmaların artması terapötik ilaçlar için yeni bir hedef olabilir.

Literatürdeki çalışmada, ATRA’nın endotelyal hücre proliferasyonunu ve migrasyonu inhibe etmediği belirtilmiştir (145). Yapılan bir diğer çalışmada kalsitriol hormonunun endotel hücre proliferasyonunu azalttığı veya etkilemediği bildirilmiştir (146). Pamela Pittarella ve Ark. kalsitriol hormonunun nitrik oksit (NO)'e bağlı olarak HUVEC migrasyonunu indüklediğini bildirmişlerdir (147). Yaptığımız çalışmada endotel hücre proliferasyonuna ve migrasyonuna ATRA ve kalsitriolün etkilerini inceledik. Yaptığımız migrasyon deneyinde açtığımız boşlukların kapanma kapasitelerini ölçtük. Deney sonunda ATRA’nın hücre migrasyonunu baskıladığını gözlemledik (Şekil 4.3. ve Şekil 4.5.). Aynı zamanda kalsitriolün hücre migrasyonunu artırdığı gözlemlendi. Ayrıca kalsitriolün doza bağlı olarak migrasyonu artırdığını gösterdik (Şekil 4.4. ve Şekil 4.6.).

Hücre proliferasyonu için MTT yöntemini kullandığımız çalışmamızda, ATRA muamelesi yapılan hücrelerin 24 saatlik grupta kontrole göre hücre proliferasyonunun baskılandığı sonucuna varılmıştır. 48 saatlik grupta 1 µM doz uygulanan hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür. 0,1 µM, 0,5 µM dozlarda herhangi bir anlamlılık görülmemiştir (Şekil 4.1.).

Ayrıca, 48 saatlik grupta kalsitriol muamelesi yapılan hücrelerde sadece 1 nM doz uygulanan hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür. 24 saatlik grupta sadece 10 nM doz uygulanan hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.2.).

Sonuç olarak, endotel hücrelerinde hem ATRA hem de kalsitriol muamelesi sonucunda ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11D, CD147, CD26, CYPA gibi hedef genlerinin ifade değişimleri, hücre proliferasyonu ve migrasyonu araştırılmıştır. Bu genler SARS-CoV-2'nin hedef hücreye giriş mekanizmasının aydınlatılmasında birer potansiyel hedef olabilir. Ayrıca hedef genlerin ifadelerindeki farklı sonuçların analizleri, endotel hücrelerin gen ifade seviyesi üzerindeki etkisine dair literatüre katkıda bulunacaktır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz TMPRSS2, TMPRSS11D, CD147, CD26, CYPA geninin ifade düzeyindeki azalmalar endotelin koruyuculuğu ve SARS CoV-2 virüsünün girişini engellemek için olumlu bir sonuçtur. Bununla ilgili daha fazla ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu bakımdan bulgularımız endotel hücrelerinde SARS-CoV-2'nin mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sunacak ve COVID19 hastalığın tedavisinde literatüre katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Salata, C., Calistri, A., Parolin, C., & Palù, G. (2019). Coronaviruses: A paradigm of new emerging zoonotic diseases. *Pathogens and Diseases* 77: ftaa006.
2. Raizada, M. K., & Ferreira, A. J. (2007). ACE2: a new target for cardiovascular disease therapeutics. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 50(2), 112-119.
3. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., ... & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 181(2), 271-280.
4. Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., & Gallagher, T. (2011). A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *Journal of virology*, 85(2), 873-882.
5. Lai, C. C., Liu, Y. H., Wang, C. Y., Wang, Y. H., Hsueh, S. C., Yen, M. Y., ... & Hsueh, P. R. (2020). Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(3), 404-412.
6. Cao, X., Tang, Z., Huang, F., Jin, Q., Zhou, X., & Shi, J. (2017). High TMPRSS11D protein expression predicts poor overall survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(8), 12812.
7. Ulrich, H., & Pillat, M. M. (2020). CD147 as a target for COVID-19 treatment: suggested effects of azithromycin and stem cell engagement. *Stem cell reviews and reports*, 16(3), 434-440.
8. Wu, J., Garami, M., Cheng, T., & Gardner, D. G. (1996). 1, 25 (OH) 2 vitamin D3, and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *The Journal of clinical investigation*, 97(7), 1577-1588.
9. Mavi, D., & Inkaya, A. Ç. (2020). COVID-19: İmmün Patogenez. *Flora*, 25(28).

