



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

SAMSUN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

ACİL TIP ANABİLİM DALI

**ACİL SERVİSE BAŞVURAN COVID-19 HASTALARINDA CLAUDIN-5
DÜZEYLERİNİN TANI VE PROGNOZDAKİ YERİ**

Dr. Ahmet Yatur

TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN-2021



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

SAMSUN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

ACİL TIP ANABİLİM DALI

**ACİL SERVİSE BAŞVURAN COVID-19 HASTALARINDA CLAUDIN-5
DÜZEYLERİNİN TANI VE PROGNOZDAKİ YERİ**

Dr. Ahmet Yatır

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Murat Yücel

TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN-2021

TEŞEKKÜR

Hekimlik sanatını öğrenmemde emeği geçen tüm hocalarıma,

Asistanlık ve tez yazım sürecime destek olan hocalarım Doç. Dr. Murat Yücel, Doç.

Dr. Murat Güzel ve Dr. Öğretim yesi Metin Yadigaroğlu'na,

Yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Selim Grgn'e,

Birlikte keyifle çalıştığım asistan arkadaşlarım ve tüm acil tıp ekibimize,

Çok yoğun çalışmasına rağmen desteğini sürekli hissettiğim eşime,

Çok sevdiğim kızım Deniz ve oğlum Janberk'e,

Her daim yanımda olan ailem annem ve babama teşekkürlerimle...

KISALTMALAR

ACE-2	:	Angiotensin converting enzyme-2
ARDS	:	Acute respiratory distress syndrome
ALT	:	Alanin aminotransferaz
AST	:	Aspartat aminotransferaz
BT	:	Bilgisayarlı tomografi
CCDC	:	China control and disease prevention center
CO-RADS	:	COVID-19 reporting and data system
DSÖ	:	Dünya sağlık örgütü
EL	:	Ekstracelluler loops
ELISA	:	Enzyme-Linked immunnosorbent assay
HIV	:	Human immunodeficiency virus
H₂S	:	Hidrojen sülfür
ICTV	:	Intertanional committee on taxonomy of viruses
kDa	:	Kilodalton
KOAH	:	Kronik obstruktif akciğer hastalığı
KRY	:	Kronik renal yetmezlik
MERS	:	Middle east respiratory syndrome
MAG	:	Membran-associated guanilat siklaz
MUPP	:	Multi PDZ protein
NLR	:	Neutrophil-Lymphocyte rate
RNA	:	Ribonükleik asit
RT-PCR	:	Real-time polymerase chain reaction
SARS	:	Severe acute respiratory syndrome
SARS-Cov-2	:	Severe acute respiratory syndrome corona virüs-2

SB	:	Sıkı bağlantı
TM	:	Trans membran
UFH	:	Unfraksiyone heparin
WBC	:	White blood cell
YBÜ	:	Yoğun bakım ünitesi
ZO	:	Zonula occludens
ZONAB	:	Zonula occludens associated nucleic acid binding protein



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
KISALTMALAR	II
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLolar DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. COVID-19 Hastalığı	4
2.1.1 Tanım ve epidemiyoloji	4
2.1.2. Patofizyoloji	5
2.1.3 SARS-CoV-2 enfeksiyonunda bulaş.....	6
2.1.4 Klinik belirtiler ve süreç.....	7
2.1.5 Tanı ve değerlendirme.....	8
2.1.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve seroloji	8
2.1.5.2 Laboratuvar	8
2.1.5.3 Görüntüleme.....	9
2.1.6 Tedavi.....	10
2.1.7 Önleme ve aşılama	11
2.2. Claudin-5	12
2.2.1 Sıkı bağlantılar	12
2.2.2 Claudinlerin genel özellikleri	14
2.2.3 Epitel dokuda claudin bulunan yapılar.....	15

2.2.3.1 Böbrek	16
2.2.3.2 Gastrointestinal Sistem.....	16
2.2.3.3 Solunum sistemi claudinleri.....	17
2.2.4 Endotel dokuda bulunan claudin yapılar.....	17
2.2.5 Diğer dokular	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Etik kurul izni	20
3.2. Çalışmanın özellikleri ve hasta seçimi.....	20
3.3. Çalışmaya dahil edilme kriterleri.....	21
3.4. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri.....	21
3.5. Çalışmanın yöntemi	22
3.6. Serum Claudin-5 seviyesinin analizi	22
3.7. İstatistiksel özellikler	22
4. BULGULAR	24
4.1. Demografik ve klinik özellikler	24
4.2. Claudin-5 düzeyleri ve ilişkili faktörler.....	26
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇ.....	40
7. KAYNAKLAR.....	41
8.ÖZGEÇMİŞ.....	49
9. EKLER	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Böbrek yapısındaki claudinler.....	16
Tablo 2: Gastrointestinal sistem ve solunum yolları claudinleri.....	18
Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri.....	24
Tablo 4: Hastaların klinik özellikleri.....	25
Tablo 5: Hastaların laboratuvar sonuçları ve dağılımı.....	25
Tablo 6: Hasta ve kontrol grubunda Claudin-5 düzeyleri.....	26
Tablo 7: COVID-19 tanısında Claudin-5 konsantrasyonunun tanısal performansı.....	26
Tablo 8: Hasta ve kontrol grubunda cinsiyetlere göre Claudin-5 düzeyinin dağılımı.....	27
Tablo 9: Hasta ve kontrol grubunda yaş ile Claudin-5 düzeylerinin korelasyonu	28
Tablo 10: Hastaların klinik özelliklerine göre Claudin-5 düzeylerinin dağılımı.....	29
Tablo 11: Ağır şiddette akciğer tutulumunda Claudin-5, O ₂ saturasyonu, solunum sayısı ve CRP seviyesinin belirleyiciliği.....	30
Tablo 12: Ağır şiddette akciğer tutulumunda Claudin-5, O ₂ saturasyonu, solunum sayısı ve CRP seviyesinin tanısal performansı.....	31
Tablo 13: Hastalarda O ₂ saturasyonu, solunum sayısı ve CRP seviyelerinin Claudin-5 düzeyleri ile korelasyonu.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: SARS COV-2 şekli.....	6
Şekil 2: COVID-19 akciğer tomografi görüntüsü.....	9
Şekil 3: Claudin fonksiyonları.....	13
Şekil 4: Hücre iskelet yapısı ile claudinlerin birleşmesi.....	14
Şekil 5: Claudin molekülünün şematik görünümü.....	15
Şekil 6: Hastaların dahil edilmesi.....	21
Şekil 7: COVID-19 tanısında Claudin-5 seviyelerinin belirleyiciliğinin ROC curve analizi.....	27
Şekil 8: Ağır şiddette akciğer tutulumunda Claudin-5, O ₂ saturasyonu, solunum sayısı, CRP, kreatinin ve üre seviyesinin belirleyiciliği.....	32

ÖZET

GİRİŞ: COVID-19 hastalığı tüm dünyada birçok ölüme neden olmuş, insan yaşamını ciddi düzeyde etkilemiş bir halk sağlığı problemidir. COVID-19 hastalığı genellikle üst solunum yolu enfeksiyonu bulgularıyla başlayıp bazı hastalarda akciğer tutulumu ve ciddi solunum yetmezliğine neden olmaktadır. Farklı doku ve organ tutulumlarına neden olarak da hastalarda mortalite ve morbidite artışına sebebiyet vermektedir. İnsan vücudunda kişiyi dışarıdan gelecek zararlı etkenlere ve enfeksiyonlara karşı koruyan bazı yapılar vardır. Bu yapılar arasında sıkı bağlantılar (SB), hücreler arası madde geçişini sağlayan, hücreler arası sinyal iletimine katkı veren ve enfeksiyonlara karşı koruyucu bariyer oluşturan yapılardır. Bu bağlantıların ana yapılarından biri de claudinlerdir. Günümüzde insan vücudunda farklı organ ve yapılarda tespit edilen 27 çeşit claudin bulunmaktadır ve Claudin-5 özellikle endotel yapısında ve akciğerlerde yaygın olarak yer almaktadır. Bu çalışmada COVID-19 hastalarında serum Claudin-5 düzeylerinin tanı ve prognozla olan ilişkisi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmaya Mart 2021 ile Nisan 2021 tarihleri arasında acil servise başvuran ve yatış planlanan 18 yaş üstü gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi pozitif, akciğer tomografisinde parankim tutulumu olan 60 COVID-19 hastası ve 20 sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubu dahil edildi. Serum Claudin-5 düzeyini etkilemesi beklenen ve kronik hastalığı olan kişiler (diyabetes mellitus, hipertansiyon, koroner arter hastalığı, kronik obstruktif akciğer hastalığı, astım, serebrovasküler hastalık, epilepsi, kronik böbrek yetmezliği) çalışmaya dahil edilmedi. Hastaların yaşı, cinsiyeti, solunum sayısı, oksijen saturasyonu, serum C-reaktif protein (CRP) düzeyleri, glukoz, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), üre, kreatin, D-dimer, nötrofil, lenfosit değerleri, hastanede kalış süreleri ve tomografi bulguları radyolojik olarak COVID-19 veri raporlama sistemi (CO-RADS) şiddet derecesine göre sınıflandırılarak kayıt altına alındı. Hem hastalarda hem de kontrol grubunda serum Claudin-5 düzeyleri Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle çalışılarak değerlendirildi.

BULGULAR: Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması $47,8 \pm 14,2$ yıl, kontrol grubunun ise $44,0 \pm 8,5$ idi ($p=0,152$). Hastaların %65'i kadın, %35'i erkek, kontrol grubunun ise %50'si kadın, %50'si erkekti ($p=0,253$). Hastaların %6,7'si COVID-19 nedeniyle kaybedilmişti. Hastaların %15'i YBÜ' ne kabul edilmişti. Akciğer tutulumu hastaların %38,3'ünde hafif şiddetli, %35'inde orta şiddetli, %26,7'sinde ağır

şiddetliydi. COVID-19 hastalarının Claudin-5 düzeyi median 6,598 ng/ml, kontrol grubunda ise median 5,108 ng/ml idi ve hastaların Claudin-5 seviyesi kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksekti ($p=0,005$). Ağır şiddette akciğer tutulumu olanların Claudin-5 düzeyleri hafif-orta şiddette akciğer tutulumu olanlardan anlamlı derecede daha yüksekti ($p=0,030$). Ağır akciğer tutulumunda en belirleyici faktörlerin oksijen saturasyonu ($p<0,001$) ve solunum sayısı ($p<0,001$) olduğu izlendi. Claudin-5 seviyelerinin ağır şiddette akciğer tutulumunda tek başına belirleyici olduğu görüldü ($p=0,018$), oksijen saturasyonu ve solunum sayısından sonra en iyi belirleyiciler sırasıyla CRP, kreatinin ve üre değerleri idi. COVID-19 hastalarında solunum sayısı ($p=0,031$) ve sistolik kan basıncı ($p=0,039$) ile Claudin-5 seviyeleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon izlendi.

SONUÇ: COVID-19 hastalarında serum Claudin-5 düzeyleri yükselmektedir ve tanıda yol gösterici olabilir. Radyolojik sınıflandırmaya göre ağır şiddette akciğer tutulumu olan hastalarda tanısal ve prognostik değeri olduğu sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: COVID-19, Claudin-5, akciğer tutulumu.

Role of Claudin-5 levels in diagnosis and prognosis in COVID-19 Patients, admitted to the Emergency Department

ABSTRACT

INTRODUCTION: COVID-19 disease is a public health problem that has caused many deaths and seriously affected human life all over the world. COVID-19 disease usually starts with signs of upper respiratory tract infection and causes lung involvement and severe respiratory failure in some patients. It also causes an increase in mortality and morbidity in patients by causing different tissue and organ involvements. There are some structures in the human body that protect the person against harmful factors and infections from outside. Tight connections between these structure are structure that provide intercellular substance transfer, contribute to intercellular signal transmission and from a protective barrier against infections. One of main structures of these connections is claudins. Today there are 27 types of claudin detected in different organs and structures in the human body, and Claudin-5 is commonly found in the endothelial structure and lungs. In this study the relationship of serum Claudin-5 levels with diagnosis and prognosis in COVID-19 patients was investigated.

MATERIAL AND METHODS: A control groups consisting of 60 COVID-19 patients with positive RT-PCR, parenchymal involvement in lung tomography and 20 healthy volunteers over the age of 18, who applied to the emergency department between March 2021 and April 2021 and were planned to be hospitalized, were included in the study. Persons with chronic disease (diabetes mellitus, hypertension, coronary artery disease, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, cerebrovascular disease, epilepsy, chronic renal failure) expected to affect serum Claudin-5 levels were not included. Patients age, gender, respiratory rate, oxygen saturation, serum CRP levels, serum biochemistry, D-dimer, neutrophil, lymphocyte values, length of hospital stay, and tomography finding were radiologically classified according to the severity of CO-RADS and recorded. Serum Claudin-5 levels were evaluated by ELISA method in both patients and control groups.

RESULTS: The mean age of the patients included in the study was 47 ± 14.2 years, and 44 ± 8.5 years in the control groups ($p=0,152$). 65% of the patients were female 35% were male, and the control group was 50% female 50% male ($p=0,253$). 6,7% of the

patients lost due to COVID-19. 15% of the patients were admitted to the intensive care unit. Pulmonary involvement was mild in %38.3, moderate in %35, and severe in %26,7 of the patients. The median Claudin-5 level of the COVID-19 patient was 6,598 ng/ml, while the median was 5,108 ng/ml in the control group, and the Claudin-5 level of the patients was significantly higher than the control group ($p=0,005$). Claudin-5 levels of patients with severe lung involvement were significantly higher than those with mild to moderate lung involvement ($p=0,030$). It was observed that the most determining factors in severe lung involvement were oxygen saturation($p<0,001$) and respiratory rate ($p<0,001$). Claudin-5 levels were found to be the only determinants in the severe lung involvement ($p=0,018$), and the best predictors after oxygen saturation and respiratory rate were CRP, creatinine and urea values respectively. A positive and significant correlation was observed between respiratory rate ($p=0,031$) and systolic blood pressure ($p=0,039$) and Claudin-5 levels in COVID-19 patients.

CONCLUSION: Serum Claudin-5 levels are elevated in COVID-19 patients and may guide the diagnosis. It was concluded that it has diagnostic and prognostic value in patient with severe lung involvement according to the radiological classification.

KEY WORDS: COVID-19, Claudin-5, lung involvement.

