T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SARS COV 2 SPİKE PROTEİN MRNA'SININ FARKLI HÜCRE HATLARINDA OLUŞTURACAĞI İMMÜN YANITIN GENOMİK VE PROTEOMİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Hale ÖKSÜZ

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ

ADANA-2023

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SARS COV 2 SPİKE PROTEİN MRNA'SININ FARKLI HÜCRE HATLARINDA OLUŞTURACAĞI İMMÜN YANITIN GENOMİK VE PROTEOMİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Hale ÖKSÜZ

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ

Bu çalışma TDK-2021-14322 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışma YÖK 100/2000 Doktora Projesi tarafından desteklenmiştir.

ADANA-2023

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamalarında beni yönlendiren, bana rehberlik eden, yardımcı olan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve tüm koşullarda anlayış gösteren kıymetli danışman hocam Sayın Prof.Dr. M. Bertan YILMAZ'a en içten dileklerimle saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Davut ALPTEKİN'e, doktora eğitimime katkıda bulunan, değerli zamanlarını benden esirgemeyen anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof.Dr. Ayfer PAZARBAŞI, Prof.Dr. Ümit LÜLEYAP, Prof.Dr. Osman DEMİRHAN, Dr.Öğr.Üyesi Perçin PAZARCI'ya ve bütün anabilim dalımız çalışanlarına tüm içtenliğimle teşekkür ederim. Ayrıca Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. B.Devrim ÖZCAN ve Uzm. Biyolog Elif DİKKAYA'ya laboratuvar çalışmamıza desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Ayrıca sevgili arkadaşlarım; Dr.Arş.Gör. N. Seda ILGAZ'a ve yüksek lisans öğrencisi GÖKSU ŞENER'e yardım ve desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Her zaman arkamda duran, beni her koşulda destekleyen sevgili annem Zühal ÖKSÜZ'e, babam Metin ÖKSÜZ'e, her durumda olduğu gibi tez çalışmamda da yardımlarını esirgemeyen abim Halil İbrahim ÖKSÜZ ve sevgili nişanlım Ali ÜÇKAYABAŞI'na çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TDK-2021-14322 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu ve YÖK 100/2000 Doktora Projesi tarafından tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR iii

İÇİNDEKİLER iv

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

ÇİZELGELER DİZİNİ viii

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ix

ÖZET xi

ABSTRACT xii

1. GİRİŞ ve AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. Koronavirüslerin kökeni ve tarihçesi 4

2.2. Yeni koronavirüs hastalığı (SARS-CoV-2) 5

2.2.1. SARS-CoV-2'nin kökeni ve evrimi 5

2.2.2. SARS-CoV-2'nin genom yapısı 5

2.2.2.1. Spike proteinin yapısı ve özellikleri 7

2.2.3. Klinik Özellikleri 7

2.2.4. Patogenezi 8

2.2.5. Epidemiyoloji ve bulaş 9

2.2.6. Tanı 11

2.2.7. Tedavi 12

2.3. Kanser ve COVİD-19 13

2.4. Çalışmamızda Kullandığımız Hücre Hatları 15

2.4.1. Kanser Hücre Hatları 16

2.4.1.1. A549 Hücre Hattı 16

2.4.1.2. HTC116 Hücre Hattı 16

2.4.1.3. FADU Hücre Hattı 16

2.4.2. Sağlıklı Kontrol Hücre Hattı 17

2.4.2.1. A549 BEAS2B Hücre Hattı 17

2.5. Kanser İlişkili Genler 17

2.5.1. STAT1.....17
2.5.2. STAT3.....18
2.5.3. IRF1.....18
2.5.4. PRDM1.....19
2.5.5. SP1.....19
2.5.6. POU5F1.....20
2.6. Büyüme Faktörleri.....20
2.7. Kök Hücreler…….....22
2.7.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....23
2.7.2. Mezenkimal Kök Hücreler.....24
2.7.2.1. Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler.....25
2.7.2.2. Plasental Mezenkimal Kök Hücreler.....25
2.7.2.3. Sinoviyal Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler.....26
2.7.3. Kök Hücre ile İlişkili Proteinler…….....26
2.7.3.1. Oct-4.....26
2.7.3.2. Sox2.....27
2.7.3.3. Nanog.....27
3. GEREÇ VE YÖNTEM..... 28
3.1. Transformasyon..... 28
3.1.1. Plazmid DNA izolasyonu..... 29
3.2. Hücre kültürü 31
3.3.RNA izolasyonu 31
3.3.1. RNA konsatrasyonlarının hesaplanması 32
3.3.2. RNA'dan cDNA eldesi..... 32
3.3.3. Real Time PCR..... 32
3.4. Eliza..... 33
3.5. İstatistiksel Analiz..... 34
4. BULGULAR..... 35
4.1. Gen Ekspresyon Bulguları..... 35
4.1.1. STAT1 Geni 35
4.1.2. STAT3 Geni 36
4.1.3. IRF1 Geni 37

4.1.4. PRDM1 Geni 37
4.1.5. SP1 Geni 38
4.1.6. POU5F1 Geni 39
4.1.7. OCT-4 Geni 40
4.1.8. SOX-2 Geni 41
4.1.9. NANOG Geni 42
4.2. ELİZA Bulguları 42
4.2.1.TGF-β1 42
4.2.2. IGF-1 44
4.2.3. PDGF 46
4.2.4. FGF-2 47
4.2.5. VEGF 49
5. TARTIŞMA 51
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 59
KAYNAKLAR 63
ÖZGEÇMİŞ 78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No: **Sayfa No:**

Şekil 2.1. Bir koronavirüsün şematik görünümü 6

Şekil 3.1. Her bir plazmid DNA'nın DH5α içinde çoğalmış saf kolonisi 30

Şekil 3.2. Plazmid DNA'sını gösteren agaroz jel görüntüsü 30

Şekil 4.1. Farklı hücre hatlarında STAT 1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması 35

Şekil 4.2. Farklı hücre hatlarında STAT 3 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması.. 36

Şekil 4.3. Farklı hücre hatlarında IRF 1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması. 37

Şekil 4.4. Farklı hücre hatlarında PRDM1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması. 38

Şekil 4.5. Farklı hücre hatlarında SP1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması. 39

Şekil 4.6. Farklı hücre hatlarında POU5F1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması 40

Şekil 4.7. Farklı mezenkimal kök hücrelerde OCT-4 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması. 40

Şekil 4.8. Farklı mezenkimal kök hücrelerde SOX 2 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması.. 41

Şekil 4.9. Farklı mezenkimal kök hücrelerde NANOG gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırılması. 42

Şekil 4.10. Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde TGF-β1 Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml). 43

Şekil 4.11. Farklı hücre hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde IGF-1 Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml) 45

Şekil 4.12. Farklı hücre hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde PDGF Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml). 46

Şekil 4.13. Farklı hücre hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde FGF2 Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml). 48

Şekil 4.14. Farklı hücre hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde VEGF Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml) 49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No: **Sayfa No:**

Çizelge 3. 1. cDNA sentez karışım oranları 32
Çizelge 3.2. PCR'daki ısıl döngüler ve süreleri 32
Çizelge 3.3. Real time PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....33
Çizelge 3.4. Real time PCR için kullanılan gen dizileri 33

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACE-2 : Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
ARDS : Akut Respiratuvar Distres Sendromu
BT : Bilgisayarlı Tomografi
CoV : Koronavirüs
COVID-19 : Yeni Koronavirü Hastalığı 19
CTD : C-terminal Domaini
DSÖ : Dünya Sağlık Sendromu
E : Zarf Proteini
FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
hACE-2 : İnsan ACE-2 Reseptörü
HE : Hemaglütinin-esteraz Proteini
HIV : İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
IRF1 : İnterferon Düzenleyici Faktör1
LB : Luria-bertani
M : Membran Proteini
MERS-CoV : Orta Doğu Solunum Sendromu
MKH : Mezenkimal Kök Hücre
N : Nükleokapsid Proteini
NIH : Ulusal Sağlık enstitüleri
NTD : N-terminal Domaini
Oct-4 : Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4
ORF : Açık Okuma Bölgeleri
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF : Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
POU5F1 : POU Domaini Sınıf 5 Transkripsiyon Faktörü 1
PRDM1 : PR alanı çinko parmak proteini 1
RBB : Reseptör Bağlanma Bölgesi
RBD : Reseptör Bağlanma Domaini
RT-PCR : Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S : Spike Proteini

SARS-CoV **:** Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü

SARS CoV-2 **:** Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2

sgRNA **:** Tek İplikli RNA

Sox2 **:** Cinsiyet Belirleyici Bölge Y-box 2

Sp1 **:** Spesifik Protein 1

STAT : Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatöraceü

TMPRSS 2 **:** Transmembran Serin Proteaz 2

TGF-β **:** Transforme Edici Büyüme Faktörü β

VEGF **:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

SARS COV 2 SPİKE PROTEİN MRNA'SININ FARKLI HÜCRE HATLARINDA OLUŞTURACAĞI İMMÜN YANITIN GENOMİK VE PROTEOMİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Bütün dünyada yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan Yeni Koronavirüs hastalığı (COVID-19) nedeniyle yaklaşık 7 milyon kişi hayatını kaybetmiştir. Farklı yaş gruplarındaki sağlıklı veya kanser gibi kronik bir hastalığı olan bireyler için, COVID-19 enfeksiyonu sonrası hücrelerdeki moleküler mekanizmaların anlaşılması büyük öneme sahiptir. Çalışmamızda, kanser hücrelerinde orijinal Wuhan Spike (S) proteini ile Omicron varyantı S protein transfektlerinin etkilerinin araştırılması ve çeşitli kanserlerde moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olunması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda sağlıklı hücre hattı olan BEAS2B, kanser hücre hatları olan A549, HCT116 ve FADU hücre hatları kullanıldı. Hücrelere Wuhan S ve Omicron varyantı S protein tranfekti uygulaması sonrası STAT1, STAT3, IRF1, SP1, PRDM1 ve POU5F1 kanser ilişkili genlerinin ifadeleri Real-time PCR (RT-PCR) yöntemi ile incelendi. Kullandığımız plansental, diş pulpası ve sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrelere (MKH) de Wuhan S ve Omicron varyantı S protein tranfekti uygulaması sonrası stemness belirteçleri olan OCT-4, SOX-2 ve NANOG genlerinin ifadeleri RT-PCR ile incelendi. Tüm hücrelerin tranfeksiyon sonrası kültür ortamına saldıkları bileşenlerdeki immün sistemle ilişkili proteinler olan TGF-β1, VEGF, PDGF, FGF-2 ve IGF-1'in seviyeleri kantitatif olarak enzime bağlı immunosorbent testi (ELİZA) ile değerlendirildi.

STAT3, IRF1, PRDM1 ve POU5F1 genleri için her iki transfekt tüm kanser hücre hatlarında indüklenme eğilimi göstermesine rağmen STAT1 geninde transfektler baskılanma eğilimindedir. Plasental ve sinovyal kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde SOX-2, OCT-4 ve NANOG genleri için her iki transfekt baskılanma eğilimi göstermektedir. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde SOX-2, OCT-4 ve NANOG genleri için Sp1 transfekti aşırı indüklenme gösterirken, Sp12 transfekti ise aşırı baskılanma eğilimindedir.

Çalışmamız sonucunda çeşitli kanser hücre hatlarında Sp1 ve Sp12 transfektlerinin farklı ekspresyon profilleri sergilemesi, COVID-19'da varyantların hücreleri farklı şekilde etkilediğini göstermektedir. Bu bağlamda kanser hastalarında COVID-19 varyantına göre tedavi ve ilaç seçilim süreçlerinin değerlendirilmesi gerektiği kanaatindeyiz. Eliza sonuçlarımız ise çeşitli kanserlerde varyant tipine göre büyüme faktörlerinin miktarlarının değişkenlik gösterdiğini ve artan protein miktarlarının anjiyogeneze katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Çalışmamız kanser hastalarının COVID-19 ile enfekte olması durumunda akciğer, farinks ve kolon kanserlerinin moleküler mekanizmasına ışık tuttuğu gibi, COVID-19 sonrası kanser hastalarının ilaç seçilimine katkı sağlayabilme potansiyelindedir. Ayrıca çalışmamız, transfeksiyon sonrası kök hücrelerin salgılarını ve kanserde tümör mikroçevresinin davranışının değerlendirilmesine ışık tutacaktır. Gelecekte çeşitli genler ve proteinlerin eklenerek araştırıldığı kapsamlı çalışmalar sayesinde, kanserde ilaç seçilimi sağlanabileceği gibi, COVID-19 sonrası dönemde kök hücrelerin klinikteki kullanım potansiyelinin belirlenebileceği kaanatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, ELİZA, hücre kültürü, mezenkimal kök hücre , RT-PCR, Spike proteini

ABSTRACT

GENOMIC AND PROTEOMIC INVESTIGATION OF THE IMMUNE RESPONSE OF SARS COV 2 SPIKE PROTEIN MRNA IN DIFFERENT CELL LINES

Approximately 7 million people have died due to the novel coronavirus disease (COVID-19), which causes high morbidity and mortality worldwide. Understanding the molecular mechanisms in cells after COVID-19 infection is of great importance for healthy individuals in different age groups or individuals with a chronic disease such as cancer. In this study, we aimed to investigate the effects of the original Wuhan Spike (S) protein and Omicron variant S protein transfects in cancer cells and assist in illuminating the molecular mechanisms in various cancers.

Healthy cell line BEAS2B and cancer cell lines A549, HCT116 and FADU were used in our study. The expression of cancer-associated genes STAT1, STAT3, IRF1, SP1, PRDM1 and POU5F1 were analyzed by Real-Time PCR (RT-PCR) after Wuhan S and Omicron variant S protein tranfection. Expression of stemness markers OCT-4, SOX-2 and NANOG genes were analyzed by RT-PCR after Wuhan S and Omicron variant S protein transfection of planental, dental pulp and synovial derived mesenchymal stem cells (MSCs). The levels of immune system-related proteins TGF-β1, VEGF, PDGF, FGF-2 and IGF-1 in the components released into the culture medium after transfection of whole cells were quantitatively assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

In STAT1, gene expression was found to be high in Sp1 transfected in BEAS2B and FADU cell lines and in IRF1, gene expression was found to be high in Sp1 transfected in BEAS2B, FADU and HCT116 cell lines. In SP1, gene expression was suppressed in Sp12 transfected in A549 and HCT116 cell lines. Sp1 transfection in POU5F1 was found to be induced gene expression in BEAS2B and A549 cell lines. In OCT-4, Sp1 transfections were suppressed in placental and synovial MSCs and induced in dental pulp-derived MSCs.

Our study sheds light on the molecular mechanism of lung, pharynx and colon cancers when cancer patients are infected with COVID-19 and has the potential to contribute to the drug selection of cancer patients post COVID-19. It will also contribute to the evaluation of the secretions of stem cells after transfection and the behavior of tumor microenvironment in cancer. We believe that thanks to comprehensive studies in which various genes and proteins are added and investigated, the clinical use potential of stem cells in the post-Covid-19 period can be revealed as well as drug selection in cancer in the future.

Key Words: Cell culture, COVID-19, ELISA, , mesenchymal stem cell, RT-PCR, Spike protein

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yeni koronavirüs hastalığı (Coronavirus Disease 2019: COVID 19), şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) neden olduğu yeni bir bulaşıcı hastalıktır[1]. Eylül 2023 itibarıyla 770 milyonun üzerinde COVID-19 vakası rapor edilmiş ve yaklaşık 7 milyon kişi bu bulaşıcı hastalıktan hayatını kaybetmiştir[2]. COVID-19 hastalarının büyük bir çoğunluğu semptom göstermemekte ya da çok hafif semptomlar göstermektedir. Ancak hastaların yaklaşık %20'sinde klinik tablo çok ağır olabilmekle birlikte ölüm görülebilmektedir. İleri yaş ve altta yatan hastalıklar, COVID-19 için bilinen risk faktörleridir[3].

SARS-CoV-2, 2002-2003 yıllarında Çin'de tanımlanan SARS-CoV'ye çok benzemektedir ve her iki virüs de viral genom dizilerinde yaklaşık %80 benzerlik göstermektedir[4]. Diğer koronavirüsler (Coronavirus;CoV) gibi SARS-CoV-2 de zarflı, küresel bir morfolojiye sahiptir ve genom olarak pozitif polariteli tek sarmallı bir RNA içerir. Böylece viral yaşam döngüsünün tüm adımları, enfekte olmuş konakçı hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşmektedir. SARS-CoV-2 yaşam döngüsünün ilk adımı, virüsün konakçı hücreye girişidir; bu, viral spike glikoproteini ile bir konakçı reseptör proteini olan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (Angiotensin-converting enzyme 2:ACE-2) arasındaki etkileşimlerin aracılık ettiği bir süreçtir[4]. Daha da önemlisi, plazma zarında ACE-2'nin varlığı, SARS-CoV-2 enfeksiyonunda konakçı tropizminin önemli bir belirleyicisidir. Bu giriş sürecinde başka bir protein olan Transmembran serin proteaz 2 (Transmembrane protease, serine 2:TMPRSS2) de viral genomun sitoplazmaya salınması için gerekli olan viral membran ile konakçı hücre membranı arasındaki füzyonu kolaylaştırarak rol almaktadır[5]. Bu füzyon, viral spike proteininin TMPRSS2 serin proteaz aktivitesi ile bölünmesinin ardından meydana gelir. Virüs hücreye girdiğinde viral genomik RNA salınır ve viral proteinlerin translasyonu ve ayrıca viral RNA'nın transkripsiyonu/replikasyonu için kullanılır. Viral partikül topluluğu endoplazmik retikulum-golgi ara bölmesinde meydana gelir ve bir araya gelen partiküller hücrelerin dışına salgılanır[6].

Coronaviridae familyasına ait çok sayıda virüs bulunmasına rağmen, yedi koronavirüsün insanları enfekte ettiği bilinmektedir (örn. 229E, OC43, SARS-CoV, NL63, HKU1, orta doğu solunum sendromu koronavirüsü (Middle East respiratory

syndrome:MERS-CoV). 1960'lı yıllarda bildirilen 229E ve OC43 dışındakiler ise 2000 yılından sonra tanımlanmışlardır[1,3,7]. Bu insan koronavirüsleri arasında yalnızca üç koronavirüsün (SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2) ciddi solunum yolu hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir ve sırasıyla ilk olarak 2002, 2012 ve 2019'da rapor edilmişlerdir. Bu son derece patojenik koronavirüslerin yakın zamanda sık sık ortaya çıkması, bu tekrar eden zorluklara daha iyi hazırlanmak için ortak küresel çabalara duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır[1,3,7].

Akciğer, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun ana hedefidir ve virüse maruz kalma ile semptomların başlaması arasındaki kuluçka süresi, 2-14 gün arasında değişse de yaklaşık 4-5 gündür[1,3,7]. Enfekte kişinin immün cevabı başlayana kadar virüs replikasyonu devam eder, dolayısıyla viral yük artar. Çoğu durumda, immün cevap oluştuktan sonra viral yük azalır ve enfekte kişi, herhangi bir terapötik müdahale olmaksızın kendiliğinden iyileşir. Ancak yüksek riskli kişilerde COVID-19 ağır seyredilebilir ve tedaviye ihtiyaç duyabilirler. COVID-19'lu hastaların tedavisi tek bir ilaçla sağlanamaz çünkü COVID-19'un farklı terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyan iki fazlı (veya çok fazlı) bir hastalık olduğu bilinmektedir[1,3,7]. COVID-19'un ilk aşaması, viral replikasyonu inhibe eden ilaçların faydalı olabileceği viral replikasyon aşamasıdır. İkinci aşaması ise, aşırı immün tepkinin enfekte olmuş bireye zarar vermede ana rol oynadığı inflamatuar bir aşamadiri. Bu nedenle aşırı immün tepkisini azaltan ilaçlar faydalı olabilir. COVID-19'un bu ayırt edici aşamaları bilinmeden, COVID-19 hastalarına yönelik kullanılan ilaçlar hastalığa yardımcı olmayabilir, aksine hastalığı ağırlaştırabilir[8].

Şu an itibariyle, COVID-19 tedavisine yönelik spesifik bir antiviral ilaç bulunmamaktadır. Sağlık hizmeti sağlayıcıları genellikle şiddetli enfeksiyonu olan hastalar için oksijen tedavisini kullanmaktadır. Şiddetli akut vakalar için araştırılmakta olan ilaçlar ve terapötikler de dahil olmak üzere ek tedavi seçenekleri kullanılmaktadır[1,3-10]. Şu anda DSÖ'nün ve birçok ülkenin önündeki zorluk, virüsü yenecek etkili bir ilaç veya sağlıklı bireyler üzerinde enfeksiyona yakalanmalarını önleyebilecek bir aşı bulmaktır. Etkili bir ilaç veya aşı bulunmadığından şu an için en iyi prosedür enfeksiyon kaynağının kontrol altına alınması, erken tanı, izolasyon ve destek tedavileridir[1,2-13]. Bireyler için kişisel hijyen ve kalabalık yerlerden kaçınmak COVID-19 enfeksiyonunu önlemeye yardımcı olacaktır. Virüs ile enfekte olan farklı

yaş gruplarındaki sağlıklı veya herhangi bir hastalık tanısına sahip bireyler için ilaç geliştirilmesi çok büyük öneme sahiptir. SARS-CoV-2'nin özellikle immün sistem üzerinde ciddi etkileri olması dolayısıyla; virüse karşı oluşan immün cevabın mekanizmalarının anlaşılması ilaç geliştirme çalışmalarına dolayısıyla salgın ile mücadeleye önemli katkılar sağlayacaktır[1-13].

Bütün dünyada bu hastalığın yüksek morbidite ve mortaliteyle seyretmesi göz önüne alındığında, biz bu çalışmada SARS-CoV-2 virüsüne karşı oluşacak immün cevapta etkinliği olan genler ve proteinleri moleküler düzeyde incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüslerin kökeni ve tarihçesi

İnsan korona virüsüne ait ilk olgu 1965 yılında Tyrrell ve Bynoe tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar bir erkek çocuğunun burun yıkama sıvısında bir virüs izole etmişler ve çocuğun tipik soğuk algınlığı semptomları olduğunu belirtmişlerdir[14]. B814 olarak adlandırılan virüs, insan embriyosunun trakeal organ dokusunda üretilebiliyordu ancak o dönemde soğuk algınlığının bilinen diğer etiyolojik ajanlarını yetiştirmek için kullanılan hücre hatlarında üretilemiyordu[14]. Hamre ve Procknow, soğuk algınlığı olan tıp öğrencilerinin solunum yollarından izole edilen beş yeni ajanı tanımlamışlardır. Bu ajanlardan biri olan 229E suşu, WI-38 hücrelerinde büyüyecek şekilde tasarlanmıştır[15]. Daha sonra Almeida ve Tyrrell, bu izolatların morfolojik olarak kuş bronşiti ve fare hepatit virüsleriyle aynı olduğunu göstermiştir[16]. Bethesda'daki Ulusal Sağlık Enstitüleri'nde çalışan Mcintosh ve meslektaşları, daha sonra tek katmanlı hücre kültürüne adapte edilemeyen ancak organ kültürlerinde çoğalabilen morfolojik olarak ilişkili altı virüsü izole etmişlerdir. Bu izolatlardan ikisi, emziren farelerin beyninde büyümek üzere tasarlanmıştır[17]. Bu ajanların karakteristik morfolojisini tanımlayan "Koronavirüs" terimi 1968 yılında kabul edilmiştir. Koronovirüslerin 50 yılı aşkın bir süredir hafif ve orta dereceli solunum yolu enfeksiyonlarının nedeni olduğu rapor edilmektedir[18]. Bu grup virüsler birçok farklı hayvandan izole edilmiş olsa da yarasalar, koronavirüslerin ana doğal rezervuarı olarak kabul edilmektedir[19,20]. 229E, HKU1, NL63 ve OC43 insanlarda soğuk algınlığına neden olan dört insan koronavirüsüdür[18,21]. Ancak yakın zamanda tespit edilen koronavirüsler SARS-CoV (2002), MERS-CoV (2012), bu virüs grubuyla ilgili bilinen tüm yaklaşımları tamamen değiştirmiştir, çünkü bu virüsler ciddi akut solunum yolu enfeksiyonlarına ve hastane kaynaklı salgınlara neden olmuştur. 2019'un sonunda, artık SARS-CoV-2 (2019) olarak bilinen yeni bir koronavirüs Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 31 Ocak 2020'de salgının önemini "uluslararası halk sağlığı acil durumu" olarak ilan etmiştir[21].

2.2. Yeni koronavirüs hastalığı (SARS-CoV-2)

İlk olarak Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkan ve SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni bir koronavirüsün neden olduğu koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) 11 Mart 2020 tarihinde DSÖ tarafından pandemi ilan edilmesine neden olmuştur[22].

2.2.1. SARS-CoV-2'nin kökeni ve evrimi

Hayvan pazarlarının SARS-CoV salgınına dahil olması ve ilk COVID-19 enfeksiyonlarının da yaban hayatı ticaretinin yapıldığı deniz ürünleri pazarıyla ilişkili olması pandemi haline gelen koronavirüs salgınınlarının ortaya çıkışında vahşi hayvanların da rol oynadığını düşündürmektedir. Ancak virüsün hangi türden olduğu ve hangi koşullar altında tür bariyerini geçerek insanlara bulaştığı henüz netlik kazanmamıştır. COVID-19'un kökenine ilişkin ilk araştırmalar, virüsün yarasalardan insana bulaşmış olabileceğini öne sürmektedir[4,23]. Ancak salgın ortaya çıktığında yarasaların kış uykusunda olması ve pazarda satılıp satılmadığı belirsiz olması, virüsün pazardaki diğer türler aracılığıyla bulaşmış olma ihtimalini artırmaktadır. COVID-19'un genomik analizleri, bir yarasadan izole edilen koronavirüs (BetaCoV/RaTG13/2013) ile %96 nükleotid benzerliği göstermektedir[4]. Önceki raporlar da, güney Çin'deki bir yarasa cinsi olan Rhinolophus'a ait türlerin, Sarbecovirüs alt türüne ait SARS benzeri CoV'ler açısından zengin bir havuz olduğunu göstermiştir. Bu virüslerde, türler arası bulaşma potansiyelini artırabilecek zengin genetik çeşitlilik ve sık rekombinasyon olayları görülmektedir[4,24-29].

