

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PANDEMİK SARS-COV-2 ENFEKSİYONU GEÇİREN
HASTALARDA MİRNA ARAŞTIRILMASI**

Dr. GÖKÇE KADER ARSLAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KONYA 2023

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PANDEMİK SARS-COV-2 ENFEKSİYONU GEÇİREN
HASTALARDA MİRNA ARAŞTIRILMASI

Dr. GÖKÇE KADER ARSLAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 221518027 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca akademik bilgisi, tecrübesi ile asistanlık ve tez sürecimde yardımını esirgemeyen, deneyimlerini ve bilgi birikimini paylaşan, kendisi ile çalışmaktan gurur duyduğum çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e,

Deneyimlerinden ve bilgilerinden her daim faydalandığım, bilgilerini ve emeğini esirgemeyen, eğitim hayatıma çok değerli katkıları olan Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU, Prof. Dr. Metin DOĞAN hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim sürecinde değerli deneyimlerini paylaşan, bizlere yol gösteren ve desteğini her zaman hissettiğimiz Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT ve Dr. Öğretim Üyesi Selin UĞRAKLI hocalarıma,

İstatistiksel analizler konusunda desteğini aldığım Mehmet Sinan İYİSOY'a,

Tezimi 221518027 no'lu proje ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Asistanlık süreci boyunca birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, mikrobiyoloji laboratuvarımızın tüm teknisyen ve personeline en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Her daim sevgisini, sabrını ve ilgisini hissettiğim, beni her zaman destekleyen, hayatımda olduğu ve bana kattıkları için sevgili eşim Samet Uğur Arslan'a

Sevgi ve destekleriyle yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Gökçe Kader ARSLAN

2023

ÖZET

PANDEMİK SARS-COV-2 ENFEKSİYONU GEÇİREN HASTALARDA

MİRNA ARAŞTIRILMASI

DR. GÖKÇE KADER ARSLAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2023

Amaç: SARS-CoV-2'nin konak bağışık yanıtını tetiklediği ve buna bağlı olarak semptomlara neden olduğu bilinmektedir. Özellikle gen ekspresyonunu ve protein fonksiyonunu düzenlemede etkili miRNA'lar, viral hastalıklarda rol almaktadır. MiRNA (miR) ekspresyonundaki değişiklikler hedef proteinlerin yapısında ve işlevlerinde değişikliklere neden olarak hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilmektedir. Çalışmamızın amacı, SARS-COV-2 ile enfekte hastaları sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırarak miR-19a-3p, miR19b-3p, miR-21, miR-26a-5p, miR-146a, miR-let-7b-3p, miR-155, miR-16, miR-590, miR-1307-3p serum düzeylerini ölçerek klinik tabloyla ilişkisini belirlemektir.

Yöntem: Çalışmaya PZR yöntemi ile COVID-19 tanısı konan 70 hasta ve herhangi bir hastalığı olmayan 30 kontrol grubunun kan örnekleri dahil edildi. Hastalar hafif, orta, ağır olmak üzere üç gruba ayrıldı. MiRNA izolasyonu amacıyla SanPrep Column MicroRNA Mini-Prep kiti (Bio Basic Inc., Toronto, Kanada) kullanıldı. Daha sonra miRNA'dan cDNA elde edilmesi miRNA All-In-One cDNA Synthesis kit (Applied Biological Materials (ABM) Inc., Richmond, Kanada) ticari kiti ile gerçekleştirildi. MiRNA seviye ölçümleri ise real time PZR kiti (ABM Inc., Richmond, Kanada) ile yapıldı. Relatif ekspresyonların hesaplanmasında Livak'ın $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ değerleri hesaplandı.

Bulgular: MiR-1307-3p, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR-19a-3p, miR19b-3p, miR-let-7b-3p'nin serum ekspresyon düzeyleri COVID-19 hastalarında daha yüksek tespit edildi. COVID-19 hastalarında miR-1307-3p, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR19b-3p, miR-let-7b-3p istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). MiR-16'da aşağı regülasyon gözlemlendi. Hasta grupları arasında miR ekspresyon düzeyleri farklılık gösterdi.