1. GİRİŞ

31 Aralık 2019'da, Çin'in Hubaei eyaletine bağlı Wuhan Şehrinde etyolojisi bilinmeyen 27 pnömoni vakası tespit edildi. Bu hastalar en çok ateş, kuru öksürük, nefes darlığı, kırgınlık, tat almakta azalma, ishal gibi klinik bulgular ile sağlık kuruluşlarına başvuruda bulundular. Hastaların akciğer görüntülemelerinde iki taraflı, daha çok periferik yerleşimli infiltrasyonlar gözlemlendi. Viral kökenli bir solunum yolu enfeksiyonu olabileceği düşünüldü. Vakaların tümü, balık ve kümes hayvanları, yarasalar, dağ sıçanları ve yılanlar dahil olmak üzere çeşitli canlı hayvan türlerinin ticareti yapılan Wuhan'ın Huanan Deniz Ürünleri Toptancı Pazarı ile bağlantılıydı (1). Etken ajan, 7 Ocak 2020'de Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CCDC) tarafından yürütülen çalışmalarda boğaz sürüntü örneklerinden tespit edildi (1). Etken daha sonra Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırıldı. Daha sonra hastalık Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından COVID-19 olarak tanımlandı (2).

30 Ocak 2020'de DSÖ, Çin'deki COVID-19 salgınına, savunmasız sağlık sistemlerine sahip ülkeler için Uluslararası Öneme Sahip Halk Sağlığı Acil Durumu olarak ilan etti. 11 Mart 2020 yılında DSÖ tarafından pandemi olarak kabul edildi (3).

SARS-CoV-2 koronavirüs ailesine ait bir virüstür. Koronavirüsler, Coronaviridae ailesinin zarflı, büyük, tek sarmallı ribonükleik asit (RNA) virüsleridir. Koronavirüsler yarasa, kuşlar, pangolinler, yılanlar, fareler ve insanlar olmak üzere pek çok omurgalıyı enfekte edebilirler. SARS-CoV-2 spike proteini yoluyla insanda anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE-2) reseptörüne yüksek afinite ile bağlanmaktadır (4) .

SARS-CoV-2 konakçı hücrelerin içine girdikten sonra akut solunum sıkıntısı sendromunu (ARDS) indükler, bağışıklık tepkisini (sitokin fırtınasını) ve vasküler hasarı uyarır. SARS-CoV-2'nin indüklediği endotel hasarı, yaşlanma, hipertansiyon ve obezitenin de yaratmış olduğu endotel hasarını arttırarak başka komplikasyonlara da yol açabilir (5).

Klinik olarak yapılan ilk çalışmalarda COVID-19 hastalarında semptom olarak ateş (% 83), öksürük (% 82), nefes darlığı (%31), kas ağrısı (%11), baş ağrısı (%8), boğaz ağrısı (%5), burun akıntısı (%4), göğüs ağrısı (%2), ishal (%2) ve mide bulantısı

(%2) saptanmıştır (6). Şiddetli hastalık genellikle belirtilerin başlamasından bir hafta sonra kendini göstermektedir. Hastalık genellikle dispne ve sıklıkla hipoksemi ile birlikte görülmektedir, daha sonra ilerleyici solunum yetmezliği, tromboembolik olaylar, artmış enflamasyon süreci, organ yetmezlikleri ve sonunda ölümle sonuçlanabilen ağır bir klinik tabloya yol açmaktadır (7).

COVID-19 için kullanılan en yaygın ve güvenilir test nazofarangeal sürüntüler veya diğer solunum yolları örnekleri kullanılarak yapılan RT-PCR yöntemidir. Viral RNA genellikle semptomların başlamasından üç gün önce ve ilk hafta solunum yolu örneklerinde tespit edilebilir (8). Ayrıca COVID-19 semptomları gösteren ama RT-PCR sonucu negatif gelen hastalarda akciğer BT görüntülemesi de bize hastalığın tanı ve prognozunda yardımcı olmaktadır (9).

Sıkı bağlantılar (SB) parasellüler geçirgenliği düzenleyerek apikal hücre-hücre yapışmasında ve epitel hücre polaritesi sağlanmasında kritik öneme sahiptirler. SB'nın esas fonksiyonu epitel hücreleri arasından her iki yöne doğru (apikalden-bazale, bazalden-apikale) madde geçişini engelleyecek şekilde bir tutunma meydana getirmektir (10).

Sıkı bağlantılar epitel ve endotel hücreleri arasında oldukça güçlü bir difüzyon bariyeri oluşturmaktadır. Sıkı bağlantılar çok sayıda trans membran proteine sahiptirler ve bu proteinler bağlantıların sitoplazmik yüzeyinde bulunurlar. SB'lar okludin, claudin proteinleri ve adezyon moleküllerinden oluşmaktadır (11).

Zonula okludens (ZO) bağlantıların en tepede olanıdır. Zonula gerçekte bağlantının bir bant şeklinde hücreyi tamamen sardığını ifade ederken, okludens ise membranın interselüler alanı kapatacak şekilde kaynaşmış olduğunu belirtir. SB moleküller mimarisi üzerine yapılan yoğun çalışmalar sonucu, claudin protein ailesinin sıkı bağlantıların önemli bir komponenti olduğu gösterilmiştir (12,13). Claudinler transmembran proteinleridir ve ZO yapılarının komşu hücre ile temas ettiği yüzeyde bulunurlar. Bu proteinlerin fonksiyonları henüz tam anlaşılamamıştır; ancak claudinlerin SB'ların belkemiğini oluşturdukları düşünülmektedir. Claudinler epitelyal hücrelerin seçici olarak geçirgenliğine doğrudan etki etmektedir. Claudinler SB'ların fonksiyonlarına katılarak böbrek epiteli, gastrointestinal sistem ve karaciğer gibi epitelyal dokular için seçici geçirgenlikte rol oynamaktadır (14).

Claudinler řu anda en çok bulunan transmembran proteinidir. Claudin genleri tüm epitelyal dokularda bulunur ve aynı anda birçok claudin çeşidi eksprese edilir. Claudin genlerinin dokuya özgü ekspresyonu böbrekte, iç kulakta ve gözde gösterilmiştir (15). İnsanlarda řu anda bilinen 27 çeşit claudin bulunmaktadır (16). Claudinler ayrıca parasellüler kanallar oluşturma potansiyeline sahip olup olmama veya parasellüler geçirgenliği kısıtlayıp kısıtlamadıklarına göre sınıflandırılmışlardır. Akciğer epitel hücreleri özellikle sızdırmazlık claudinleri (Claudin-1, 3, 4, 5, 7 ve 18) ve gözenek oluşturan claudinlerin (Claudin-2, 10 ve 15) ekspresyonunu yapmaktadır (17,18). Claudin-5 en çok vasküler endotel tarafından eksprese edilmektedir ve akciğerlerde de yaygın olarak eksprese edilerek pulmoner vasküler geçirgenliğe katkı sağlamaktadır (19).

Jang ve ark'nın (20) yaptığı çalışmada akreolin ile akciğer bariyer bütünlüğünü bozarak endotel hasarı oluşturulmuş, sonrasında pulmoner vasküler yatakta artış olmuş ve pulmoner ödem meydana gelmiştir. Doku düzeyinde yapılan bu çalışmada Claudin-5 transkriptlerinde artış olduğu gözlemlenmiş ve akut akciğer hasarının nlenmesinde Claudin-5 seviyelerinin korunmasının yeni bir tedavi potansiyeli oluşturabileceği ifade edilmiştir. İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) ile enfekte olmuş intertisyel pnömonili hayvan akciğerinde Claudin-5 seviyeleri düşük ve makrofaj infiltrasyonunun artmış olduğu tespit edilmiştir (21).

Sıkı bağlantı proteinlerinin salınımı ve proteinlerin düzenlenmesi Mikro RNA'lar tarafından yapılmaktadır ve burada meydana gelebilecek herhangi bir aksaklık birçok hastalığa yol açmaktadır (18).

Bizim bu çalışmadaki amacımız serum Claudin-5 seviyelerinin COVID-19 hastalarında, hastalığın şiddetine göre tespit edilip tanı ve prognoz ile olan ilişkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. COVID-19

COVID-19 tüm dünyayı tehdit eden ciddi bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. COVID-19 salgını dünya genelinde hem ekonomik anlamda hem de psikososyal anlamda ciddi yıkıntılara neden olmaktadır. Son bir yıldır yüz otuz milyonu aşkın teyit edilmiş vaka ve üç milyona yakın ölüm ile halen ciddi bir sağlık problemi olarak devam etmektedir. COVID-19 hastalığı kuru öksürük, ateş, kas ağrıları, ishal, genel halsizlik ve bazen de daha ciddi olan ARDS, organ yetmezliği ve şok ile beraber ölüme kadar sebebiyet veren ciddi bir solunum yolu hastalığıdır (22).

COVID-19'a karşı halen dünyada ciddi bir savaş verilmekte hem tedavi anlamında daha fazla bilgiye sahip olunmakta hem de korunma anlamında geliştirilen aşilar ile aşılama hizmetleri hızlı bir şekilde devam etmektedir.

2.1.1 Tanım ve Epidemiyoloji

COVID-19 31 Aralık 2019'da Çin'in Hubaei eyaleti Wuhan şehrinde nedeni bilinmeyen bir etken tarafından bir grup pnömoni hastası olarak ortaya çıktı. Daha sonra yapılan viral sekans analizleri ile bu hastalığa neden olan virüsün 2019-nCoV adlı bir korona virüsün neden olduğu anlaşıldı (22,23). Daha sonra DSÖ tarafından 11 Şubat 2020'de COVID-19 olarak adlandırıldı ve aynı tarihte Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından SARS-CoV-2 olarak adlandırıldı. 11 Mart 2020 tarihinde DSÖ tarafından pandemi olarak ilan edildi (24).

Salgın Çin'den tüm dünyada yayılarak çok sayıda ölüme neden olmuştur. DSÖ güncel verilerine göre son 1 yıl içerisinde 130 milyonu aşkın teyit edilmiş vaka ve 3 milyona yakın hayatını kaybeden olmuştur (3).

İlk epidemiyolojik çalışmalardaki sonuçlar şüpheli vakaların çoğunun yerel bir deniz ürünleri pazarından kaynaklandığı yönündeydi ancak daha sonra yapılan çalışmalarda en az 2 farklı SARS-CoV-2 suşunun hastalığa neden olduğu tespit edildi. Sonrasındaki filo epidemiyolojik çalışmalar ise bu virüsün başka yerden ithal edilen deniz ürünlerinden kaynaklanabileceği yönünde düşünceye neden olmuştur (25).

COVID-19 hapşıırma, öksürme ve yakın temas ile hızlı bulaş olan bir hastalıktır. Hastalık genel olarak temastan yaklaşık beş gün sonra bulgu vermeye başlar. Enfekte olmuş kişilerde, bulaşıcılığın bulgu vermeyen bireyler tarafından veya inkübasyon

sürecindeki dönemde de hastalığı bulaştırdığı gösterilmiştir. Bu vakalar salgının kontrolünde ciddi sıkıntılara neden olabilmektedir. En yaygın bulgular ise ateş, kuru öksürük, nefes darlığı, kas ağrıları, iştahsızlık, tat ve koku kaybı şeklinde olmaktadır. Hastaların % 5 kadarında hastaneye yatırılma ihtiyacı duyulmaktadır ve bunlarında % 20 kadarı yoğun bakıma yatarak tedavi görmektedir. Yatırılan hastaların %70'den fazlası ek oksijen tedavisine ihtiyaç duymaktadır. Hastalık bulgu vermeden düzelme eğilimi olmasından, ölüme neden olacak ARDS' na kadar ilerleyen bir klinik çeşitlilik izleyebilir (25).

2.1.2. Patofizyoloji

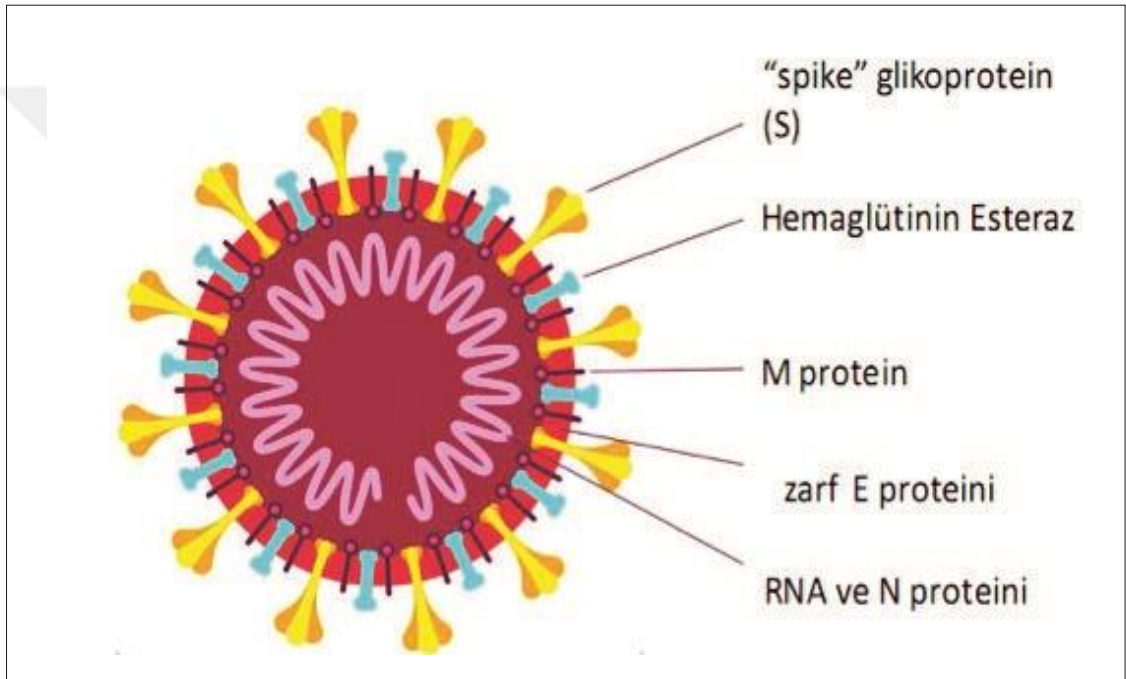
Koronavirüsler, insanlarda ve kedi, köpek, sığır, domuz, kuş ve diğer memelilerde bulunan zarflı, tek sarmallı büyük bir RNA virüsüdür (Şekil 1). Korona virüsler solunum yolu hastalıkları, sindirim sistemi hastalıkları, damar patolojileri ve nörolojik sistem hastalıklarına neden olabilirler. Genellikle soğuk algınlığı bulguları ile birlikte başlar, ancak diğer sistem semptomları da görülebilmektedir (23). COVID-19 pandemisi son yirmi yılda görülen üçüncü şiddetli koronavirüs salgınıdır. Birinci salgın Çin'de 2002-2003 yılları arasında görülen Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS), ikincisi ise arap yarımadasında ortaya çıkan Ortadoğu Solunum Sendromu'dur (MERS) (26).

SARS-CoV 60 nm ile 140 nm arasında büyüklüğe sahip olup Şekil 1'de görüldüğü gibi değişici sivri uçları bulunmaktadır. Genetik rekombinasyon ve varyasyon yoluyla farklı konaklara adapte olma yeteneğine sahiptir (27). Enfeksiyonun erken döneminde ACE-2 reseptörüne bağlanan viral sivri uç proteini ile nazal ve bronşiyal epitel hücrelerini ve pnömositleri hedef alır (28). Aynı influenzada olduğu gibi SARS-CoV-2 T lenfositleri enfekte edip harap ettiğinde ciddi bir lenfopeniye neden olmaktadır (29).

