



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**COVID-19 ENFEKSİYONUNUN METABOLİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ŞEYMA ÇİMEN

BESLENME VE DİYETETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr.Öğr. Üyesi Rabia İclal ÖZTÜRK

İkinci Tez Danışmanı
Dr. Emrah EROĞLU

İSTANBUL-2024

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Beslenme ve Diyetetik
Tez Sahibi : Şeyma ÇİMEN
Tez Başlığı : COVID-19 Enfeksiyonunun Metabolik Etkilerinin
Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 22.07.2024

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Rabia İclal ÖZTÜRK

Sınav Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Neda SALEKİ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Neşe AYŞİT

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Elif YAVUZ
DOKGÖZ

İstinye Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Şeyma ÇİMEN

TEŞEKKÜR

Lisans hayatımdan bu yana akademik yolculuğum boyunca bana rehberlik eden, ilham veren, tüm içtenliği ve samimiyetiyle her zaman destek olan değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Rabia İclal Öztürk'e,

Birlikte çalışmaya başladığımız günden beri kendisinden çok şey öğrendiğim, ekibinin bir parçası olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim, bilim heyecanını ve motivasyonunu kendime örnek aldığım, eş danışmanım Dr. Emrah Eroğlu'na,

Hem akademik hem manevi açıdan desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, geldiğim noktada üzerimde çok emeği olan, bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde de büyük katkısı bulunan üçüncü tez danışmanım diyebileceğim değerli hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Değerli katkıları ve destekleri için tez izleme komitemde ve jürimde bulunan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Hande Bakırhan, Dr. Öğr. Üyesi Neda Saleki ve Dr. Öğr. Üyesi Elif Yavuz Dokgöz'e, SABİTA'da ve üzerimizde çok emekleri olan Dr. Öğr. Üyesi Nese Ayşit hocama,

Uzun süre birlikte çalıştığım ve kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Yozgat'a,

Lisans eğitimimden doktora sürecine kadar her koşulda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, emeği geçen tüm İstanbul Medipol Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine,

Örnek toplama aşamasındaki yükü üstlenen, bu çalışmayı mümkün kılan, hiçbir konuda ve koşulda desteklerini esirgemeyen Dr. Arda Kebapçı'ya,

SABİTA'ya renk katan, birlikte çalışmaktan hep mutluluk duyduğum Göztürk Lab ve Eroğlu Lab'daki bütün ekip arkadaşlarıma, Kanser Araştırma Laboratuvarı'ndaki tüm arkadaşlarıma, tüm SABİTA ve MEDİTAM ailesine,

Elektron mikroskopisi konusundaki destekleri için Dr. Mehmet Şerif Aydın'a, örnek ve veri toplama sürecindeki destekleri için Büşranur Delice'ye, virüs üretimi konusundaki destekleri için değerli arkadaşlarım Hamza Yusuf Altun ve Melike Seçilmiş'e, kan alımları konusundaki destekleri için Genetik Tanı Merkezi'nin tüm

hemşirelerine, örnekleri toplama sürecindeki destekleri için Doç. Dr. Oktay Olmuşelik ve ekibine, bu çalışma için gönüllü olan tüm değerli katılımcılara,

Hayatıma renk ve neşe katan bütün arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan ve bana g veren sevgili aileme, annem Fatma Kablan’a, babam Mustafa Kablan’a, kardeşlerim Samed ve Sıla Kablan’a, dedem Rıdvan Gündüz’e, imen ailesine ve mutluluk kaynağım minik Veysel Asil imen’e,

Beni her koşulda destekleyen, en iyi arkadaşım ve eşim Muhammed Emin imen’e,

Sonsuz teşekkürler...

Bu tez alışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TBTAK), Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BDEB), 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1 COVID-19 Pandemisinin Epidemiyolojik ve Klinik Özeti.....	6
4.2 SARS-CoV-2 Yapısı ve Genel Özellikleri	7
4.3 SARS-CoV-2 Enfeksiyon Mekanizması	8
4.4 SARS-CoV-2'nin Hücresel Hedefleri	10
4.4.1 Mononükleer Kan Hücreleri ve SARS-CoV-2	11
4.4. Hücresel Enerji Metabolizması ve Ölçüm Yöntemleri	14
4.4.1 Enerji Metabolizmasının Temel Süreçleri ve Regülasyonu	14
4.4.2 Mitokondrinin Temel Fonksiyonları ve Önemi	15
4.4.3 Biyoenerjetik Süreçlerin Ölçümü ve Değerlendirilmesi.....	17
4.4.3.1 Biyoenerjetik Sağlık İndeksi.....	19
4.4.4 Enerji Metabolizmasının Genetik Kodlanmış Biyosensörler ile İncelenmesi.....	20

4.5 COVID-19 Enfeksiyonunun Hücre Metabolizması ve Mitokondri Üzerindeki Etkileri	22
4.5.1 COVID-19’da Metabolizma ile İlişkili İnteraktom Değişiklikleri	22
4.5.2 COVID-19’da Metabolizma ile İlişkili Serum Metabolom Değişiklikleri	24
4.5.3 COVID-19 ile İlişkili Mitokondriyal ve Biyoenerjetik Değişiklikler	25
5. MATERYAL VE METOT	30
5.1 Çalışmanın Tasarımı, Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi	30
5.2 Kan Alımları, Serum ve Plazma İzolasyonu.....	32
5.3 Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu ve Hücre Dondurma İşlemleri.....	32
5.4 Biyokimyasal Analizlerin Gerçekleştirilmesi.....	33
5.5 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	33
5.6 Hücre Çözdürme, Tripan Mavisi ile Canlılık İncelenmesi ve Hücre Sayımı İşlemleri.....	33
5.7 Lentivirüs ve Pseudovirüs Üretimi	34
5.8 Stabil Hücre Hattı Geliştirilmesi	35
5.9 Sitotoksosite Deneyleri	35
5.10 Mito Stres ve Glikoliz Stres Testi	36
5.11 Transmisyon Elektron Mikroskopisi.....	39
5.12 Canlı Hücre Görüntüleme ve Mikroskopi Deneyleri	40
5.13 İstatistiksel Analiz.....	41
5.14 Kullanılan Malzemeler.....	42
6. BULGULAR	44
6.1. Ön Çalışma Sonuçları: COVID-19 Geçirip İyileşen Bireylerin Kan Hücre Metabolizmalarının İncelenmesi	44
6.2 Çalışmaya Dahil Edilen Bireylerin Genel Özellikleri	47
6.3. Katılımcıların Biyokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi	48

6.4 Akut COVID-19'un Mitokondriyal Aktivite Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	49
6.5 Biyoenerjetik Sağlık İndeksinin Farklı Değişkenler ile Korelasyonunun Değerlendirilmesi	52
6.6 Akut COVID-19'un Glikolitik Aktivite Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	54
6.7 Akut COVID-19'un Mitokondri Morfolojisi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	54
6.8 Serum ve Pseudovirüs Müdahaleleri İçin Hücre Modeli Geliştirilmesi.....	56
6.9 MRC-5 Hücrelerinde Hasta ve Kontrol Serumlarının Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi	56
6.10 Serum Uygulamalarının MRC-5+ACE2 Hücrelerinin Mitokondriyal Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	59
6.11 Serum Uygulamalarının MRC-5+ACE2 Hücrelerinin Glikolitik Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	63
6.12 SpikeΔ19 Pseudovirüsünün MRC-5+ACE2 Hücrelerinin Mitokondriyal Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	65
6.13 SpikeΔ19 Pseudovirüsünün MRC-5+ACE2 Hücrelerinin Glikolitik Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	66
6.14 Mononükleer Kan Hücrelerinde Hasta ve Kontrol Serumlarının Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi	67
6.15 Serum Uygulamalarının Mononükleer Kan Hücrelerinin Mitokondriyal Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	68
6.16 SpikeΔ19 Pseudovirüsünün Mononükleer Kan Hücrelerinin Mitokondriyal Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	72
6.17 Biyosensörler ile Gerçekleştirilecek Enerji Metabolizması Ölçümleri İçin Multiparametrik Görüntüleme Yaklaşımlarının Geliştirilmesi	74
6.18 Biyosensör Karakterizasyonlarının Gerçekleştirilmesi	75
6.19 Metabolik Analiz İçin Hücre İçi pH Değişimlerinin İncelenmesi.....	83

6.19.1 Glikolitik Stres Testi için Alternatif Bir Yöntem Geliştirilmesi.....	83
6.19.2 Mito Stres Testi için Alternatif Bir Yöntem Geliştirilmesi	85
6.19.3 Geliştirilen Tek Hücre Görüntüleme Yaklaşımının Farklı Metabolik Profillere Sahip Hücrelerde Test Edilmesi	87
7. TARTIŞMA	88
8. SONUÇ.....	98
9. KAYNAKLAR	99
10. ETİK KURUL ONAYI.....	115
11. ÖZGEÇMİŞ.....	118

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

2-DG:	2-Deoksi-Glikoz
ACE2:	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
ADP:	Adenozin Difosfat
AKI:	Akut Böbrek Hasarı
AOC:	Açık Okuma Çerçevesi
ARDS:	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
AST:	Aspartat Aminotransferaz
ATP:	Adenozin Trifosfat
BALF:	Bronkoalveolar Lavaj Sıvısı
BHİ:	Biyoenerjetik Sağlık İndeksi
BKİ:	Beden Kütle İndeksi
BSL-2:	Biyogüvenlik Seviyesi 2
CFP:	Cyan Floresan Protein
cm:	Santimetre
CRP:	C-Reaktif Protein
dl:	Desilitre
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
E:	Zarf
ECAR:	Ekstraselüler Asidifikasyon Oranı
EDTA:	Etilendiamintetraasetik Asit
ER:	Endoplazmik Retikulum
ERGIC:	ER-Golgi Ara Bölmesi
ETS:	Elektron Taşıma Sistemi
FACS:	Floresan Destekli Hücre Ayırma
FAD:	Flavin Adenin Dinükleotit
FBS:	Fetal Sığır Serumı
FCCP:	Karbonilsiyaniid-p Trifluorometoksifenilhidrazon
FMN:	Flavin mononükleotit

FRET: Förster Rezonans Enerji Transferi
g: gram
GFP: Yeşil Floresan Protein
HCL: Hidrojen Klorür
HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HIF: Hipoksiye Duyarlı Faktör
IFN: İnterferon
IL: İnterlökin
IMS: Mitokondri Zarları Arası Boşluk
IU: Uluslararası birim
kV: kilovolt
kb: kilobaz
kg: kilogram
kkal: kilokalori
L: Litre
LDH: Laktat dehidrojenaz
LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
M: Membran
MAVS: Mitokondriyal Antiviral Sinyalleşme
MRC-5: Medical Research Council cell strain 5
MERS-CoV: Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
mM: milimolar
mPH: mili pH
mtDNA: Mitokondriyal DNA
N: Nükleokapsid
NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Hidrit
NaCl: Sodyum Klorür
NMR: Nükleer Manyetik Rezonans
NSP: Yapısal Olmayan Protein
nm: nanometre
OCR: Oksijen Tüketim Oranı

ORF: Açık Okuma Çerçevesi
OsO₄: Osmiyum Tetroksit
OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon
PBS: Fosfat Tamponlu Salin
pmol: pikomol
PUFA: Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
RFP: Kırmızı Floresan Protein
RNA: Ribonükleik Asit
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR: Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTC: Replikasyon Transkripsiyon Kompleksi
S: Spike
SARS-CoV-2: Ciddi Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüs-2
SGLT1: Sodyum-Glikoz Taşıyıcı Proteini 1
TCA: Trikarboksilik Asit
TMPRSS2: Transmembran Serin Proteaz 2
TNF: Tümör Nekrozis Faktör
uM: Mikromolar
WT: Wild Type-Yabanıl Tip

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 SARS-CoV-2 yapısı ve viral genom organizasyonu	7
Şekil 4.2 SARS-Cov-2'nin hücre içi replikasyon döngüsü	8
Şekil 4.3 Biyoenerjetik Sağlık İndeksi Formülü (102)	19
Şekil 4.4 Düşük Biyoenerjetik Sağlık İndeksi İlişkilendirilen Durumlar	20
Şekil 4.5 Tek floresan proteinli bir biyosensör örneği	21
Şekil 4.6 SARS-CoV-2 enfeksiyonunda mitokondriyle ilgili olaylardaki değişiklikler (129).	27
Şekil 5.1 Çalışmanın akış şeması	31
Şekil 5.2 Seahorse test profilleri ve parametre hesaplamalarında kullanılan formüller	39
Şekil 6.1.1 Sağlıklı kontrol (n=5) ve COVID-19 geçirip iyileşmiş bireylere (n=5) ait mononükleer kan hücrelerinde gerçekleştirilen Mito Stres testinin genel profili.	44
Şekil 6.1.2 COVID-19 geçirip iyileşmiş bireylere (n=5) ait mononükleer kan hücrelerinde ölçülen mitokondriyal aktivite parametrelerinin sağlıklı kontroller (n=5) ile kıyaslanması.	45
Şekil 6.1.3 COVID-19 geçirip iyileşmiş bireyler (n=5) ve sağlıklı kontrollerin (n=5) BHİ değerlerinin kıyaslanması.	46
Şekil 6.4.1 Sağlıklı kontrol (n=15) ve akut COVID-19 hastalarına (n=15) ait mononükleer kan hücrelerinde gerçekleştirilen Mito Stres testinin genel profili.	49
Şekil 6.4.2 Sağlıklı kontrollere (n=15) ve akut COVID-19 hastalarına (n=15) ait mononükleer kan hücrelerinde ölçülen metabolik parametrelerin kıyaslanması.	50
Şekil 6.4.3 Sağlıklı kontrol (n=15) ve akut COVID-19 hastalarının (n=15) Biyoenerjetik Sağlık İndekslerinin kıyaslanması.	51
Şekil 6.5.1 BHİ ile Demografik ve Antropometrik Değişkenler Arasındaki Korelasyon Matriksinin Isı Haritası	52
Şekil 6.6.1 Sağlıklı kontrol (n=5) ve akut COVID-19 hastalarına (n=5) ait mononükleer kan hücrelerinde gerçekleştirilen Glikoliz Stres testinin genel profili ve glikolitik parametrelerin kıyaslanması.	54
Şekil 6.7.1 Sağlıklı kontrol (n=2) ve akut COVID-19 hastalarının (n=2) mononükleer kan hücrelerine ait temsili elektron mikroskobu görüntüleri.	55
Şekil 6.8.1 MRC-5+ACE2 hücrelerinin temsili mikroskop görüntüleri.	56

Şekil 6.9.1 Sağlıklı kontrollere (K) ve COVID-19+ hastalara (C) ait serumların MRC-5 WT hücrelerinin canlılığına etkisi.....	57
Şekil 6.9.2 Sağlıklı kontrollere (K) ve COVID-19+ hastalara (C) ait serumların MRC-5+ACE2 hücrelerinin canlılığına etkisi.....	58
Şekil 6.9.3 Sağlıklı kontrollere ve COVID-19+ hastalara ait serumların MRC-5 WT ve MRC-5+ACE2 hücrelerinin canlılığına etkisinin genel profili.	59
Şekil 6.10.1 MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde 48 saatlik sağlıklı kontrol (K, n=3) ve COVID-19+ hasta (C, n=3) serumu müdahalelerinin Mito Stres Testi profiline etkileri.	60
Şekil 6.10.2 MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde 48 saatlik sağlıklı kontrol (K, n=3) ve COVID-19+ hasta (C, n=3) serumu müdahalelerinin mitokondriyal aktivite parametrelerine etkileri. (İstatistiksel değerlendirmede Kolmogorov Smirnov ve ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)	61
Şekil 6.11.1 MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde 48 saatlik sağlıklı kontrol (K, n=3) ve COVID-19+ hasta (C, n=3) serumu müdahalelerinin Glikolitik Stres Testi profiline etkileri.	63
Şekil 6.11.2 MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde 48 saatlik sağlıklı kontrol (K, n=3) ve COVID-19+ hasta (C, n=3) serumu müdahalelerinin glikoliz ve glikolitik kapasite üzerindeki etkileri.....	64
Şekil 6.12.1 SpikeΔ19 pseudovirüs müdahalesinin MRC-5+ACE2 hücrelerinde Mito Stres Testi profiline ve mitokondriyal aktivite parametrelerine etkisi.....	65
Şekil 6.13.1 MRC-5+ACE2 hücrelerinde 48 saatlik SpikeΔ19 pseudovirüs müdahalesinin Glikoliz Stres Testi profiline etkileri.	66
Şekil 6.14.1 Mononükleer kan hücreleri üzerine farklı dozlarda uygulanan serumların 24 saatlik sitotoksik etkileri.	67
Şekil 6.15.1 Mononükleer kan hücreleri üzerinde 24 saatlik kontrol veya COVID-19+ hasta serumu müdahalelerinin Mito Stres Testi profiline etkileri.	68
Şekil 6.15.2 Mononükleer kan hücreleri üzerinde 24 saatlik sağlıklı kontrol (n=10) ve COVID-19+ hasta (n=10) serumu müdahalelerinin mitokondriyal aktivite parametrelerine etkileri.	70
Şekil 6.16.1 SpikeΔ19 pseudovirüs müdahalesinin mononükleer kan hücrelerinde Mito Stres Testi profiline ve mitokondriyal aktivite parametrelerine etkileri.	72

Şekil 6.17.1 Enerji Metabolizması İçin Multiparametrik Görüntüleme Yaklaşımlarının Geliştirilmesi	74
Şekil 6.18.1 MRC-5 hücrelerinde glikoz sensörü FLII12PGlu-700 μ δ6'nın karakterizasyonu.	75
Şekil 6.18.2 Red Glifon 300, 3000 ve Negatif biyosensörlerinin FRET temelli FLII12PGlu-700 μ δ6 biyosensörü ile karşılaştırılması.	76
Şekil 6.18.3 İnsülinin hücre içi glikoz düzeylerine etkisinin Red Glifon 300 biyosensörü ile görüntülenmesi.	77
Şekil 6.18.4 MRC-5 hücrelerinde ATP sensörü mtAT1.03'ün karakterizasyonu	77
Şekil 6.18.5 MRC-5 hücrelerinde ATP sensörleri MaLionG ve Mito-MaLionR'nin karakterizasyonu.	78
Şekil 6.18.6 Pyronic Sensörünün Karakterizasyonu.	79
Şekil 6.18.7 (A) Red Glifon 300, (B) Red Glifon Nega ve (C) FLII ¹² PGlu-700 μ δ6 sensörlerinde Pirüvat denemesi.	80
Şekil 6.18.8 (A) SypHer3s ve (B) Red Glifon 300 sensörlerinde Pirüvat denemesi. .	81
Şekil 6.18.9 Laconic Sensörünün Karakterizasyonu	82
Şekil 6.19.1 SypHer biyosensörünü ifade eden hücrelerde perfüzyon ile sağlanan Glikolitik Stres Testi.	83
Şekil 6.19.2 Farklı glikoz koşullarında ve 2-DG inhibisyonu ile hücre içi pH görüntülenmesi.	84
Şekil 6.19.3 Optimize Edilen Biyosensör Temelli Glikolitik Stres Testi Profili.....	85
Şekil 6.19.4 Seahorse Mito Stres Testi protokolünün Sypher pH sensörü ile görüntüleme protokolüne uygulanması.	85
(A) Stardart bir Seahorse Mito Stres Test profili. (B) SypHer3s biyosensörünü ifade eden hücrelerde perfüzyon ile sağlanan, pH ölçümüne dayalı Mito Stres Testi.	85
Şekil 6.19.5 Farklı hücre içi bölgelerde pH sensörü tabanlı (A) Glikolitik Stres Testi ve (B) Mito Stres Testi uygulaması.	86
Şekil 6.19.6 Örnek hücre modellerinde Seahorse Glikoliz Stres Testi ve SypHer3s ölçümlerine dayalı Glikoliz Stres Testi profillerinin kıyaslanması.....	87

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1 Kullanılan Malzeme Listesi	42
Tablo 6.2.1. Katılımcılara ait genel özellikler	47
Tablo 6.3.1. Katılımcılara ait biyokimyasal bulgular.....	48



1. ÖZET

COVID-19 ENFEKSİYONUNUN METABOLİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, COVID-19'un hücre metabolizması ve mitokondriyal aktivite üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 21'i hastanede yatan akut COVID-19 hastası, 21'i ise sağlıklı ve daha önce COVID-19 geçirmemiş kontrol olmak üzere 18-75 yaş aralığında toplam 42 erkek gönüllü dahil edilmiştir. Bireylerden kan örnekleri toplanmış, mononükleer kan hücreleri ve serumları izole edilmiştir. Kontrol ve COVID-19 gruplarına ait mononükleer kan hücrelerinde SARS-CoV-2 enfeksiyonunun oluşturduğu metabolik ve biyoenerjetik değişiklikler Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile incelenmiştir. Mitokondriyal aktivite ölçümleri tamamlanan 15 kişilik kontrol grubunun yaş ortalaması $37,7 \pm 12,2$ yıl iken COVID-19 grubunun yaş ortalaması $43,5 \pm 13,2$ yıldır. COVID-19 hastalarına ait hücrelerde maksimal solunum, yedek solunum kapasitesi, ATP eşleşme verimliliği ve Biyoenerjetik Sağlık İndeksi (BHİ)'nin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p < 0,05$). Kontrol grubunun BHİ ortalaması $2,16 \pm 0,22$ iken, COVID-19 grubunun ortalaması $1,49 \pm 0,17$ 'dir. Bu çalışmalara ek olarak, hasta serumu ve SpikeΔ19 pseudovirüs müdahalelerinin metabolik etkileri MRC-5+ACE2 ve mononükleer kan hücresi modellerinde araştırılmıştır. COVID-19 hastalarına ait serumların mitokondriyal aktivite üzerindeki etkilerinin hücre modelleri arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. MRC-5+ACE2 hücrelerinde serum uygulamaları sonrasında maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesi artış göstermiştir ($p < 0,05$). Sağlıklı mononükleer kan hücrelerinde hasta serumu uygulamaları ise, akut hasta hücrelerinde görüldüğü gibi mitokondriyal aktivite parametrelerinde düşüşe neden olmuştur. SpikeΔ19 pseudovirüs uygulaması ise iki modelde de mitokondriyal aktivite üzerinde belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. Tez kapsamında, bu çalışmalara ek olarak genetik kodlu biyosensör temelli enerji metabolizması görüntüleme yaklaşımları geliştirilmesine yönelik karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak COVID-19 enfeksiyonunun insan hücrelerinin metabolik profilinde önemli değişiklikler oluşturabileceği, BHİ'nin hastalığın etkilerini değerlendirmede ve mitokondriyal sağlığın takibinde önemli bir biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Koronavirüs, COVID-19, Hücre Metabolizması, Mitokondriyal Aktivite, Mononükleer Kan Hücresi

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE METABOLIC EFFECTS OF COVID-19 INFECTION

In this study, the aim was to investigate the effects of COVID-19 on cell metabolism and mitochondrial activity. A total of 42 male volunteers aged 18-75 participated in the study, comprising 21 hospitalized acute COVID-19 patients and 21 healthy controls who had never contracted the virus. Blood samples were collected from the individuals, and mononuclear blood cells and sera were isolated. Metabolic and bioenergetic changes induced by SARS-CoV-2 infection in the mononuclear blood cells of the control and COVID-19 groups were examined using the Seahorse Analyzer. The average age of the 15 control group subjects whose mitochondrial activity measurements were completed was 37.7 ± 12.2 years, while the average age of the COVID-19 group was 43.5 ± 13.2 years. It was found that maximal respiration, spare respiratory capacity, ATP coupling efficiency, and the Bioenergetic Health Index (BHI) significantly decreased in the cells of COVID-19 patients ($p < 0.05$). The average BHI of the control group was 2.16 ± 0.22 , whereas the COVID-19 group's average was 1.49 ± 0.17 . In addition to these studies, the metabolic effects of patient serum and Spike Δ 19 pseudovirus interventions were investigated in the MRC-5+ACE2 and mononuclear blood cell models. It was determined that the effects of the sera from COVID-19 patients on mitochondrial activity varied between cell models. In the MRC-5+ACE2 cells, maximal respiration and spare respiratory capacity increased after serum applications ($p < 0.05$). In healthy mononuclear blood cells, patient serum applications caused decreases in mitochondrial activity parameters, similar to results seen in acute patient cells. The application of the Spike Δ 19 pseudovirus did not cause any significant change in mitochondrial activity in either model. Within the scope of this thesis, characterization studies were also conducted to develop genetically encoded biosensor-based multiparametric energy metabolism imaging approaches. In conclusion, it was shown that COVID-19 infection can cause significant changes in the metabolic profile of human cells and that BHI can be an important biomarker in assessing the effects of the disease and monitoring mitochondrial health.

Keywords: Coronavirus, COVID-19, Cell Metabolism, Mitochondrial Activity, Mononuclear Blood Cell

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yılların en önemli küresel sağlık sorunlarından biri olarak öne çıkan Ciddi Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) kaynaklı Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19), dünya genelinde milyonlarca insanın sağlığını etkilemiş ve çok sayıda ölüme neden olmuştur (1). Ayrıca büyük sosyal ve ekonomik etkiler yaratmıştır (2).

COVID-19'un klinik spektrumu geniş olup, asemptomatik enfeksiyonlardan yaşamı tehdit eden pnömoni, akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ve çoklu organ yetmezliği gibi ciddi sonuçlara kadar değişmektedir. Hastalık öncelikli olarak solunum sistemi olmak üzere çeşitli organ sistemlerini de etkileyen sistemik bir hastalık olarak tanımlanmıştır (3–6). Transkriptomik, proteomik ve metabolomik düzeylerde sistemik değişikliklere neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (7–9).

COVID-19 salgını, sadece solunum sistemi üzerindeki etkileriyle değil, aynı zamanda metabolizma üzerindeki potansiyel etkileriyle de dikkat çekmiştir. Metabolizma, enerji üretimi, besin emilimi ve hücresel işlevlerin düzenlenmesi gibi temel süreçleri kapsayan karmaşık bir sistemdir. COVID-19'a karşı duyarlılığın, iyileşmenin ve hastalıktan sonraki hayatta kalma şansının önemli bir belirleyicisi olarak ortaya çıkmaktadır (10). Enfeksiyon hastalıkları ve konak metabolik süreçleri arasında sıkı bir bağlantı olup enfeksiyon sırasında konak metabolizmasındaki değişiklikler hücre, doku ve organ seviyelerinde meydana gelebilmektedir (11, 12).

Yapılan bazı çalışmalar, hücrenin enerji kaynağı olan mitokondrinin, SARS-CoV-2 ve onun bazı proteinlerinin önemli hedeflerinden biri olduğunu ortaya koymuştur (13–15). Mitokondri, hücresel homeostazın korunmasında, metabolizmanın kontrolünde, hücresel tepkilerin başlatılmasında, doğuştan gelen bağışıklık yollarının ve çeşitli hücre ölüm yollarının aktivasyonunda kilit bir organeldir (16). Bu sebeple, mitokondri, konak hücre içinde hayatta kalmayı amaçlayan birçok virüs için ideal bir hedeftir. Viral genom, antiviral sinyalizasyonu, bağışıklık yanıtını ve hücre metabolizmasını düzensizleştiren çeşitli açık okuma çerçeveleri kodlamaktadır. Bu nedenle, immün sistemi baskılayarak hayatta kalmayı ve çoğalmayı hedefleyen virüslerin mitokondri işlevini modüle etmelerinin kaçınılmaz

olduğu söylenebilir. Mitokondriyal fonksiyon, metabolik süreçlerin ve genel sağlığın bir göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir (17–19).

Şimdiye kadar yapılan sınırlı sayıda çalışma, çeşitli hücrelerde SARS-CoV-2 veya Spike proteinlerinin neden olduğu bazı metabolik değişiklikleri ortaya koysa da SARS-CoV-2 enfeksiyonunun ardından hücresel düzeyde gerçekleşen metabolik değişiklikler ve bu değişikliklerin mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır (14, 20–22). SARS-CoV-2'nin hücre metabolizması üzerindeki etkilerinin anlaşılması, hem COVID-19'un hem de gelecekte ortaya çıkabilecek benzer viral hastalıkların mekanizmalarının anlaşılmasına, etkili tedavi ve önlemlerin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayabilir.

Bu tez çalışmasının birincil amacı, COVID-19 enfeksiyonunun insan mononükleer kan hücrelerinde neden olduğu metabolik değişiklikleri ve olası mitokondriyal fonksiyon bozukluklarını araştırmaktır. Tezin amacı doğrultusunda çalışma süresince gerçekleştirilmiş birden fazla hedef söz konusudur:

- Akut semptomatik COVID-19 hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna ait mononükleer kan hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri incelenmiş ve Biyoenerjetik Sağlık İndeksi (BHI) kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır.
- MRC-5+ACE2 modeli geliştirilerek COVID-19+ hasta ve sağlıklı bireylere ait serumların ve laboratuvar koşullarında üretilen yapısal olarak SARS-CoV-2 benzeri ancak hastalık oluşturmeyen, Spike proteini taşıyan bir pseudovirüsün (SpikeΔ19) hücrelere verilmesinin sitotoksik ve metabolik etkileri araştırılmıştır.
- COVID-19+ hasta ve sağlıklı kontrollere ait serumların ve SpikeΔ19 pseudovirüsünün sitotoksik ve metabolik etkileri mononükleer kan hücre modelinde araştırılmıştır.
- Genetik olarak kodlanmış metabolik biyosensörleri temel alan multiparametrik enerji metabolizması görüntüleme yaklaşımları geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Araştırmanın hipotezleri şunlardır:

- Akut COVID-19 enfeksiyonu belirgin mitokondriyal disfonksiyona neden olarak mononükleer kan hücrelerinde  l  len Mito Stres testi parametrelerini değiştirir ve sağlıklı kontrollere kıyasla hastaların Biyoenerjetik Sağlık İndeksi'ni düşürür.
- Akut COVID-19 enfeksiyonu olan hastaların serumları ve Spike 19 pseudovirüs partikülleri, insan hücrelerinde farklı metabolik değişimlere yol açabilir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1 COVID-19 Pandemisinin Epidemiyolojik ve Klinik Özeti

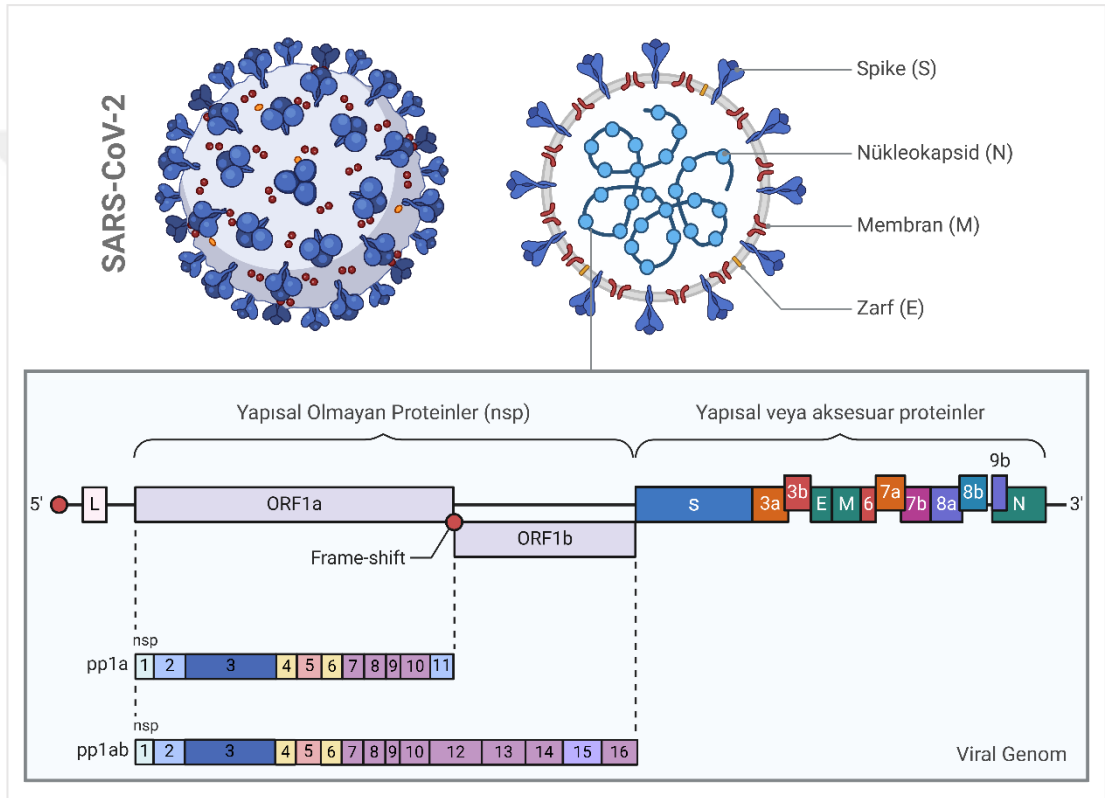
Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19), İlk kez Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıktıktan sonra birçok ülkeye yayılmış ve Mart 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından pandemi olarak sınıflandırılmıştır (23). İnsanlık tarihinin önde gelen halk sağlığı krizlerinden biri haline gelen bu hastalığın etkeni Şiddetli Akut Solunum Sendromu-Koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırılmıştır (24). Virüsün genellikle enfekte bir bireyin öksürmesi, hapşırması veya konuşması sırasında havaya salınan küçük damlacıklar yoluyla bulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca, virüsün enfekte bir bireyin temas ettiği yüzeylerden de bulaşabileceği bilinmektedir (25).

En yaygın görülen semptomlar arasında ateş, öksürük, nefes darlığı, kas ağrıları ve yorgunluk bulunurken bazı vakalarda, ciddi akut solunum sendromu, çoklu organ yetmezliği ve ölümle sonuçlanabilen komplikasyonlar gelişmiştir (3–5). Hastalığın akut semptomlarına ek olarak, birçok hasta aylar boyunca devam eden yorgunluk, hafıza kaybı ve bilişsel problemler gibi çeşitli sorunlarla da karşı karşıya kalmıştır. Endişe verici olduğu ifade edilen bu durum, uzun COVID olarak tanımlanmıştır (26).

COVID-19 pandemisi, başlangıçta çeşitli yıkıcı tıbbi, sosyal ve ekonomik etkilere neden olmuştur (27, 28). Bu etkilerle başa çıkmak için, birçok ülke maske takma, el hijyeni, sosyal mesafe, seyahat kısıtlamaları ve okul kapatmaları gibi çeşitli farmasötik olmayan müdahaleler uygulamıştır. Bu müdahaleler sayesinde, semptomatik ve asemptomatik COVID-19 vakalarında önemli bir azalma yaşanmıştır (25). Ancak, 2020'nin sonlarına doğru, bu önlemler kademeli olarak azaltıldığında daha bulaşıcı SARS-CoV-2 varyantları ortaya çıkmıştır. Özellikle Delta ve Omicron varyantları pandeminin seyrini değiştirmiştir. Delta varyantı, 2021'in ikinci yarısında çoğu ülkede baskın hale gelirken Omicron varyantı da 2021'in sonunda tespit edilmiştir (29). Bu tehlikeli varyantlarla ilişkilendirilen yeni COVID-19 dalgaları ve sorunlar ortaya çıkmıştır. Ancak, enfekte olmuş kişilerin yeniden enfekte olma riskinin azalması, izolasyonun sağlanmasına yönelik hassas test, aşı, monoklonal antikor ve antivirallerin hızla geliştirilmesi, pandeminin kontrol altına alınmasında önemli bir rol oynamıştır (30).

4.2 SARS-CoV-2 Yapısı ve Genel Özellikleri

Koronavirüsler, hayvanları ve insanları enfekte edebilen, çapları yaklaşık 100-120 nm olan zarflı RNA virüsleridir. Koronavirüslerin viral zarfı, çift katlı lipid katmandan oluşmaktadır. Bu zarın içerisinde, pozitif yüklü RNA ve viral nükleokapsid protein kompleksi tarafından oluşturulan bir helikal nükleokapsid bulunmaktadır (31, 32).



Şekil 4.1 SARS-CoV-2 yapısı ve viral genom organizasyonu (BioRender kullanılarak Hartenian ve ark.'dan adapte edildi (33).)

SARS-CoV-2, diğer üyeleri OC43, HKU1, SARS-CoV-1 ve Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü (MERS-CoV) olan insan Beta koronavirüs ailesine aittir (34). SARS-CoV-2'nin genomu yaklaşık olarak 30 kilobaz büyüklüğündedir, 14 açık okuma çerçevesi (ORF) içerir ve 29 viral protein kodlar. Genomun 5' ucunun yaklaşık üçte ikisi iki makro polipeptid pp1a/pp1b'nin kodlanmasından sorumludur(24). Bu iki poliprotein, proteolitik olarak işlenir ve 16 yapısal olmayan

Bu sürecin ana adımları:

Hücre Girişi: Virüsün konak hücreye girişi, enfeksiyonun ilk adımı ve virüs yaşam döngüsündeki en önemli süreçlerden biridir. SARS-CoV-2'nin enfekte etmek istediği hücreye girmesi için öncelikle hücrenin dış zarını geçmesi gereklidir. Bu süreç, SARS-CoV-2'nin zarındaki S proteini tarafından gerçekleştirilir. S proteini, konak hücre reseptörünü tanıır ve membran füzyonuna aracılık ederek viral genomun sitoplazmaya salınmasını sağlar (36). SARS-CoV-2 virüsü için temel hücresel reseptör, büyük oranda akciğer ve bağırsağın epitel hücrelerinde ve daha az ölçüde böbrek, kalp, yağ ve hem erkek hem de dişi üreme dokularında eksprese edilen Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2)'dir. Ancak daha sonraki çalışmalarda Nöropilin-1 (NRP-1), CD147, AXL, CD209L/L-SIGN/CLEC4M, CD209/DC-SIGN/CLEC4L, CLEC4G/LSECtin, ASGR1/CLEC4H1, LDLRAD3, TMEM30A, and KREMEN1 gibi farklı reseptörler de belirlenmiştir (37, 38).

Membran Füzyonu ve Genom Salınımı: Son 20 yılda birden fazla koronavirüs üzerinde yapılan ve SARS-CoV-2 için büyük ölçüde doğrulanan çalışmalar, koronavirüslerin konak hücrelere iki farklı yol ile girebileceğini göstermektedir. İlk yol TMPRSS2 gibi serin proteazlar tarafından aktive edilen membran füzyonu yolu, ikinci yol ise endositik yoldur (39, 40). İlk seçenekte, S proteininin reseptöre bağlanmasını, bir konak proteazı tarafından S1 ve S2 alanları arasından proteolitik yıkımı takip eder. Ardından, serbest bırakılan S2 domain N-terminalinin hücre zarına sokulması gerçekleşir. Bu olay, viral ve hücresel zarların füzyonuna yol açar ve sonuç olarak viral RNA, viral replikasyonun meydana gelebileceği konakçı hücre sitoplazmasına aktarılır (41). İkinci seçenek olarak, SARS-CoV-2 virionları, reseptöre bağlandıktan sonra hücre tarafından endositoz yolu ile içeri alınabilir. Hücre içine alındıktan sonra, konak enzimi katepsin L, S proteinini keserek virüs genomunun hücreye salınmasını sağlayabilir (42).

Replikasyon ve Translasyon: Sitoplazmaya salınan viral genomik RNA viral polimeraz proteinlerine çevrilir. NSP'yi kodlayan ve bir replikasyon transkripsiyon kompleksi (RTC) oluşturan 2 poliprotein (viral replikaz poliproteinleri), pp1a ve pp1ab sentezlenir. RTC, yardımcı ve yapısal proteinleri kodlayan bir dizi alt genomik RNA'yı sürekli olarak çoğaltır ve sentezler. Viral RNA ve N yapısal proteini

sitoplazmada çoğaltılıp, sentezlenirken; S, M ve E proteini endoplazmik retikulumda (ER) transkripte edilir ve Golgi'ye nakledilir. Viral proteinler bireysel olarak önemli fizyolojik roller üstlenebilir, viral yaşam döngüsündeki belirli temel olaylar için viral protein mekanizmasını oluşturabilir veya konak immün yanıtı ve patogenezindeki hücrel faktörlerle kapsamlı bir şekilde etkileşime girebilir (36).

Partikül Oluşumu ve Salınımı: Sentezlenen viral proteinler ve yeni viral RNA kopyaları bir araya gelerek yeni virüs partikülleri oluşturulur. Viral RNA-N kompleksi, ER-Golgi ara bölmesinde (ERGIC) uygun bir virüs partikülü oluşturmak üzere S, M ve E proteinleri birleştirilirler. Yeni oluşturulan virüs partikülleri, konakçı hücrelerden ekstraselüler alana ekzositoz ile salınır ve çevredeki diğer hedef hücreleri enfekte etmeye devam eder.

4.4 SARS-CoV-2'nin Hücrel Hedefleri

Bugüne dek yapılan bilimsel araştırmalar, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun sadece solunum yolu ile sınırlı kalmayıp, vücudun çeşitli dokularındaki hücreleri etkileyebildiğini göstermektedir (43). SARS-CoV-2, solunum yoluyla vücuda girdikten sonra geniş bir doku tropizmine sahiptir (44, 45). Enfekte olmuş solunum yolu epitel hücreleri, alveolar epitel hücreler gibi solunum yolu hücreleri, virüsün ilk temas noktasını oluşturur ve enfeksiyonun başlamasına katkıda bulunur (43). Virüsün girişinde rol oynayan reseptörler ve araçlar, virüsün konak ve enfekte organı belirlemede kritik öneme sahiptir. Özellikle, ACE2 ve TMPRSS2 gibi proteinlerin ekspresyon düzeyi ve dağılımının incelenmesi, enfekte olabilecek organları belirlemede önemli bir strateji olmuştur. Çalışmalar, bu proteinlerin sadece akciğer dokularında değil, kalp, böbrek, karaciğer, kolon, yemek borusu, beyin, safra kesesi ve testis gibi akciğer dışı organlarda da eksprese edildiğini göstermiştir, bu da SARS-CoV-2'nin akciğer dışı organları da etkileyebileceğinin kanıtını oluşturmuştur (46).