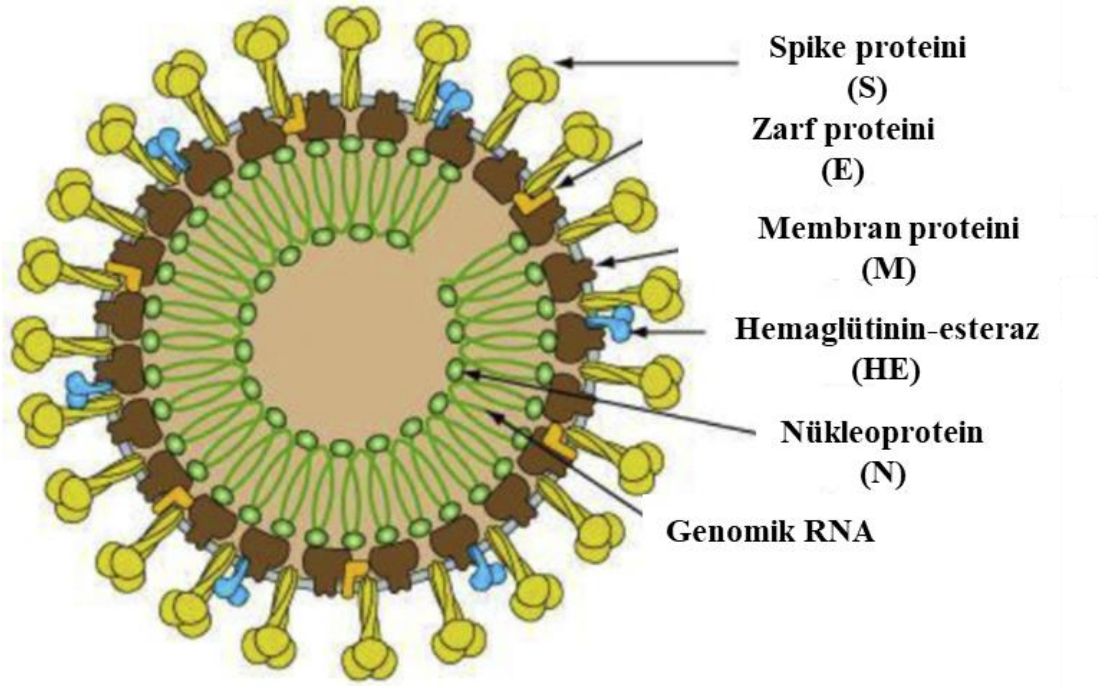
2.2.2. SARS-CoV-2'nin genom yapısı

SARS-CoV-2, matriks proteininden oluşan bir kapsid içindeki nükleoprotein ile ilişkili tek iplikli pozitif polariteli RNA içeren küresel veya pleomorfik zarflı partiküllerdir. Zarf, sopa şeklindeki glikoprotein çıkıntılarını taşır[30]. Genom organizasyonu diğer betakoronavirüslerle aynıdır. Bazı koronavirüsler ayrıca hemagglutinin esterase; hemaglütinin-esteraz proteini (HE) içerir (Şekil 2.1)[30]. Coronavirüsler, bilinen tüm RNA virüsleri arasında en büyük genomlara (26.4-31.7 kb) sahiptir ve G+C içerikleri %32 ile %43 arasında değişmektedir[31]. Çeşitli korunmuş genler (ORF1ab, spike, zarf, membran ve nükleokapsid) arasında ve farklı koronavirüs

soylarında nükleokapsid geninin aşağısında değişken sayıda küçük Open reading frame; açık okuma bölgeleri (ORF) mevcuttur[32]. Viral genom, spike proteini içindeki benzersiz bir N-terminal fragmanı da dahil olmak üzere ayırt edici özellikler içerir[31]. Altı fonksiyonel ORF, 5' ile 3' arasında düzenlenmiştir[32]. Bu bölgelerde replikaz (ORF1a/ORF1b), spike (S), envelop; zarf (E), membran (M) ve nükleokapsid (N) proteinleri kodlanmaktadır. Ek olarak, aksesuar proteinleri kodlayan yedi varsayılan ORF, yapısal genler arasında bulunmaktadır[33,34]. Replikaz geni, genomunun üçte ikisini kaplar ve transkripsiyon ile virüs replikasyonunda rol oynayan 16 yapısal olmayan proteine nsp proteolitik olarak bölünen büyük bir poliproteini kodlar[32]. Tüm yapısal ve aksesuar proteinler CoV'lerin tek iplikli RNA (single guide RNA:sgRNA)'larından çevrilir[33,34]. Farklı CoV'ler dört ana yapısal protein (spike, zarf, membran proteini ile nükleoprotein) haricinde 3a/b proteini ve 4a/b proteini gibi özel yapısal ve yardımcı proteinleri kodlar. Bu proteinler, genom bakımı ve virüs replikasyonunda birçok önemli fonksiyondan sorumludur[33].

SARS-CoV-2, SARS-CoV ile %79, MERS-CoV ile %50 genom sekans benzerliğine sahiptir[35]. SARS-CoV-2 tarafından kodlanan proteinlerin çoğu, SARS-CoV'de karşılık gelen proteinlerle benzer uzunluğa sahiptir[32]. SARS-CoV-2'nin dört yapısal genden, S geni dışında SARS-CoV ile %90'dan fazla amino asit benzerliği bulunmaktadır[4,35]. Diğer taraftan SARS-CoV-2'nin yapısal olmayan proteinlerinin çoğu,

SARS-CoV ile %85'ten fazla amino asit dizisi benzerliğine sahiptir[32].



Şekil 2.1. Bir koronavirüsün şematik görünümü[30]

2.2.2.1. Spike proteinin yapısı ve özellikleri

Spike proteini (S), virüsü hücresel bir reseptöre bağlayıp daha sonra membran füzyonu yoluyla virüs girişini katalize ettiğinden, hücre tropizminin ve dolayısıyla CoV'lerin türler arası aktarımının ana belirleyicisidir. SARS-CoV'nin S proteini elektron mikroskobuyla incelidiğinde diğer CoV'ler ile benzer olduğu görülmüştür[36].

S proteinlerinin homotrimerleri virüsün yüzeyinde belirgin spike yapılarini oluşturur. S proteini, konakçı hücreye girerken SARS-CoV ile benzer şekilde ACE-2 reseptörüne tutunmaktadır. Bu sırada S proteininin hazırlanmasında TMPRSS2 görev almaktadır[5]. S proteini, S1 ve S2 alt birimlerini içeren bir viral füzyon proteinidir. S1 proteininin temel görevi konak hücre reseptörüne bağlanılmasıdır. S1 proteininin konak hücre reseptörüne bağlanması, viral membranın konakçı hücre membranına füzyonunu tetikler[37]. Bu protein, sinyal peptidi, N-terminal domain (NTD) ve reseptör bağlanma bölgesini (RBB) içermektedir[38]. Ektodomain, proteazlar tarafından, reseptör bağlama aktivitelerini taşıyan, cinsler arasındaki oldukça değişken S1 domainine ve membran füzyonunu katalize eden daha fazla korunmuş bir bölge olan S2 domainine bölünür. S1 domaini ayrıca bir NTD ve bir C-terminal domainine (CTD) bölünmüştür. NTD'nin yapısı, galektinler ve galaktoz bağlayıcı lektinlerden oluşmaktadır[36,39]. Dolayısıyla çoğu CoV'de hücre yüzeyinde bir şeker olarak bulunur ve bağlanma faktörü olarak görev

yapar. CTD ise SARS-CoV'da olduğu gibi SARS-CoV-2'de de konak reseptörünün ACE-2'ye bağlanmasından sorumludur. CTD iki alt domain içerir: beş sarmallı antiparalel β-tabaka yapısında bir çekirdek yapı ve reseptör bağlanma spesifikliğini belirleyen bir RBB'dir[36,39].

2.2.3. Klinik Özellikleri

Kuluçka süresi (ilk enfeksiyondan semptomlara kadar) 0 ile 24 gün arasında değişmekte olup ortalama 5-7 gün arasındadır[40]. Yenidoğanlar ve hamile kadınlar da dahil olmak üzere her yaştan birey enfeksiyona karşı hassastır. Çoğu hasta hafif ile orta şiddette semptomlarla kliniğe başvurmaktadır. En sık görülen semptomlar ateş, kuru öksürük, yorgunluk, farengalji, baş ağrısı ve miyaljidir. Çocuklarda ve ergenlerde karın ağrısı ve ishal de dahil olmak üzere gastrointestinal semptomlar da görülebilmektedir[41]. Ayrıca asemptomatik hastalarla da sık sık karşılaşılmaktadır. COVID-19 hastalarının yaklaşık %20'sinde ciddi solunum yolu rahatsızlıkları gelişmektedir ve genel mortalite oranı yaklaşık %2,3'tür[40]. Klinik tablosu kötü olan hastalarda genellikle ateş, kuru öksürük, nefes darlığı gibi semptomlar görülmektedir ve bu hastaların akciğer grafisinde iki taraflı infiltrasyonlar ile sık karşılaşılmaktadır. COVID-19'un komplikasyonları arasında akut respiratuvar distres sendromu (Acute respiratory distress syndrome:ARDS), solunum yetmezliği, karaciğer hasarı, akut miyokard hasarı, akut böbrek hasarı, septik şok ve çoklu organ yetmezliği sayılabilir. Hastalığın ilerlemesine ilişkin risk faktörleri henüz belirlenmemiştir; ancak özellikle ileri yaş, erkek cinsiyeti ve alttan yatan ek hastalığı olan kişilerde şiddetli semptomların görülme ihtimali daha yüksektir[40]. 70.000'den fazla COVID-19 hastasını kapsayan ulusal bir araştırma, hayatını kaybeden bireylerin %80'inden fazlasının 60 yaşın üzerinde olduğunu ve %75'inden fazlasının kardiyo-serebral-vasküler hastalık ve/veya diyabet hastası olduğunu göstermiştir. Çin'in Zhejiang Eyaletinde yürütülen bir kohort çalışmada 62 COVID-19 hastasından yalnızca birinde ARDS geliştiği ve hiçbirinin ölmediği rapor edilmiştir[42].

Lenfopeni sıklıkla COVID-19 hastalarında görülmektedir. Ferritin ve C-reaktif protein seviyelerinin yanı sıra eritrosit sedimantasyon hızı dahil olmak üzere sistemik inflamasyon göstergeleri, dolaşımdaki yüksek düzeydeki proinflamatuar sitokinler ve kemokinlerle ilişkili olarak yükselebilir. Benzer şekilde, ekstrapulmoner sistemik

komplikasyonları olan hastalarda alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, troponin ve/veya kreatinin serum seviyeleri yükselebilir[43].

2.2.4. Patogenezi

SARS-CoV-2, SARS-CoV ile aynı reseptörü, yani ACE-2'yi kullanır[4,5]. SARS-CoV-2, insan ACE-2 reseptörünün (Human ACE-2 receptor:hACE-2) yanı sıra domuz, gelincik, al yanaklı maymun, misk kedisi, kedi, pangolin, tavşan ve köpekteki ACE-2'yi de tanımaktadır[4,44-46]. SARS-CoV-2'nin geniş reseptör kullanımı, geniş bir konakçı aralığına sahip olabileceği anlamına gelir. Bir koronavirüsün S1 alt birimi N terminal ve C terminal alanı olmak üzere iki alana bölünmüştür. Yapısal ve biyokimyasal analizler sonucunda, SARS-CoV-2'nin S1 C-terminal alanında 211 amino asitlik bir bölge (amino asitler 319-529) reseptör bağlanma domaini (Receptor-Binding Domain:RBD) olarak tanımlanmıştır. Bu bölge, virüs girişinde anahtar role sahiptir ve nötralizan antikorların hedef bölgesidir[37,47]. RBD mediatörleri, ACE-2 reseptörü (SARS-CoV-2 S proteininin 437-507 amino asitleri) ile etkileşime geçer ve SARS-CoV-2'deki bu bölge, ACE-2 bağlanması açısından SARS-CoV'dekinden farklıdır[48]. Biyokimyasal veriler, SARS CoV-2 RBD'nin yapısal özelliklerinin, SARS-CoV ile karşılaştırıldığında hACE2 bağlanma afinitesini güçlendirdiğini göstermiştir[47-49].

Diğer koronavirüslerle benzer şekilde SARS-CoV-2'nin de endositik yolu aktive etmek için S proteininin etkileşimine ihtiyacı vardır. Konağın proteazlarının, S proteininin bölünmesine katıldığı ve TMPRSS2, katepsin L ve furin ile birlikte SARS-CoV-2'nin girişini aktive ettiği gösterilmiştir[5,50,51]. RNA dizileme verileri, TMPRSS2'nin çeşitli dokularda ve vücut bölgelerinde yüksek düzeyde eksprese edildiğini, nazal epitel hücrelerinde, akciğerlerde ve bronşiyal dallarda ise ACE-2 ile birlikte eksprese edildiğini göstermiştir. Bu SARS-CoV-2'nin doku tropizmini açıklamaktadır[52,53].

İnsanlarda SARS-CoV-2 enfeksiyonunun patogenezi, hafif semptomlardan ciddi solunum yetmezliğine kadar kendini göstermektedir. SARS-CoV-2, solunum yolundaki epitel hücrelerine bağlandıktan sonra replike olmaya başlar ve solunum yollarına doğru göç eder. Daha sonra akciğerlerdeki alveoler epitel hücrelerine girer. SARS-CoV-2'nin akciğerlerde hızlı çoğalması güçlü bir immün cevabı tetikleyebilir. Sitokin fırtınası sendromu, COVID-19 hastalarında ana ölüm nedeni olarak kabul edilen ARDS ve

solunum yetmezliğine neden olur[54,55]. Daha yaşlı (>60 yaş) ve önceden ciddi hastalıkları olan hastalarda ARDS ve ölüm gelişme riski daha yüksektir[56-58]. Bazı COVID-19 vakalarında çoklu organ yetmezliği de rapor edilmiştir[59-61].

COVID-19 hastalarındaki histopatolojik değişiklikler esas olarak akciğerlerde meydana gelir. Histopatoloji analizler sonucunda, şiddetli COVID-19 hastalarının akciğerlerinde iki taraflı yaygın alveolar hasar, hiyalin membran oluşumu ve fibrin birikimleri görülmüştür. Bazı vakalarda eksüdatif inflamasyon da gösterilmiştir. İmmünohistokimya analizler sonucunda ise, üst solunum yolu, bronş epiteli ve submukozal bez epitelinin yanı sıra akciğerlerdeki tip I ve tip II pnömositlerde, alveolar makrofajlarda ve hiyalin membranlarda SARS-CoV-2 antijeni tespit edilmiştir[54,60,62,63].

2.2.5. Epidemiyoloji ve bulaş

Çin'in Wuhan şehrinde 2019 yılı sonunda ilk vaka rapor edildikten bu yana, tüm kıtalarda COVID-19 vakası bildirilmiştir. Dünya çapında 770 milyondan fazla doğrulanmış COVID-19 vakası rapor edilmiştir[2]. Ayrıca, akut enfeksiyonların yalnızca bir kısmına tanı konduğu ve rapor edildiği için COVID-19'un gerçek yükünün bildirilen vaka sayılardan, 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir[64-66]. COVID-19 ile ilişkili ölümler ve seroprevalans veritabanları da dahil olmak üzere birden fazla veri kaynağının kullanıldığı bir çalışmada, Kasım 2021 itibarıyla 3 milyardan fazla kişinin, yani dünya nüfusunun %44'ünün SARS-CoV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Toplam vakaların yaklaşık üçte biri Güney Asya'dan (Hindistan dahil) bildirilmiştir[67].

Doğrudan kişiden kişiye solunum sekresyonlarının teması, SARS-CoV-2'nin primer bulaş yoludur[68]. Enfeksiyonlu bir kişinin öksürmesi, hapşırması veya konuşması sırasında solunum salgıları ile salınan virüs, solunması veya mukoza zarlarıyla doğrudan temas etmesi halinde başka bir kişiye bulaşabilir. Bir kişinin ellerinin bu salgılarla kontamine olması veya kontamine yüzeylere dokunması daha sonra ise gözlerine, burnuna veya ağzına dokunması durumunda da enfeksiyon meydana gelebilir. Ancak, kontamine yüzeylerin ana bulaşma yolu olduğu düşünülmemektedir[69-72].

SARS-CoV-2 ayrıca aerosol yolla (havada kalan parçacıkların solunması yoluyla) daha uzun mesafelere taşınabilir ve insanlar enfekte olabilir. Ancak, bu bulaşma yolunun pandemiye ne ölçüde katkıda bulunduğu belirsizdir[69-72]. SARS-CoV-2

salgınlarına ilişkin raporlar kapalı mekanlarda ya da yetersiz havalandırılan alanlarda aerosol yolla bulaşma potansiyelini vurgulamıştır[73-76]. Deneysel çalışmalar aynı zamanda aerosol bulaşmanın fizibilitesini de desteklemiştir[77-79]. Yapılan diğer çalışmalarda ise, hafif enfeksiyonu olan hastalar da dahil olmak üzere, COVID-19'lu hastaların hastane odalarındaki havalandırma sistemlerinde ve hava örneklerinde viral RNA tespit edilmiştir[80-87].

SARS-CoV-2 dışkı, kan, oküler sekresyonlar ve meni dahil olmak üzere solunum dışı örneklerde tespit edilmiştir, ancak bu örneklerin bulaşmadaki rolü belirsizdir[88-95]. Özellikle, üst solunum yolu örneklerinde viral RNA artık tespit edilemese[91,92] bile dışkı örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'nın tespit edildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Çok nadirde olsa, dışkı örneklerinde virüs kültürlenmiştir[89,96]. Sağlık koşullarının zayıf olduğu yoğun bir kentsel toplulukta veya bir konut binasında virüsün kanalizasyon drenajından aerosol yolla bulaşma olasılığı çeşitli çalışmalarda tartışılmıştır[97,98]. Bununla birlikte, DSÖ-Çin ortak raporuna göre, fekal-oral yolla bulaşma, enfeksiyonun yayılmasında önemli bir faktör olarak görünmemektedir[99].

Çok fazla çalışmada kanda SARS-CoV-2 RNA'sı tespit edilmiştir. Ancak kan yoluyla bulaşma olasılığı (örn. kan ürünleri veya iğne batmaları yoluyla) düşük görünmektedir[88,89,92,100,101]. Solunum yolu virüsleri genellikle kan yoluyla bulaşmamaktadır. SARS-CoV-2, SARS-CoV ve MERS-CoV için kan nakli yoluyla bulaş bildirilmemiştir[102].

2.2.6. Tanı

SARS-CoV-2'nin hızlı tespiti, COVID-19 salgınının kontrolü için son derece önemlidir. Ancak bu tanı yöntemlerinin düşük maliyet ve yüksek sensitivite ile spesifiteye sahip olması gerekmektedir. COVID-19 tanısı balgam, alt solunum yolu sekresyonları, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, kan, dışkı ve idrar gibi örnekler üzerinde yapılan laboratuvar testlerine dayanmaktadır[103,104]. Şu anda SARS-CoV-2 için uygulanan tanı doğrulama testi RT-PCR'dır. Tüm şüpheli hastalar için bilgisayarlı tomografi (BT) taraması önerilmektedir. Hastaların çoğunda, göğüs BT incelemesinde iki taraflı yama şeklinde gölgelenme ve buzlu cam opasiteleri ile karakterize pnömoni vardır[105]. Çeşitli çalışmalar, göğüs BT'nin, COVID-19 tanısı için

RT-PCR'den daha duyarlı olduğunu göstermiştir[106-108]. Bununla birlikte, RT-PCR pozitifliği olan hastalarda semptomların başlangıcında normal göğüs BT'si de görünebilmektedir[106,108-110].

Geçtiğimiz 20 yılda, klinik laboratuvarlarda patojenleri tanımlamak için polimeraz zincir reaksiyonları (Polymerase chain reaction:PCR) ve DNA dizileme yöntemlerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu yöntemler, İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus:HIV) gibi bulaşıcı hastalıkların tedavisine verilen yanıtın doğru şekilde izlenmesini sağlamaktadır[111]. Ancak bu yeni yöntemlerin maliyeti yüksektir ve deneyimli personel gerektirmektedir. SARS-CoV-2 salgınının ortaya çıkması, özellikle klinik laboratuvarlardan uzak alanlarda hızlı ve ucuz virüs tanı yöntemlerinin yanı sıra hastabaşı spot testlerin de önemini vurgulamaktadır. Şu anda, COVID-19 hastalarını taramak ve tanı koymak yaklaşık 24 saatten fazladır, ancak virüsün RT-PCR kullanılarak tespiti yalnızca birkaç saat sürmektedir[112]. Ancak, RT-PCR yönteminin hala zaman alıcı olduğu düşünülmektedir ve yanlış negatif sonuçlar da verebilmektedir[113,114]. Ayrıca bu yöntem eğitimli laboratuvar personeli gerektirir; bu nedenle SARS CoV-2 enfeksiyonlarının tespitindeki uygulaması orta gelirli ülkelerde önemli ölçüde sınırlıdır[114-116]. Ek olarak bu yöntem hedeflenen virüs genomunun farklı bölgelerinin her biri farklı tespit hassasiyetine sahiptir[116]. RT-PCR ile virüs RNA tespitinin pozitif oranı numune tipine bağlıdır; bronkoalveoler lavaj sıvısı için %93, balgam için %72, nazal sürüntüler için %63 ve kan için %1 pozitiflik oranları olarak tespit edilmiştir[89]. Viral yükün kademeli olarak azalması nedeniyle pozitiflik oranı da düşmektedir. Bu nedenle viral yükü düşük hastalara RT-PCR kullanılarak tanı konulamayabilir[117,118]. Bazı RT-PCR tespit vakalarında, tekrarlanan negatif testlerden sonra pozitif sonuç ortaya çıkabilmektedir[119,120]. Semptomların başlangıcından önce yanlış negatif sonuçların RT-PCR ile değerlendirildiği bir çalışmada, enfeksiyonun ilk gününde yanlış negatiflik oranı %100'den dördüncü günde %67'ye düşmüştür. Semptomların ilk gününde ve semptomlardan sonraki üçüncü günde (8. gün) yanlış negatiflik oranı sırasıyla %38 ve %20 bulunmuştur. Daha sonra enfeksiyondan sonraki 9. günde %21'e, 21. günde ise %66'ya yükselmiştir. Özellikle klinik şüphenin yüksek olduğu durumlarda koruyucu önlemlerin kullanımını ortadan kaldırırken dikkatli olunmalıdır. Yalnızca RT-PCR sonuçlarına dayanarak enfeksiyon dışlanmamalıdır[121].

Seroloji yöntemleri serum antikorlarını tespit etmek için minimum ekipman gerektirmesine rağmen antikor yanıtlarının ortaya çıkması günler veya haftalar sürebilir. Bu nedenle serolojik testler SARS-CoV-2 virüsünün taranmasında veya erken tespitinde aktif bir rol oynamayabilir[112,122].

2.2.7. Tedavi

COVID-19'a karşı ilk olarak destek tedavileri kullanılmıştır. Azitromisin ve/veya hidroksiklorokin, COVID-19 tedavisinde uygulanmıştır. Hospitalize edilen hastalarda olası bakteriyel ko-enfeksiyonlar için, etkinliği kanıtlanmamış olmasına rağmen antibiyotikler kullanılmıştır. 2020'nin başlarında yayınlanan dokuz çalışmayı içeren bir literatür taramasında, hastanede yatan COVID-19 hastalarının %72'sinin ampirik olarak antimikrobiyallerle tedavi edildiği, ancak yalnızca %8'ine bakteriyel veya fungal bir ko-enfeksiyon tanısı konulduğu sonucuna varılmıştır[123].

Azitromisin in vitro antiviral aktiviteye sahip olan ve muhtemelen viral replikasyonu sınırladığı düşünülen bir antibiyotiktir[124]. Hidroksiklorokinin ise, in vitro SARS-CoV-2'ye karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu ve viral girişi bloke ettiği gösterilmiştir[125]. İn vitro olarak azitromisin ve hidroksiklorokinin birlikte kullanıldığında SARS-CoV-2 enfeksiyonu üzerinde sinerjistik bir etkiye sahip oldukları gözlemlenmiştir[126]. Ancak hidroksiklorokin ve azitromisin klinik deneylerde etkili olmamıştır ve Ulusal Sağlık Enstitüleri (National Institutes of Health:NIH) Tedavi Klavuzları Paneli tarafından COVID-19'un tedavisi için önerilmemektedir[127]. Bu kombinasyonlar pandeminin başlarında rutin olarak kullanılmıştır. Bu rejimlerin hiçbir klinik fayda sağlamadığını gösteren daha sonraki çalışmalar, sınırlı düzeydeki in vitro verilerin ne kadar yanlış yorumlanabileceği bilim camiasına göstermiştir. Benzer şekilde, yetersiz veri nedeniyle NIH, COVID-19 Tedavi Kılavuzları Paneli tarafından ampirik antimikrobiyallere yönelik spesifik bir öneriyi de desteklememektedir. Yüksek konsantrasyonlarda bazı RNA virüslerinde replikasyonu engellediği düşünülen çinko dahil olmak üzere vitaminler ve mineral takviyeleri de pandeminin başlarında araştırılmıştır. Hastanede yatan hastalarda hidroksiklorokine çinko eklenmesinin değerlendirildiği çok merkezli retrospektif bir kohort çalışmada, çinkonun herhangi bir faydası olmadığı gösterilmiştir ve şu anda COVID-19 hastalarının tedavisinde çinko önerilmemektedir[128].

COVID-19 enfeksiyonunun klinik özellikleri, patogenezi ve komplikasyonları daha net bir şekilde ortaya çıktıkça, klinisyenler yüksek risk altındaki hastaların önceliklendirilmesine ve izlenmesine yoğunlaşmıştır. NIH COVID-19 Tedavi Yönergeleri Paneli, uygun olduğu şekilde ek oksijenasyon sağlanmasını ve akut hipoksemik solunum yetmezliği olan hastalarda yüksek akışlı nazal kanülün kullanılmasını önermiştir[129]. Venöz tromboembolik durumların insidansının oldukça yüksek olduğu fark edildiğinde, profilaktik antikoagülasyon, COVID-19 ile hastaneye yatırılan hastalar için klavuzlara dahil edilmiştir[130].

2.3. Kanser ve COVID-19

Hematolojik ve solid tümörlerde, nötropeni, lenfopeni, nazal mukoza gibi anatomik yüzeylerin bozulması, dalak ve humoral defektler ve sitotoksik veya diğer immün baskılayıcı tedavilerin uygulanmasına bağlı olarak çeşitli enfeksiyon riskleri artabilmektedir[131]. İmmün sistemin baskılanması, kanserli hastaların SARS-CoV-2'ye karşı daha duyarlı olmasına ve COVID-19 enfeksiyonunu takiben kötü prognoza sahip bir hastalık tablosuyla karşılaşılma şansının artmasına neden olabilir. SARS-CoV-2 tümör progresyonunu promote edebilir ve tümör hücrelerinde tümör ilişkili metabolik yolakları yeniden düzenleyebilir[131].

İnsan kolon epitelyal karsinom hücre hattı olan Caco-2'nin SARS-CoV-2 ile enfeksiyonu sonrası; translasyon, karbon ve nükleik asit metabolizması dahil olmak üzere merkez hücre yolaklarının yeniden şekillendiği, bu yolakları hedef alan küçük molekül inhibitörlerinin ise Caco-2 hücrelerinde SARS-CoV-2 replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Örneğin, nükleik asit metabolizması inhibitörü Ribavirin, SARS-CoV-2'nin replikasyonunu düşük molar konsantrasyonda bile baskılayabilir[103,132]. Ek olarak, Caco-2 hücrelerinin proteomikleri, SARS-CoV-2 enfeksiyonundan 24 saat sonra kapsamlı bir düzenlemeye tabi tutulur; bu düzenlemede, esas olarak enfeksiyon sırasında kolesterolden zengin metabolik proteinlerde bir azalma ve karbonhidrat metabolizmasını değiştiren proteinlerdeki artıştır[103]. Çalışmalar, SARS-CoV-2'nin, yüksek verimlilikte replikasyonunu kolaylaştırmak için glikoliz gibi daha yüksek üretkenliğe sahip metabolik yolakları başlatmak üzere tümör hücrelerinde metabolizma değişimini uyarabileceğini göstermektedir[133,134]. Bu durumda, bir heksokinaz inhibitörü olan 2-DG kullanılarak tümör hücrelerinde glikoliz

metabolizmasının inhibe edilmesi, Caco-2 hücrelerinde SARS-CoV-2 replikasyonunu önemli ölçüde baskılayabilmektedir[103,133]. Bu, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tümör hücrelerinde metabolik yeniden programlamayı ortaya çıkarabileceğini ve dolayısıyla kanserin progresyonunu etkileyebileceğini göstermektedir[131].