Enfeksiyon sonraki aşamalara ilerlediğinde epitel-endotel bütünlüğü tehlikeye girer ve zarar görebilir. Epitel hücrelere ek olarak, SARS-CoV-2 endotel hücrelerini de enfekte ederek enflamatuvar yanıtı artırır ve o bölgeye nötrofil ve monosit göçünü başlatır. Yapılan otopsi çalışmalarında alveoler duvarın kalınlaştığı gösterilmiştir. İnterisyel mononükleer infiltratlar ve alveoler ödem ise tomografide buzlu cam görüntüsüne neden olmaktadır. Bu tabloda alveoler boşlukları dolduran pulmoner ödem erken dönem ARDS tablosunun göstergesidir. Toplu olarak endotel bozulması, işlevsiz

alveolar-kapiller iletimi ve bozulmuş oksijen difüzyon kapasitesi COVID-19'un karakteristik özelliğidir (29,30).

Şiddetli COVID-19 hastalığında pıhtılaşmanın aktivasyonu ve pıhtılaşma faktörlerinin tüketimi meydana gelebilir. Enfekte akciğer dokuları ve pulmoner endotel hücreleri mikrotrombüs oluşumuna neden olabilir, derin ven trombozu, pulmoner emboli ve trombotik arteriyel komplikasyonlara yol açabilir (iskemik inme, myokard enfarktüsü, uzuv iskemisi vb.) (30,31). Enfeksiyonun düzensiz bir konakçı tepkisinin neden olduğu yaşamı tehdit eden organ disfonksiyonu olarak tanımlanan viral sepsis gelişimi ve multiorgan yetmezliğine katkıda bulunduğu görülmüştür (31).



Şekil 1: SARS-CoV-2 şekli (8)

2.1.3 SARS-CoV-2 Enfeksiyonunda Bulaş

Enfeksiyonun bulaşması daha çok öksürme, hapsirme ve yüz yüze yakın temas ile olmaktadır. Enfekte kişiye yakın maruziyetlerde bulaşma riski taşıyıcıya göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca virüs bulaşmış yüzeylerle de temas virüs bulaşmasını arttırmakta ve havada asılı aerosollerle bulaş ise daha çok laboratuvar ortamı ve hasta tedavi sırasında meydana gelmektedir (32).

Gebe olan COVID-19 hastalarında maternal bulaşın düşük olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiş ve gebe olan COVID-19 hasta serilerinde doğan bebeklerin ciddi bir klinik seyrinin olmadığı gösterilmiştir (33).

Yapılan çalışmalarda viral nükleik asit altı haftaya kadar boğaz sürüntülerinde saptanabilse de viral kültürlerde 8 gün sonra SARS-CoV-2 için herhangi bir üreme olmadığı gösterilmiştir. Bu durum bize klinik bulgular başladıktan 5 gün sonra bulaşın olmayacağı yönünde bilgi vermektedir (34).

2.1.4 Klinik Belirtiler ve Süreç

COVID-19 hastalarında inkübasyon süresi temas olduktan sonra ortalama 5 (2-7) gündür (35). COVID-19'un klinik seyri farklılıklar göstermektedir. Çin'de yapılan bir çalışmada hastaların %81'inin hafif bulgular ile hastalığı atlattığı, %14'ünün şiddetli belirtiler ile seyrettiği ve %5'inin ise mortalitesi yüksek olabilecek bulgularla seyrettiği (solunum yetmezliği, septik şok ve çoklu organ yetmezliği) gösterilmiştir (32). İngiltere'de 20133 COVID-19 hastası ile yapılan bir çalışmada hastaların %17.1'inin yoğun bakım ihtiyacı olduğu ve bu ünitelerine yatırılarak tedavi aldığı gösterilmiştir (36). COVID-19 hastalarında görülen yaygın bulgular ve komplikasyonları Kutul'de detaylı olarak gösterilmiştir.

Enfekte olan hastaların yaklaşık %25'inde ek hastalık bulunmasına rağmen hastaneye yatan hastaların yaklaşık %60-90'ında ek hastalıkları olduğu görülmektedir. Hastaneye yatan hastalarda en sık eşlik eden hastalıklar hipertansiyon, diyabet, kalp damar hastalığı, kronik akciğer hastalığı, kronik böbrek hastalığı, malignite ve kronik karaciğer hastalığı yer almaktadır. COVID-19 nedeniyle hastanede yatan hastaların yaklaşık %17-35'i yoğun bakım ünitelerinde akut solunum yetmezliği nedeni ile tedavi almaktadır (37).

Bu hastaların yaklaşık %2-5'i 18 yaş altı çocuklardan oluşmaktadır ve bu yaş grubundaki kişilerde ciddi hastalık görülme ihtimali daha düşüktür, daha az yoğun bakım ve mekanik ventilasyon ihtiyacı oluşmaktadır (38).

Kutu 1: Koronavirüs Hastalığının Belirtileri ve Komplikasyonları

. Yaygın belirtiler ateş (%70-90), kuru öksürük (%70-86), nefes darlığı (%53-80), yorgunluk ve halsizlik (%38), miyalji (%15-44), bulantı/kusma ve ishal (% 15-39), burun akıntısı (%7). COVID-19'lu hastaların % 3'ünde ise koku almama şikayeti olmaktadır.

. COVID-19 ile hastanede yatan hastaların arasında yaygın komplikasyon olarak pnömoni (%75), akut solunum sıkıntısı (%15), aspartat transaminaz, alanin transaminaz ve bilirubin yükselmesi ile karakterize akut karaciğer hasarı (19), troponin yükselmesi, miyokardit, kalp yetmezliği bulguları, disritmiler (%7-17), arteriyel ve venöz embolilerle seyreden trombo-embolik olaylar (%10-25), akut böbrek hasarı (%9), bilinç bulanıklığı (%9), akut serebrovasküler hastalık (%3) ve şok (%6) civarındadır.

2.1.5 Tanı ve Değerlendirme

Klinik olarak şüphelenilen COVID-19 hastalarının tanısı için, ağız ve burun yoluyla alınan sürüntü örneklerinde veya bronşiyal sekresyonlardan alınan örneklerde RT-PCR kullanılarak yapılır. Bazen bu testin negatif gelmesi durumunda ise hasta klinik olarak, laboratuvar testleri ve akciğer görüntülemesi ile de değerlendirilebilir.

2.1.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Seroloji

Nazofareks örneklemesinden yapılan RT-PCR'a dayalı SARS-CoV-2 RNA saptaması tanı için standart bir uygulamadır. Bununla birlikte virüse maruz kalma zamanı, testin alınma tekniği testin hassasiyeti konusunda önemlidir. Bir modelleme çalışmasında maruziyetten 4 gün sonra %33, semptom başlangıcında %62 ve semptom başlangıcından 3 gün sonra %80 civarında saptanmıştır. Ayrıca bronkoalveolar sıvılardaki duyarlılık nazofarenks sıvılarına göre daha fazladır (39).

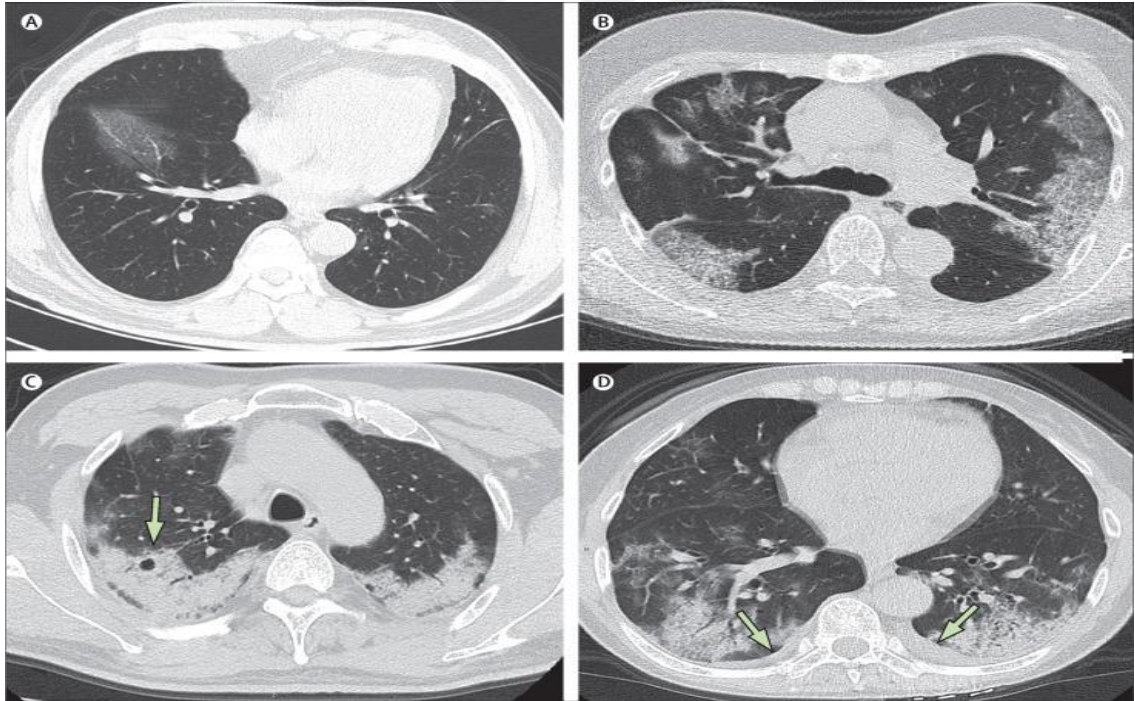
2.1.5.2 Laboratuvar

COVID-19 hastalarında yapılan laboratuvar çalışmalarında serumda CRP yüksekliği saptanmıştır. Artmış CRP düzeylerinin hastalığın klinik şiddetiyle orantılı olduğu gösterilmiştir. Enflamatuvar belirteçlerden olan intelökin-6 ve serum ferritin düzeylerinde de artış gözlemlenmiştir. Ayrıca laktat dehidrogenaz yüksekliği, ALT ve AST yüksekliği saptanmıştır. Hematolojik bulgu olarak ise lenfopeni sık görülen bir

bozukluktur. Koagülasyon sisteminin bozulmasına bağlı olarak ise yüksek D-dimer düzeyleri, artmış protrombin düzeyleri ve hafif trombositopeniye rastlanmaktadır (40).

2.1.5.3 Görüntüleme

Hastalığın erken döneminde akciğer bulguları normal olabilir ancak iki hafta içerisinde artan akciğer tutulumları meydana gelebilir ve sonrasında giderek bulgular azalır (41). Göğüs tomografi bulguları spesifik değildir ve diğer akciğer enfeksiyonu bulgularıyla da örtüşmektedir, bu nedenle COVID-19 için bilgisayarlı tomografi görüntülerinin tanısal değeri sınırlıdır. Bazı RT-PCR ile doğrulanmış vakalarda tomografi bulguları normal iken, bazı hastalarda ise COVID-19 düşündüren tomografi bulguları olmasına karşın RT-PCR testleri normal olarak saptanmaktadır (42). COVID-19'da akciğerin periferal yerleşimli tutulumunun tomografi görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir (42). Akciğer tomografi bulguları, CO-RADS ve tomografi şiddet skorlamasına göre yapılan çalışmalarda bize hastalık şiddeti ve klinik seyri hakkında da bilgi vermektedir (9).



Şekil 2: COVID-19 hastalarında ince kesit akciğer tomografi görüntüleri (42)

2.1.6 Tedavi

COVID-19 hastalığında tedavi ve destek protokolleri her geçen gün yeni yapılan araştırmalar ve gelişmeler öncülüğünde Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından güncellenmektedir (41,43).

COVID-19 geçiren hastaların yaklaşık %80'i tıbbi müdahale ya da hastaneye yatmayı gerektirmeyen hafif bir hastalığa sahiptir. Hafif COVID-19'lu hastaların (viral pnömoni ve hipokseminin olmaması olarak tanımlanır) evde tedavisi yönetilebilir. Orta derecede COVID-19 (viral pnömoni olan ancak hipoksemisi olmayan) ve şiddetli COVID-19 (dispne, hipoksemi veya akciğer tutulumunun $> \%50$ 'si olanlar) akciğer tutulumunun hızla yayılabileceğinden ve klinik bozulma olabileceğinden dolayı hastaneye yatırımları gerekmektedir (43).

COVID-19 nedeniyle hastaneye yatan hastaların yaklaşık %75'inde oksijen tedavisine ihtiyaç duyulmaktadır. Klasik oksijen tedavisine yanıt alınamayan hastalarda ise yüksek akımlı nazal oksijen tedavisi verilmektedir. Buna rağmen ilerleyen solunum yetmezliği olan hastalarda ve mekanik ventilasyon ihtiyacı olan hastalarda mekanik ventilatöre bağlanarak tedavi sağlanmaktadır (43,44).

COVID-19 hasta yönetimi için çeşitli ilaç ve tedaviler uygulanmaktadır; antiviraller (örn; remdesivir, favipiravir), antikorlar (örn; iyileşen hastalardan alınan plazma, immünglobulinler), immünmodülatör tedaviler (örn; tacilizumab, sarilumab, anakinra, ruxolinitib), antikoagülanlar (örn; heparin) ve antifibrotikler (örn; tirozin kinaz inhibitörleri). Viral inhibisyon yapan tedavilerin erken dönemde etkili olması beklenirken, hastanede yatan hastalarda immünmodülatör tedavilerin hastalığın ilerlemesini engelleyebileceği ve antikoagülan tedavilerinde hastalık sürecince gelişebilecek komplikasyonların engellenmesinde etkili olabileceği bilinmektedir (44,45).

Ayrıca bu artmış enflamasyon sürecini ve sitokin fırtınasını baskılamak için hastalarda kortikosteroid tedavisi de verilmektedir. Birleşik Krallık' ta COVID-19'lu hastalarda yapılan randomize kontrollü çalışmada (RECOVERY), solunum desteğine ihtiyaç duyulan hastalarda 6 mg dexametazon ile yapılan tedavinin 28 günlük ölüm oranlarında anlamlı derecede düşme olduğu saptanmış ve hastaların hastanede kalış sürelerinin azaldığı gösterilmiştir (45).

2.1.7 Önleme ve Aşılama

Halen COVID-19 salgının şiddeti birçok ülkede yıkıcı etkisiyle beraber devam etmektedir. Hem sosyal hem ekonomik anlamda ciddi zararlara neden olmakta ve insanların ölümüne sebebiyet vermektedir. Salgının başladığı günden itibaren aşı çalışmaları yapılmaktadır ve mevcut geliştirilen aşılar ile salgının önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Günümüzde uygulanan aşılar mevcut iken devam eden aşı çalışmaları da bulunmaktadır. Tam aşılama ile toplumsal bağışıklık sağlanana ve salgın bitene kadar hasta kişilerin izole edilmesi, temaslı kişilerin tespit edilerek izole edilmesi, kişisel hijen, sosyal mesafe ve kişisel koruyucu malzeme kullanımının önemi devam etmektedir (46).