Sonuç: Konak-virüs etkileşimleri göz önüne alındığında, miRNA'ların COVID-19'da hem terapötik hedef olabileceğini hem de hastalığın patogenezi anlamaya yardımcı olacağını düşünüyoruz. Hastalığın patogenezinin anlaşılmasında in vivo ve in vitro deneyler ile birlikte klinik çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR-let-7b-3p

ABSTRACT

MIRNA INVESTIGATION IN PATIENTS WITH PANDEMIC SARS-COV-2 INFECTION

DR. GÖKÇE KADER ARSLAN

THESIS OF MEDICAL SPECIALTY

KONYA 2023

Objective: It is known that SARS-CoV-2 triggers the host immune response and accordingly causes symptoms. In particular, miRNAs that are effective in regulating gene expression and protein function play a role in viral diseases. Changes in miRNA (miR) expression may contribute to the pathogenesis of diseases by causing changes in the structure and functions of target proteins. The aim of our study was to compare the patients infected with SARS-COV-2 with the healthy control group and compare miR-19a-3p, miR19b-3p, miR-21, miR-26a-5p, miR-146a, miR-let-7b-3p, miR-155, miR-16, miR-590, miR-1307-3p. To determine the effect on the clinical correlation by measuring the serum levels of this miRNAs.

Methods: Blood samples of 70 patients diagnosed with COVID-19 by PCR method and 30 control groups without any disease were included in the study. The patients were divided into three groups as mild, moderate and severe. SanPrep Column MicroRNA Mini-Prep kit (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) was used for miRNA isolation. Extraction of cDNA from miRNA was performed with the commercial kit of the miRNA All-In-One cDNA Synthesis kit (Applied Biological Materials (ABM) Inc., Richmond, Canada). MiRNA level measurements were made with real time PCR kit (ABM Inc., Richmond, Canada). $2^{-\Delta\Delta CT}$ values were calculated using Livak's $\Delta\Delta CT$ method to calculate the relative expressions.

Results: Serum expression levels of miR-1307-3p, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR-19a-3p, miR19b-3p, miR-let-7b-3p were higher in COVID-19 patients detected. MiR-1307-3p, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR19b-3p, miR-let-7b-3p were statistically significant in COVID-19 patients ($p<0.05$). Downregulation was observed in miR-16 MiR expression levels were different between patient groups.

Conclusion: Considering host-virus interactions, we think miRNAs may be both a therapeutic target in COVID-19 and help to understand the pathogenesis of the disease. In understanding the pathogenesis of the disease, it is important to carry out clinical studies together with in vivo and in vitro experiments.

Keywords: COVID-19, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR-let-7b-3p

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLOLAR.....	viii
ŞEKİLLER VE RESİMLER.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. COVID-19	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Virüs Taksonomisi.....	4
2.1.3. Virüs Yapısı.....	4
2.1.3.1. SARS-CoV-2 Genomu	4
2.1.3.2. Viral Proteinler	5
2.1.3.3. Viral Replikasyon.....	9
2.1.4. Epidemiyoloji	15
2.1.4.1. Rezervuar.....	9
2.1.4.2. Bulaş Yolları.....	9
2.1.5. Patogenez ve İmmün Yanıt.....	17
2.1.6. Klinik Özellikler	17
2.1.7. Tanı.....	18
2.2. MİKORNA (miRNA)	17
2.2.1. Tarihçe	17
2.2.2. MiRNA Yapı ve Sentezi.....	18
2.2.3. MiRNA'nın Biyolojik Etkileri.....	20
2.2.4. MiRNA ve Viral Hastalıklar.....	20
2.2.5. COVID-19 ve MiRNA	24