Malignite ile komplike olan COVID-19 hastalarında ciddi hastalık gelişme riskinin, malignite olmayanlara göre 3,61 kat daha fazla bulunduğu bildirilmiştir[135]. Son zamanlarda, New York'ta yürütülen bir çalışma, COVID-19 hastalarının %56'sının 60 yaş üstü yetişkinler olduğunu, en yaygın malignitelerin ise meme kanseri, kolorektal ve akciğer kanseri olduğunu göstermiştir[136]. Lenfoma en sık görülen hematopoietik malignitedir ve vakaların %50'sinden fazlası metastatik solid tümörlerdir[136,137]. Kanser ve COVID-19 hastalarının %59'unda diyabet, hipertansiyon, kronik böbrek hastalığı ve kalp hastalığı dahil olmak üzere belirlenmiş komplikasyonlardan en az biri bulunmaktadır[135]. Hematolojik kanser ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunun bir arada bulunduğu hastalar, SARS-CoV-2 ve diğer kanser türlerinin bir arada bulunduğu hastalar ile karşılaştırıldığında hematopoetik malignitelerde (lösemi, miyelom ve lenfoma) fonksiyon kaybına uğramış plazma hücreleri, lenfositler ve beyaz kan hücrelerinden dolayı, daha yüksek bir ölüm oranına sahiptir. Çünkü bu hücrelerin kaybı organizmada bağışıklık fonksiyonunu azaltmaktadır. Tüm solid tümörler arasında akciğer kanserinin SARS-CoV-2 ile enfekte hastalar için en tehlikeli hastalık sınıfı olduğu gösterilmiştir. Akciğer kanseri ile komplike olan COVID-19 hastaları için ateş ve öksürük en belirgin klinik semptomlardır. BT'de ise buzlu cam sahası ve yamalı gölge görünümü ile karşılaşılmaktadır[138]. Ayrıca laboratuvar incelemeleri, malignite ile komplike olan COVID-19 hastalarında, özellikle de kritik vakalarda, sitokin fırtınası, immün sistem bozukluğu ve nispeten belirgin bir pıhtılaşma bozukluğu da dahil olmak üzere çoklu organ/sistem hasarının ortaya çıktığını göstermektedir[139]. Çok ağır seyreden şiddetli COVID-19 vakaları için yaşlılık, IL-6, prokalsitonin, artmış D-dimer, azalmış lenfositler, kanser çeşidi ve evresi ile antikanser tedavi öyküsü risk faktörleridir[140-142]. Ortalama yaşı 50 olan 7.094 Çinli COVID-19 hastasının dahil olduğu bir meta analiz çalışmasında, COVID-19 popülasyonunda kanser prevalansı %2,3 olduğu, bu oranın tüm Çin nüfusuna (%0,26) kıyasla dört kat daha, ayrıca 50 yaşındaki Çin nüfusuna (%0,39) kıyasla da üç kat daha yüksek bulunduğu tespit edilmiştir[143]. Bu, tümörlerin COVID-19 hastalarında ciddi hastalık ve ölüm riskiyle yakından ilişkili olduğunu

göstermektedir. Özellikle, tümör metastazı olmayan erken evre kanser hastaları ile kanser olmayan hastalar arasında COVID-19'un ölüm oranı veya hastalığın şiddeti açısından hiçbir fark gözlemlenmemiştir. Aksine, ilerlemiş metastatik kanseri olan hastaların SARS-CoV-2 ile enfekte olma olasılığı daha yüksektir[138]. Hematolojik malignitesi olanların kötü prognoza sahip olduğu, erkek hastalarda ise ölüm riskinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Semptomların başlangıcından dört hafta önce uygulanan kemoterapi ve erkek cinsiyeti, kanser hastalarında COVID-19 enfeksiyonu için yüksek risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, antikanser tedavi öyküsü olan 182 COVID-19 hastasından 31'i, COVID-19 ile enfekte olmadan önceki 4 hafta içinde kemoterapi görmüştür. Dikkat çekici bir şekilde, 31 hastanın ölüm riski geri kalan 151 hastanınkinden 3,51 kat daha yüksek bulunmuştur. Kadınlarda sıklıkla görülen meme kanseri, tiroid karsinomu ve rahim ağzı kanseri gibi kanserlerin görüldüğü COVID-19 hastalarında ölüm oranının nispeten daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aksine, COVID-19 ile enfekte kanserli erkek hastaların ölüm riski, kadın meslektaşlarına göre 3,86 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır[144].

2.4. Çalışmamızda kullandığımız hücre hatları

Çalışmamızda insan akciğer kanseri hücre hattı (A549), insan hipofaringeal karsinom hücre hattı (FADU), insan kolon kanser hücre hattı (HCT116) olmak üzere çeşitli kanser hücre hatları kullanılmışken, sağlıklı kontrol hücre hattı olarak da bronş epitelinden izole edilen hücre hattı (BEAS2B) kullanıldı. Hücre hatları ile ilgili bilgiler aşağıda detaylandırılmıştır.

2.4.1. Kanser hücre hatları

2.4.1.1. A549 hücre hattı

A549 hücreleri, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin bir tipi olan skuamoz hücre tipine ait olup, erkek bireylerde en yaygın görülenidir. A549 hücreleri, 1972 yılında 58 yaşındaki karsinomlu bir erkek bireyin akciğerinden izole edilmiş olan bir epitel hücredir, yüzeye yapışkan halde bulunurlar[145,146].

Solunum yolu enfeksiyonlarında yapılacak çalışmalar için A549 hücreleri önemli bir modeldir, ancak SARS-CoV-2 enfeksiyonu için iki ana faktör eksiktir; bunlar ACE-2 ve TMPRSS2'dir. Bu iki ana faktör A549 hücre hatlarında çok az düzeyde ifade olmaktadır[147].

2.4.1.2. HTC116 hücre hattı

HCT116 hücre hattı yetişkin kolon kanseri bir bireyden izole edilmiştir. Ras proto onkogeninde 13. kodonda mutasyona sahiptir, bu mutasyon PCR analizlerinde pozitif kontrol amaçlı kullanım sağlamaktadır. Bu hücre hattı transfeksiyon için kullanıma uygun olup, HCT116 hücrelerinde dönüştürücü büyüme faktörü faktörü beta 1 (Transforming growth factor beta 1:TGFB1) ve TGFB2 ekspresyonları pozitiftir[148].

2.4.1.3. FADU hücre hattı

1968 yılında skuamöz hücreli karsinoma sahip 56 yaşındaki Hindu bir erkek bireyden alınan hipofarengial tümörün punch biyopsisi ile elde edilen epitel morfolojili bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı adherent olup, tranfeksiyona uygundur. Kanser çalışmalarında ve immüno-onkoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır[149].

2.4.2. Sağlıklı kontrol hücre hattı

2.4.2.1. BEAS2B hücre hattı

Kanserli olmayan bireylerin normal insan bronş epitelinden otopsi ile elde edilen hücrelerdir. Bu hücreler skuamöz farklılaşmaya uğrama yeteneklerini korurlar ve farklılaşma ya da karsinogenezi indükleme veya etkileme yetenekleri dolayısıyla biyolojik ve kimyasal ajanları araştırmak için kullanıma uygundurlar. BEAS-2B hücre hattı transfeksiyona uygun olup, adherent yapıdadır[150].

2.5. Kanser ilişkili genler

Bilinen kanser genlerinin protein ve sinyal yolaklarıyla etkileşimi, kanser genlerinin özelliklerini ortaya çıkarmaktadır. Bu yaklaşım, kanser genlerinin sıklıkla birçok hücresel süreçte yer alan merkez proteinler olarak işlev gördüğünü ve çeşitli sinyal yolakları arasındaki bilgi alışverişinde odak noktaları oluşturduğunu göstermektedir[151].

2.5.1. STAT1

Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1 (Signal transducer and activator of transcription 1:STAT1), STAT protein ailesinin bir üyesidir. Sitokinlere ve büyüme faktörlerine yanıt olarak, STAT ailesi üyeleri reseptör ilişkili kinazlar tarafından fosforile edilir ve sonra transkripsiyon aktivatörleri olarak hareket ettikleri hücre çekirdeğine translokasyon yapan homo veya heterodimerler oluştururlar. STAT1 tarafından kodlanan protein, endotelyal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor:EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor:PDGF), interferon gama (IFN-γ), interferon alfa (IFN-α) ve interlökin-6 (IL-6)' yı da içeren çeşitli ligantlar ile aktive edilebilmektedir. Bu protein fungal, viral ve mikrobakteriyel patojenlere karşı bağışıklık cevaplarında önemli rol oynamaktadır[152].

STAT1 antiviral özellikleri sebebiyle tanımlanan yüzlerce genin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Bu özelliği sebebiyle Ebola ve SARS-CoV2 gibi virüsler bu transkripsiyon faktörünü inhibe etmek için farklı mekanizmalar geliştirmiştir. Yapılan bir çalışmada SARS-CoV-2 virüsünün IFN/STAT1 sinyalini etkileyebileceği gösterilmiştir[153].

2.5.2. STAT3

STAT protein ailesine ait olan Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (Signal transducer and activator of transcription:STAT3) geni sitoplazmada aktif olmayan formda bulunmaktadır. Sitokinlere ve büyüme faktörlerine karşı yanıt oluşturabilmektedir. Hücre büyümesi ve apoptozun da dahil olduğu pekçok hücresel süreçte ana rol oynamaktadır. Bu protein, interferonlar, EGF, IL-5, IL-6 ve BMP2 dahil olmak üzere çeşitli sitokinlere ve büyüme faktörlerine yanıt olarak fosforilasyon yoluyla

aktive edilir. STAT3 geni koronavirüs biyolojisinde bağışıklık cevabında veya antiviral aktivitede görev almaktadır[154].

Vücudun ilk antiviral savunma hattı olan interferonlar, virüs enfeksiyonuna yanıt olarak konak hücreler tarafından salgılanan sitokinlerdir. IFN Tip1 sinyali hem STAT1 hem de STAT3 faktörlerini etkinleştirmektedir. Kızamık virüsü, kabakulak virüsü, İnfluenza A, SARS-CoV vb. virüsler bir dizi protein ile direk etkileşime girebildiği gibi viral replikasyonu ve devamlılığını etkileyebilmektedir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda STAT3'ün rolü enfekte olan hücre tipine bağlı olarak değişebilmektedir[155].

2.5.3. IRF1

İnterferon düzenleyici faktörler ilk olarak interferonların ve interferonla indüklenebilir genlerin transkripsiyonel düzenleyicileri olarak tanımlanmış olsa da sonraki çalışmalar interferon sisteminin ötesinde onkogenez düzenlenmesinde önemli rolleri olduğunu göstermiştir[156].

İnterferon Düzenleyici Faktör1 (Interferon Regulatory Factor 1:IRF1) geni tarafından kodlanan IRF1, doğuştan ve edinilmiş immün cevaplarda rol oynayan hem transkripsiyonel düzenleyici hem de tümör baskılayıcı özellikler göstermektedir. Kodlanan protein, vücudun virüslere ve bakterilere karşı rol oynayan genlerin transkripsiyonunu aktive ederek hücre çoğalması, apoptoz, immün cevap ve DNA hasarı tepkisinde rol oynar. IRF1 geni birçok genin transkripsiyonunu baskılamaktadır. Bir tümör süpresör olarak tümör hücresinin büyümesini baskılar ve tümör hücrelerine karşı immün cevabı uyarır. Bu gendeki defektler mide, miyeloid, lösemi ve akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir[157].

2.5.4. PRDM1

B hücresi ve T hücresi farklılaşmasının düzenleyicisidir ve immünosupresyonda kritik bir rol oynamaktadır. PR alanı çinko parmak proteini 1 (PR domain zinc finger protein 1:PRDM1), lokal tümör mikro çevresinin düzenlenmesinde immün süpresif bir

rol oynamaktadır[158]. Bu genin transkripsiyonu, virüs indüksiyonu ile artmaktadır. Beta interferon geninin ifadesini baskılayan bir proteini kodlamaktadır[159].

2.5.5. SP1

Spesifik protein 1 (Sp1), temel onkogen ve tümör süpresörlere ilaveten çoğalma, farklılaşma, DNA hasarına yanıt, yaşlanma, apoptoz ve anjiyogenez gibi esas hücresel süreçlerde yer alan genlerin ifadelerini indükler veya baskılar. Sp1 geni inflamasyonda da rol almaktadır. Sp1 bağımlı transkripsiyon, hücresel farklılaşma, gelişim ve tümör oluşumu süresince düzenlenir[160].

Tümör ilişkili anjiyogenezi aktive etmek ve büyüyen tümörlerin besin ve oksijen gereksinimleri karşılamak için anjiyojenik yolaklar aktifleştirilir. Tümör ve normal dokularda çok sayıda hücresel faktör, anjiyojenik yolaklarla ilişkilidir. Sp1 ayrıca vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor:VEGF), PDGF de dahil olmak üzere bir dizi genin düzenlenmesiyle ilişkilidir[160].

Sp1 geni ile kodlanan protein, çeşitli promoterin G+C zengin motiflerine bağlanan bir zinc finger transkripsiyon faktörüdür. Bu gen ile kodlanan protein birçok promoterin GC zengin motiflerine bağlanan bir çinko parmak transkripsiyon faktörüdür. Bu gen tarafından kodlanan protein, birçok hücresel süreçte (hücre büyümesi, hücre farklılaşması, immün yanıt, DNA hasarına tepki.) rol almaktadır[161].

2.5.6. POU5F1

POU domain transkripsiyon faktörleri spesifik oktomer DNA motifine bağlanır ve hücre tipine özgü farklılaşma yolaklarını düzenler. Kodlanan protein embriyonik gelişimde ve kök hücre pluripotensisinde anahtar rol oynamaktadır[162]. OCT-4 geni insanlarda POU domaini, sınıf 5, transkripsiyon faktörü 1 (POU Class 5 Homeobox 1;POU5F1) tarafından kodlanmaktadır. OCT-4 ilk kez, 1989 yılında fare embriyogenezi esnasında embriyonik kök hücreler ve germ hücrelerinde tanımlanmıştır. Son yıllarda

çeşitli kanserlerde kök hücre teorisinde, kanserin erken tanı ve tedavisine muhtemel rolü dolayısıyla tercih edilmektedir[163].

2.6. Büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri, çoğalma, göç, farklılaşma ve hayatta kalma/apoptoz dahil olmak üzere hücresel fonksiyonun güçlü düzenleyicileridir. Hücrelerin büyüme faktörü uyarımı, çeşitli sinyal basamaklarını kullanarak hücre dışı uyarıları hedef hücreye ileten karmaşık ve çok adımlı bir prosestir. Çeşitli büyüme faktörlerinin farklı kanser türlerindeki fonksiyonel rolü tanımlanmıştır ve büyüme faktörüne bağlı otokrin tümör büyümesini veya büyüme faktörüne bağlı tümör anjiyogenezini durdurmaya yönelik stratejiler günümüzde araştırılmaktadır[164]. Anjiyogenez tüm insanlarda kılcal damar ağının gelişiminde kritik bir rol oynar. Vücuttaki her doku kan dolaşımına ihtiyaç duyar. Bu kan desteği ya yeni ortaya çıkan ya da daha yeni keşfedilen intususeptif anjiyogenez yoluyla oluşturulur. Anjiyogenez insan vücudu için her zaman olumlu etkilere sahip değildir, aynı zamanda tedavi amaçlı kullanıldığında inhibisyonu da gerekebilir. Anjiyogenezin inhibisyonu birçok hastalık ve kanserde oldukça faydalıdır[164].

Dört farklı büyüme faktörü PDGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), VEGF ve transforme edici büyüme faktörü β (TGF-β) ve bunların farklı izoformları, reseptörleri ve sinyal iletim mekanizmaları anjiyogenezde önemli roller oynamaktadır[165]. Normal ve patolojik koşullarda anjiyogenez, pozitif ve negatif endojen düzenleyiciler tarafından yönetilen çok adımlı bir süreçtir. Anjiyogenez, proanjiyojenik faktörler ve spesifik inhibitörler tarafından düzenlenen çok aşamalı bir süreçtir. Normal dokularda, anjiyogenezin endojen uyarıcıları ve inhibitörleri arasında bir denge vardır[166].

Anjiyogenezi tetikleyen faktörlerden biri VEGF'dir. VEGF hem adaptif hem de tümör anjiyogenezinde rol oynadığı gösterilen endotelyal spesifik bir büyüme faktörüdür. VEGF, aynı gen tarafından kodlanan mRNA'nın eklenmesiyle üretilen beş izoform halinde bulunmaktadır[165]. Normal fizyolojik koşullar altında VEGF proteininin, embriyonik gelişim sırasında, yaralanmalardan sonra veya tıkalı damarları açmak için yeni damarların oluşturulması (kollateral dolaşım) ve egzersiz sonrasında kas oluşturulması gibi fonksiyonları vardır. VEGF ayrıca vasküler endotelyal hücre

büyümesinin, hayatta kalmasının ve çoğalmasının uyarılmasından da sorumludur. VEGF, birbirleriyle yapısal olarak ilişkili olan bir protein ailesine aittir. Bu protein ailesinin tüm üyeleri damar sisteminin farklı bileşenlerinin, özellikle de kan ve lenf damarlarının büyümesini regüle eder. VEGF, morfolojik ve hücre iskeletinde değişiklikler, hücre büyümesi ile göçünün uyarılması dahil olmak üzere vasküler endotelyal hücreler üzerinde çeşitli etkiler gösterebilmektedir. VEGF yolağının tümörle ilişkili anjiyogenez ile yakın etkileşimi, onkoloji çalışmalarında bir terapötik kullanım alanı oluşturmaktadır. Bu yolağın inhibe edilmesiyle, tümör progresyonu durdurulabilir veya yavaşlatılabilir[164]. Normal hücreler ve tümör hücreleri tarafından salgılanan VEGF, spesifik reseptörleri olan VEGFR1 ve VEGFR2'yi bağlayarak anjiyogenezi indükler[166]. İn vitro olarak VEGF ve bFGF kombinasyonu şu anda bilinen en güçlü anjiyogenik uyarıdır[165].

FGF'ler ise, çeşitli hücre tipleri için mitojeniktir, hücre dışı matrisin yeniden yapılanmasını düzenler ve özellikle tümörlerde anjiyogenez oluşumuna katkıda bulunurlar. Ayrıca, tümör anjiyogenezinde endotel hücrelerinin uyarılmasında ve hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesi sonucu gelişen metastazda rolü önemlidir[167].

Hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen bir diğer büyüme faktörü PDGF'lerdir. PDGF özellikle, kan damarı oluşumunda, mevcut kan damarı dokusundan kan damarlarının gelişiminde, fibroblastlar, osteoblastlar, tenositler, vasküler düz kas hücreleri ve mezenkimal kök hücreler gibi mezenkimal hücrelerin mitogenezinde yani çoğalmasında önemli bir rol oynar. PDGF, iki A alt biriminden (PDGF-AA) veya iki B alt biriminden (PDGF-BB) veya her birinden (PDGF-AB) oluşabilen dimerik bir glikoproteindir[168,169]. PDGF fibroblastlar, düz kas hücreleri ve glial hücreler de dahil olmak üzere mezenkimal kökenli hücreler için güçlü bir mitojendir. Hem farede hem de insanda PDGF sinyal ağı, PDGF-AA'dan -DD'ye kadar beş ligand ve iki reseptörden oluşur. Tüm PDGF'ler salgılanan, disülfit bağlı homodimerler olarak işlev görür, ancak yalnızca PDGFA ve B fonksiyonel heterodimerler oluşturabilir. PDGF trombositler tarafından sentezlenmelerine, depolanmalarına ve salınmalarına rağmen, aynı zamanda düz kas hücreleri, aktive edilmiş makrofajlar ve endotel hücreleri gibi diğer hücreler tarafından da üretilir[168,169].

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ise; büyüme, farklılaşma ve dönüşüm gibi çeşitli hücre davranışlarına katılır ve ateroskleroz, hipertansiyon ve diyabet gibi çeşitli vasküler hastalıklar üzerine yapılan araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. IGF-1 ve ilgili reseptörü daha sonra PI3K/Akt sinyal yollarını aktive edebilir ve proliferasyon, farklılaşma ve göç gibi hücresel eylemleri daha da tetikleyebilir. IGF-1 ve diğer büyüme faktörleri arasındaki etkileşim IGF-1 sinyalizasyonunu daha da karmaşık hale getirmektedir. Anjiyogenez açısından IGF-1, anti-apoptoz etkileri uygulayarak ve vasküler düz kas hücrelerinin göçünü teşvik ederek olumlu bir etki oluşturur[170]. IGF ailesi, yapısal ve işlevsel olarak insüline benzeyen tek zincirli polipeptitler olan IGF1 ve IGF2 olmak üzere başlıca iki üyeden oluşur. Bunlar aynı zamanda 2 reseptör (IGF1R ve IGF2R) ve 6 bağlayıcı protein (IGFBPs) içeren daha büyük bir protein ağının parçasıdır. Her iki faktör de birçok insan dokusunda, öncelikle stromal hücreler tarafından üretilir ve parakrin etki ile epitel hücre proliferasyonunu uyarır[167].

2.7. Kök hücreler

Kök hücreler, birden fazla hücre soyuna farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir. Farklılaşma yeteneklerine veya kökenlerine göre ayırt edilirler. Kök hücreler kemik iliği, yağ dokusu, plasenta dokusu dahil olmak üzere çok farklı kaynaklardan elde edilebilmektedirler. Modern tıpta kullanımlarına 1950 yıllarında kemik iliği nakli ile başlanmıştır[171].

2.7.1. Kök hücrelerin sınıflandırılması

Kök hücreler, insan vücudundaki özelleşmemiş hücrelerdir. Organizmadaki her hücreye farklılaşma ve kendini yenileme potansiyeline sahiplerdir. Yetişkin hücrelerde ve embriyolarda bulunabilirler[172].

Totipotent kök hücreler; tüm organizmanın hücrelerine bölünebilme ve farklılaşabilme yeteneğindelerdir. Bu hücreler en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Hücrelerin hem embriyo yapılarının hem de embriyo dışı yapılarının

oluşmasına imkan vermektedir[172]. Embriyonik yapının oluşumundan sorumlu olan iç hücre kütlesini, plasentayı ve diğer ekstra embriyonik destek dokularını oluşturan trofektodermi oluşturabilirler[173].

Pluripotent kök hücreler; tüm germ katmanlarının hücrelerini oluşturabildikleri halde ekstraembriyonik yapıları (plasenta gibi) oluşturamamaktadırlar[172]. Pluripotent kök hücreler iki özellikleriyle öne çıkmaktadırlar. Bunlar; kendini yenileme özellikleri ve dönüşüm kapasiteleridir. Kendini yenileme, kök hücrelerin süresiz olarak bölünerek progenitör hücrelerin kendi özelliklerini koruyarak değişmeyen soy üretme kapasiteleridir. Belirli koşullar ve sinyaller altında, bir kök hücre kendini yenilemeden aynı özellikte kalabilmekte ve üç germ katmanından (endoderm, ektoderm ve mezoderm) türeyen spesifik hücre tiplerine farklılaşmaya sebep olan bir programa girebilmektedirler. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler olmak üzere iki tür pluripotent kök hücre vardır. Embriyonik kök hücreler preimplantasyon embriyolarının iç hücre kütlesinden türemektedirler. Hücre yeniden programlanması olarak bilinen, invitro teknoloji yoluyla yetişkin somatik hücrelerin faklılaşması indüklenerek de pluripotent kök hücreler elde edilebilmektedir[174].

Multipotent kök hücreler; pluripotent kök hücrelere kıyasla daha az farklılaşma spektrumuna sahip olan ve spesifik hücre soylarının farklı hücrelerine özelleşebilen hücrelerdir[172]. Multipotent kök hücrelerin birçok avantajı olduğu gibi kullanım alanları da geniştir. Bu hücreler doku onarımı, gelişim ve savunma süreçlerinde anahtar görev almaktadırlar. Kök hücrelerin son yıllarda kalp ve sinir hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılıyor olmaları tıpta gelecekte umut vadetmektedir. Multipotent kök hücreler, osteoblastlar, adipositler, kondrositler ve miyositleri de içeren çeşitli hücrelere farklılaşabilmektedirler. Multipotent hücre populasyonları klinikte seçenek olarak kullanılabilecek saygın bir hücre kaynağıdır[175].

Oligopotent kök hücreler; çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğinde olan hücrelerdir[172].

Unipotent kök hücreler; farklılaşma yeteneği en az olan ve tekrar tekrar bölünebilme özelliği ile karakterize edilen hücrelerdir[172].

Kök hücre araştırmalarının önemli olması klinikte geniş uygulama potansiyelleridir. Hücre çeşitlerine faklılaşma potansiyelleri, hasarlı dokuların rejeneratif tıpta hücre replasman tedavileri ile klinikte alternatif tedavi olarak kullanımlarının önünü açmıştır[174].

2.7.2. Mezenkimal kök hücreler

MKH'ler, kendini yenileme yeteneğine sahip olup ayrıca çok soylu farklılaşma sergileyen stromal hücrelerdir. MKH'lerin göbek kordonu, kemik iliği, yağ dokusu vb. çeşitli dokulardan kolayca izole edilebilme kolaylıkları vardır. Çoğu MKH, hücre kültür sürecinde yüzeye yapışkan bir profil sergilemektedir[176]. Özellikle, MKH'lerin immünolojik davranışı, donör-alıcı eşleşmesine ihtiyaç duymadan çok sayıda allojenik uygulamaya izin vermekte ve klinisyenlerin kolayca kullanabileceği rutin bir "kullanıma hazır" hücresel ürün olasılığını mümkün kılmaktadır[177]. MKH'ler immünomodülatör, antiinflamatuar ve rejeneratif özelliklere sahip hücrelerdir[178]. MKH'ler otokrin, parakrin ve endokrin yoluyla immün modülasyonda rol alabilirler[179]. MKH'ler, konağın doğuştan gelen ve adaptif immün cevaplarını modüle edebilir, böylece proinflamatuar sitokin üretimini azaltabilir. MKH'lerin güvenliği ve etkinlikleri, inflamatuar barsak hastalığı, osteoartrit, romatoid artrit ve multipl skleroz dahil çeşitli hastalıkların tedavisinde araştırılmıştır[180]. MKH'lerin klinik öncesi modeller üzerinde yapılan terapötik temelli çalışmaları ve akut akciğer yaralanması, ARDS ve akciğer fibrozu ile ilgili klinik çalışmalarından ötürü COVID-19 için tedavi amaçlı uygulanabilir olduğu düşünülmektedir[180]. Bu nedenlerden dolayı MKH terapisi, COVID-19 ile enfekte kritik hastalarda prognozu düzeltmek için isteğe bağlı bir girişimsel yöntem olarak düşünülebilir. Akut akciğer hasarı olan klinik öncesi modeller ile yapılan çalışmada, MKH'lerin, lokal ve sistemik inflamasyonu hafiflettiği, immün hücre aktivasyonunu artırdığı ve akciğer hasarını azalttığı tespit edilmiştir[180].

2.7.2.1. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Özellikle, insan diş pulpası orjinli kök hücrelerinin, ksenograft modellerinde mineralize doku, hücre dışı bir matris ve dentin, diş özü ve periodontal bağ gibi yapılar oluşturabildiği gösterilmiştir. Dişler, oral ektodermal epitel hücreleri ile MKH'ler arasındaki etkileşimleri sonucunda gelişir; ilk önce mine, ikinci olarak papilla ve diş folikülü oluşur. MKH'ler dentin, pulpa, sement ve periodontal ligaman gibi dişin diğer kısımlarının oluşumunda rol oynar[181]. Diş pulpası kök hücreler, periodontal ligaman kök hücreleri, apikal papilla kök hücreleri ve diş folikül kök hücreleri olmak üzere dişlerde farklı türde MKH'lerin varlığı gösterilmiş olsa da, bunlar genel olarak diş kök hücresi olarak anılırlar. Diş pulpası kök hücrelerinin bir MKH olduğu, nöral ektodermal hücrelere ve adipositlere, odontoblastlara, osteoblastlara, kondrositlere ve mezodermal kökenli miyoblast hücrelerine farklılaşma yetenekleri ile doğrulanmıştır ve bu da onların plastisitesini doğrular niteliktedir. Fonksiyonel olarak diş pulpası, periodontal doku ve bununla ilişkili bağışıklık sisteminin bakımı ve onarımından sorumludur, yüksek bir rejeneratif kapasiteye sahiptir ve çeşitli hasar türlerine yanıt olarak rol oynamaktadır[181].

2.7.2.2. Plasental mezenkimal kök hücreler

İnsan plasenta dokusu zengin bir MKH kaynağıdır ve kemik iliğinden elde edilen MKH'lere benzemektedir. Plasenta dokusu, kemik iliğine kıyasla donör için ekstra bir risk oluşturmaması dolayısıyla daha fazla tercih edilmektedir. Bulunması kolay bir doku olan plasentada yoğun miktarda MKH elde edilmektedir. Plasenta dokusu hepatojenik, adipojenik, kardiyak, endotelyal, miyojenik, pulmoner, pankreatik ve nörolojik doku türlerine farklılaşma yeteneği olan kök hücreleri ve epitel hücreleri içermektedir[171].