2.2. CLAUDİN-5

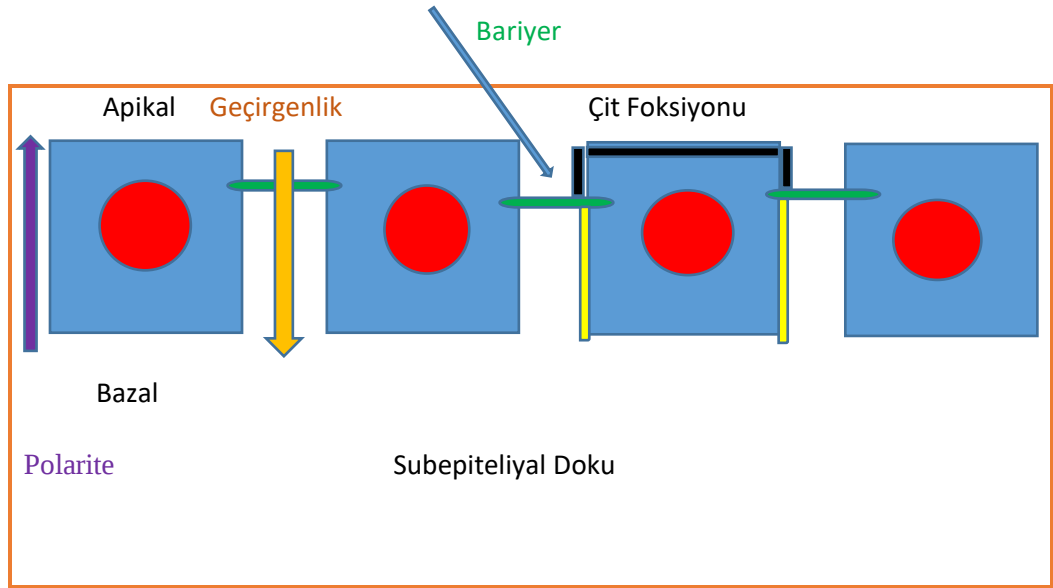
Genel anlamda SB yapıları bir dizi transmembran (TM) proteinden ve sitoplazmik plaktan oluşan, transmembran proteinlerini bir aktomyozin iskelete bağlayan kompleks bir protein yapıdır. SB'lar, epitelyal bağlantı komplekslerinin uç kısmında bulunan bileşenlerdir ve bu bağlantıların temel yapısal molekülleri ise claudinlerdir (47). Bilinen 27 çeşit claudin bulunmaktadır ve bu farklı yapıdaki claudinler farklı hücrelerdeki çeşitli elektrolit ve madde geçişlerinden sorumludur. Claudin ve SB'ların insanları bazı enfeksiyonlara karşı koruduğu, Clostridium perfringens gibi bazı enfektif ajanların toksinlerinin bu bölgeleri hedef alarak enfeksiyona yol açtığı bilinmektedir (18).

2.2.1 Sıkı Bağlantılar

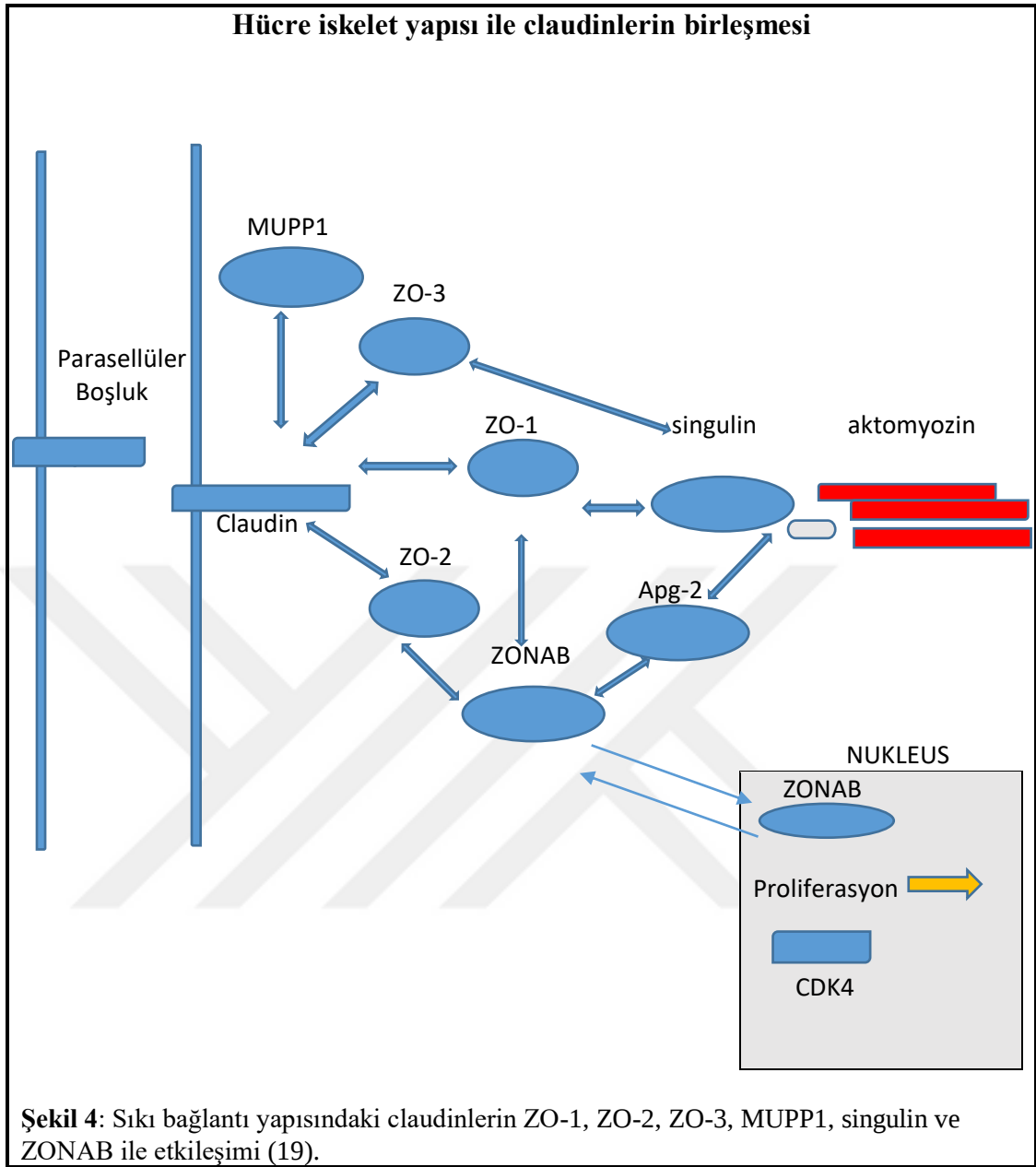
Sıkı bağlantılar epitelyal, endotelyal ve mezenkimal hücrelerde bulunan yapılardır. Şekil 3'te görüldüğü gibi hücreler arası boşluktan molekül ve iyon difüzyonunu da sağlamaktadırlar (19). Apikal kısmı diğer kısımlardan ayıran ve zar proteinlerinin karışmasını engelleyen bir çit görevi de vardır. SB'ın oluşturduğu bariyer yapı patojen mikroorganizmaların geçişine engel olarak doğuştan gelen bağışıklığın bir yapısı olarak da görev almaktadır. Aynı zamanda hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında da rol alırlar (13,18).

Sıkı bağlantılar diğer yandan hücre-hücre temaslarına aracılık eden zar protein yapılarından oluşmaktadır. Okludin, claudin, trikelulin, ve JAM'ı (adezyon molekülleri) içerirler. İskele proteinleri sitokeletal aktin filamanlara giden sinyallere eşlik eder ve hücre sinyal kaskadını aktive eder. Bunlar arasında ZO-1 (zonula okludens), ZO-2, ZO-3, MAG-1 (membran-associated guanilat siklaz 1), singulin ve MUPP1 (multi-PDZ alan proteini1) yer alır. Membran proteinleri, iskele proteinlerine bağlanabileceği karboksi-terminal uçlarında olan bir takım yapılar içerirler, bunlardan biri ZO-1, ZO-2, ZO-3 ve MUPP1 proteinlerine bağlandığı PDZ alanıdır (48). ZO-1 ZONAB'ı (ZO-1 ilişkili nükleik asit bağlayıcı protein) bağlayarak hücre proliferasyonunu engelleyebilir. Bu durumda ısı şok proteini olan Apg-2, ZONAB'ın ZO-1 ile olan ilişkisinin yerini alıp proliferasyonu tekrar başlatabilir (Şekil 4) (19). Böylelikle sıkı bağlantı yapıları aynı zamanda hücre farklılaşması ve proliferasyonda da yer almaktadır (13,16).

Claudin fonksiyonları



Şekil 3: Epitel hücre sıkı bağlantıları yeşil işaretlenmiş, parasellüler boşluktaki maddelerin geçişini sağlar (turuncu ok). Parasellüler boşluğun bariyeri olarak patojenlerin epitel altı dokulara ulaşmasını engeller. Epitel hücre polaritesinin belirlenmesinde de rol alırlar (mor ok). Hücre membranının apikolateral kısmında bulundukları için apikal ve lateral kısmı ayırarak buradan gelen proteinlerinde karışmasını engeller (çit fonksiyonu) (19).

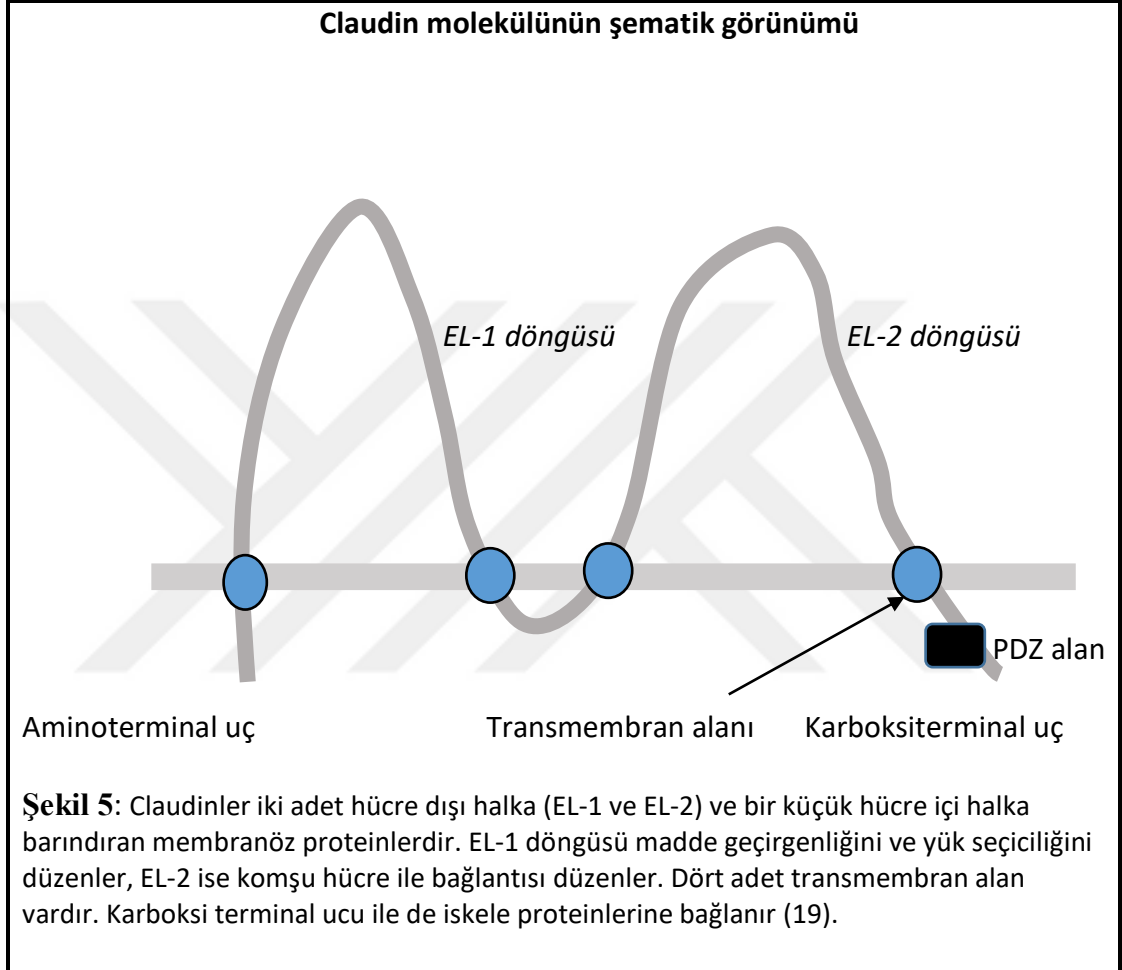


2.2.2 Claudinlerin Genel Özellikleri

Claudinler esas olarak hücreler arası geçirgenlikten sorumlu proteinlerdir. Claudin ailesi SB içinde en çok bulunan TM proteinlerdir. 1998 yılında Shoichiro Tusikida'nın laboratuvarında Furuse tarafından tavuk karaciğerinden saflaştırılarak bir bağlantı proteininden elde edilmiştir (47). Claudinler ortalama 207 ile 305 amino asitten oluşan ve 21-34 kDa'lık hesaplanmış molekül ağırlığına sahiptirler (47).

Günümüzde bilinen ve canlılarda tespit edilmiş, SB'ların yapısına katılan 27 çeşit claudin tespit edilmiştir ve insanlarda ise 23 çeşit claudin ve iki tane claudin benzeri protein gösterilmiştir. Claudinlerin dört transmembran alanı vardır, bunlardan

iki tane uzun hücre dışı ve bir tane ise kısa hücre içi döngü bulunmaktadır. Karboksiterminal ucu ile iskele proteinlerine bağlanmaktadır (50). Daha büyük olan hücre dışı halka-1 (EL) döngüsü madde geçirgenliği ve yük seçiciliğini düzenlerken daha küçük olan EL-2 ise komşu hücreye bağlanmayı sağlar (51) (Şekil 5).



Fonksiyonlarına göre esas olarak sızdırmazlıkta rol alan Claudin-1, 2, 3, 5, 14 ve 19 iken, kanal oluşturan claudinler ise claudin-11, 10a, 10b, 15 ve 17 olarak gösterilmiştir. Claudin-4, 7, 8 ve 16 için ise sızdırmazlık ya da kanal oluşturma herhangi bir görevi tespit edilememiştir (16).

2.2.3 Epitel Dokuda Claudin Bulunan Yapılar

Claudinler bilinen tüm epitel dokularda yer almaktadır. Farklı epitel dokularda farklı claudin salınımları mevcuttur.