10. Ma, D., Chen, C. B., Jhanji, V., Xu, C., Yuan, X. L., Liang, J. J., ... & Ng, T. K. (2020). Expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 in human primary conjunctival and pterygium cell lines and in mouse cornea. *Eye*, 34(7), 1212-1219.
11. Chibber, P., Haq, S. A., Ahmed, I., Andrabi, N. I., & Singh, G. (2020). Advances in the possible treatment of COVID-19: A review. *European journal of pharmacology*, 883, 173372.
12. Masters, P. S., & Perlman, S. (2013). In *Fields Virology*,(vol. 2)(Knipe, DM and Howley, PM, eds) pp. 825–858.
13. Wertheim, J. O., Chu, D. K., & Peiris, J. S. (2013). Kosakovsky Pond SL, Poon LL. 2013. A case for the ancient origin of coronaviruses. *J. Virol*, 87, 7039-7045.
14. Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1966). Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*, 76-7.
15. Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 121(1), 190-193.
16. McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., & Chanock, R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(4), 933.
17. Kenneth, M. (2005). Coronaviruses in the limelight. *The Journal of infectious diseases*, 191(4), 489-491.
18. Lu, R. XZ (30 de Enero de 2020). Caracterización genómica y epidemiología del nuevo coronavirus 2019: implicaciones para los orígenes del virus y la unión al receptor. *The lancet*, 395(10224), 566-568.

19. Zhao, Z., Zhang, F., Xu, M., Huang, K., Zhong, W., Cai, W., ... & Hawkey, P. M. (2003). Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *Journal of medical microbiology*, 52(8), 715-720.
20. Guan, Y., Zheng, B. J., He, Y. Q., Liu, X. L., Zhuang, Z. X., Cheung, C. L., ... & Poon, L. L. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 302(5643), 276-278.
21. Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2019). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book*. Elsevier Health Sciences.
22. Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van, P. D., ... & Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature medicine*, 10(4), 368-373.
23. Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., ... & Yuen, K. Y. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of virology*, 79(2), 884-895.
24. Zaki, A. M., Van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D., & Fouchier, R. A. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814-1820.
25. De Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., ... & Ziebuhr, J. (2013). Commentary: Middle east respiratory syndrome coronavirus (mers-cov): announcement of the coronavirus study group. *Journal of virology*, 87(14), 7790-7792.
26. Bermingham, A., Chand, M. A., Brown, C. S., Aarons, E., Tong, C., Langrish, C., ... & Zambon, M. (2012). Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Eurosurveillance*, 17(40), 20290.

27. World Health Organization Global Alert and Response (GAR). Coronavirus infections. http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/ (Erişim Tarihi: 12.03.2022)
28. Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., ... & Feng, Z. (2020). Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *New England journal of medicine*.
29. Park, S. E. (2020). Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clinical and experimental pediatrics*, 63(4), 119.
30. World Health Organization Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2020. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19- 11 March 2020 [Internet] [cited 2020 Mar 11]. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
31. Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and molecular biology reviews*, 69(4), 635-664.
32. Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., De Groot, R. J., Cowley, J. A., Ziebuhr, J., & Snijder, E. J. (2008). Nidovirales. *Encyclopedia of virology*, 419.
33. Kasmi, Y., Khataby, K., Souiri, A., & Ennaji, M. M. (2020). Coronaviridae: 100,000 years of emergence and reemergence. In *Emerging and reemerging viral pathogens* (pp. 127-149). Academic Press.
34. Jaiswal, N. K., & Saxena, S. K. (2020). Classical coronaviruses. In *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* (pp. 141-150). Springer, Singapore.
35. Tatar B, Adar P. SARS-CoV-2: Mikrobiyoloji ve Epidemiyoloji. *İzmir Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*. 2020;30:27-35.
36. Kahn, J. S., & McIntosh, K. (2005). History and recent advances in coronavirus discovery. *The Pediatric infectious disease journal*, 24(11), S223-S227.