2.7.2.3. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Güncel raporlar, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerle karşılaştırıldığında, sinoviyal kaynaklı kök hücrelerin multipotent, proliferatif ve antiapoptoz özelliklerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Klinik uygulamalar için sinoviyal MKH'lerin kökenlerinin kondrojenez yeteneklerinin çok yüksek olduğu bilinmektedir. Sinovyadan gelen progenitör hücrelerin, kıkırdak oluşumu için yakın olmaları, kollajen tip II ve glikozaminoglikanlar açısından zengin olmaları ve sinovyal kondromatozis ile karakterize edilen metaplazide gözlenen hiyalin kıkırdaklardan ötürü kompleks bir yolağa sahiptir. Sinovyal membran ve infrapatellar yağ yastığı gibi artroskopi cerrahisinde genellikle ayrılan parçalardan MKH'lerin elde edilmesi mümkündür. Sinovyadan gelen MKH'ler, kondrojenik doku mühendisliği için umut verici bir hücre kaynağı olarak büyük ilgi görmüştür. Sinovyal MKH'ler, kemik ve adipoz kaynaklı MKH'lerden daha fazla proliferasyona ve güçlü kondrojenik potansiyele sahipken, kemik kaynaklı MKH'leri ise daha az hipertrofik farklılaşma eğilimindedir[182].

2.7.3. Kök hücre ile ilişkili proteinler

2.7.3.1. Oct-4

POU5F1 olarak da bilinen Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (Octamer-binding transcription factor 4:Oct-4), insanlarda POU5F1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Oct-4, Pit-Oct-Unc (POU) ailesinin bir homeodomain transkripsiyon faktörüdür. Farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesinde kritik öneme sahiptir. Bu nedenle sıklıkla farklılaşmamış hücreler için bir belirteç olarak kullanılır. Oct-4 ifadesi belirli aralıklar arasında olmalıdır[183]. Çok ya da az eksprese olmaları hücrelerin farklılaşmasına neden olur. OCT-4, hedef genlere bağlanan ve belirli ifadeleri etkinleştiren veya devre dışı bırakan AGTCAAAT'ın belirli bir DNA dizisi olan bir oktamer motifinden oluşur. Bu gen ifadeleri daha sonra memeli embriyosunun gelişimi sırasında kök hücre farklılaşmasında fenotipik değişikliklere yol açmaktadır. Hem iç hücre kitleleri hem de embriyonik kök hücrelerinin kaderinin belirlenmesinde hayati bir rol oynar ve embriyonik gelişim boyunca pluripotensisi sürdürme yeteneğine sahiptir[183].

2.7.3.2. Sox2

SoxB1 transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan cinsiyet belirleyici bölge Y-box 2 (SRY-box transcription factor 2:Sox2), pluripotent kök hücrelerde önemli bir transkripsiyonel düzenleyicidir. Oct-4 ve NANOG ile birlikte, plasenta kaynaklı kök hücrelerin gen ekspresyonunu işbirliği içinde kontrol eder ve pluripotentliklerini korurlar. Pluripotensi düzenleyen temel içsel faktörler Oct4, Sox2 ve NANOG olarak tanımlanmıştır, Oct-4 ve Sox2 ayrıca sırasıyla mezoderm ve ektoderm farklılaşmasını düzenlemek için soy belirleyiciler olarak önerilmiştir[184].

2.7.3.3. Nanog

NANOG, embriyonik kök hücrelerde keşfedilen bir transkripsiyon faktörüdür ve pluripotensin korunmasında anahtar bir faktör olduğu düşünülmektedir. NANOG'un, embriyonik kök hücrelerin kimliğini oluşturmak için POU5F1 ve SOX2 gibi diğer faktörlerle uyum içinde çalıştığı düşünülmektedir. Bu hücreler üç germ katmanından (endoderm, ektoderm, mezoderm) herhangi birinin hemen hemen her hücresi haline dönüşme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, bir hücrenin pluripotensisini koruyan mekanizmaların anlaşılması, araştırmacıların kök hücrelerin nasıl çalıştığını anlamaları açısından kritik öneme sahiptir[185].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Transformasyon

Çalışmamızda, transformasyon aşaması Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zooloji bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN rehberliğinde DH5α hücreleri kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla izlenen basamaklar aşağıda detaylandırılmıştır.

- DH5α hücreleri için hazırlanan 1lt Luria-bertani (LB) besiyeri ortamı 10 gr pepton, 5gr yeast ekstrakt ve 5gr NACl olarak hazırlandı. (pH:7,5)
- LB besiyeri ortamına, 1lt için 15 gr agar ekleyerek hazırlanan besiyeri ise otoklavlandıktan sonra petrilere 55°C'de eklendi ve çalışmamızdaki besiyerini seçici hale getirmek için blasticidin (İnvivogen, San Diego, ABD) (Katolog No/ID: ant-bl-05) ilave edilerek +4°C'ye kaldırıldı.
- LB sıvı besiyeri ortamına ekilen DH5α suşu, 16 saat boyunca 37°C inkübasyona bırakıldı.
- 16 saat sonunda çoğalan DH5α hücreleri; santrifüj tüplerine aktarıldı.
- +4°C 4900 rpm'de 10dk santrifüj edildi.
- Pelletlerin üzeri döküldü ve ters çevrilerek beklendi.
- Pelletin üzerine MgCl (Merck, Darmstadt, Almanya) (Katolog No/ID: TA125432) 4 ml eklenerek pipetaj yapıldı ve 4900 rpm'de +4°C 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılınca buz üzerinde 4 ml $CaCl_2$ (Merck, Darmstadt, Almanya) (Katolog No/ID: TA374481) eklendi ve 20 dk inkübe edildi.
- 4900 rpm'de +4°C 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılınca tüpler hemen buz üzerine alındı.
- Soğuk $CaCl_2$ 400'er mikrolitre olarak her tüpe eklendi ve pipetaj yapılarak büyük tüplerden ependorflara aktarıldı.
- 5'er mikrolitre her plazmidden pUNO1-Spike (İnvivogen, San Diego, ABD) (Katolog No/ID: p1-spike, orijinal Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2Spike gene), pUNO1-SpikeV12 (Katolog No/ID: p1-spike-v12, Omicron varyantı, BA.2

lineage), pUNO1-mcs (Katolog No/ID: puno1-mcs, invivogen), eklendi ve 20 dk buz üzerinde +4°C'de bekletildi.

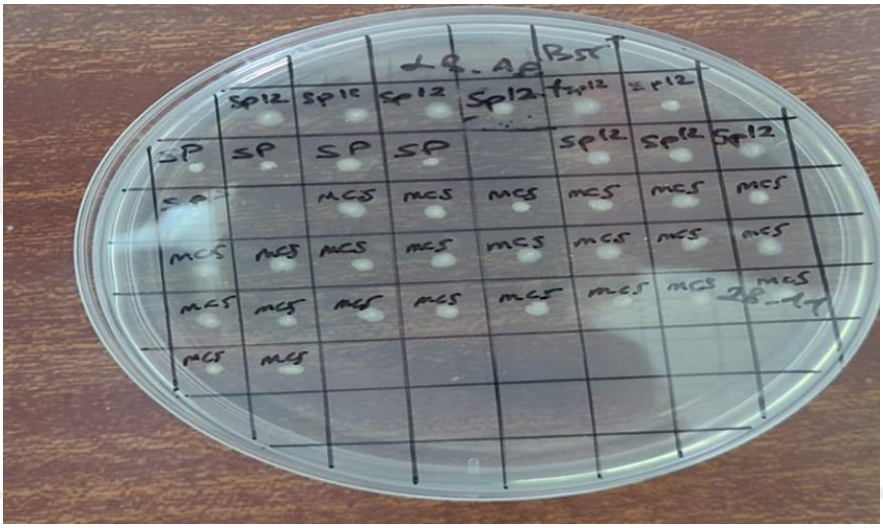
- Sonrasında 90 sn 42°C bekletildi ve hemen buz üzerine geri alındı. (4-5 dk)
- İşlem öncesinde 25 ml 5 adet erlene 1'er ml besiyeri konularak otoklav işlemi gerçekleştirildi.
- 1 ml besiyerine $CaCl_2$ ile birlikte plazmid karışımı eklendi. (200 mikrolitre)
- 37°C 1 saat inkübatörde bekletildi ve 100'er mikrolitre agarlara ekildi.
- Ertesi gün tekli düşen kolonilerden alınarak ekim yapıldı (Şekil 3.1).

3.1.1. Plazmid DNA izolasyonu

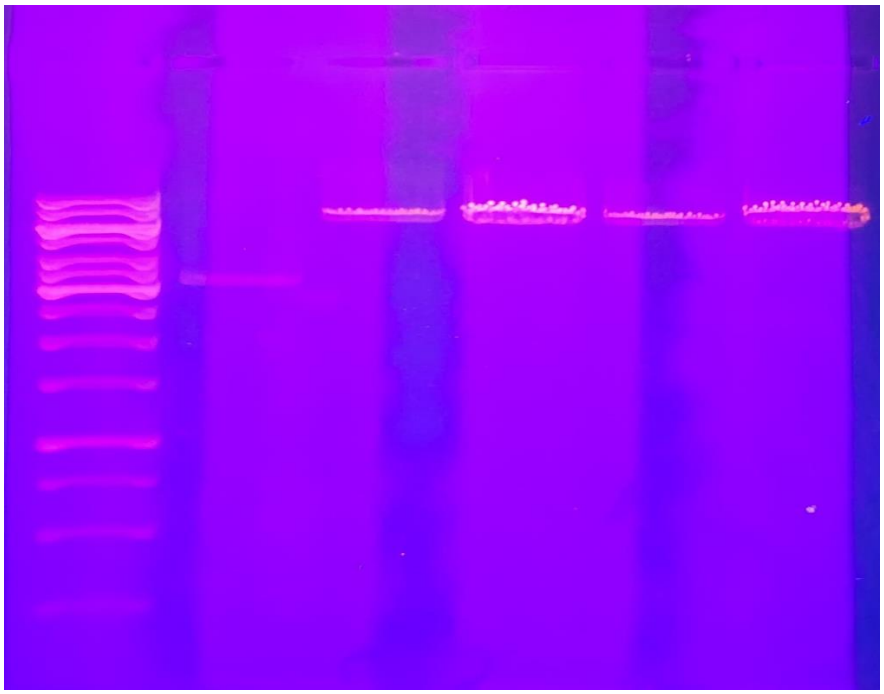
Plazmid DNA izolasyonu II Plasmid Maxiprep Kit (ZymoPURE™, Irvine, ABD) (Katolog No/ID: D4202,) ile üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA izolasyonu için izlenen basamaklar aşağıda detaylandırılmıştır.

- Bakteri hücre pelletlerine 14 ml Zymopure P1 solüsyonu eklenerek vortex ve pipetaj yapılarak süspanse edildi.
- 14 ml Zymopure P2 solüsyonu eklenerek tüp 6 kez hafifçe karıştırıldı, 2-3 dk oda ısısında bekletildi.
- 14 ml Zymopure P3 solüsyonu eklendi ve hafifçe karıştırıldı ve Zymopure şırıngasının içerisine aktarıldı.
- Pistonu şırıngadan geçirerek filtre edilen sıvıyı yeni bir tüpe aktarıldı.
- Lizata 14 ml Zymopure binding buffer eklendi ve tüp 8 kez karıştırıldı.
- Zymospin V-Px kolonu ve Reservoir-x düzeneği konik tüplere yerleştirildi.
- 5.adımdaki karışımdan 10 ml düzeneğe eklendi ve 500 g'de 2 dk santrifüj edildi. Tüm karışım kolondan geçene kadar bu işlem tekrarlandı.
- Kolon düzeneğine 10 ml wash buffer 1 solüsyonu eklendi ve kolon 500 g'de 2 dk santrifüj edilerek alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
- Kolon düzeneğine 10 ml wash buffer 2 solüsyonu eklendi. 500 g'de 2 dk santrifüj edildi, alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez gerçekleştirildi.

- 15 ml Reservoir X, V-PX kolonundan çıkarıldı ve uzaklaştırıldı. V-PX kolonu bir toplama tüpüne yerleştirildi ve kolon yıkama tamponunu uzaklaştırmak için mikrosantrifüjde 16000 g' de 1 dk santrifüj edildi.
- V-PX kolonu 1,5 ml'lik temiz bir tüpe aktarıldı ve 400 µl elution buffer kolon matrisine eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi ve mikrosantrifüjde 16000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Örnekler %0.8'lik agaroz jelde yürütmeleri gerçekleştirilerek doğrulandı (Şekil3.2).



Şekil 3.1. Her bir plazmid DNA'nın DH5α içinde çoğalmış saf kolonisi



Şekil 3.2. Plazmid DNA'sını gösteren agaroz jel görüntüsü.

3.2. Hücre kültürü

Çalışmamızda insan bronş epitelinden izole hücre hattı (BEAS2B), insan akciğer kanseri hücre hattı (A549), insan hipofaringeal karsinom hücre hattı (FADU), insan kolon kanser hücre hattı (HCT116) hücre hattı danışman hocam Prof.Dr. M.Bertan YILMAZ'ın hücre kültür laboratuvarından temin edilmiştir. BEAS2B, A549, FADU ve HCT116 hücre hatlarının DMEM besiyeri ortamı kullanılarak %10 FBS ve %1 antibiyotikli ortamda gelişimleri takip edildi. Daha önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz Plasental mezenkimal kök hücreler, sinoviyal sıvı ve diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin MEM alpha besiyeri ortamında %15 FBS ve %1 antibiyotik ortam koşullarında gelişimleri takip edildi. Hücreler %70-80 yayılım gösterdiklerinde 6 kuyucuklu platelere 300.000 hücre olacak şekilde ekimleri yapıldı. Sonrasında Sp, Sp12 ve MCS plazmid DNA'ları Fugene transfection reagent (Promega, Wisconsin, ABD) (Katolog No/ID: E2311) ile hücrelere muameleler gerçekleştirildi. 24 saat inkübasyon süresi sonrasında hücrelerin üst fazları Eliza yöntemi için kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı. Hücrelerin üzerine İnvitrogen Trizol reagent eklenerek cell scraper ile hücreler yüzeyden kazındı.

3.3. RNA İzolasyonu

Tüm hücre hatlarının Trizol reaktifi kullanılarak RNA'ları izole edildi. RNA izolasyonu için izlenen basamaklar aşağıda detaylandırılmıştır.

- Kazınan örnekler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant alındı ve süpernatantların üzerine 100µl kloroform eklendi, 10 dakika buz üzerinde bekletildi ve sonrasında 15 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- Üstteki RNA sıvısı alındı ve 1:1 oranında izopropanol eklendi.
- Vorteks sonrası 10 dakika buz üzerinde bekletilip sonrasında 15 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- RNA pelletinin üzerindeki süpernatant atıldı.
- RNA pelletinin üzerine %75'lik Etanol-DEPC (dietil prokarbonatlı su) karışımı 1000µl olarak eklendi, 5 dk santrifüj edildi.

- Pelletin üzerine uygun miktarda DEPC'li su eklendi.
- Buz üzerinde 15 dakika sonra pipetajlandı ve çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere -80ºC'de saklandı.

3.3.1. RNA konsantrasyonlarının hesaplanması

Hücrelerden elde edilen RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre cihazında µg/ml düzeyinde ölçüldü ve örnekler ölçüm sonuçlarına göre hazırlandı.

3.3.2. RNA'dan cDNA eldesi

cDNA sentezi, High capacity cDNA kiti (Thermo Fisher, Waltham, ABD) (Katolog No/ID: 4368814) aracılığıyla gerçekleştirildi. Karışım oranları çizelge 3.1'de, PCR ısıl döngüleri ve süreleri çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA sentez karışım oranları

Bileşenler	**Hacimleri**
10X RT buffer	2 µl
dNTP (100 mM)	0,8 µl
Random primer (10 pmol)	2 µl
Enzim (10000 unit/ml)	1 µl
RNaz inhibitörü (1000 unit/ml)	1 µl
Deiyonize su	3,2 µl
RNA	10 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 1.2. PCR'daki ısıl döngüler ve süreleri

x1	x2	x1	
25°C	37°C	85°C	4°C
10 dk	60 dk	5 dk	∞

3.3.3. Real Time PCR

cDNA örnekleri ve kullanılan Sybr green floresan işaretli primerler (Solis BioyDyne OÜ, Tartu, Estonya) (Katolog No/ID: 08-24-00001) kullanılarak 96 kuyucuklu plate içerisine her gen ve örnek için yükleme yapıldı. Real time PCR

reaksiyon bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.3'te, kullanılan gen dizileri Çizelge 3.4'te gösterilmiştir,

Çizelge 3.3. Real time PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	**Hacimler**
SyBr Green Mix	12,5 µl
Primer forward	1,25 µl
Primer reverse	1,25 µl
cDNA	2 µl
Deiyonize su	8 µl
Toplam Reaksiyon	25 µl

Çizelge 3.4. Real time PCR için kullanılan gen dizileri

SyBr Green Gen Expression assay	**Diziler**
Aktin primer forward	GACAGGATGCAGAAGGAGATCACT
Aktin primer reverse[186]	TGATCCACATCTGCTGGAAGGT
Prdm1 primer forward	AAAAGAAACATGACCGGCTACAAG
Prdm1 primer reverse[187]	GGTGGACCTTCAGATTGGAGA
IRF1primer forward	ACCCTGGCTAGAGATGCAGA
IRF1 primer reverse[188]	TTTTCCCCTGCTTTGTATCG
STAT1 primer forward	CTTACCCAGAATGCCCTGAT
STAT1 primer reverse[189]	CGAACTTGCTGCAGACTCTC
SOX2 primer forward	TTACCTCTTCCTCCCACTCCA
SOX2 primer reverse[190]	GGTAGTGCTGGGACATGTGAA
NANOG3 primer forward	CTGTGATTTGTGGGCCTGAA
NANOG3 primer reverse[190]	TGTTTGCCTTTGGGACTGGT
SP1 primer forward	TTG AAA AAGGAGTTGGTGGC
SP1 primer reverse[191]	TGCTGGTTCTGTAAGTTGGG
STAT3 primer forward	GCACAGATTGCCTGCATTG
STAT3 primer reverse[192]	CTGCTAATGACGTTATCCAGT
GAPDH primer forward	GCCTCAAGATCATCAGCAATG
GAPDH primer reverse[193]	CTTCCACGATACCAAAGTTGTC
POU5F1/Oct-4 primer forward	AAGGATGTGGTCCGAGTGTG
POU5F1/Oct-4 primer reverse[190]	GAAGTGAGGGCTCCCATAGC

Primerler 100 pmol hacimde olup, 10 pmol olarak kullanıma hazırlanmıştır. Real time PCR reaksiyonunda son hacim 20 µl olup, primerlerin reaksiyonda son hacimleri 0,5pmol'dür. Primerlerin referansları ilgili gen dizisinin devamında belirtilmiştir.

3.4. Eliza

Protein ifadeleri ELİZA yöntemiyle araştırıldı. Bunun için izlenen basamaklar aşağıda detaylandırılmıştır.

1. Tüm plateler için standartlar kitte FGF2 (FineTest, Wuhan, Çin) (Katolog No/ID: EH0541), TGF-β1(FineTest, Wuhan, Çin) (Katolog No/ID: EH0287), PDGF (FineTest, Wuhan, Çin) (Katolog No/ID: EH3531), VEGF (FineTest, Wuhan, Çin) (Katolog No/ID: EH0327), IGF-1 (FineTest, Wuhan, Çin) (Katolog No/ID: EH0165) belirtilen konsantrasyonlarda hazırlandı.
2. Standart ve örnekler 100'er µl hacimde kuyulara yüklendi. 90 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon süresi sonrası tüm kuyular aspire edilerek wash buffer solüsyonu ile iki kez yıkama yapıldı.
4. 100'er µl biotin işaretli antibody tüm kuyulara yüklendi. 60°C'de inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon süresi sonrası tüm kuyular aspire edilerek wash buffer solüsyonu ile üç kez yıkama yapıldı.
6. Tüm kuyulara SABC working solüsyonu eklendi ve 30 dk 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon süresi sonrası tüm kuyular aspire edilerek wash buffer solüsyonu ile beş kez yıkama yapıldı.
8. 90 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve 10-20 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon süresi sonlanınca 50 µl stop solüsyonu eklenerek 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma gerçekleştirildi.

3.5. İstatistiksel analiz

Bulgularımızın istatistiksel analizi "StatView 5.0" istatistik program paketi (SAS Institute, Cary NC, USA) kullanılarak yapılmıştır. Gen ekspresyonlarının istatistiksel analizinde tek faktörlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılmıştır. Tukey çoklu karşılaştırma testi bunu takiben Welch paired t-test kullanılmıştır. Anlamlılık $\alpha=0.05$ ve $\beta=0.20$ olarak kabul edilmiştir. mRNA değerleri ortalama ± SEM olarak belirlenmiştir ($n=3$).

4. BULGULAR

4.1. Gen Ekspresyon Bulguları

Her örnek için ilk anlamlı artışın gözlendiği Ct (cycle threshold) değerleri hesaplandı. Her örneğin hem hedef genler için hem de referans gen olan beta aktin için Ct değerleri alındı. Sonrasında katlı değişim değerleri aşağıdaki formül üzerinden hesaplandı. Kontrol olarak boş vektör transfekti (mcs) kullanılmıştır.

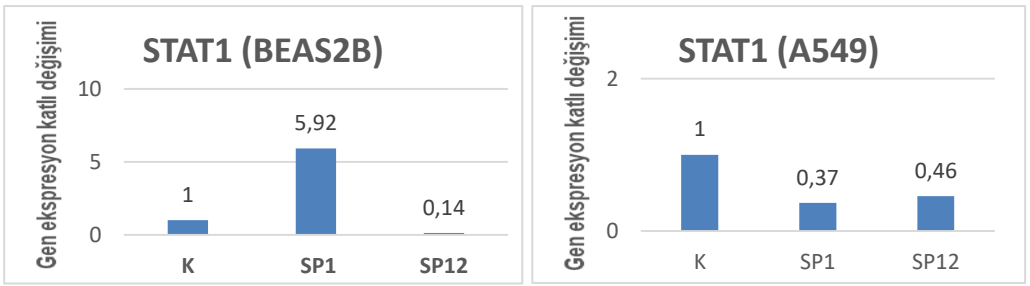
ΔCt=Ct hedef gen- Ct referans gen

$\Delta\Delta Ct$=ΔCt muamele edilen- ΔCt kontrol

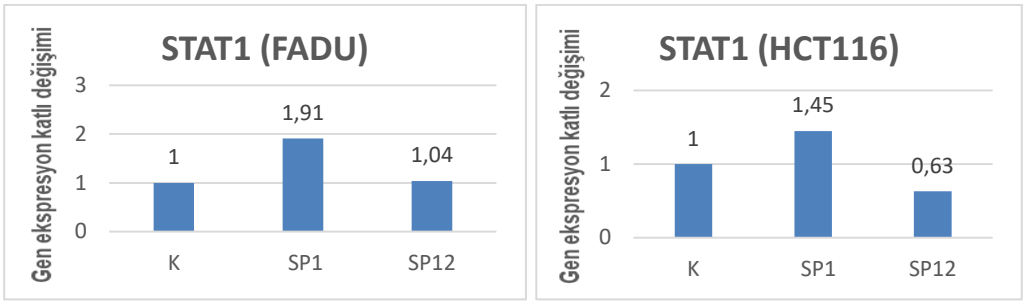
Ekspresyon oranı=$2^{-\Delta\Delta Ct}$

4.1.1. STAT1 Geni

BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 5,92 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 7,1 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 2,7 kat, Sp12 transfektinde ise 2,1 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,91 kat, Sp12 transfektinde ise 1,04 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir. HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,45 kat gen ifadesinde indüklenme, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 1,58 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



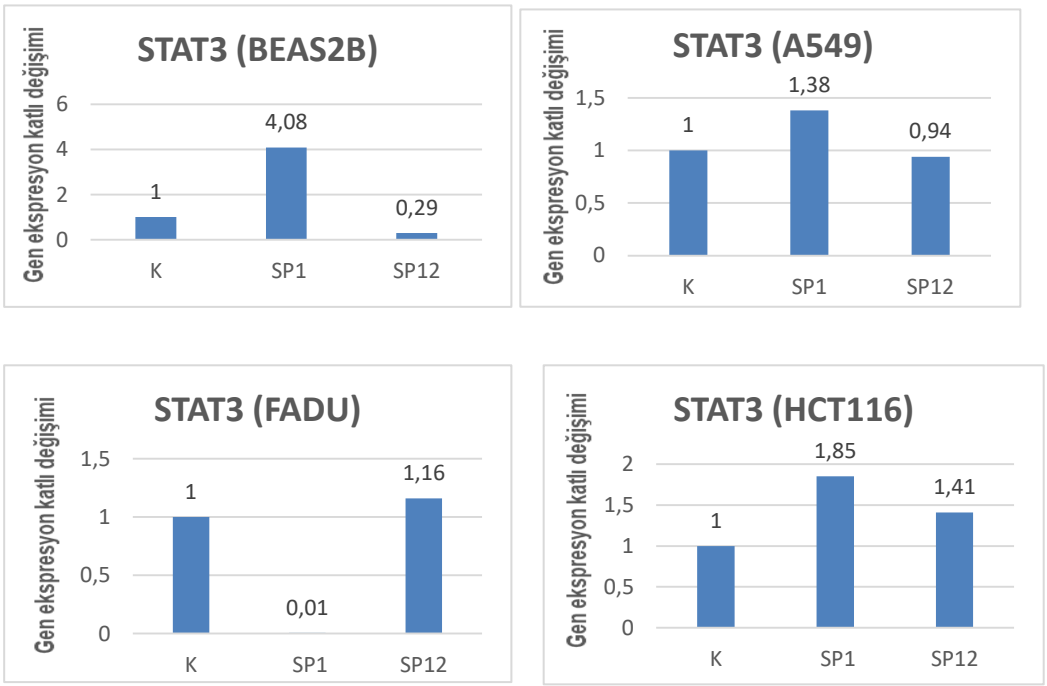
Şekil 4.1. Farklı hücre hatlarında STAT 1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması



Şekil 4.1. (Devam) Farklı hücre hatlarında STAT 1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.1.2. STAT3 Geni

BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 4,08 kat, Sp12 transfektinde ise 3,44 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,38 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 1,06 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 200 kat baskılanma, Sp12 transfektinde ise 1,16 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir. HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 1,85 kat, Sp12 transfektinde ise 1,41 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Farklı hücre hatlarında STAT 3 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.1.3. IRF1 Geni

BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 98,3 kat, Sp12 transfektinde ise 3,75 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir. A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,22 kat, Sp12 transfektinde ise 1,01 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir. FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 2,4 kat, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 1,2 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir. HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,83 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 1,07 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).