2.2.3.1 Böbrek

Claudinler böbrek nefronu boyunca yayılım göstermektedir. Özellikle Claudin-5 kantitatif RT-PCR ile değerlendirmede plazmada eksprese edilen ana claudindir ve podositlerin plazma membranında bulunur. Claudin-6 bazal membranda ve diyafram aralığındaki podositlerin plazma membranında bulunur. Makro moleküllere bariyer görevi gören Bowman kapsülünün pariyetal epiteli, SB yerleri Claudin-1 eksprese eden squamöz hücrelerden oluşur (17,52).

Tablo 1: Böbrek yapısındaki claudinler

Nefron boyunca claudinler	
Nefron segmenti	Claudinler
Glomerül	5, 6 (podosit); 1 (pariyetal epitel)
Proksimal tüp	2, 10a, 17 (yetişkin); 6, 9 (yenidoğan)
İnce inen kol üst segment	2
İnce inen kol alt segment	7, 8
İnce yükselen kol	3, 4, 16, 19
Kalın yükselen kol	3, 10a, 10b, 16, 18, 19
Makula densa	10
Distal tübül, bağlantı tübülü	7, 8, 10
Toplama kanalı	3, 4, 7, 8, 10a (kortikal CD), 10b (medüller CD), 14, 18
CD= Collecting duct	

Yapılan hayvan deneylerinde fare mesanesinde Claudin-2 4, 8, 12, 13 tespit edilmiş ancak üroepitelyal dokuda ise Claudin-4, 8 ve 12 bulunmuştur (53).

2.2.3.2 Gastrointestinal Sistem

Gastrointestinal sistemde claudinler için yapılan fare deneylerinde Claudin-3 mide yüzey epitelinde, Claudin-4 ve 5'in ise mide proksimal bezlerinde bulunduğu, insan mide yapısında ise Claudin-12, 23 ve 18 bulunduğu bilinmektedir (54). İnce bağırsakta en yaygın olarak Claudin-2, 3, 7 ve 15 tespit edilirken, Claudin-8'in ince

bağırsaktan kolona giderek artan bir salınımı olduğu gözlemlenmiştir. Claudin-13 ise sadece kolonda tespit edilmiştir (18,55).

Claudin-1 karaciğer hepatositlerin sıkı bağlantı noktalarında ve ayrıca safra kesesinde kolanjiositlerin yan duvarlarında bulunmaktadır (55). Claudin-2’de peri portalden peri sentiral hepatositlere doğru giderek artan bir salınım izlemektedir. Claudin-3 hepatosit ve kolanjiositlerin sıkı bağlantılarında yer almaktadır (56).

2.2.3.3 Solunum Sistemi Claudinleri

Claudinler solunum yolları epitelinde de yaygın bulunmaktadır (57). Akciğer bronş ve bronşiyollerinde esas olarak Claudin-1, 3, 4, 5, 7, 8 ve 18 eksprese edilmektedir (Tablo 2). Claudin-2 akciğerde tespit edilememiştir ve genelde böbrek, pankreas, mide ve karaciğerde yüksek oranda gösterilmiştir. Bronşiyal, alveoler ve mezotelyal hücrelerde farklı claudin çeşitlilikleri tespit edilmiştir (18).

2.2.4 Endotel Dokuda Bulunan Claudin Yapılar

Vasküler endotel hücreleri sıkı bağlantılara sahiptir ve çeşitli claudin türleri içerir. Vasküler yatakta en çok salınan Claudin-5’tir (12). Ancak Claudin-1, 3, 12 de tespit edilmiştir. Beyin kapiller endotelinde de yüksek düzeyde Claudin-10 ve 22 ye rastlanmıştır (58).

2.2.5 Diğer Dokular

Claudinler başka dokularda da izole edilmişlerdir. Claudin-11 ve 19 miyelinli sinirleri ayırt etmeye ve sinir iletimini kolaylaştırmaya hizmet ettikleri bildirilmiştir. Periferik sinir sisteminde miyelin kılıflarının interlamellar ipliklerinde belirtilmiştir (59).

Claudin-4 pankreas ada hücrelerinde bulunmaktadır (11). Aynı zamanda claudinler lenfosit, monosit, dendritik hücreler, timositler, osteblast ve osteoklastlarda da bulunmaktadır (18).

Tablo 2: Gastrointestinal Sistem ve Solunum Yollarında Claudinler

Doku	Claudinler
Mide	3, 4, 5, 12, 18, 23
Bağırsak	1, 5, 7, 8, 10, 12, 13 (kemirgen), 2, 15, 18, 20, 21, 23
Karaciğer	1, 3, 5, 9, 14
Safra Kesesi	1, 4, 7, 8, 10
Solunum Sistemi	1, 3, 5, 7, 10, 18 (proksimal), 1, 3, 5, 7, 8, 18 (distal)
Epidermis	1, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 17
Göz	1, 4, 7 (konjonktiva ve retina), 10 (konjonktiva)
Tükürük Bezi	1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 12
Meme bezleri	1, 5, 7, 8, 15, 16
Tat alma cisimciği	4, 6, 7, 8
Ekzokrin Pankreas	1, 5, 7
Retina Pigment Epiteli	3, 10, 19 (insan), 1, 3 (kemirgen)
Koroid Plexus	1, 2, 5, 11
Koklea	1, 2, 3, 8, 9, 10, 12, 14, 18 (corti organı ve marjinal hücreler) 11 (vasküler stria bazal hücreleri)
Over	1, 5
Prostat	1, 3, 4, 5, 7, 8, 10
Epididim	2, 4, 5, 7, 10
Seminifer tübül	3, 5, 11
Mesane	4, 8, 12

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada claudinlerin çeşitli sistem hastalıklarıyla ilişkili olduğu gösterilmiş ve tedavide yol gösterici olduğu düşünülmüştür. Santral sinir sistemi hastalıklarında claudinlerin, santral sinir sistemine zarar verecek maddelere karşı bir bariyer oluşturarak koruduğu bilinmektedir. Santral sinir sisteminde ve kan beyin bariyerinde özellikle Claudin-5 yoğun olarak tespit edilmiştir. Claudin-5 fonksiyon bozukluğunda Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda, multipl skleroz

gibi nöroinflamatuvar hastalıklarda, depresyon ve şizofreni gibi psikiyatrik hastalıklarda rol oynadığı gösterilmiştir (58,60). Epilepsi ve migren gibi ağrı bozukluklarında da claudinlerin rolünün olduğu tespit edilmiştir (61).

Gastrointestinal sistem vücudu dış ortamdan ayıran bir bariyer sistem işlevi görür. SB'lar ise bu sistemde epitel tabakalarda önemli fonksiyonları vardır ve ana bileşenleri claudinlerdir. Reflü özafajit, gastrointestinal maligniteler, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, fonksiyonel gastrointestinal bozukluklar bu moleküllerdeki değişiklikler ile ilişkili olabilir. Her hastalığın biyo belirteci farklı olabilir ve bunlardaki regülasyonun düzenlenmesi hastalıkların tedavisinde belirleyici olabilir (56).

Solunum sistemindeki claudinlerin yeri ise akciğer enfeksiyonları, KOAH, astım ve akciğer malignitesi dahil bir çok hastalıkta yeri olduğu anlaşılmıştır. ARDS, septik enfeksiyonlar dahil toksik kimyasalların verdiği alveoler hasara bağlı olarak oluşmaktadır. Claudinler hücrelerarası katmanların geçirgenliğini düzenlediğinden bunların ekspresyonundaki değişikliklerin rolü önemlidir. Özellikle Claudin-4 ve 18 membran direncinde önemlidir. Farelerde sepsise bağlı akciğer hasarında yapılan bir çalışmada fraksiyone olmayan heparin (UFH) ile yapılan tedavilerde akciğer hasarını ve vasküler sızıntıyı azalttığı gözlemlenmiştir. UFH'nin Claudin-5, ZO-1 ve okludin salınımını düzenleyerek vasküler endotel permeabiliteyi düzenlediği tespit edilmiştir (62). Akut akciğer hasarındaki Claudin-5 etkisi ve dexametazon ile yapılan çalışmada; hidrojen sülfür (H_2S) gazına maruz bırakılan farelerde akciğerde Claudin-5 mRNA ekspresyonu azalmış ve artan akciğer ödemi ve hasarı oluşmuştur. Dexametazon verilen deneklerde Claudin-5 mRNA ekspresyonu artarak endotel dokudan alveollere enflamatuvar hücrelerin sızmasını engellemiştir (20).

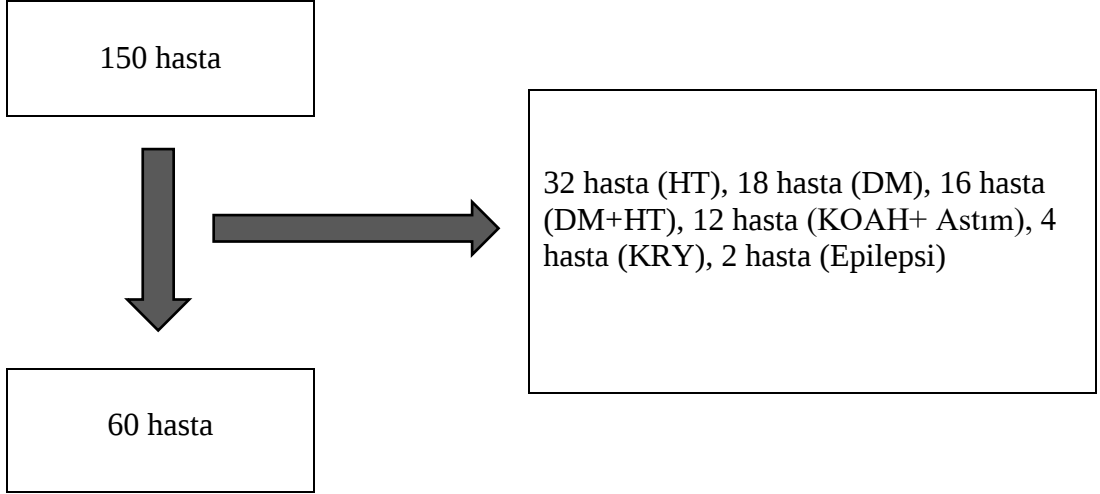
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK KURUL İZNİ

Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformuna 16.06.2020 yılı 2020-06-16T10_41_03 no'lu form ile yapmış olduğumuz başvuru ile COVID-19 ile ilgili çalışma izni alınmıştır. Çalışmamız 25.02.2021 tarihinde Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından OMÜ KAEK 2021/007 karar numarası ile onaylandı. Yaptığımız çalışma Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar ve İyi Laboratuvar Uygulamalarına uygun şekilde gerçekleştirildi.

3.2. ÇALIŞMANIN ÖZELLİKLERİ VE HASTA SEÇİMİ

Çalışmamız prospektif, tanımlayıcı ve analitik bir çalışma şeklinde planlandı. Çalışmamızda 01/03/2021 ile 30/04/2021 tarihleri arasında, Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Servisi'ne COVID-19 Hastalığı için başvuran, hastanedeki COVID-19 için ayrılmış servis ve yoğun bakım ünitesine yatışı yapılan 18 yaş üstü bireyler dahil edildi. Claudin-5 değerleri dikkate alındığında; %95 güven (1-alfa), %95 test gücü (1-beta) ve $d=1,767$ etki büyüklüğü ile iki yönlü bağımsız örnekler t testi power analizi sonucuna göre her bir grupta alınması gereken minimum örnek sayısı 10 olmak üzere toplam en az 20 vakanın çalışmaya katılması hesaplanmıştır. Bahsedilen tarihler arasında 150 hasta başvurusu oldu ve dışlama kriterlerine göre toplam 60 hasta ve 20 kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. Hastaların çalışmaya dahil edilme ve dışlama şeması Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6: Hastaların çalışmaya dahil edilmesi

3.3. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

1. 18 Yaş üstü olmak
2. RT-PCR pozitif olmak
3. Toraks BT viral pnömoni tutulumu olmak

3.4. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLMEME KRİTERLERİ

1. 18 yaş altı olmak
2. Hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalığı olmak
3. Diyabetes Mellitus hastası olmak
4. Kronik solunum yolu hastalığı olmak
5. Serebrovasküler hastalık, epilepsi hastası olmak
6. Kronik böbrek hastalığı olmak
7. Herhangi bir malignite olması

3.5. ÇALIŞMANIN YÖNTEMİ

Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet verileri kaydedildi. Acil servise başvuran RT-PCR sonucu pozitif olan ve toraks BT’de viral pnömoni tutulumu olan hastalar kayıt altına alındı. Tüm hastaların komorbid hastalıkları olup olmadığı, kronik ilaç kullanımını sorgulandı ve kayıt edildi. Hastalar CO-RADS ve BT şiddet skorlamasına göre üç gruba ayrıldı;

- . Hafif tutulum gösteren viral pnömoni
- . Orta tutulum gösteren viral pnömoni
- . Şiddetli tutulum gösteren viral pnömoni

Hastaların solunum sayısı, oksijen saturasyonları, vital bulguları, CRP, D-dimer, biyokimya (AST, ALT, üre, kreatin, glukoz), lökosit, lenfosit, nötrofil değerleri kayıt altına alındı. Yatırıldıkları servis (COVID-19 servisi veya yoğun bakım ünitesi) belirlendikten sonra mortalite ve hastaneden taburculuk bilgileri kayıt altına alındı. Hastalara yatış işlemleri yapılırken çalışmayla ilgili onamları alındıktan sonra kanları alınarak Claudin-5 düzeyleri ölçüldü.