Yapılan birçok çalışmada, solunum yolu dışında, kalp dokusunda da enfeksiyon belirtileri gözlemlenmiştir (44, 47). Kalp dokusundaki kardiyomiyositler ve kardiyak makrofajlar gibi hücrelerin viral partikülleri barındırdığı belirtilmiştir (47–49). Benzer şekilde, böbrek ve karaciğer dokusu da enfeksiyonun hedefleri arasındadır

ve enfekte böbrek ve karaciğer hücrelerinin varlığına dair kanıtlar bulunmuştur (50–53).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun gastrointestinal sistemde de yayılabileceği gösterilmiştir. Bağırsak epitel hücreleri, enterositler gibi gastrointestinal sistem hücreleri, virüsün enfekte olabileceği potansiyel bir alan olarak tanımlanmıştır (54, 55).

COVID-19'un akut döneminde ve sonrasında nörolojik semptomların sıklıkla görülmesi SARS-CoV-2'nin sinir hücreleri üzerinde potansiyel bir etkisine işaret etmiştir. Yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2'nin endotel hücreleri, nöronlar, astrositler ve oligodendrositleri enfekte edebileceği gösterilmiştir (56, 57).

Virüsün hedefleri yalnızca yukarıda bahsedilen dokularla sınırlı değildir. Çeşitli organların vasküler endotel hücrelerindeki SARS-CoV-2 enfeksiyonunun hem doğrudan hem de pıhtılaşmanın bozulması gibi dolaylı hasarlara neden olması, kan damarlarının insan vücudunda bir yayılma yolunu temsil edebilecek önemli hedef dokular olduğunu düşündürmektedir. Kan dolaşımı aracılığıyla dolaşan hücrelerin enfekte olabileceği ve virüsü vücudun farklı bölgelerine taşıyabileceği fikri araştırmalara konu olmuştur. Bazı çalışmalar, SARS-CoV-2'nin çeşitli immün sistem hücrelerinde enfeksiyon belirtileri gösterdiğini ortaya koymuştur. Farklı çalışmalarda monosit ve nötrofillerin SARS-CoV-2 ile enfekte olabileceği, başka bölgelere de virüs taşıyabileceği gösterilmiştir (58, 59).

4.4.1 Mononükleer Kan Hücreleri ve SARS-CoV-2

Periferik kan, dolaşım sisteminde dolaşan kanın bir kısmını oluşturur ve çeşitli hücre tiplerini içerir. İnsan periferik kan mononükleer hücreleri periferik kandan izole edilir ve yuvarlak çekirdekli herhangi bir kan hücresi (yani lenfositler, monositler, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) veya dendritik hücreler) olarak tanımlanır (60). Mononükleer kan hücreleri, immünolojik araştırmalarda ve laboratuvar çalışmalarında önemli bir rol oynarlar ve bağışıklık sisteminin işleyişini anlamak için sıkça kullanılırlar (61).

Mononükleer kan hücre popülasyonunda lenfositler önemli bir yer tutar ve bu popülasyonun yaklaşık %70-90'ını oluşturur. Bu hücreler edinsel bağışıklığı düzenleyen anahtar hücrelerdir ve yabancı ajanların spesifik olarak tanınması ve uzaklaştırılmasından sorumludurlar. Ömürleri birkaç haftadan birkaç yıla kadar değişebilir. Lenfositler genel olarak B ve T hücreleri ile NK (doğal öldürücü) hücreler olmak üzere üç ana gruba ayrılır (60).

B ve T lenfositleri, bağışıklık sisteminin önemli hücreleridir ve farklı görevlere sahiptirler. B lenfositleri, yabancı organizmalara (antijenlere) karşı savunma sağlayan antikor adı verilen proteinleri üretirler ve humoral bağışıklık oluştururlar. Bu antikorlar, antigenleri işaretler ve nötralize ederek olumsuz etkilerini baskılar. B lenfositleri bir antijene karşı tepki verdiklerinde, o antijene karşı hafızalarını da oluştururlar, böylece aynı antijenle tekrar karşılaşıldığında daha hızlı ve etkili bir yanıt oluşturulur (62, 63)

T lenfositleri etkili her bağışıklık yanıtı için etkinleştirilmeleri gereken bağışıklık hücreleridir. Özellikle, kanser hücrelerine, virüsler ve bakteriler gibi patojenik organizmalara karşı savunma olan, hücre-aracılı bağışıklıkta önemlidirler (64). Yardımcı T hücreleri ($CD4^+$), diğer bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve fonksiyonunu düzenlerler ve B lenfositlerinin antikor üretimini tetiklerler (65). Sitotoksik T hücreleri ($CD8^+$), enfekte hücreleri tanır ve doğrudan yok ederler. Bu işlev, virüs enfeksiyonları veya kanser gibi hücresel enfeksiyonlara karşı etkili bir savunma mekanizması sağlar (66). Hafıza T hücreleri ise daha önce karşılaşılan bir antijenle tekrar karşılaşıldığında daha hızlı ve güçlü bir yanıt sağlarlar (67). Baskılayıcı T hücreleri olarak da bilinen düzenleyici T hücreleri ($CD4^+CD25^+$), immünolojik dengeyi sağlamak ve aşırı immün yanıtları kontrol etmek gibi önemli görevlere sahiptirler. İmmün yanıtın aşırı aktivasyonunu engelleyerek otoimmün hastalıklara karşı koruma sağlarlar. Ayrıca, inflamasyonun kontrol altında tutulmasında ve doku hasarının önlenmesinde rol oynarlar (68, 69). Tüm bu lenfosit alt tiplerinin koordinasyonu, vücudun bağışıklık sisteminin uygun ve etkili bir şekilde çalışmasını sağlar.

NK hücreleri, doğal bağışıklığın önemli bir parçasıdır. Enfekte hücreleri veya kanser hücrelerini tanır ve öldürürler. Sitokinlerle uyarıldıklarında aktif hale gelerek

hedef hücreleri öldürmek için sitotoksik granüller salgırlar. Ayrıca inflamasyon sırasında düzenleyici hücreler olarak da işlev görürler. NK hücreleri, antijen sunan hücrelerle etkileşime girerek, diğer bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesini sağlarlar. Bu işlevleriyle, enfeksiyonların yayılmasını önlemekte ve kanser hücrelerinin kontrol altına alınmasına yardımcı olmaktadır (70, 71).

Monositler, doğal immün sistemin önemli ve büyük (14-20 mikrometre) hücreleridir (72). Temel görevleri, enfeksiyonlarla mücadele etmek ve doku onarımında yer almak gibi çeşitli bağışıklık fonksiyonlarını yerine getirmektir. Dokulara göç ederek enfekte olmuş veya hasar görmüş hücreleri, eritrositleri, büyük parçacıkları ve bulaşıcı ajanları fagositte edebilirler (73). Genellikle enfekte doku bölgelerinde bulunurlar. Ayrıca, antijen sunan hücreler olarak işlev görürler, bağışıklık sistemine yabancı maddelerin tanınmasını ve bağışıklık tepkisinin uygun şekilde başlatılmasını sağlarlar. Bunun yanı sıra, doku onarımı ve rejenerasyonunda da rol oynayarak, hasar görmüş dokuların yenilenmesine yardımcı olurlar. Makrofajlara veya dendritik hücrelere farklılaşarak doğal ve adaptif immüniteyi düzenlerler (74–76).

Dendritik hücreler, bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır ve antijen sunumu ve bağışıklık tepkisinin başlatılmasında kilit bir rol oynarlar. Vücutta dolaşan dendritik hücreler, çevrelerindeki doku ve kandan antijenleri toplarlar. Daha sonra bu antijenleri lenfoid organlara taşıyarak lenfositlere sunarlar. Bu süreç, spesifik bir bağışıklık yanıtının başlatılmasında kritik bir adımdır. Dendritik hücreler, antijen sunumu sırasında uygun sinyaller göndererek lenfositlerin aktivasyonunu sağlarlar. Bu aktivasyon, antijenle uygun lenfositlerin çoğalmasını ve spesifik bir immün yanıtın gelişmesini tetikler. Bu nedenle, dendritik hücreler, vücudun enfeksiyonlara, tümörlere ve diğer patojenlere karşı etkili bir şekilde tepki vermesinde önemli bir araçlardır (77, 78).

Pontelli ve ark. (79), bu tez çalışmasında da kullanılacak olan insan periferik kan mononükleer hücrelerinin SARS-CoV-2'ye duyarlılığını ve enfekte olabilirliğini araştırmıştır. Bu hücrelerin hem in vitro hem de COVID-19 hastalarında SARS-CoV-2 enfeksiyonuna duyarlı olduğu belirlenmiştir. Monositler in vitro enfeksiyona en duyarlı olan hücrelerken onları B lenfositleri, CD4 ve CD8 T lenfositleri izlemiştir. Ek

olarak, COVID-19 hastalarından alınan örneklerde gerçekleştirilen akış sitometrisi ve immüno Floresan analizleri, SARS-CoV-2'nin monositlerde ve B lenfositlerinde sıklıkla tespit edildiğini ortaya koymuştur.

4.4. Hücresel Enerji Metabolizması ve Ölçüm Yöntemleri

4.4.1 Enerji Metabolizmasının Temel Süreçleri ve Regülasyonu

Hücresel enerji metabolizması, canlı organizmaların hayati fonksiyonlarını sürdürebilmek için gerekli olan enerjinin üretim ve kullanım süreçlerini içerir. Bu süreçler, biyolojik sistemlerdeki moleküler düzeydeki tepkimeler ve metabolik yollar aracılığıyla gerçekleşir (80). Hücresel enerji metabolizması, temel olarak biyoenerjetik adı verilen bir dizi süreç tarafından yönlendirilir (81). Bu süreçler, hücre içindeki enerji üretiminden, taşınmasına ve kullanımına kadar olan süreçleri kapsar.

Hücresel enerji metabolizmasının anahtar bileşenleri, ATP/ADP ve NADH/NAD molekülleridir. Anabolik yollar ATP'yi tüketirken NADH üretecektir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon gibi katabolik yollar, ADP+P_i'den ATP üretecek ve NADH'yi NAD'a oksitleyecektir. Bu nedenle hücre enerji metabolizması, NADH dönüşümüne bağlı ATP sentezinde yer alan metabolik yolları ifade eder (82). Hücre içinde ATP üretimi genellikle üç ana süreçte gerçekleşir. Bu süreçler sırasıyla glikoliz, sitrik asit (trikarboksilik asit veya Krebs) döngüsü ve oksidatif fosforilasyon (OKSFOS)'dur. Bu süreçlerin her biri, hücrenin enerji ihtiyaçlarını karşılamak için birlikte çalışarak kompleks bir enerji üretim mekanizması oluşturur (83).

Glikoliz, sitoplazmada gerçekleşen ve glikozun pirüvat moleküllerine parçalanmasıyla ATP üretimi sağlayan bir metabolik yol olarak bilinir. Bu süreçte, glikoz molekülü bir dizi kimyasal reaksiyona girer ve pirüvat moleküllerine dönüşürken net 2 ATP üretilir (84).

Sitrik asit veya Krebs döngüsü, mitokondri içinde gerçekleşen bir dizi kimyasal reaksiyon serisidir. Bu döngüde, pirüvat molekülleri Asetil-CoA'ya dönüştürülür ve ardından sitrik asit döngüsü boyunca bir dizi ara ürüne dönüşerek, elektron taşıyıcılarının üretimi ve CO₂ salınımı ile sonuçlanır. Bu süreç, daha fazla ATP sentezi

için gerekli olan NADH ve FADH₂ gibi elektron taşıyıcılarının üretilmesini sağlar (85).

OKSFOS, mitokondri içindeki elektron taşıyıcılarının (NADH ve FADH₂) oksidasyonunu ve bu elektronların son elektron alıcısı olan oksijen tarafından kullanılmasını içerir. Elektron transfer sistemi (ETS) ve OKSFOS, hücresel solunumun karmaşık ve hayati öneme sahip süreçleridir. Bu süreçler, mitokondri içerisinde gerçekleşir ve hücrelerin enerji üretiminde anahtar bir rol oynar.

ETS, mitokondrinin iç zarına gömülü olarak bulunan bir dizi protein kompleksinden (I-IV) oluşur. Bu kompleksler, elektron taşıyan moleküllerden gelen yüksek enerjili elektronları birbirine aktarır. Elektronlar, bu kompleksler arasında taşındıkça, serbest bırakılan enerji, protonların mitokondri iç zarından dış zarına doğru pompalanmasını sağlar. Bu proton pompalaması, mitokondri içinde bir proton gradienti oluşturur (19).

OKSFOS aşamasında, bu proton gradienti ATP sentaz (Kompleks V) enzimi tarafından kullanılır. ATP sentaz, protonların geri akışı sırasında serbest kalan enerjiyi kullanarak ADP ve fosfat grubunu birleştirir ve ATP sentezler. Bu süreç, oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır çünkü ATP sentezi, elektron taşıma zinciri boyunca elektronların oksidatif indirgenmesi ve fosforilasyon süreci arasındaki bağlantıya dayanır. Aerobik solunumun anahtarı olan bu süreçte, hücre içinde büyük miktarda ATP üretimi sağlanır (86).

Biyoenerjetik süreçler, hücre içindeki enerji akışının düzenlenmesi ve yönlendirilmesiyle ilgilidir. ATP, hücre içinde enerji taşıyıcı molekül olarak işlev görür ve hücredeki biyokimyasal tepkimelerin çoğunda enerji kaynağı olarak kullanılır (81). Hücresel enerji metabolizmasının ve biyoenerjetik anlaşılmaması, sağlık ve hastalık durumlarında hücresel fonksiyonların anlaşılmasına ve tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir (19).

4.4.2 Mitokondrinin Temel Fonksiyonları ve Önemi

Mitokondri, neredeyse tüm ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunan hücresel organellerden biridir. Organeli matriks ve zarlar arası boşluk (IMS) olmak üzere iki boşluğa bölen dış mitokondriyal membran ve iç mitokondriyal membran

olmak üzere iki fosfolipidik zarla çevrilidir (19). İç mitokondriyal membran katlanmalar yaparak krista adı verilen yapıları oluşturur. Bu krista yapıları, enerji ihtiyaçları veya apoptotik sinyaller gibi çeşitli uyarıcılara bağlı olarak dinamik bir şekilde yeniden düzenlenebilir, daha sıkı ya da daha gevşek bir yapı oluşturabilirler (87).

Mitokondriyal genom (mtDNA), 16,5 kb uzunluğunda, dairesel, intron içermeyen, çift sarmallı, haploid bir DNA zinciridir ve 37 geni kodlar. Memelilerin mitokondriyal genomunun organizasyonu oldukça korunmuştur. İnsan mtDNA'sı, oksidatif fosforilasyon sisteminde yer alan 13 temel geni kodlarken, kalan genler amino asitleri işlevsel proteinlere dönüştürmede esas rol oynarlar (88).

En yaygın bilinen görevi oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi olan mitokondrinin, hücrenin hayati fonksiyonlarını sürdürmek için ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlamanın yanı sıra birçok farklı önemli fizyolojik rolü bulunmaktadır (89). Hücresel homeostazın korunmasında, metabolizmanın kontrolünde, hücresel yaşlanmada, hücre döngüsü kontrolünde, doğuştan gelen bağışıklık yollarının, apoptotik süreçlerin ve çeşitli sinyal yollarının aktivasyonunda anahtar organel olduğu bilinmektedir (16, 90). Nükleotitler, lipitler, hem ve demir-sülfür kümeleri gibi makromoleküllerin biyosentezinde önemli rollere sahiptir (88).

Mitokondriler fizyolojik olarak bir dizi süreçten geçer: füzyonla uzarlar, fisyonla bölünürler ve mitofaji yoluyla kontrollü bir yıkım geçirirler. Füzyon, fisyon ve mitofajinin dinamik süreçleri homeostazı destekler ve mitokondrinin kalite kontrolü olarak hareket eder. Daha genel olarak hücresel sağlığın korunmasında önemli bir rol oynar (91).

Mitokondriler, proliferasyon, farklılaşma ve strese uyum gibi çeşitli hücresel süreçlerde merkezi bir rol oynarlar. İç mitokondriyal membran potansiyeli ve belirli faktörlerin ya da metabolitlerin salınımındaki değişiklikler aracılığıyla çevreleriyle sürekli iletişim kurmak için çeşitli mekanizmalar kullanırlar. Yüksek seviyelerde reaktif oksijen türünün (ROS) oksidatif stres açısından hücrelere zararlı olabileceği fikrine rağmen, düşük seviyelerdeki mitokondriyal ROS, fizyolojik fonksiyonların korunmasında görev alır. Ayrıca mitokondri, hücredeki oksidatif stresi önleyen antioksidan enzimlerin üretiminden de sorumludur. Oksidatif stres; protein ve lipitler

gibi hücresel bileşenlerin hasar görmesine neden olabilir. Mitokondriler, bu serbest radikalleri nötralize ederek hücre sağlığını korur (92, 93).

Mitokondrilerin bir diğer önemli fonksiyonu, hücre apoptozunu (programlı hücre ölümü) düzenlemeleridir. Mitokondriler, bu süreçteki sinyal yollarını etkileyerek hücre ölümünü yönlendirir (94). Mitokondriler ayrıca, hücrenin kalsiyum homeostazisini (dengesini) düzenlerler. Kalsiyum, hücre sinyal iletimi ve çeşitli hücresel süreçler için gereklidir ancak aşırı kalsiyum seviyeleri hücrede zararlı etkilere neden olabilir. Mitokondriler, hücre içindeki kalsiyum seviyelerini kontrol ederek bu dengenin korunmasına yardımcı olur (95).

Özetle, mitokondriler hücrelerin sağlığı ve işlevselliği için kritik öneme sahiptir. Enerji üretimi, antioksidan koruma, apoptoz düzenlemesi ve kalsiyum homeostazisi gibi temel fonksiyonlarıyla, mitokondriler hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmelerine yardımcı olur. Bu nedenle, mitokondriyal fonksiyonların anlaşılması ve korunması, birçok hastalığın tedavisi ve önlenmesinde önemli bir rol oynar.

4.4.3 Biyoenerjetik Süreçlerin Ölçümü ve Değerlendirilmesi

Hücreler, enerji üretmek için karmaşık bir dizi biyokimyasal reaksiyon yürütürler. Enerji üretiminde yer alan metabolik yolları karakterize etmek için çeşitli metodolojiler mevcuttur (75). Geçmişten günümüze kadar metabolizma araştırmaları için kullanılan ana teknikler, respirometri, doku ekstraktlarının aktivite ölçümleri, saflaştırılmış enzimler, radyo etiketli moleküller ve florimetridir. Respirometri, yani hücresel solunum ölçümü, oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi ve oksijen tüketimi arasındaki bağlantı nedeniyle enerji metabolizmasını değerlendirmek için kullanılan güçlü bir deneysel araçtır (76).

Günümüzde metabolizmayı incelemek ve anlamak için kullanılan önemli respirometri araçlarından olan Seahorse teknolojisi, hücre ve dokuların metabolik aktivitesi hakkında gerçek zamanlı, dinamik bilgi sağlamaktadır (77). Kanseri metabolizması, nörodejeneratif hastalıklar ve ilaç toksisitesi dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçleri incelemek için sıklıkla tercih edilmektedir (79–81).

Seahorse Enerji Metabolizması Ölçüm Cihazı, hücresel iki büyük enerji yolağının (mitokondriyal solunum ve glikoliz) aynı anda ölçülmesine imkan sağlamaktadır. Ölçümler, cihaz için özel olarak geliştirilmiş hücre kültürü mikropalakalarına ekilen hücrelerin 200 mikron üzerine kadar inen probalar ile gerçekleştirilmektedir. Ortamdaki çözünmüş oksijen ve serbest proton (H^+) konsantrasyonlarındaki değişimlerin ölçülmesinin ardından mitokondriyal solunumun göstergesi olan Oksijen Tüketim Oranı (OCR, pmol/dk) ve büyük ölçüde glikolizin göstergesi olan Ekstraselüler Asidifikasyon Oranı (ECAR, mpH/dk) hesaplanmaktadır (78).

Seahorse Enerji Metabolizması Ölçüm Cihazı, sunduğu farklı deneysel yaklaşımlar ile hücresel metabolizmanın farklı yönlerini inceleme imkânı sağlamaktadır. Dört kanallı enjeksiyon sistemi ile; hücrelerin farklı bileşiklere, substratlara, inhibitörlere veya uyarıcılara gerçek zamanlı tepkileri tespit edilebilmektedir. Bu sayede farklı testler uygulanarak, bir dizi hücresel parametrenin hesaplaması gerçekleştirilmektedir. Bu testler arasında en yaygın kullanılan iki test Mito Stres ve Glikoliz Stres testleridir (96, 97).

Mito Stres Testi, hücrelerin mitokondriyal fonksiyonlarını kapsamlı bir şekilde değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bu test sırasında, bazal değerlerin ölçümünü takiben hücelere sırasıyla oligomisin, karbonilsiyamid-p trifluorometoksi-fenilhidrazon (FCCP) ve Rotenon&Antimisin A karışımı enjekte edilmektedir. ETS'deki kompleks 5'in (ATP sentaz) inhibitörü olan oligomisin, OCR'nin düşmesine neden olur ve bu düşüş oksijen tüketimine bağlı ATP üretimi olarak kabul edilir. İkinci sırada enjekte edilen iyonofor özellikteki FCCP, mitokondri iç zarındaki proton gradyanını azaltarak mitokondriyal solunum ile ATP sentezi arasındaki bağı koparır. Bu etki, hücrelerin oksijen tüketimini artırır, böylece maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesi gibi parametreler ölçülür. Son olarak eklenen Rotenon ETS'deki kompleks I'i, Antimisin A ise kompleks III'ü inhibe eder ve mitokondriyal elektron transferinin durmasına bağlı olarak oksijen tüketiminin minimuma düşmesi beklenir. Geriye kalan OCR değeri, mitokondriyal olmayan solunum adı verilen, farklı oksidazlardan kaynaklanan oksijen tüketimini gösterir ve arkaplan sinyali olarak kabul edilerek hesaplama sırasında diğer parametrelerden çıkarılır (98, 99).

Glikoliz Stres Testi, enerji üretimindeki ana yollardan biri olan glikolizi değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Testin ilk adımı, hücreleri glikoz veya pirüvat içermeyen bir ortamda inkübe ederek başlangıç hücre dışı asidifikasyon oranı (ECAR) değerinin ölçülmesidir. Ardından, hücrelere doymuş bir glikoz çözeltisi enjekte edilir. Bu enjeksiyon, hücrelerin glikozu alıp glikolitik yolu kullanarak pirüvata metabolize etmesini sağlar. Bu süreçte, ATP, NADH, su ve protonlar üretilir ve bu protonlar hücre dışı ortama çıkararak ECAR'ın hızla artmasına neden olur. Bu artış, hücrelerin bazal glikoliz hızını belirler. Daha sonra oligomisin enjeksiyonu yapılarak mitokondriyal ATP üretimi inhibe edilir ve enerji üretimi yalnızca glikolize bağlanır. Bu enjeksiyon sonrası ECAR'da görülen artış glikolitik rezerv olarak yorumlanır. Son adımda ise hücrelere glikoz analogu olan 2-Deoksi-Glikoz (2-DG) enjekte edilir. Bu bileşik, glikolizi inhibe ederek ECAR'ı düşürür ve glikolitik olmayan asidifikasyonun belirlenmesini sağlar. Glikoliz stres testi, hücrelerin glikolitik kapasitesini ve enerji üretim yeteneklerini değerlendirmek için önemli bir araçtır (100, 101).

4.4.3.1 Biyoenerjetik Sağlık İndeksi

Mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesi; viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere birçok hastalığın patolojisinin anlaşılması, hastalık belirteçleri belirlenmesi ve tedavi stratejileri geliştirilmesi için önemlidir. Bu bağlamda, mitokondriyal fonksiyonu nicelendirmek ve izlemek için Biyoenerjetik Sağlık İndeksi gibi yeni araçlar geliştirilmiştir. Bu indeks, Seahorse Mito Stres Testi ile elde edilen temel parametreleri bir araya getirerek, bireylerin mitokondriyal sağlığını objektif olarak değerlendirmeyi amaçlamaktadır (102). İndeksin formülü aşağıdaki gibidir:

$$\text{Biyoenerjetik Sağlık İndeksi} = \log \frac{\text{Yedek Solunum Kapasitesi} \times \text{ATP Üretimi}}{\text{Mitokondriyal Olmayan Solunum} \times \text{Proton Kaçağı}}$$

Şekil 4.3 Biyoenerjetik Sağlık İndeksi Formülü (102)

Biyoenerjetik sağlık indeksinin, bireyselleştirilmiş tıp alanında tanı ve belirteç amaçlı kullanılmak için önemli bir potansiyele sahip olduğu ifade edilmektedir (102).

Yapılan birçok çalışmada BHİ'nin farklı hastalıklara, oksidatif strese, alkol kullanımı gibi olumsuz koşullara bağlı hasarları yansıtmakta oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir (103–106).

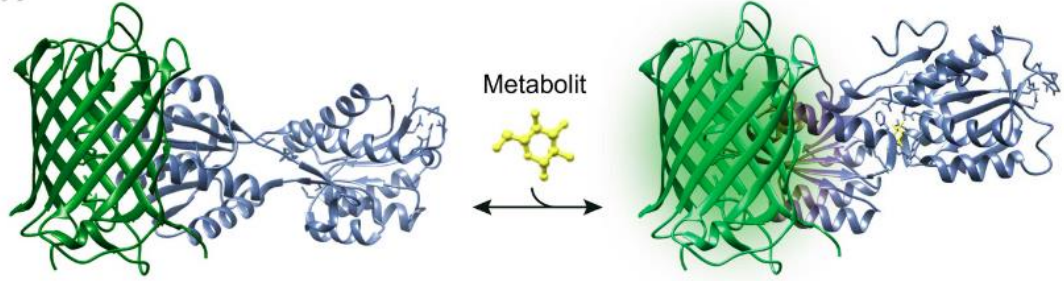


Şekil 4.4 Düşük Biyoenerjetik Sağlık İndeksi İlişkilendirilen Durumlar (BioRender ile oluşturulmuştur.)

4.4.4 Enerji Metabolizmasının Genetik Kodlanmış Biyosensörler ile İncelenmesi

Genetik olarak kodlanmış floresan biyosensörler, 1990'ların başında geliştirilmiştir ve günümüzde hücre içi sinyalleri izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyosensörler, belirli metabolik aktiviteleri gerçek zamanlı olarak raporlamak üzere tasarlanabilen moleküler problemlerdir (107). Genellikle bir algılama bölgesi ve bir floresan protein (FP) veya FP çifti içeren iki kısımdan oluşurlar. Bir molekül algılama bölgesine bağlandığında, sensörün yapısı değişir ve bu değişiklik sensörün floresan özelliklerinde bir değişikliğe neden olur. Sensörün floresan özelliklerindeki bu değişiklikler, floresan mikroskopu veya floresan plaka okuyucu gibi araçlar kullanılarak ölçülebilmektedir. Floresan ölçümleri, tek kanallı ve çift

kanallı (veya oranlamalı) ölçümler olarak ikiye ayrılabilir. Çift kanallı ölçümler arasında, floresan sensörlerde sıkça kullanılan Förster Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi de bulunur (108).



Şekil 4.5 Tek floresan proteinli bir biyosensör örneği.

Genetik olarak kodlanmış biyosensörler, özellikle canlı hücrelerde hücresel metabolizmayı hücre içinde ve hatta hücre içindeki spesifik bölgelerde incelemek için önemli bir alternatiftir (109, 110). Bu sensörler, hücrelerde genetik olarak kodlanıp ifade edilerek canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi gerçek zamanlı izlemeye olanak tanımaktadır (111). Kullanımları invaziv olmamakla birlikte kültür edilmiş hücrelerden canlı hayvanlara kadar birçok deney sisteminde kolaylıkla kullanılabilirler (112).

Son 20 yılda, metabolitleri yüksek çözünürlükle izleyebilen 50'den fazla genetik olarak kodlanmış biyosensör geliştirilmiştir (109). Bu sensörler sayesinde göreceli metabolit seviyelerini, mutlak konsantrasyonları ve metabolik yolak aktivitelerini belirlemek mümkün olmaktadır. Bu biyosensörlerin bazı örnekleri glikoz, ATP, NADH, laktat, pirüvat gibi metabolitler için FRET veya tek floresan protein tabanlı problemlerin yanı sıra ATP ve reaktif oksijen türleri (ROS) için lusiferaz bazlı problemleri içerir (113). Bu sensörler, bir dizi hücre tipinde ve organizmada hücresel metabolizmayı araştırmak için kullanılmış ve sağlık ve hastalıkta metabolik yolların düzenlenmesi ve işlevine ilişkin yeni bilgiler sağlamıştır. Bu çalışmalar, hücresel metabolizmayı ölçmek için mevcut teknolojilere tamamlayıcı veya alternatif bir yaklaşım olarak genetik olarak kodlanmış biyosensörlerin potansiyelini göstermektedir (114).

Genetik olarak kodlanmış biyosensörlerin mevcut teknolojilere göre birçok avantajı bulunmaktadır:

- DNA transfeksiyonu veya viral transdüksiyon yoluyla çeşitli hücrelere oldukça kolay bir şekilde gönderilebilir veya organelle özgü sinyal peptitleri ile etiketlenerek farklı organellere hedeflenebilirler.
- Az sayıda hücreyle çalışmak için uygunlardır. Bir hücre popülasyonu içindeki metabolik heterojeniteyi ortaya çıkarmaya yardımcı olmak için tek hücrelerde kullanılabilirler.
- Ligand bağlanma veya ayrışma dinamikleri, FP tabanlı sensörler için genellikle tersine çevrilebilir, böylece in vitro ve in vivo metabolik aktivitelerin gerçek zamanlı kaydına izin verirler.
- Gerçek zamanlı canlı hücre görüntülemeye izin verirler, farklı manipülasyonlara verilen yanıtlar eş zamanlı olarak izlenebilir.
- Araştırmacıların metabolik reaksiyonların kinetiğini ve bunların nasıl düzenlendiğini araştırmasına izin vererek, belirli metabolik yolların ve metabolitlerin aktivitesi hakkında gerçek zamanlı bilgi sağlayabilirler.
- İlaçların, farklı manipülasyonların veya çevresel değişikliklerin hücresel metabolizma üzerindeki etkilerini araştırmak için floresan mikroskopisi, akış sitometrisi ve yüksek verimli tarama platformları gibi diğer tekniklerle birlikte kullanılabilirler.

Tüm bu avantajlara da bağlı olarak, son zamanlarda, genetik olarak kodlanmış floresan sensörler, çeşitli metabolik süreçlerin gerçek zamanlı izlenmesinde kapsamlı bir şekilde uygulanmıştır ve uygulamaları yaygınlaşmaya devam etmektedir (114–117).

4.5 COVID-19 Enfeksiyonunun Hücre Metabolizması ve Mitokondri Üzerindeki Etkileri

4.5.1 COVID-19’da Metabolizma ile İlişkili İnteraktom Değişiklikleri

Hücresel davranışı metabolik yollar yönlendirmektedir. Bulaşıcı hastalıklar ve konak metabolik süreçleri yakından bağlantılıdır ve enfeksiyon sırasında konak metabolizmasındaki değişiklikler hücre, doku ve organ olmak üzere tüm seviyelerde

meydana gelebilmektedir. COVID-19 enfeksiyonunun hücre metabolizması üzerindeki etkileri geniş çaplıdır. Virüsün hücre içine girişi, hücresel enerji metabolizmasında önemli değişikliklere yol açabilir. Virüs, replikasyonunu sürdürmek için yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyar ve bu enerji ihtiyacını karşılamak için hücresel metabolizmayı yeniden programlayabilmektedir (118). Diğer yandan ise bazı virüsler hücresel enerji metabolizmasını bozarak, hücrenin normal fonksiyonlarını engelleyebilir.

SARS-CoV-2, herhangi bir metabolik kapasiteye sahip değildir; bu nedenle, virüsün çoğalması ve yayılması için konak hücrenin metabolik mekanizmalarını kullanması gereklidir (119). SARS-CoV-2 genomu ve ürünleri, konak metabolizmasını transkripsiyon, translasyon ve metabolik düzenleyicilerin post-translasyonel modifikasyonları gibi çeşitli aşamalarda etkileyebilir (120). Bu RNA virüsü, 14 ORF kodlayarak insan vücudunda çeşitli protein-protein etkileşimlerini başlatır. Bu geniş kapsamlı viral protein etkileşimlerinin, insan metabolik yollarının yeniden programlanmasına ve dengesizliğine yol açabileceği belirtilmektedir. Bu durumun bozulmuş biyoenerjetik süreçlere, bağışıklık disfonksiyonuna ve redoks dengesizliğine neden olabileceği ifade edilmektedir (38).

Viral proteinlerin konak hücre metabolizmasını nasıl ele geçirdiği ile ilgili mekanizmalar halen net olarak bilinmese de incelenen protein-protein etkileşimleri bu konuda ipuçları sağlamaktadır. Yayınlanmış proteomik çalışmalarının derlendiği bir çalışmada viral proteinlerin, şeker metabolizması, amino asit metabolizması, lipid metabolizması, nükleotid metabolizması ve redoks homeostazıyla ilgili birçok yolla etkileştiği gösterilmiştir. (120). Viral proteinlerin farklı hücre bölümlerinde ve organellerde farklı metabolik enzimlerle etkileşime girdiği ifade edilmiştir (86).

Virüs proteinlerinin sitozolde etkileşime girdiği enzimler arasında glikoliz ile ilişkili fosfoglisarat kinaz 2 (PGK2), fruktoz-bisfosfat aldolaz b (ALDOB) ve hekzokinaz 3 (HK3) bulunmaktadır (120–122). Mitokondride ise viral M, Nsp2, Nsp3, Nsp6, Nsp7, ORF9c proteinlerinin oksidatif fosforilasyon ve ETS ile ilişkili birçok proteinle ilişkisi saptanmıştır (120). Nsp7, Nsp8 ve Nsp12'nin ise mitokondrideki ETS ve ribozom proteinleri ile etkileşime girdiği saptanmıştır. M proteini ayrıca amino asit metabolizmasıyla ilgili taşıyıcılar ve enzimlerle ilişkili bulunmuştur.

SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında lipid metabolizması ve nükleotid biyosentezi yeniden programlanırken, yağ asidi beta-oksidasyon enzimleri (asil-CoA dehidrogenazlar, ACADM ve ACAD9) ve lipogenezde rol alan (ATP sitrat liaz, ACLY) enzimler viral proteinlerle etkileşir. Nsp7, lipid metabolizmasının güçlü bir düzenleyicisi olarak saptanmıştır (120). SARS-CoV-2'nin giriş ve replikasyonu için kolesterol önemlidir. Virüsün hücrelere girdikten sonra, SREBP2 aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenleyerek konak kolesterol metabolizmasını artırdığı gösterilmiştir. ORF8, Nsp6 ve E viral proteinleri, kolesterol, kolin ve poliamin metabolizmasındaki enzimlerle etkileşir ancak bu etkileşimlerin biyolojik işlevi henüz net değildir.

Redoks dengesizliği, COVID-19'un temel bir metabolik sonucudur. Nsp5 ve Nsp14 viral proteinleri hem sitoplazmada hem de mitokondrideki redoks düzenleyici enzimlerle etkileşir. SARS-CoV-2, farklı hücre bölümlerinde redoks dengesini ve biyosentetik süreçleri koordine ederek çoğalma etkinliğini arttırabilir.

4.5.2 COVID-19'da Metabolizma ile İlişkili Serum Metabolom Değişiklikleri

COVID-19'da serum metabolomik analizleri, enfekte bireylerin kan serumunda bulunan küçük moleküllerin (metabolitlerin) değişimlerini incelemeyi amaçlamıştır. Bu değişimler, hastalığın metabolik yollara olan etkisi hakkında bilgi sağlayabilir, teşhis için potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesine yardımcı olabilir ve tedavi müdahalesi için hedefler sunabilir (123). Çalışmalar, COVID-19'un inflamasyon, enerji metabolizması ve bağışıklık tepkisi ile ilgili metabolitleri önemli ölçüde değiştirebileceğini göstermiştir (124, 125).

Xiao ve ark., COVID-19 hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla düzensiz hale gelen metabolik yolları karakterize etmişlerdir. Hem hafif hem de ağır hastalarda primer safra asidi biyosentezi, amino asit metabolizması ve nükleik asit metabolizmasının önemli ölçüde bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Buna karşılık, nikotinat ve nikotinamid metabolizması, triptofan metabolizması ve TCA döngüsü gibi bazı metabolik yollar yalnızca ağır hastalarda değişiklik göstermiştir. Hastalığın şiddeti boyunca sürekli artış veya azalış gösteren metabolitler çoğunlukla pürin

metabolizması, nikotinat ve nikotinamid metabolizması, triptofan metabolizması, TCA döngüsü ve arginin metabolizması ile ilişkili bulunmuştur (126).

Shen ve ark, COVID-19 hastalarının serumlarının proteomik ve metabolomik karakterizasyonlarını gerçekleştirmiş, COVID-19 hastalarına ait serumlarında sağlıklı gruba kıyasla makrofaj düzensizliği, trombosit degranülasyonu ve büyük bir metabolik baskılamayı yansıtan moleküler değişiklikler tespit etmiştir (127).

Jia ve ark, serumda değişen metabolitlerin çoğunlukla trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve üre döngüsü yolu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (128).

Caterino ve ark., COVID-19'un her düzeyinde serumda laktik asit seviyelerinin arttığını belirlemiştir. Enerji üretimi ve amino asit metabolizmasıyla ilgili yollarda düzensizlikler olduğu, karaciğerde karbon ve azot metabolizmasının etkilenmiş olabileceği bildirilmiştir (124).

4.5.3 COVID-19 ile İlişkili Mitokondriyal ve Biyoenerjetik Değişiklikler

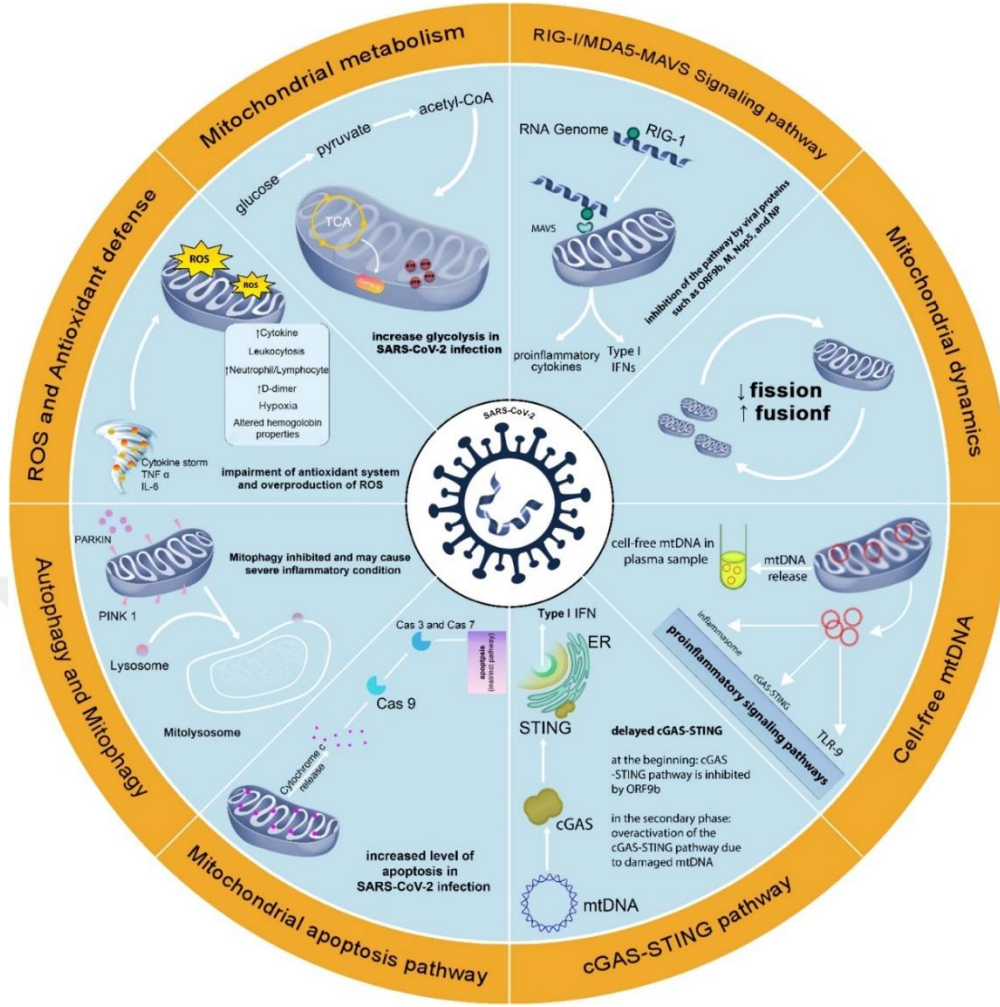
Çalışmalar hücrenin enerji kaynağı olarak işlev görev mitokondrinin SARS-CoV-2'nin ve bazı proteinlerinin önemli hedeflerinden biri olduğunu göstermiştir. Mitokondri, hücresel homeostazın korunmasında, metabolizmanın kontrolünde, bazı hücresel tepkilerin başlatılmasında, doğuştan gelen bağışıklık yollarının ve çeşitli hücre ölüm yollarının aktivasyonunda anahtar organelidir (16, 129). Bu nedenle mitokondri, konakçı hücre içinde hayatta kalmayı isteyen ve diğer yandan hücre sağkalımı garanti edilemediğinde apoptoz süreçlerini başlatması gereken birçok virüs için ideal hedeftir (38).