3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Örneklerin Toplanması	17
3.2. SARS-CoV-2 Tespiti	29
3.3. MiRNA Analizi	29
3.3.1. MiRNA İzolasyonu	31
3.3.2. MiRNA’lardan cDNA Elde Edilmesi.....	32
3.3.3. Real Time PZR	33
3.4. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
7. KAYNAKLAR.....	50

TABLÖLAR

Sayfa No

Tablo 2.1. İnsan koronavirüsleri.....	4
Tablo 2.2. Yapısal olmayan proteinlerin özellikleri ve görevleri.....	6
Tablo 3.1. cDNA miks içeriği.....	34
Tablo 3.2. BlasTaq™ 2X qPCR Master Miks ve U6 Primer Master Miks İçeriği	34
Tablo 3.3. PCR ısı protokolü	35
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik veriler.....	39
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubu miRNA değerlerinin karşılaştırılması.....	40
Tablo 4.3. Hastalık şiddetine göre grupların miRNA değerlerinin karşılaştırılması	37
Tablo 4.4. Kontrol grubu ile her hasta grubunun karşılaştırılması	38
Tablo 4.5. Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	38
Tablo 4.6. Kontrol grubu ile COVID-19 hastalarının miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	40

ŞEKİLLER VE RESİMLER

Sayfa No

Şekil 2.2.1. Klasik miRNA sentez yolağı (Bautista-Becerril ve ark., 2021).....	19
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubu miRNA'larının ekspresyon düzeyindeki farklılıkları....	40
Resim 1. Üç faza ayrılmış serum örneği	32
Resim 2. Thermal Cycler cihazı.....	32

SİMGELER ve KISALTMALAR

Dk	: Dakika
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
Sn	: Saniye
ACE2	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
ARDS	: Akut Respiratuar Distres Sendromu
<i>C. elegans</i>	: <i>Caenorhabditis elegans</i>
CD	: Konektör alanı
CH	: Merkezi sarmal
COVID-19	: Koronavirüs hastalığı 2019
Ct	: Eşik döngü sayısı
CT	: Sitoplazmik kuyruk
DGCR8	: DiGeorge sendromu kritik bölge 8
DROSHA	: Çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dsRNA	: Çift sarmallı RNA
E	: Zarf proteini
ERGIC	: Endoplazmik retikulum- Golgi ara bölmesi
EZN	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FP	: Füzyon peptidi
HBV	: Hepatit B virüsü
HCoV-229E	: İnsan koronavirüsü 229E
HCoV-OC43	: İnsan koronavirüsü OC43
HCV	: Hepatit C virüsü
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HR1	: Heptad tekrar 1
HR2	: Heptad tekrar 2

ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IRAK	: interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz
ISG	: İnterferon stimüle edici gen
Jak	: Janus kinaz
LAMP	: Döngü aracılı izotermal amplifikasyon
M	: Membran proteini
MAP	: Mitojenle aktive olan protein
MAS	: Makrofaj aktivasyon sendromu
MDA5	: Melanom farklılaşmasıyla ilişkili protein 5
MERS-CoV	: Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü
miRNA, miR	: MikroRNA
MyD88	: Miyeloid farklılaşma faktörü 88
N	: Nükleokapsid proteini
NF-κB	: Nuclear factor-κB
NK	: Natural Killer
NLRP3	: Pyrin domain içeren protein 3
NSP	: Yapısal olmayan protein
NTD	: N terminal alanı
ORF	: Open Reading Frame
PAMP	: Patojenle ilişkili molekül
pDC	: Plazmasitoid dendritik hücre
PDCD4	: Programlanmış hücre ölümü reseptörü 4
PHB	: Prohibitin
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 kinaz
PP	: Poliprotein
PRR	: Patern tanıma reseptörü
PTEN	: Kromozom 10'da silinen fosfataz ve tensin homologu
Pur-a	: Pürin açısından zengin element bağlayıcı protein a