3.6. SERUM CLAUDİN-5 SEVİYESİNİN ANALİZİ

Tüm katılımcılardan alınan venöz kan örnekleri santrifüj edilerek analiz zamanına kadar -80 °C’de saklandı. Serum Claudin-5 düzeyi tayininde ticari olarak bulunabilecek ELISA yöntemi kullanıldı. Serumda Claudin-5 tayini, Claudin-5 Human ELISA kit/96 kiti (Bioassay Technology Laboratory®, Shangai, China) ile gerçekleştirildi. Analiz üretici firmanın kit prospektüsünde verdiği talimatlar doğrultusunda yapıldı. Sonuçlar ELISA okuyucusu (Tecan®, Infinite M200 pro, Austria) kullanılarak 450 nm’de kaydedildi.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 15.0 (Chicago, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılımına uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (*Kolmogrov Smirnov*, *Shapiro-Wilk testi*) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı istatistikler normal dağılan sayısal verilerde ortalama ve standart sapma, normal dağılmayanlarda median (minimum-maksimum değer) şeklinde, nominal verilerde sayı ve yüzde şeklinde ifade edildi. Normal dağılan

sayısal değişkenler iki grup arasında “*bağımsız gruplarda t testi*” kullanılarak analiz edildi. Normal dağılmayan sayısal değişkenler iki grup arasında “*Mann Whitney U testi*” kullanılarak analiz edildi. Normal dağılmayan değişkenler üç grup arasında “*Kruskal Wallis testi*” ile karşılaştırıldı. Nominal verilerin karşılaştırılmasında “*Ki-kare analizi*” kullanıldı. Sensitivite ve spesifite analizlerinde ki-kare tablosu ve “MedCalc” (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belçika) programı kullanıldı. Tanısal performansın hesaplanmasında sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) analizlere dahil edildi. Çalışmadaki istatistiksel analizlerde $p<0.05$ ’in altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Demografik ve klinik özellikler

Çalışmaya ek hastalığı olmayan 60 COVID-19 hastası ve 20 sağlıklı kişi kontrol grubuna dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması $47,8 \pm 14,2$ yıl, kontrol grubunun ise $44,0 \pm 8,5$ yılı ($p=0,152$). Hastaların %65'i kadın, %35'i erkek, kontrol grubunun ise %50'si kadın, %50'si erkekti ($p=0,233$). Tablo 3'te katılımcıların demografik özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 3. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	Hasta (n=60)	Kontrol (n=20)	p değeri
Yaş (<i>Ort $\pm$ SS</i>)	$47,8 \pm 14,2$	$44,0 \pm 8,5$	0,152 [†]
Cinsiyet (<i>N[%]</i>)			
Kadın	39 (65,0)	10 (50,0)	0,233 ^{††}
Erkek	21 (35,0)	10 (50,0)	

[†]Bağımsız gruplarda *t* testi, ^{††}Ki-kare testi

Akciğer tutulumu hastaların %38,3'ünde hafif şiddetli, %35'inde orta şiddetli, %26,7'inde ağır şiddetliydi. Hastaların %15'i YBÜ'ne yatırıldı. Hastaların %6,7'si COVID-19 nedeniyle öldü. Hastaların klinik özellikleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Hastaların klinik özellikleri

Özellik	Değer
Prognoz	<i>N (%)</i>
	Ölen 4 (6,7)
	Sağ kalan 56 (93,3)
YBÜ	<i>N (%)</i>
	Evet 9 (15,0)
	Hayır 51 (85,0)
Hospitalizasyon süresi (gün)	<i>Med (min-max)</i> 5 (3-26)
Sistolik kan basıncı	<i>Ort ± SS</i> 111 ± 14
Diastolik kan basıncı	<i>Ort ± SS</i> 67 ± 10
Akciğer tutulumu	<i>N (%)</i>
	Hafif şiddetli 23 (38,3)
	Orta şiddetli 21 (35,0)
	Ağır şiddetli 16 (26,7)
O2 saturasyonu (%)	<i>Ort ± SS</i> 88,6 ± 6,5 (68-95)
Solunum sayısı	<i>Ort ± SS</i> 17,5 ± 5,2 (12-32)

*YBÜ; yoğun bakım ünitesi

Hastaların laboratuvar sonuçları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Hastaların laboratuvar sonuçları ve dağılımı

Özellik	Median değer (min-max)
CRP	6,5 (1-339)
WBC	6,9 (2,6-20,0)
D-Dimer	0,86 (0,21-17,40)
Glukoz	108 ± 24
Üre	29 (12-104)
Kreatinin	0,6 (0,3-1,7)
AST	27 (16-104)
ALT	31 (9-124)
Nötrofil	4,9 (1,4-16,4)
Lenfosit	1,1 (0,2-3,6)
NLR	4,0 (0,9-50,0)

* CRP; C reaktif protein,, WBC; white blood cell, AST; aspartat aminotransferaz, ALT; alanin aminotransferaz, NLR; neutrophil-lymphocyte rate

4.2. Claudin-5 düzeyleri ve ilişkili faktörler

COVID-19 hastalarının serum Claudin-5 konsantrasyonu median 6,598 ng/ml, kontrol grubunda ise median 5,108 ng/ml idi. Hastaların Claudin-5 seviyesi kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksekti ($p=0,005$) (Tablo 6).

Tablo 6. Hasta ve kontrol grubunda Claudin-5 düzeyleri

	Hasta (n=60)	Kontrol (n=20)	p değeri
Claudin-5 (ng/ml)	6,598 (4,069-8,540)	5,108 (2,522-7,812)	0,005[†]

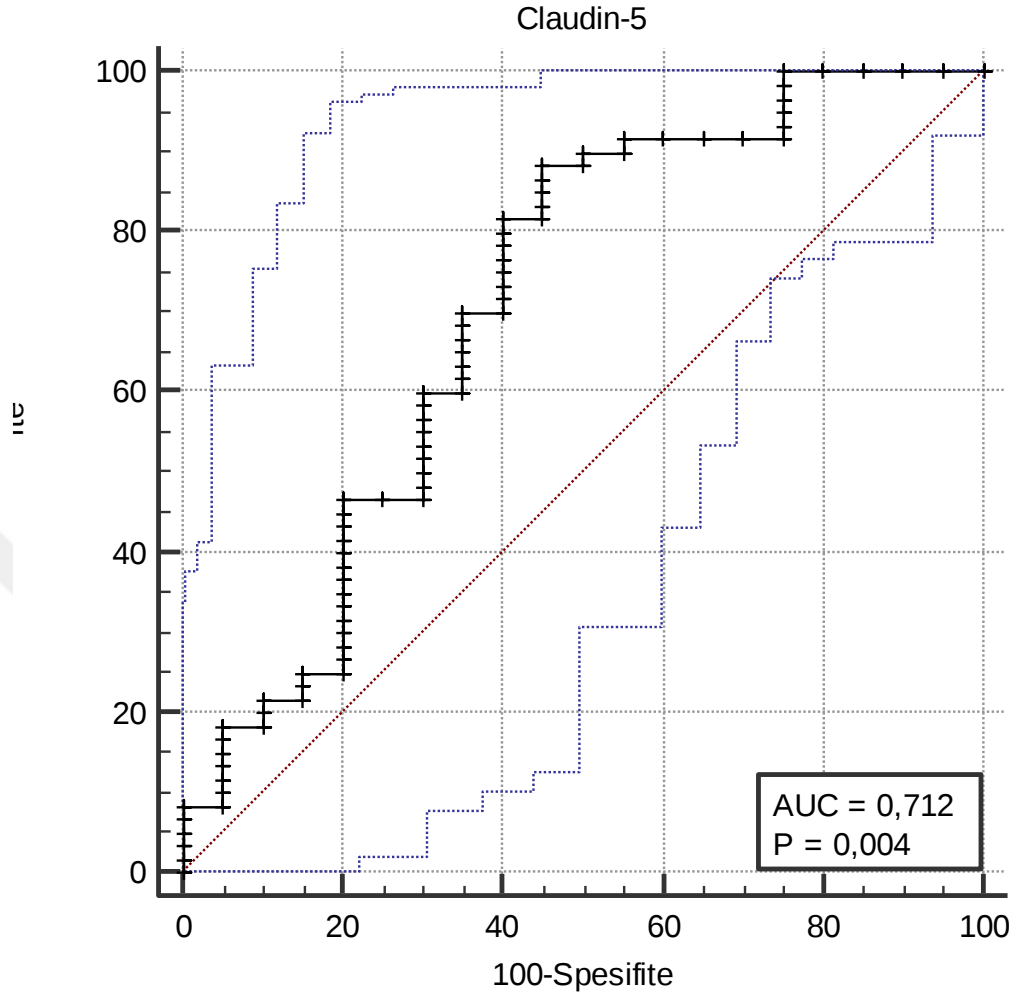
**Veriler median (min-max) şeklinde ifade edilmiştir, [†]Mann-Whitney U testi*

ROC analizinde, COVID-19 tanısında serum Claudin-5 seviyesinin tek başına belirleyici olduğu görüldü (AUC=0,712, %95 GA: 0,600-0,808, p=0,004) (Şekil 7). COVID-19 tanısında en iyi tanısal performans Claudin-5 seviyesi 5,128 ng/ml üzerinde olduğunda elde edildi. Claudin-5 seviyesinin 5,128 ng/ml üzerinde olması %88,3 sensitivite, %55,0 spesifite ile COVID-19 hastalarını kontrol grubundan ayırmaktaydı (Tablo 7).

Tablo 7. COVID-19 tanısında Claudin-5 konsantrasyonunun tanısal performansı

	Eşik değer	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	PPD (%)	NPD (%)
Cluadin-5 (ng/ml)	>5,128	88,3	55,0	85,5	61,1

**PPD; pozitif prediktif değer, NPD; negatif prediktif değer*



Şekil 7. COVID-19 tanısında Claudin-5 seviyelerinin ROC curve analizi

Hasta ve kontrol grubunda cinsiyete göre Claudin-5 düzeyleri Tablo 8’de gösterilmiştir. Buna göre Claudin-5 düzeyleri hasta ve kontrol grubunda cinsiyete göre farklılık göstermemektedir (sırasıyla $p=0,310$, $p=0,705$).

Tablo 8. Hasta ve kontrol grubunda cinsiyetlere göre Claudin-5 düzeylerinin dağılımı

Cinsiyet	Hasta (n=60)	Kontrol (n=20)
Kadın	6,574 (4,069-8,076)	5,108 (2,522-7,086)
Erkek	6,647 (4,362-8,540)	5,437 (3,767-7,812)
p değeri	0,310 [†]	0,705 [†]

[†]Mann-Whitney U testi

Claudin-5 düzeyleri hasta ve kontrol grubunda yaş ile korelasyon göstermemekteydi (sırasıyla $p=0,705$, $p=0,557$). Tablo 9’da katılımcıların yaşı ile Claudin-5 düzeyleri arasındaki korelasyon gösterilmiştir.

Tablo 9. Hasta ve kontrol grubunda yaş ile Claudin-5 düzeylerinin korelasyonu

Yaş	Hasta (n=60)	Kontrol (n=20)
Korelasyon katsayısı	0,050	0,140
p değeri	0,705 [†]	0,557 [†]

[†]*Spearman korelasyon testi*

Hastaların klinik özelliklerine göre Claudin-5 konsantrasyonlarının dağılımı incelendi. Ölen hastalarda Claudin-5 seviyesi 6,222 ng/ml, sağ kalanlarda 6,607 ng/ml idi. Sadece 4 hasta öldüğü için hastaların prognozu Claudin-5 analizlerine dahil edilmedi.

YBÜ’ne kabul edilen hastaların Claudin-5 seviyesi 6,827 ng/ml, servise yatırılanların 6,554 ng/ml idi. YBÜ’ne kabul edilen ve edilmeyen hastalar arasında Claudin-5 seviyeleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,203$).

Klinik olarak ağır şiddette akciğer tutulumu önemli olduğu için, hastalar akciğer tutulumlarına göre hafif-orta ve ağır şiddetli şeklinde sınıflandırıldı. Akciğer tutulumu hafif-orta olanların Claudin-5 düzeyleri 6,512 ng/ml, ağır şiddetle olanların 6,898 ng/ml idi. Ağır şiddette akciğer tutulumu olanların Claudin-5 düzeyleri hafif-orta şiddette akciğer tutulumu olanlardan anlamlı derecede daha yüksekti ($p=0,030$). Tablo 10’da hastaların klinik özellikleri ile Claudin-5 seviyeleri arasındaki ilişki gösterilmiştir.

Tablo 10. Hastaların klinik özelliklerine göre Claudin-5 düzeylerinin dağılımı

Özellik		Değer Med (min-max)
Prognoz		
	Ölen	6,222 (4,456-6,827)
	Sağ kalan	6,607 (4,069-8,540)
p değeri		-
YBÜ		
	Evet	6,827 (4,456-7,966)
	Hayır	6,554 (4,069-8,540)
p değeri		0,203
Akciğer tutulumu		
	Hafif-orta şiddetli	6,512 (4,069-8,540)
	Ağır şiddetli	6,898 (4,456-7,966)
p değeri		0,030[†]

[†]Mann-Whitney U testi ^{††}Kruskal Wallis testi

*YBÜ; yoğun bakım ünitesi

ROC analizinde, Claudin-5 ve klinik ve diğer laboratuvar parametrelerinin ağır akciğer tutulumundaki belirleyicilikleri analiz edildi. Ağır akciğer tutulumunda beklendiği üzere en belirleyici faktörlerin O₂ saturasyonu (AUC=0,966) ve solunum sayısı (AUC=0,969) olduğu izlendi. Bununla birlikte, Claudin-5 seviyelerinin ağır şiddette akciğer tutulumunda tek başına belirleyici olduğu görüldü (AUC=0,685, %95 GA: 0,552-0,799, p=0,018). O₂ saturasyonu ve solunum sayısından sonra en iyi belirleyiciler sırasıyla CRP (AUC=0,878), kreatinin (AUC=0,858) ve üre (AUC=0,844) idi (Tablo 11).

Tablo 11. Ağır şiddette akciğer tutulumunda Claudin-5, O₂ saturasyonu, solunum sayısı ve CRP seviyesinin belirleyiciliği

	AUC	%95 GA	p değeri
Claudin-5	0,685	0,552-0,799	0,018
O₂ saturasyonu (%)	0,966	0,884-0,996	<0,001
Solunum sayısı	0,969	0,888-0,997	<0,001
Vücut ısısı (°C)	0,506	0,373-0,637	0,944
Sistolik KB (mmHg)	0,563	0,429-0,691	0,517
Diastolik KB (mmHg)	0,544	0,410-0,673	0,650
CRP (mg/dl)	0,878	0,768-0,948	<0,001
WBC (10³/µL)	0,519	0,386-0,650	0,825
D-Dimer (ng/mL)	0,790	0,666-0,885	<0,001
Glukoz (mg/dL)	0,714	0,582-0,823	0,006
Üre (mg/dL)	0,844	0,727-0,925	<0,001
Kreatinin (mg/dL)	0,858	0,744-0,935	<0,001
AST (U/L)	0,681	0,548-0,796	0,025
ALT(U/L)	0,771	0,645-0,870	<0,001
Nötrofil (10³/µL)	0,539	0,404-0,669	0,656
Lenfosit (10³/µL)	0,549	0,414-0,679	0,597
NLR	0,540	0,405-0,671	0,639