Wu ve ark., SARS-CoV-2 genomunun ve sgRNA'larının, mitokondriyal matris ve nükleolusta zenginleştiğini saptamıştır (130). Singh ve ark., SARS-CoV-2 proteinlerinin mitokondriye lokalize olduğunu ve virüsün hücrenin mitokondriyal fonksiyonunu ele geçirdiğini göstermiştir (131). Konakçı-virüs etkileşim analizleri, SARS-CoV-2 proteinleri ile fiziksel olarak etkileşime giren ve virüsün yaşam döngüsünde, enfeksiyon sürecinde ve çoğalmasında rol oynayabilecek proteinleri belirlemiştir ve proteinler arasında mitokondriyal proteinlerle olan ilişkiler öne çıkmaktadır (120).

Mitokondri, hücrel mikroyevresindeki değişikliklere ve stres durumlarına sürekli olarak devam eden füzyon ve fisyon süreçleri ile dinamik olarak da yanıt veren bir organeldir. Bu süreçler, mitokondrinin yapısal bütünlüğünün ve fonksiyonunun korunması için önemlidir (132). Mitokondriyal füzyon/fisyon mekanizmasının bozulması, mitokondri tahribatına ve apoptoz süreçlerinin başlatılmasına da yol açabilmektedir. COVID-19 ile ilişkili bazı çalışmalarda bu dinamik dengelerin bozulduğu ve bunun sonucunda oksidatif stres, mtDNA hasarı, sitokin artışı ve hücre ölümü olduğu gösterilmiştir(129). Duan ve ark., SARS-CoV-2'nin alveolar epitel hücrelerinde aşırı mitokondriyal fisyonu neden olduğunu göstermiştir (133).

Mitokondri dinamikleri ve morfolojisi biyoenerjetik süreçlerle de bağlantılı bulunmuştur (134). Mevcut veriler, enerji metabolizmasındaki değişiklikler ile memeli hücrelerindeki mitokondriyal morfolojideki adaptasyonlar arasında işlevsel bir bağlantıya işaret etmektedir. Metabolizma ve solunum açısından aktif hücrelerde birbirine bağlı mitokondriyal ağların sıklıkla bulunduğu, buna karşın durgun ve solunum açısından aktif olmayan hücrelerde küçük ve parçalanmış mitokondrilerin daha yaygın olduğu görölmektedir (134).

Mitofaji ve biyogenez de mitokondrinin stres yanıtları ile ilişkili dinamik süreçleridir. Birçok çalışmada mitofajik süreçlerin SARS-CoV-2 enfeksiyonundan etkilendiği gösterilmiştir (133, 135). Li ve ark., SARS-CoV-2'ye ait ORF10'un mitofajiyi indüklediğini göstermiştir (15).



Şekil 4.6 SARS-CoV-2 enfeksiyonunda mitokondriyle ilgili olaylardaki değişiklikler (129).

Mitokondrinin memelilerin bağışıklık sistemindeki rolü önemli ölçüde kanıtlanmıştır (136), bu nedenle immün sistemi baskılayarak hayatta kalmayı ve çoğalmayı hedefleyen virüslerin mitokondri işlevini modüle etmeleri beklenen bir durumdur. Mitokondri, antiviral yanıtların düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Mitokondriyal antiviral sinyalizasyon (MAVS) proteinleri, viral enfeksiyonlara yanıt olarak interferon üretimini teşvik eder. SARS-CoV-2'nin MAVS proteinlerini hedef alarak interferon yanıtlarını baskıladığı ve böylece bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırdığı bildirilmiştir (15, 137, 138). Duan ve ark., COVID-19 hastalarının akciğer dokusu ve kan bağışıklık hücrelerinde mitokondri kalitesinin ciddi şekilde

düşmesinin virüsün bağışıklıktan kaçışında önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Çalışmada, SARS-CoV2'nin fisyon artışına ve mitofajinin inhibisyonuna yol açarak bağışıklık yanıtını zayıflattığı ve virüsün çoğalmasını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, SARS-CoV-2'nin alveolar makrofajlarda mitokondriyal solunum yeteneğini azaltarak ve mitokondriyal ROS-HIF1A yoluyla pro-inflamatuar yanıtı artırarak sitokin fırtınasına yol açtığı bulunmuştur. (133).

Mitokondrinin solunum zinciri kompleksleri gibi makromolekülleri inflamasyona ve oksidatif strese karşı oldukça hassastır ve mitokondriyal disfonksiyon birçok hastalık ile ilişkilendirilmektedir (Bornstein et al., 2020; Czajka et al., 2015b; Prasun, 2020). Mitokondriler, hücresel enerji üretiminin ana merkezidir ve SARS-CoV-2 enfeksiyonu, mitokondriyal fonksiyonları ciddi şekilde bozar. Mitokondriyal disfonksiyon, hastalığın şiddetini artırarak sistemik inflamasyon ve organ hasarına katkıda bulunabilir. Miller ve ark., SARS-CoV-2'nin hücresel solunum ve Kompleks I ile ilgili nükleer kodlu mitokondriyal genleri baskıladığını bildirmiştir (139).

Mitokondri, fonksiyonunu inceleyen bazı çalışmalar farklı değişiklikler olduğunu sunmuşlardır. Ajaz ve ark., COVID-19 hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerini göğüs enfeksiyonu olan hastaların ve sağlıklı bireylerin hücreleri ile karşılaştırmış, akut COVID-19 hastalarının mononükleer hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon ve glikolize geçiş saptamıştır (20). Liu ve arkadaşları, akut olarak enfekte olmuş COVID-19 hastalarından alınan in vitro aktive edilmiş T hücrelerinde, mTOR sinyallemesinin daha düşük aktivasyonu ile birlikte daha düşük glikoliz, glikolitik kapasite ve azalmış glikolitik rezerv belirtileri olduğunu saptamıştır (140). Gibellini ve ark. SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastaların monositlerinin mitokondriyal işlev bozukluğu belirtileri gösterdiğini; bazal, maksimum, yedek solunum kapasitelerinin azaldığını belirlemiştir (22). Mozzi ve ark., SARS-CoV-2 ORF-3c proteininin, sağlıklı akciğer epitel hücrelerinde mitokondriyal metabolizmayı değiştirerek glikoz oksidasyonundan yağ asitlerine ve artan oksidatif fosforilasyona kaymaya neden olduğunu göstermiştir (14).

Hastalardan alınan hücrelerin yanı sıra bazı çalışmalarda virüse ait Spike proteini veya S1 alt ünitesiyle karşılaşmanın da monosit, makrofaj, mikrogliya veya beyin endotel hücresi gibi farklı hücrelerde metabolik değişimlere yol açtığı

gösterilmiştir (141–144). İnsan akciğer mikrodamar endotel hücrelerinde SARS-CoV-2 spike protein alt birimlerinin mitokondriyal metabolizmada değişikliklere yol açarak aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçişi işaret ettiği belirtilmiştir (145).



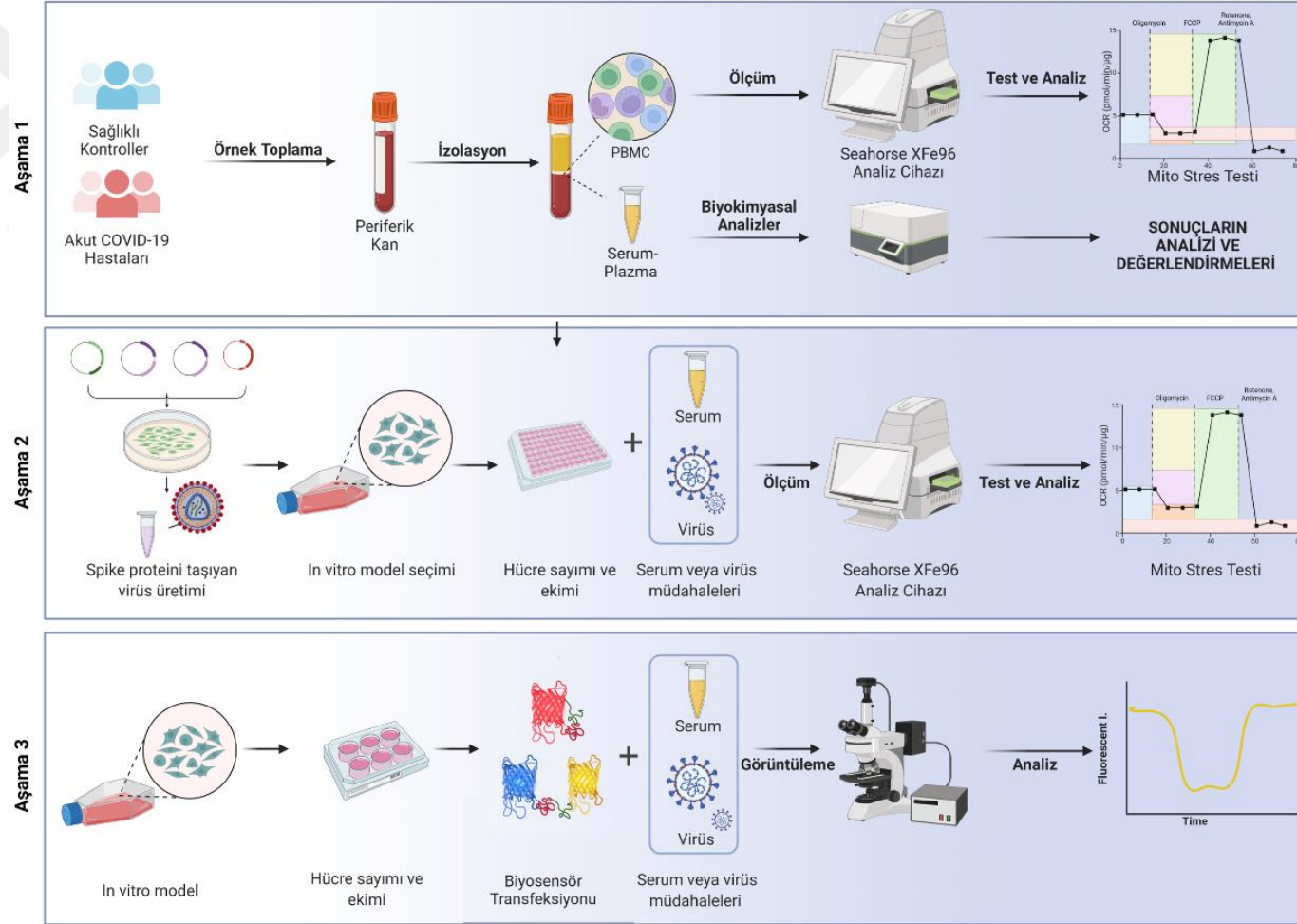
5. MATERYAL VE METOT

5.1 Çalışmanın Tasarımı, Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi

Çalışmanın tüm deneysel aşamaları, Temmuz 2021-Haziran 2024 ayları arasında İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Hastaneden örnek toplama aşamasından geçilmeden önceki pilot çalışmaya 5'i hiç COVID-19 geçirmemiş sağlıklı kontrol, 5'i semptomatik COVID-19 geçirip en az bir ay önce iyileşmiş katılımcı olmak üzere toplam 10 gönüllü erkek birey dahil edildi. Bu çalışma ile COVID-19 kaynaklı olası kalıcı bir metabolik etkinin görülüp görülemeyeceği de incelendi. Akut hasta örnekleri ile gerçekleştirilecek esas çalışma için gerekli örneklem sayısının belirlenmesi amacıyla bu ön çalışmanın bulgularından yola çıkılarak yapılan analizlerde, Tip-1 hatanın %5 olduğu varsayımı altında, gruplar arası farkı %80 istatistik güçle göstermek için grup başına 21 kişinin yeterli olacağı hesaplandı. Bu nedenle çalışmanın ana deneyleri için gönüllü olarak deneylerde yer almayı kabul eden 18-75 yaş aralığındaki 21'i hasta, 21'i sağlıklı toplam 42 erkek bireyden gerekli bilgiler ve kan örnekleri toplandı. Hasta grubunu Bağcılar Medipol Mega Üniversite Hastanesi'nde yatan RT-PCR pozitif ve klinik olarak doğrulanmış COVID-19 hastaları oluşturdu. Sağlıklı kontrol grubunu ise daha önce hiç COVID-19'a yakalanmamış olan gönüllüler oluşturdu. Sigara kullanan, kronik hastalığı olan, düzenli olarak immünsupresif ilaç kullanan bireyler çalışmaya dahil edilmedi. Örnek toplamaları 29 Eylül 2021-29 Ocak 2022 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Bu çalışmanın yapılabilmesi için; İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan E-10840098-772.02-1747 Sayı, 236 Karar No ile izin alındı.

Bireyler sözlü ve yazılı olarak çalışma hakkında bilgilendirildi, onay formu imzalatıldı. Başlangıçta katılımcıların genel özellikleri ve hastalık durumlarına ilişkin bilgileri kayıt altına almak için bilgi formları dolduruldu. Yaş, antropometrik ölçümler, mevcut hastalıklar, kullanılan ilaçlar, hastalık belirtileri, PCR testinde pozitif sonuç alınan tarihle ilgili bilgiler kayıt altına alındı. Tez çalışmasının akış planı Şekil 5.1'de şematize edilmiştir ve bu çalışmada kullanılan yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

TEZ ÇALIŞMASI AKIŞ PLANI



Şekil 5.1 Çalışmanın akış şeması.

5.2 Kan Alımları, Serum ve Plazma İzolasyonu

Deneyleri gerçekleştirebilmek amacıyla bütün gruplardaki katılımcılardan 3x8 ml olmak üzere toplam 24 ml açlık kanı alındı. Kanların 16 ml'si (2x8 ml) mononükleer hücre izolasyonunda kullanılmak ve plazma elde etmek üzere antikoagülanlı (Etilendiamin tetraasetik asit-EDTA) vakumlu kan tüplerine, 8 ml'si ise vakumlu serum tüplerine hemşire tarafından alındı. Hastanede alınan kanlar en fazla 3 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılarak izolasyon işlemlerine başlandı.

EDTA'lı tüpler ve serum tüpleri oda sıcaklığında 300xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Kan tüplerinden yeni ve uygun şekilde etiketlenmiş 1,5 ml'lik tüplere aktarılan plazma ve serumlar ileri analizlerde ve deneylerde kullanılmak üzere -80 °C donduruculara kaldırıldı. EDTA'lı tüplerde plazma ayrıştırıldıktan sonra kalan kısımdan mononükleer kan hücrelerinin izolasyonuna devam edildi, izolasyonu takiben bu hücreler de dondurularak saklandı.

5.3 Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu ve Hücre Dondurma İşlemleri

Kanlardan mononükleer hücre izolasyonu, Lymphoprep kullanılarak dansite gradient yöntemi ile gerçekleştirildi. İzolasyon yapılacak her bir kan örneği için 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne 5 ml Lymphoprep çözeltisi konuldu. EDTA'lı tüplerde alınan kanlar 1:1 oranında Fosfat Tamponlu Salin (PBS) ile seyreltildi. Seyreltilmiş kanlar serolojik pipetle Lymphoprep çözeltisi bulunan tüpün kenarından yavaşça sızdırılarak iki sıvının birbirine karışmadan tabakalandırılması sağlandı ve tüpler 18-20 °C'deki santrifüje yerleştirilerek 400xg'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda bulut şeklindeki mononükleer hücre tabakası çekilerek farklı bir tüpe aktarıldı. Ayırılan mononükleer hücreler olan tüpe 6 ml PBS eklendi ve 300xg'de 8 dakika (Acc:9 Dec:9) santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki PBS döküldü ve tüpün dibindeki hücreler 1 ml PBS ile süspanse edildi. Daha sonra 6 ml PBS daha eklenerek 300xg'de 8 dakika (Acc:9 Dec:9) santrifüj edildi. Her örnek başına 2 tüp olacak şekilde, hücre dondurma tüplerinin üzeri uygun bir şekilde etiketlendi. Santrifüj sonrasında tüplerdeki PBS serolojik pipetle çekildi, kalan hücreler 1 ml hücre dondurma çözeltisi (%10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) + %90 fetal sıgır serumu (FBS)) ile süspanse edildi, sonra üzerlerine 2 ml daha dondurma çözeltisi eklenip 3 ml'e

tamamlandıktan sonra 2 tüpe bölündü. Tüpler hücre dondurma kutusuna (Mr. Frosty) yerleştirilerek hızlıca -80°C dondurucuya kaldırıldı. Dondurucuya kaldırılan tüpler maksimum 72 saat içerisinde sıvı azot tankına transfer edildi.

5.4 Biyokimyasal Analizlerin Gerçekleştirilmesi

Hasta ve sağlıklı bireylerin glikoz, albümin, laktat dehidrojenaz (LDH), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, total protein, trigliserit, üre, ve CRP seviyeleri otomatik kan biyokimyasal analiz cihazı (Randox Monaco) ve üreticiye ait ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

5.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Tüm hücre izolasyonları ve hücre kültürü çalışmaları Biyogüvenlik Seviyesi 2 (BSL-2) standartlarına uygun olarak steril hücre kültürü kabinleri içerisinde yürütüldü. Biyosensör karakterizasyon çalışmaları ve virüs üretimi için insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293T), serum ve virüs denemeleri için MRC-5 insan akciğer fibroblast hücreleri kullanıldı. Hücreler, yüksek glikozlu (4,5 g/L) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde, %10 FBS, 100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin eklenerek kültüre edildi (37°C ve %5 CO₂ koşullarında). Mononükleer kan hücrelerinin inkübasyon gereken işlemlerinde RPMI 1640 besiyeri kullanıldı.

5.6 Hücre Çözdürme, Tripan Mavisi ile Canlılık İncelenmesi ve Hücre Sayımı İşlemleri

Dondurularak saklanan tüm mononükleer kan hücreleri ve diğer hücre hatlarının çözündürülmesi işlemine başlanmadan önce, su banyosu 37°C'ye ayarlandı ve hücre kültürü besiyeri hazır bulunduruldu. Hücrelerin dondurulduğu tüp, -80°C veya sıvı azot tankından çıkarılarak hızlı bir şekilde 37°C su banyosuna yerleştirildi ve yavaşça çalkalanarak hücreler tamamen çözündürüldü. Bu sürenin 1 dakikayı aşmaması sağlandı. Hücreler çözüldükten hemen sonra, hücre dondurma tüpünün içeriği içerisinde 5 ml besiyeri bulunan steril bir tüpe damla damla olacak şekilde yavaşça aktarıldı. Hücreler 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki süpernatant dikkatlice aspire edilerek hücre pelletine zarar verilmemesi sağlandı. Hücreler kültür edilecekse pellet 1 ml besiyeri ile resüspanse edildi ve hücre

kültürü kaplarına ekim yapıldı. Hücre sayımına devam edilecekse hücre pelleti, 5 ml hücre kültürü besiyeri eklenerek nazıkçe resüspanse edildi.

Tez çalışması sürecinde, tüm hücre sayımları tripan mavisi boyama tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Süspanse haldeki hücrelerden 5 µl alınarak, küçük bir santrifüj tüpünde bulunan 45 µl tripan mavisi solüsyonuna eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan bu 1:10 oranında seyreltilmiş hücre ve boya karışımından 10 µl alınarak Neubauer Hemositometresi'ne yüklendi ve ışık mikroskobu altında 10X büyütmede canlı hücre sayımı yapıldı. Mikroskop altında görülen büyük karelerden oluşan 4 alandaki parlak hücreler sayılarak, formüle göre 1 mililitre süspansiyondaki canlı (parlak) ve ölü (mavi boyalı) hücre sayısı hesaplandı. Bir ml çözelti içindeki hücre sayısının hesaplanmasında: $(\text{Toplam Hücre sayısı}/4) \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4$ formülü kullanıldı.

5.7 Lentivirüs ve Pseudovirüs Üretimi

Lentivirüs partikülleri, pLenti-MP2 vektörü (Addgene #36097) kullanılarak HEK293T hücrelerinde üretildi. 4x10⁶ cm² çapındaki hücre kültürü kaplarında büyütülen hücreler %80-90 yoğunluk seviyesine ulaştığında, 3 µg psPAX2 (Addgene #12260), 3 µg pMD2.G (Addgene #12259) yardımcı vektörleri ve 6 µg ACE2-CFP lentivirüs vektörleri ile ko-transfekte edildi. Transfeksiyon, üreticinin önerilerine göre PolyJet transfeksiyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi (SignaGen Laboratories, Rockville, MD, ABD). Spike-pseudotiplenmiş lentiviral partiküllerin üretimi için ise hücreler mCherry floresan işaretini içeren 7.5 µg vektör plazmidi, 3.75 µg pMDLg/pRRE, 2.25 µg pRSV-Rev ve SARS-CoV-2 Spike proteinini kodlayan 1,5 µg pCMV-SpikeΔ19 plazmidi ile ko-transfekte edildi. 24 saat sonra, hücrelerin besiyerleri değiştirildi. Sonraki 24. ve 48. saatlerde virüs partikülleri içeren hücre kültürü besiyeri toplandı. Yirmi dördüncü saatte toplanan besiyerleri 4°C'de saklandı. Kırk sekizinci saatte toplanan besiyerleri ile virüs izolasyonu aşamasına geçildi. Besiyerleri öncelikle 400xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. 0.45 µm düşük protein bağlama özelliğine sahip filtrede filtrelendi. Virüs partiküllerinin ayrıştırılmasında kullanılacak süktroz içeren tampon hazırlığı için, 100 ml suda 50 mM Tris Hidroklorik asit (HCl), 100 mM sodyum klorür (NaCl) ve 0.5 mM EDTA karıştırılarak hazırlandı ve sonra 20 g süktroz eklenip karıştırıldı (pH 7.4). Hazırlanan

sükroz çözeltisinden 10 ml uygun bir 50 ml'lik tüpe aktarıldı. Sonrasında, virüs içeren besiyerleri her bir tüpe 40 ml olacak şekilde dikkatlice sükroz çözeltisinin üstüne eklendi, bu sırada iki karışımın karıştırılmamasına özen gösterildi. Tüpler, 4°C'de 10.000xg hızında 4 saat boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant dikkatlice çekildi ve virüs pelleti temas edilmeden tüpün dibinde bırakıldı. Tüpe 100 µl PBS eklenerek virüs pelleti homojen hale getirildi. Konsanstre edilen virüsler 10'ar µl'lik alikotlar halinde hazırlandı ve uzun süreli saklanmak üzere hızlıca -80°C'ye kaldırıldı.

5.8 Stabil Hücre Hattı Geliştirilmesi

Hücre kültürü çalışmaları için bir erkek fetüsünün akciğer dokusundan geliştirilen, fibroblastlardan oluşan bir diploid hücre kültürü hattı olan MRC-5 modeli uygun türe, genetik arka plana ve doku tipine ait olması nedeniyle tercih edildi. Bu hücrelerde bazal ACE2 ekspresyonunun düşük olması nedeniyle kontrol hücreleri MRC-5 yabanıl tip (WT) olarak bırakılırken, ACE2 ekspresyonu indüklenen MRC-5+ACE2 hücreleri de geliştirildi (146). Stabil olarak ACE2 eksprese eden MRC-5 hücrelerinin geliştirilmesi için öncelikle MRC-5 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına, ertesi gün %40-50 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Viral transdüksiyon için ekimden 24 saat sonra hücrelerin besiyeri, içinde 10% FBS, 10 µg/mL Polybrene enfeksiyon reaktifi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ve ACE2-CFP kodlayan lentivirüs partikülleri bulunan antibiyotiksiz besiyeri ile değiştirildi. Hücreler bu virüs içeren ortamda 48-72 saat süreyle kültüre edildi. Daha sonra, normal kültürlerinde kullanılan DMEM ile bir hafta daha kültüre edilen hücreler floresan destekli hücre ayırma (FACS) işlemine tabi tutuldu. Floresan ışınması en yüksek oranda olan hücreler (en üst %30) seçildi. Seçilen bu hücreler daha sonra ileri deneylerde kullanılmak üzere kültürde büyütüldü.

5.9 Sitotoksikite Deneyleri

MRC-5 WT ve MRC-5+ACE2 hücreleri üzerindeki sitotoksikite deneyleri için hücreler 96 kuyucuklu siyah duvarlı mikropalakalara 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Yirmi dört saat sonra hücrelerin besiyerleri tamamen çekilerek sağlıklı kontrollere ve COVID-19+ hastalara ait serum örneklerinden %0-%5-%10-%20-%30-%40 oranlarında eklenerek hazırlanan 100 µl RPMI besiyerleri ile değiştirildi. Kontrol

kuyucuklarına %10 oranında FBS içeren RPMI besiyeri konuldu. Hücreler bu şekilde 48 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı ölçümü için tüm besiyerleri tekrar çekilerek 20 µl Cell Titer Blue boyası içeren 120 µl RPMI besiyeri eklendi. Bir saat inkübasyonun ardından Spectramax cihazında floresan okuma (560_{Ex}/590_{Em}) yapılarak kuyucuklardaki canlı hücre oranları ölçüldü. Hiç serum eklenmeyen, %10 FBS'li standart besiyerinde inkübe edilen hücrelerin bulunduğu kuyucuklar kontrol, hiç hücre ekilmeden sadece besiyeri ve boya eklenen kuyucuklar arkaplan olarak kabul edildi.

Mononükleer kan hücrelerindeki sitotoksosite deneyleri için sağlıklı bir erkek gönüllüden alınan kandan izole edilen mononükleer kan hücreleri tripan mavisi ile sayılarak 1,5 ml'lik deney tüplerine eşit sayıda olacak şekilde bölündü. Tüm tüplerin içindeki besiyerleri değiştirilerek; %10 FBS içeren kontrol besiyeri, FBS içermeyen kontrol besiyeri, %10 oranında sağlıklı kontrol (n=15) veya COVID-19+ hasta (n=15) serumu içeren besiyeri, %30 oranında sağlıklı kontrol (n=15) veya COVID-19+ hasta (n=15) serumu içeren besiyeri grupları oluşturuldu. Tüpler 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar hücre sayımları gerçekleştirildi ve canlı hücre oranları hesaplandı.

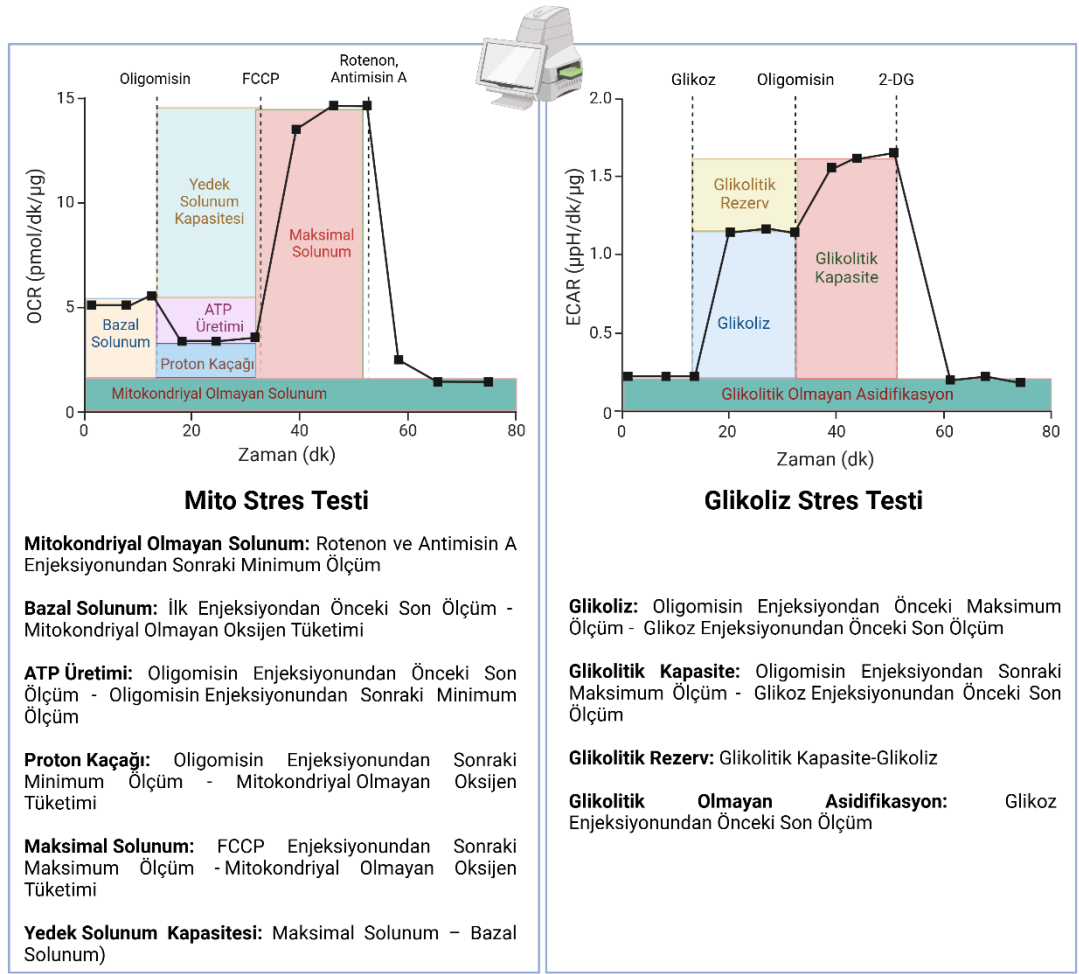
5.10 Mito Stres ve Glikoliz Stres Testi

Bu tez çalışması kapsamında hücresel enerji metabolizmasının ölçümü için Seahorse XFe96 Enerji Metabolizması Ölçüm Cihazı kullanıldı. Üreticinin kitleri kullanılarak (Agilent, Seahorse Biosciences) Hücre Mito Stres Testi ve Glikoliz Stres Testi uygulandı. Bu testlerin uygulanabilmesi için:

- Ölçümlerden 1 gün önce, yeşil sensör kartuşu, 96 kuyucuklu kalibrasyon mikropalakasının her bir kuyucuğuna 200 µl distile su konularak 1 gece 37°C'deki CO₂'siz inkübatörde hidrate edildi. Ölçüm günü ise kuyucuklardaki su 200 µl kalibrasyon çözeltisi ile değiştirilerek, sensör kartuşunun ölçüm öncesi 2-3 saat de bu şekilde hidrate edilmesi sağlandı.
- Mito Stres Testi için kullanılacak deney besiyeri 1 mM pirüvat, 2 mM L-Glutamin ve 10 mM glikoz içerecek şekilde hazırlandı ve sıcaklığı 37°C'ye getirildi. Hazırlanan besiyerinin pH'ı 7.4'e ayarlandı.
- Glikoliz Stres Testi için kullanılacak deney besiyeri 2 mM L-Glutamin içerecek şekilde hazırlandı ve sıcaklığı 37°C'ye getirildi. Hazırlanan besiyerinin pH'ı 7.4'e ayarlandı.

- MRC-5+ACE2 hücrelerinde gerçekleştirilecek olan ölçümler için, deneylerden 72 saat önce 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimleri gerçekleştirildi. 48 saat önce %10 FBS içeren kontrol besiyeri, FBS içermeyen kontrol besiyeri, %10 oranında sağlıklı kontrol (n=3) veya COVID-19+ hasta (n=3) serumu içeren besiyeri, %30 oranında sağlıklı kontrol (n=3) veya COVID-19+ hasta (n=3) serumu içeren besiyeri grupları oluşturulacak şekilde besiyeri değişimleri yapıldı. Her grup en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Deney günü hücrelerin besiyerleri uygulanacak teste uygun deney besiyeri ile değiştirildi. Mikropalaka ölçüm öncesinde 37 °C'deki CO₂'siz inkübatörde 1 saat inkübe edildi.
- Mononükleer kan hücrelerinde gerçekleştirilecek ölçümler için, deney gününde hücrelerin ekileceği mikropalakanın kuyucuklarına 30 µl Poli-D-Lizin (PDL, 50 µg/ml) eklendi. Bu şekilde 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilen mikropalakanın kuyucukları 2 kez distile su ile yıkanarak hücre ekimine hazır hale getirildi. Sağlıklı kontrol veya COVID-19+ hastalara ait hücreler uygun şekillerde çözündürülerek sayıldı ve mikropalakaya her kuyucukta 400.000 hücre olacak şekilde uygun deney besiyeri içerisinde final hacim 180 µl olacak şekilde ekim yapıldı. Mikropalaka ölçüm öncesinde 37 °C'deki CO₂'siz inkübatörde 1 saat inkübe edildi.
- Tüm deneylerde mikropalakanın A1, A12, H1, H12 kuyucukları arkaplan sinyalinin hesaplanabilmesi için boş bırakıldı ve ölçüm günü 180 µl deney besiyeri eklenerek ölçüme hazırlandı.
- Mito Stres Testi için gerekli olan ilaçlar Oligomisin, FCCP, Rotenon&Antimisin A; Glikoliz Stres Testi için gerekli olan ilaçlar Glikoz, Oligomisin ve 2-DG deney planlarına göre sırasıyla kartuştaki portlara yüklendi. MRC5 hücreleri için Oligomisin 2 µM, FCCP 1,5 µM, Rotenon&Antimisin A ise 1 µM olacak şekilde kullanıldı. Mononükleer kan hücreleri için ise Oligomisin 2 µM, FCCP 1 µM, Rotenon&Antimisin A ise 1 µM olacak şekilde kullanıldı. Glikoliz stres testinde her zaman 10 mM Glikoz, 1 µM Oligomisin ve 50 mM 2-DG kullanıldı.

- İlaçların yüklendiği sensör kartuşu, hücre mikropalakaları CO₂'siz inkübatöre kaldırıldıktan 30 dakika sonra kalibrasyonu başlatmak üzere enerji metabolizması ölçüm cihazına yüklendi.
- Kalibrasyon tamamlandıktan sonra ilaçların yüklendiği sensör kartuşu cihazın içinde kalırken kalibrant çözeltisini içeren mikropalaka cihazdan alındı. Bir saatlik inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra CO₂'siz inkübatörde bekleyen hücre kültürü mikropalakası cihaza yüklenerek ölçüm başlatıldı.
- Üç dakika karıştırma, 3 dakika ölçüm döngüsü şeklinde okumalar ve her 3 okuma sonrası planlanmış ilaç enjeksiyonları şeklinde tasarlanan test protokolleri uygulandı.
- Hasta hücreleriyle yapılan deneylerde hücre sayısı ile ilgili gereklilikler ve hücrelerin dondurulması sırasındaki kayıplar nedeni ile her gruptan 15 kişinin mitokondriyal aktivite ölçümleri tamamlanabildi. Glikoliz Stres Testi yalnızca fazla hücre elde edilebilen bireylere ait hücrelerde gerçekleştirildi.
- Deneylerin tasarlanması, sonuçların görüntülenmesi ve analizi için Wave 2.6 programı kullanıldı. Test parametreleri Şekil 5.2'deki formüller ile hesaplandı.



Şekil 5.2 Seahorse test profilleri ve parametre hesaplamalarında kullanılan formüller (BioRender ile oluşturulmuştur.)

5.11 Transmisyon Elektron Mikroskopisi

İki sağlıklı kontrole ve iki akut COVID-19 hastasına ait aynı gün izole edilen mononükleer kan hücreleri 0.1 M kakodilat tamponu (pH 7.4) içinde %2.5 glutaraldehit (Electron Microscopy Sciences) ile 4°C’de 4 saat sabitlendi, 0.1 M kakodilat tamponu içinde yıkandı ve 4°C’de 1 saat boyunca kakodilat tampon içindeki %1 OsO₄ ile tekrar sabitlendi. Hücreler rutin prosedürlerle kurutularak Epon 812’ye (Electron Microscopy Sciences) gömüldü. Elmas bıçakla ultra ince kesitler (60 nm) elde edildi, bakır ızgaralar üzerine monte edilip lantan tuzları, samaryum triasetat ve gadolinyum triasetat (TAAB Laboratories Equipment Ltd) ve Reynolds’un kurşun sitrat karışımı ile boyandı. Numuneler bir FEI NOVA NanoSEM 450 ile incelendi ve

30 kV'da voltajlı Katı Hal Dedektörü kullanılarak STEM modunda görüntüler elde edildi.

5.12 Canlı Hücre Görüntüleme ve Mikroskopi Deneyleri

Projede hücre içi glikoz görüntülemeleri için FLII12PGlu-700 μ 86, Red Glifon Negatif, Red Glifon 300, Red Glifon 3000; ATP görüntülemeleri için mtAT1.03, MaLionG ve Mito-MaLionR, pirüvat görüntülemeleri için Pyronic, laktat görüntülemeleri için Laconic, pH ölçümleri için SypHer3s biyosensörleri kullanıldı. Biyosensörler hücrelerde transfeksiyon yoluyla ifade ettirildi. Transfeksiyon, üreticinin önerilerine göre PolyJet transfeksiyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi (SignaGen Laboratories, Rockville, MD, ABD). Canlı hücre görüntüleme sırasında farklı ilaçları uygulamak ve uzaklaştırmak için özel yapım perfüzyon sistemleri kullanıldı.

Canlı hücre görüntüleme deneyleri için, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 138 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM D-Glikoz içeren (glikozsuz koşullar dışında) ve pH'si 1 M NaOH kullanılarak 7.43'e ayarlanmış HEPES tamponlu fizyolojik bir çözelti kullanıldı. Görüntülemelerin öncesinde, inkübatör dışındaki hücreler, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 138 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM HEPES, 0.44 mM KH₂PO₄, 2.6 mM NaHCO₃, 0.34 mM NaH₂PO₄, 10 mM D-Glikoz, %0.1 MEM Vitaminleri, %0.2 esansiyel amino asitler, 100 μ g/mL Penisilin ve 100 U/mL Streptomisin içeren (pH: 7.43, filtrelenmiş) bir çözeltide muhafaza edildi.

Görüntüleme deneyleri LED ışık kaynağı Colibri 7 (423/44 nm, 469/38 nm, 555/30), Plan-Apochromat 20 $\times$ /0.8 kuru objektif, Plan-Apochromat 40 $\times$ /1.4 yağlı objektif ve monokrom CCD kamera AxioCam 503 ile donatılmış bir Zeiss Axio Observer.Z1/7 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Almanya) mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. Kırmızı floresan emisyonu, FT570 (BS) ve 605/70 emisyon filtresi kombinasyonları kullanılarak toplandı. Yeşil floresan içeren hücreler 495 nm dalga boyu ile uyarıldı ve emisyon BP 525/50 kombinasyonu ile toplandı. CFP/YFP FRET sensörleri 430 nm dalga boyunda uyarıldı; emisyon, optik ışın ayırıcı kullanılarak aynı anda 535 nm ve 480 nm'de toplandı. SypHer biyosensöründen gelen sinyaller, ışın ayırıcı ile donatılmış motorize ikili filtre çarkı (FT455 (SypHer düşük, F420 için) ve FT495 (SypHer yüksek, F490) için) ile uyarılarak görüntülendi. Emisyonu toplamak

için ise BP 525/50 filtre kullanıldı. Veri toplama ve mikroskop kontrolü, Zen Blue 3.1 yazılımı (Zeiss, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi.