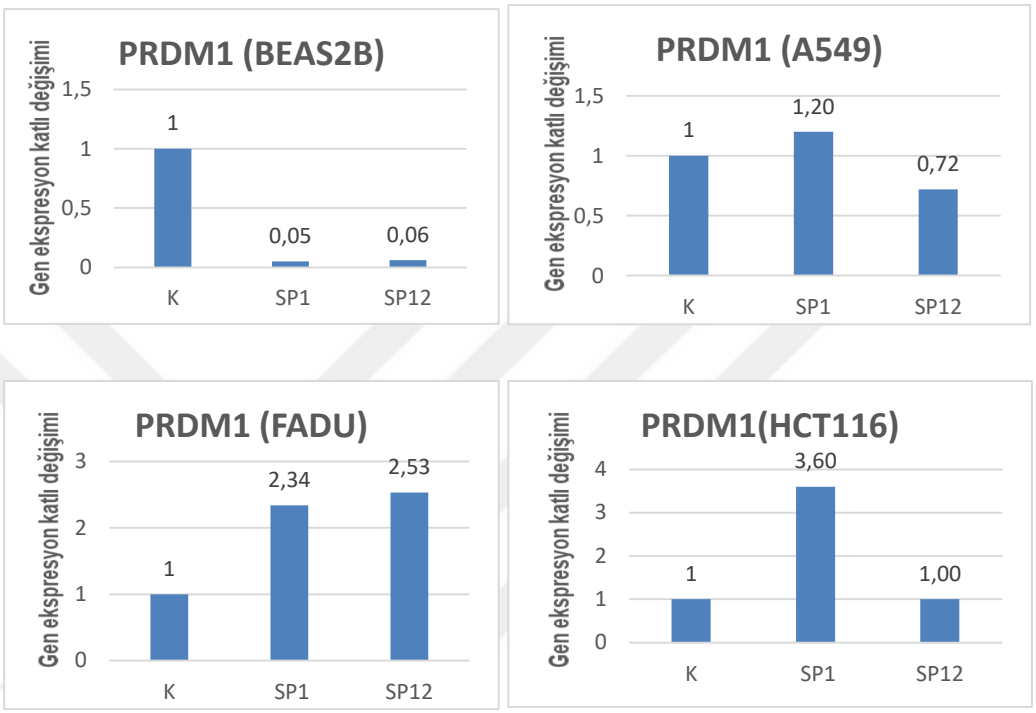


Şekil 4.3. Farklı hücre hatlarında IRF 1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.1.4. PRDM1 Geni

BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 20 kat, Sp12 transfektinde ise 16,6 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 1,2 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 1,38 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. FADU hücre hattı için kontrole

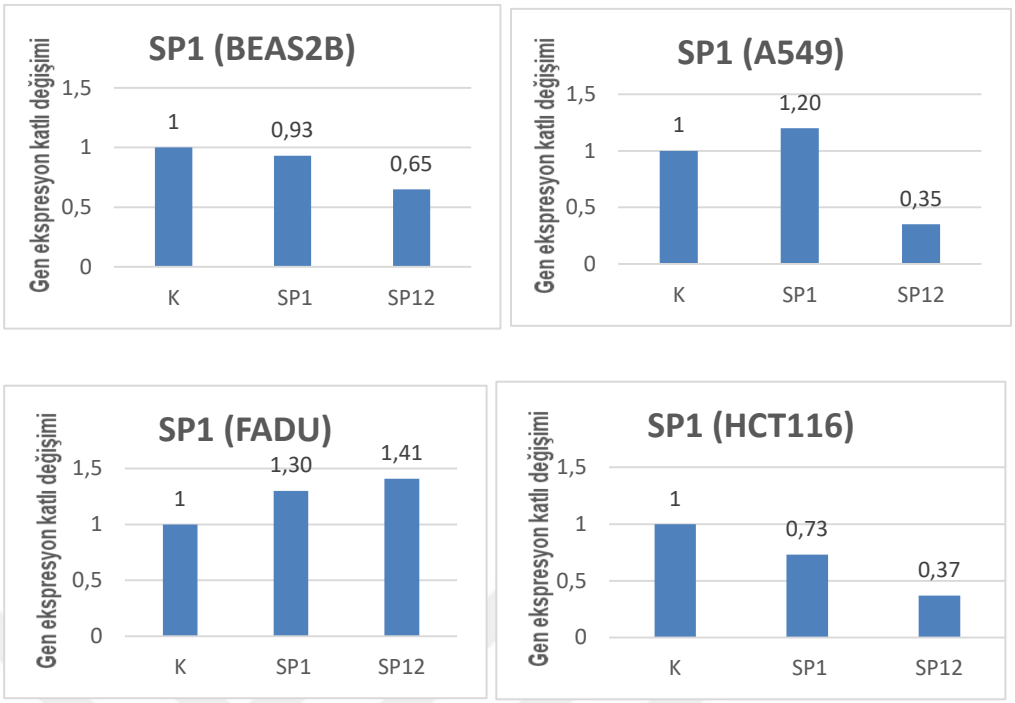
kıyasla Sp1 transfektinde 2,34 kat, Sp12 transfektinde ise 2,53 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir. HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 3,6 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise herhangi bir değişiklik gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Farklı hücre hatlarında PRDM1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.1.5. SP1 Geni

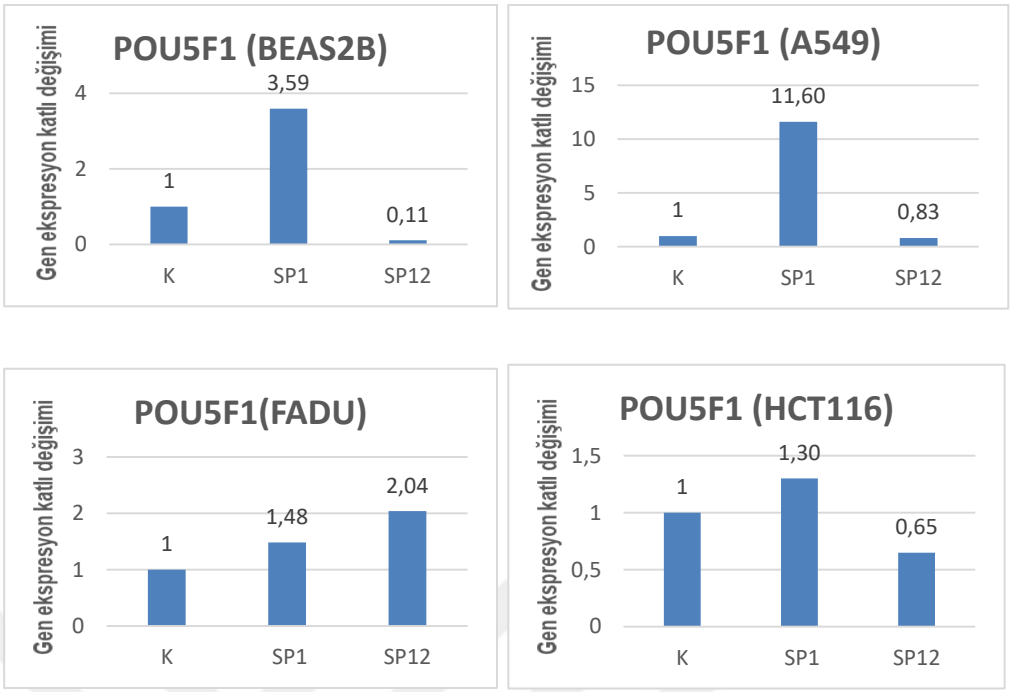
BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 1,07 kat, Sp12 transfektinde ise 1,5 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 1,2 kat gen ifadesinde indüklenme, Sp12 transfektinde ise 2,8 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,3 kat, Sp12 transfektinde ise 140 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir. HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 1,36, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 2,7 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Farklı hücre hatlarında SP1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.1.6. POU5F1 Geni

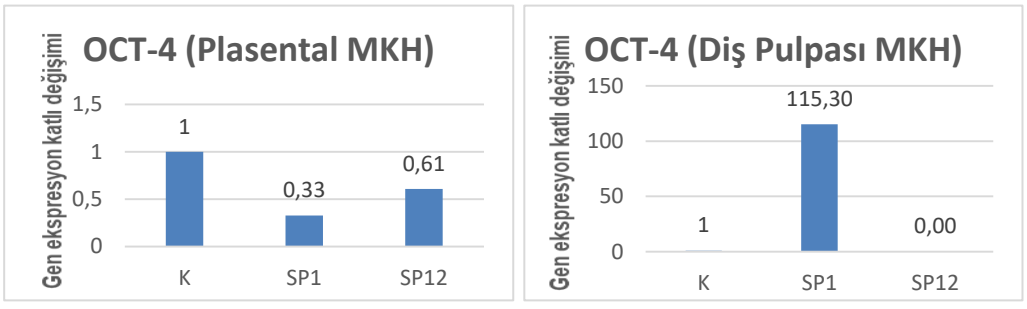
BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 3,59 kat gen ifadesinde indüklenme, Sp12 transfektinde ise 9,09 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 11,6 kat gen ifadesinde indüklenme, Sp12 transfektinde ise 1,2 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 1,48 kat, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 2,04 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir. HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 1,3 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 1,5 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



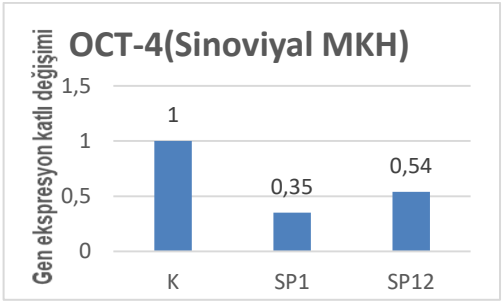
Şekil 4.6. Farklı hücre hatlarında POU5F1 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.1.7. OCT-4 Geni

Plasental mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 3,03 kat, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 1,63 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 0,02 kat, Sp12 transfektinde ise 1,85 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 115,3 kat gen ifadesinde indüklenme, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 500 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).



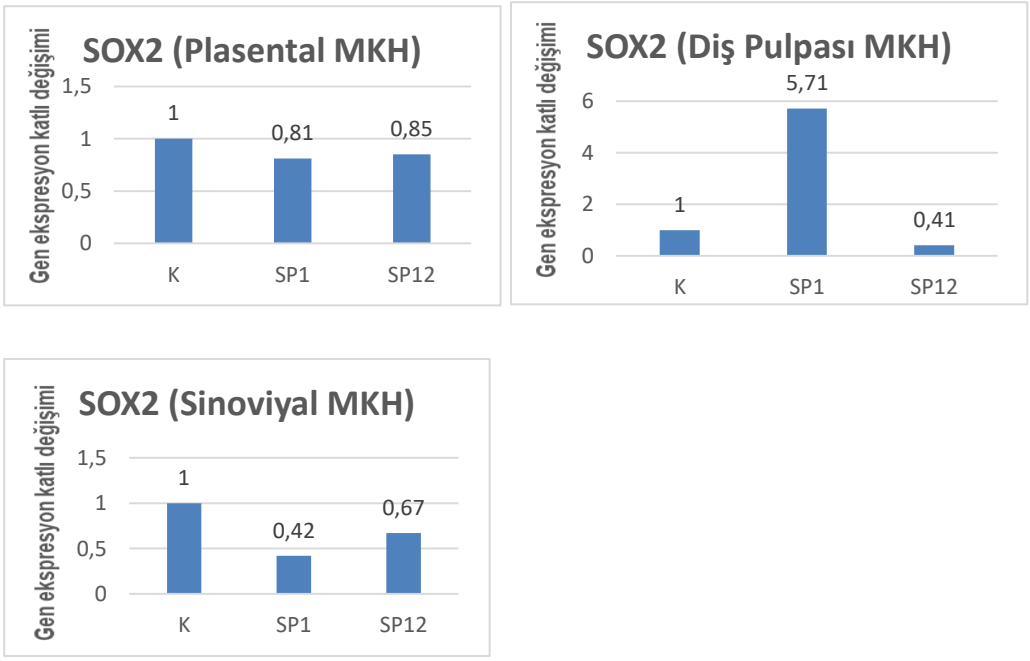
Şekil 4.7. Farklı mezenkimal kök hücrelerde OCT-4 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması



Şekil 4.7. (Devam) Farklı mezenkimal kök hücrelerde OCT-4 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.1.8. SOX-2 Geni

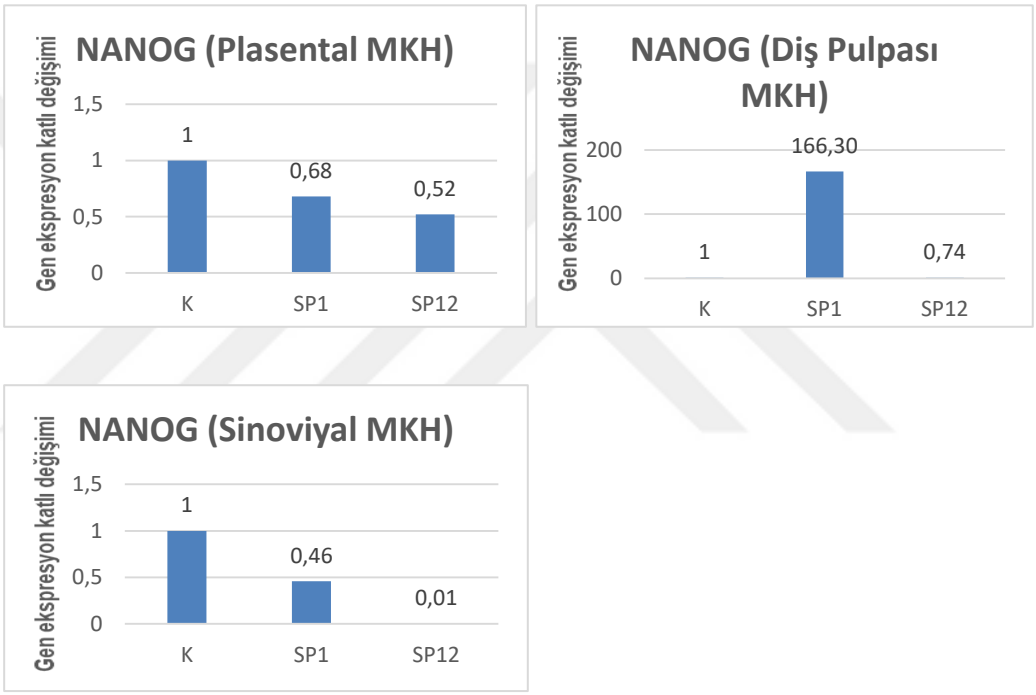
Plasental mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 5,71 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 2,43 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 2,38 kat, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 1,5 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 50 kat, Sp12 transfektinde ise 2,43 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Farklı mezenkimal kök hücrelerde SOX 2 gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.1.9. NANOG Geni

Plasental mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,47 kat, Sp12 transfektinde ise 1,92 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 2,17 kat, Sp12 transfektinde ise 14,2 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 166,3 kat gen ifadesinde indüklenme, Sp12 transfektinde ise 1,35 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



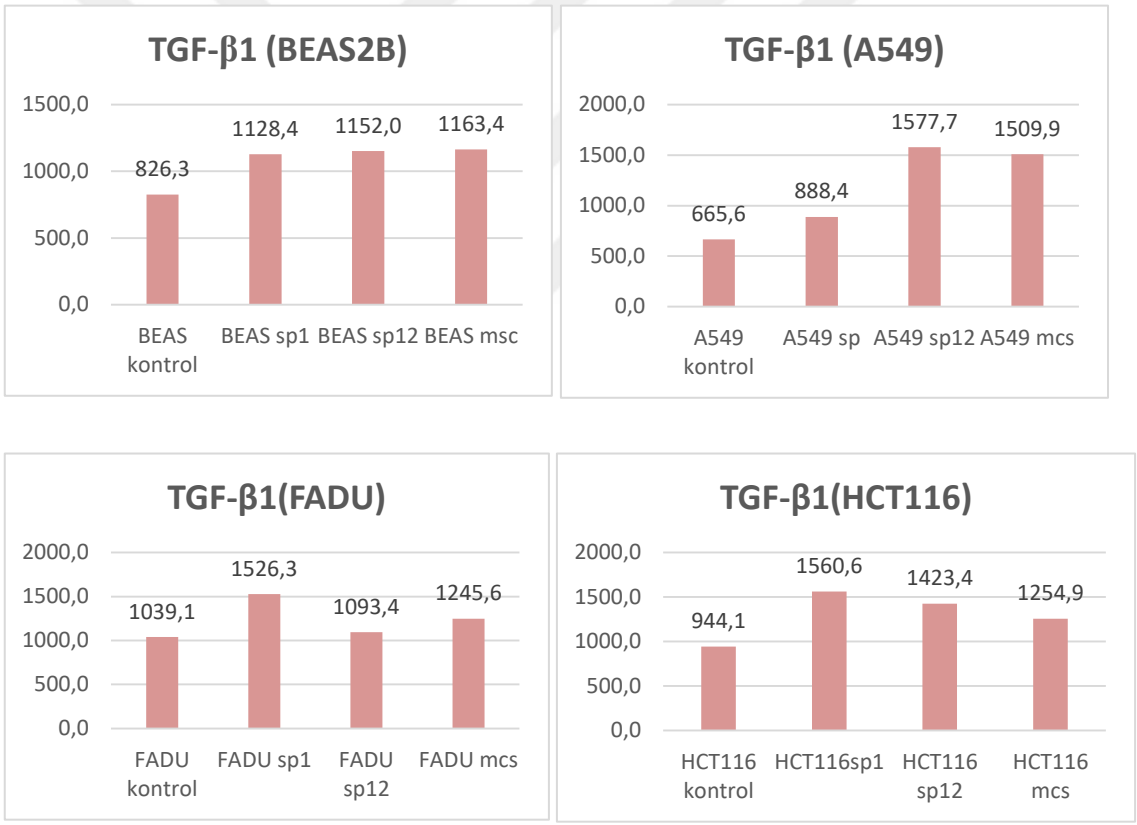
Şekil 4.9. Farklı mezenkimal kök hücrelerde NANOG gen ekspresyonlarının kontrol grubuyla (mcs) karşılaştırılması

4.2. ELİZA Bulguları

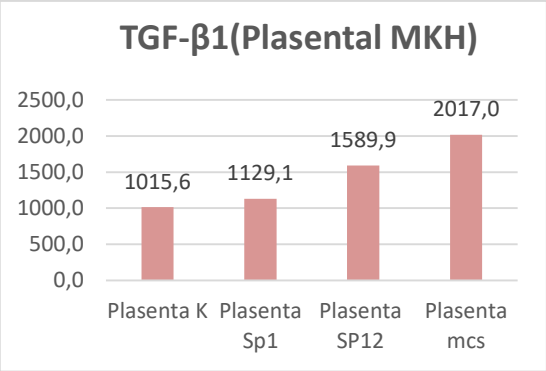
4.2.1. TGF-β1

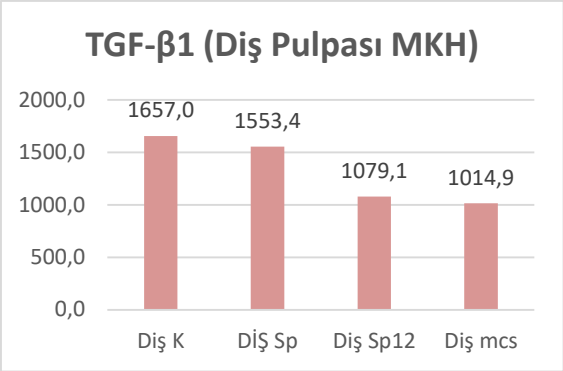
BEAS2B hücre hattında kontrol grubu 826,2 pg/ml, boş vektör transfekti 1163,4 pg/ml, Sp1 transfekti 1128,7 pg/ml, Sp12 transfekti 1152,0 pg/ml olarak bulunmuştur. A549 hücre hattında kontrol grubu 665,5 pg/ml, boş vektör transfekti 1509,8 pg/ml, Sp1 transfekti 888,4 pg/ml, Sp12 transfekti 1577,7 pg/ml olarak bulunmuştur. FADU hücre

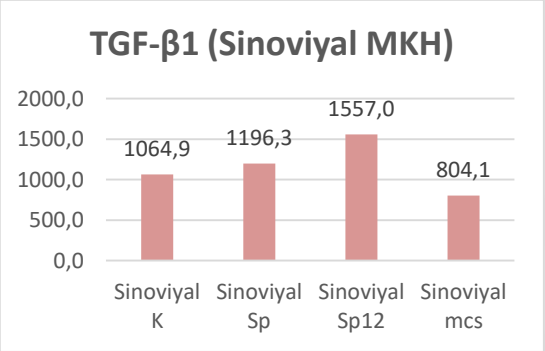
hattında kontrol grubu 1039,1 pg/ml, boş vektör transfekti 1245,5 pg/ml, Sp1 transfekti 1526,2 pg/ml, Sp12 transfekti 1093,4 pg/ml olarak bulunmuştur. HCT116 hücre hattında kontrol grubu 944,1 pg/ml, boş vektör transfekti 1254,8 pg/ml, Sp1 transfekti 1560,5 pg/ml, Sp12 transfekti 1423,4 pg/ml olarak bulunmuştur. Plasental mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1015,5 pg/ml, boş vektör transfekti 2017,0 pg/ml, Sp1 transfekti 1129,1 pg/ml, Sp12 transfekti 1589,8 pg/ml olarak bulunmuştur. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1657,0 pg/ml, boş vektör transfekti 1014,8 pg/ml, Sp1 transfekti 1553,4 pg/ml, Sp12 transfekti 1079,1 pg/ml olarak bulunmuştur. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1064,8 pg/ml, boş vektör transfekti 804,1 pg/ml, Sp1 transfekti 1196,2 pg/ml, Sp12 transfekti 1557,0 pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde TGF-β1 Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml)





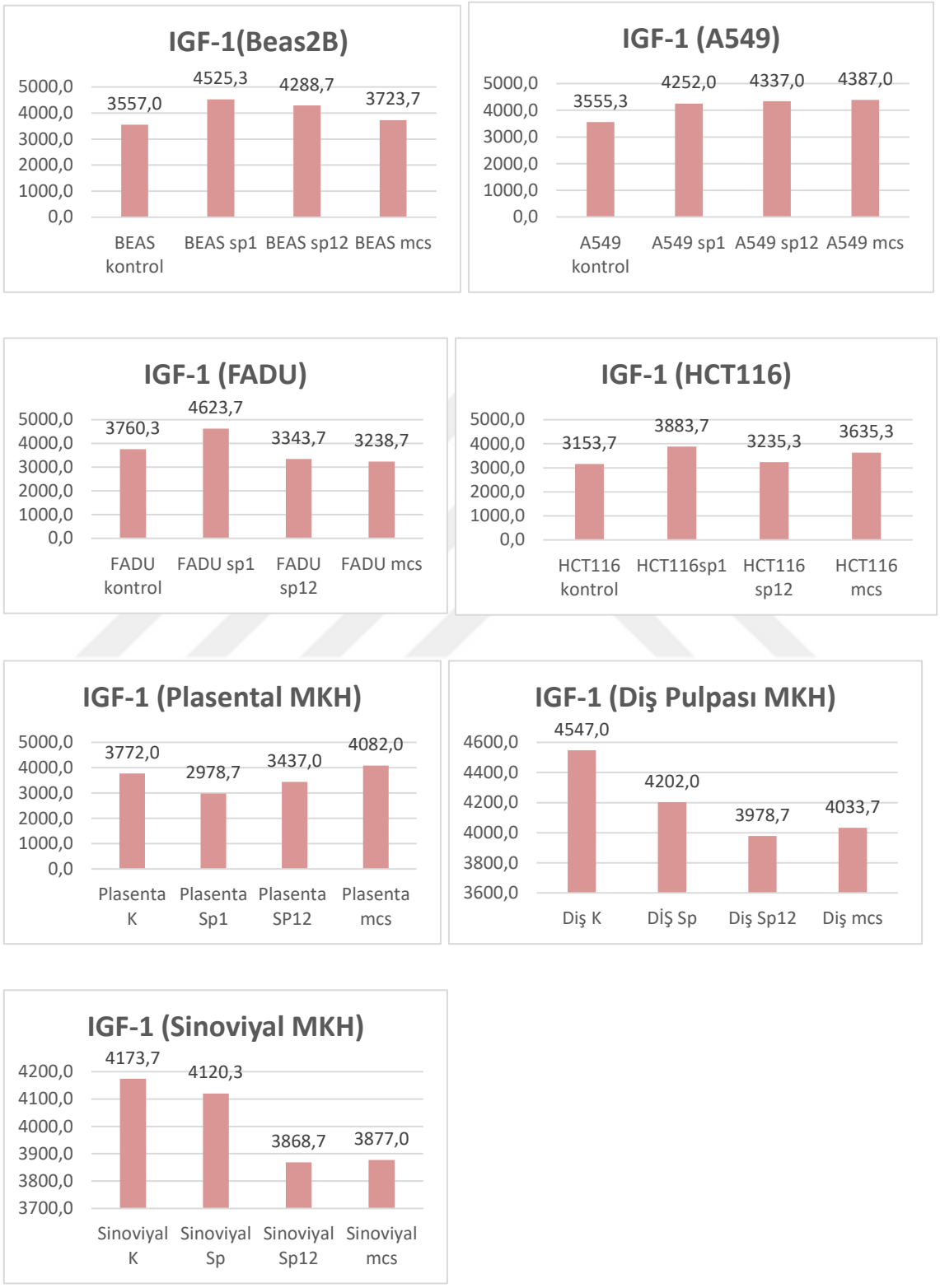


Şekil 4.10.(Devam) Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde TGF-β1 Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml)

4.2.2. IGF-1

BEAS2B hücre hattında kontrol grubu 3557,0 pg/ml, boş vektör transfekti 3723,6 pg/ml, Sp1 transfekti 4523,3 pg/ml, Sp12 transfekti 4288,6 pg/ml olarak bulunmuştur. A549 hücre hattında kontrol grubu 3555,3 pg/ml, boş vektör transfekti 4387,0 pg/ml, Sp1 transfekti 4252,0 pg/ml, Sp12 transfekti 4337,0 pg/ml olarak bulunmuştur. FADU hücre hattında kontrol grubu 3760,3 pg/ml, boş vektör transfekti 3238,6 pg/ml, Sp1 transfekti 4623,6 pg/ml, Sp12 transfekti 3343,6 pg/ml olarak bulunmuştur. HCT116 hücre hattında kontrol grubu 3153,6 pg/ml, boş vektör transfekti 3635,3 pg/ml, Sp1 transfekti 3883,6 pg/ml, Sp12 transfekti 3235,3 pg/ml olarak bulunmuştur. Plasental mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 3772,0 pg/ml, boş vektör transfekti 4082,0 pg/ml, Sp1 transfekti 2978,6 pg/ml, Sp12 transfekti 3437,0 pg/ml olarak bulunmuştur. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 4547,0 pg/ml, boş vektör transfekti 4033,6 pg/ml, Sp1 transfekti 4202,0 pg/ml, Sp12 transfekti 3978,6 pg/ml olarak bulunmuştur. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök

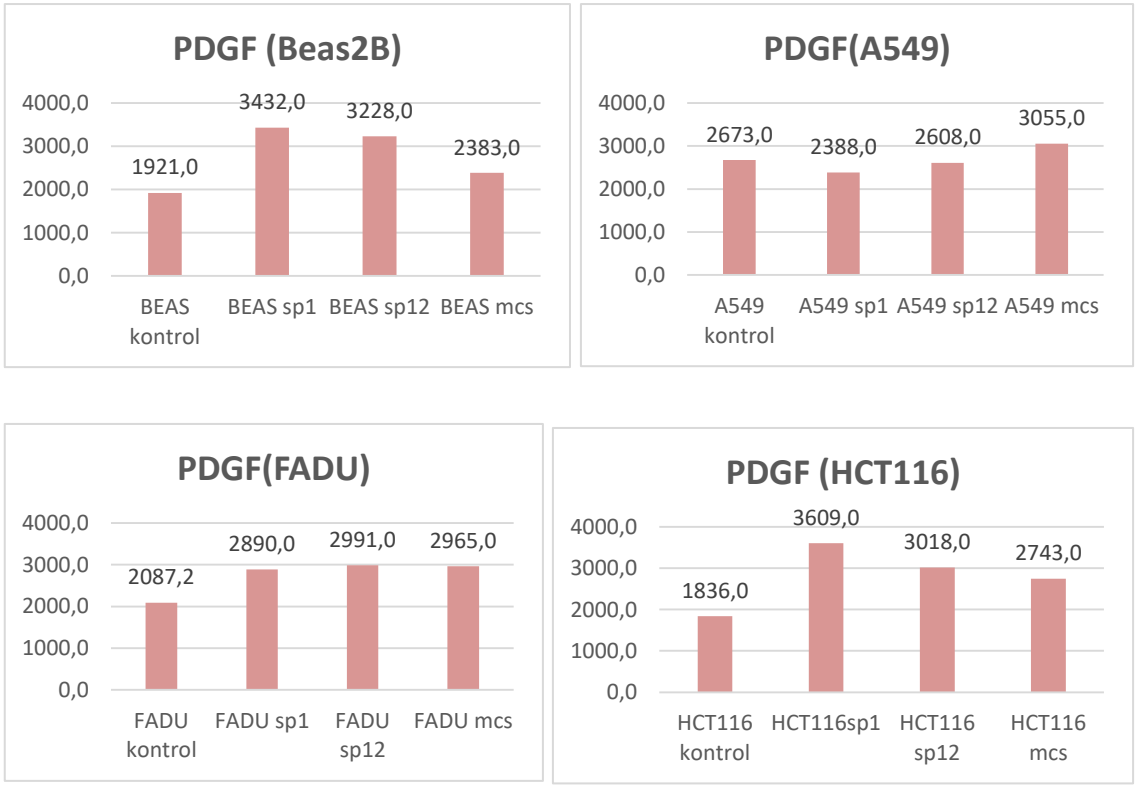
hücreler için kontrol grubu 4173,6 pg/ml, boş vektör transfekti 3877,0 pg/ml, Sp1 transfekti 4120,3 pg/ml, Sp12 transfekti 3868,6 pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.11).