**AUC; eğri altında kalan alan, GA; güven aralığı*

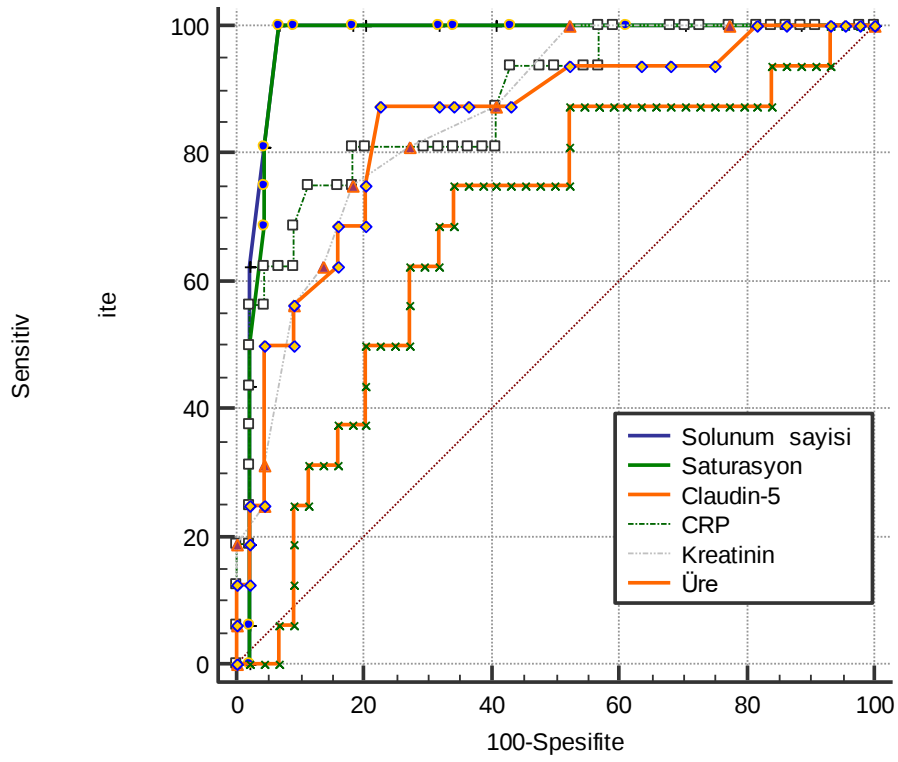
Claudin-5 seviyesinin ağır şiddette akciğer tutulumunda en iyi tanısal performansı 6,647 ng/ml üzerindeki değerlerde gösterdiği izlendi. Claudin-5 seviyesinin 6,647 ng/ml üzerinde olması ağır akciğer tutulumunda %75 sensitivite, %65,9 spesifite ile belirleyici idi. Claudin-5 ve diğer laboratuvar parametrelerinin tanısal performansı Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. Ağır şiddette akciğer tutulumunda Claudin-5, O₂ saturasyonu, solunum sayısı ve CRP seviyesinin tanısal performansı

	Eşik değer	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	PPD (%)	NPD (%)
Claudin-5	>6,647	75,0	65,9	44,4	87,8
O₂ saturasyonu (%)	≤86	100	93,2	84,2	100
Solunum sayısı	>18	100	93,2	84,2	100
Vücut ısısı (°C)	>37,1	93,7	22,7	30,6	90,9
Sistolik KB (mmHg)	≤100	43,7	75,0	38,9	78,6
Diastolik KB (mmHg)	≤80	81,3	0	22,8	0
CRP (mg/dl)	>120	75,0	88,6	70,6	90,7
WBC (10³/μL)	>5,8	75,0	38,6	30,8	81,0
D-Dimer (ng/mL)	>2,16	56,3	90,9	69,2	85,1
Glukoz (mg/dL)	>125	50,0	90,9	66,7	83,3
Üre (mg/dL)	>32	87,5	77,3	58,3	94,4
Kreatinin (mg/dL)	>0,7	75,0	81,8	60,0	90,0
AST (U/L)	>41	50,0	84,1	53,3	82,2
ALT(U/L)	>33	75,0	81,8	60,0	90,0
Nötrofil (10³/μL)	>4	80,0	43,2	32,4	86,4
Lenfosit (10³/μL)	≤0,8	53,3	65,9	34,8	80,6
NLR	>6,75	46,7	70,5	35,0	79,5

**PPD; pozitif prediktif değer, NPD; negatif prediktif değer*

Şekil 8’de ağır şiddette akciğer tutulumunda Claudin-5, O₂ saturasyonu, solunum sayısı ve CRP seviyesinin ROC grafiği gösterilmiştir.



Şekil 8. Ağır şiddette akciğer tutulumunda Claudin-5, O₂ saturasyonu, solunum sayısı, CRP, kreatinin ve üre seviyesinin belirleyiciliği

COVID-19 hastalarında solunum sayısı ($p=0,031$) ve sistolik kan basıncı ($p=0,039$) ile Claudin-5 seviyeleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon izlendi. Ancak Claudin-5 seviyeleri ile diğer klinik ve laboratuvar parametreleri arasında anlamlı bir korelasyon izlenmedi (Tablo 13).

Tablo 13. Hastalarda O₂ saturasyonu, solunum sayısı ve CRP seviyelerinin Claudin-5 düzeyleri ile korelasyonu

	Claudin-5	
	Korelasyon katsayısı	p değeri
O₂ saturasyonu	-0,232	0,075
Solunum sayısı	0,279	0,031
Vücut ısısı	-0,016	0,906
Sistolik kan basıncı	0,268	0,039
Diyastolik kan basıncı	0,104	0,430
Hospitalizasyon süresi	0,153	0,244
CRP	0,194	0,138
WBC	0,080	0,544
D-Dimer	0,153	0,242
Glukoz	-0,089	0,499
Üre	0,088	0,503
Kreatinin	0,107	0,417
AST	-0,178	0,173
ALT	-0,039	0,767
Nötrofil	0,040	0,761
Lenfosit	0,030	0,822
NLR	0,016	0,907

[†]Tüm analizlerde Spearman korelasyon testi kullanıldı

5. TARTIŞMA

Claudin-5 beyin, akciğer, karaciğer, böbrek ve cilt gibi organların endotel hücrelerinden eksprese edilmektedir. Birçok dokudan eksprese edilmesine rağmen beyin ve akciğerdeki ekspresyonu daha fazladır (60,63). Sıkı bağlantı proteini olan Claudin-5 endotelyal hücre-hücre adezyonu ve bariyer fonksiyonuna sahiptir. Hücreler arası yollarda iyon seçiciliğinden sorumludur. Aynı zamanda kan beyin bariyerinin önemli yapıtaşlarından (18). Daha önce sınırlı sayıda çalışmada COVID-19'un kan beyin bariyerini etkilediği bildirilmiştir (64). Yüksek riskli hastaların COVID-19 enfeksiyonunu ağır geçirmelerine vasküler endotel hasarının aracılık ettiği bilinmektedir (65). Hastalığa bağlı kaybedilen hastaların otopsi çalışmalarında endotel hasarının şiddetli olduğu izlenmiştir (66). Claudin-5 başlıca endotel hücrelerinden eksprese edilmektedir, ekspresyonundaki değişimler ise endotel disfonksiyonuyla ilişkilidir (67). Çalışmamızda bu nedenle COVID-19 hastalarında Claudin-5 seviyeleri değerlendirilmiş, kontrol grubuyla karşılaştırılmış ve Claudin-5'in COVID-19 hastalarındaki tanısal ve prognostik önemi araştırılmıştır.

Çalışmamızda COVID-19 hastalarında, yaş ve cinsiyete göre eşleştirildi, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla Claudin-5 seviyelerinin daha yüksek olduğu izlendi. Claudin-5 (>5,128 ng/ml) COVID-19 hastalarını sağlıklı kontrollerden %88,3 sensitivite, %55,0 spesifite ile ayırabilmektedir. Bulgularımız Claudin-5 seviyelerinin COVID-19 için tanısal önemi olduğuna işaret etmektedir. Ek olarak, akciğer tutulum şiddeti ağır olan hastalarda Claudin-5 seviyelerinin daha yüksek olduğu, ağır akciğer tutulumu olan hastaları (>6,647 ng/ml) diğerlerinden %75 sensitivite ve %65,9 spesifite ile ayırabilmekteydi. Bu nedenle tanısal önemine ek olarak Claudin-5'in COVID-19 patogeneziyle ilişkili olduğu ve COVID-19 hastaları için prognostik değeri olduğu düşünüldü. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız COVID-19 hastalarında Claudin-5'in kan konsantrasyonlarının arttığı gösterilen ilk klinik çalışmadır. Daha önce COVID-19 enfeksiyonunda Claudin-5 ekspresyonunu değerlendiren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur, ancak bu çalışmalar (64,65) deneysel özellikte olup klinik değerlendirmeden öte Claudin-5 transkripsiyonu veya ekspresyonu değerlendiren ve COVID-19 patofizyolojisinin aydınlatılmasını amaçlayan çalışmalardan oluşmaktadır.

Reynolds ve ark'ının (64) yaptığı çalışmada COVID-19 hastalarında nörolojik semptomların izlenmesinden yola çıkılarak, hastalığa bağlı nörolojik semptomların gelişiminde kan-beyin bariyerinin etkisi ve nöroinflamasyon varlığı değerlendirilmiştir. Çalışmada COVID-19'un normal astrositlerde ve beyin mikrovasküler endotelial hücrelerinde bulunan ACE-2 reseptörleri aracılığıyla beyine girdiği, sonrasında sıkı bağlantı proteinlerinde değişim yaparak kan-beyin bariyerinde bozulmaya neden olduğu, bu şekilde COVID-19'un nöroinflamasyonu ve oksidatif stresi artırarak nöronal hücre ölümüne neden olduğu ileri sürülmüştür. Reynolds ve ark'ının bu çalışmasında kan-beyin bariyerinin in vivo özelliklerini ve fonksiyonel özelliklerine oldukça benzeyen bir in vitro kan-beyin bariyer modeli tercih edilmiştir. Bu model rekombinant SARS-CoV-2 spike proteinine maruz bırakılmıştır. Sonrasında, kantitatif PCR yöntemiyle Claudin-5 gen ekspresyonu değerlendirilmiştir. Çalışmada kan-beyin bariyeri modelinde Claudin-5 gen ekspresyonunda belirgin bir azalma olduğu izlenmiştir. Bu bulgular ışığında, SARS-CoV-2 ile ilişkili endotelial hücre disfonksiyonunun, COVID-19 ile enfekte hastalarda gözlenen SARS-CoV-2 ile ilişkili nöropatolojinin öncüsü olduğu düşünülmüş, kan-beyin bariyer hasarını önleyecek anti-sitokin temelli tedavilerin COVID-19 ilişkili nörolojik semptom ve bulguların tedavisinde etkili olabileceği ifade edilmiştir. Çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada in vitro analizler ve modeller oluşturulmuş ve Claudin-5 seviyesi gen düzeyinde çalışılmıştır. Claudin-5 gen ekspresyonun serum düzeyinden farklılık göstermesi nedeniyle çalışmalar arasında direkt bir karşılaştırma yapılması doğru olmayabilir. COVID-19'a bağlı nörolojik semptomların gelişiminde kan-beyin bariyerindeki değişimlerin etkili olduğu başka çalışmalarda da gösterilmiştir (68). Hayvan çalışmalarında da Claudin-5 ekspresyonu baskılandığında kan beyin bariyerinin permeabilitesinde belirgin artış olduğu ifade edilmiştir (13).

Torices ve ark'ının (69) çalışmasında COVID-19'un nörolojik semptomların patogenezinin aydınlatılması için insan beyin mikrovasküler endotelial hücre kültürleri oluşturulmuştur. Hücre kültürleri COVID-19'un S proteinin ünitesine maruz bırakıldıktan sonra sıkı bağlantı proteinleri değerlendirilmiştir. Claudin-5 ekspresyon seviyesi bu çalışmada immunblotting yöntemiyle değerlendirilmiştir. S1 proteini maruziyeti sonrasında 3. saatte Claudin-5 ekspresyon seviyesinde azalma izlenirken, 48 ve 72. saatte Claudin-5 seviyelerinde belirgin bir yükselme izlenmiştir. Çalışmanın

sonunda 72. saatte S1 proteinine maruz bırakılmayan hücre kültürüyle karşılaştırıldığında Claudin-5 seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgular COVID-19'un kan beyin bariyerinde bozulmaya neden olduğuna ve nörolojik semptomların izlenmesinde Claudin-5'in rolü olduğuna işaret etmektedir. Çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada Claudin-5 farklı yöntemlerle değerlendirilmiş ve farklı zaman noktalarında tekrar değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızda ise hastaların tanı anındaki Claudin-5 seviyeleri değerlendirilmiştir. Ancak hastalık seyri içerisinde Claudin-5 seviyelerinde farklı yönde değişimler olabilir.

Flores-Pliego ve ark'nın (70) çalışmasında ise COVID-19'un plasenta üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. RT-PCR pozitif olan kadınların plasenta dokuları doğum sonrasında incelenmiştir. Gestasyonel yaşa göre eşleştirilmiş sağlıklı kadınların plasentaları kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmada hafif ve şiddetli COVID-19 vakalarında, plasantanın desidua ve koryonik villuslarında Claudin-5 ekspresyonu değerlendirilmiştir. İmmü floresans yönteminin kullanıldığı çalışmada hafif vakalarda, kontrollere kıyasla desidua ve koryonik villuslarda Claudin-5 ekspresyonunun değişmediği görülmüştür. Ancak şiddetli COVID-19 vakalarında desidua ve koryonik villuslarda Claudin-5 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Endotel hücrelerindeki ana claudin çeşidi Claudin-5 olduğu için (71), çalışmada hastalık şiddeti artış gösterdiğinde plasantanın sıkı bağlantılarının disfonksiyonu nedeniyle vasküler sızıntıya neden olarak plasental perfüzyonu olumsuz etkileyebileceği düşünülmüştür.

Claudin-5 seviyeleri farklı viral enfeksiyonlarda değerlendirilmiştir. Tropikal ülkelerde endemik bir enfeksiyon olan Dengue Ateşinde plazma sızıntısı önemli bir özelliktir (72). Plazma sızıntısı primer olarak mikrovasküler endotelyumun permeabilitesindeki değişimlere bağlı gelişmektedir (73,74) . Suwanto ve ark'ı (75) vasküler endotelial hücrelerde Claudin-5 ekspresyonu fazla olduğu için Dengue Ateşinde plazma sızıntısı ile Claudin-5'in ilişkisini değerlendirilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde Claudin-5 seviyeleri serumdan ELİSA yöntemiyle çalışılmıştır. Çalışmada Claudin-5 seviyelerinin hastalık şiddetiyle ilişkili olduğu, plazma sızıntısı olan grupta daha yüksek seviyede izlendiği ifade edilmiştir. Dengue virüsü haricindeki virüslerin de içerisinde claudinlerin olduğu sıkı bağlantı proteinlerinde bozulmaya yol

açabileceği bildirilmiştir. Bu virüsler içerisinde respiratuvar sinsityal virüs, insan rinovirüsü, koksakivirüs, enterovirüs, insan adenovirüsü, influenza A, influenza H1N1, insan immün yetmezlik virüsü, insan parainfluenza virüsü ve bocavirüs yer almaktadır. Bu virüslerin farklı claudin türleri üzerinde etkisi olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (76). Bu nedenle çalışmamızda izlenen Claudin-5 seviyelerindeki yükselmenin COVID-19'a özgü olmadığı başka viral enfeksiyonların da benzer değişimlere yol açabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda COVID-19 hastalarında serum Claudin-5 konsantrasyonu yüksek bulundu, ancak bu yükselmenin altında yatan mekanizmalar net olarak bilinmemektedir. COVID-19 patofizyolojisinin tam olarak bilinmemesine rağmen her geçen gün daha çok veriye ulaşılmaktadır. Daha önce Claudin-5 ekspresyonunun akut akciğer hasarında artış gösterdiği deneysel bir hayvan modelinde gösterilmiştir. Jang ve ark'ının (20) çalışmasında akut akciğer hasarında pulmoner ödem gelişimi için endotel bariyerlerin bozulması gerektiğinden yola çıkılarak akrolein ile deneysel bir akciğer hasarı modeli oluşturulmuştur. Sonrasında endotel hücrelerinde Claudin-5 transkriptleri değerlendirilmiştir. Akrolein maruziyeti sonrasında doku düzeyinde Claudin-5 transkriptlerinde artış olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmada akut akciğer hasarının önlenmesinde endotelial Claudin-5 moleküllerinin korunmasının yeni bir tedavi potansiyeli taşıdığı ifade edilmiştir. Akut akciğer hasarında olduğu gibi COVID-19 hastalarında da pulmoner ödem izlenmektedir (77). Bu nedenle çalışmamızda Claudin-5 seviyelerinde artış izlenmiş olabilir.