37. Memikoğlu O, Genç V. COVID-19. E-Kitap, Ankara Üniversitesi Basımevi (Ed). 2020.
38. Narayanan, K., Ramirez, S. I., Lokugamage, K. G., & Makino, S. (2015). Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus research*, 202, 89-100.
39. Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 221-236.
40. Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., ... & Li, H. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(5), 766-788.
41. Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*, 1-23.
42. Gui, M., Song, W., Zhou, H., Xu, J., Chen, S., Xiang, Y., & Wang, X. (2017). Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell research*, 27(1), 119-129.
43. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*. 2020; 92(4): 418-423.
44. Tanriverdi, E. S., Yakupoğulları, Y. U. S. U. F., & Otlı, B. A. R. I. Ş. (2020). COVID-19 etkeninin özellikleri. Çiçek C, editör *Mikrobiyoloji ve COVID-19*, 1, 7-14.
45. Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., ... & Wang, L. F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, 310(5748), 676-679.

46. Belouzard, S., Chu, V. C., & Whittaker, G. R. (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5871-5876.
47. Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellichio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., & Holmes, K. V. (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, 357(6377), 420-422.
48. Hofmann, H., Pyrc, K., Van Der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B., & Pöhlmann, S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), 7988-7993.
49. Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., & Vogel, L. K. Sjöström, H., Noren, O. & Laude, H. (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 357, 417-420.
50. Li, B. X., Ge, J. W., & Li, Y. J. (2007). Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, 365(1), 166-172.
51. Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., ... & Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450-454.
52. Raj, V. S., Mou, H., Smits, S. L., Dekkers, D. H., Müller, M. A., Dijkman, R., ... & Haagmans, B. L. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 495(7440), 251-254.
53. Saponaro, F., Rutigliano, G., Sestito, S., Bandini, L., Storti, B., Bizzarri, R., & Zucchi, R. (2020). ACE2 in the era of SARS-CoV-2: controversies and novel perspectives. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 271.
54. Jain, J., Gaur, S., Chaudhary, Y., & Kaul, R. (2020). The molecular biology of intracellular events during Coronavirus infection cycle. *Virusdisease*, 31(2), 75-79.

55. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32075877; PMCID: PMC7164637.
56. Kim, D., Lee, J. Y., Yang, J. S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*, 181(4), 914-921.
57. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in immunology*, 41(12), 1100-1115.
58. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection : A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020 Sep 1;173(5):362-367. doi: 10.7326/M20-3012. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32491919; PMCID: PMC7281624.
59. Sharma, A., Tiwari, S., Deb, M. K., & Marty, J. L. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *International journal of antimicrobial agents*, 56(2), 106054.
60. Madabhavi, I., Sarkar, M., & Kadakol, N. (2020). COVID-19: a review. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 90(2).
61. Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., & Duan, G. (2020). Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses* 12 (4): 372.
62. AKGÜN, O. (2020). COVID-19 SALGINI DÖNEMİNDE TÜRKİYE'DE ALINAN İDARİ KARARLARIN SALGININ ÖNLENMESİNDEKİ ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ. *Avrasya Sosyal ve Ekonomi Araştırmaları Dergisi*, 7(7), 201-228.
63. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novelcoronavirus-2019> (Erişim tarihi: 24 Ocak 2022)
64. <https://covid19.saglik.gov.tr> (Erişim tarihi: 22 Ocak 2022)

65. Centers for Disease Control and Prevention. How COVID-19 spreads. Erişim:<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html> Erişim Tarihi: 24Ocak 2022
66. Gemicioğlu, B., Breki, Ő., Dilektaşlı, A. G., Ulubay, G., Azap, ., & Saryal, S. (2020). Turkish thoracic society experts consensus report: recommendations for pulmonary function tests during and after COVID 19 pandemic. *Turkish thoracic journal*, 21(3), 193.
67. Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *jama*, 323(13), 1239-1242.
68. Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., ... & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The lancet*, 395(10229), 1054-1062.
69. elik, D., & Kse, Ő. Erişkinlerde COVID-19: Klinik Bulgular.
70. Cuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., & Guo, F. (2005). Guan Bet al. Un papel crucial de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la lesin pulmonar inducida por coronavirus del SARS. *Nat Med*, 11(8), 875-9.
71. Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., & Hao, J. (2020). han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*, 14(2), 185-192.
72. Danilczyk, U., & Penninger, J. M. (2006). Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circulation research*, 98(4), 463-471.
73. Kabbani, N., & Olds, J. L. (2020). Does COVID19 infect the brain? If so, smokers might be at a higher risk. *Molecular pharmacology*, 97(5), 351-353.