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBD	: Reseptör bağlama alanı
RIG-I	: Retinoik asitle indüklenebilir gen I
RISC	: RNA kaynaklı susturma kompleksi
RNP	: Ribonükleoprotein
RTC	: Replikasyon-transkripsiyon kompleksi
S	: Spike proteini
SARS-CoV	: Şiddetli Akut Solunum Sendromu koronavirüsü
SOCS1	: Sitokin sinyal baskılayıcı protein 1
SR-B1	: HDL tanıyan scavenger reseptörü 1
ssRNA	: Tek sarmallı RNA
TGF-beta	: Transforming growth factor beta
TLR	: Toll-like reseptör
TM	: Transmembran alanı
TMPRSS-2	: Transmembran proteaz serin 2
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TRAF-6	: Tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 6
Tyk2	: Tirozin kinaz 2
UTR	: Untranslated region

1. GİRİŞ VE AMAÇ

SARS CoV-2'nin neden olduğu COVID-19, ateş, öksürük, yorgunluk ve nefes darlığı gibi çeşitli klinik belirtilerle seyretmektedir (Bhatraju ve ark., 2020). SARS-CoV-2, aritmiler, akut koroner sendrom, kalp yetmezliği, miyokardiyal hasar ve venöz tromboembolizm gibi kardiyak komplikasyonların yanı sıra akut respiratuvar distres sendromu (ARDS), multiple organ yetmezliği, nörolojik komplikasyonların gelişiminde de rol oynar (Shi ve ark., 2020; Chams ve ark., 2020). Proinflamatuvar belirteçlerin akut dönemde aşırı üretimi ve kontrolsüz salınımı olarak tanımlanan sitokin fırtınasına da neden olur. ARDS, COVID-19 hastalarında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve esas olarak sitokin fırtınası tarafından tetiklenir (Montazersaheb ve ark., 2022).

MikroRNA'lar, spesifik mesajcı RNA'ları hedefleyerek çok sayıda fizyolojik tepkinin düzenlenmesine katılan küçük kodlanmayan RNA'lardır. Son çalışmalar, mikroRNA'lar dahil olmak üzere birkaç negatif transkripsiyon düzenleyicisinin, inflamatuvar yanıtların baskılamada/tetiklemede ve immünolojik homeostazın sürdürülmesinde önemli roller oynadığını göstermiştir (Lee ve ark., 2016). Ayrıca miRNA'lar viral enfeksiyonlar, nörodejeneratif bozukluklar, metabolik hastalıklar, kronik hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogeneğinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Paul ve ark., 2022). Viral miRNA'lar virüs replikasyonunu kolaylaştırabilir, apoptozu indükleyebilir, sitokin fırtınasına katkıda bulunabilir, konakçı hücrelerin tepkisini modüle edebilir (AbdelHamid ve ark., 2021, Li ve Zou, 2019). Aksine, konakçının miRNA'ları, ya hayatta kalmalarını sağlamak için virüs tarafından hedeflenirler ya da savunma mekanizmalarının enfeksiyonla savaşmasını sağlamak için bir konak tepkisi olarak ya da virüsün bir hücreye girmesine neden oldukları için enfeksiyonun bir sonucu olarak yukarı/aşağı regüle edilebilirler (Barbu ve ark., 2020). Çok sayıda insan miRNA'sı koronavirüslerle doğrudan etkileşime girme potansiyeli göstermiştir ve miRNA'nın SARS-CoV-2 enfeksiyonundaki rolünü açıklayan artan kanıtlar ile miRNA ile hedeflenen biyomoleküller arasındaki etkileşimin hastalık gelişimi için kritik bir önemi olduğu belirtilmektedir (Zhang ve ark., 2021).