Endotel hücreleri çoğunlukla kan damarlarının iç tabakasında bulunmakta ve perisitler tarafından korunmaktadır (78). Pulmoner endotel hücreleri ise kan ve interstisyum arasında temel bir bariyer görevi görmektedir (79,80). Pulmoner endotel hücrelerinin aktivasyonu veya disfonksiyonu ARDS'nin ana bulguları arasındadır (81). COVID-19 enfeksiyonunun hem vasküler hem de pulmoner endotel hücrelerinin etkilediği hakkında giderek daha çok kanıt elde edilmektedir (82,83). Ağır veya şiddetli COVID-19 hastaları YBÜ'ne daha fazla kabul edilmektedir ve bu hastaların sıklıkla altta yatan komorbid hastalıkları mevcuttur. Altta yatan diyabet, ileri yaş, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar gibi komorbid durumlar hastalığın prognozunu kötüleştirmektedir. Bu komorbid durumların hastaların prognozunu kötüleştirmesine kronik endotel hasarına yol açmaları neden olabilir (84). Claudin-5

çok sayıda organda, özellikle beyin ve akciğerin endotelial hücrelerinden eksprese edilmektedir (60). Bu nedenle endotel hasarında Claudin-5 ekspresyonunun etkilenebileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda COVID-19 hastalarında Claudin-5 seviyelerinin belirleyici olduğu izlendi. Ancak oksijen saturasyonu, solunum sayısı ve CRP düzeyi ile karşılaştırıldığında Claudin-5 seviyelerinin ağır akciğer tutulumundaki belirleyiciliği daha düşüktü. Bu nedenle, Claudin-5'in tek başına kullanılmasının pratik uygulamada sınırlı olduğu söylenebilir. Ancak çalışmamızın sonuçları COVID-19 patogeneğinde Claudin-5'in yer aldığına işaret etmekteydi. Yapılacak olan prospektif dizayndaki çalışmalarla daha kapsamlı sonuçlara ulaşılabilir, Claudin-5'in terapötik açıdan önemi değerlendirilebilir.

Çalışmamıza dahil edilen akciğer tutulumu olan 60 hastanın 4'ü öldü. Ölen az hastanın olması nedeniyle Claudin-5 seviyeleri bu hastalarda analiz edilememiştir. Ancak Claudin-5 seviyelerinin ağır akciğer tutulumu olan hastalarda daha yüksek olması ve hastaların klinik olarak ağır şiddet şeklinde sınıflandırılmasında dikkate alınan solunum sayısı ile Claudin-5 seviyelerinin korelasyon göstermesi Claudin-5'in COVID-19 hastalarında önemli prognostik önemi olduğuna işaret etmekteydi.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttu. Çalışmamıza dahil edilen hasta sayısı kısmen azdı. Çalışmamıza sadece akciğer tutulumu olan hastalar dahil edildi ve Claudin-5 seviyeleri kontrol grubundan daha yüksek izlendi. Çalışmamıza dahil edilen hastalarda hastalık şiddetinin daha yüksek olduğu söylenebilir. Bulgularımız tüm COVID-19 hastalarından ziyade akciğer tutulumu olan hastalarda Claudin-5 seviyelerinin farklılık gösterdiği söylenebilir. Çalışmamızda Claudin-5 seviyeleri ELISA yöntemiyle serumdan çalışılmıştır. Ancak çok sayıda çalışmada doku düzeyinde kantitatif PCR veya immünofloresans veya işaretleme yöntemleriyle Claudin-5'in ekspresyon veya transkripsiyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla ilk defa yapılan çalışmamızda COVID-19 hastalarında serumdan ELISA yöntemiyle Claudin-5 seviyeleri incelenmiştir. Bununla birlikte çalışmalar arasında metodolojik farklılıklar olması nedeniyle çalışmalar arasında direkt bir karşılaştırma yapılması doğru olmayabilir. Ek olarak, Claudin-5 ekspresyonunu değerlendiren deneysel çalışmalarda farklı zamanlarda Claudin-5 ekspresyonunun değiştiği ifade

edilmiştir. Ancak çalışmamızda Claudin-5 seviyeleri bir defa değerlendirilmiştir. Hastalık seyrinde Claudin-5 seviyelerinin nasıl değiştiğini analiz eden prospektif çalışmalarla daha kapsamlı sonuçlara ulaşılabilir.



6. SONUÇ

1. COVID-19 hastalarında Claudin-5 seviyeleri sağlıklı bireylere göre daha yüksektir.
2. Şiddetli akciğer tutulumu olanlarda Claudin-5 seviyeleri daha yüksektir.
3. Klinik olarak şiddetli akciğer tutulumunda azalmış oksijen saturasyonu ve artmış solunum sayısı önemlidir. Artmış serum CRP, üre ve kreatin değerleri de belirleyici olarak görülmüştür.
4. Serum Claudin-5 düzeyleri COVID-19 hastalığında tanısal olarak anlamlı bulunmuştur.
5. Hastalarda solunum sayısı ve sistolik kan basıncı ile Claudin-5 düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon görülmüştür.
6. Hastaların mortalite oranlarında Claudin-5 düzeylerinde anlamlı bir fark olup olmadığı değerlendirilememiştir ve bunun için daha fazla hasta ile çalışma yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol*. 2020 Apr;92(4):401-402.
2. World Health Organization . 2020. WHO Director-General’s Remarks at the Media Briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>
3. Sohrabi C, Alsafi Z, O'Neill N, et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19) [published correction appears in *Int J Surg*. 2020 May;77:217]. *Int J Surg*. 2020;76:71-76.
4. Asselah T, Durantel D, Pasmant E, Lau G, Schinazi RF. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *J Hepatol*. 2021 Jan;74(1):168-184.
5. Amraei R, Rahimi N. COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. *Cells*. 2020;9(7):1652.
6. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507-513.
7. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Dec 17;383(25):2451-2460.
8. Erensoy S. COVID-19 Pandemisinde SARS-CoV-2 ve Mikrobiyolojik Tanı Dinamikler [SARS-CoV-2 and Microbiological Diagnostic Dynamics in COVID-19 Pandemic]. *Mikrobiyol Bul*. 2020 Jul;54(3):497-509.
9. Lieveid AWE, Azijli K, Teunissen BP, et al. Chest CT in COVID-19 at the ED: Validation of the COVID-19 Reporting and Data System (CO-RADS) and CT Severity Score: A Prospective, Multicenter, Observational Study. *Chest*. 2021 Mar;159(3):1126-1135.
10. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61-72.

11. Kojima T, Yamaguchi H, Ito T, et al. Tight junctions in human pancreatic duct epithelial cells. *Tissue Barriers*. 2013;1(4):e24894.
12. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Nov;285(5):L1166-78.
13. Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 2003;161(3):653-660.
14. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Oct;17(5):453-8.
15. Elkouby-Naor L, Ben-Yosef T. Functions of claudin tight junction proteins and their complex interactions in various physiological systems. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2010;279:1-32.
16. Heinemann U, Schuetz A. Structural Features of Tight-Junction Proteins. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 29;20(23):6020.
17. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):631-45.
18. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013 Apr;93(2):525-69.
19. Soini Y. Claudins in lung diseases. *Respir Res*. 2011 May 27;12(1):70.
20. Jang AS, Concel VJ, Bein K, et al. Endothelial dysfunction and claudin 5 regulation during acrolein-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(4):483-90.
21. Li H, Singh S, Potula R, Persidsky Y, Kanmogne GD. Dysregulation of claudin-5 in HIV-induced interstitial pneumonitis and lung vascular injury. Protective role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(1):85-97.
22. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-733.

23. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 2020 Aug 25;324(8):782-793.
24. Yu WB, Tang GD, Zhang L, Corlett RT. Decoding the evolution and transmissions of the novel pneumonia coronavirus (SARS-CoV-2 / HCoV-19) using whole genomic data. *Zool Res*. 2020 May 18;41(3):247-257.
25. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*. 2003;362(9393):1353-1358.
26. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1814-1820.
27. Goldsmith CS, Tatti KM, Ksiazek TG, et al. Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(2):320-326.
28. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8.
29. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020;8(4):420-422.
30. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844-847.
31. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020;191:145-147.
32. Chu DK, Akl EA, Duda S, et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2020;395(10242):1973-1987.
33. Dashraath P, Wong JLJ, Lim MXK, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;222(6):521-531.

34. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19 [published correction appears in *Nat Med*. 2020 Sep;26(9):1491-1493]. *Nat Med*. 2020;26(5):672-675.
35. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann Intern Med*. 2020;172(9):577-582.
36. Docherty AB, Harrison EM, Green CA, et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ*. 2020;369:m1985.
37. Garg S, Kim L, Whitaker M, et al. Hospitalization Rates and Characteristics of Patients Hospitalized with Laboratory-Confirmed Coronavirus Disease 2019 - COVID-NET, 14 States, March 1-30, 2020. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 69(15), 458–464.
38. Götzinger F, Santiago-García B, Noguera-Julián A, et al. COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020;4(9):653-661.
39. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA*. 2020;323(18):1843-1844.
40. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2020;34:101623.
41. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-1720.
42. Shi H, Han X, Jiang N, et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(4):425-434.
43. Alhazzani W, Møller MH, Arabi YM, et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Intensive Care Med*. 2020;46(5):854-887.

44. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) treatment guidelines. National Institutes of Health website. Updated June 25, 2020. Accessed July 1, 2020. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov>
45. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384(8):693-704.
46. Lurie N, Saville M, Hatchett R, Halton J. Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed. *N Engl J Med*. 2020;382(21):1969-1973.
47. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 1998;141:1539–50.
48. Jeansonne B, Lu Q, Goodenough DA, Chen YH. Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. *Cell Mol Biol*. 2003;49:13–21.
49. Stiffler MA, Chen JR, Grantcharova VP, et al. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome [published correction appears in *Science*. 2007 Oct 19;318(5849):393]. *Science*. 2007;317(5836):364-369.
50. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*. 2011;585(4):606-612.
51. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol*. 2009;10:235.
52. Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Apr;13(4):875-886.
53. Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, et al. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(2):F305-F318.
54. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, et al. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(8):933-944.

55. Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002;156(6):1099-1111.
56. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease [published correction appears in *Gastroenterology*. 2005 Feb;128(2):524]. *Gastroenterology*. 2004;127(5):1386-1390.
57. Kaarteenaho-Wiik R, Soini Y. Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *J Histochem Cytochem.* 2009;57:187–95.
58. Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem.* 2008;104(1):147-154.
59. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, et al. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005;169(3):527-538.
60. Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS.* 2019 Jan 29;16(1):3.
61. Yücel, M et al. “Serum levels of endocan, claudin-5 and cytokines in migraine.” *European review for medical and pharmacological sciences* vol. 20,5 (2016): 930-6.
62. Liu Y, Mu S, Li X, Liang Y, Wang L, Ma X. Unfractionated Heparin Alleviates Sepsis-Induced Acute Lung Injury by Protecting Tight Junctions. *J Surg Res.* 2019 Jun;238:175-185.
63. Daneman R, et al. The mouse blood–brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS ONE.* 2010;5(10):e13741.
64. Reynolds JL, Mahajan SD. SARS-COV2 Alters Blood Brain Barrier Integrity Contributing to Neuro-Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021;16(1):4-6.
65. Yamaoka-Tojo M. Vascular Endothelial Glycocalyx Damage in COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9712.

66. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020;383:120–128.
67. Escudero-Esparza A, Jiang WG, Martin TA. Claudin-5 participates in the regulation of endothelial cell motility. *Mol Cell Biochem.* 2012;362(1-2):71-85.
68. Erickson MA, Rhea EM, Knopp RC, Banks WA. Interactions of SARS-CoV-2 with the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2681.
69. Torices S, Cabrera R, Stangis M, Naranjo O, Adesse D, Toborek M. Expression of SARS-CoV-2-related Receptors in Cells of the Neurovascular Unit: Implications for HIV-1 Infection. Preprint. *Res Sq.* 2021;rs.3.rs-228960.
70. Flores-Pliego A, Miranda J, Vega-Torreblanca S, et al. Molecular Insights into the Thrombotic and Microvascular Injury in Placental Endothelium of Women with Mild or Severe COVID-19. *Cells.* 2021;10(2):364.
71. Morita K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S. Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1999;147:185–194.
72. Rajapakse S, Rodrigo C, Maduranga S, Rajapakse AC. Corticosteroids in the treatment of dengue shock syndrome. *Infect Drug Resist* 2014; 7:137–43.
73. de Azeredo EL, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM. Thrombocytopenia in dengue: interrelationship between virus and the imbalance between coagulation and fibrinolysis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm* 2015; 2015:313842.
74. Srikiatkachorn A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost* 2009; 102:1042–9.
75. Suwanto S, Sasmono RT, Sinto R, Ibrahim E, Suryamin M. Association of Endothelial Glycocalyx and Tight and Adherens Junctions With Severity of Plasma Leakage in Dengue Infection. *J Infect Dis.* 2017;215(6):992-999.
76. Linfield DT, Raduka A, Aghapour M, Rezaee F. Airway tight junctions as targets of viral infections. *Tissue Barriers.* 2021;9(2):1883965.
77. Zwaveling S, Gerth van Wijk R, Karim F. Pulmonary edema in COVID-19: Explained by bradykinin?. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(6):1454-1455.
78. Sturtzel, C. Endothelial cells. *Adv. Exp. Med Biol.* 2017;1003: 71–91.

79. Zeng H. et al. Human pulmonary microvascular endothelial cells support productive replication of highly pathogenic avian influenza viruses: possible involvement in the pathogenesis of human H5N1 virus infection. *J. Virol.* 2012; 86: 667–678.
80. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* 2007;100:174–190.
81. Matthay, M. A., McAuley, D. F. & Ware, L. B. Clinical trials in acute respiratory distress syndrome: challenges and opportunities. *Lancet Respir. Med.* 2017; 5: 524–534.
82. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A. & Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat. Rev. Immunol.* 2020;20: 389–391.
83. Bermejo-Martin JF, Almansa R, Torres A, Gonzalez-Rivera M. & Kelvin DJ. COVID-19 as a cardiovascular disease: the potential role of chronic endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2020;116:132–133.
84. Jin Y, Ji W, Yang H, Chen S, Zhang W, Duan G. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020;5(1):293.