5.13 İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesi GraphPad Prism yazılımı sürüm 10.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirdi. İki grup arasındaki istatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için bağımsız örneklem t testi veya Mann-Whitney U testi kullanıldı. Çoklu parametrelerin karşılaştırması, Oneway ANOVA ve post-hoc Tukey ya da Kruskal Wallis ve ikili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Veriler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Biyokimyasal verilerin BHİ üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla çoklu regresyon analizi uygulandı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

5.14 Kullanılan Malzemeler

Tablo 5.1 Kullanılan Malzeme Listesi

Sarf Malzeme	Firma	Katalog Numarası
BD Vacutainer™ K2-Edta Tubes	BD	367525
Lymphoprep	Stemcell Tech.	07851
DPBS 1X	Gibco	14190094
RPMI 1640 1X (with Phenol Red)	Gibco	52400025
FBS	Gibco	F4135
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco	15140122
Poly-D- Lysine	Sigma	P7280
Seahorse XFe96 FluxPak	Agilent	102416-100
Seahorse XF Calibrant Solution	Agilent	103059-000
XF DMEM Medium	Agilent	103335-100
L-Glutamine (200 mM)	Sigma	A2916801
Sodyum Pirüvat Solüsyonu	Sigma	S8636
Glikoz Solüsyonu	Agilent	103577-100
Oligomisin	Sigma	O4876
FCCP	Sigma	C2920
Rotenon	Sigma	R8875
Antimisin A	Sigma	A8674
Seahorse XF Glikoliz Stres Test Kiti	Agilent	103020-100
PolyJet	Signagen	SL100688
Polibren	Sigma	TR-1003
DMSO	Thermo Scientific	TS-20688
Tripan Mavisi Çözeltilisi, 0.4%	Gibco	15250061
PolyJet	PAN-Biotech	
D (+) Glikoz	Multicell	600-035 LG
HEPES	Genaxxon	M6370.1000
Sodyum Klorür	Merck	1064041000
Potasyum Klorür	PA	12-005-1B

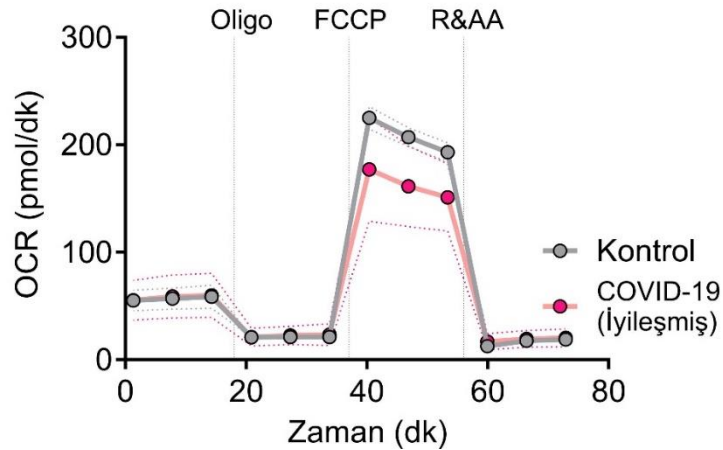
Magnezyum Klorür	neoFroxx	LC-5041.4
Kalsiyum Klorid	neoFroxx	1186GR500
Sodyum Hidroksit	neoFroxx	1180KG001
Yuvarlak Lamel, No:1, 30 mm	Glaswarenfabrik Karl Knecht	C911500
Trypsin-EDTA (0.25%)	Thermo Fisher	25200056
pHmetre	HannaLab	HI11102
Hemositometre (Neubauer Imp.)	Isolab	075.03.001



6. BULGULAR

6.1. Ön Çalışma Sonuçları: COVID-19 Geçirip İyileşen Bireylerin Kan Hücre Metabolizmalarının İncelenmesi

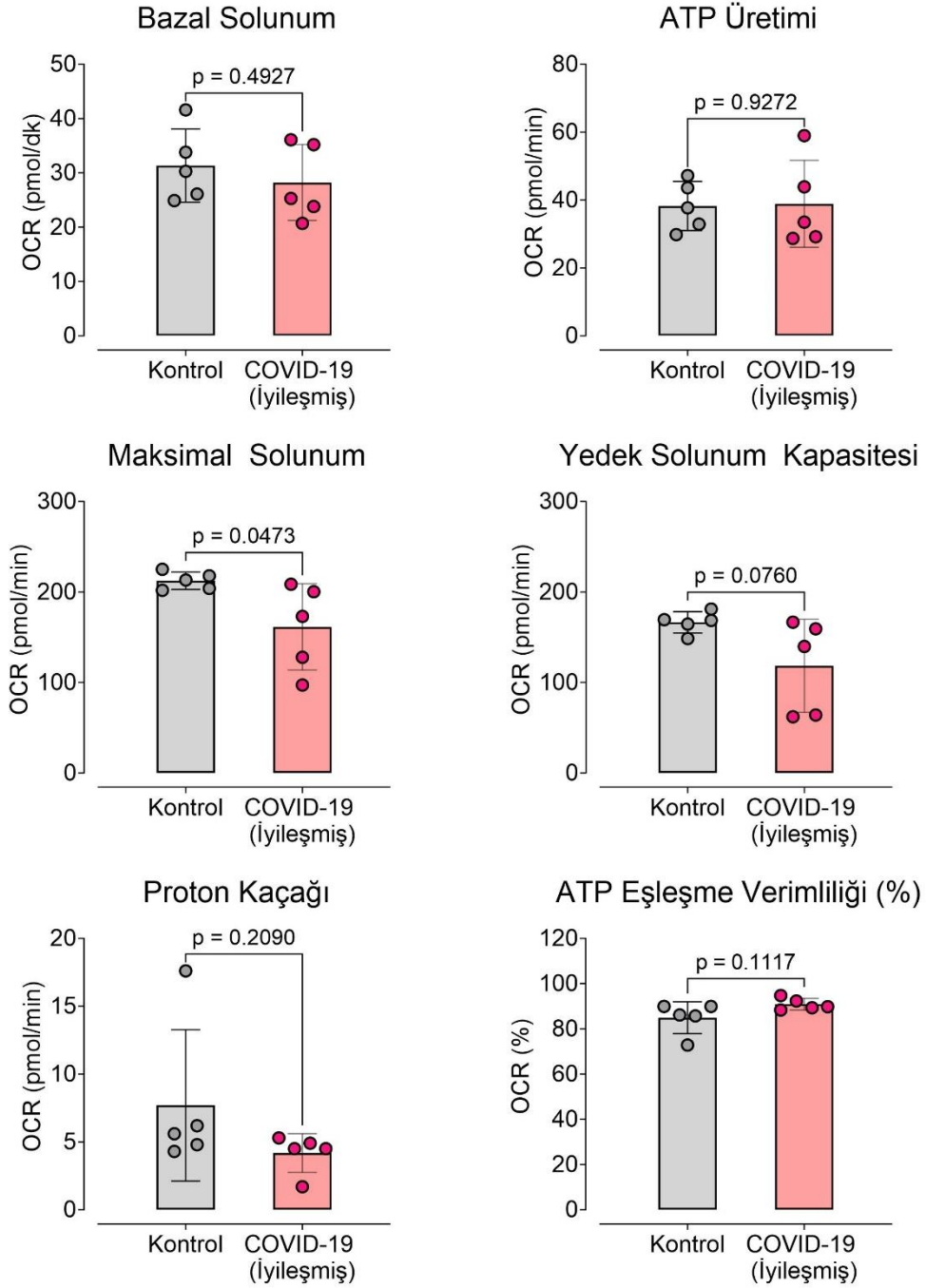
Tez çalışması kapsamında hastaneden akut SARS-CoV-2 pozitif hasta örneği toplama aşamasına geçilmeden önce COVID-19'un mononükleer kan hücrelerinin metabolizmasında kalıcı etkilerinin olup olmadığını incelemek için yapılan ilk ön çalışmanın sonuçları Şekil 6.1.1 ve 6.1.2'de sunulmuştur. Daha önce hiç SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirmemiş 5 sağlıklı erkek kontrol ve son 3 ay içerisinde semptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirip en az bir ay önce iyileşmiş 5 erkek bireyden alınan kanlardan izole edilen mononükleer kan hücrelerinin metabolizma ölçümleri Mito Stres Testi uygulanarak gerçekleştirilmiş, grupların genel test profili Şekil 6.1.1'de gösterilmiştir. İki gruba ait test profillerindeki temel farklılaşmanın maksimal solunumu gösteren FCCP enjeksiyonundan sonra olduğu görülmüştür.



Şekil 6.1.1 Sağlıklı kontrol (n=5) ve COVID-19 geçirip iyileşmiş bireylere (n=5) ait mononükleer kan hücrelerinde gerçekleştirilen Mito Stres testinin genel profili. (Renkli kalın çizgiler grupların ortalamalarını kesikli çizgiler standart sapmayı göstermektedir.)

Şekil 6.1.1'deki profiller üzerinden hesaplanan mitokondriyal aktivite parametrelerinin karşılaştırma grafikleri ise Şekil 6.1.2'de gösterilmiştir. COVID-19 geçirip iyileşen bireylerin maksimal solunumlarının sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p=0,0473$).

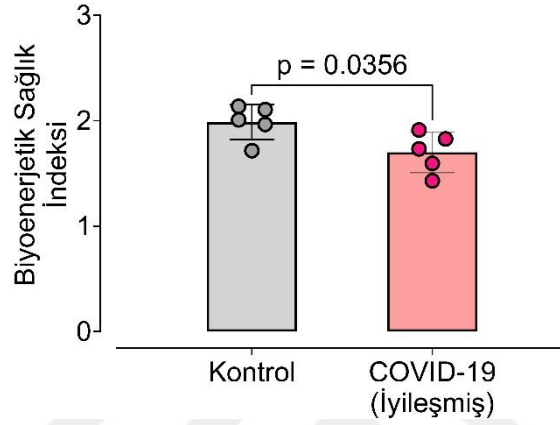
Bireylere ait hücrelerin bazal solunum, ATP üretimi, yedek solunum kapasitesi, proton kaçağı ve ATP eşleşme verimliliği parametreleri arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 6.1.2 COVID-19 geçirip iyileşmiş bireylere (n=5) ait mononükleer kan hücrelerinde ölçülen mitokondriyal aktivite parametrelerinin sağlıklı kontroller (n=5) ile kıyaslanması.

(İstatistiksel değerlendirmede Bağımsız örneklemelerde t testi kullanılmıştır.)

Mito Stres Testi parametrelerinden yedek solunum kapasitesi, ATP üretimi, mitokondriyal olmayan solunum ve proton kaçağı verileri kullanılarak BHİ hesaplandığında, bu indeksin hastalığı geçiren bireylerde istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p=0,0356$). Bu kıyaslama Şekil 6.1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 6.1.3 COVID-19 geçirip iyileşmiş bireyler (n=5) ve sağlıklı kontrollerin (n=5) BHİ değerlerinin kıyaslanması.
(İstatistiksel değerlendirmede Bağımsız örneklemelerde t testi kullanılmıştır.)

6.2 Çalışmaya Dahil Edilen Bireylerin Genel Özellikleri

Çalışmanın hasta örnekleri ile gerçekleştirilen ana basamağında yeterli sayıda hücre elde edilebilen 15 sağlıklı kontrol ve 15 akut COVID-19 hastasına ait hücrelerin ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tüm katılımcılar erkek olup bazı demografik ve antropometrik bilgileri Tablo 6.2.1'deki gibidir.

Çalışmaya dahil edilen 15 kişilik kontrol grubunun yaş ortalaması $37,7 \pm 12,2$ yıl iken hasta grubunun yaş ortalaması $43,5 \pm 13,2$ yıldır. Gruplar arasında yaş, boy uzunluğu, vücut ağırlığı, Beden Kütle İndeksi (BKİ) gibi parametreler açısından istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p > 0,05$). Her iki gruptaki bireylerin de bilinen kronik hastalığı mevcut değildir. COVID-19 grubundaki bireylerin 11'i iyileşirken, 4 kişinin hastalığı ölüm ile sonuçlanmıştır.

Tablo 6.2.1. Katılımcılara ait genel özellikler

Tanıtıcı Özellikler	Grup		p ^a
	Kontrol (n=15) X $\pm$ SS	COVID-19 (n=15) X $\pm$ SS	
Yaş (yıl)	37,7 $\pm$ 12,2	43,5 $\pm$ 13,2	0,227
Vücut Ağırlığı (kg)	79,9 $\pm$ 16,3	85,2 $\pm$ 19,8	0,344
Boy Uzunluğu (cm)	176 $\pm$ 8	179 $\pm$ 7	0,707
Beden Kütle İndeksi (kg/m ²)	25,2 $\pm$ 3,8	26,5 $\pm$ 4,9	0,420
Kronik Hastalık Sayısı	-	-	-
Akut Semptom Sayısı	-	3,7 $\pm$ 1,5	-
Ölüm Sayısı	-	4	-

a: Bağımsız örneklemelerde t testi

6.3. Katılımcıların Biyokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen bireylerin serum örneklerinde gerçekleştirilen biyokimyasal analizlerin sonuçları Tablo 6.3.1’de sunulmuştur. COVID-19 grubunun açlık kan glikoz düzeyleri ($109,5 \pm 41,3$ mg/dl), kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,0414$). Total protein ve albümin düzeyleri ise kontrol grubuna kıyasla COVID-19 grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşüktür ($p<0,001$).

Tablo 6.3.1. Katılımcılara ait biyokimyasal bulgular

Biyokimyasal Parametreler	Grup			p ^a
	Referans Aralığı	Kontrol (n=15)	COVID-19 (n=15)	
Glikoz (mg/dl)	70-100	$85,5 \pm 14,0$	$109,5 \pm 41,3$	0,0414*
Total Protein (g/dl)	6,6-8,3	$7,0 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,7$	<0,0001*
Albumin (g/dl)	3,5-5,2	$4,3 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,5$	<0,0001*
Trigliserit (mg/dl)	35-150	$126,2 \pm 40,2$	$142,3 \pm 62,6$	0,4084
Total Kolesterol(mg/dl)	120-200	$151,6 \pm 23,3$	$152,3 \pm 47,0$	0,9584
HDL (mg/dl)	40-60	$32,6 \pm 7,0$	$24,7 \pm 4,3$	0,0008*
LDL (mg/dl)	<100	$96,3 \pm 25,3$	$113,1 \pm 33,2$	0,1301
AST (IU/L)	0-35	$28,7 \pm 9,3$	$58,1 \pm 40,0$	0,0096*
ALT (IU/L)	0-45	$22,7 \pm 4,4$	$47,6 \pm 16,3$	<0,0001*
Üre (mg/dl)	10-20	$10,2 \pm 2,9$	$12,4 \pm 2,9$	0,0483*
Kreatinin (mg/dl)	0,5-1,2	$0,90 \pm 0,13$	$1,02 \pm 0,1$	0,0101*
LDH (U/L)	0-248	$171,1 \pm 39,8$	$332,4 \pm 116,1$	<0,0001*
CRP (mg/L)	0-5	$1,09 \pm 0,60$	$40,1 \pm 29,9$	<0,0001*

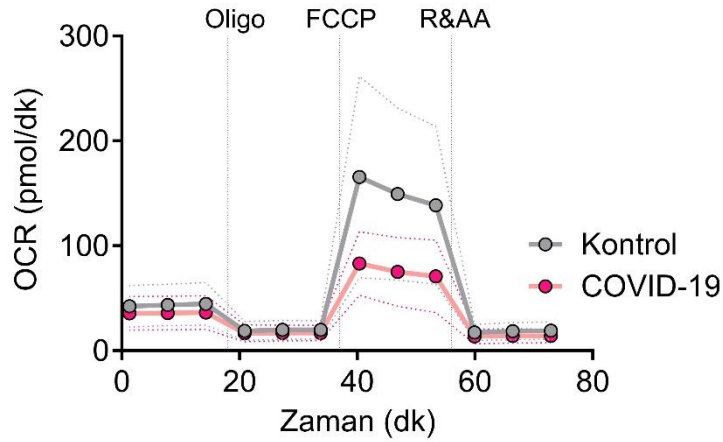
a: Bağımsız örneklerde t testi

Katılımcıların total kolesterol, trigliserit, HDL ve LDL düzeyleri incelendiğinde, yalnızca HDL düzeyleri açısından farklılık olduğu; kontrol grubunun HDL düzeylerinin ($32,6 \pm 7,0$ mg/dl), COVID-19 grubundan ($24,7 \pm 4,3$ mg/dl) daha

yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,0008$). COVID-19 grubunda AST ve ALT değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,01$). Üre, kreatinin, LDH ve CRP düzeylerinin de COVID-19 grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

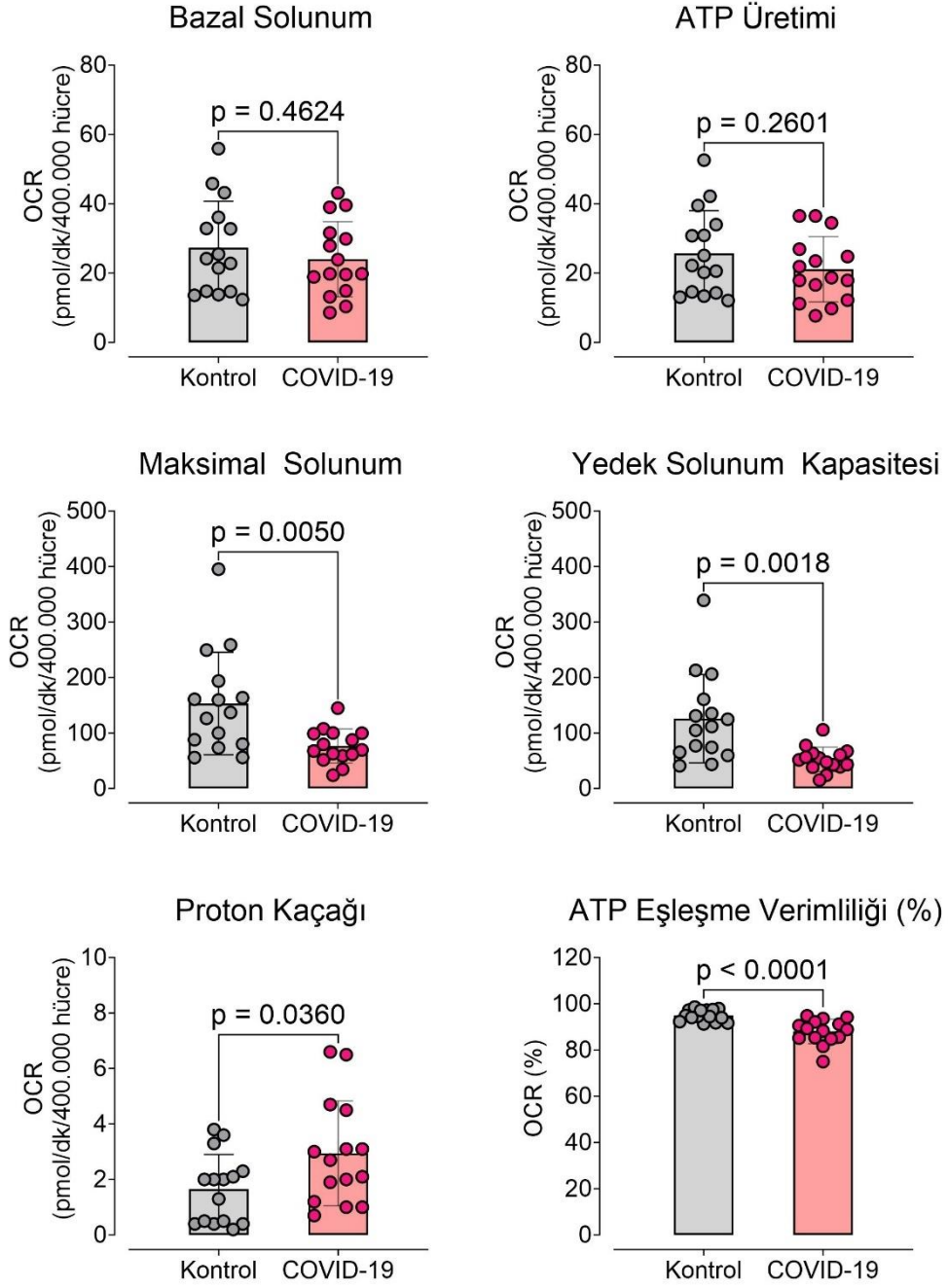
6.4 Akut COVID-19'un Mitokondriyal Aktivite Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının bu bölümünde, daha önce hiç SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirmemiş 15 sağlıklı erkek kontrol ve akut COVID-19 nedeniyle hastanede yatan 15 erkek bireyden alınan kanlardan izole edilen mononükleer kan hücrelerinin metabolizma ölçümleri Mito Stres Testi uygulanarak gerçekleştirilmiş, grupların genel test profili Şekil 6.4.1'de gösterilmiştir. Ön çalışmada iyileşen hastalarda yapılan teste benzer şekilde, bu bölümde de gruplar çoğunlukla FCCP enjeksiyonu sonrasında ayrılmıştır.



Şekil 6.4.1 Sağlıklı kontrol (n=15) ve akut COVID-19 hastalarına (n=15) ait mononükleer kan hücrelerinde gerçekleştirilen Mito Stres testinin genel profili. (Renkli kalın çizgiler grupların ortalamalarını kesikli çizgiler standart sapmayı göstermektedir.)

Bu ölçümler üzerinden hesaplanan mitokondriyal aktivite parametrelerinin karşılaştırma grafikleri Şekil 6.4.2'de gösterilmiştir.

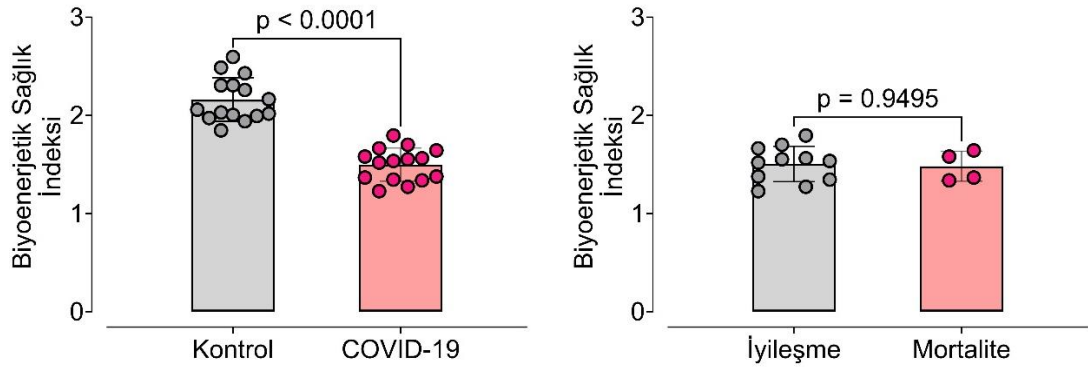


Şekil 6.4.2 Sağlıklı kontrollere (n=15) ve akut COVID-19 hastalarına (n=15) ait mononükleer kan hücrelerinde ölçülen metabolik parametrelerin kıyaslanması. (İstatistiksel değerlendirmede Bağımsız örneklemelerde t testi kullanılmıştır.)

Gruplara ait mitokondriyal aktivite parametreleri incelendiğinde, bazal solunum ve ATP üretimi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). COVID-19 grubunun maksimal solunum düzeyi ($76,5 \pm 30,9$

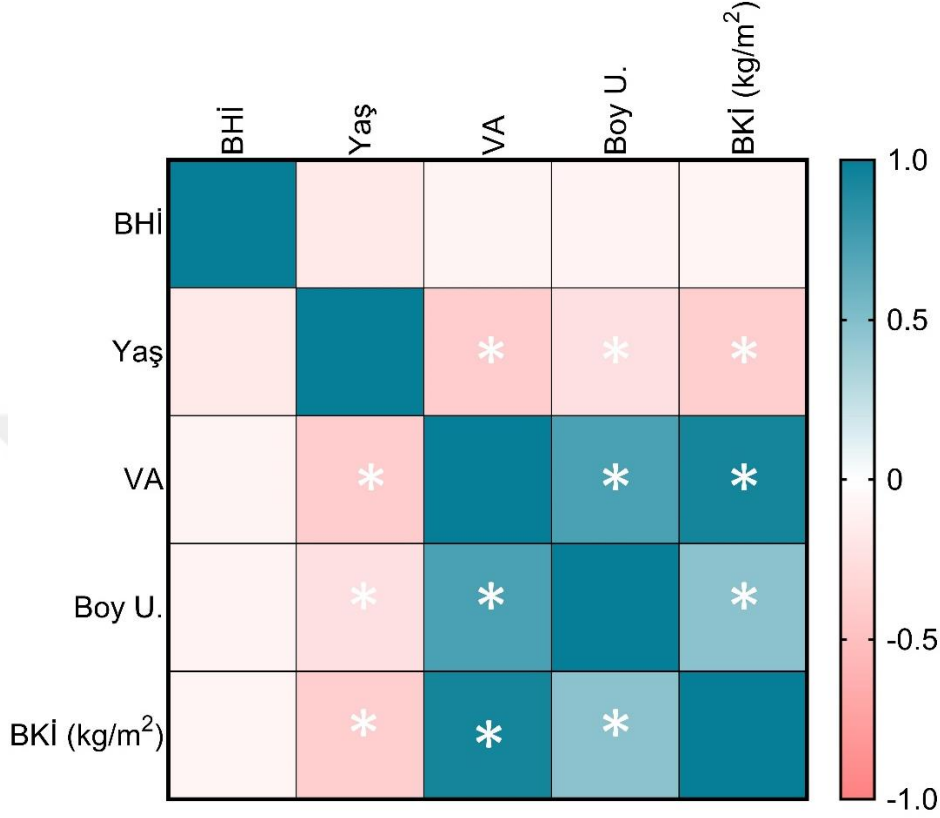
pmol/dk), kontrol grubuna ($153,2 \pm 92,4$ pmol/dk) kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p=0,005$). Bu düzeyle bağlantılı olarak yedek solunum kapasitesi de COVID-19 grubunda ($52,5 \pm 21,9$ pmol/dk), kontrol grubundan ($125,8 \pm 79,6$ pmol/dk) anlamlı olarak daha düşüktür ($p=0,0018$). Proton kaçağının ise COVID-19 grubunda anlamlı olarak yükseldiği görülmüştür ($p=0,036$).

Bu değişikliklerin BHİ'ye nasıl yansıdığı incelenmiş, sonuçlar Şekil 6.4.3'te sunulmuştur. COVID-19 grubundaki tüm hastalara ait BHİ'ler kontrol grubundan daha düşük çıkmıştır. Kontrol grubunun BHİ ortalaması ($2,16 \pm 0,22$), COVID-19 grubundan ($1,49 \pm 0,17$) anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). COVID-19 grubu içerisinde hastaların prognozuna göre bir karşılaştırma yapıldığında, hastalıkları iyileşme ile sonuçlanan grup ($1,51 \pm 0,18$) ile mortalite ile sonuçlanan grup ($1,48 \pm 0,15$) arasında BHİ değerleri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir.



Şekil 6.4.3 Sağlıklı kontrol (n=15) ve akut COVID-19 hastalarının (n=15) Biyoenerjetik Sağlık İndekslerinin kıyaslanması. (İstatistiksel değerlendirmede grafik sırasıyla bağımsız örneklemelerde t testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

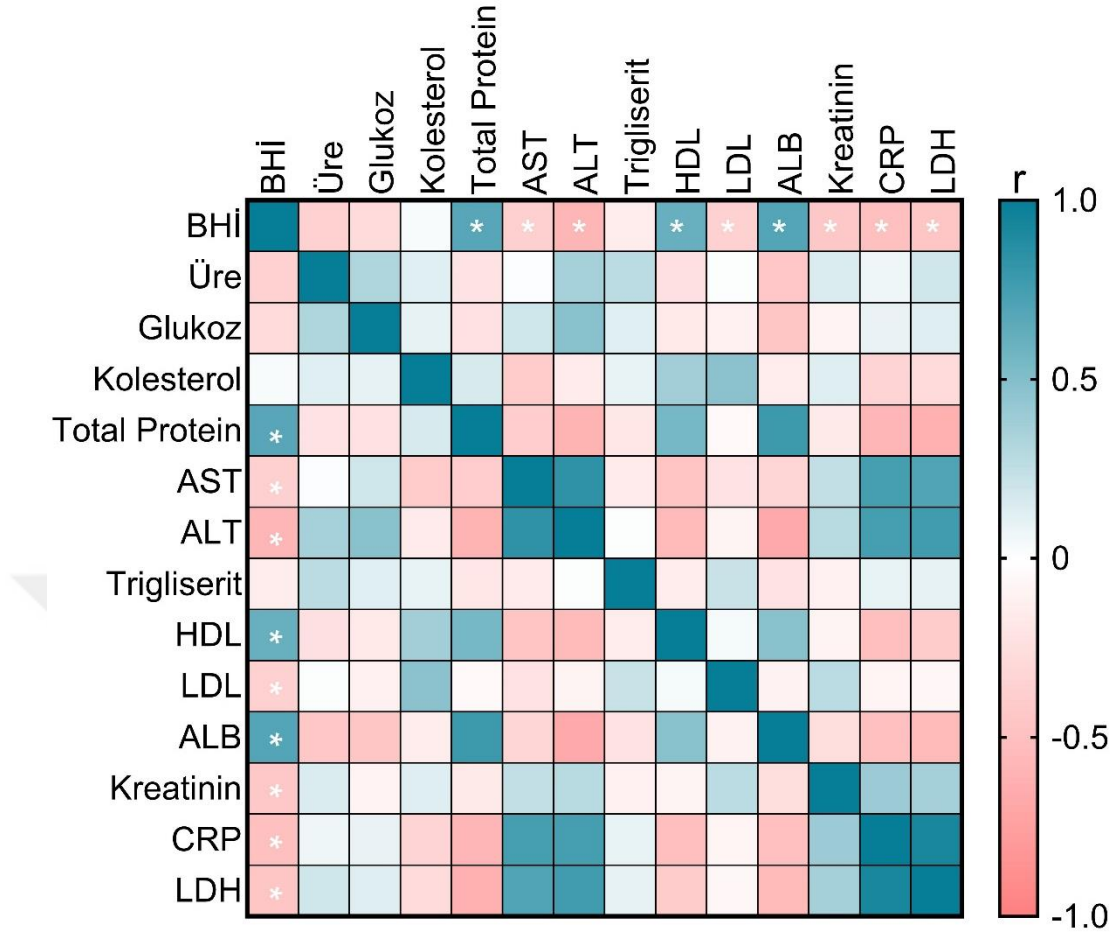
6.5 Biyoenerjetik Sağlık İndeksinin Farklı Değişkenler ile Korelasyonunun Değerlendirilmesi



Şekil 6.5.1 BHI ile Demografik ve Antropometrik Değişkenler Arasındaki Korelasyon Matrisinin Isı Haritası

Pearson korelasyon testi kullanılmıştır. Isı haritasının sol tarafındaki çubuk, Pearson korelasyon katsayılarının (r) renk göstergesini belirtmektedir. p değeri <0,05 olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiş ve karelerin içindeki * işareti ile gösterilmiştir. BHI: Biyoenerjetik Sağlık İndeksi VA: Vücut ağırlığı Boy U: Boy Uzunluğu BKİ: Beden Kütle İndeksi

Şekil 6.5.1’de BHI ile yaş ve antropometrik ölçümler arasındaki korelasyon incelenmiştir. BHI’nin katılımcıların sağlıklı veya hasta olmasından bağımsız olarak yaş ve BKİ ile ilişkisi olup olmadığı incelendiğinde, hafif düzeyde negatif bir eğilim olsa da anlamlı bir korelasyon görülmemiştir ($p>0,05$). Aynı şekilde bireylerin vücut ağırlığı ve BKİ gibi antropometrik ölçümleri ile BHI’leri arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

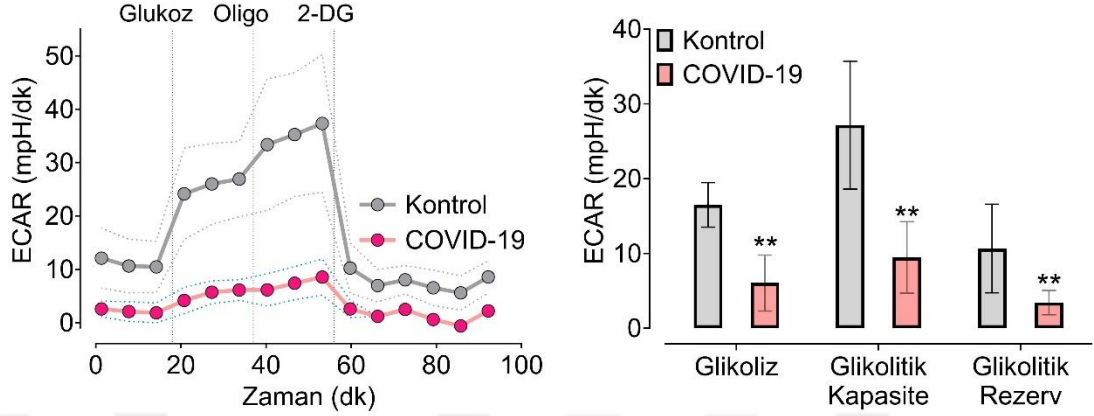


Şekil 6.5.2 BHİ ile Biyokimyasal Parametreler Arasındaki Korelasyon Matrisinin Isı Haritası

Pearson korelasyon testi kullanılmıştır. Isı haritasının sol tarafındaki çubuk, Pearson korelasyon katsayılarının (r) renk göstergesini belirtmektedir. p değeri <0,05 olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiş ve yalnızca BHİ'nin diğer parametrelerle olan anlamlı ilişkileri karelerin içindeki * işareti ile gösterilmiştir. BHİ: Biyoenerjetik Sağlık İndeksi AST: Aspartat Aminotransferaz, ALT: Alanin Aminotransferaz, HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein, LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein, ALB: Albumin, CRP: C-Reaktif Protein, LDH: Laktat dehidrojenaz

BHİ'nin biyokimyasal parametrelerle olan korelasyonu şekil 6.5.2'deki ısı haritasında gösterilmiştir. BHİ total protein, HDL ve albümin değerleri ile pozitif yönde orta düzeyde korelasyon gösterirken AST, ALT, LDL, Kreatinin, CRP ve LDH değerleriyle negatif yönde korelasyon göstermiştir ($p < 0,05$). BHİ ile açlık kan glikozu arasında ise anlamlı korelasyon bulunmamaktadır ($p > 0,05$). Yapılan çoklu regresyon analizinde ise, sadece LDL'nin BHİ üzerinde negatif yönde anlamlı bir etkisinin olduğu bulunmuştur ($R^2: 0,781$, LDL: $\beta = -0,005204$, $p = 0,0122$).

6.6 Akut COVID-19'un Glikolitik Aktivite Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi



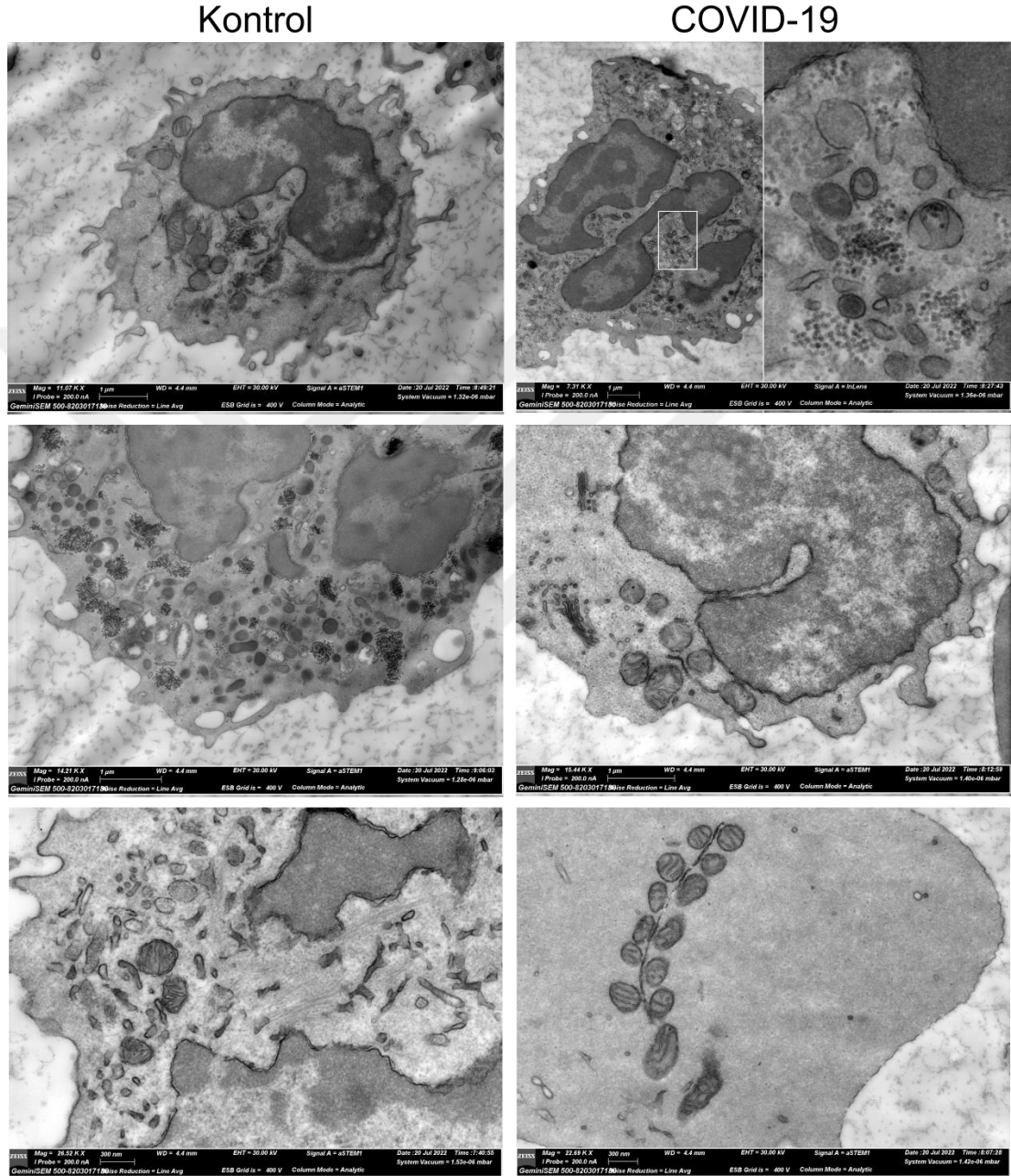
Şekil 6.6.1 Sağlıklı kontrol (n=5) ve akut COVID-19 hastalarına (n=5) ait mononükleer kan hücrelerinde gerçekleştirilen Glikoliz Stres testinin genel profili ve glikolitik parametrelerin kıyaslaması. (İstatistiksel değerlendirmede Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

Mononükleer kan hücrelerinin glikolitik aktivitelerini kıyaslamak için, kontrol ve COVID-19 grubundan 5'er hastanın hücrelerinde Glikoliz Stres Testi uygulanmış ve sonuçları Şekil 6.6.1'de sunulmuştur. COVID-19 grubunun glikolitik profillerinin kontrol grubundan oldukça farklı olduğu; bazal glikoliz, glikolitik kapasite ve glikolitik rezervin COVID-19 grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan daha düşük olduğu belirlenmiştir.

6.7 Akut COVID-19'un Mitokondri Morfolojisi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol karşılaştırmaları yapılan mitokondriyal aktivite ölçüm deneylerini desteklemesi amacıyla geçirimli elektron mikroskopisi kullanılarak akut COVID-19 hastalarının ve sağlıklı kontrollerin hücrelerindeki mitokondri morfolojilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. 2 akut hasta ve 2 sağlıklı kontrolden aynı gün içerisinde izole edilen mononükleer kan hücreleri sabitlenip takipleri yapılarak

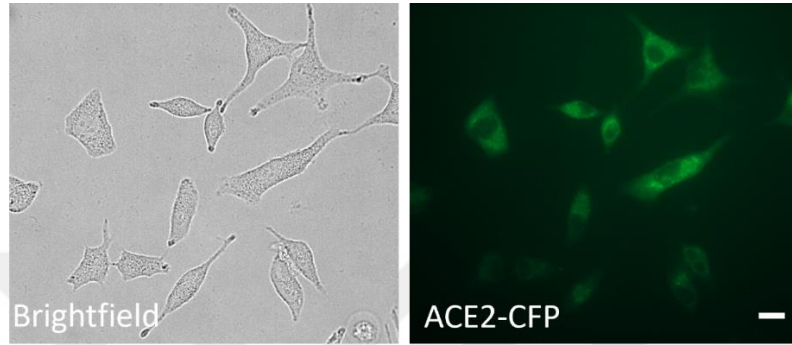
görüntülemeler gerçekleştirilmiştir. Ancak elde edilen görüntüler mitokondri morfolojilerini karşılaştırmak için yeterli kalitede olmamıştır.



Şekil 6.7.1 Sağlıklı kontrol (n=2) ve akut COVID-19 hastalarının (n=2) mononükleer kan hücrelerine ait temsili elektron mikroskobu görüntüleri.