Koronavirüs-konak etkileşiminde yer alan insan miRNA'larının tanımlanması COVID-19 pandemisi nedeniyle daha önem kazanmıştır. Çalışmamızın amacı SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırarak miR-19a-3p, miR19b-3p, miR-21, miR-26a-5p, miR-146a, miR-let-7b-3p, miR-155, miR-16, miR-590,

miR-1307-3p serum düzeylerini incelemek ve bu miRNA'ların klinik tabloyla ilişkisini belirleyerek patogenezdaki rolünün anlaşılmasına katkı ve fayda sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. COVID-19

2.1.1. Tarihçe

Beaudette ve Hudson tarafından 1937 yılında tanımlanan ilk koronavirüs enfeksiyöz bronşit virüsü olup tavuk embriyosundan izole edilmiştir. Ardından 1940 yılında fare hepatit virüsü (MHV), 1960'lı yıllarda ise iki insan koronavirüsü olan insan koronavirüsü 229E (HCoV-229E) ve insan koronavirüsü OC43 (HCoV-OC43) keşfedilmiştir (Woo ve ark., 2009, Hasöksüz ve ark., 2020).

Kasım 2002'de, Çin'in Foshan kentinde ilk ciddi akut solunum sendromu (SARS) vakası meydana gelmiştir. Enfekte olan ve daha sonra seyahat eden kişiler, salgını Hong Kong'a ve oradan da Vietnam, Kanada ve diğer birkaç ülkeye yaymıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Mart 2003'te, SARS'a neden olan ajanı belirlemek için bir laboratuvar ağı kurarak SARS koronavirüsünü (SARS-CoV) tanımlamıştır. 27 ülkedeki 774 ölüm ve bildirilen toplam 8.096 vakanın ardından salgınının sona erdiği bildirilmiştir (de Wit ve ark., 2016). Ardından 2004 ve 2005'te HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1'i tanımlanmıştır (Woo ve ark., 2009).

SARS-CoV'un ortaya çıkışından yaklaşık 10 yıl sonra, Suudi Arabistan'da bir hasta akut pnömoni ve böbrek yetmezliğinden ölmüştür. Bu hastanın balgamından yeni bir koronavirüs, Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV) izole edilmiştir (de Wit ve ark., 2016). İlk tespitinden bu yana yaklaşık %35 ölüm oranı görülen ve bugüne kadar yaklaşık 2500 MERS-CoV vakası rapor edilmiştir (Rabaan ve ark., 2021).

2019 yılının son aylarında ise Çin'in Wuhan kentinde birçok pnömoni vakası bildirilmiştir. Pnömonili hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj sıvısından yeni bir virüs izole edilmiştir. Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV]) yeni koronavirüsü, SARS-CoV-2; DSÖ ise hastalığı, koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) olarak adlandırmıştır. Artan vakalarla beraber seyahat sonrası birçok ülkede salgının yayılması sebebi ile DSÖ 11 Mart 2020'de, küresel COVID-19 salgınını pandemi olarak ilan etti (Hu ve ark., 2021).

2.1.2. Virüs Taksonomisi

Koronavirüslerin mevcut sınıflandırması Coronaviridae familyasına, Coronavirineae alt takımına, Nidovirales takımına ve Riboviria alemine ait 27 alt cins, beş cins ve iki alt familyadaki 39 türü içerir. Aile sınıflandırması, ICTV'nin bir çalışma grubu olan Coronaviridae Çalışma Grubu tarafından geliştirilmiştir. İnsan koronavirüsleri, genotipik olarak birbirinden ayrılan Alfakoronavirüs, Betakoronavirüs, Deltakoronavirüs ve Gamakoronavirüs olmak üzere 4 cins içerir (Kirtipal ve ark., 2020).

Alfakoronavirüsler ve betakoronavirüsler yalnızca memelileri enfekte eder. Taksonomide HCoV-229E ve HCoV-NL63, AlphaCoV altında yer alırken, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, SARS-CoV ve MERS-CoV, BetaCoV olarak sınıflandırılır (Tablo 2.1). Gammakoronavirüsler ve deltakoronavirüsler kuşları enfekte etmenin yanı sıra bazıları memelileri de enfekte edebilir (Woo ve ark., 2012).