74. Kanda, T., & Itoh, H. (2012). The ACE2/Ang (1-7)/Mas receptor axis in cardiovascular and renal diseases. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 70(9), 1487-1491.
75. Zhang, Y. H., Zhang, Y. H., Dong, X. F., Hao, Q. Q., Zhou, X. M., Yu, Q. T., ... & Zhang, Y. (2015). ACE2 and Ang-(1-7) protect endothelial cell function and prevent early atherosclerosis by inhibiting inflammatory response. *Inflammation Research*, 64(3), 253-260.
76. Renteria, A. E., Mfuno Endam, L., Adam, D., Filali-Mouhim, A., Maniakas, A., Rousseau, S., ... & Desrosiers, M. (2020). Azithromycin downregulates gene expression of IL-1 β and pathways involving TMPRSS2 and TMPRSS11D required by SARS-CoV-2. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 63(5), 707-709.
77. Bertram, S., Glowacka, I., Blazejewska, P., Soilleux, E., Allen, P., Danisch, S., ... & Pöhlmann, S. (2010). TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *Journal of virology*, 84(19), 10016-10025.
78. Ma, D., Chen, C. B., Jhanji, V., Xu, C., Yuan, X. L., Liang, J. J., ... & Ng, T. K. (2020). Expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 in human primary conjunctival and pterygium cell lines and in mouse cornea. *Eye*, 34(7), 1212-1219.
79. Iwata-Yoshikawa, N., Okamura, T., Shimizu, Y., Hasegawa, H., Takeda, M., & Nagata, N. (2019). TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. *Journal of virology*, 93(6), e01815-18.
80. Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., & Gallagher, T. (2011). A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *Journal of virology*, 85(2), 873-882.

81. Varadarajan, S., Balaji, T. M., Sarode, S. C., Sarode, G. S., Sharma, N. K., Gondivkar, S., ... & Patil, S. (2020). EMMPRIN/BASIGIN as a biological modulator of oral cancer and COVID-19 interaction: Novel propositions. *Medical hypotheses*, 143, 110089.
82. Gavriilaki, E., Anyfanti, P., Gavriilaki, M., Lazaridis, A., Douma, S., & Gkaliagkousi, E. (2020). Endothelial dysfunction in COVID-19: lessons learned from coronaviruses. *Current hypertension reports*, 22(9), 1-12.
83. Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., & Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*, 9(10), 1057.
84. Pludowski, P., Holick, M. F., Pilz, S., Wagner, C. L., Hollis, B. W., Grant, W. B., ... & Soni, M. (2013). Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—a review of recent evidence. *Autoimmunity reviews*, 12(10), 976-989.
85. Grant, W. B., Lahore, H., McDonnell, S. L., Baggerly, C. A., French, C. B., Aliano, J. L., & Bhattoa, H. P. (2020). Evidence that vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and COVID-19 infections and deaths. *Nutrients*. 2020; 12(4): 988. External Resources Crossref (DOI).
86. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):685-98. doi: 10.1038/nri2378. PMID: 19172691; PMCID: PMC2906676.
87. Van Etten, E., & Mathieu, C. (2005). Immunoregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 97(1-2), 93-101.
88. Chen, S., Sims, G. P., Chen, X. X., Gu, Y. Y., Chen, S., & Lipsky, P. E. (2007). Modulatory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1634-1647.