6.8 Serum ve Pseudovirüs Müdahaleleri İçin Hücre Modeli Geliştirilmesi

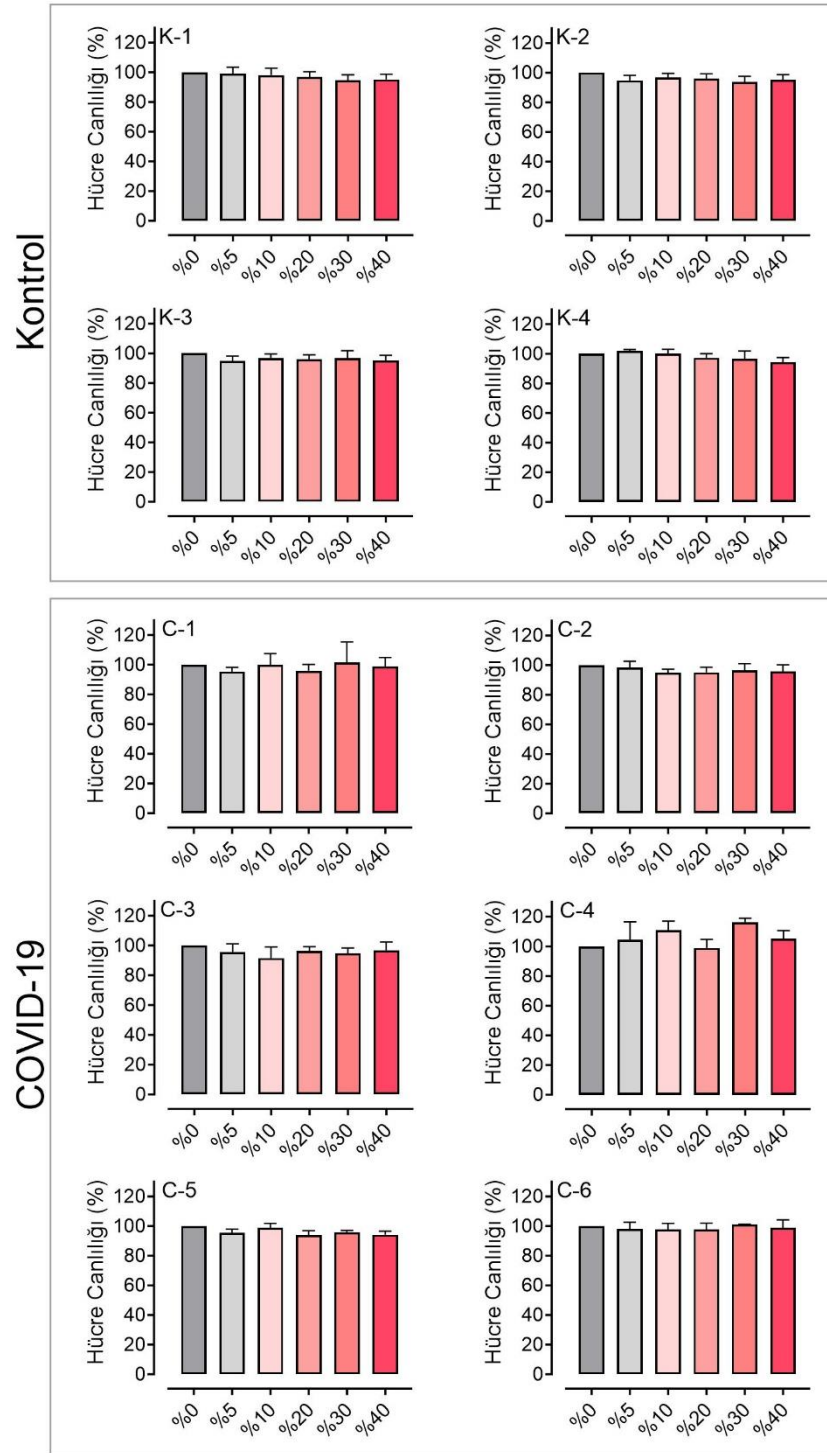
Şekil 6.8.1’de serum ve pseudovirüs denemeleri için CFP işaretli ACE2 ekspresyonu indüklenerek Floresan Destekli Hücre Ayırma (FACS) ile seçilip stabil hale getirilmiş insan akciğer fibroblast kökenli olan MRC-5+ACE2 hücrelerinin temsili fotoğrafı gösterilmiştir.



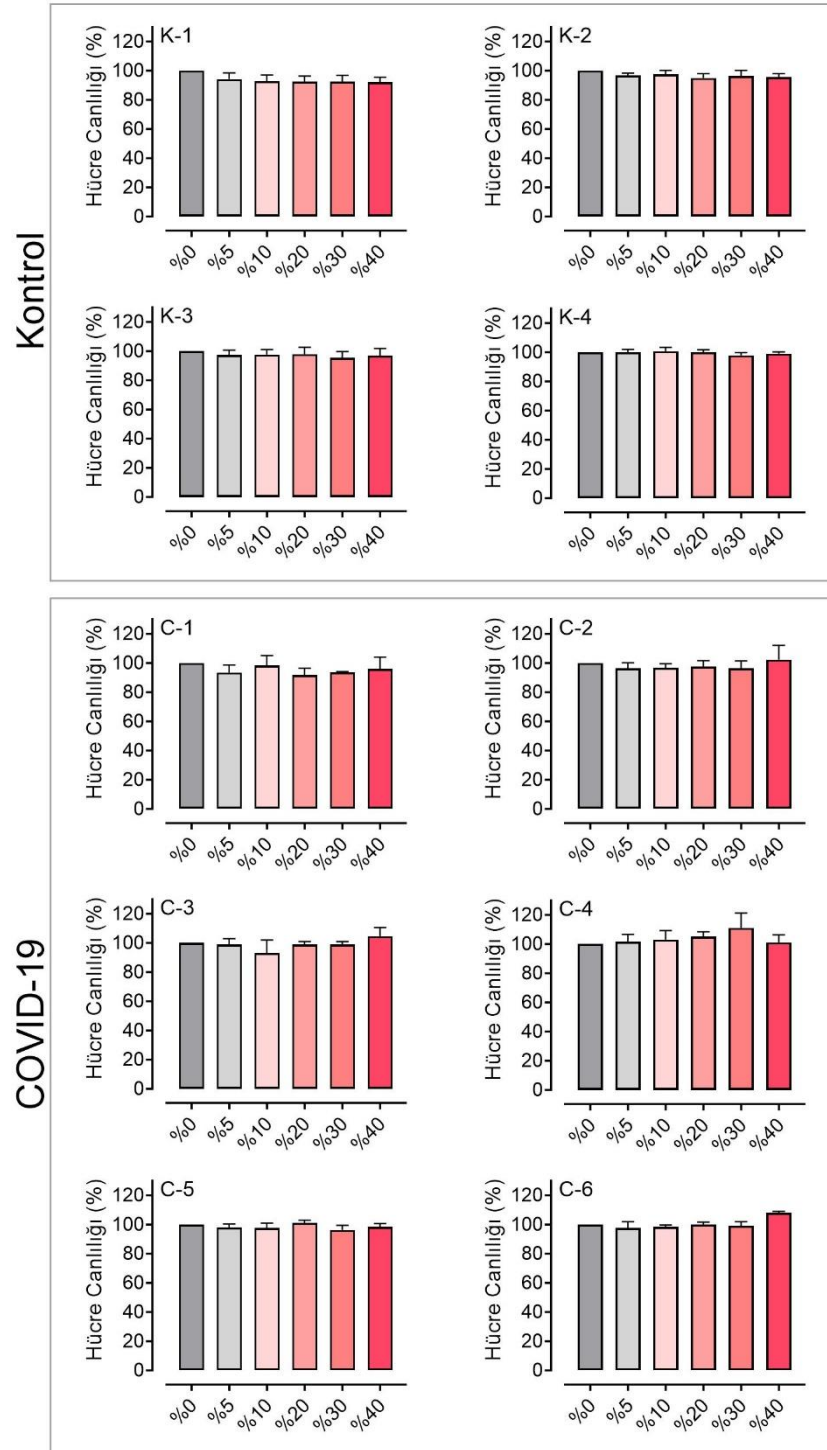
Şekil 6.8.1 MRC-5+ACE2 hücrelerinin temsili mikroskop görüntüleri. (Ölçek çizgisi: 20 μ M).

6.9 MRC-5 Hücrelerinde Hasta ve Kontrol Serumlarının Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının hedeflerinden biri uygun bir hücre hattı modeli geliştirilerek hasta ve sağlıklı bireylere ait serumların ve laboratuvar koşullarında üretilen yapısal olarak SARS-CoV-2 benzeri ancak hastalık oluşturmeyen, Spike proteini taşıyan bir pseudovirüsün hücrelere verilmesinin sitotoksik ve metabolik etkilerinin incelenmesiydi. Bu doğrultuda ilk olarak MRC-5 WT ve ACE2 ekspresyonu arttırılan MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde serum müdahaleleri uygulanarak sitotoksisite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.9.1 ve 6.9.2’te görüldüğü üzere sağlıklı kontrollere ve COVID-19 hastalarına ait serumlar ACE2 ekspresyonu arttırılan hücrelerde de kontrol MRC-5 WT hücrelerinde de sitotoksik etki göstermemiştir.

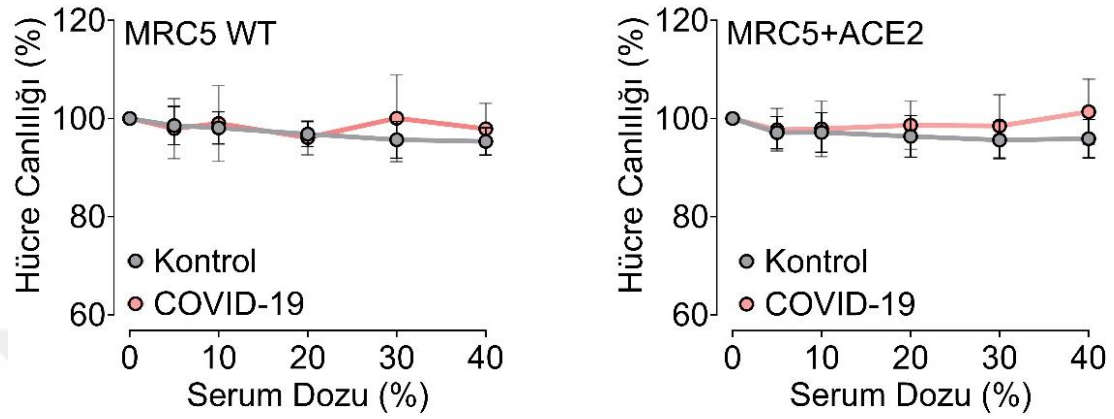


Şekil 6.9.1 Sağlıklı kontrollere (K) ve COVID-19+ hastalara (C) ait serumların MRC-5 WT hücrelerinin canlılığına etkisi.



Şekil 6.9.2 Sağlıklı kontrollere (K) ve COVID-19+ hastalara (C) ait serumların MRC-5+ACE2 hücrelerinin canlılığına etkisi.

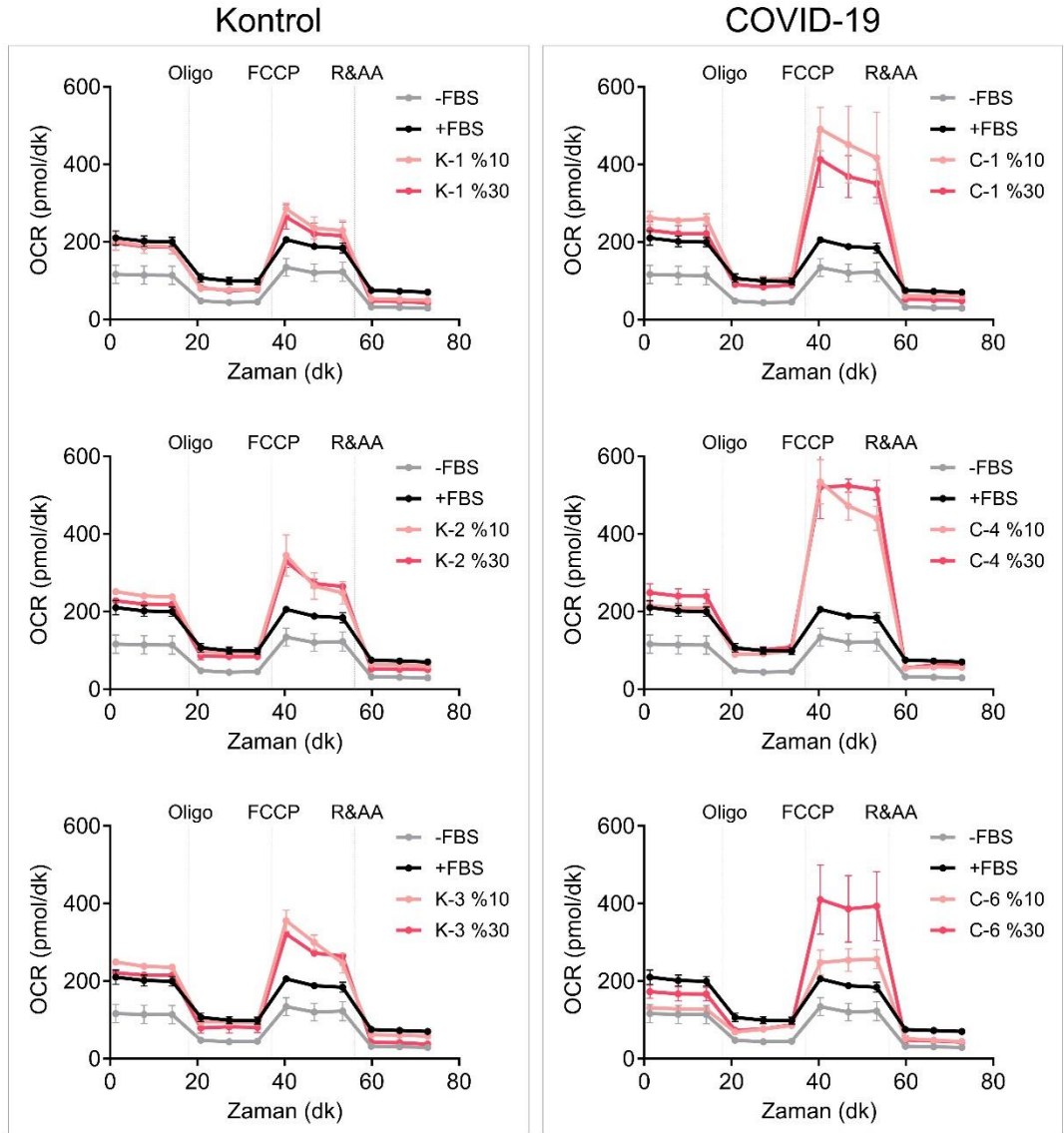
Tüm grupların ortalamaları alınarak hazırlanan grafikler Şekil 6.9.3'te gösterilmiştir. Serumların gösterdiği sitotoksik etki açısından MRC-5 WT ve MRC-5+ACE2 grupları arasında fark gözlenmemiştir.



Şekil 6.9.3 Sağlıklı kontrollere ve COVID-19+ hastalara ait serumların MRC-5 WT ve MRC-5+ACE2 hücrelerinin canlılığına etkisinin genel profili.

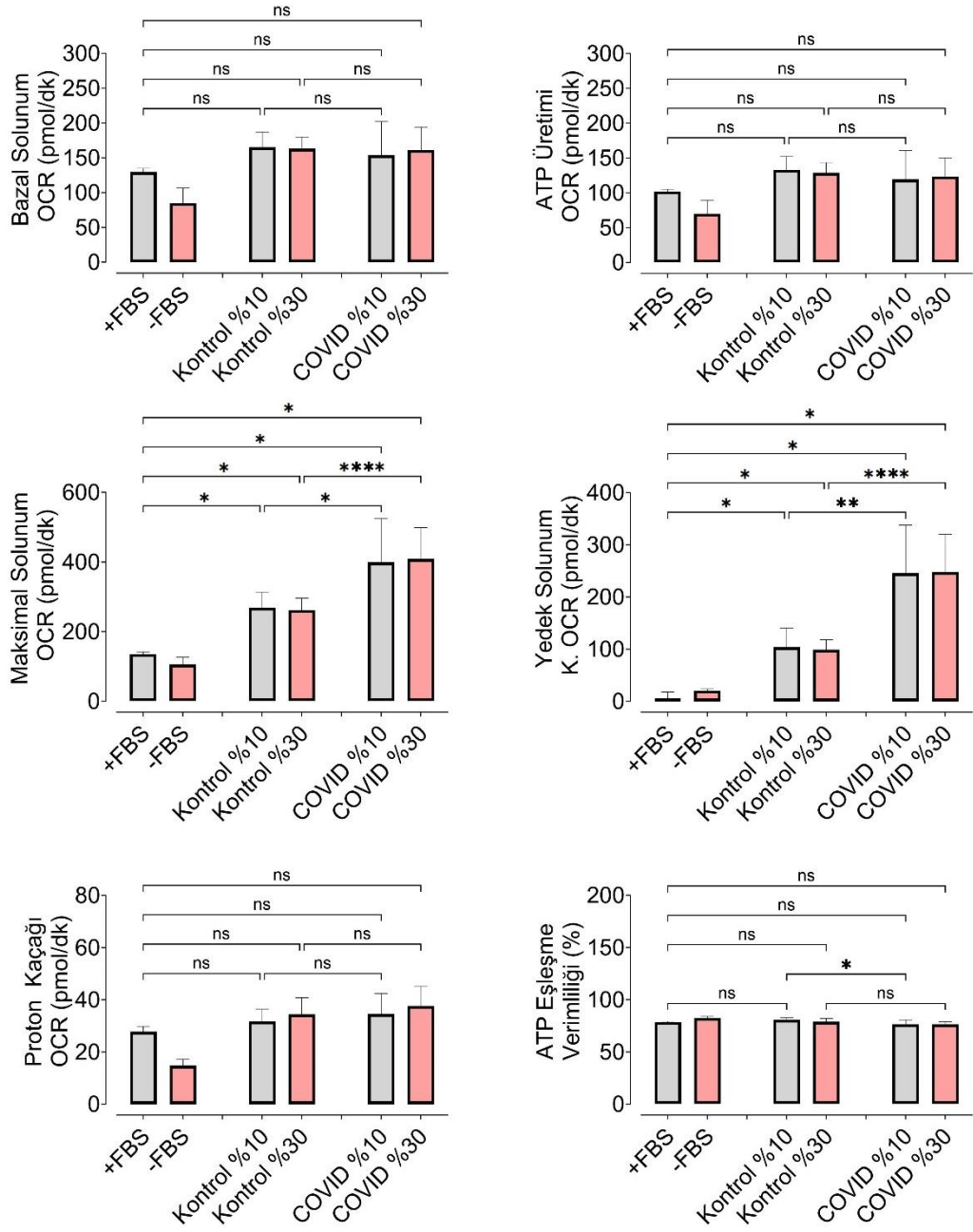
6.10 Serum Uygulamalarının MRC-5+ACE2 Hücrelerinin Mitokondriyal Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sitotoksisite deneylerinin ardından, sağlıklı kontrollere ve COVID-19 hasta grubuna ait serumların MRC-5+ACE2 hücre modelinin mitokondriyal aktivitesi üzerindeki etkileri Mito Stres Testi ile araştırılmıştır. Serum miktarları kısıtlı olduğundan iki doz tercih edilmiş, MRC-5+ACE2 hücrelerine 48 saat boyunca %10 ve %30 oranında hasta veya kontrol serumları uygulanmıştır. Her iki gruba ait serumların bireysel etkileri Şekil 6.10.1'de gösterilmiştir. Kontrol ve hasta serumu eklenirken besiyerinden FBS çıkarıldığı için hem FBS içeren hem de FBS içermeyen besiyerinde bırakılan kontrol grupları kullanılmıştır. Serumların etkilerinde bireysel farklılıklar olduğu görülmüştür. Ancak özellikle FCCP enjeksiyonu sonrasında COVID-19 grubunun profillerinde kontrol grubundan ayrışma olduğu görülmektedir.



Şekil 6.10.1 MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde 48 saatlik sağlıklı kontrol (K, n=3) ve COVID-19+ hasta (C, n=3) serumu müdahalelerinin Mito Stres Testi profiline etkileri.

Bu grafikler üzerinden hesaplanan mitokondriyal aktivite parametrelerinin karşılaştırmaları ise Şekil 6.10.2’de gösterilmiştir.



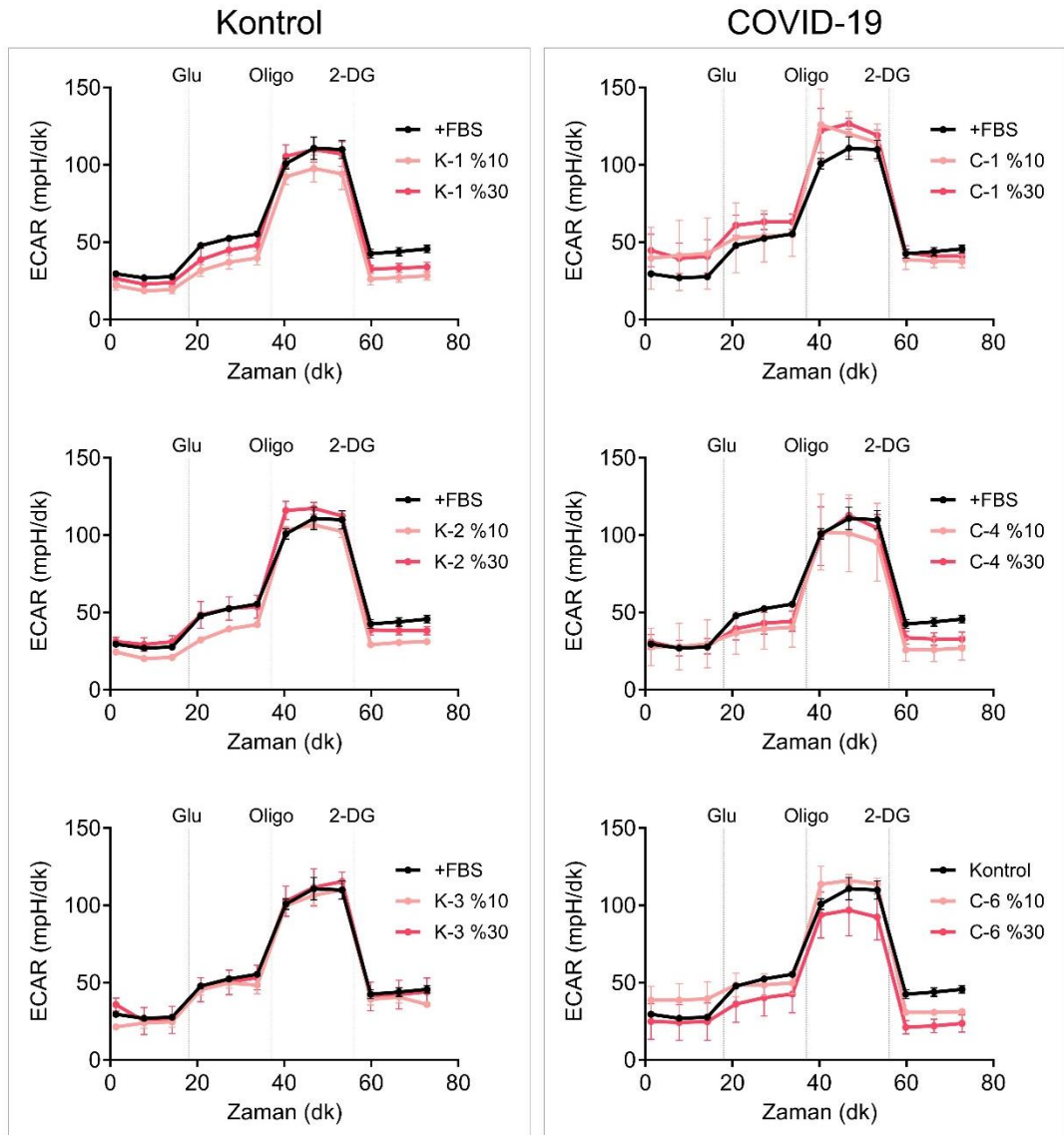
Şekil 6.10.2 MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde 48 saatlik sağlıklı kontrol (K, n=3) ve COVID-19+ hasta (C, n=3) serumu müdahalelerinin mitokondriyal aktivite parametrelerine etkileri. (İstatistiksel değerlendirmede Kolmogorov Smirnov ve ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

Kontrol ve COVID-19 hastalarına ait serumların %10 ve %30 oranında kullanıldığı grupların hepsi +FBS grubuyla ayrı olarak ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Her iki gruba ait serumlar bazal solunum ve ATP üretimi parametreleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılık oluşturmamıştır. Tüm grupların maksimal solunumu ve yedek solunum kapasitesi serum müdahaleleri sonrasında +FBS grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,05$). COVID-19 grubuna ait serumlar hem %10 hem de %30 dozunda kullanıldığında kontrol serumlarına kıyasla maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesi üzerinde daha fazla artışa neden olmuştur ($p<0,05$). Dozlar arasında ise anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).

Proton kaçağı açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). ATP eşleşme verimliliği açısından yalnızca %10 grubunda kontrol ve COVID-19 grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

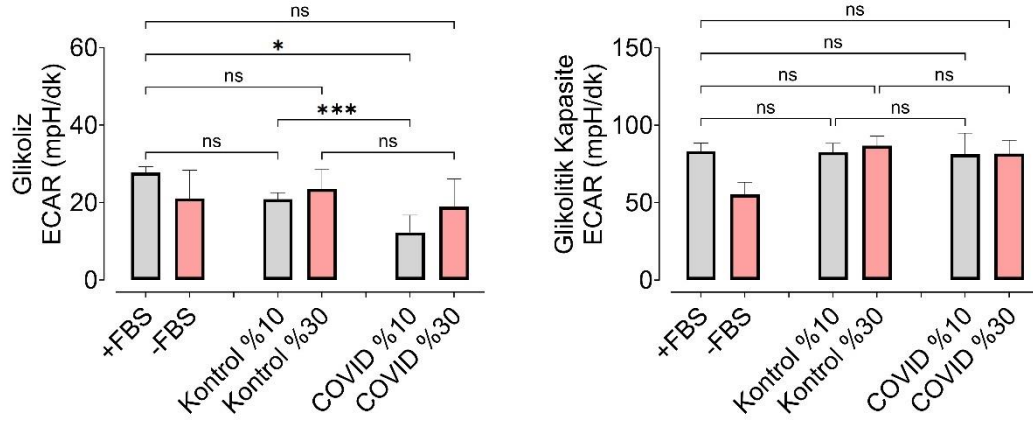
6.11 Serum Uygulamalarının MRC-5+ACE2 Hücrelerinin Glikolitik Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sağlıklı kontrollere ve COVID-19 hasta grubuna ait serumların MRC-5+ACE2 hücre modelinin glikolitik aktivitesi üzerindeki etkileri Glikoliz Stres Testi ile araştırılmıştır. Serumların bireysel etki profilleri Şekil 6.11.1’de sunulmuştur. Bu deneylerde glikolitik profilin mitokondriyal aktivite profiline kıyasla daha az etkilendiği görülmüştür.



Şekil 6.11.1 MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde 48 saatlik sağlıklı kontrol (K, n=3) ve COVID-19+ hasta (C, n=3) serumu müdahalelerinin Glikolitik Stres Testi profiline etkileri.

Glikoliz Stres testi ile hesaplanan verilerin kıyaslaması Şekil 6.11.2’de gösterilmiştir.



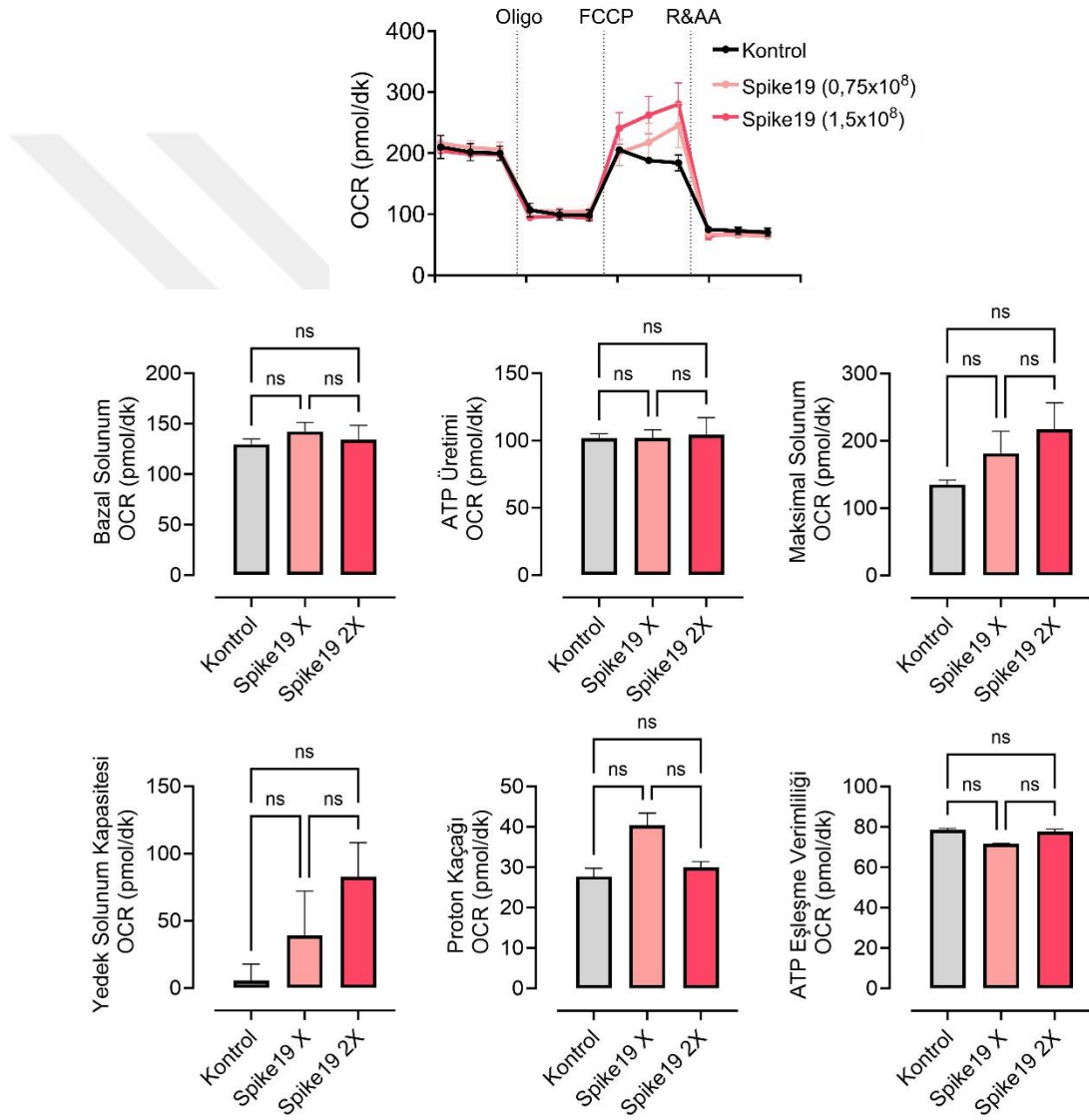
Şekil 6.11.2 MRC-5+ACE2 hücreleri üzerinde 48 saatlik sağlıklı kontrol (K, n=3) ve COVID-19+ hasta (C, n=3) serumu müdahalelerinin glikoliz ve glikolitik kapasite üzerindeki etkileri.

(İstatistiksel değerlendirmede Kolmogorov Smirnov ve ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

Grupların bazal glikoliz düzeyleri karşılaştırıldığında COVID %10 grubunun hem +FBS hem de Kontrol %10 grubundan anlamlı olarak daha düşük glikolize sahip olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Glikolitik kapasite ise hiçbir grupta anlamlı farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$).

6.12 SpikeΔ19 Pseudovirüsünün MRC-5+ACE2 Hücrelerinin Mitokondriyal Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

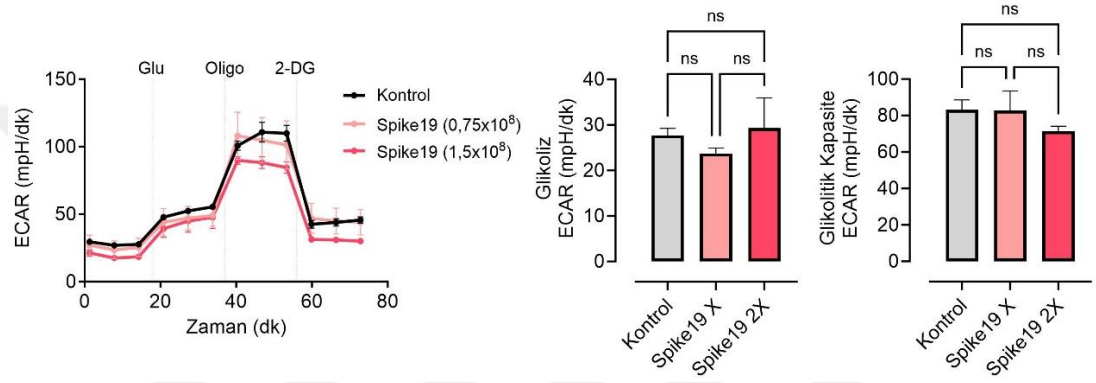
Laboratuvarımızda aktif ve enfektif SARS-CoV-2 virüsüyle çalışmak mümkün olmadığından SARS-CoV-2 benzeri ancak hastalık oluşturmeyen, Spike proteini taşıyan bir pseudovirüs üretilmiştir. MRC-5+ACE2 hücrelerinin 48 saat boyunca bu virüse iki farklı dozda maruz bırakılmasının hücrelerin Mito Stres Test profiline ve mitokondriyal aktivite parametrelerine etkisi Şekil 6.12.1’de gösterilmiştir.



Şekil 6.12.1 SpikeΔ19 pseudovirüs müdahalesinin MRC-5+ACE2 hücrelerinde Mito Stres Testi profiline ve mitokondriyal aktivite parametrelerine etkisi. (İkili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

SARS-CoV-2 benzeri pseudovirüs MRC-5+ACE2 hücrelerinde hiçbir mitokondriyal aktivite üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı etki oluşturmada da maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesi üzerinde doza bağımlı şekilde bir artış eğilimi olduğu görülmüştür ($p>0,05$).

6.13 Spike Δ 19 Pseudovirüsünün MRC-5+ACE2 Hücrelerinin Glikolitik Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

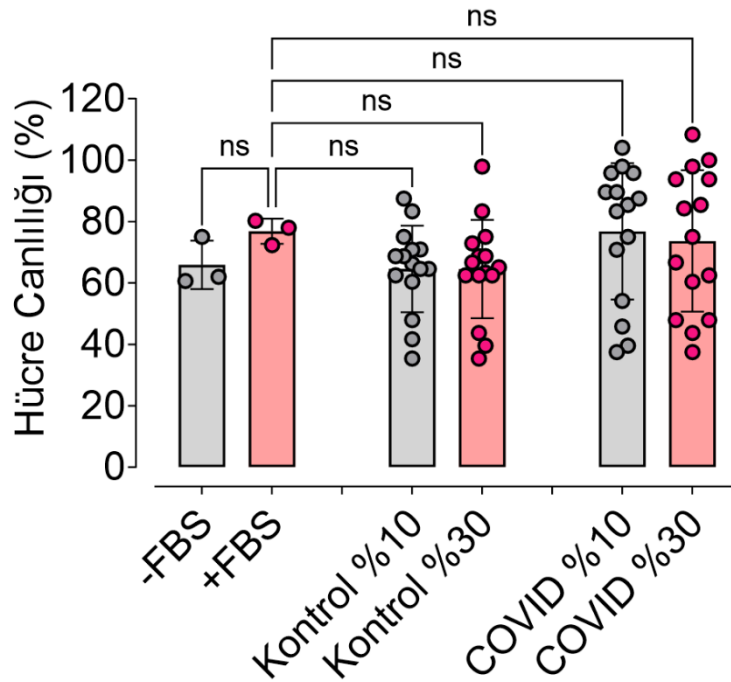


Şekil 6.13.1 MRC-5+ACE2 hücrelerinde 48 saatlik Spike Δ 19 pseudovirüs müdahalesinin Glikoliz Stres Testi profiline etkileri. (İkili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

SARS-CoV-2 benzeri pseudovirüsün MRC-5+ACE2 hücrelerinin glikolitik stres testi profili üzerindeki etkileri incelendiğinde (Şekil 6.13.1), glikolitik profilin virüs maruziyetinden etkilenmediği, kontrol grubu ile iki farklı dozda virüse maruz kalan gruplar arasında glikoliz ve glikolitik kapasite açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

6.14 Mononükleer Kan Hücrelerinde Hasta ve Kontrol Serumlarının Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

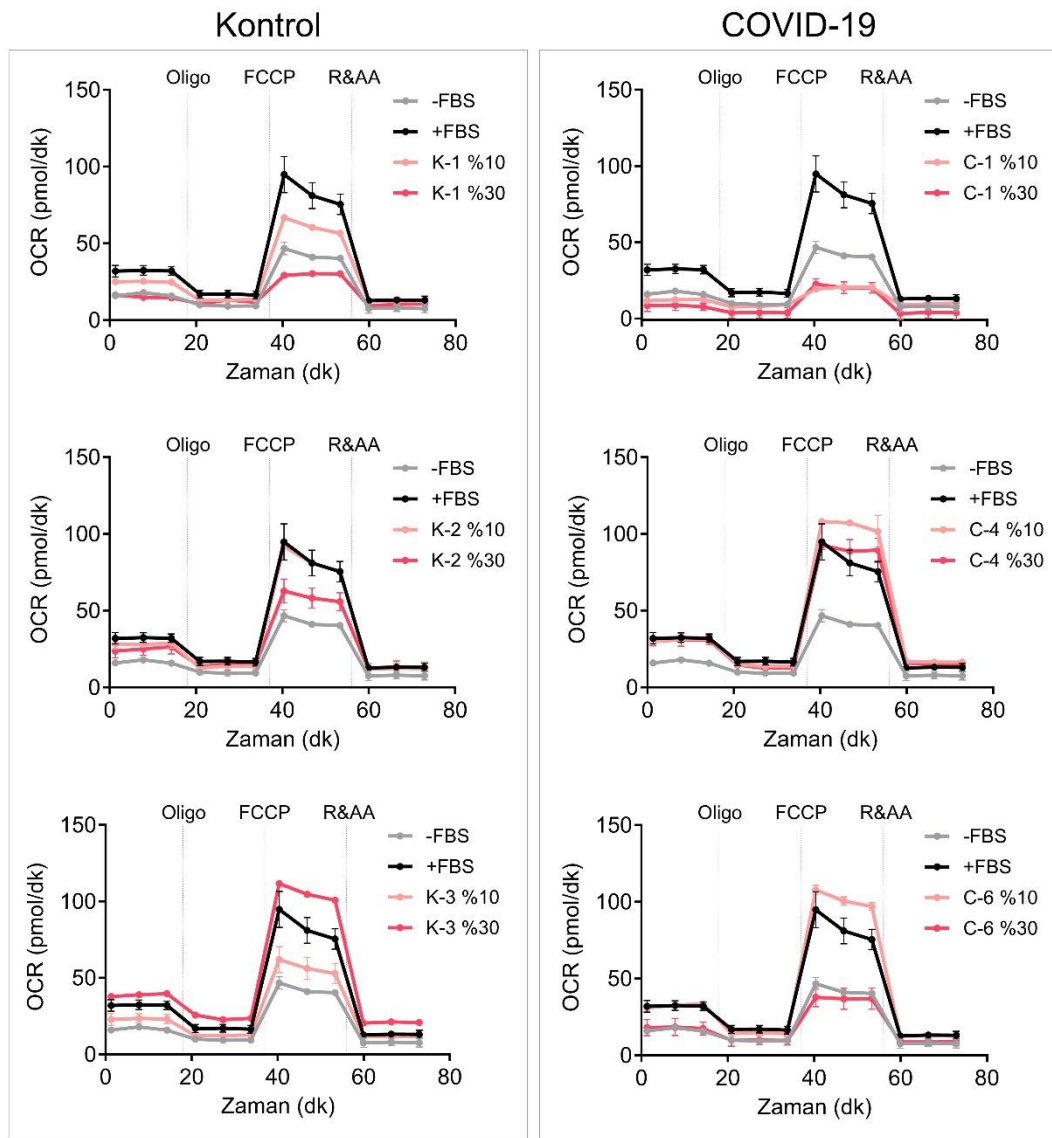
MRC-5+ACE2 hücre modelinde elde edilen ölçüm sonuçları, hasta mononükleer hücrelerinden alınan sonuçlardan farklı olduğundan benzer serum ve pseudovirüs denemelerinin mononükleer kan hücre modelinde tekrarlanmasına karar verilmiştir. Şekil 6.14.1’de tez çalışmasının başlangıcında Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile mononükleer kan hücrelerinin metabolik ölçümleri gerçekleştirilmiş olan 15 sağlıklı kontrol ve 15 SARS-CoV2+ hastaya ait serumların, sağlıklı bir kontrolden alınan mononükleer kan hücrelerine 24 saat boyunca uygulanması yoluyla gerçekleştirilen sitotoksikite deneyinin sonuçları gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Serum içeren +FBS kontrol grubunda da yaklaşık %20 oranında olağan bir hücre ölümü olduğu görülmektedir.



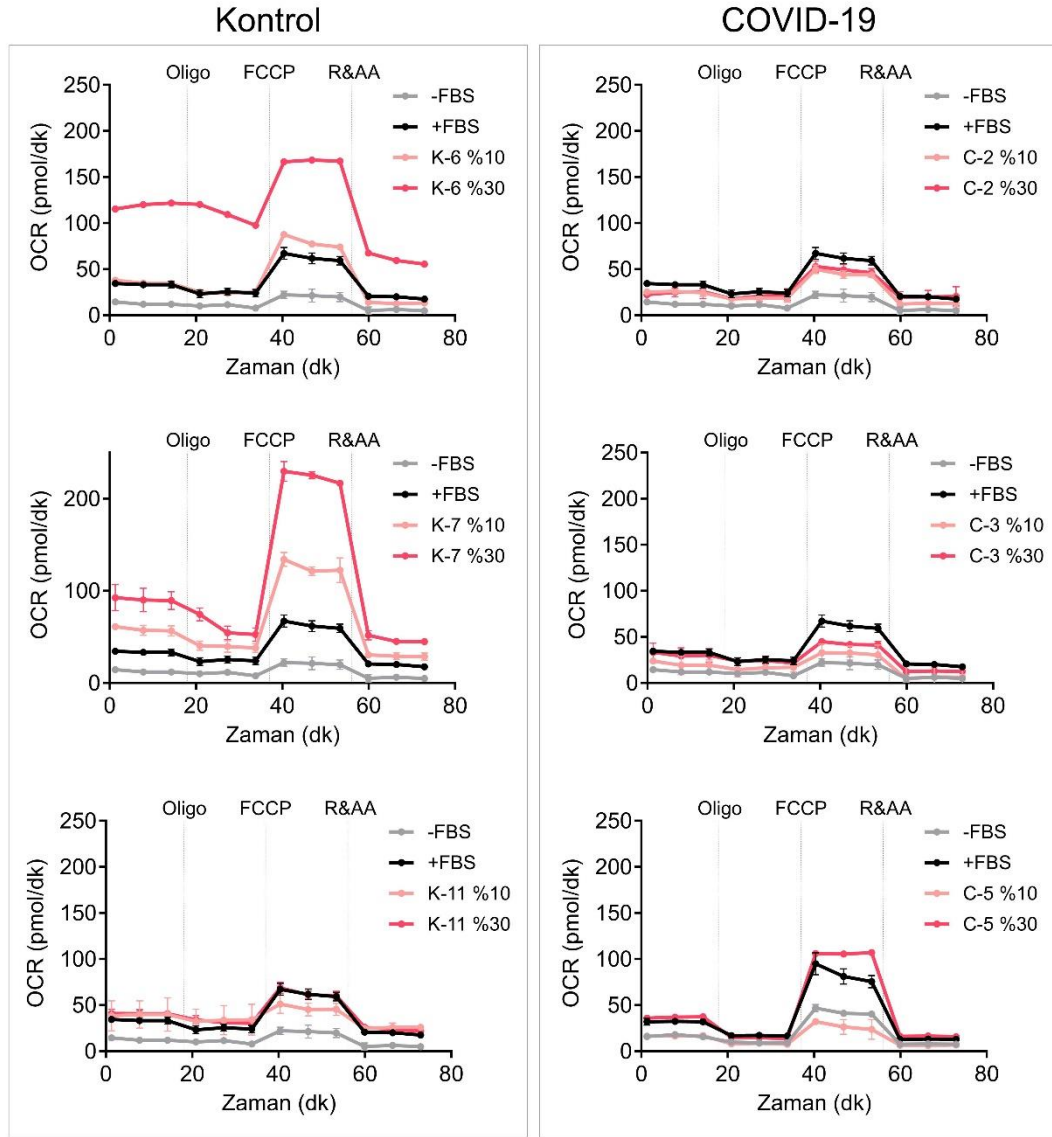
Şekil 6.14.1 Mononükleer kan hücreleri üzerine farklı dozlarda uygulanan serumların 24 saatlik sitotoksik etkileri.