Tablo 2.1. İnsan koronavirüsleri

Virüs	Cins	Alt Cins
İnsan CoV-NL63	Alfakoronavirüs	Setracovirus
İnsan CoV-229E	Alfakoronavirüs	Duvinacovirus
İnsan CoV-OC43	Betakoronavirüs	Embecovirus
İnsan CoV-HKU1	Betakoronavirüs	Embecovirus
SARS-CoV	Betakoronavirüs	Sarbecovirus
MERS-CoV	Betakoronavirüs	Merbecovirus
SARS-CoV-2	Betakoronavirüs	Sarbecovirus

2.1.3. Virüs Yapısı

2.1.3.1. SARS-CoV-2 Genomu

Genomu (27–32 kb), diğer tüm RNA virüslerinden daha büyük olan tek sarmallı pozitif polariteli bir RNA'ya sahiptir. SARS-CoV-2'nin (29,9 kb) genomik yapısı farklı sayıda 13–15 (12 işlevsel) ORF (Open Reading Frame) içermektedir. Tüm genom uzunluğunun yaklaşık üçte ikisini oluşturan bu ORF'ler (özellikle ORF1a/b), poliprotein 1a (pp1a) ve poliprotein 1ab (pp1ab) olmak üzere iki poliproteini kodlar. Bu proteinler yapısal

olmayan protein (NSP)'e dönüşerek 16 adet NSP'yi oluşturur (Mousavizadeh ve ark., 2021). Diğer ORF'ler ise yapısal proteinler olan, nükleokapsid (N), spike (S), membran (M) ve zarf (E) proteinlerini kodlar (Nakagawa ve ark., 2020).

2.1.3.2. Viral Proteinler

SARS-CoV-2, dört yapısal protein (S, E, M ve N) ve on altı yapısal olmayan protein (NSP 1–16) içerir (Wang ve ark., 2020).

Yapısal Proteinler

3' ucunda yer alan ORF'ler dört yapısal proteini kodlar. S proteini konakçı hücre reseptörlerini tanıırken, M proteinleri virionları ve zarfı şekillendirir. E proteinleri ise virionların bir araya gelmesinden ve salınmasından, N proteini RNA genomunun paketlenmesinden ve bir interferon (IFN) inhibitörü olarak virüsün patogenezinin sorumludur (Ravi ve ark., 2022).

S Proteini

S proteini, hem duyarlı hücrelerde reseptöre bağlanarak hücre girişinden hem de füzyondan sorumludur (Nakagawa ve ark., 2020). Bu proteinler, viral yüzeyden çıkıntı yaparak homotrimerik bir yapı oluşturur. S proteini, S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşur. S1 alt birimi, N-terminal alanı (NTD) ve reseptör bağlama alanı (Receptor Binding Domain [RBD]) içerir. S1 alt birimi, konakçı hücrelere girmek için, RBD aracılığıyla konak hücreler üzerindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörünü tanıır ve konakçı hücreye bağlanır. S2 alt birimi ise, füzyon peptidi (FP), konektör alanı (CD), heptad tekrar 1 (HR1), merkezi sarmal (CH), transmembran alanı (TM), heptad tekrar 2 (HR2) ve sitoplazmik kuyruk (CT)'tan oluşur (Walls ve ark., 2020, Wrapp ve ark., 2020). S2 alt biriminin görevi, virüslerin ve konakçı hücrelerin zarlarını kaynaştırarak füzyonu sağlamaktır. HR1 ve HR2 membran füzyonu için kritik öneme sahiptirler (Wang ve ark., 2020).

E Proteini

Yapısal proteinlerin en küçüğü olan E proteini, enfekte hücre içinde yüksek miktarda eksprese edilir. E proteini virüsün üretiminde ve olgunlaşmasında önemi bir role sahiptir. Viral birleşme (assembly) ve tomurcuklanmada görev alır (Ravi ve ark., 2022).