89. Di Rosa, M., Malaguarnera, M., Nicoletti, F., & Malaguarnera, L. (2011). Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology*, 134(2), 123-139.
90. Hossein-Nezhad, A., Spira, A., & Holick, M. F. (2013). Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial. *PloS one*, 8(3), e58725.
91. Provvedini, D. M., Tsoukas, C. D., Deftos, L. J., & Manolagas, S. C. (1983). 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*, 221(4616), 1181-1183.
92. Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., ... & Modlin, R. L. (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311(5768), 1770-1773.
93. L Bishop, E., Ismailova, A., Dimeloe, S., Hewison, M., & White, J. H. (2021). Vitamin D and immune regulation: antibacterial, antiviral, anti-inflammatory. *JBMR plus*, 5(1), e10405.
94. Tripathi, S., Tecle, T., Verma, A., Crouch, E., White, M., & Hartshorn, K. L. (2013). The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins. *The Journal of general virology*, 94(Pt 1), 40.
95. Teymoori-Rad, M., Shokri, F., Salimi, V., & Marashi, S. M. (2019). The interplay between vitamin D and viral infections. *Reviews in medical virology*, 29(2), e2032.
96. Adams, J. S., Ren, S., Liu, P. T., Chun, R. F., Lagishetty, V., Gombart, A. F., ... & Hewison, M. (2009). Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *The Journal of Immunology*, 182(7), 4289-4295.
97. Laaksi, I. (2012). Vitamin D and respiratory infection in adults. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(1), 90-97.
98. Adams, J. S., & Hewison, M. (2008). Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*, 4(2), 80-90.

99. Zhou, Y. F., Luo, B. A., & Qin, L. L. (2019). The association between vitamin D deficiency and community-acquired pneumonia: A meta-analysis of observational studies. *Medicine*, 98(38).
100. Khadilkar, V. V., & Khadilkar, A. V. (2013). Use of vitamin D in various disorders. *The Indian journal of pediatrics*, 80(3), 215-218.
101. Tsujino, I., Ushikoshi-Nakayama, R., Yamazaki, T., Matsumoto, N., & Saito, I. (2019). Pulmonary activation of vitamin D3 and preventive effect against interstitial pneumonia. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 65(3), 245-251.
102. Xu, J., Yang, J., Chen, J., Luo, Q., Zhang, Q., & Zhang, H. (2017). Vitamin D alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulation of the renin-angiotensin system. *Molecular medicine reports*, 16(5), 7432-7438.
103. Rondanelli, M., Miccono, A., Lamburghini, S., Avanzato, I., Riva, A., Allegrini, P., ... & Perna, S. (2018). Self-care for common colds: the pivotal role of vitamin D, vitamin C, zinc, and echinacea in three main immune interactive clusters (physical barriers, innate and adaptive immunity) involved during an episode of common colds—practical advice on dosages and on the time to take these nutrients/botanicals in order to prevent or treat common colds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
104. Radujkovic A, Hippchen T, Tiwari-Heckler S, Dreher S, Boxberger M, Merle U. Vitamin D Deficiency and Outcome of COVID-19 Patients. *Nutrients*. 2020 Sep 10;12(9):2757. doi: 10.3390/nu12092757. PMID: 32927735; PMCID: PMC7551780.
105. Coperchini, F., Chiovato, L., Croce, L., Magri, F., & Rotondi, M. (2020). The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine & growth factor reviews*, 53, 25-32.