6.15 Serum Uygulamalarının Mononükleer Kan Hücrelerinin Mitokondriyal Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Şekil 6.15.1’de, aynı kişiden alınan mononükleer kan hücrelerinde, 24 saatlik kontrol ve COVID-19+ hasta serumu müdahaleleri sonucu ölçülen metabolik profillerin bir kısmı, bireysel farklılıkların görülebilmesi amacıyla ayrı ayrı grafiklenerek gösterilmiştir. Genel profiller incelendiğinde, bireysel serumların etkileri arasında hem grup içi hem de gruplar arasında farklılıklar olduğu, çoğunlukla serum dozuna bağlı bir yanıt olmadığı görülmektedir.

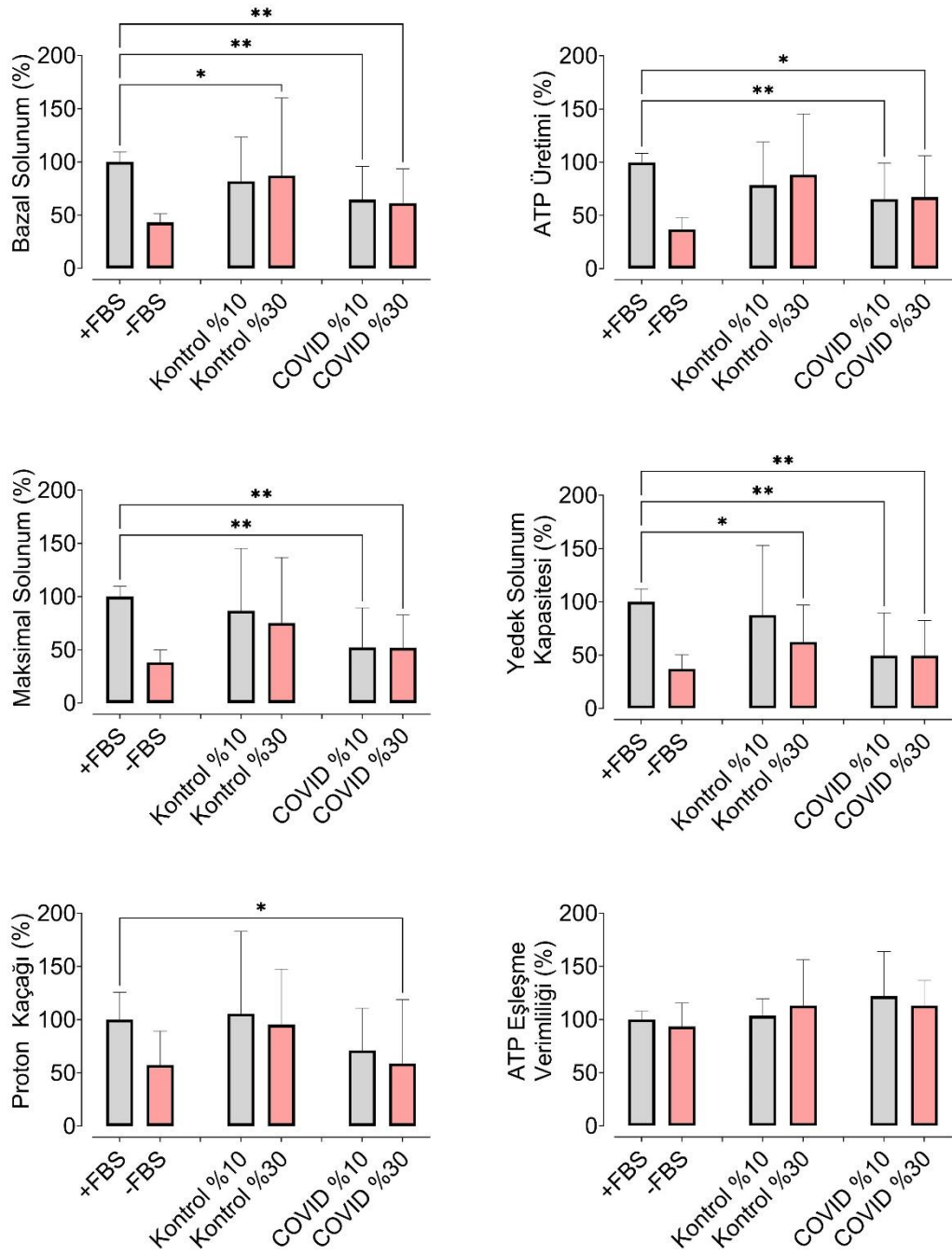


Şekil 6.15.1 Mononükleer kan hücreleri üzerinde 24 saatlik kontrol veya COVID-19+ hasta serumu müdahalelerinin Mito Stres Testi profiline etkileri.



Şekil 6.15.1 Mononükleer kan hücreleri üzerinde 24 saatlik kontrol veya COVID-19+ hasta serumu müdahalelerinin Mito Stres Testi profiline etkileri (Devam).

Üç deney setinde tamamlanan ölçümlerin bir araya getirilerek karşılaştırılabilmesi için her deney setindeki mitokondriyal parametrelerin, serum müdahalesinden sonra FBS içeren kontrol grubuna kıyasla yüzde (%) olarak nasıl değiştiğini gösteren bir normalizasyon yapılmış ve veriler bir araya getirilmiştir. Bu normalizasyon sonrası ortaya çıkan mitokondriyal aktivite parametrelerinin karşılaştırma grafikleri Şekil 6.15.2’de sunulmuştur.



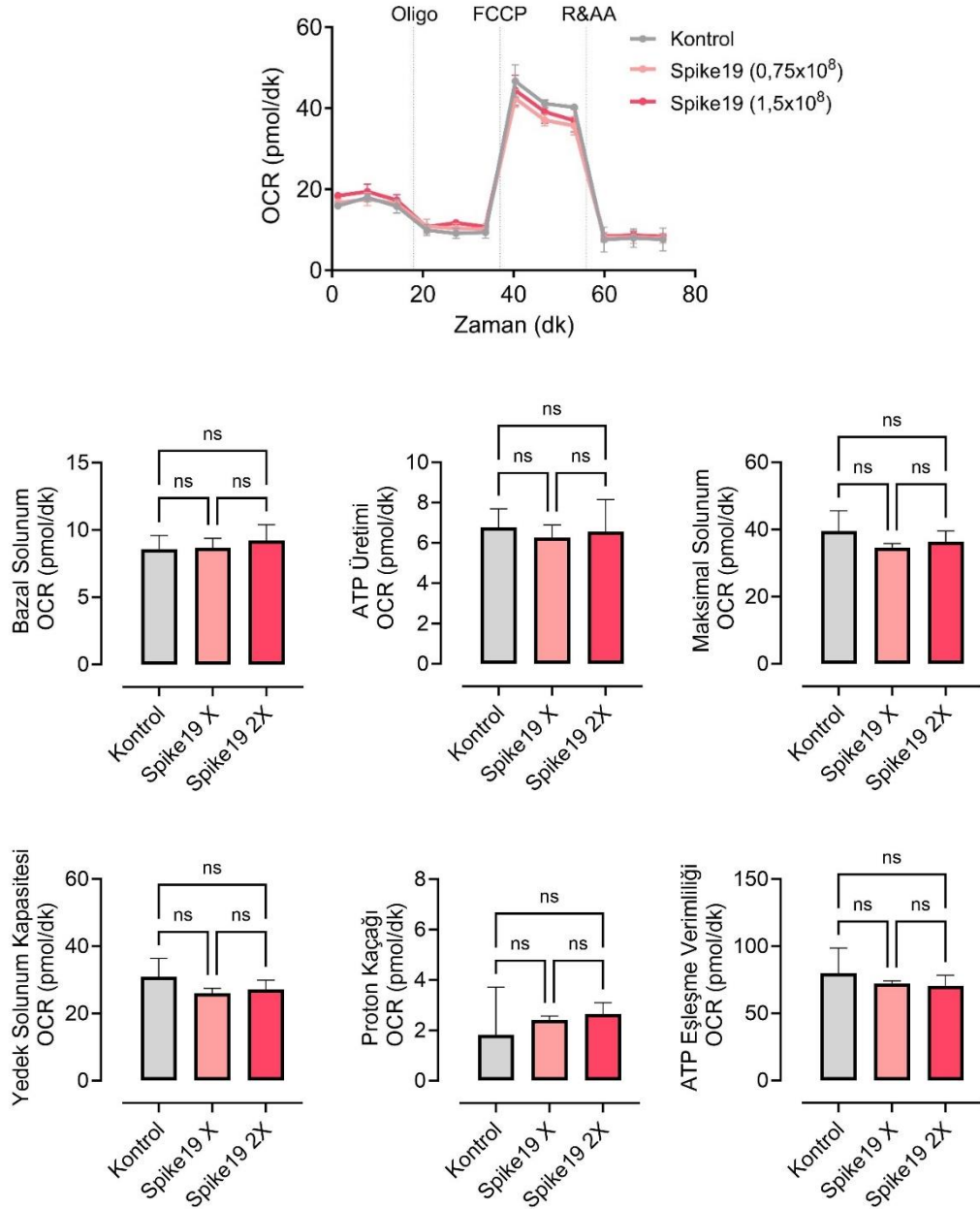
Şekil 6.15.2 Mononükleer kan hücreleri üzerinde 24 saatlik sağlıklı kontrol (n=10) ve COVID-19+ hasta (n=10) serumu müdahalelerinin mitokondriyal aktivite parametrelerine etkileri.

(Tüm parametreler +FBS grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede Kolmogorov Smirnov ve ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

Bu verilere göre bazal solunum +FBS grubuna kıyasla kontrol grubunun yalnızca %30 serum dozunda anlamlı düşüş gösterirken ($p<0,05$), COVID-19 grubunda her iki serum dozunda da istatistiksel açıdan anlamlı azalma görülmüştür ($p<0,01$). Aynı profil yedek solunum kapasitesinde de saptanmıştır. ATP üretimi ve maksimal solunum ise yalnızca COVID-19 grubunda her iki serum dozunda da +FBS grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur. Proton kaçağı yalnızca COVID-19 grubunun %30 serum dozunda istatistiksel olarak +FBS grubundan farklılık göstermiştir. Ancak hiçbir parametre için direkt olarak kontrol serumları uygulanan grup ve COVID-19 hasta serumları uygulanan grup arasında istatistiksel açıdan farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



6.16 SpikeΔ19 Pseudovirüsünün Mononükleer Kan Hücrelerinin Mitokondriyal Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi



Şekil 6.16.1 SpikeΔ19 pseudovirüs müdahalesinin mononükleer kan hücrelerinde Mito Stres Testi profiline ve mitokondriyal aktivite parametrelerine etkileri.

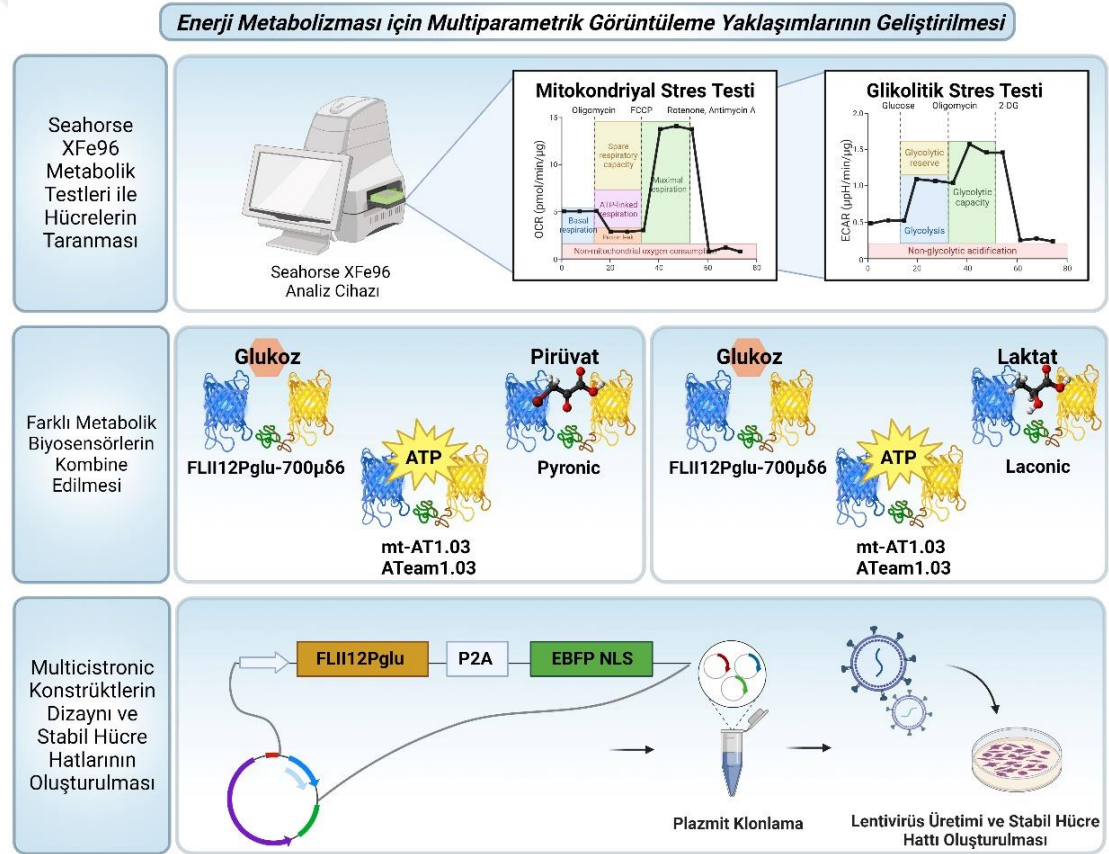
Sağlıklı bir gönüllüden aynı gün içerisinde alınan mononükleer kan hücrelerinin 24 saat boyunca SpikeΔ19 pseudovirüsüne maruz bırakılmasının

hücrelerin Mito Stres Testi profiline ve mitokondriyal aktivite parametrelerine etkisi Şekil 6.16.1’de gösterilmiştir. Bu virüs uygulaması mononükleer kan hücrelerinin hem genel Mito Stres Test profilinde hem de mitokondriyal aktivite parametrelerinde hiçbir anlamlı değişikliğe neden olmamıştır.



6.17 Biyosensörler ile Gerçekleştirilecek Enerji Metabolizması Ölçümleri İçin Multiparametrik Görüntüleme Yaklaşımlarının Geliştirilmesi

Bu tez çalışmasında geliştirilmesi hedeflenen multiparametrik görüntüleme yaklaşımları ile, Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile genel bir metabolik profil taramasının ardından spesifik metabolik biyosensörler ile hücre metabolizmasının tek hücre düzeyinde canlı olarak görüntülenmesi ve glikoz, ATP, laktat, pirüvat gibi birçok önemli ara ürünün hücre içi dinamiklerinin izlenmesi amaçlanmıştır. Bu yaklaşım yalnızca COVID-19 enfeksiyonunda değil, birçok farklı koşulda metabolik taramalar ve görüntülemeler yapmak için kullanılabilecektir ve geliştirilmesi hedeflenen yaklaşım aşağıdaki Şekil 6.17.1’de özetlenmiştir.

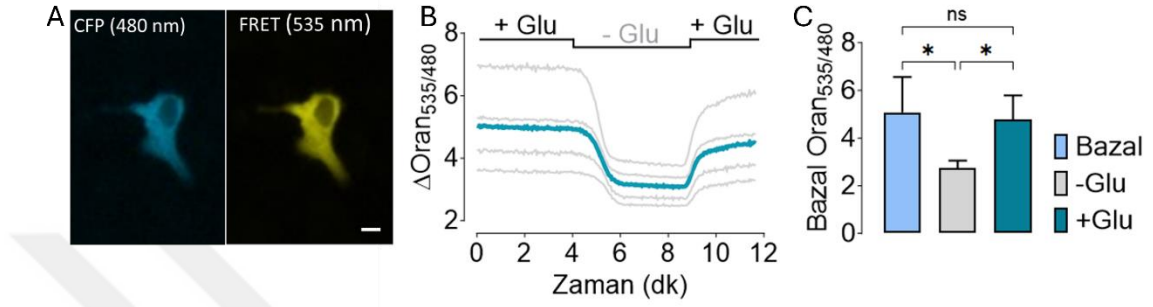


Şekil 6.17.1 Enerji Metabolizması İçin Multiparametrik Görüntüleme Yaklaşımlarının Geliştirilmesi

Bu hedef doğrultusunda ilk olarak kullanılması hedeflenen biyosensörlerin MRC-5 ve HEK293T hücre hattında denemeleri ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

6.18 Biyosensör Karakterizasyonlarının Gerçekleştirilmesi

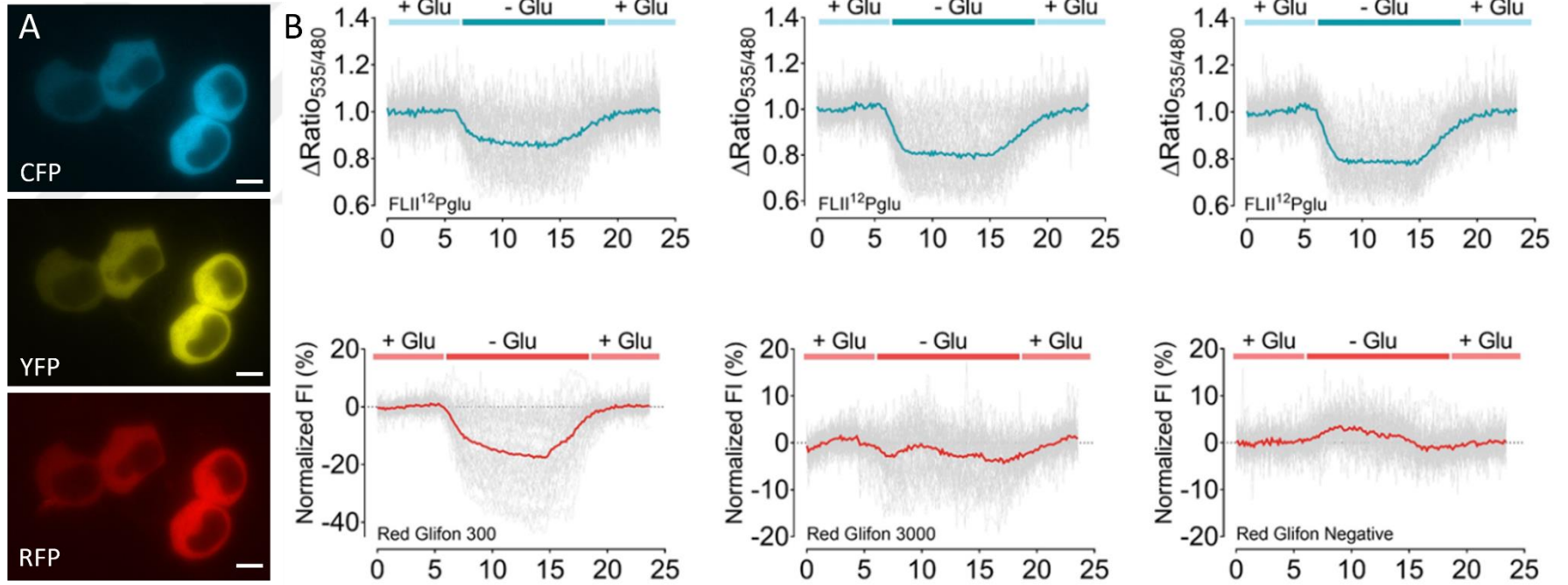
MRC-5 hücrelerinde ilk olarak FRET temelli glikoz sensörü olan FLII12PGlu-700 μ 86'nın karakterizasyonu gerçekleştirilmiş, deney sonucu Şekil 6.18.1'de gösterilmiştir. Standart bir görüntüleme solüsyonundan glikoz çekip geri verme protokolü uygulanmış ve sensörün fonksiyonel olduğu gözlenmiştir.



Şekil 6.18.1 MRC-5 hücrelerinde glikoz sensörü FLII12PGlu-700 μ 86'nın karakterizasyonu.

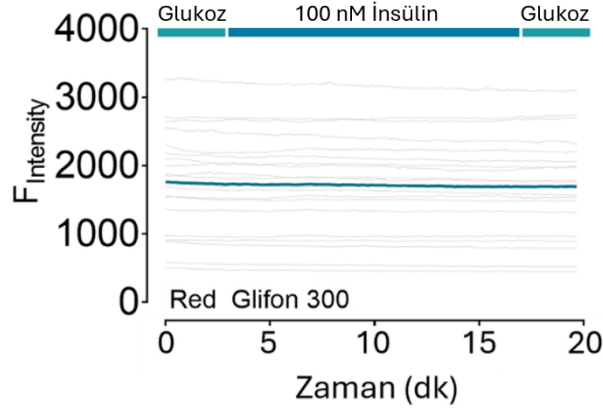
(A) Sitolitik hedefli FLII12PGlu-700 μ 86 biyosensörünü ifade eden temsili MRC-5 hücre görüntüleri. Ölçek çizgisi 20 μ m'yi temsil etmektedir. (B) Glikoz (10 mM) varlığı ve yokluğundaki gerçek zamanlı oransal glikoz dinamikleri. Kalın mavi eğri ortalamayı ve açık gri eğriler tek hücre yanıtlarını göstermektedir. (C) Barlar, bazal glikozlu (açık mavi), glikozsuz (gri) ve glikozun yeniden eklendiği (koyu mavi) koşullardaki hücre içi glikoz seviyelerinin istatistiksel analizini temsil etmektedir. İstatistiksel karşılaştırma için ikili olarak Mann Whitney U testi yapılmıştır. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

FRET temelli biyosensörler aynı anda birlikte kullanılabilecek kanal sayısını sınırladığından, FRET temelli glikoz sensörü olan FLII12PGlu-700 μ 86'ya alternatif olarak kırmızı kanallı Red Glifon 300,3000 ve Negatif sensörlerinin karakterizasyonları da gerçekleştirilmiştir. Bu karakterizasyon ve sensörlerin performansının FLII12PGlu-700 μ 86 sensörü ile kıyaslaması Şekil 6.18.2'de gösterilmiştir. MRC-5 hücrelerinde transfeksiyon başarısı düşük olduğundan bu deney HEK293T hücrelerinde yapılmıştır. Kontrol sensörü olan Red Glifon Negatif olması gerektiği gibi glikoz değişimlerine yanıt vermemiş, Red Glifon 3000 ise yeterli hassasiyeti göstermemiştir Çalışmalarımıza uygun olan tek kanallı biyosensörün Red Glifon 300 olduğu belirlenmiştir.



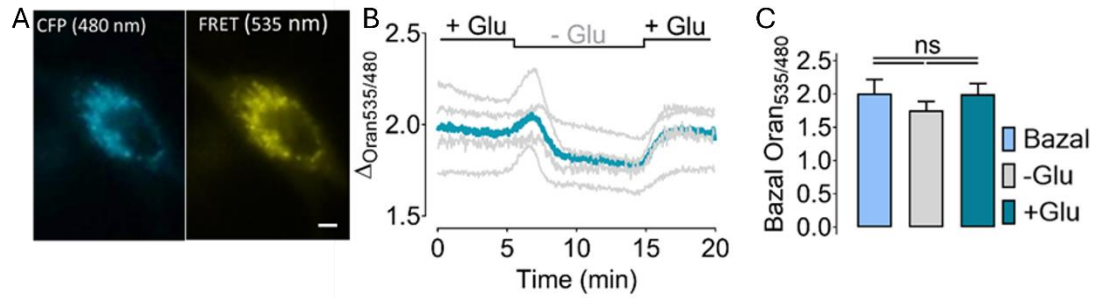
Şekil 6.18.2 Red Glifon 300, 3000 ve Negatif biyosensörlerinin FRET temelli FLII12PGlu-700μδ6 biyosensörü ile karşılaştırılması. (A) Aynı anda FLII12PGlu-700μδ6 ve Red Glifon biyosensörlerini ifade eden temsili HEK293T hücre görüntüleri. Ölçek çizgisi 20 μm'yi temsil etmektedir. (B) Glikoz (10 mM) varlığı ve yokluğundaki gerçek zamanlı oransal glikoz dinamikleri. Kalın eğriler ortalamayı ve açık gri eğriler tek hücre yanıtlarını göstermektedir.

Hücre dışı glikozun manipüle edildiği deneylerde insülin kullanımının gerekli olup olmadığının test edilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneyin sonuçları Şekil 6.18.3'te gösterilmiştir. İnsülin varlığı hücre içine glikoz girişini etkilememiştir.

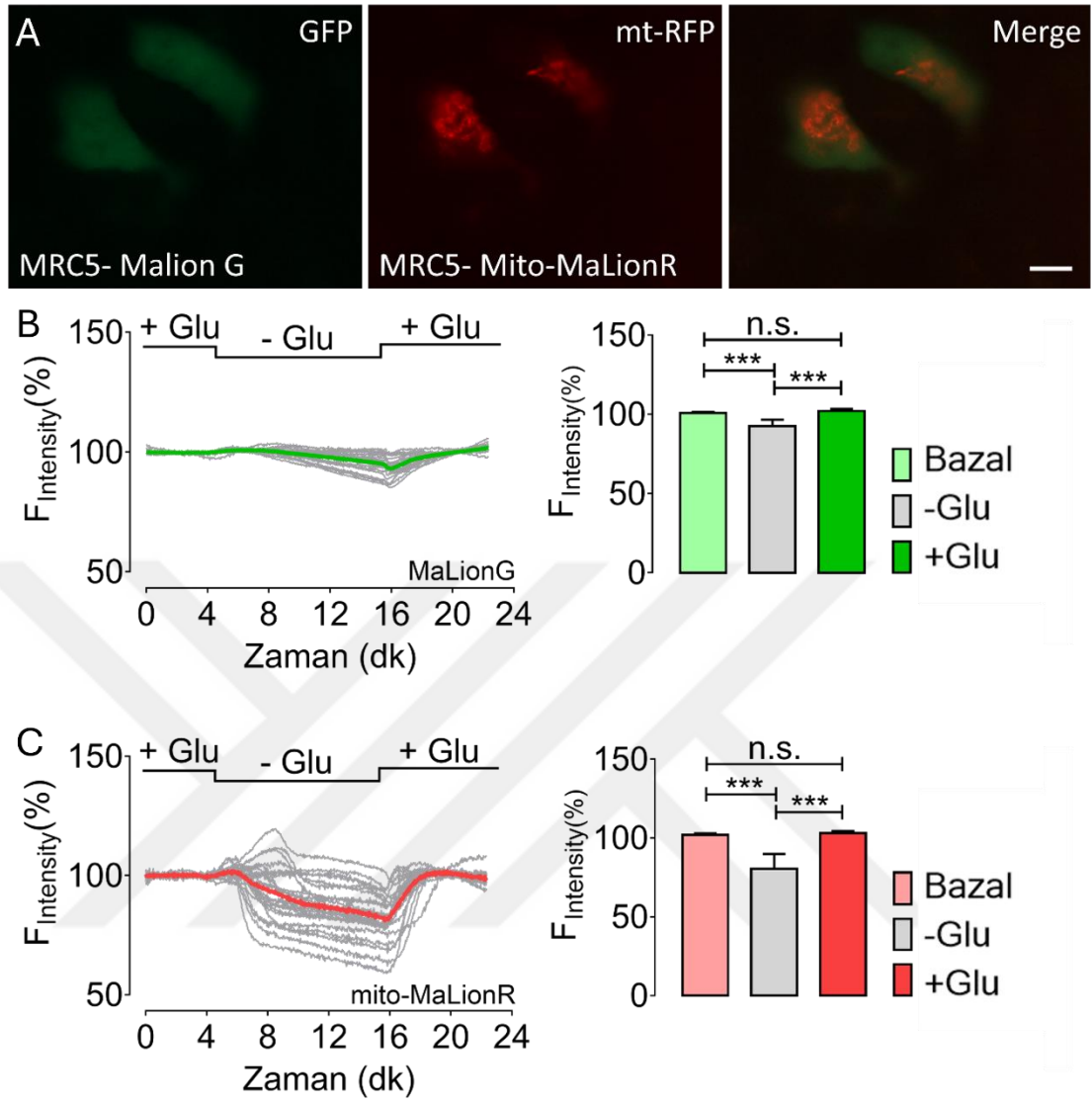


Şekil 6.18.3 İnsülinin hücre içi glikoz düzeylerine etkisinin Red Glifon 300 biyosensörü ile görüntülenmesi.

Glikoz sensörleri denenirken uygulanan aynı protokol kullanılarak mitokondriyal ATP biyosensörü olan mtAT1.03 biyosensörü de MRC-5 hücrelerinde denenmiş ve sensörün fonksiyonel olduğu görülmüştür (Şekil 6.18.4).



Şekil 6.18.4 MRC-5 hücrelerinde ATP sensörü mtAT1.03'ün karakterizasyonu (A) Mitokondri hedefli mtAT1.03 biyosensörünü ifade eden temsili MRC-5 hücre görüntüleri. Ölçek çizgisi 20 µm'yi temsil etmektedir. (B) Glikoz (10 mM) varlığı ve yokluğundaki gerçek zamanlı oransal ATP dinamikleri. Kalın mavi eğri ortalamayı ve açık gri eğriler tek hücre yanıtlarını göstermektedir. (C) Bazal, bazal glikozlu (açık mavi çubuk, n=3/4), glikozsuz (gri çubuk, n=3/4) ve glikozun yeniden eklendiği (koyu mavi çubuk, n=3/4) koşullardaki hücre içi ATP seviyelerinin istatistiksel analizini temsil etmektedir. İstatistiksel karşılaştırma için ikili olarak Mann Whitney U testi yapılmıştır. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.



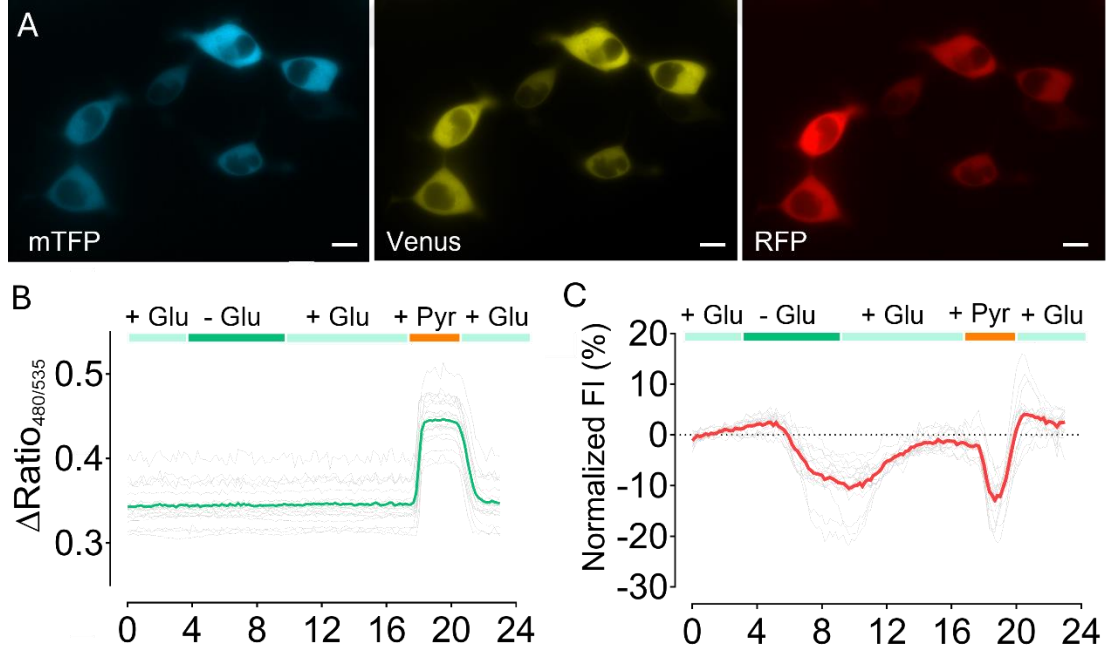
Şekil 6.18.5 MRC-5 hücrelerinde ATP sensörleri MaLionG ve Mito-MaLionR'nin karakterizasyonu.

(A) Aynı anda sitozole hedefli MaLionG ve mitokondriye hedefli Mito-MaLionR ATP biyosensörünü ifade eden MRC-5 hücrelerinin temsili görüntüsü. Ölçek çizgisi 20 μ m'yi temsil etmektedir. (B) Glikoz varlığı ve yokluğundaki gerçek zamanlı sitozolik ATP dinamikleri ve bar grafikleri. (C) Glikoz varlığı ve yokluğundaki gerçek zamanlı mitokondriyal ATP dinamikleri ve bar grafikleri. İstatistiksel karşılaştırma için One-Way Anova ve Tukey post-hoc testi yapılmıştır. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir. ***p<0.0001.

FRET bazlı ATP sensörüne alternatif olarak tek kanallı sitozole hedefli yeşil renkteki MaLionG ve mitokondriye hedefli kırmızı renkli Mito-MaLionR sensörlerinin de karakterizasyonu eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiş, sensörlerin fonksiyonel ve birlikte görüntülenmeye uygun oldukları belirlenmiştir (Şekil 6.18.5).

Aynı zamanda glikoz starvasyonu sırasında mitokondriyal ATP düzeylerinin daha belirgin bir düşüş gösterdiği saptanmıştır.

Metabolik biyosensör görüntülemeleri kapsamında görüntülenmesi hedeflenen metabolitlerden biri pirüvat olduğundan karakterizasyon çalışmalarına FRET temelli Pyronic biyosensörünün karakterizasyonu ile devam edilmiştir. Hücrelerde pirüvat ile eş zamanlı olarak glikoz seviyelerini de izlemek için Glifon 300 glikoz sensörü de Pyronic ile birlikte HEK293T hücrelerine transfekte edilmiştir. Sonuçları Şekil 6.18.5'te gösterilen ilk denemede görüntülemeye 10 mM glikoz içeren görüntüleme çözeltisi ile başlanmış, daha sonra glikozsuz çözeltiye geçilmiş, bu aşamada glikoz sensörünün sinyali beklendiği gibi düşerken, pirüvat sensörünün sinyalinde değişim görülmemiştir. Daha sonra sensörün çalışıp çalışmadığını doğrulamak için pirüvat verildiğinde Pyronic sensörünün yanıt verdiği saptanmıştır. Sensörün yüksek pirüvat konsantrasyonlarına yanıt verdiği ancak glikoz starvasyonu gibi farklı metabolik manipülasyonlara bağlı daha düşük orandaki değişimleri yansıtmak için yeterli hassasiyete sahip olmadığı belirlenmiştir.

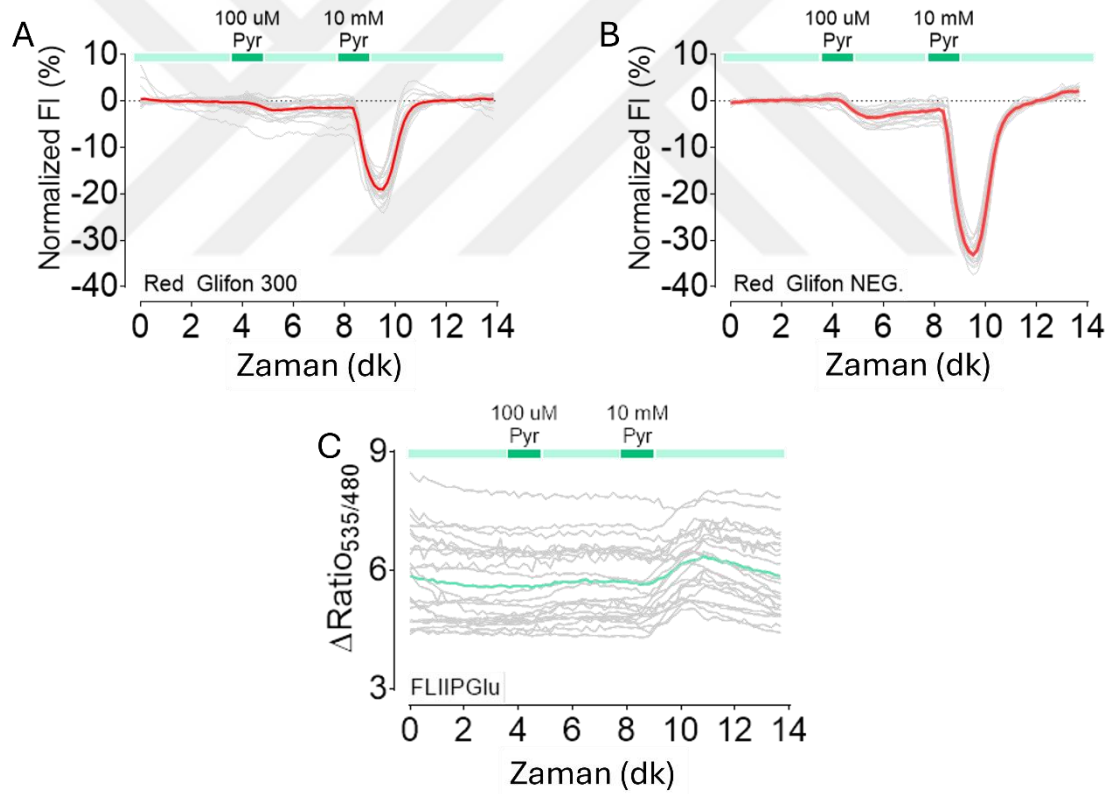


Şekil 6.18.6 Pyronic Sensörünün Karakterizasyonu.

A) Aynı anda Pyronic ile Red Glifon biyosensörlerini ifade eden hücrelerin temsili görüntüleri. B) Pyronic ile C) Red Glifon 300 biyosensörlerini ifade eden hücrelerin perfüzyon ile sağlanan glikozlu, glikozsuz ve 10 mM pirüvatlı ortam koşullarındaki sensör profilleri.

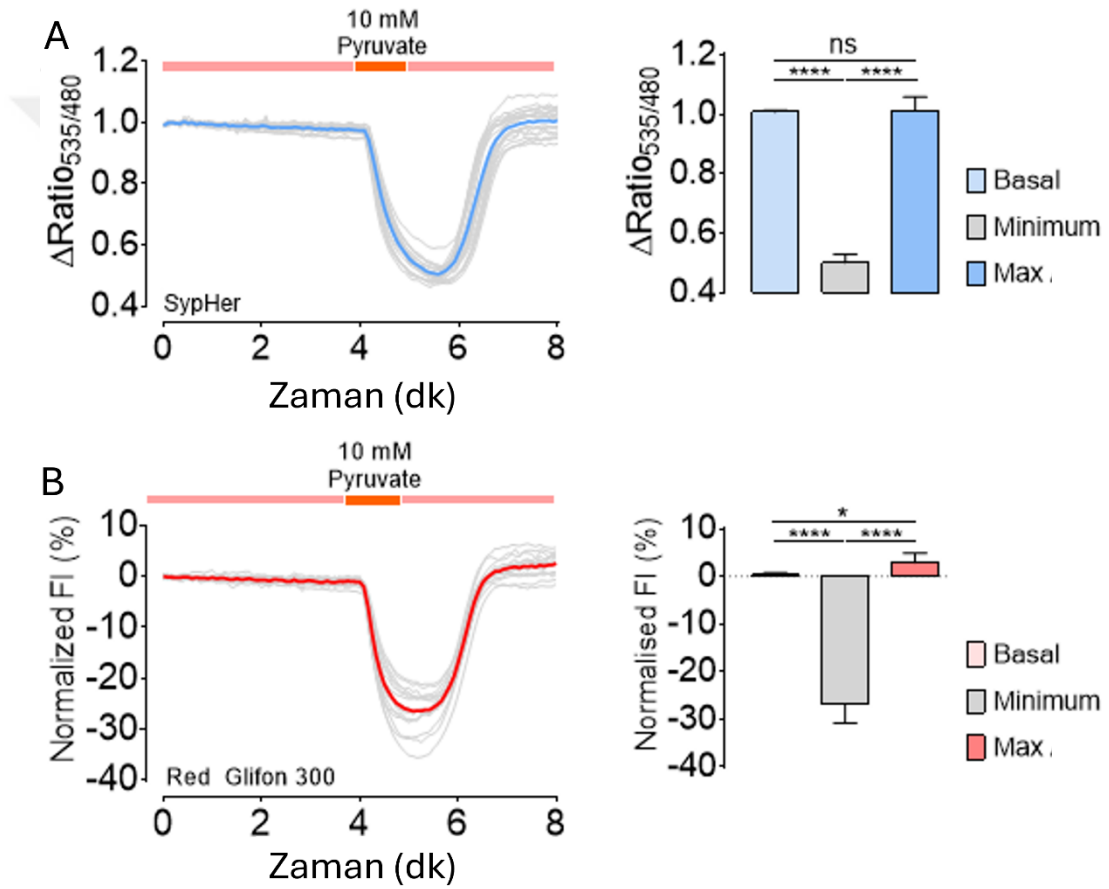
Şekil 6.18.6’te gösterilen deneyde Red Glifon 300 biyosensörü beklenmedik şekilde pirüvata da yanıt vermiştir. Bunun fizyolojik bir durum olup olmadığını anlamak amacıyla sonuçları Şekil 6.18.7’de gösterilen deney yapılmıştır. Piruvatın hücre içi glikoz dinamikleri üzerindeki etkilerini araştırmak üzere sırasıyla 100 uM ve 10 mM piruvat perfüzyonu yapılmıştır. Bu ölçümlerde kontrol biyosensörü olan Glifon Negatif’in de 100 mM pirüvata çok net bir yanıt vermesi değişimin glikoz seviyeleri ile ilişkili olmadığını doğrulamıştır.