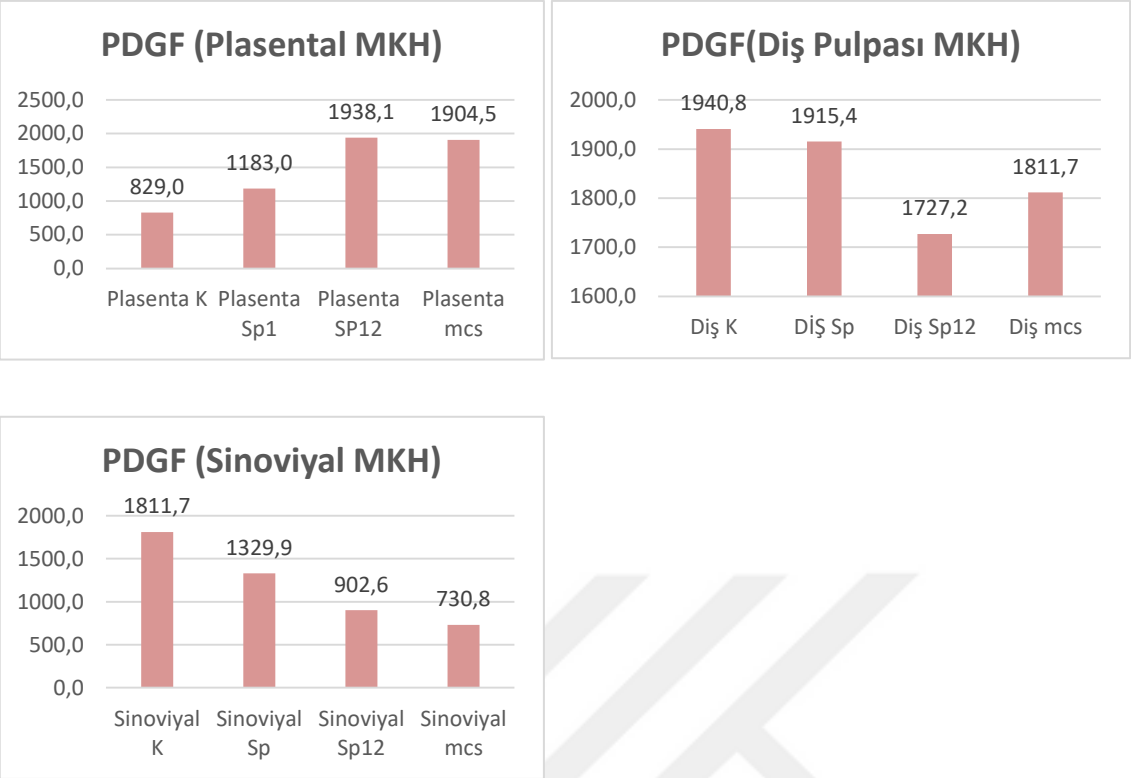
Şekil 4.11. Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde IGF-1 Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml)

4.2.3. PDGF

BEAS2B hücre hattında kontrol grubu 1921,0 pg/ml, boş vektör transfekti 2383,0 pg/ml, Sp1 transfekti 3432,0 pg/ml, Sp12 transfekti 3228,0 pg/ml olarak bulunmuştur. A549 hücre hattında kontrol grubu 2673,0 pg/ml, boş vektör transfekti 3055,0 pg/ml, Sp1 transfekti 2388,0 pg/ml, Sp12 transfekti 2608,0 pg/ml olarak bulunmuştur. FADU hücre hattında kontrol grubu 2087,1 pg/ml, boş vektör transfekti 2965,0 pg/ml, Sp1 transfekti 2890,0 pg/ml, Sp12 transfekti 2991,0 pg/ml olarak bulunmuştur. HCT116 hücre hattında kontrol grubu 1836,0 pg/ml, boş vektör transfekti 2743,0 pg/ml, Sp1 transfekti 3609,0 pg/ml, Sp12 transfekti 3018,0 pg/ml olarak bulunmuştur. Plasental mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 829,0 pg/ml, boş vektör transfekti 1904,4 pg/ml, Sp1 transfekti 1183,0 pg/ml, Sp12 transfekti 1938,0 pg/ml olarak bulunmuştur. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1940,8 pg/ml, boş vektör transfekti 1811,7 pg/ml, Sp1 transfekti 1915,3 pg/ml, Sp12 transfekti 1727,1 pg/ml olarak bulunmuştur. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1811,7 pg/ml, boş vektör transfekti 730,8 pg/ml, Sp1 transfekti 1329,9 pg/ml, Sp12 transfekti 902,6 pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde PDGF Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml)

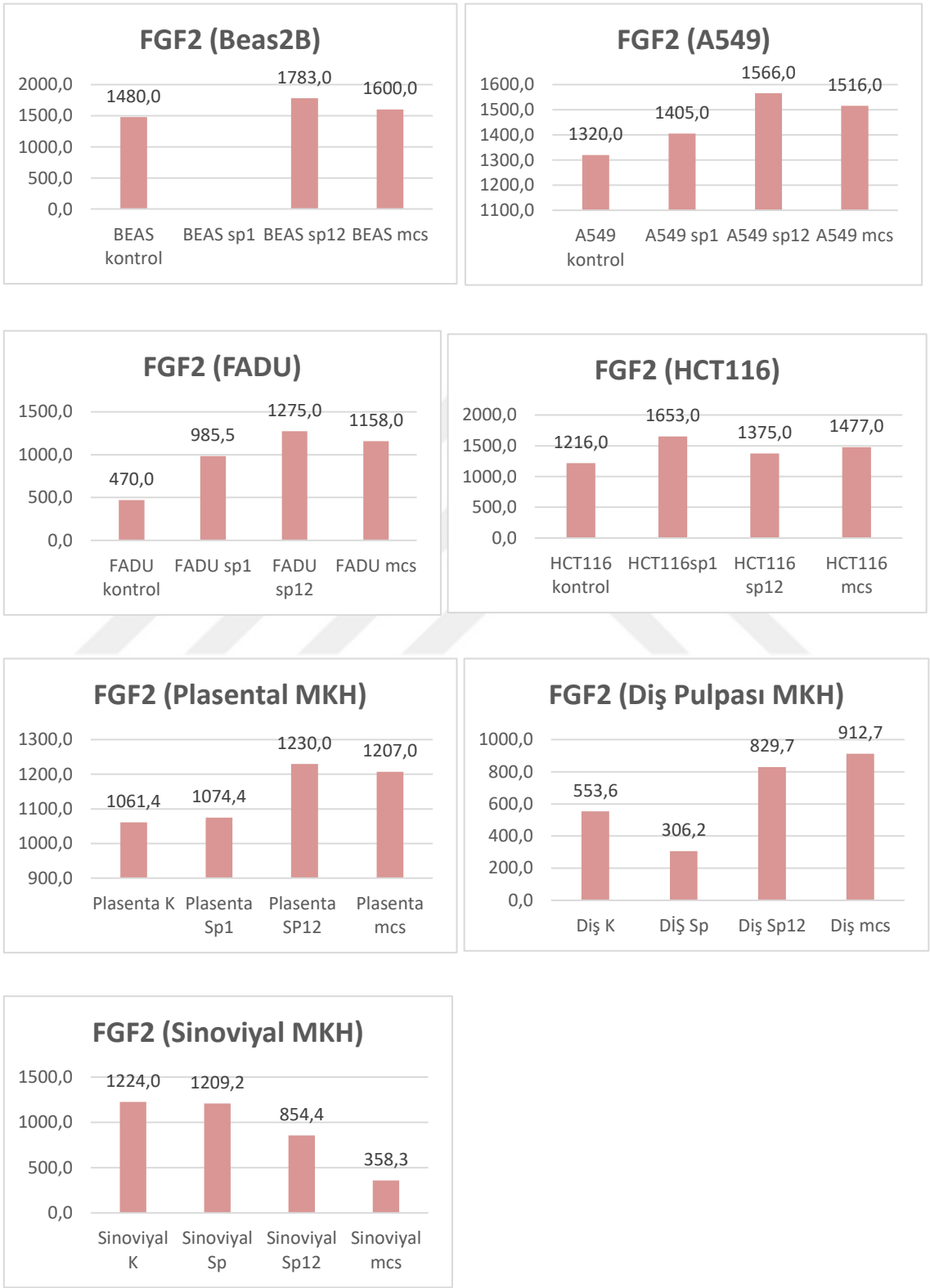


Şekil 4.12. (Devam) Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde PDGF Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml)

4.2.4. FGF-2

BEAS2B hücre hattında kontrol grubu 1480,0 pg/ml, boş vektör transfekti 1600,0 pg/ml, Sp12 transfekti 1783,0 pg/ml olarak bulunmuş, Sp1 transfekti için kantitatif bir sonuç alınamamıştır. A549 hücre hattında kontrol grubu 1320,0 pg/ml, boş vektör transfekti 1516,0 pg/ml, Sp1 transfekti 1405,0 pg/ml, Sp12 transfekti 1566,0 pg/ml olarak bulunmuştur. FADU hücre hattında kontrol grubu 470,0 pg/ml, boş vektör transfekti 1158,0 pg/ml, Sp1 transfekti 985,5 pg/ml, Sp12 transfekti 1275,0 pg/ml olarak bulunmuştur. HCT116 hücre hattında kontrol grubu 1216,0 pg/ml, boş vektör transfekti 1477,0 pg/ml, Sp1 transfekti 1653,0 pg/ml, Sp12 transfekti 1375,0 pg/ml olarak bulunmuştur. Plasental mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1061,3 pg/ml, boş vektör transfekti 1207,0 pg/ml, Sp1 transfekti 1074,4 pg/ml, Sp12 transfekti 1230,0 pg/ml olarak bulunmuştur. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 553,5 pg/ml, boş vektör transfekti 912,6 pg/ml, Sp1 transfekti 306,1 pg/ml, Sp12 transfekti 829,6 pg/ml olarak bulunmuştur. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal

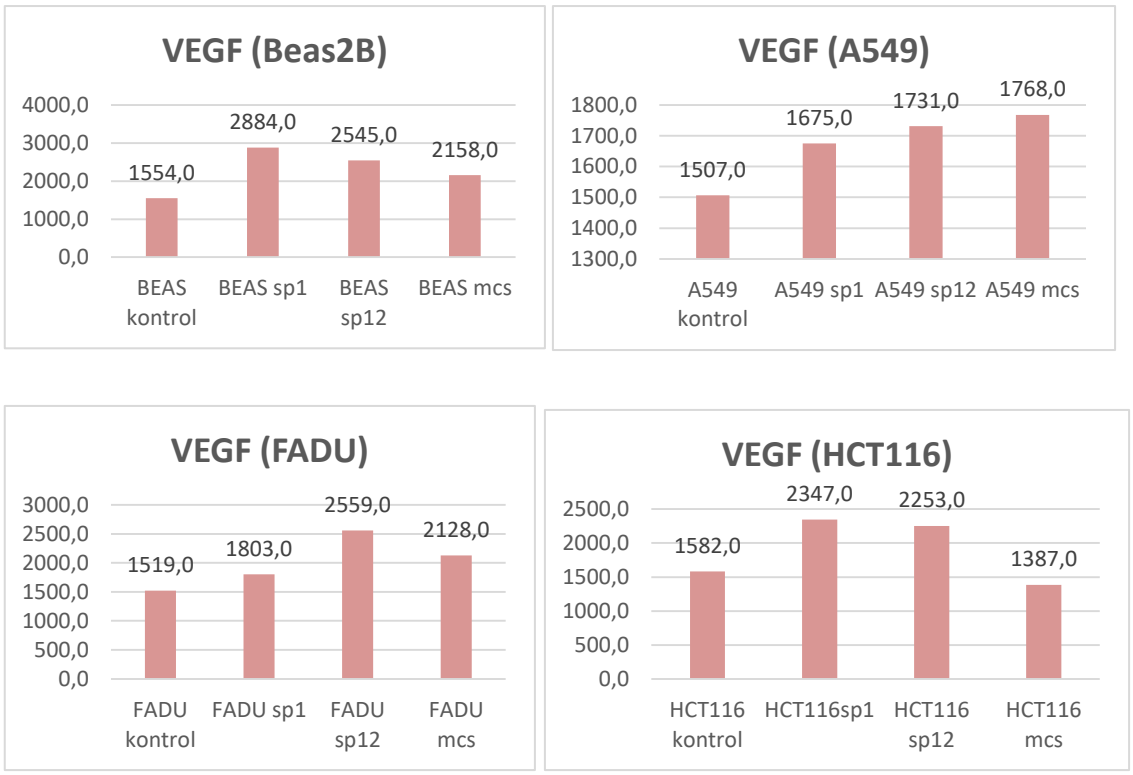
kök hücreler için kontrol grubu 1224,0 pg/ml, boş vektör transfekti 358,3 pg/ml, Sp1 transfekti 1209,2 pg/ml, Sp12 transfekti 854,4 pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



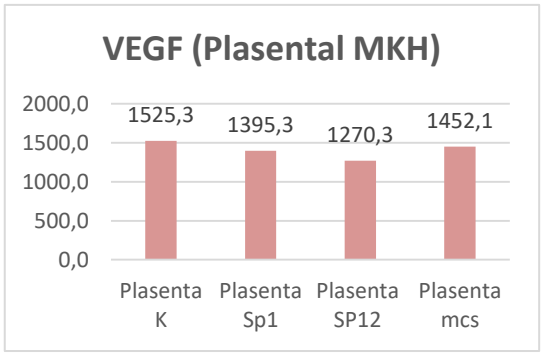
Şekil 4.13. Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde FGF2 Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml)

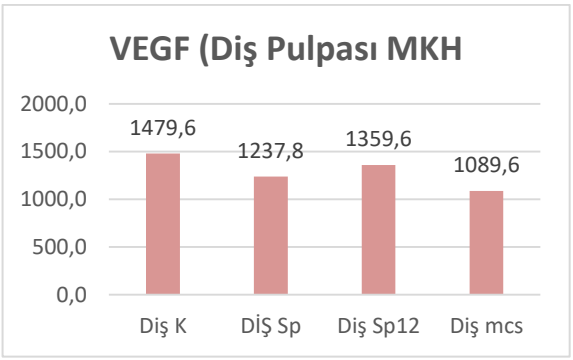
4.2.5. VEGF

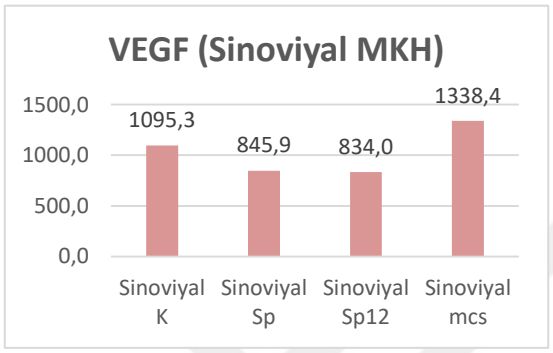
BEAS2B hücre hattında kontrol grubu 1554,0 pg/ml, boş vektör transfekti 2158,0 pg/ml, Sp1 transfekti için 2884,0 pg/ml, Sp12 transfekti 2545,0 pg/ml olarak bulunmuştur. A549 hücre hattında kontrol grubu 1507,0 pg/ml, boş vektör transfekti 1768,0 pg/ml, Sp1 transfekti 1675,0 pg/ml, Sp12 transfekti 1731,0 pg/ml olarak bulunmuştur. FADU hücre hattında kontrol grubu 1519,0 pg/ml, boş vektör transfekti 2128,0 pg/ml, Sp1 transfekti 1803,0 pg/ml, Sp12 transfekti 2559,0 pg/ml olarak bulunmuştur. HCT116 hücre hattında kontrol grubu 1582,0 pg/ml, boş vektör transfekti 1387,0 pg/ml, Sp1 transfekti 2347,0 pg/ml, Sp12 transfekti 2253,0 pg/ml olarak bulunmuştur. Plasental mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1525,2 pg/ml, boş vektör transfekti 1452,1 pg/ml, Sp1 transfekti 1395,2 pg/ml, Sp12 transfekti 1270,2 pg/ml olarak bulunmuştur. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1479,6 pg/ml, boş vektör transfekti 1089,6 pg/ml, Sp1 transfekti 1237,7 pg/ml, Sp12 transfekti 1359,6 pg/ml olarak bulunmuştur. Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrol grubu 1095,2 pg/ml, boş vektör transfekti 1338,3 pg/ml, Sp1 transfekti 845,8 pg/ml, Sp12 transfekti 834,0 pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde VEGF Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml)







Şekil 4.14. (Devam) Farklı hücrel hatlarında ve mezenkimal kök hücrelerde VEGF Eliza yöntemi sonuçları (pg/ml)

5. TARTIŞMA

Küresel düzeyde salgına sebep olan SARS CoV-2 virüsü, çok hızlı bulaş ve yüksek mortalite oranına sahiptir. Bütün dünyada ilaç ve aşı çalışmaları sürekli yenileri eklenerek halen devam etmektedir. Virüs ile enfekte olan farklı yaş gruplarındaki sağlıklı veya herhangi bir hastalık tanısına sahip bireyler için ilaç geliştirilmesi çok büyük öneme sahiptir ve tüm klinik alanlarda ihtiyaç duyulmaktadır. SARS CoV-2'nin özellikle immün sistem üzerinde ciddi etkileri olması dolayısıyla; virüse karşı oluşan immün cevabın mekanizmalarının anlaşılması ilaç geliştirme çalışmalarına dolayısıyla salgın ile mücadeleye önemli katkılar sağlayacaktır. Özellikle de ilaç geliştirme sürecinde moleküler çalışmalar hedefe yol göstermesi açısından büyük önem arz etmektedir[1-13]. Yaptığımız çalışmada, SARS CoV-2 virüsüne karşı oluşacak immün cevapta etkinliği olan genler ve proteinlerin moleküler düzeyde incelenmesi amaçlandı.

SARS-CoV-2 ile enfekte bireylerde en sık solunum sisteminde hasar görülse de, virüs vücudun her organını etkileyebilmektedir. Kliniği kötü olan hastalarda sıklıkla birden fazla organ etkilenir. Virüs, vasküler endotel hücreleri, akciğerler, kalp, beyin, böbrekler, bağırsak, karaciğer, farenks ve diğer dokularda bulunan ACE-2 reseptörlerine bağlanır. Bu organlara doğrudan zarar verebilir. Ayrıca virüsün neden olduğu sistemik bozukluklar çoklu organ yetmezliği gibi daha ciddi problemlere yol açmaktadır[194,195]. Pıhtılaşma ve damar endotelindeki bozukluklar ile yaygın olarak karşılaşılmaktadır, ancak erken evrelerde semptomlara yol açmayabilir. Akut enfeksiyonun geçmesinden uzun bir süre sonra organlardaki hasar belirgin hale gelebilir. Farklı organlar farklı zamanlarda etkilenebilir. Kronik yaralanma görülebilir. Rehabilitasyon uzun ve zorlayıcı olabilir[194,195]. Literatürle uyumlu olarak biz de çalışmamızda akciğer, farinks ve kolon karsinom hücre hatlarını tercih ettik. Ayrıca plasental, diş pulpası ve sinoviyal sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile birlikte sağlıklı akciğer hücre hattını da çalışmamıza dahil ettik.

Sinyal transdüseri ve aktivasyon faktörleri (STAT) sitokinler tarafından aktive edilir ve onkogenezde önemli olan yolakları aktive ederler. STAT proteinleri ilk olarak sitokin cevabı olarak tanımlanmıştı, ancak günümüzde hücre döngüsünün ilerlemesi, apoptoz, tümör anjiyogenezi, tümör hücresinin invazyonu, metastazı ve tümör hücresinin bağışıklık sisteminden kaçması dahil olmak üzere onkogenezde önemli

yolakları düzenlediği bilinmektedir. Esas olarak membran reseptörüne bağlı Janus kinazlar (JAK) tarafından aktive edilirler. Bu yolağın regülasyonundaki problemler primer tümörlerde sıklıkla gözlenir ve anjiyogenezin ilerlemesine yol açar, bu da tümörlerin hayatta kalmasını ve immünsupresyonu artırır. Gen susturma çalışmaları, STAT proteinlerinin bağışıklık sisteminin gelişimi ve fonksiyonuna dahil olduğunu ayrıca bağışıklık toleransı ve tümör immün gözetiminin sürdürülmesinde rol oynadığına dair kanıtlar sağlamıştır. STAT1, STAT3 ve STAT5 dahil olmak üzere STAT ailesi üyelerinin yapısal aktivasyonu, çok çeşitli tümörlerde gözlemlenmiştir[196,197]. Yapılan çalışmalarda, STAT1'in kolorektal kanserli hastalarda yukarı yönde regüle olduğu gösterilmiştir[198,199]. Akciğer kanserli hastalarda ise STAT1 ekspresyonunun yüksek bulunması hastaların düşük sağkalım oranıyla ilişkilendirilmiştir[200]. STAT1 ekspresyonunun baş boyun skuamoz hücreli kanserli hastalardaki rolü günümüzde hala tartışma konusudur[201]. Çalışmamızda STAT1 gen ekspresyonu kontrole kıyasla BEAS2B hücre hattında Sp1 transfektinde yaklaşık 6 kat indüklenmiştir, Sp12 transfektinde ise 7,1 kat baskılanmıştır. A549 hücre hattında ise kontrole kıyasla Sp1 transfekti 2,7 kat, Sp12 transfekti 2,1 kat baskılanmıştır. Çalışmamızda literatürdeki kolon kanseri çalışmalarıyla uyumlu olarak HCT116 hücre hattında kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,45 kat indüklenme gözlemlemişken, Sp12 transfektinde ise 1,6 kat baskılanma tespit ettik.

Chalikonda ve ark. 2021 yılında yaptıkları çalışmada, STAT3'ün kolorektal kanserli hastalarda gen ifadesinin artığı gösterilmiştir[202]. Başka bir çalışmada ise, adenokarsinomlarda STAT3'ün ekspresyonunun yüksek olduğu belirtilmiştir[203]. Gao ve ark. 2005 yılında larinks kanser hücreleriyle yaptıkları çalışmada STAT3 ekspresyonunun inhibisyonu ile tümör progresyonunun baskılandığını bildirmişlerdir[204]. Bizim çalışmamızda STAT3 gen ekspresyonu kontrole kıyasla BEAS2B hücre hattında Sp1 transfektinde 4,08 kat indüklenmiş, Sp12 transfektinde ise 3,4 kat baskılanmıştır. Literatürdeki koleraktal kanser verileriyle uyumlu olarak biz de HCT116 hücre hattında Sp1 transfektinde 1,85 kat, Sp12 transfektinde ise 1,41 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemledik. Literatürdeki adenokarsinom verileriyle uyumlu olarak biz de A549 hücre hattında Sp1 transfektinde 1,3 kat gen ifade artışı tespit etmişken, Sp12 transfektinde ise neredeyse hiç fark gözlemlemedik. Literatürdeki larinks kanser verileri ile Sp12

transfektinde tespit ettiğimiz gen ifadesi uyumlu olsa da Sp1 transfektindeki gen ifadesi farklı olarak 100 kat baskılanmıştır.

Gottschlich ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada, normal mukoza ve tümör dokusu arasındaki apoptozla ilişkili genlerin transkripsiyonel değişikliklerini tanımlamayı amaçlamışladır. Bu nedenle skuamoz hücreli baş boyun kanserli 6 hastanın merkez tümör dokularından 6, sınır tümör dokularından 2, sağlıklı mukoza dokularından ise 4 biyopsi örneği almışlardır. Örneklerden RNA elde edildikten sonra Microarray hibridizasyon yöntemi ile çeşitli genlerin ekspresyonlarını araştırılmışlardır. Doğrulama testi olarakta RT-PCR kullanılmışlar, kanserli dokulardan alınan örneklerde IRF1 geninin yukarı yönde regüle olduğu tespit ettiklerini bildirmişlerdir[205]. Çalışmamızda da benzer şekilde FADU hücre hattında Sp1 transfektinin 2,4 kat indüklendiğini gözlemledik. Hong ve ark. 2019 yılında yaptıkları çalışmada kolorektal kanserli 39 hastanın, kanserli dokusundan ve sağlıklı mukozalarından biyopsi örnekleri almışlardır. Yapmış oldukları çalışmada IRF1'in gen ekspresyonlarını RT-PCR, Western blot ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırmışlardır. Sonuç olarak ise IRF1'in kolorektal kanser dokularında aşağı yönde regüle edildiğini ve kolorektal kanser metastazında kritik bir rol oynayabileceğini belirtmişlerdir[206]. Biz de çalışmamızda, HCT116 hücre hattında Sp12 transfektinin baskılanma eğiliminde olduğunu tespit ettik. Zhang ve ark 2022 yılında yaptıkları çalışmada ise, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde IRF1'in fonksiyonunu ve gen ekspresyonunu araştırmışlardır. Araştırmacılar, akciğer kanser dokularındaki IRF1 seviyelerini normal dokularla karşılaştırdıklarında, IRF-1 ekspresyonunun anlamlı derecede düşük olduğunu ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri için prognostik bir belirteç olabileceğini bildirmişlerdir[199]. Biz ise çalışmamızda A549 hücre hattında Sp1 transfektinde 1,2 kat indüklenme gözlemlemişken, Sp12 transfektinde ise herhangi bir değişiklik tespit edemedik.

Yu ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada PRDM1'in akciğer kanseri hücre hatlarındaki fonksiyonlarını araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan tüm akciğer kanser hücrelerinin (A549, H1299, Calu-1, H23 ve H441) PRDM1'i eksprese ettikleri belirlenmiştir[208]. Zhu ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada akciğer kanserinin progresyonunda PRDM1 geninin fonksiyonunu RT-PCR ve Western blot yöntemleri ile araştırmışlardır. Araştırmacılar PRDM1'in sağlıklı insan akciğer epitelinde eksprese

edildiğini ancak, akciğer kanser hücrelerinde aşağı yönde regüle edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, in vivo olarak PRDM1 geninin ifade olmamasının akciğer metastazını promote ettiğini ve akciğer kanserinde kötü prognoz ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir[209]. Biz de PRDM1 geni için A549 hücre hattında Sp12 transfektinde 1,3 kat baskılanma gözlemlememize rağmen, Sp1 transfektinde 1,2 kat indüklenme saptadık. FADU hücre hattında Sp1 transfektinde 2,3 kat Sp12 transfektinde ise 2,5 kat indüklenme gözlemledik. HCT116 hücre hattında ise, Sp1 transfektinde 3,6 kat indüklenme tespit etmişken, Sp12 transfektinde ise herhangi bir değişiklik olmadığını gözlemledik.

Citron ve ark. 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada, SP1 yolağının inhbisyonunun baş boyun skuamoz hücreli karsinomlu farelerde, kanser hücrelerinin ölümünü indüklediği ve relapsı engellediği bildirilmiştir[210]. Biz de bu çalışmayla uyumlu olarak FADU hücre hattı Sp1 transfektinin 1,3 kat, Sp12 transfektinin ise 1,4 kat indüklendiğini gözlemledik. Hosoi ve ark. 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada ise, kolorektal kanserli hastalarda SP1 geninin yukarı yönde regüle edildiği göstermişlerdir[211]. Çalışmamızda bu sonucun aksine HCT116 hücre hattında 1,3 kat, Sp12 transfektinde ise 2,7 kat baskılanma gözlemledik. Hsu ve ark. 2012 yılında, SP1 geninin akciğer tümör progresyonu ve metastazında rolünü anlamak için transgenik fareleri kullanmışlardır. Araştırmacılar Sp1'in yukarı yönde regülasyonunun akciğer tümörü oluşumunda rol oynadığını göstermişlerdir[212]. Biz de, SP1 geni için A549 hücre hattında Sp1 transfektinde 1,2 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 2,8 kat baskılanma gözlemledik.