106. Mansur, J. L. (2020). low population mortality from COVID-19 in countries south of latitude 35 degrees North supports vitamin D as a factor determining severity. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 52.
107. Panarese, A., & Shahini, E. (2020). COVID-19, and vitamin D. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 51(10), 993.
108. D'Avolio, A., Avataneo, V., Manca, A., Cusato, J., De Nicolò, A., Lucchini, R., ... & Cantù, M. (2020). 25-Hydroxyvitamin D concentrations are lower in patients with positive PCR for SARS-CoV-2. *Nutrients*, 12(5), 1359.
109. Alipio, M. (2020). Vitamin D supplementation could possibly improve clinical outcomes of patients infected with Coronavirus-2019 (COVID-19)(April 9, 2020). Available at SSRN 3571484.
110. Raharusun, P., Priambada, S., Budiarti, C., Agung, E., & Budi, C. Patterns of COVID-19 Mortality and Vitamin D: An Indonesian Study (April 26, 2020 updated 6 May). Available at SSRN 3585561.
111. Dadon Bar-El, S., & Reifen, R. (2015). Vitamin A and the Epigenome. *Critical reviews in food science and nutrition*, 00-00.
112. Conaway, H. H., Henning, P., & Lerner, U. H. (2013). Vitamin a metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. *Endocrine reviews*, 34(6), 766-797.
113. Blomhoff, R., & Blomhoff, H. K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of neurobiology*, 66(7), 606-630.
114. Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., ... & Gronemeyer, H. (2006). The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily. *RETINOID X RECEPTORS (RXRs)*. *Pharmacol Rev*, 58, 760-72.
115. Huang, Z., Liu, Y., Qi, G., Brand, D., & Zheng, S. G. (2018). Role of vitamin A in the immune system. *Journal of clinical medicine*, 7(9), 258.

116. Villamor, E., & Fawzi, W. W. (2005). Effects of vitamin A supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clinical microbiology reviews*, 18(3), 446-464.
117. Semba, R. D. (1999). Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(3), 719-727.
118. Olofin, I. O., Spiegelman, D., Aboud, S., Duggan, C., Danaei, G., & Fawzi, W. W. (2014). Supplementation with multivitamins and vitamin A and incidence of malaria among HIV-infected Tanzanian women. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 67(Suppl 4), S173.
119. Tenforde, M. W., Yadav, A., Dowdy, D. W., Gupte, N., Shivakoti, R., Yang, W. T., ... & NWCS319 and ACTG 5175 study team. (2017). Vitamin A and D deficiencies associated with incident tuberculosis in HIV-infected patients initiating antiretroviral therapy in multinational case-cohort study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 75(3), e71.
120. Semba, R. D., & Tang, A. M. (1999). Micronutrients and the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *British Journal of Nutrition*, 81(3), 181-189.
121. Trasino, S. E. (2020). A role for retinoids in the treatment of COVID-19?. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47(10), 1765-1767.
122. Beck, M. A. (1996). The role of nutrition in viral disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(12), 683-690.
123. Trottier, C., Colombo, M., Mann, K. K., Miller Jr, W. H., & Ward, B. J. (2009). Retinoids inhibit measles virus through a type I IFN-dependent bystander effect. *The FASEB Journal*, 23(9), 3203-3212.
124. Iddir, M., Brito, A., Dingo, G., Fernandez Del Campo, S. S., Samouda, H., La Frano, M. R., & Bohn, T. (2020). Strengthening the immune system and reducing inflammation and oxidative stress through diet and nutrition: considerations during the COVID-19 crisis. *Nutrients*, 12(6), 1562.

125. Timoneda, J., Rodríguez-Fernández, L., Zaragoza, R., Marín, M. P., Cabezuelo, M. T., Torres, L., ... & Barber, T. (2018). Vitamin A deficiency and the lung. *Nutrients*, 10(9), 1132.
126. Stephens, D., Jackson, P. L., & Gutierrez, Y. (1996). Subclinical vitamin A deficiency: a potentially unrecognized problem in the United States. *Pediatric nursing*, 22(5), 377-393.
127. Rahman, M. M., Mahalanabis, D., Alvarez, J. O., Wahed, M. A., Islam, M. A., Habte, D., & Khaled, M. A. (1996). Acute respiratory infections prevent improvement of vitamin A status in young infants supplemented with vitamin A. *The Journal of nutrition*, 126(3), 628-633.
128. Biesalski, H. K., & Nohr, D. (2003). Importance of vitamin-A for lung function and development. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 431-440.
129. Sommer, A., Katz, J., & Tarwotjo, I. (1984). Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency. *The American journal of clinical nutrition*, 40(5), 1090-1095.
130. Karim, T., Muhit, M., & Khandaker, G. (2017). Interventions to prevent respiratory diseases-Nutrition and the developing world. *Paediatric respiratory reviews*, 22, 31-37.
131. McGill, J. L., Kelly, S. M., Guerra-Maupome, M., Winkley, E., Henningson, J., Narasimhan, B., & Sacco, R. E. (2019). Vitamin A deficiency impairs the immune response to intranasal vaccination and RSV infection in neonatal calves. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
132. West, C. E., Sijtsma, S. R., Kouwenhoven, B., Rombout, J. H., & van der Zijpp, A. J. (1992). Epithelia-damaging virus infections affect vitamin A status in chickens. *The Journal of nutrition*, 122(2), 333-339.