Aynı deney FLII¹²PGlu-700µδ6 ile tekrarlandığında elde edilen sonucun Red Glifon’lardan farklı olması da sensörlerdeki bu yanıtın kırmızı floresan proteinin spesifik bir hassasiyetinden (pH hassasiyeti gibi) kaynaklandığını düşündürmüştür.



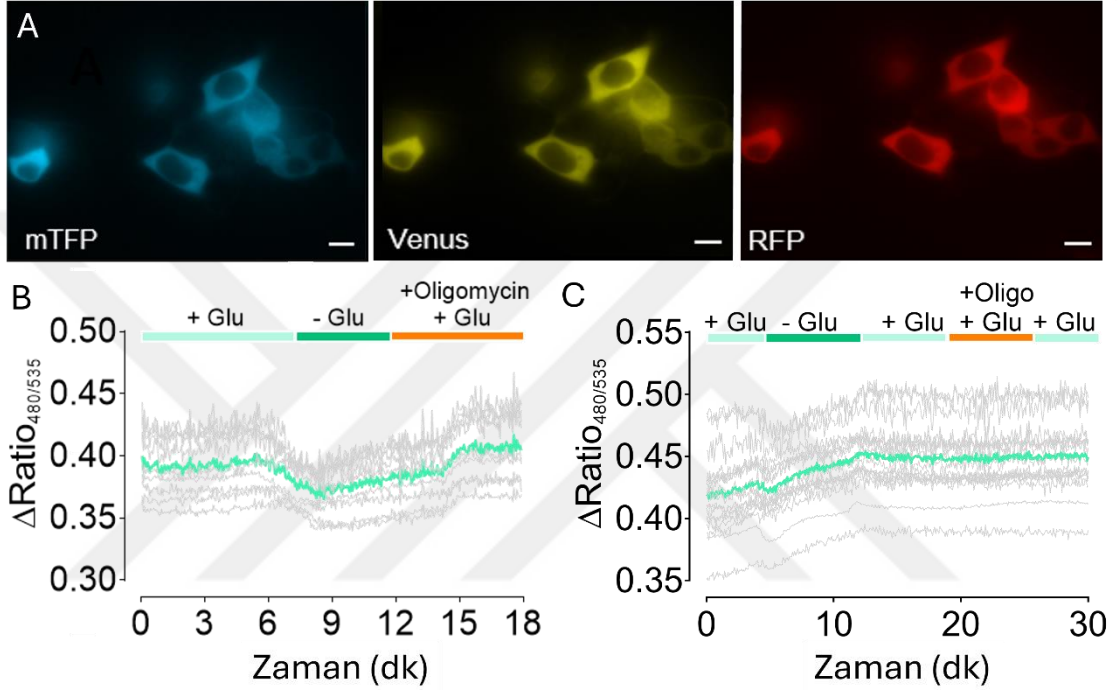
Şekil 6.18.7 (A) Red Glifon 300, (B) Red Glifon Nega ve (C) FLII¹²PGlu-700µδ6 sensörlerinde Pirüvat denemesi.

Pirüvatın Glifon sensörlerinin sinyali üzerindeki etkisinin pH kaynaklı olup olmadığının anlaşılması için pH sensörü olan SypHer3s ile birlikte ölçüm gerçekleştirilmiştir. SypHer ya da Red Glifon 300 ifade eden HEK293T hücrelerinin sinyallerinde yapılan bu karşılaştırma sonucunda pirüvat hücre içindeki pH'ı önemli bir şekilde değiştirdiği için Glifon 300 sinyalini değiştirdiği anlaşılmıştır (Şekil 6.18.8). Glifon 300 sensörünün pH değişimine neredeyse pH sensörü kadar duyarlı olduğu ve pH değişimi görülebilecek metabolik olaylarda kullanıma uygun olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 6.18.8 (A) SypHer3s ve (B) Red Glifon 300 sensörlerinde Pirüvat denemesi. İstatistiksel karşılaştırma için One-Way Anova ve Tukey post-hoc testi yapılmıştır. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Laktat ölçümlerinde kullanılacak Laconic sensörü için karakterizasyon çalışmaları HEK293T hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Laconic sensörü ile yapılan denemelerde sensörün çalıştığı ancak glikoz kısıtlaması sonrası verilen 10 mM glikoza ve hücredeki glikolizi indüklemesi gereken ATP sentaz inhibitörü olan oligomisin müdahalesine verilen yanıtların hafif olduğu görülmüştür. Enjeksiyon stratejisi değiştirilince oligomisine hiç yanıt görülmemiştir (Şekil 6.18.9).



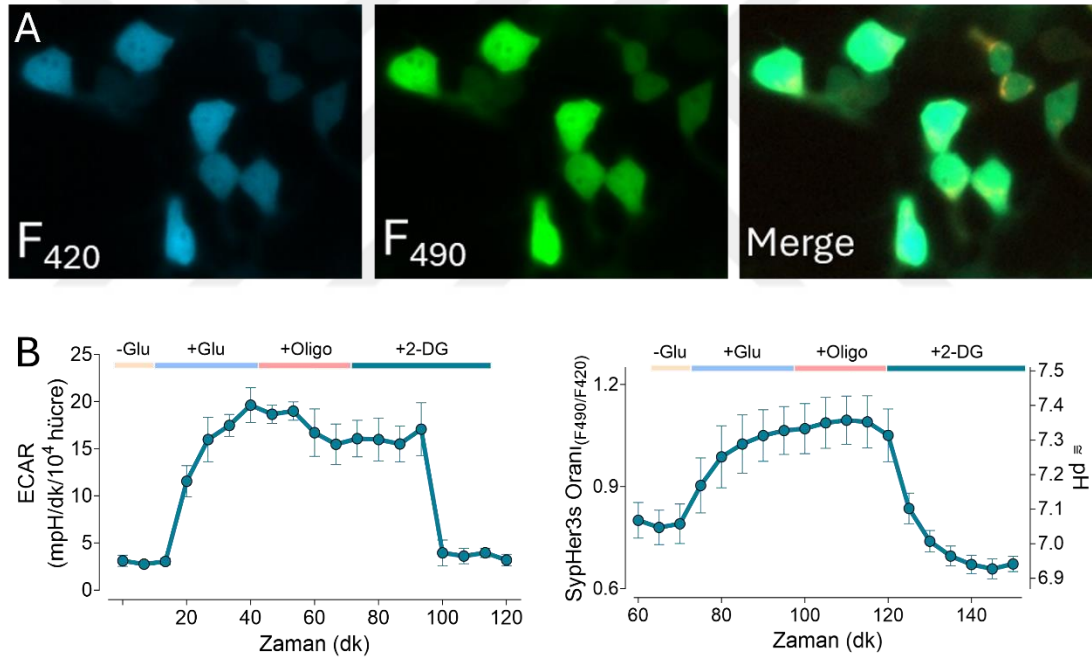
Şekil 6.18.9 Laconic Sensörünün Karakterizasyonu

A) Aynı anda Laconic ile Red Glifon biyosensörlerini ifade eden hücrelerin temsili görüntüleri. **B)** Laconic biyosensörlerini ifade eden hücrelerin perfüzyon ile sağlanan glikozlu, glikozsuz ve 4 μM Oligomisin içeren solüsyon koşullarındaki sensör profilleri.

6.19 Metabolik Analiz İçin Hücre İçi pH Değişimlerinin İncelenmesi

6.19.1 Glikolitik Stres Testi için Alternatif Bir Yöntem Geliştirilmesi

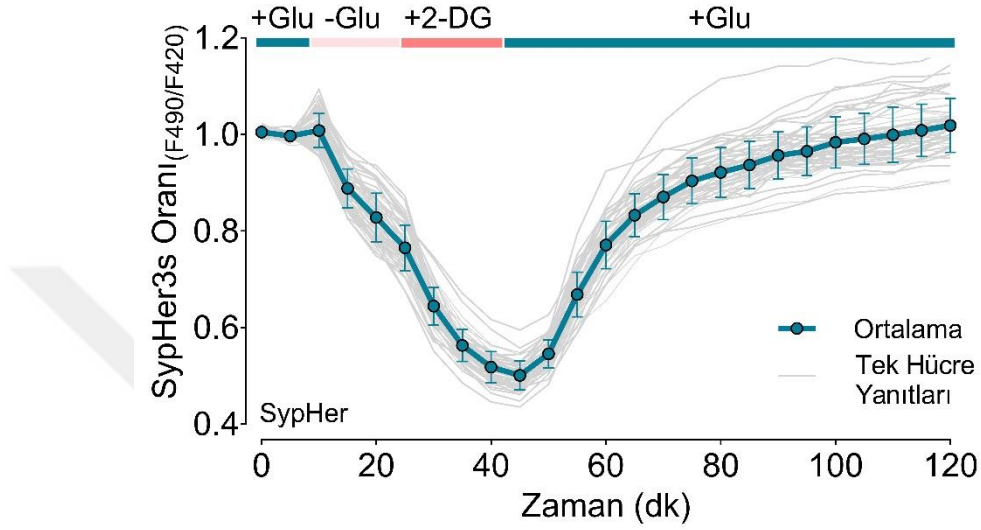
Biyosensör çalışmaları kapsamında multiparametrik görüntüleme yaklaşımlarına alternatif olarak metabolik analiz için hücre içi pH değişimlerinin takibi çalışmalarına devam edilmiştir. Şekil 6.19.1’de gösterilen SypHer biyosensörü ile hücre içi pH ölçümünde Seahorse Glikoliz Stres Testi’nin protokolü birebir olarak uygulanmış ve standart Seahorse Glikoliz Stres Testi profiline çok benzer bir profil görülmüştür. Bu grafikler hücre dışı asidifikasyon artarken hücre içindeki pH’nın da korele olarak yükseldiğini göstermiştir. Bu doğrultuda Seahorse testlerine alternatif olarak tek hücre pH görüntüleme yaklaşımlarının kullanılması için optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 6.19.1 SypHer biyosensörünü ifade eden hücrelerde perfüzyon ile sağlanan Glikolitik Stres Testi.

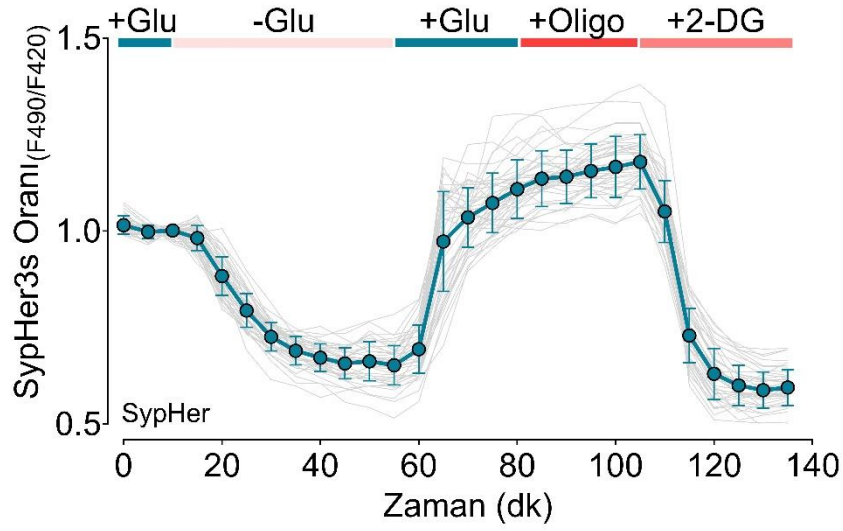
(A) SypHer3s biyosensörünü ifade eden HEK293T hücrelerinin temsili görüntüleri. (B) Hücrelere ait orijinal Seahorse Glikoliz Stres Testi profili. (C) SypHer3s biyosensörünü ifade eden hücrelerde perfüzyon ile sağlanan, pH ölçümüne dayalı Glikoliz Stres Testi.

Glikozlu ve glikozsuz koşulların hücre içi pH'ı değiştirdiğinin net olarak anlaşılabilmesi için farklı bir protokol uygulanmış, glikozsuz ortama geçişin ve 2-DG ile glikoliz inhibisyonunun hücre içi pH'ı belirgin olarak düşürdüğü, hücreye tekrar glikoz verilmesiyle pH değerinin tekrar yükseldiği, bu düşüşün geri dönüşümlü olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.19.2).



Şekil 6.19.2 Farklı glikoz koşullarında ve 2-DG inhibisyonu ile hücre içi pH görüntülemesi.

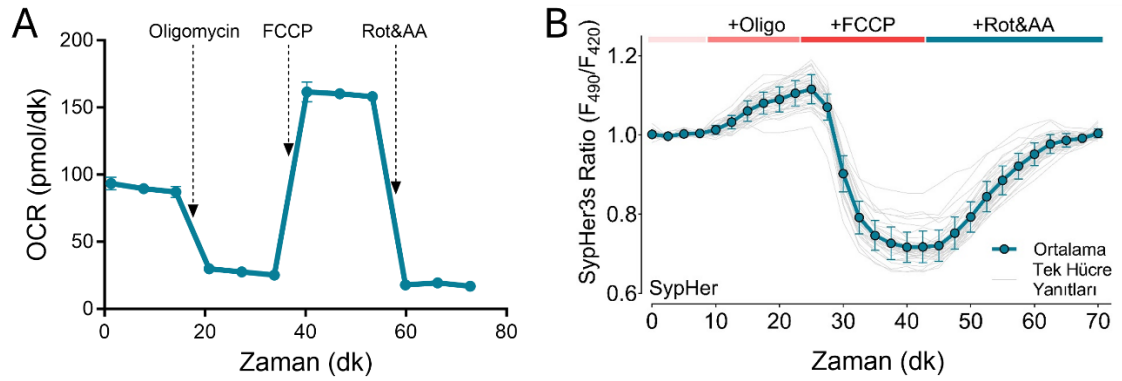
Standart Seahorse Glikoliz Stres Testi glikozsuz besiyeri ile başlatılmaktadır. Ancak glikozsuz ortama geçiş hücre içi pH'ı düşürdüğünden pH görüntülemesi sırasında bu etkinin başlangıçta yakalanıp analiz edilmesi zor olmaktadır. Bu nedenle görüntülemeye glikozlu ortamda başlanarak Seahorse testinde cihaz dışında yapılan 1 saatlik glikoz kısıtlamasının görüntüleme esnasında yapılmasına karar verilmiştir. Böylece elde edilen profil daha düzgün olmuş ve sensörün solması ile glikoz kısıtlaması kaynaklı pH düşüşü birbirinden ayırt edilebilmiştir. Kullanılacak protokol Şekil 6.19.3'te görüldüğü gibi olacaktır.



Şekil 6.19.3 Optimize Edilen Biyosensör Temelli Glikolitik Stres Testi Profili

6.19.2 Mito Stres Testi için Alternatif Bir Yöntem Geliştirilmesi

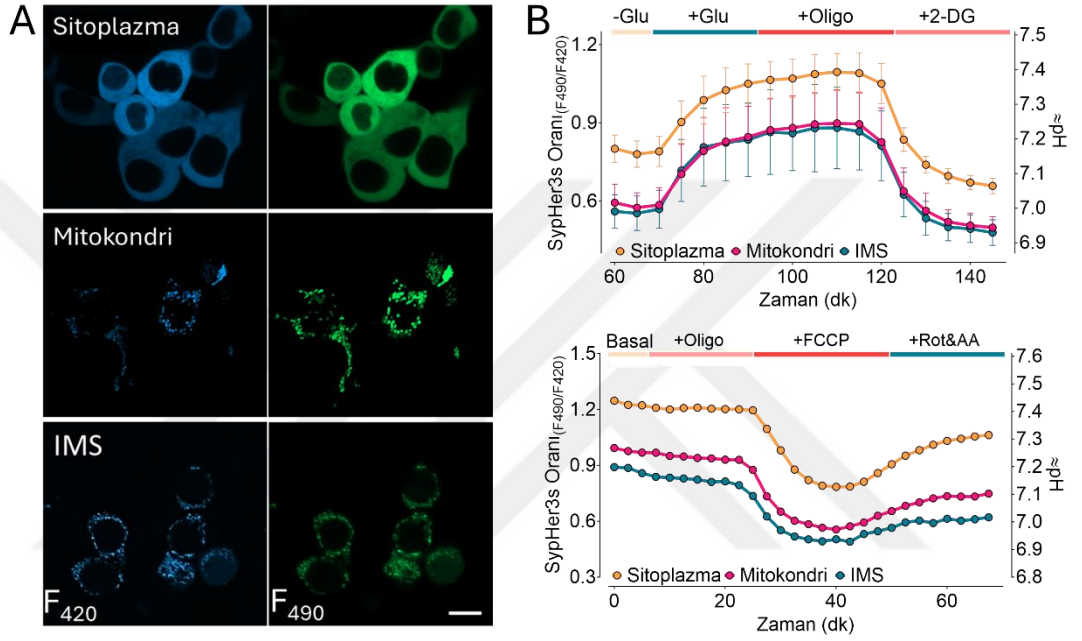
Seahorse analiz cihazı ile yapılan Mito Stres testinde OCR değerleri kullanılmakta, ECAR değerleri kullanılmamaktadır. pH sensörü ile hücre içi pH, ilk kez Mito Stres Testi protokolü kullanılarak ölçüldüğünde hücre içinde belirgin pH değişimleri olduğu görülmüştür (Şekil 6.19.4) ve bu değişimlerin alternatif bir Mito Stres Testi geliştirilmesi amacıyla kullanılabileceği düşünülmüştür.



Şekil 6.19.4 Seahorse Mito Stres Testi protokolünün Sypher pH sensörü ile görüntüleme protokolüne uygulanması.

(A) Standart bir Seahorse Mito Stres Test profili. (B) SypHer3s biyosensörünü ifade eden hücrelerde perfüzyon ile sağlanan, pH ölçümüne dayalı Mito Stres Testi.

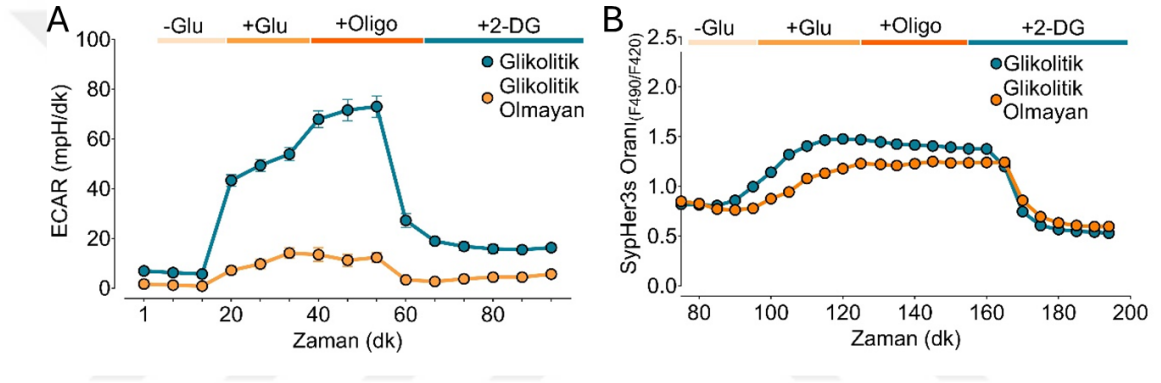
Ek olarak SypHer3s biyosensörü hücrelerin farklı hücre bölgelerine hedeflenmiş (sitoplazma, mitokondri, mitokondri zarları arası boşluk (IMS)) ve geliştirilen pH görüntülemeye dayalı Glikoliz Stres Testi ve Mito Stres Testi protokolleri farklı hücre bölümlerinde tekrarlanmıştır (Şekil 6.19.5). Test profillerinde hücre bölümleri arasında fark görülmemiştir ancak pH düzeyleri farklılık göstermiştir.



Şekil 6.19.5 Farklı hücre içi bölgelerde pH sensörü tabanlı (A) Glikolitik Stres Testi ve (B) Mito Stres Testi uygulaması.

6.19.3 Geliştirilen Tek Hücre Görüntüleme Yaklaşımının Farklı Metabolik Profillere Sahip Hücrelerde Test Edilmesi

Geliştirilen protokollerin COVID-19 deneyleri kapsamında kullanılabilmesi için ayırıcı olduklarının kanıtlanması gereklidir. Bu amaçla geliştirilen Glikoliz Stres Testi Seahorse analizlerinde farklı metabolik profillere sahip oldukları bilinen iki örnek hücre hattında denenerek test edilmiştir. Şekil 6.19.3'te farklı metabolik profillere sahip iki hücre hattında Seahorse ölçümleri ayırıcı iken görüntüleme yönteminin ayırıcı olmadığı görülmüştür. Bu nedenle geliştirilen yöntem valide edilememiş ve COVID-19 kapsamındaki deneylere devam edilmemiştir.



Şekil 6.19.6 Örnek hücre modellerinde Seahorse Glikoliz Stres Testi ve SypHer3s ölçümlerine dayalı Glikoliz Stres Testi profillerinin kıyaslanması. A) Glikolitik ve glikolitik olmayan iki hücre modelinin Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile ölçülmüş Glikoliz Stres Testi profilleri. B) Glikolitik ve glikolitik olmayan iki hücre modelinin tek hücre düzeyinde pH ölçümü ile belirlenen görüntüleme temelli Glikolitik Stres Testi profilleri.

7. TARTIŞMA

SARS-CoV-2 kaynaklı COVID-19, 2019'un sonlarında Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmış ve hızla yayılarak tüm dünyayı etkisi altına alan bir pandemi haline gelmiştir(1). Günümüzde hala etkilerini sürdüren bu pandemi, 7 milyondan fazla kişinin hayatını kaybetmesine neden olmuştur (147). İlk ortaya çıktığı günden bu yana COVID-19 ile ilgili anlayışımız büyük ölçüde ilerlemiş, ağır hastalık belirtilerini ve ölümleri önlemede etkili olduğu kanıtlanmış aşılar ve tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak, yeni virüslerin veya varyantların ortaya çıkma olasılığı devam etmektedir. Bu nedenle, SARS-CoV-2'nin patojenik mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılması ve daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği sürmektedir.

Bu tez çalışmasında, öncelikle COVID-19 enfeksiyonunun insan mononükleer kan hücrelerinde oluşturduğu metabolik ve biyoenerjetik değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, hasta serumlarının ve SARS-CoV-2'ye benzer ancak hastalık oluşturmeyen, Spike proteini taşıyan bir pseudovirüsün (SpikeΔ19) hücrel metabolizma üzerindeki etkileri MRC-5+ACE2 akciğer fibroblast ve mononükleer kan hücresi modellerinde araştırılmıştır.

Son yıllarda, biyoenerjetik sağlık kavramı, diyagnostik ve/veya prognostik bir klinik araç olarak önemli bir ilgi görmektedir (102, 103, 105, 148, 149). Ancak, mitokondrilerin hastalık patogeneziindeki rolünün anlaşılmasında önemli zorluklar mevcuttur. Özellikle insanlarda mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesinde kullanılan geleneksel yöntemler olan kas biyopsileri, deri greftleri ve ³¹P-nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi yöntemler, invaziv ve maliyetli olmaları, uzmanlık gerektirmeleri nedeniyle klinik tarama ve kişiselleştirilmiş tıpta kullanım için uygun olmamaktadır. Bu bağlamda, periferik kan mononükleer kan hücrelerinde biyoenerjetik/mitokondriyal fonksiyonun ölçümü, invaziv olmayan bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır ve kişiselleştirilmiş tıpta umut verici bir rol oynadığı ifade edilmektedir (94). Bu hücrelerde ölçülen metabolik parametrelerin çeşitli hastalıklarda patolojik ve prognostik değer taşıyabileceği belirtilmiş, Biyoenerjetik Sağlık İndeksi bu amaçla geliştirilmiştir (102). Bilgilerimize göre, COVID-19'un BHİ üzerindeki etkisi literatürde ilk kez bu tez çalışmasında değerlendirilmiştir.

Hastaneden akut COVID-19 pozitif hasta örneği toplama aşamasına geçilmeden önce COVID-19 geçirip iyileşmiş bireylerden ve daha önce hiç COVID-19 geçirmemiş sağlıklı kontrol grubundan alınan mononükleer kan hücreleri üzerinde yapılan ön çalışmada, semptomatik COVID-19 geçirip iyileşmiş bireylerin Biyoenerjetik Sağlık İndeksi'nin (BHI) daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgu, akut hasta grubunda daha belirgin farklılıklar olabileceği konusunda bir işaret niteliği taşımakla birlikte, oluşan etkilerin uzun süre kalıcı olabileceğini de göstermiştir. Literatürdeki birçok çalışma COVID-19'un uzun vadeli ve kalıcı etkilerini araştırmaktadır ve uzamış COVID kavramı üzerinde durulmaktadır (30, 119). Örneklem sayımız küçük olsa da ön çalışma verilerimiz COVID-19'un mitokondriyal sağlık ve aktivite üzerindeki kalıcı etkilerinin araştırılmasının önemli olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmanın ilk hipotezini test etmek için yapılan ana mitokondriyal aktivite ölçüm deneyleri, 15 sağlıklı kontrol ve 15 akut semptomatik COVID-19 hastasına ait hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın en güçlü yanlarından biri, grupların cinsiyet, yaş, vücut ağırlığı ve BKİ gibi faktörler açısından dengeli oluşturulmuş olmasıdır. Her iki gruptaki katılımcıların hiçbir ek kronik hastalığı olmayan, sigara kullanmayan bireyler arasından seçilmiş olması da çalışmamızı literatürde benzer çalışmalardan ayırtmakta ve metodolojik güvenilirliğini artırmaktadır. Örneğin, literatürde bu çalışmaya en benzer şekilde mononükleer kan hücrelerinde mitokondriyal aktivite ölçümü yaparak akut COVID hastaları ile sağlıklı kontrolleri karşılaştıran Ajaz ve arkadaşlarının çalışmasında, 9 kişilik kontrol grubunun yaş ortalaması 39 ± 8.2 yıl, 7 kişilik akut hasta grubunun yaş ortalaması ise 66 ± 8.6 yıldır (20). Aynı zamanda 7 kişilik hasta grubunda bazı hastaların diyabet olması dikkate alındığında, mevcut tez çalışmamızın gruplarının yaş, cinsiyet, BKİ, kronik hastalık gibi faktörler açısından daha dengeli ve güvenilir şekilde oluşturulduğu, örnek sayısı açısından da daha güçlü olduğu söylenebilir.

Bu grupların biyokimyasal bulguları incelendiğinde, kontrol ve COVID-19 gruplarından elde edilen verilerin literatürle tutarlı olduğu gözlenmektedir. Çalışmamızda COVID-19 grubunun açlık kan glikoz düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Pandemi boyunca yapılan birçok

çalışma, COVID-19'un bilinen diyabeti olan ve olmayan kişilerde hiperglisemi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (150). Daha önce teşhis edilmemiş diyabet, stres hiperglisemisi, steroid kaynaklı hiperglisemi ve SARS-CoV-2'nin pankreas β hücresi üzerindeki doğrudan veya dolaylı etkileri dahil olmak üzere çeşitli karmaşık süreçlerin hiperglisemi nedenleri arasında olabileceği ifade edilmektedir (151). Ayrıca farklı bir mekanizma olarak ACE2'nin, bağırsakta glikoz emilimini etkileyen SGLT1 aktivitesini düzenlediği, COVID-19 enfeksiyonu sırasında ACE2 ifadesinin azalmasının, SGLT1'in ve bağırsakta glikoz emiliminin artmasına yol açtığı bildirilmiştir (152). Glikoz yükselmelerinin diyabeti olmayan kişilerde bile daha kötü sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (150). Çalışmalar, yüksek kan glikozu seviyesinin insan monositlerinde mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) ve HIF1a tarafından indüklenen aerobik glikoliz yoluyla SARS-CoV-2 replikasyonunu doğrudan artırdığını göstermektedir (153). Bu durumda da hücresel enerji metabolizmasının kritik rol oynadığının altı çizilmiştir.

COVID-19 kaynaklı karaciğer hasarında bulunan başlıca değişiklikler hipoalbüminemi, AST ve ALT düzeylerinde artış olarak tanımlanmaktadır (154). Hasta grubumuzda albümin düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmış, AST ve ALT düzeyleri ise artmıştır. Bulgular hasta grubunda COVID-19 kaynaklı karaciğer hasarının da mevcut olabileceğini göstermektedir. Zerbato ve ark. 876 COVID-19 hastasının 67.8%'inde hipoalbüminemi (<3.5 g/dL) olduğunu ve düşük albümin düzeylerinin mortalite ile korelasyon gösterdiğini saptamıştır (155). Bir metaanalizde incelenen 12,882 COVID-19 hastasını içeren 24 çalışmada, hastaların %41,1'inde AST ve %29,1'inde ALT yüksekliği saptanmış; AST ve ALT yüksekliği, kötü prognozla anlamlı şekilde ilişkilendirilmiştir (156).

COVID-19'da kolesterol seviyeleri, bağışıklık yanıtını ve virüsün hücrelere girişini etkileyebileceğinden hastalığın seyri ve şiddeti üzerinde önemli bir rol oynar (157). Bu tez çalışmasında, sağlıklı kontrol grubu ile COVID-19 grubu arasında total kolesterol, trigliserit, ve LDL düzeyleri arasında fark görülmemiş, HDL düzeylerinin ise COVID-19 grubundan düşük olduğu görülmüştür. Literatürde yüksek serum HDL seviyeleri, daha düşük SARS-CoV-2 enfeksiyon riski ile ilişkilendirilmiş ve COVID-19 hastalarında enfeksiyon anında serum HDL-C ve LDL-C seviyelerinin geçici olarak düştüğü gözlemlenmiştir (158).

COVID-19 hastalarında üre ve kreatinin seviyeleri, böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde önemli biyobelirteçlerdir (159). COVID-19'un ağır seyreden vakalarında akut böbrek hasarı sıkça gözlemlenmektedir. Üre ve kreatinin seviyelerindeki artış, böbreklerin işlevlerini yeterince yerine getiremediğini gösterir ve bu durum, hastalığın prognozunu kötüleştirebilir (160). Bizim çalışmamızda da üre ve kreatinin değerleri COVID-19 grubunda normal aralıkta kalsa da sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha yüksektir.

LDH, laktatı pirüvata dönüştürerek enerji üretiminde rol oynayan ve hemen hemen tüm vücut hücrelerinde bulunan bir enzimdir. En yüksek seviyeleri kalp, karaciğer, akciğerler, kaslar, böbrekler ve kan hücrelerinde görülür (161). LDH, akut veya kronik doku hasarının genel bir göstergesidir ve inflamatuvar bir marker olarak kabul edilir. CRP ise akut inflamasyonun güvenilir bir göstergesidir ve karaciğerde IL-6 ve IL-1 tarafından düzenlenen bir proteindir (162). Yapılan birçok metaanaliz ve çalışmada COVID-19'da CRP ve LDH düzeylerinin arttığı ve prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (161, 163, 164). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde LDH ve CRP seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Özetle, hasta grubumuzun biyokimyasal profilinin, literatürde tanımlanan akut COVID-19 özelliklerini yansıttığı söylenebilir. Devam eden deneylerde bu hastalara ait mononükleer kan hücrelerinin metabolizmaları Mito Stres Testi ve Glikoliz Stres Testi ile incelenmiş ve sağlıklı kontrollere kıyasla profillerinin farklı olduğu görülmüştür. Mitokondriyal aktivite parametreleri incelendiğinde, bazal solunum ve ATP üretimi açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır ancak bu parametrelerin de COVID-19 grubunda azalma eğilimi gösterdiği görülmüştür. Ancak, COVID-19 grubunun maksimal solunum düzeyi ve yedek solunum kapasitesi kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, COVID-19 grubunda proton kaçağı anlamlı şekilde artmıştır. Bu değişiklikler, genel bir indeks olan BHİ'ye yansımış ve COVID-19 grubundaki BHİ'ler, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.

Ajaz ve ark., çalışmamıza benzer şekilde mononükleer kan hücrelerinde Mito Stres Testi uygulayarak daha küçük ve heterojen bir örneklemede akut COVID-19 hastalarını ve sağlıklı kontrolleri karşılaştırmış, bizim bulgularımıza çok benzer

şekilde azalmış ATP üretimi, yedek solunum kapasitesi ve maksimal solunum seviyeleri gözlemlenmiştir (20). Yine aynı çalışmada, glikoliz ile ilişkili olan bazal ECAR düzeyleri COVID-19 hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise tam tersi şekilde, COVID-19 hastalarının hücrelerinde glikoliz, glikolitik kapasite ve glikolitik rezervler daha düşük bulunmuştur. Bu durum literatürdeki COVID-19'un Warburg etkisi benzeri bir etki yarattığı fikrinin de aksini göstermiştir (38). Mononükleer kan hücre popülasyonunun büyük kısmını lenfositler oluşturmaktadır(61). Liu ve ark. yaptıkları çalışmada, akut enfekte COVID-19 hastalarından elde edilen T hücrelerinde, sağlıklı kontrollerden daha düşük glikoliz, azalmış glikolitik kapasite ve azalmış glikolitik rezerv saptamıştır. Sonuçlarımız bu açıdan bu çalışma ile benzerlik göstermektedir (140). Gibellini ve ark. da çalışmamıza benzer şekilde SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastaların monositlerinin mitokondriyal işlev bozukluğu belirtileri gösterdiğini; maksimal solunum, yedek solunum kapasitesi ve bazal ECAR düzeylerinin azaldığını belirlemiştir (22). Leopold ve ark. ise plateletler üzerinde yaptıkları analizlerde, glikoliz metabolitlerinin ve glikozun temel metabolik yollara katılımının azaldığını, genel bir metabolik disfonksiyon olduğunu belirlemişlerdir (165). Yasseen ve ark. yoğun bakımdaki COVID-19 hastalarından aldıkları plateletlere Mito Stres ve Glikoliz Stres testlerini uygulamış ve bizimle aynı şekilde glikoliz ve mitokondriyal solunum aktivitelerinde genel bir azalma görmüştür. Ayrıca, plateletlerin glikolize geçiş yeteneklerinin azaldığını göstermişlerdir (166).

COVID-19 hastalarının serum metabolitlerindeki değişiklikler, viral enfeksiyonun neden olduğu metabolik yeniden programlama hakkında bilgiler sağlamaktadır. Yapılan metabolomik profillemeye çalışmaları, COVID-19 serumunda glikoz, amino asitler ve lipid metabolizmasında dramatik değişiklikleri gösteren işaretler olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada, COVID-19 hastalarının serum örneklerinin, her hastada farklı miktarlarda bulunan IL-6, IL-1, TNF gibi çeşitli iyi bilinen sitokinleri ve bilinmeyen mikroRNA'ları, serbest DNA'ları, veya uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) gibi araçları, viral peptitler ve diğer parçacıkları içermesi gerektiği ve bunların bir araya gelerek COVID-19 benzeri bir etki yaratabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Literatürde, in vitro serum uygulamalarının hastalıkların etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılması ve farklı hücrelerde

COVID-19+ hasta serumu kaynaklı patolojik tepkilerin görülmüş olması bu hipotezi güçlendirmiştir (167–170).

Pseudovirüs kullanımı, SARS-CoV-2'nin etkilerini taklit etmek için tercih edilen bir diğer yaklaşımdır (171). Pseudovirüs, bir virüsün genetik materyali yerine, başka bir genetik materyalle donatılmış, enfeksiyöz fakat çoğalma yeteneği olmayan bir virüs partikülüdür (160). Bu partiküller, genellikle bir virüsün kapsid ve zarf proteinlerini içerir, ancak içerdikleri genetik materyal, doğal virüs genomundan farklıdır ve çoğunlukla deneysel amaçlar için tasarlanmıştır (172). Pseudovirüsler, laboratuvar ortamında güvenli bir şekilde virüs enfeksiyonlarını ve virüs-hücre etkileşimlerini incelemek, aşı ve antikör etkinliğini test etmek için kullanılmaktadır (171, 172). COVID-19'un mitokondriyal aktivite üzerindeki etkilerini mimik etmek amacıyla ise ilk kez bu çalışmada Spike Δ 19 pseudovirüsü kullanılmıştır.

Çalışmada serum ve pseudovirüs müdahalelerinin etkilerinin değerlendirilmesi için bir model ihtiyacı doğmuştur. Bu aşamada MRC-5 insan akciğer fibroblast hücre hattı; insan ve akciğer temelli normal hücreleri temsil etmesi ve iyi doğrulanmış olması nedeniyle uygun bir model olarak tercih edilmiştir. Literatürdeki COVID-19 ile ilişkili bazı çalışmalarda da bu hücre hattı model olarak kullanılmıştır (173, 174). Bortolotti ve ark.'ın çalışmasında MRC-5 hücre hattında ACE2 ekspresyonu bulunduğu ve MRC-5 hücrelerinin, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna duyarlı olduğu gösterilmiştir (146). Bununla birlikte, MRC-5 hücrelerindeki ACE2 ekspresyonu, SARS-CoV-2 enfeksiyonu için daha yüksek bir hassasiyete sahip olan Calu-3 hücrelerine göre daha düşük seviyede bulunmuştur. Bu nedenle viral hassasiyeti arttırmak amacıyla hücrelerdeki ACE2 ekspresyonu artırılarak MRC-5+ACE2 modeli geliştirilmiştir.

Hasta serumu deneylerine ilk olarak sitotoksite çalışmaları ile başlanmıştır. Saygıdeğer ve ark., bronşiyal epitel hücreler, primer akciğer fibroblast hücreleri ve A549 akciğer adenokarsinom hücrelerinde, iki farklı hasta serumu kullanarak sitotoksite testleri yapmış ve hücre canlılığı 24 saat içinde birinci hasta serumu ile %15 konsantrasyonda, ikinci hasta serumu ile %3 konsantrasyonda yarıya düşmüştür (169). Bizim çalışmamızda ise sağlıklı kontrollere ve COVID-19 hastalarına ait serumlar ACE2 ekspresyonu artırılan hücrelerde de MRC-5 WT hücrelerinde de

muamele süresi 48 saat olmasına sitotoksik etki göstermemiştir. Hücre modeli ve hastalar arası farklılık bu sonuca neden olmuş olabilir.

Sitotoksik etki göstermeyen kontrol ve hasta serumlarından BHİ'si en düşük hastalara ait serumlar seçilerek MRC-5+ACE2 hücrelerinin metabolizmaları üzerinde farklı etki oluşturup oluşturmayacakları incelenmiştir. COVID-19 grubuna ait serumlar hem %10 hem de %30 dozunda kullanıldığında kontrol serumlarına kıyasla maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesi üzerinde daha fazla artışa neden olmuştur. Literatürde bu parametrelerin substrat mevcudiyetinden de etkilenebildiği bildirildiği için sonuçların serumların besinsel içeriğinden etkilenme riski göz önünde bulundurulmuştur. Ancak serum dozuna bağlı bir etki görülmemiş olması, bazal solunum ve ATP üretimi ölçümlerinin anlamlı olarak etkilenmemiş olması serum kaynaklı metabolik etkinin viral enfeksiyon kaynaklı farklı faktörler tarafından indüklendiği görüşünü desteklemiştir. Ayrıca kontrol ve hasta grupları arasında da metabolik etkiler açısından fark görülmüştür.