Miyoshi ve arkadaşları 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada POU5F1'in kolorektal kanserdeki (CRC) rolünü araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Kolorektal kanserli 95 hastadan biyopsi örneği almışlardır. 95 kolorektal kanserli hastanın 79'unda POU5F1 mRNA ekspresyonunun az olduğu gözlemlenmişken, 16 hastada ise, yüksek bulunduğu belirlenmiştir[213]. Biz çalışmamızda HCT116 hücre hattı Sp1 transfektinde 1,3 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 1,2 kat baskılanma gözlemledik. Koo ve ark. 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada baş boyun skuamoz hücreli karsinomda POU5F1'in potansiyel rolünü değerlendirmek için çeşitli kanser hücre hatlarını kullanmışlardır. POU5F1, normal baş-boyun dokusuna göre primer baş-boyun skuamoz hücreli karsinom dokularında yüksek derecede eksprese edildiği ve baş-boyun skuamoz

hücreli karsinomda güçlü bir prognostik marker olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca POU5F1'in aşırı ekspresyonunun, baş-boyun skuamoz hücreli karsinom progresyonunu indüklediğini tespit etmişlerdir. POU5F1'in aşırı ekspresyonu, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında FADU hücrelerinin hem göçünü hem de invazyon potansiyelini önemli ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir[214]. Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak FADU hücre hattı Sp1 transfektinde 1,48 kat, Sp12 transfektinde ise 2,04 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemledik. Li ve ark. 2016 yılında yapmış oldukları meta analiz çalışmasında, POU5F1'in küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde prognostik belirteç olarak kullanımını değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar POU5F1'i küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirmişlerdir[215]. Biz de çalışmamızda POU5F1 genini değerlendirdiğimizde A549 hücrelerinde Sp1 transfektinin 11,6 kat indüklendiğini, Sp12 transfektinin ise 1,2 kat baskılandığını gözlemledik. Çalışmamız sonucunda çeşitli kanser hücre hatlarında Sp1 ve Sp12 transfektlerinin farklı ekspresyon profilleri sergilemesi, COVID-19'da varyantların farklı etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda kanser hastalarında COVID-19 varyantına göre tedavi ve ilaç seçim süreçlerinin değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Izadpanah ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada insan kemik iliği kaynalıklı MKH, Rhesus maymunu kemik iliği kaynaklı MKH, insan adipoz doku kaynaklı MKH, Rhesus maymunu adipoz doku kaynaklı MKH olmak üzere dört grup oluşturmuşlardır. Bu hücrelerde Oct-4, Sox-2 ve Rex-1 genlerinin mRNA ve protein ifadelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar MKH'lerin tamamının, 10. pasaja kadar embriyonik kök hücre belirteçleri olan, Oct-4, Rex-1 ve Sox-2'yi eksprese ettiğini belirlemişlerdir. Kök hücrelerin biyolojisini kontrol eden sınırlı sayıda transkripsiyon faktörünün olduğu bilinmektedir. Bu faktörlerin, pluripotent hücrelerin başlatılması, sürdürülmesi ve farklılaşmasının ana düzenleyicisi olduğu öne sürülmektedir. Oct-4 ve Sox-2 mRNA'ları, tüm hücre tiplerinde yüksek pasajlarda dahil olmak üzere yüksek seviyede eksprese edilmiştir. Sonuçlar, Oct-4 ve Sox-2 mRNA'larının yapısal olarak daha yüksek pasajlarda eksprese edildiğini, oysa Rex-1 ekspresyonunun in vitroda değişken olduğunu göstermektedir. Western blot analizi, MKH'lerde Oct-4 ve Sox-2 protein ekspresyon seviyelerinin olduğunu göstermektedir. Oct-4, MKH'lerin hem nükleer hem de sitoplazmik lokalizasyon gösterdiği, Sox-2'nin ise, daha fazla nükleer ve perinükleer

lokalizasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Oct-4 ve Sox-2, düşük pasajlı MKH'lerde yüksek düzeyde ortak lokalizasyon göstermiştir[216]. İnsan diş pulpası kök hücreleri, MKH olup kendini yenileme ve yüksek farklılaşma potansiyeli sergilerler. Huang ve ark. yaptıkları çalışmada diş pulpası kaynaklı MKH'lerde Oct-4 ve Nanog gen ekspresyonlarının birlikte baskılanması ile hücre çoğalması ve osteojenik farklılaşma kapasitesinin de azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca, Oct4/Nanog aşırı ekspresyonunun proliferasyon hızının artmasına ve diş pulpası kaynaklı kök hücrelerde osteojenik/kondrojenik/adipogenik indüksiyon farklılaşmasının promote edilmesinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, Oct-4/Nanog sinyallerinin diş pulpası kaynaklı MKH özelliklerinin korunmasında çok önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu hücreler, osteoblast, kıkırdak, adiposit, kas, hepatosit ve nöronların da dahil olduğu yüksek farklılaşma potansiyeline sahiptir. Ek olarak, multipotent farklılaşma yeteneğine sahip olan diş pulpası kaynaklı kök hücrelerinin rejeneratif tıp için aday olduğunu düşünmüşler, Oct4 ve Nanog, diş pulpası kaynaklı kök hücrelerdeki MKH'lerin korunmasında ana düzenleyiciler olarak hareket edebildiğini göstermişlerdir[217]. Dev ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada, plasental membran hücrelerinde Oct-4, Sox-2 ve Nanog un ifade olduklarını göstermişlerdir[218]. Han ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada da Oct-4 ve Sox-2'nin insan adipoz doku kaynaklı MKH'lerde kontrole göre gen ifadesinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada RT-PCR ve Western blot yöntemlerini kullanmışlardır[219]. Biz çalışmamızda, plasental kaynaklı MKH'lerde Sox-2 gen ekspresyonunu, Sp1 transfektinde 1,2 kat, Sp12 transfektinde 1,1 kat baskılandığını, Oct-4 gen ekspresyonunu Sp1 transfektinde 3 kat, Sp12 transfektinde 1,6 kat baskılandığını, Nanog gen ekspresyonunun ise Sp1 transfektinde 1,4 kat, Sp12 transfektinde ise 1,9 kat baskılandığını gözlemledik. Sinoviyal kaynaklı MKH'lerde Sox-2 gen ekspresyonunu, Sp1 transfektinde 2,3 kat, Sp12 transfektinde 1,5 kat baskılandığını, Oct-4 gen ekspresyonunu Sp1 transfektinde 2,8 kat, Sp12 transfektinde 0,4 kat baskılandığını, Nanog gen ekspresyonunun ise Sp1 transfektinde 2,1 kat, Sp12 transfektinde ise 100 kat baskılandığını tespit ettik. Diş pulpası kaynaklı MKH'lerde Sox-2 gen ekspresyonunu, Sp1 transfektinde 5,7 kat indüklendiğini, Sp12 transfektinde 2,4 kat baskılandığını, Oct-4 gen ekspresyonunu Sp1 transfektinde 115,3 kat indüklendiğini, Sp12 transfektinde eksprese olmadığını, Nanog gen ekspresyonunun ise Sp1 transfektinde 116,3 kat

indüklendiğini, Sp12 transfektinde ise 1,3 kat baskılandığını gözlemledik. Sonuçlarımız plasental ve sinoviyal kaynaklı MKH'lerde Sp1 ve Sp12 transfektlerinin stemness genlerinin baskılandığını ve dolayısıyla kök hücrelerin dönüşüm kapasitelerini azaldığını göstermiştir. Diş pulpası kaynaklı MKH'lerde ise, Sp1 transfektinin indüklenmiş olması S proteinin Wuhan varyantının (Sp1) savunma amaçlı bir mekanızma geliştirmiş olabileceğini akla getirmektedir. Omicron varyantında (Sp12) ise, tüm stemness genlerinde baskılanma gözlenmiş olması dönüşüm potansiyelinin olumsuz etkilendiğini göstermiştir.

Makrofajlar tümör mikroçevresinde bulunan ve mikroçevresel sinyallere yanıt olarak farklı fenotipik ve fonksiyonel özellikler kazanan immün sistem elemanlarıdır. Makrofajlar M1 veya diğer adıyla proinflamatuar makrofajlar (klasik olarak aktifleştirilmiş), M2 veya diğer adıyla anti-inflamatuar makrofaj (alternatif olarak aktifleştirilmiş) olarak iki fenotipe ayrılır: M1 makrofajları, mikroortama yanıt olarak STAT1 ve NF-jB-p65, M2 makrofajları ise STAT3 ve STAT6 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Aktivasyon, makrofajlar tarafından salgılanan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin profilini etkiler[220]. Tümör hücreleri tarafından büyüme faktörleri ve sitokinler gibi çözünür moleküllerin salgılanması ve ayrıca tümör hücreleri ile bağışıklık sistemi arasındaki doğrudan temas mekanizmaları sayesinde hücreler, anti-tümör fonksiyonlarına karşı immün hücrelerini baskılayabilir ya da komple ortadan kaldırabilir.[221,222] M2 makrofajları, VEGF, EGF ve FGF gibi tümör çevresinde kanser hücrelerine beslenme avantajı sağlayan çeşitli büyüme faktörlerini salgılarlar[223-225]. Kanser hücreleri, büyümelerini ve farklılaşmalarını promote edebilen ve tümör için optimal ortamı yaratabilecek immün cevabı modüle eden çeşitli çözünür moleküller salgılar. Tümör hücreleri tarafından sağlanan ve M2 makrofajlara farklılaşmayı destekleyen sitokinler ve büyüme faktörleri arasında IL-10, CCL kemokinler, VEGF ve PDGF yer alır[225-228]. Tümör mikro ortamına cevap olarak makrofajlardan, büyümeyi, hücre invazyonunu, neovaskülarizasyonu ve metastazı promote eden immünsüpresif özellikte yeni bir fenotip elde edilebilir. TGF-β1, T efektör hücrelerini baskılayabilen regülatör T hücrelerini indükleyerek doğal ve kazanılmış immüniteyi düzenleyebilir[220]. PDGF tümör mikro ortamı içindeki damarın olgunlaşmasında rol oynadığı için anjiyojenik sürecin önemli bir bileşenidir[229]. Biz de Eliza sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde, TGF-β1 protein miktarının boş vektöre kıyasla A549 hücre hattı

için Sp12 transfektinde , FADU hücre hattı için Sp1 transfektinde ve HCT116 hücre hattı için Sp1 ve Sp12 transfektlerinde artığını tespit ettik. IGF-1 protein miktarının boş vektöre kıyasla FADU hücre hattı için her iki varyantta ve HCT116 hücre hattında ise sadece Sp1 transfektinde arttığını saptadık. PDGF protein miktarının boş vektöre kıyasla FADU ve HCT116 hücre hatlları için Sp1 ve Sp12 transfektlerinde artığını tespit ettik. FGF2 protein miktarının boş vektöre kıyasla A549 ve FADU hücre hatlarında Sp12 transfektlerinde arttığını belirledik. VEGF protein miktarının boş vektöre kıyasla FADU hücre hattı için sadece Sp12 transfekinde, HCT116 hücre hattında ise hem Sp1 hem de Sp12 transfektlerinde arttığını tespit ettik. Bu sonuçlar çeşitli kanserlerde varyant tipine göre büyüme faktörlerinin miktarlarının değişkenlik gösterdiğini ve artan protein miktarları anjiyogenezin indüklenme potansiyelini desteklemedir. Ayrıca bulgularımız, kanser çeşidine göre Wuhan ya da Omicron varyant tiplerinin daha agresif fenıotip oluşturma yatkınlığını da göstermektedir.

Literatürde IGF-1, TGF-β1, PDGF, VEGF ve FGF2 proteinlerinin farklı kaynaklı MKH'lerde birlikte değerlendirildiği bir çalışmaya rastlamadık. Eliza sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde TGF-β1 protein miktarının plasental MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte de azaldığını belirledik. Diş pulpası kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte de artığını tespit ettik. Sinoviyal kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte artığını gözlemledik. Bu sonuçlar bize TGF-β1 proteininin farklı kaynaklı MHK'lerde varyant tipine göre değişmeyip MKH'nin kaynağına göre artış veya azalış yatkınlığında olduğunu göstermiştir. IGF-1 protein miktarı plasental MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte de azalmıştır. Diş pulpası kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her Sp1 transfektinde artmış, Sp12 transfektinde ise azalmıştır. Sinoviyal kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla Sp1 transfektinde artmış, Sp12 transfektinde ise azalmıştır. PDGF protein miktarı plasental MHK'lerde boş vektöre kıyasla Sp1 transfektinde azalmış, Sp12 transfektinde artmıştır. Diş pulpası kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her Sp1 transfektinde artmış, Sp12 transfektinde ise azalmıştır. Sinoviyal kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfekte artmıştır. FGF2 protein miktarı plasental MHK'lerde boş vektöre kıyasla Sp1 transfektinde azalmış, Sp12 transfektinde artmıştır. Diş pulpası kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte de azalmıştır. Sinoviyal kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte

artmıştır. VEGF protein miktarı plasental MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte azalmıştır. Diş pulpası kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte artmıştır. Sinoviyal kaynaklı MHK'lerde boş vektöre kıyasla her iki transfektte azalmıştır. VEGF proteini de TGF-β1 proteininde olduğu gibi farklı kaynaklı MHK'lerde varyant tipine göre değişmeyip MKH'nin kaynağına göre protein miktarlarında artış veya azalış yatkınlığında olduğu gözlemlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

SARS-CoV-2 virüsüne karşı oluşacak kanser hücre yanıtları ve kök hücre ilişkili olan genler ve proteinlerin moleküler düzeyde anlamayı amaçladığımız çalışmamızın sonucunda;

1. STAT1 geninde BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 5,92 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 7,1 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlendiği,
2. STAT1 geninde A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 2,7 kat, Sp12 transfektinde ise 2,1 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlendiği,
3. STAT3 geninde BEAS2b hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 4,08 kat, Sp12 transfektinde ise 3,44 kat gen ifadesinde baskılanma olduğu,
4. STAT3 geninde FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 200 kat baskılanma, Sp12 transfektinde ise 1,16 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlendiği,
5. IRF1 geninde BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 98,3 kat, Sp12 transfektinde ise 3,75 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlendiği,
6. IRF1 geninde HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 1,83 kat indüklenme gözlemlendiği,
7. PRDM1 geninde BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 20 kat, Sp12 transfektinde ise 16,6 kat gen ifadesinde baskılanma olduğu,
8. PRDM1 geninde FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 2,34 kat, Sp12 transfektinde ise 2,53 kat gen ifadesinde indüklenme olduğu,
9. PRDM1 geninde HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 3,6 kat indüklenme olduğu,
10. SP1 geninde A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp12 transfektinde 2,8 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlendiği,
11. SP1 geninde FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp12 transfektinde 1,4 kat gen ifadesinde indüklenme olduğu,

12. SP1 geninde HCT116 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp12 transfektinde yaklaşık 2,7 kat gen ifadesinde baskılanma olduğu,
13. PU5F1 geninde BEAS2B hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde yaklaşık 3,6 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise 9,09 kat gen ifadesinde baskılanma olduğu,
14. POU5F1 geninde A549 hücre hattı için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 11,6 kat gen ifadesinde indüklenme olduğu,
15. POU5F1 geninde FADU hücre hattı için kontrole kıyasla Sp12 transfektinde 2 kat gen ifadesinde indüklenme olduğu,
16. OCT-4 geninde plasentel mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 3 kat baskılanma gözlemlendiği,
17. OCT-4 geninde diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 115 kat indüklenme, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 500 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlendiği,
18. SOX-2 geninde sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 2,38 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlendiği,
19. SOX-2 geninde diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 50 kat, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 2,43 kat gen ifadesinde baskılanma olduğu,
20. NANOG geninde sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 2,17 kat, Sp12 transfektinde ise yaklaşık 14,2 kat gen ifadesinde baskılanma olduğu,
21. NANOG geninde diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler için kontrole kıyasla Sp1 transfektinde 166,3 kat gen ifadesinde indüklenme olduğu,
22. TGF-β1 protein miktarının boş vektöre kıyasla A549 hücre hattında, Sp1 transfektinde azaldığı, FADU hücre hattında Sp1 transfektinde artığı, Sp12 transfektinde ise azaldığı, HCT116 hücre hattında Sp1 transfektinde azaldığı, plansental mezenkimal kök hücrede Sp1 ve Sp12 transfektlerinde azaldığı, diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp1 transfektinde artığı, sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp1 ve Sp12 transfektlerinde artığı,
23. IGF-1 protein miktarının boş vektöre kıyasla FADU hücre hattında Sp1 transfektinde artığı, plansental mezenkimal kök hücrede Sp1 ve Sp12

transfektlerinde azaldığı, sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp1 transfekinde artığı,

24. PDGF protein miktarının boş vektöre kıyasla A549 hücre hattında Sp1 ve Sp12 transfektlerinde artığı, HCT116 hücre hattında Sp1 ve Sp12 transfektlerinde artığı, plansental mezenkimal kök hücrede Sp1 transfektinde artığı, diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp1 transfektinde artığı, sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp1 transfektinde artığı,
25. FGF2 protein miktarının boş vektöre kıyasla A549 hücre hattında, Sp1 transfektinde azaldığı, FADU hücre hattında Sp1 transfektinde azaldığı, HCT116 hücre hattında Sp1 transfektinde artığı, plansental mezenkimal kök hücrede Sp1 transfektinde azaldığı, diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp1 transfektinde azaldığı, sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp1 ve Sp12 transfektlerinde artığı,
26. VEGF protein miktarının boş vektöre kıyasla A549 hücre hattında Sp1 transfektinde azaldığı, FADU hücre hattında Sp1 transfektinde azaldığı, Sp12 transfektinde ise artığı, HCT116 hücre hattında Sp1 ve Sp12 transfektlerinde artığı, plansental mezenkimal kök hücrede Sp12 transfektinde azaldığı, diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp12 transfektinde artığı, sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrede Sp1 ve Sp12 transfektlerinde azaldığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda özellikle kanser hücrelerinde orijinal Wuhan S proteini transfekti ile Omicron varyantı S protein transfektlerinin etkinliklerine bakılmış olup, sonuçlarımız kanserli hastaların COVID-19 ile enfekte olması durumunda akciğer, farinks ve kolon kanserlerinin moleküler mekanizmasına ışık tuttuğu gibi COVID-19 sonrası kanser hastalarının ilaç seçimine katkı sağlayacaktır. Araştırmamızda sağlıklı, kanser ve kök hücreler kullanılmış olup, aynı zamanda hücre kültürlerindeki süpernatant sıvılar alınarak hücrelerin tranfeksiyon sonrası kültür ortamına saldıkları bileşenler protein düzeyinde değerlendirilmiştir. Aldığımız veriler transfeksiyon sonrası kök hücrelerin salgılarını ve kanserde tümör mikroçevresinin davranışını değerlendirmemizi sağlamaktadır. Ayrıca çalışmamızda plasental, diş pulpası ve sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrelere Wuhan S protein transfekti ve Omicron varyantı S protein

transfekti uygulaması sonrası stemness belirteçleri araştırılmış olup, COVID-19 sonrası kök hücre özelliklerinin etkinlikleri değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız tedavide kullanım potansiyeli olan kök hücrelerin COVID-19 enfeksiyonu ile karşılaştıktan sonra klinikte uygulanabilirlikleri için çok değerlidir. Gelecekte çeşitli genler ve proteinlerin eklenerek araştırıldığı kapsamlı çalışmalar sayesinde, kanserde ilaç seçilimi sağlanabileceği gibi, COVID-19 sonrası dönemde kök hücrelerin klinikteki kullanım potansiyelleri belirlenebilecektir.

KAYNAKLAR

1. **Couto PS, Al-Arawe N, Filgueiras IS, Fonseca DLM, Hinterseher I, Catar RA, et al.** Systematic review and meta-analysis of cell therapy for COVID-19: global clinical trial landscape, published safety/efficacy outcomes, cell product manufacturing and clinical delivery. *Front Immunol,* **2023;** 14:1200180.

2. World Health Organization (WHO). Weekly epidemiological update on COVID-19- 1-September 2023. Available on: https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---1-september-2023 (Erişim tarihi: 13.09.2023)

3. **Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L.** Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol,* **2021;** 19:141-154.

4. **Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al.** A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature,* **2020;** 579:270-273.

5. **Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al.** SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell,* **2020;** 181:271-280.e8.

6. **V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V.** Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol,* **2021;** 19:155-170.

7. **Griffin DO, Brennan-Rieder D, Ngo B, Kory P, Confalonieri M, Shapiro L, et al.** The importance of understanding the stages of COVID-19 in treatment and trials. *AIDS Rev,* **2021;** 23:40-47.

8. **Sahu AK, Mathew R, Bhat R, Malhotra C, Nayer J, Aggarwal P, et al.** Steroids use in non-oxygen requiring COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *QJM,* **2021;** 114:455-463.

9. **Ghosh AK, Brindisi M, Shahabi D, Chapman ME, Mesecar AD.** Drug Development and Medicinal Chemistry Efforts toward SARS-Coronavirus and Covid-19 Therapeutics. *ChemMedChem,* **2020;** 15(11):907-932.

10. **Almaghaslah D, Kandasamy G, Almanasef M, Vasudevan R, Chandramohan S.** Review on the coronavirus disease (COVID-19) pandemic: Its outbreak and current status. *Int J Clin Pract,* **2020;** 74(11):e13637.

11. **Muratov EN, Amaro R, Andrade CH, Brown N, Ekins S, Fourches D , et al.** A critical overview of computational approaches employed for COVID-19 drug discovery. *Chem Soc Rev,* **2021;** 50(16):9121-9151.

12. **Asai A, Konno M, Ozaki M, Otsuka C, Vecchione A, Arai T, et al.** COVID-19 Drug Discovery Using Intensive Approaches. *Int J Mol Sci,* **2020;** 21(8):2839.

13. **Ng TI, Correia I, Seagal J, DeGoey DA, Schrimpf MR, Hardee DJ, et al.** Antiviral Drug Discovery for the Treatment of COVID-19 Infections. *Viruses,* **2022;** 14(5):961.

14. **Tyrrell DA, Bynoe MI.** Cultıvatıon of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *Br Med J,* **1965;** 1(5448):1467-1470.

15. **Hamre D, Procknow JJ.** A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med,* **1966;** 121(1):190-193.

16. **Almeida JD, Tyrrell DA.** The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol,* **1967;** 1(2):175-178.

17. **McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM.** Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **1967;** 57(4):933-940.

18. **Fung TS, Liu DX.** Human coronavirus: host-pathogen interaction. *Ann Rev Microbiol,* **2019;** 73:529-557.

19. **Cui J, Li F, Shi ZL.** Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol,* **2019;** 17(3):181-192.

20. **Yu P, Hu B, Shi ZL, Cui J.** Geographical structure of bat SARS-related coronaviruses. *Infect Genet Evol,* **2019;** 69:224-229.

21. **Bulut C, Kato Y.** Epidemiology of COVID-19. *Turk J Med Sci,* **2020;** 50(SI-1):563-570.

22. **Gürer Giray B, Kılıç S.** SARS-CoV-2 virüsünün genetiği. Canatan D, Alkan ŞŞ, editörler. Güncel COVID-19 Bilgileri. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; **2021.** p.1-10.

23. **Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al.** A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature,* **2020;** 579(7798):265–269.

24. **Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, et al.** Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **2005;** 102(7):2430-2435.

25. **Hu D, Zhu C, Ai L, He T, Wang Y, Ye F, et al.** Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg Microbes Infect,* **2018;** 7(1):154.

26. **Lam TT, Jia N, Zhang YW, Shum MH, Jiang JF, Zhu HC, et al.** Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature,* **2020;** 583(7815):282-285.

27. **Menachery VD, Yount BL Jr, Debbink K, Agnihothram S, Gralinski LE, Plante JA, et al.** A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med,* **2015;** 21(12):1508-1513.

28. **Paraskevis D, Kostaki EG, Magiorkinis G, Panayiotakopoulos G, Sourvinos G, Tsiodras S.** Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infect Genet Evol,* **2020;** 79:104212.

29. **Luk HKH, Li X, Fung J, Lau SKP, Woo PCY.** Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect Genet Evol,* **2019;** 71:21-30.

30. **de Haan CAM, Kuo L, Masters PS, Vennema H, Rottier PJM.** Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein. *J Virol,* **1998;** 72(8):6838-6850.

31. **Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K-Y.** Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. Viruses, **2010;** 2(8):1804-1820.

32. **Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, et al.** Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect,* **2020;** 9(1):221-236.

33. **Van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, et al.** Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBioi,* **2012;** 3(6):e00473-12.

34. **Czub M, Weingartl H, Czub S, He R, Cao J.** Evaluation of modified vaccinia virus Ankara based recombinant SARS vaccine in ferrets. *Vaccine,* **2005;** 23(17-18):2273-2279.

35. **Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al.** Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet,* **2020;** 395(10224):565-574.

36. **Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al.** Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science,* **2020;** 367(6483):1260-1263.

37. **Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D.** Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell,* **2020;** 181(2):281-292 e286.

38. **Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC.** Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science,* **2005;** 309(5742):1864-1868.

39. **Sun C, Chen L, Yang J, Luo C, Zhang Y, Li J, et al.** SARS-CoV-2 and SARS-CoV spike-RBD structure and receptor binding comparison and potential implications on neutralizing antibody and vaccine development. *bioRvix,* **2020.**

40. **Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al.** Clinical characteristics of Coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med,* **2020;** 382:1708-1720.

41. **Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al.** Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med,* **2020;** 8(4):420-422.

42. **Xu X, Wu X, Jiang X, Xu K, Ying L, Ma C, et al.** Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. *BMJ,* **2020;** 368:m606.

43. **Shi Y, Wang G, Cai XP, Deng JW, Zheng L, Zhu HH, et al.** An overview of COVID-19. *J Zhejiang Univ Sci B,* **2020;** 21(5):343-360.

44. **Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al.** Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science,* **2020;** 368(6494):1016-1020.

45. **Chandrashekar A, Liu J, Martinot AJ, McMahan K, Mercado NB, Peter L, et al.** SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science,* **2020;** 369(6505):812-817.

46. **Zhao X, Chen D, Szabla R, Zheng M, Li G, Du P, et al.** Broad and differential animal angiotensin-converting enzyme 2 receptor usage by SARS-CoV-2. *J Virol,* **2020;** 94(18):e00940-20.

47. **Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al.** Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature,* **2020;** 581(7807):221-224.

48. **Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F.** Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol,* **2020;** 94(7):e00127-20.

49. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol,* **2020;** 5(4):562-569.

50. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun,* **2020;** 11(1):1620.

51. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **2020;** 117(21):11727-11734.

52. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med,* **2020;** 26(5):681-687.

53. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J,* **2020;** 39(10):e105114.

54. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet,* **2020;** 395(10223):497-506.

55. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet,* **2020;** 395(10229):1033-1034.

56. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med,* **2020;** 180(7):934-943.

57. Liu Y, Mao B, Liang S, Yang JW, Lu HW, Chai YH. Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. *Eur Respir J,* **2020;** 55(5):2001112.

58. Tian J, Yuan X, Xiao J, Zhong Q, Yang C, Liu B, et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol,* **2020;** 21(7):893-903.

59. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA,* **chen** 323(13):1239-1242.

60. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, 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.

61. Yao XH, Li TY, He ZC, Ping YF, Liu HW, Yu SC, et al. A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi,* **2020;** 49(5):411-417.

62. Martines RB, Ritter JM, Matkovic E, Gary J, Bollweg BC, Bullock H, et al. Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease, United States. *Emerg Infect Dis,* **2020;** 26(9):2005-2015.

63. Zeng Z, Xu L, Xie XY, Yan HL, Xie BJ, Xu WZ, et al. Pulmonary pathology of early-phase COVID-19 pneumonia in a patient with a benign lung lesion. *Histopathology,* **2020;** 77(5):823-831.

64. Stringhini S, Wisniak A, Piumatti G, Azman AS, Lauer SA, Baysson H, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *Lancet,* **2020;** 396(10247):313-319.

65. Centers for Disease Control and Prevention. Commercial Laboratory Seroprevalence Survey Data. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/commercial-lab-surveys.html (Accessed date: 13.09.2023).

66. Havers FP, Reed C, Lim T, Montgomery JM, Klena JD, Hall AJ, et al. Seroprevalence of Antibodies to SARS-CoV-2 in 10 Sites in the United States, March 23-May 12, 2020. *JAMA Intern Med,* **2020.**

67. COVID-19 Cumulative Infection Collaborators. Estimating global, regional, and national daily and cumulative infections with SARS-CoV-2 through Nov 14, 2021: a statistical analysis. *Lancet,* **2022;** 399(10344):2351-2380.

68. Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med,* **2021;** 174(1):69-79.

69. Morawska L, Milton DK. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis,* **2020;** 71(9):2311-2313.

70. World Health Organization. Transmission of SARS-CoV-2: Implications for infection prevention prec autions. https://www.who.int/publications/i/item/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations (Accessed date:13.09.2023).

71. Klompas M, Baker MA, Rhee C. Airborne Transmission of SARS-CoV-2: Theoretical Considerations and Available Evidence. *JAMA,* **2020;** 324(5):441-442.

72. Chagla Z, Hota S, Khan S, Mertz D. International Hospital and Community Epidemiology Group. Re: It Is Time to Address Airborne Transmission of COVID-19. *Clin Infect Dis,* **2021;** 73(11):e3981-e3982.

73. Duval D, Palmer JC, Tudge I, Pearce-Smith N, O'Connell E, Bennett A, et al. Long distance airborne transmission of SARS-CoV-2: rapid systematic review. *BMJ,* **2022;** 377:e068743.

74. Lu J, Gu J, Li K, Xu C, Su W, Lai Z, et al. COVID-19 Outbreak Associated with Air Conditioning in Restaurant, Guangzhou, China, 2020. *Emerg Infect Dis,* **2020;** 26(7):1628-1631.

75. Hamner L, Dubbel P, Capron I, Ross A, Jordan A, Lee J, et al. High SARS-CoV-2 Attack Rate Following Exposure at a Choir Practice-Skagit County, Washington, March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep,* **2020;** 69(19):606-610.

76. Shen Y, Li C, Dong H, Wang Z, Martinez L, Sun Z, et al. Community Outbreak Investigation of SARS-CoV-2 Transmission Among Bus Riders in Eastern China. *JAMA Intern Med,* **2020;** 180(12):1665-1671.

77. Bahl P, Doolan C, de Silva C, Chughtai AA, Bourouiba L, et al. Airborne or Droplet Precautions for Health Workers Treating Coronavirus Disease 2019? *J Infect Dis,* **2022;** 225(9):1561-1568.

78. Bourouiba L. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions: Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. *JAMA,* **2020;** 323(18):1837-1838.

79. Stadnytskyi V, Bax CE, Bax A, Anfinrud P. The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **2020;** 117(22):11875-11877.

80. Ong SWX, Tan YK, Chia PY, Lee TH, Ng OT, Wong MSY, et al. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA,* **2020;** 323(16):1610-1612.

81. **Guo ZD, Wang ZY, Zhang SF, Li X, Li L, Li C, et al.** Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis,* **2020;** 26(7):1583-1591.

82. **Liu Y, Ning Z, Chen Y, Guo M, Liu Y, Gali NK, et al.** Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature,* **2020;** 582(7813):557-560.

83. **Zhou J, Otter JA, Price JR, Cimpeanu C, Meno Garcia D, Kinross J, et al.** Investigating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Surface and Air Contamination in an Acute Healthcare Setting During the Peak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in London. *Clin Infect Dis,* **2021;** 73(7):e1870-e1877.

84. **Santarpia JL, Rivera DN, Herrera VL, Morwitzer MJ, Creager HM, Santarpia GW, et al.** Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. *Sci Rep,* **2020;** 10(1):12732.

85. **Lednicky JA, Lauzard M, Fan ZH, Jutla A, Tilly TB, Gangwar M, et al.** Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *Int J Infect Dis,* **2020;** 100:476-482.

86. **Ben-Shmuel A, Brosh-Nissimov T, Glinert I, Bar-David E, Sittner A, Poni R, et al.** Detection and infectivity potential of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) environmental contamination in isolation units and quarantine facilities. *Clin Microbiol Infect,* **2020;** 26(12):1658-1662.

87. **Birgand G, Peiffer-Smadja N, Fournier S, Kerneis S, Lescure FX, Lucet JC.** Assessment of Air Contamination by SARS-CoV-2 in Hospital Settings. *JAMA Netw Open,* **2020;** 3(12):e2033232.

88. **Chen W, Lan Y, Yuan X, Deng X, Li Y, Cai X, et al.** Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity. *Emerg Microbes Infect,* **2020;** 9(1):469-473.

89. **Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al.** Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA,* **2020;** 323(18):1843-1844.

90. **Colavita F, Lapa D, Carletti F, Lalle E, Bordi L, Marsella P, et al.** SARS-CoV-2 Isolation From Ocular Secretions of a Patient With COVID-19 in Italy With Prolonged Viral RNA Detection. *Ann Intern Med,* **2020;** 173(3):242-243.

91. **Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, et al.** Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology, **2020;** 159(1):81-95.

92. **Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al.** Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ,* **2020;** 369:m1443.

93. **Li D, Jin M, Bao P, Zhao W, Zhang S.** Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw Open,* **2020;** 3(5):e208292.

94. **Pham TD, Huang C, Wirz OF, Röltgen K, Sahoo MK, Layon A, et al.** SARS-CoV-2 RNAemia in a Healthy Blood Donor 40 Days After Respiratory Illness Resolution. *Ann Intern Med,* **2020;** 173(10):853-854.

95. **Azzolini C, Donati S, Premi E, Baj A, Siracusa C, Genoni A, et al.** SARS-CoV-2 on Ocular Surfaces in a Cohort of Patients With COVID-19 From the Lombardy Region, Italy. *JAMA Ophthalmol,* **2021;** 139(9):956-963.

96. Xiao F, Sun J, Xu Y, Li F, Huang X, Li H, et al. Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19. *Emerg Infect Dis,* **2020;** 26(8):1920-1922.

97. Kang M, Wei J, Yuan J, Guo J, Zhang Y, Hang J, et al. Probable Evidence of Fecal Aerosol Transmission of SARS-CoV-2 in a High-Rise Building. *Ann Intern Med,* **2020;** 173(12):974-980.

98. Yuan J, Chen Z, Gong C, Liu H, Li B, Li K, et al. Sewage as a Possible Transmission Vehicle During a Coronavirus Disease 2019 Outbreak in a Densely Populated Community: Guangzhou, China, April 2020. *Clin Infect Dis,* **2021;** 73(7):e1487-e1488.

99. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-2019). February 16-2 4, 2020. http://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-m ission-on-covid-19-final-report.pdf (Accessed date: 13.09.2023).

100. Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis,* **2020;** 71(15):793-798.

101. Xu D, Zhou F, Sun W, Chen L, Lan L, Li H, et al. Relationship Between Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Nucleic Acid and Organ Damage in Coronavirus 2019 Patients: A Cohort Study. *Clin Infect Dis,* **2021;** 73(1):68-75.

102. AABB. AABB's Coronavirus Resources. http://www.aabb.org/advocacy/regulatorygovernment/Page s/AABB-Coronavirus-Resources.aspx (Accessed date:13.09.2023).

103. Kim JM, Kim HM, Lee EJ, Jo HJ, Yoon Y, Lee NJ, et al. Detection and Isolation of SARS-CoV-2 in Serum, Urine, and Stool Specimens of COVID-19 Patients from the Republic of Korea. *Osong Public Health Res Perspect,* **2020;** 11(3):112-117.

104. Lu Q, Shi Y. Coronavirus disease (COVID-19) and neonate: What neonatologist need to know. *J Med Virol,* **2020;** 92(6):564-567.

105. Han Q, Lin Q, Jin S, You L. Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *J Infect,* **2020;** 80(4):373-377.

106. Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, et al. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology,* **2020;** 296(2):E32-E40.

107. Hao W, Li M. Clinical diagnostic value of CT imaging in COVID-19 with multiple negative RT-PCR testing. *Travel Med Infect Dis,* **2020;** 34:101627.

108. Long C, Xu H, Shen Q, Zhang X, Fan B, Wang C, et al. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *Eur J Radiol,* **2020;** 126:108961.

109. Bernheim A, Mei X, Huang M, Yang Y, Fayad ZA, Zhang N, et al. Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. *Radiology,* **2020;** 295(3):200463.

110. Fang Y, Zhang H, Xie J, Lin M, Ying L, Pang P, et al. Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology,* **2020;** 296(2):E115-E117.

111. Caliendo AM, Hodinka RL. A CRISPR Way to Diagnose Infectious Diseases. *N Engl J Med,* **2017;** 377(17):1685-1687.

112. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol,* **2020;** 38(7):870-874.

113. Li C, Ren L. Recent progress on the diagnosis of 2019 Novel Coronavirus. *Transbound Emerg Dis,* **2020;** 67(4):1485-1491.

114. Li Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J Med Virol,* 2020; 92(7):903-908.

115. Abduljalil JM. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. *New Microbes New Infect,* **2020;** 36:100713.

116. Ji T, Liu Z, Wang G, Guo X, Akbar Khan S, Lai C, Chen H, et al. Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. *Biosens Bioelectron,* 2020; 166:112455.

117. Xie C, Jiang L, Huang G, Pu H, Gong B, Lin H, et al. Comparison of different samples for 2019 novel coronavirus detection by nucleic acid amplification tests. *Int J Infect Dis,* **2020;** 9:264-267.

118. Zhu H, Fohlerová Z, Pekárek J, Basova E, Neužil P. Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis. *Biosens Bioelectron,* **2020;** 153:112041.

119. Habibzadeh P, Sajadi MM, Emami A, Karimi MH, Yadollahie M, Kucheki M, et al. Rate of re-positive RT-PCR test among patients recovered from COVID-19. *Biochem Med (Zagreb),* **2020;** 30(3):030401.

120. Lan L, Xu D, Ye G, Xia C, Wang S, Li Y, et al. Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19. *JAMA,* **2020;** 323(15):1502-1503.

121. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann Intern Med,* **2020;** 173(4):262-267.

122. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol,* **2020;** 58(6):e00512-20.

123. Rawson TM, Moore LSP, Zhu N, Ranganathan N, Skolimowska K, Gilchrist M, et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clin Infect Dis,* **2020;** 71(9):2459-2468.

124. Venditto VJ, Haydar D, Abdel-Latif A, Gensel JC, Anstead MI, Pitts MG, et al. Immunomodulatory Effects of Azithromycin Revisited: Potential Applications to COVID-19. *Front Immunol,* **2021;** 12:574425.

125. Yao X, Ye F, Zhang M, Cui C, Huang B, Niu P, et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis,* 2020; 71(15):732-739.

126. Andreani J, Le Bideau M, Duflot I, Jardot P, Rolland C, Boxberger M, et al. In vitro testing of combined hydroxychloroquine and azithromycin on SARS-CoV-2 shows synergistic effect. *Microb Pathog, 2020;* 145:104228.

127. Cavalcanti AB, Zampieri FG, Rosa RG, Azevedo LCP, Veiga VC, Avezum A, et al. Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate Covid-19. *N Engl J Med,* **2020;** 383(21):2041-2052.

128. Frontera JA, Rahimian JO, Yaghi S, Liu M, Lewis A, de Havenon A, et al. Treatment with Zinc is Associated with Reduced In-Hospital Mortality Among COVID-19 Patients: A Multi-Center Cohort Study. *Res Sq,* **2020;** n.pag.

129. Ni YN, Luo J, Yu H, Liu D, Liang BM, Liang ZA. The effect of high-flow nasal cannula in reducing the mortality and the rate of endotracheal intubation when used before mechanical ventilation compared with conventional oxygen therapy and noninvasive positive pressure ventilation. A systematic review and meta-analysis. *Am J Emerg Med,* **2018;** 36(2):226-233.

130. Toussi SS, Hammond JL, Gerstenberger BS, Anderson AS. Therapeutics for COVID-19. *Nat Microbiol,* **2023;** 8(5):771-786.

131. Li YS, Ren HC, Cao JH. Correlation of SARS-CoV-2 to cancer: Carcinogenic or anticancer? (Review). *Int J Oncol,* **2022;**60(4):42.

132. Elfiky AA. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study. *Life Sci,* **2020;** 253:117592.

133. Icard P, Lincet H, Wu Z, Coquerel A, Forgez P, Alifano M, et al. The key role of Warburg effect in SARS-CoV-2 replication and associated inflammatory response. *Biochimie,* **2021;** 180:169-177.

134. Codo AC, Davanzo GG, Monteiro LB, de Souza GF, Muraro SP, Virgilio-da-Silva JV, et al. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1α/Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metab,* **2020;** 32(3):437-446.

135. Raymond E, Thieblemont C, Alran S, Faivre S. Impact of the COVID-19 Outbreak on the Management of Patients with Cancer. *Target Oncol,* **2020;** 15(3):249-259.

136. Robilotti EV, Babady NE, Mead PA, Rolling T, Perez-Johnston R, Bernardes M, et al. Determinants of COVID-19 disease severity in patients with cancer. *Nat Med,* **2020;** 26(8):1218-1223.

137. Lewis WD, Lilly S, Jones KL. Lymphoma: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician. **2020;** 101(1):34-41.

138. Dai M, Liu D, Liu M, Zhou F, Li G, Chen Z, et al. Patients with Cancer Appear More Vulnerable to SARS-CoV-2: A Multicenter Study during the COVID-19 Outbreak. *Cancer Discov,* **2020;** 10(6):783-791.

139. Li D, Liu C, Liu J, Hu J, Yang Y, Zhou Y. Analysis of Risk Factors for 24 Patients With COVID-19 Developing From Moderate to Severe Condition. Front Cell Infect Microbiol. **2020;** 10:548582.

140. Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol,* **2020;** 146(1):110-118.

141. Turnquist C, Ryan BM, Horikawa I, Harris BT, Harris CC. Cytokine Storms in Cancer and COVID-19. *Cancer Cell,* **2020;** 38(5):598-601.

142. Gosain R, Abdou Y, Singh A, Rana N, Puzanov I, Ernstoff MS. COVID-19 and Cancer: a Comprehensive Review. *Curr Oncol Rep,* **2020;** 22(5):53.

143. Tian Y, Qiu X, Wang C, Zhao J, Jiang X, Niu W, et al. Cancer associates with risk and severe events of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer,* **2021;** 148(2):363-374.

144. Yang K, Sheng Y, Huang C, Jin Y, Xiong N, Jiang K, et al. Clinical characteristics, outcomes, and risk factors for mortality in patients with cancer and COVID-19 in Hubei, China: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol,* **2020;** 21(7):904-913.

145. Selda Uçar. A549 Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattında Daha Önce Etkinliği Tanımlanmamış Türkiye Endemiği Olan 3 Bitkinin Antitümöral Aktiviteleri Açısından Değerlendirilmesi. Yükek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya, **2015.**

146. https://www.atcc.org/products/crm-ccl-185 (Erişim tarihi: 13.11.2023)

147. Chang CW, Parsi KM, Somasundaran M, Vanderleeden E, Liu P, Cruz J, et al. A Newly Engineered A549 Cell Line Expressing ACE2 and TMPRSS2 Is Highly Permissive to SARS-CoV-2, Including the Delta and Omicron Variants. *Viruses,* **2022;** 14(7):1369.

148. https://www.atcc.org/products/ccl-247 (Erişim tarihi: 13.11.2023)

149. https://www.atcc.org/products/htb-43 (Erişim tarihi: 13.11.2023)

150. https://www.atcc.org/products/crl-3588 (Erişim tarihi: 13.11.2023)

151. Wang E, Lenferink A, O'Connor-McCourt M. Cancer systems biology: exploring cancer-associated genes on cellular networks. *Cell Mol Life Sci,* **2007;** 64(14):1752-1762.

152. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6772 (Erişim tarihi: 13.11.2023)

153. Tolomeo M, Cavalli A, Cascio A. STAT1 and Its Crucial Role in the Control of Viral Infections. Int *J Mol Sci,* **2022;** 23(8):4095.

154. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6774 (Erişim tarihi: 14.11.2023)

155. Jafarzadeh A, Nemati M, Jafarzadeh S. Contribution of STAT3 to the pathogenesis of COVID-19. *Microb Pathog,* **2021;** 154:104836.

156. Chen FF, Jiang G, Xu K, Zheng JN. Function and mechanism by which interferon regulatory factor-1 inhibits oncogenesis. *Oncol Lett,* **2013;** 5(2):417-423.

157. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3659 (Erişim tarihi: 14.11.2023)

158. Shen L, Chen Q, Yang C, Wu Y, Yuan H, Chen S, et al. Role of PRDM1 in Tumor Immunity and Drug Response: A Pan-Cancer Analysis. *Front Pharmacol,* **2020;** 11:593195.

159. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/639#gene-expression (Erişim tarihi: 14.11.2023)

160. Beishline K, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer. *FEBS J,* **2015;** 282(2):224-258.

161. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6667 (Erişim tarihi: 14.11.2023)

162. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18999 (Erişim tarihi: 14.11.2023)

163. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet,* **2000;** 24(4):372-376.

164. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol,* **2002;** 20(21):4368-4380.

165. Waltenberger J. Modulation of growth factor action: implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation,* **1997;** 96(11):4083-4094.

166. Raica M, Cimpean AM. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel),* **2010;** 3(3):572-599.

167. Soulitzis N, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol,* **2006;** 29(2):305-314.

168. Hannink M, Donoghue DJ. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochim Biophys Acta,* **1989;** 989(1):1-10.

169. Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J,* **1992;** 11(12):4251-4259.

170. Lin S, Zhang Q, Shao X, Zhang T, Xue C, Shi S, et al. IGF-1 promotes angiogenesis in endothelial cells/adipose-derived stem cells co-culture system with activation of PI3K/Akt signal pathway. *Cell Prolif,* **2017;** 50(6):e12390.

171. Poliwoda S, Noor N, Downs E, Schaaf A, Cantwell A, Ganti L, et al. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop Rev (Pavia),* **2022;** 14(3):37498.

172. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther,* **2019;** 10(1):68.

173. Ghazimoradi MH, Khalafizadeh A, Babashah S. A critical review on induced totipotent stem cells: Types and methods. *Stem Cell Res,* **2022;** 63:102857.

174. Romito A, Cobellis G. Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. *Stem Cells Int,* **2016;** 2016:9451492.

175. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadiani S, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran,* **2017;** 55(1):6-23.

176. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant,* **2011;** 20(1):5-14.

177. Timmins NE, Kiel M, Günther M, Heazlewood C, Doran MR, Brooke G, et al. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng,* **2012;** 109(7):1817-1826.

178. Lopes-Pacheco M, Robba C, Rocco PRM, Pelosi P. Current understanding of the therapeutic benefits of mesenchymal stem cells in acute respiratory distress syndrome. *Cell Biol Toxicol,* **2020;** 36(1):83-102.

179. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol,* **2014;** 15(11):1009-1016.

180. Xu R, Feng Z, Wang FS. Mesenchymal stem cell treatment for COVID-19. *EBioMedicine,* **2022;** 77:103920.

181. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int,* 2016;2016:4709572.

182. Fernandes TL, Kimura HA, Pinheiro CCG, Shimomura K, Nakamura N, Ferreira JR, et al. Human Synovial Mesenchymal Stem Cells Good Manufacturing Practices for Articular Cartilage Regeneration. *Tissue Eng Part C Methods,* **2018;** 24(12):709-716.

183. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet,* **2000;** 24(4):372-376.

184. Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells,* **2014;** 6(3):305-311.

185. Barral A, Rollan I, Sanchez-Iranzo H, Jawaid W, Badia-Careaga C, Menchero S, et al. Nanog regulates Pou3f1 expression at the exit from pluripotency during gastrulation. *Biol Open,* **2019;** 8(11):bio046367.

186. Murphy RM, Watt KK, Cameron-Smith D, Gibbons CJ, Snow RJ. Effects of creatine supplementation on housekeeping genes in human skeletal muscle using real-time RT-PCR. *Physiol Genomics,* **2003;** 12(2):163-174.

187. Kang HB, Lee HR, Jee da J, Shin SH, Nah SS, Yoon SY, et al. PRDM1, a Tumor-Suppressor Gene, is Induced by Genkwadaphnin in Human Colon Cancer SW620 Cells. *J Cell Biochem,* **2016;** 117(1):172-179.

188. Antonios D, Rousseau P, Larangé A, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO4. *J Immunol,* **2010;** 185(1):89-98.

189. Han W, Carpenter RL, Cao X, Lo HW. STAT1 gene expression is enhanced by nuclear EGFR and HER2 via cooperation with STAT3. *Mol Carcinog,* **2013;** 52(12):959-969.

190. Wan Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. 5-Azacytidine is insufficient for cardiogenesis in human adipose-derived stem cells. *J Negat Results Biomed,* **2012;** 11:3.

191. Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. Transcription factors sp1 and sp3 regulate expression of human extracellular superoxide dismutase in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol,* **2008;** 39(2):243-251.

192. Glienke W, Hausmann E, Bergmann L. Downregulation of STAT3 signaling induces apoptosis but also promotes anti-apoptotic gene expression in human pancreatic cancer cell lines. *Tumour Biol,* **2011;** 32(3):493-500.

193. García-Rúa V, Otero MF, Lear PV, Rodríguez-Penas D, Feijóo-Bandín S, Noguera-Moreno T, et al. Increased expression of fatty-acid and calcium metabolism genes in failing human heart. *PLoS One,* **2012;** 7(6):e37505.

194. Jain U. Effect of COVID-19 on the Organs. *Cureus,* **2020;**12(8):e9540.

195. Shah MD, Sumeh AS, Sheraz M, Kavitha MS, Venmathi Maran BA, Rodrigues KF. A mini-review on the impact of COVID 19 on vital organs. *Biomed Pharmacother,* **2021;**143:112158.

196. Li J, Yu B, Song L, Eschrich S, Haura EB. Effects of IFN-gamma and Stat1 on gene expression, growth, and survival in non-small cell lung cancer cells. *J Interferon Cytokine Res,* **2007;** 27(3):209-220.

197. Mohrherr J, Haber M, Breitenecker K, Aigner P, Moritsch S, Voronin V, et al. JAK-STAT inhibition impairs K-RAS-driven lung adenocarcinoma progression. *Int J Cancer,* **2019;** 145(12):3376-3388.

198. Tanaka A, Zhou Y, Ogawa M, Shia J, Klimstra DS, Wang JY, et al. STAT1 as a potential prognosis marker for poor outcomes of early stage colorectal cancer with microsatellite instability. *PLoS One,* **2020;** 15(4):e0229252.

199. Nivarthi H, Gordziel C, Themanns M, Kramer N, Eberl M, Rabe B, et al. The ratio of STAT1 to STAT3 expression is a determinant of colorectal cancer growth. *Oncotarget,* 2016; 7(32):51096-51106.

200. Zhang J, Wang F, Liu F, Xu G. Predicting STAT1 as a prognostic marker in patients with solid cancer. *Ther Adv Med Oncol,* **2020;** 12:1758835920917558.

201. Ryan N, Anderson K, Volpedo G, Hamza O, Varikuti S, Satoskar AR, et al. STAT1 inhibits T-cell exhaustion and myeloid derived suppressor cell accumulation to promote antitumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer,* **2020;** 146(6):1717-1729.

202. Chalikonda G, Lee H, Sheik A, Huh YS. Targeting key transcriptional factor STAT3 in colorectal cancer. *Mol Cell Biochem,* **2021;** 476(9):3219-3228.

203. Haura EB, Zheng Z, Song L, Cantor A, Bepler G. Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signaling promotes tumor survival in vivo in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res,* **2005;** 11(23):8288-94.

204. Gao LF, Xu DQ, Wen LJ, Zhang XY, Shao YT, Zhao XJ. Inhibition of STAT3 expression by siRNA suppresses growth and induces apoptosis in laryngeal cancer cells. *Acta Pharmacol Sin,* **2005;** 26(3):377-383.

205. Gottschlich S, Ambrosch P, Cordes C, Görögh T, Schreiber S, Häsler R. Gene expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Int J Oncol,* **2006;** 29(3):605-613.

206. Hong M, Zhang Z, Chen Q, Lu Y, Zhang J, Lin C, et al. IRF1 inhibits the proliferation and metastasis of colorectal cancer by suppressing the RAS-RAC1 pathway. *Cancer Manag Res,* **2018;** 11:369-378.

207. Zhang L, Cheng T, Yang H, Chen J, Wen X, Jiang Z, et al. Interferon regulatory factor-1 regulates cisplatin-induced apoptosis and autophagy in A549 lung cancer cells. *Med Oncol,* **2022;** 39(4):38.

208. Yu Z, Sato S, Trackman PC, Kirsch KH, Sonenshein GE. Blimp1 activation by AP-1 in human lung cancer cells promotes a migratory phenotype and is inhibited by the lysyl oxidase propeptide. *PLoS One,* **2012;** 7(3):e33287.

209. Zhu Z, Wang H, Wei Y, Meng F, Liu Z, Zhang Z. Downregulation of PRDM1 promotes cellular invasion and lung cancer metastasis. *Tumour Biol,* **2017;** 39(4):1010428317695929.

210. Citron F, Armenia J, Franchin G, Polesel J, Talamini R, D'Andrea S, et al. An Integrated Approach Identifies Mediators of Local Recurrence in Head and Neck Squamous Carcinoma. *Clin Cancer Res,* **2017;** 23(14):3769-3780.

211. Hosoi Y, Watanabe T, Nakagawa K, Matsumoto Y, Enomoto A, Morita A, et al. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer. *Int J Oncol,* **2004;** 25(2):461-468.

212. Hsu TI, Wang MC, Chen SY, Yeh YM, Su WC, Chang WC, et al. Sp1 expression regulates lung tumor progression. *Oncogene,* **2012;** 31(35):3973-3988.

213. Miyoshi N, Fujino S, Ohue M, Yasui M, Takahashi Y, Sugimura K,et al. The POU5F1 gene expression in colorectal cancer: a novel prognostic marker. *Surg Today*. **2018** Jul;48(7):709-715.

214. Koo BS, Lee SH, Kim JM, Huang S, Kim SH, Rho YS, et al. Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene,* **2015;** 34(18):2317-2324.

215. Li SJ, Huang J, Zhou XD, Zhang WB, Lai YT, Che GW. Clinicopathological and prognostic significance of Oct-4 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Dis,* **2016;** 8(7):1587-1600.

216. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem,* **2006;** 99(5):1285-1297.

217. Huang CE, Hu FW, Yu CH, Tsai LL, Lee TH, Chou MY, et al. Concurrent expression of Oct4 and Nanog maintains mesenchymal stem-like property of human dental pulp cells. *Int J Mol Sci,* **2014;** 15(10):18623-18639.

218. Dev K, Giri SK, Kumar A, Yadav A, Singh B, Gautam SK. Expression of transcriptional factor genes (Oct-4, Nanog, and Sox-2) and embryonic stem cell-like characters in placental membrane of Buffalo (Bubalus bubalis). *J Membr Biol,* **2012;** 245(4):177-183.

219. Han SM, Han SH, Coh YR, Jang G, Chan Ra J, Kang SK, et al. Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med,* **2014;** 46(6):e101.

220. Sánchez-Reyes K, Pedraza-Brindis EJ, Hernández-Flores G, Bravo-Cuellar A, López-López BA, Rosas-González VC, et al. The supernatant of cervical carcinoma cells lines induces a decrease in phosphorylation of STAT-1 and NF-κB transcription factors associated with changes in profiles of cytokines and growth factors in macrophages derived from U937 cells. *Innate Immun,* **2019;** 25(6):344-355.

221. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegård J, Öberg Å, Oldenborg PA, et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One,* **2012;** 7(10):e47045.

222. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene,* **2008;** 27(45):5904-5912.

223. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol,* **2012;** 2012:948098.

224. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res,* **2006;** 66(2):605-612.

225. Zhang M, He Y, Sun X, Li Q, Wang W, Zhao A, et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res,* **2014;** 7:19

226. Kong LY, Wu AS, Doucette T, Wei J, Priebe W, Fuller GN, et al. Intratumoral mediated immunosuppression is prognostic in genetically engineered murine models of glioma and correlates to immunotherapeutic responses. *Clin Cancer Res,* **2010;** 16(23):5722-5733.

227. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol,* **2002;** 23(11):549-555.

228. Green CE, Liu T, Montel V, Hsiao G, Lester RD, Subramaniam S, et al. Chemoattractant signaling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis and neovascularization. *PLoS One,* **2009;** 4(8):e6713.

229. Xue Y, Lim S, Yang Y, Wang Z, Jensen LD, Hedlund EM, et al. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat Med,* **2011;** 18(1):100-110.