133. Gavriatopoulou, M., Korompoki, E., Fotiou, D., Ntanasis-Stathopoulos, I., Psaltopoulou, T., Kastritis, E., ... & Dimopoulos, M. A. (2020). Organ-specific manifestations of COVID-19 infection. *Clinical and experimental medicine*, 20(4), 493-506.
134. Munjal, M., Das, S., Chatterjee, N., Setra, A. E., & Govil, D. (2020). Systemic involvement of novel coronavirus (COVID-19): a review of literature. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 24(7), 565.
135. Stephensen, C. B., & Lietz, G. (2021). Vitamin A in resistance to and recovery from infection: relevance to SARS-CoV2. *British Journal of Nutrition*, 126(11), 1663-1672.
136. Liden, M., & Eriksson, U. (2006). Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13001-13004.
137. Sarohan, A. R., Kızıl, M., İnkaya, A. Ç., Mahmud, S., Akram, M., & Cen, O. (2021). A novel hypothesis for COVID-19 pathogenesis: Retinol depletion and retinoid signaling disorder. *Cellular signalling*, 87, 110121.
138. Khaled, M. B., & Benajiba, N. (2020). The role of nutrition in strengthening immune system against newly emerging viral diseases: case of SARS-CoV-2. *The North African Journal of Food and Nutrition Research*, 4(7), 240-244.
139. Benedetti, F., Silvestri, G., Mavian, C., Weichseldorfer, M., Munawwar, A., Cash, M. N., ... & Zella, D. (2021). Comparison of SARS-CoV-2 Receptors Expression in Primary Endothelial Cells and Retinoic Acid-Differentiated Human Neuronal Cells. *Viruses*, 13(11), 2193.
140. Kishimoto, M., Uemura, K., Sanaki, T., Sato, A., Hall, W. W., Kariwa, H., ... & Sasaki, M. (2021). TMPRSS11D and TMPRSS13 activate the SARS-CoV-2 spike protein. *Viruses*, 13(3), 384.

141. Cao, Q., Xu, D., Chen, Y., Long, Y., Dai, F., Gui, L., & Lu, Y. (2021). Sitagliptin Reduces Endothelial Dysfunction and Apoptosis Induced by High-Fat Diet and Palmitate in Thoracic Aortas and Endothelial Cells via ROS-ER Stress-CHOP Pathway. *Frontiers in pharmacology*, 2299.
142. Morimoto, C., & Schlossman, S. F. (1998). The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunological reviews*, 161(1), 55-70.
143. Xie, Y., Li, X., & Ge, J. (2020). STAT3–CyPA signaling pathway in endothelial cell apoptosis. *Cellular Signalling*, 65, 109413.
144. Zhe, Q. I. A. N., Wentao, Y. U. E., & Baolan, L. I. (2010). Progress of CypA and Lung Cancer-related Research. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 13(8).
145. Van Lith, R., Wang, X., & Ameer, G. (2016). Biodegradable elastomers with antioxidant and retinoid-like properties. *ACS biomaterials science & engineering*, 2(2), 268-277.
146. Molinari, C., Rizzi, M., Squarzanti, D. F., Pittarella, P., Vacca, G., & Renò, F. (2013). $1\alpha, 25$ -Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D3) induces NO-dependent endothelial cell proliferation and migration in a three-dimensional matrix. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31(6), 815-822.
147. Pittarella, P., Squarzanti, D. F., Molinari, C., Invernizzi, M., Uberti, F., & Renò, F. (2015). NO-dependent proliferation and migration induced by Vitamin D in HUVEC. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 149, 35-42.

ÖZGEÇMİŞ

Lise öğrenimini İsmet Paşa Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimine 2003 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladı ve 2007 yılında mezun oldu. 2019 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