MRC-5+ACE2 hücrelerinde görülen maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesi değişiklikleri, hastalara ait mononükleer kan hücrelerinde görülen değişimlerin tam tersi şekilde oluşmuştur. Bu nedenle aynı serum denemelerinin mononükleer kan hücreleri üzerinde tekrarlanmasına karar verilmiştir. Ve mononükleer kan hücreleri üzerindeki serum kaynaklı metabolik etkiler, bu kez hasta grubunda görülen etkilerle benzer yönde olmuştur. Hem kontrol hem hasta serumlarının etkilerindeki bireysel farklılıklara bağlı heterojenite dikkat çekse de, toplu analizlerde yalnızca COVID-19 grubuna ait serumlar uygulanan hücrelerin bazal solunum, ATP üretimi, maksimal solunum ve proton kaçaklarının anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, hücre modeline bağlı bu farklılıkların tutarlı olduğu görülmüştür. Mozzi ve ark., insan akciğeri kökenli epitel hücre hattı HSAEC1 üzerinde, SARS-CoV-2'ye ait ORF3b'nin oluşturduğu metabolik etkilerin bizim çalışmamızdaki MRC-5+ACE2 hücrelerinin yanıtıyla çok benzer olduğunu göstermiştir. Maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesi artarken, bazal glikoliz azalmıştır (14).

Literatürde SARS-CoV-2'ye ait yalnızca spike proteinine veya farklı proteinlere maruz kalmanın hücrelerde farklı metabolik değişiklikleri indüklediği gösterilse de (142), bizim çalışmamızda SpikeΔ19 pseudovirüsü her iki hücre modelinde de mitokondriyal aktiviteyi değiştirmemiştir. İlginç bir şekilde, Huynh ve ark., AC16 kardiyomiyosit hücrelerini SARS-CoV-2 spike proteininin S1 alt ünitesine 24 saat maruz bıraktıktan sonra hem mitokondriyal hem de glikolitik aktivitede artış olduğunu, maksimal solunumun arttığını göstermiştir. Ancak, S1 ile 48 saat işlem gören hücrelerde OCR değerleri kontrol hücreleriyle aynı bulunmuştur. Öte yandan, S1'e 72 saat maruz bırakılan AC16 hücrelerinde önemli ölçüde daha düşük OCR seviyeleri gözlenmiştir. Bu bulgular, S1'e maruziyetin zamanlamasının kritik olduğunu göstermiştir ve bizim çalışmamızda da maruziyet süresi olarak 48 saatin tercih edilmesi mitokondriyal aktivite üzerindeki olası etkileri görememiş olmamıza neden olmuş olabilir.

Çalışmalarımızın önemli bir hedefi de tek hücre düzeyinde metabolik biyosensör görüntülemelerinin Seahorse XFe96 analiz cihazı ile yapılan ölçümlerle kombine edilmesiydi. Genetik olarak kodlanmış biyosensörler, hücresel metabolizmayı incelemek için güçlü ve çok yönlü bir araçtır (108). Bu sensörler ile geliştirilecek olan multiparametrik tarama yöntemleri Seahorse gibi mevcut teknolojileri tamamlama ve geliştirilecek yeni protokollerle enerji metabolizması ölçümü için başlı başına standart bir yöntem olma potansiyeline sahiptir. Multiparametrik görüntüleme yaklaşımlarının geliştirilmesi için öncelikle karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, glikoz ve ATP sensörlerinin istenen şekilde çalıştıkları gösterilmiştir. Tek kanallı biyosensörlerin pH hassasiyeti gibi sorunlar nedeniyle dikkatli kullanılmaları gerektiği anlaşılmıştır. Pirüvat ve laktat sensörlerinin hassasiyetlerinin bizim hedeflediğimiz metabolik değişiklikleri ölçmek için yeterli olmaması nedeniyle bu sistemin viral enfeksiyonun etkilerini değerlendirmek için kullanımı konusunda ilerlenememiştir.

Alternatif olarak, Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile hücrelerin hücre dışı asidifikasyon oranları ölçüldüğünden, hücre içi pH değişimlerinin takibinin metabolik durum hakkında bilgi verebileceği düşünülmüştür. Karakterizasyonlar sırasında hücre içi pH düzeylerinin metabolik manüpyasyonlar nedeniyle değiştiğinin gözlemlenmesi de bu fikir için yol gösterici olmuştur. Gerçekten de uygulanan protokollerle Seahorse

Glikolitik Test’inde hücre dışında görülen pH değişimlerinin hücre içinde de tamamlayıcı olarak izlenebildiği, benzer test profilinin elde edilebildiği görülmüştür. Seahorse metabolizma ölçüm cihazında gerçekleştirilen Mito Stres testinde hücrelerin oksijen tüketimine odaklanılmaktadır. Bu çalışmada ilk kez Mito Stres Testi protokolü ile de hücre içindeki pH değişimleri takip edilerek spesifik bir test profili elde edilebileceği gösterilmiştir. Ancak metabolik profil farklılıkları doğrulanmış hücrelerde bu testlerin metabolik farklılıkları yansıtmaması, aynı profili göstermesi nedeniyle bu yaklaşım da COVID-19’un metabolik etkilerini değerlendirmek için kullanılamamıştır. Ancak yine de mevcut verilerimiz biyosensör temelli görüntüleme yaklaşımlarının mevcut yöntemlere alternatif olarak umut vaat ettiğini, daha ileri ve spesifik optimizasyonların gerekli olduğunu göstermiştir.

Özetle bu çalışmada, COVID-19’un insan mononükleer kan hücreleri ve akciğer fibroblast hücreleri (MRC-5+ACE2) üzerindeki metabolik etkileri Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile gerçekleştirilen testler aracılığıyla araştırılmıştır. Akut COVID-19 hastalarından ve sağlıklı bireylerden elde edilen mononükleer kan hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen analizler, literatürde ilk kez COVID-19 hastalarının BHİ’lerinin sağlıklı bireylere göre daha düşük olduğunu ortaya koymuştur. Bu fark COVID-19 geçirip iyileşen bireylerin hücrelerinde de gözlemlenmiştir. BHİ’nin hastalık takibinde önemli bir parametre olabileceği görülmüştür. Konak hücrelerdeki metabolik değişiklikler, konağın antiviral yanıtının ya da SARS-CoV-2’nin neden olduğu metabolik yeniden programlamanın sonuçları olabileceğinden mitokondriyal fonksiyondaki değişimleri yorumlamak zorlaşmaktadır. Ancak literatürdeki çalışmaların da desteğiyle, görülen sonuçların SARS-CoV-2 kaynaklı mitokondriyal disfonksiyona veya metabolik yeniden programlamaya bağlı olduğu söylenebilir. Yine de enfeksiyonlarda görülen metabolik bozulmaların sadece patojenin doğrudan etkisi olmayabileceğini, aynı zamanda sistemin buna yanıtı olabileceğini unutmamak gereklidir. Hücreler virüslere yanıt olarak mitokondriyal yapıyı hızla değiştirebileceği gibi, aynı zamanda virüsler de mitokondriyal dinamikleri modüle edebilir.

Hasta serumu denemelerimizin sonuçları da, COVID-19 kaynaklı serum profili farklılıklarının metabolik süreçleri etkileyip akut COVID-19’un hücre üzerindeki

etkilerini mimik edebileceğini, ancak bu etkinin hücre türüne ve ortamına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda biyokimyasal parametreler dışındaki serum bileşenleri incelenmediğinden, etkinin esas kaynağını anlamak mümkün olmamıştır. Pseudovirüs denemelerinde hücrelerin metabolik profilinde farklılık görülmemesi, enfekte hücrelerin salgıladığı faktörlerin veya inflamatuvar yanıtların bu metabolik yanıtları indüklemeye daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak pseudovirüs yerine SARS-CoV-2 virüsünün kendisiyle yapılacak çalışmalar bu konuda daha yol gösterici olacaktır.

Bu bulgular, COVID-19'un hücresel enerji metabolizmasında karmaşık değişikliklere yol açtığını ve bu değişikliklerin hücre tipi ve bağlamına göre farklılık gösterebileceğini göstermektedir. Araştırmamız, COVID-19'un hücresel metabolizmayı nasıl etkilediğini anlamak ve potansiyel tedavi hedeflerini belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. Ayrıca, metabolik değişimlerin uzun vadeli etkilerinin anlaşılması ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için ileri araştırmaların önemi ortaya konulmuştur.

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. İlk olarak, deneylerimizde COVID-19 pandemisinin belirli bir döneminde toplanan hasta hücre ve serumları kullanılmıştır ve diğer varyantların farklı etkiler gösterebileceği olasılığı göz ardı edilmemelidir. Hücrelerin dondurularak kullanılması diğer bir sınırlılık olmuştur ancak kontrol hücrelerinin hasta örneklerine paralel zamanlarda dondurulması ile dondurma kaynaklı olası etkiler eşitlenmeye çalışılmıştır. COVID-19 hasta serumlarının bazı metabolik etkileri tespit edilse de gözlemlenen etkileri belirleyen serum faktörleri tespit edilmemiştir. Son olarak, serumların ve SpikeΔ19 pseudovirüsünün etkileri izole hücre modellerinde test edilmiştir ancak, COVID-19'un neden olduğu metabolik ve fizyolojik değişimler birçok hücre türü arasında karmaşık ve dinamik bir etkileşimi içermektedir bu nedenle sistemik bir genelleme yapmak mümkün olamamaktadır.

8. SONUÇ

Bu tez çalışmasının sonuçları, COVID-19'un metabolik etkilerini anlamak ve mitokondri hedefli tedavi stratejileri geliştirmek açısından önemli ipuçları sunmaktadır. Bulgularımız, akut COVID-19 enfeksiyonunun insan mononükleer kan hücrelerinde önemli metabolik ve biyoenerjetik değişikliklere yol açtığını göstermiştir. BHİ, hastalığın seyrini izlemek için değerli bir araç olarak ortaya çıkmıştır ve bu indeksteki değişimlerin, hastalığın hem akut evresinde hem de iyileşme sürecinde izlenebileceği görülmüştür.

Gelecekteki araştırmalar, bu bulguları daha geniş hasta gruplarında doğrulamalı ve BHİ'nin enfeksiyonların teşhis ve tedavisinde klinik bir araç olarak kullanılma potansiyelini araştırmalıdır. COVID-19'un metabolik sonuçlarını anlamak, sadece hastalığın mekanizmalarını aydınlatmak için değil, aynı zamanda hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından da büyük önem taşımaktadır.

Mitokondriyal işlevi hedefleyen terapötik stratejilerin geliştirilmesi COVID-19 ve benzeri enfeksiyonların yönetiminde yeni yaklaşımlar sunabilir. Mitokondri sağlığını güçlendirmeye yönelik ilaç, egzersiz ve diyet tedavileri gibi stratejiler, COVID-19'un kalıcı etkilerini ve uzamış COVID sendromunu hafifletmede önemli olabilir. Bu nedenle, mitokondriyal sağlığa odaklanmak hem mevcut hastalık yönetimi hem de gelecekteki pandemilere hazırlık açısından kritik bir öneme sahiptir.

9. KAYNAKLAR

1. Wu Y-C, Chen C-S, Chan Y-J. The outbreak of COVID-19: An overview. *Journal of the Chinese Medical Association*. 83(3):217–20, 2020.
2. Bhattacharya S, Smark C, Mir M. Covid 19: Social, Financial and Economic Implications. *Australasian Accounting Business and Finance Journal*. 15(1):1–4, 2021.
3. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *Journal of Infection*. 80(6):607–13, 2020.
4. Cheng, J. L., Huang, C., Zhang, G. J., Liu, D. W., Li, P., Lu, C. Y., & Li, J. Epidemiological characteristics of novel coronavirus pneumonia in Henan. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua jiehe he huxi zazhi= Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 43(4):327-331, 2020.
5. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 395(10223):497–506, 2020.
6. Mohamed S, Saad K, Elgohary G, AbdelHafez A, El-Aziz NA. Is COVID-19 a Systemic Disease? *Coronaviruses*. 2(5):4–8, 2021.
7. Lipman D, Safo SE, Chekouo T. Multi-omic analysis reveals enriched pathways associated with COVID-19 and COVID-19 severity. *PLoS One*. 17(4):e0267047, 2022.
8. Nie X, Qian L, Sun R, et al. Multi-organ proteomic landscape of COVID-19 autopsies. *Cell*. 184(3):775-791.e14, 2021.
9. Buyukozkan M, Alvarez-Mulett S, Racanelli AC, et al. Integrative metabolomic and proteomic signatures define clinical outcomes in severe COVID-19. *iScience*. 25(7):104612, 2022.
10. Ayres JS. A metabolic handbook for the COVID-19 pandemic. *Nat Metab*. 2(7):572–85, 2020.
11. Shen T, Wang T. Metabolic Reprogramming in COVID-19. *Int J Mol Sci*. 22(21):11475, 2021.

12. Chen P, Wu M, He Y, Jiang B, He M-L. Metabolic alterations upon SARS-CoV-2 infection and potential therapeutic targets against coronavirus infection. *Signal Transduct Target Ther.* 8(1):237, 2023.
13. Singh KK, Chaubey G, Chen JY, Suravajhala P. Decoding SARS-CoV-2 hijacking of host mitochondria in COVID-19 pathogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 319(2):C258–67, 2020.
14. Mozzi A, Oldani M, Forcella ME, et al. SARS-CoV-2 ORF3c impairs mitochondrial respiratory metabolism, oxidative stress, and autophagic flux. *iScience.* 26(7):107118, 2023.
15. Li X, Hou P, Ma W, et al. SARS-CoV-2 ORF10 suppresses the antiviral innate immune response by degrading MAVS through mitophagy. *Cell Mol Immunol.* 19(1):67–78, 2022.
16. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells.* 8(7):680, 2019.
17. Madeddu E, Maniga B, Zaffanello M, Fanos V, Marcialis A. The SARS-CoV2 and mitochondria: the impact on cell fate. *Acta Biomed.* 93(2):e2022199, 2022.
18. Shang C, Liu Z, Zhu Y, et al. SARS-CoV-2 Causes Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy Impairment. *Front Microbiol.* 12:780768, 2021.
19. Protasoni M, Zeviani M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *Int J Mol Sci.* 22(2):586, 2021.
20. Ajaz, S., McPhail, M. J., Singh, K. K., Mujib, S., Trovato, F. M., Napoli, S., & Agarwal, K. Mitochondrial metabolic manipulation by SARS-CoV-2 in peripheral blood mononuclear cells of patients with COVID-19. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2021.
21. Liu X, Zhao J, Wang H, et al. Metabolic Defects of Peripheral T Cells in COVID-19 Patients. *The Journal of Immunology.* 206(12):2900–8, 2021.
22. Gibellini L, De Biasi S, Paolini A, et al. Altered bioenergetics and mitochondrial dysfunction of monocytes in patients with COVID-19 pneumonia. *EMBO Mol Med*

[Internet]. 12(12) 2020. <https://www.embopress.org/doi/10.15252/emmm.202013001>. doi:10.15252/emmm.202013001.

23. Conte C, Cipponeri E, Roden M. Diabetes Mellitus, Energy Metabolism, and COVID-19. *Endocr Rev*. 45(2):281–308, 2024.

24. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol*. 61(3):180–202, 2021.

25. Ciotti M, Ciccozzi M, Terrinoni A, Jiang W-C, Wang C-B, Bernardini S. The COVID-19 pandemic. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 57(6):365–88, 2020.

26. Asadi-Pooya AA, Nemati H, Shahisavandi M, et al. Long COVID in children and adolescents. *World Journal of Pediatrics*. 17(5):495–9, 2021.

27. Padhan R, Prabheesh KP. The economics of COVID-19 pandemic: A survey. *Econ Anal Policy*. 70:220–37, 2021.

28. Daniel SJ. Education and the COVID-19 pandemic. *Prospects (Paris)*. 49(1–2):91–6, 2020.

29. Lippi G, Mattiuzzi C, Henry BM. Updated picture of SARS-CoV-2 variants and mutations. *Diagnosis (Berl)*. 9(1):11–7, 2021.

30. Lippi G, Sanchis Gomar F, Henry BM. COVID-19 and its long-term sequelae: what do we know in 2023? *Pol Arch Intern Med [Internet]*. 2023 [cited 2024 Mar 5]. <https://www.mp.pl/paim/issue/article/16402>. doi:10.20452/pamw.16402.

31. Saif LJ, Wang Q, Vlasova AN, Jung K, Xiao S. Coronaviruses. *Diseases of Swine*. Wiley; 2019. p. 488–523.

32. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses: Methods and Protocols*. Springer New York; 2015. p. 1–23. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2438-7_1.

33. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*. 295(37):12910–34, 2020.

34. Liu J, Xie W, Wang Y, et al. A comparative overview of COVID-19, MERS and SARS: Review article. *International Journal of Surgery*. 81:1–8, 2020.
35. Wu S-Y, Fu T, Jiang Y-Z, Shao Z-M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*. 19(1):120, 2020.
36. Murgolo N, Therien AG, Howell B, et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. *PLoS Pathog*. 17(2):e1009225, 2021.
37. Lehmann M, Allers K, Heldt C, et al. Human small intestinal infection by SARS-CoV-2 is characterized by a mucosal infiltration with activated CD8⁺ T cells. *Mucosal Immunol*. 14(6):1381–92, 2021.
38. Naidu AS, Wang C-K, Rao P, et al. Precision nutrition to reset virus-induced human metabolic reprogramming and dysregulation (HMRD) in long-COVID. *NPJ Sci Food*. 8(1):19, 2024.
39. McCann N, Castellino FJ. Cell Entry and Unusual Replication of SARS-CoV-2. *Curr Drug Targets*. 23(17):1539–54, 2022.
40. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23(1):3–20, 2022.
41. Peng R, Wu L-A, Wang Q, Qi J, Gao GF. Cell entry by SARS-CoV-2. *Trends Biochem Sci*. 46(10):848–60, 2021.
42. Suryawanshi RK, Koganti R, Agelidis A, Patil CD, Shukla D. Dysregulation of Cell Signaling by SARS-CoV-2. *Trends Microbiol*. 29(3):224–37, 2021.
43. Liu J, Li Y, Liu Q, et al. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. *Cell Discov*. 7(1):17, 2021.
44. Bradley BT, Maioli H, Johnston R, et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *The Lancet*. 396(10247):320–32, 2020.
45. Cagno V. SARS-CoV-2 cellular tropism. *Lancet Microbe*. 1(1):e2–3, 2020.

46. Dong M, Zhang J, Ma X, et al. ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 131:110678, 2020.
47. Bailey AL, Dmytrenko O, Greenberg L, et al. SARS-CoV-2 Infects Human Engineered Heart Tissues and Models COVID-19 Myocarditis. *JACC Basic Transl Sci*. 6(4):331–45, 2021.
48. Dolhnikoff M, Ferreira Ferranti J, de Almeida Monteiro RA, et al. SARS-CoV-2 in cardiac tissue of a child with COVID-19-related multisystem inflammatory syndrome. *Lancet Child Adolesc Health*. 4(10):790–4, 2020.
49. Tavazzi G, Pellegrini C, Maurelli M, et al. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail*. 22(5):911–5, 2020.
50. Zhao B, Ni C, Gao R, et al. Recapitulation of SARS-CoV-2 infection and cholangiocyte damage with human liver ductal organoids. *Protein Cell*. 11(10):771–5, 2020.
51. Su H, Yang M, Wan C, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int*. 98(1):219–27, 2020.
52. Wanner N, Andrieux G, Badia-i-Mompel P, et al. Molecular consequences of SARS-CoV-2 liver tropism. *Nat Metab*. 4(3):310–9, 2022.
53. Braun F, Lütgehetmann M, Pfefferle S, et al. SARS-CoV-2 renal tropism associates with acute kidney injury. *The Lancet*. 396(10251):597–8, 2020.
54. Neuberger M, Jungbluth A, Irlbeck M, et al. Duodenal tropism of SARS-CoV-2 and clinical findings in critically ill COVID-19 patients. *Infection*. 50(5):1111–20, 2022.
55. Lehmann M, Allers K, Heldt C, et al. Human small intestinal infection by SARS-CoV-2 is characterized by a mucosal infiltration with activated CD8⁺ T cells. *Mucosal Immunol*. 14(6):1381–92, 2021.
56. Weissert R. Nervous system-related tropism of SARS-CoV-2 and autoimmunity in COVID-19 infection. *Eur J Immunol*. 54(1):2250230, 2024.

57. Andrews MG, Mukhtar T, Eze UC, et al. Tropism of SARS-CoV-2 for human cortical astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 119(30), 2022.
58. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *Journal of Experimental Medicine* 217(12), 2020.
59. Ferreira, AC, Soares, VC, de Azevedo-Quintanilha, IG, Dias, SDSG, Fintelman-Rodrigues, N., Sacramento, CQ et al. SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. *Cell death discovery*. 7(1):43, 2021.
60. Kleiveland, CR. Peripheral blood mononuclear cells. The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models, 161-167, 2015.
61. Betsou F, Gaignaux A, Ammerlaan W, Norris PJ, Stone M. Biospecimen Science of Blood for Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Functional Applications. *Curr Pathobiol Rep*. 7(2):17–27, 2019.
62. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*. 42(4):607–12, 2015.
63. Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu Rev Immunol*. 30(1):221–41, 2012.
64. Maus M V., Fraietta JA, Levine BL, Kalos M, Zhao Y, June CH. Adoptive Immunotherapy for Cancer or Viruses. *Annu Rev Immunol*. 32(1):189–225, 2014.
65. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A*. 85(1):36–42, 2014.
66. Cassioli, C., & Baldari, C. T. (2022). The expanding arsenal of cytotoxic T cells. *Frontiers in immunology*. 13, 883010.
67. Busch DH, Fräßle SP, Sommermeyer D, Buchholz VR, Riddell SR. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Semin Immunol*. 28(1):28–34, 2016.
68. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol*. 30(1):531–64, 2012.

69. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res.* 4(9):721–5, 2016.
70. Wu S-Y, Fu T, Jiang Y-Z, Shao Z-M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer.* 19(1):120, 2020.
71. Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, Santoni A. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26(2):113–20, 2015.
72. Wacleche V, Tremblay C, Routy J-P, Ancuta P. The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis. *Viruses.* 10(2):65, 2018.
73. Hume DA, Irvine KM, Pridans C. The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. *Trends Immunol.* 40(2):98–112, 2019.
74. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 12(4):e0176460, 2017.
75. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol.* 106(2):309–22, 2019.
76. Knoll R, Schultze JL, Schulte-Schrepping J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. *Front Immunol.* 12:720109, 2021.
77. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* 234(1):45–54, 2010.
78. Cabeza-Cabrero M, Cardoso A, Minutti CM, Pereira da Costa M, Reis e Sousa C. Dendritic Cells Revisited. *Annu Rev Immunol.* 39(1):131–66, 2021.
79. Pontelli MC, Castro ÍA, Martins RB, et al. SARS-CoV-2 productively infects primary human immune system cells in vitro and in COVID-19 patients. *J Mol Cell Biol.* 14(4), 2022.
80. Ji W, Tang X, Du W, et al. Optical/electrochemical methods for detecting mitochondrial energy metabolism. *Chem Soc Rev.* 51(1):71–127, 2022.

81. Yang X, Heinemann M, Howard J, et al. Physical bioenergetics: Energy fluxes, budgets, and constraints in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 118(26):e2026786118, 2021.
82. Rigoulet M, Bouchez CL, Paumard P, et al. Cell energy metabolism: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1861(11):148276, 2020.
83. Korla K, Mitra CK. Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. *J Biomol Struct Dyn*. 32(2):242–56, 2014.
84. Chaudhry R, Varacallo M. Biochemistry, glycolysis. 2018. <https://europepmc.org/article/nbk/nbk482303>.
85. Korla K, Mitra CK. Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. *J Biomol Struct Dyn*. 32(2):242–56, 2014.
86. Tang JX, Thompson K, Taylor RW, Oláhová M. Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways. *Int J Mol Sci*. 21(11):3820, 2020.
87. Cogliati S, Calvo E, Loureiro M, et al. Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. *Nature*. 539(7630):579–82, 2016.
88. Castellani CA, Longchamps RJ, Sun J, Guallar E, Arking DE. Thinking outside the nucleus: Mitochondrial DNA copy number in health and disease. *Mitochondrion*. 53:214–23, 2020.
89. Herst PM, Rowe MR, Carson GM, Berridge M V. Functional Mitochondria in Health and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 8:296, 2017.
90. Cedíkova M, Pítule P, Kripnerova M, Markova M, Kuncova J. Multiple Roles of Mitochondria in Aging Processes. *Physiol Res*. 65:519–31, 2016.
91. Harrington, JS, Ryter, SW, Plataki, M, Price, DR, & Choi, AM. Mitochondria in health, disease, and aging. *Physiological reviews*, 103(4), 2349-2422, 2023.
92. Brillo V, Chieragato L, Leanza L, Muccioli S, Costa R. Mitochondrial Dynamics, ROS, and Cell Signaling: A Blended Overview. *Life*. 11(4):332, 2021.

93. Hernansanz-Agustín P, Enríquez JA. Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *Antioxidants*. 10(3):415, 2021.
94. Abate M, Festa A, Falco M, et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Semin Cell Dev Biol*. 98:139–53, 2020.
95. Garbincius JF, Elrod JW. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiol Rev*. 102(2):893–992, 2022.
96. Pelletier M, Billingham LK, Ramaswamy M, Siegel RM. Extracellular Flux Analysis to Monitor Glycolytic Rates and Mitochondrial Oxygen Consumption. *Methods in enzymology*. Academic Press; p. 125–49, 2014.
97. Zhang J, Zhang Q. Using Seahorse Machine to Measure OCR and ECAR in Cancer Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. *Methods Mol Biol*; 353–63, 2019.
98. Jaber SM, Yadava N, Polster BM. Mapping mitochondrial respiratory chain deficiencies by respirometry: Beyond the Mito Stress Test. *Exp Neurol*. 328:113282, 2020.
99. Gu X, Ma Y, Liu Y, Wan Q. Measurement of mitochondrial respiration in adherent cells by Seahorse XF96 Cell Mito Stress Test. *STAR Protoc*. 2(1):100245, 2021.
100. TeSlaa T, Teitell MA. Techniques to Monitor Glycolysis. Elsevier. 2014. p. 91–114.
101. Bernardino RL, Braga PC, Oliveira PF, Alves MG. Determination of glycolysis flux by extracellular flux measurements. *Glycolysis*. Elsevier; 2024. p. 443–54.
102. Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, et al. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clin Sci*. 127(6):367–73, 2014.
103. Chacko BK, Zhi D, Darley-USmar VM, Mitchell T. The Bioenergetic Health Index is a sensitive measure of oxidative stress in human monocytes. *Redox Biol*. 8:43–50, 2016.
104. Simon L, Molina PE. Cellular Bioenergetics: Experimental Evidence for Alcohol-induced Adaptations. *Function (Oxf)*. 3(5):zqac039, 2022.

105. Czajka A, Ajaz S, Gnudi L, et al. Altered Mitochondrial Function, Mitochondrial DNA and Reduced Metabolic Flexibility in Patients With Diabetic Nephropathy. *EBioMedicine*. 2(6):499–512, 2015.
106. Bakare AB, Dean J, Chen Q, et al. Evaluating the Bioenergetics Health Index Ratio in Leigh Syndrome Fibroblasts to Understand Disease Severity. *Int J Mol Sci*. 22(19):10344, 2021.
107. Kim H, Ju J, Lee HN, Chun H, Seong J. Genetically Encoded Biosensors Based on Fluorescent Proteins. *Sensors*. 21(3):795, 2021.
108. Wang M, Da Y, Tian Y. Fluorescent proteins and genetically encoded biosensors. *Chem Soc Rev*. 52(4):1189–214, 2023.
109. San Martín A, Arce-Molina R, Aburto C, et al. Visualizing physiological parameters in cells and tissues using genetically encoded indicators for metabolites. *Free Radic Biol Med*. 182:34–58, 2022.
110. Choe M, Titov D V. Genetically encoded tools for measuring and manipulating metabolism. *Nat Chem Biol*. 18(5):451–60, 2022.
111. Müller-Schüssele SJ, Schwarzländer M, Meyer AJ. Live monitoring of plant redox and energy physiology with genetically encoded biosensors. *Plant Physiol*. 186(1) 2021.
112. Rogers JK, Taylor ND, Church GM. Biosensor-based engineering of biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol*. 42:84–91, 2016.
113. Koo K-M, Kim C-D, Kim T-H. Recent Advances in Electrochemical Detection of Cell Energy Metabolism. *Biosensors (Basel)*. 14(1):46, 2024.
114. Koberstein JN, Stewart ML, Smith CB, et al. Monitoring glycolytic dynamics in single cells using a fluorescent biosensor for fructose 1,6-bisphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 119(31), 2022.
115. Tantama M, Martínez-François JR, Mongeon R, Yellen G. Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nat Commun*. 4(1):2550, 2013.

116. Mita M, Sugawara I, Harada K, et al. Development of red genetically encoded biosensor for visualization of intracellular glucose dynamics. *Cell Chem Biol.* 29(1):98-108.e4, 2022.
117. Depaoli MR, Karsten F, Madreiter-Sokolowski CT, et al. Real-Time Imaging of Mitochondrial ATP Dynamics Reveals the Metabolic Setting of Single Cells. *Cell Rep.* 25(2):501-512.e3, 2018.
118. Thaker SK, Ch'ng J, Christofk HR. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol.* 17(1):59, 2019.
119. Nunn AVW, Guy GW, Brysch W, Bell JD. Understanding Long COVID; Mitochondrial Health and Adaptation—Old Pathways, New Problems. *Biomedicines.* 10(12):3113, 2022.
120. Wang T, Cao Y, Zhang H, et al. COVID-19 metabolism: Mechanisms and therapeutic targets. *MedComm (Beijing).* 3(3):e157, 2022.
121. Wu ST, Liu B, Ai ZZ, et al. Esculetin Inhibits Cancer Cell Glycolysis by Binding Tumor PGK2, GPD2, and GPI. *Front Pharmacol.* 11, 2020.
122. Chang Y-C, Yang Y-C, Tien C-P, Yang C-J, Hsiao M. Roles of Aldolase Family Genes in Human Cancers and Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 29(8):549–59, 2018.
123. Shi D, Yan R, Lv L, et al. The serum metabolome of COVID-19 patients is distinctive and predictive. *Metabolism.* 118:154739, 2021.
124. Caterino M, Costanzo M, Fedele R, et al. The Serum Metabolome of Moderate and Severe COVID-19 Patients Reflects Possible Liver Alterations Involving Carbon and Nitrogen Metabolism. *Int J Mol Sci.* 22(17):9548, 2021.
125. Gu M, Pan H, Yuan Y, et al. Sera Metabolomics Characterization of Patients at Different Stages in Wuhan Identifies Critical Biomarkers of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol.* 12:882661, 2022.

126. Xiao N, Nie M, Pang H, et al. Integrated cytokine and metabolite analysis reveals immunometabolic reprogramming in COVID-19 patients with therapeutic implications. *Nat Commun.* 12(1):1618, 2021.
127. Shen B, Yi X, Sun Y, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell.* 182(1):59-72.e15, 2020.
128. Jia H, Liu C, Li D, et al. Metabolomic analyses reveal new stage-specific features of COVID-19. *European Respiratory Journal.* 59(2):2100284, 2022.
129. Shoraka S, Samarasinghe AE, Ghaemi A, Mohebbi SR. Host mitochondria: more than an organelle in SARS-CoV-2 infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 13:1228275, 2023.
130. Wu KE, Fazal FM, Parker KR, Zou J, Chang HY. RNA-GPS Predicts SARS-CoV-2 RNA Residency to Host Mitochondria and Nucleolus. *Cell Syst.* 11(1):102-108.e3, 2020.
131. Singh Y, Gupta G, Kazmi I, et al. SARS CoV-2 aggravates cellular metabolism mediated complications in COVID-19 infection. *Dermatol Ther.* 33(6), 2020.
132. Chan DC. Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22(1):79–99, 2006.
133. Duan C, Ma R, Zeng X, et al. SARS-CoV-2 Achieves Immune Escape by Destroying Mitochondrial Quality: Comprehensive Analysis of the Cellular Landscapes of Lung and Blood Specimens From Patients With COVID-19. 13, 2022.
134. Westermann, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(10), 1833-1838, 2012.
135. Akbari H, Taghizadeh-Hesary F. COVID-19 induced liver injury from a new perspective: Mitochondria. *Mitochondrion.* 70:103–10, 2023.
136. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol.* 18(5):488–98, 2017.

137. Deng J, Zheng S, Xiao Y, et al. SARS-CoV-2 NSP8 suppresses type I and III IFN responses by modulating the RIG-I/MDA5, TRIF, and STING signaling pathways. *J Med Virol* [Internet]. 95(4), 2023.
138. Zotta A, Hooftman A, O'Neill LAJ. SARS-CoV-2 targets MAVS for immune evasion. *Nat Cell Biol*. 23(7):682–3, 2021.
139. Miller B, Silverstein A, Flores M, et al. Host mitochondrial transcriptome response to SARS-CoV-2 in multiple cell models and clinical samples. *Scientific Reports* 2021 11:1. 11(1):1–10, 2021.
140. Liu X, Zhao J, Wang H, et al. Metabolic Defects of Peripheral T Cells in COVID-19 Patients. *The Journal of Immunology*. 206(12):2900–8, 2021.
141. Palasiewicz K, Umar S, Romay B, Zomorodi RK, Shahrara S. Tofacitinib therapy intercepts macrophage metabolic reprogramming instigated by SARS-CoV-2 Spike protein. *Eur J Immunol* [Internet]. 51(9) 2021. doi:10.1002/eji.202049159.
142. Kim ES, Jeon M-T, Kim K-S, Lee S, Kim S, Kim D-G. Spike Proteins of SARS-CoV-2 Induce Pathological Changes in Molecular Delivery and Metabolic Function in the Brain Endothelial Cells. *Viruses*. 13(10):2021, 2021.
143. Cory TJ, Emmons RS, Yarbrow JR, Davis KL, Pence BD. Metformin Suppresses Monocyte Immunometabolic Activation by SARS-CoV-2 Spike Protein Subunit 1. *Front Immunol* [Internet]. 12, 2021.
144. Clough E, Inigo J, Chandra D, et al. Mitochondrial Dynamics in SARS-COV2 Spike Protein Treated Human Microglia: Implications for Neuro-COVID. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 16(4):770–84, 2021.
145. Zekri-Nechar K, Zamorano-León JJ, Reche C, et al. Spike Protein Subunits of SARS-CoV-2 Alter Mitochondrial Metabolism in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells: Involvement of Factor Xa. *Dis Markers*. 2022:1–11, 2022.
146. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, et al. Tlr3 and tlr7 rna sensor activation during sars-cov-2 infection. *Microorganisms*. 9(9):1820, 2021.

147. Sarker R, Roknuzzaman ASM, Nazmunnahar, Shahriar M, Hossain MdJ, Islam MdR. The WHO has declared the end of pandemic phase of COVID-19: Way to come back in the normal life. *Health Sci Rep*. 6(9):e1544, 2023.
148. Levitt DE, Ferguson TF, Primeaux SD, et al. Skeletal muscle bioenergetic health and function in people living with HIV: association with glucose tolerance and alcohol use. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 321(5):R781–90, 2021.
149. Huang S-H, Lin Y-W. Bioenergetic Health Assessment of a Single *Caenorhabditis elegans* from Postembryonic Development to Aging Stages via Monitoring Changes in the Oxygen Consumption Rate within a Microfluidic Device. *Sensors*. 18(8):2453, 2018.
150. Khunti K, Del Prato S, Mathieu C, Kahn SE, Gabbay RA, Buse JB. COVID-19, Hyperglycemia, and New-Onset Diabetes. *Diabetes Care*. 44(12):2645–55, 2021.
151. Geetha HS, Singh G, Sekar A, et al. Hyperglycemia in COVID-19 infection without diabetes mellitus: Association with inflammatory markers. *World J Clin Cases*. 11(6):1287–98, 2023.
152. Koufakis T, Metallidis S, Zebekakis P, Kotsa K. Intestinal SGLT1 as a therapeutic target in COVID-19-related diabetes: A “two-edged sword” hypothesis. *Br J Clin Pharmacol*. 87(10):3643–6, 2021.
153. Codo AC, Davanzo GG, Monteiro L de B, et al. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metab*. 32(3):437-446.e5, 2020.
154. Wagner J, Garcia-Rodriguez V, Yu A, et al. Elevated transaminases and hypoalbuminemia in Covid-19 are prognostic factors for disease severity. *Sci Rep*. 11(1):10308, 2021.
155. Zerbato V, Sanson G, De Luca M, et al. The Impact of Serum Albumin Levels on COVID-19 Mortality. *Infect Dis Rep*. 14(3):278–86, 2022.

156. Sharma A, Jaiswal P, Kerakhan Y, et al. Liver disease and outcomes among COVID-19 hospitalized patients – A systematic review and meta-analysis. *Ann Hepatol.* 21:100273, 2021.
157. Kočar E, Režen T, Rozman D. Cholesterol, lipoproteins, and COVID-19: Basic concepts and clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1866(2):158849, 2021.
158. Chidambaram V, Kumar A, Majella MG, et al. HDL cholesterol levels and susceptibility to COVID-19. *EBioMedicine.* 82:104166, 2022.
159. Nogueira SÁR, Oliveira SCS de, Carvalho AFM de, et al. Renal changes and acute kidney injury in covid-19: a systematic review. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 66Suppl 2(Suppl 2):112–7, 2020.
160. Temiz MZ, Hacibey I, Yazar RO, et al. Altered kidney function induced by SARS-CoV-2 infection and acute kidney damage markers predict survival outcomes of COVID-19 patients: a prospective pilot study. *Ren Fail.* 44(1):233–40, 2022.
161. Poggiali E, Zaino D, Immovilli P, et al. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in CoVID-19 patients. *Clinica Chimica Acta.* 509:135–8, 2020.
162. Khadzhieva MB, Gracheva AS, Belopolskaya OB, et al. Serial Changes in Blood-Cell-Count-Derived and CRP-Derived Inflammatory Indices of COVID-19 Patients. *Diagnostics.* 13(4):746, 2023.
163. Malik P, Patel U, Mehta D, et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid Based Med.* 26(3):107–8, 2021.
164. Wang L, Yang LM, Pei SF, et al. CRP, SAA, LDH, and DD predict poor prognosis of coronavirus disease (COVID-19): a meta-analysis from 7739 patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 81(8):679–86, 2021.
165. Léopold V, Chouchane O, Butler JM, et al. Platelets of COVID-19 patients display mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and energy metabolism failure compatible with cell death. *Res Pract Thromb Haemost.* 7(7):102213, 2023.

166. Yasseen BA, Elkhodiry AA, El-Messierly RM, et al. Platelets' morphology, metabolic profile, exocytosis, and heterotypic aggregation with leukocytes in relation to severity and mortality of COVID-19-patients. *Front Immunol* [Internet]. 13, 2022.
167. Flaskamp L, Roubal C, Uddin S, et al. Serum of Post-COVID-19 Syndrome Patients with or without ME/CFS Differentially Affects Endothelial Cell Function In Vitro. *Cells*. 11(15):2376, 2022.
168. Viecei Dalla Sega F, Fortini F, Licastro D, et al. Serum from COVID-19 patients promotes endothelial cell dysfunction through protease-activated receptor 2. *Inflammation Research*. 73(1):117–30, 2024.
169. Saygideger Y, Sezan A, Candevir A, et al. COVID-19 patients' sera induce epithelial mesenchymal transition in cancer cells. *Cancer Treat Res Commun*. 28:100406, 2021.
170. Joffre J, Rodriguez L, Matthay ZA, et al. COVID-19-associated Lung Microvascular Endotheliopathy A “From the Bench” Perspective. *Am J Respir Crit Care Med*. 206(8):961–72, 2022.
171. Huang Y, Borisov O, Kee JJ, et al. Calibration of two validated SARS-CoV-2 pseudovirus neutralization assays for COVID-19 vaccine evaluation. *Sci Rep*. 11(1):23921, 2021.
172. Xiang Q, Li L, Wu J, Tian M, Fu Y. Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies. *Microbiol Res*. 258:126993, 2022.
173. Ping YH, Yeh H, Chu LW, et al. The Traditional Chinese Medicine Formula Jing Guan Fang for Preventing SARS-CoV-2 Infection: From Clinical Observation to Basic Research. *Front Pharmacol*. 13:744439, 2022.
174. Han H, Kim J-E, Lee H-J. Effect of apigenin in pseudo-SARS-CoV-2-induced inflammatory and pulmonary fibrosis in vitro model. *Sci Rep*. 14(1):14545, 2024.

10. ETİK KURUL ONAYI

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Sayı : E-10840098-772.02-1747
Konu: Etik Kurulu Kararı

12/03/2022

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Eski Başlık: COVID-19 Enfeksiyonunun Periferik Kan Hücrelerinin Metabolizması Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması Yeni Başlık: COVID-19 Enfeksiyonunun Metabolik Etkilerinin Araştırılması”			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	ŞEYMA ÇİMEN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Araştırmacı / Diyetisyen			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 091D6740X4 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Sa



İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞİŞİKLİKLER	DİĞER:	1: Çalışma adının "COVID-19 Enfeksiyonunun Metabolik Etkilerinin Araştırılması" olarak değiştirilmesi isteği.		
Karar Bilgileri	Karar No:236	Tarih: 09/03/2022		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna " oybirliği " ile karar verilmiştir.			

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınıza <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 091D6740X4 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ	Tıp Tarihi ve Etik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Uygundur
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Uygundur
Doç. Dr. Mehmet Kemal ÖZDEMİR	Elektrik ve Elektronik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Uygundur
Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Uygundur
Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Uygundur
Dr. Öğr. Üyesi Neziha HACIHASANOĞLU ÇAKMAK	Biyokimya	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Uygundur
Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	Tıbbi Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Uygundur

* :Toplantıda Bulunma

Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Sekreteri
Bilge KAYA

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 091D6740X4 kodu ile doğrulayabilirsiniz.