M Proteini

M proteini, 25-30 kDa'lık bir glikoproteindir. Yapısal proteinler arasında en fazla bulunandır ve üç ayrı transmembran bölgeye sahiptir. Bu protein, nükleokapsid dahil olmak üzere diğer viral yapısal proteinlerle birleşerek patogeneizde yer alır (Yadav ve ark., 2021). Viral zarfı oluşturan M ve E proteinleri, virüs benzeri partiküllerin üretilmesine ve salınmasına yardımcı olur (Ravi ve ark., 2022).

N Proteini

N proteini, virüsün dokuzuncu ORF'si tarafından kodlanır ve 419 amino asitten oluşur. N proteini, yüksek oranda korunur ve virüs bulaşmış hücrelerde en bol bulunan yapısal proteinlerden biridir. N proteininin temel işlevi, viral genom RNA'sını uzun bir sarmal ribonükleokapsid (RNP) kompleksi halinde paketlemek ve viral genom ve membran proteini M ile etkileşimleri yoluyla virionun birleştirilmesinde yer almaktır. Ek olarak, koronavirüslerin N proteininin, viral yaşam döngüsünde düzenleyici bir rolü olan IFN inhibisyonu, RNA interferansı ve apoptoz gibi konakçı hücresel mekanizmalara da dahil olduğu gösterilmiştir (Bai ve ark., 2021).

Yapısal Olmayan Proteinler

Viral RNA genomunun 5'-bölgesinde yer alan genler tarafından kodlanırlar (Ravi ve ark., 2022). Bu proteinler, erken transkripsiyon düzenlemesini, helikaz aktivitesini, immünomodülasyonu, gen transaktivasyonunu modüle ederek ve antiviral yanıtı karşılayarak viral patogeneizde yer alır (Naqvi ve ark., 2020). Yapısal olmayan proteinlere ait özellikler Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Yapısal olmayan proteinlerin özellikleri ve görevleri

Protein	Özellik	Görevi
NSP1	180 aa uzunluğunda Viral replikazın N-terminal ürünü	RNA replikasyonuna ve işlenmesine aracılık eder
NSP2	638 aa uzunluğunda Replikaz ürünü	Prohibitin 1 ve prohibitin 2 (PHB1/PHB2)'ye bağlanır
NSP3	1945 aa uzunluğunda Papain benzeri bir proteinaz	NSP1, NSP2 ve NSP3'ün pp1a ve 1ab'nin salınmasından sorumludur
NSP4	500 aa uzunluğunda Transmembran bölge 2'yi (TM2) içeren membran kapsayan protein	Viral replikasyon-transkripsiyon kompleksi ve ER membranlarının düzenlenmesine yardımcı olur
NSP5	306 aa uzunluğunda Proteinaz ve ana proteinaz	Replikasyon esnasında poliprotein sürecine katılır.
NSP6	290 aa uzunluğunda Transmembran alanı	ER'den türetilen otofagozomların oluşumunu ve çift membranlı vezikülleri indükler
NSP7	83 aa uzunluğunda RNA'ya bağımlı RNA polimeraz	NSP8 ve NSP12 ile kompleks oluşturur
NSP8	198 aa uzunluğunda	NSP8 ve 12 ile heterodimer bir kompleks yapar

	Replikaz, Multimerik RNA polimeraz	
NSP9	198 aa uzunluğunda Tek sarmallı RNA bağlayıcı viral protein	ssRNA bağlayıcı protein olarak işlev görür.
NSP10	139 aa uzunluğunda Büyüme faktörü benzeri ve iki çinko bağlayıcı motif içeren protein	Viral mRNA'ların metilasyonu için kritiktir
NSP11	13 aa uzunluğunda Nsp12'nin ilk segmentiyle aynı	Bilinmiyor
NSP12	932 aa uzunluğunda RNA'ya bağımlı RNA polimeraz	Nsp7 ve Nsp8 ile birlikte viral RNA genomunun replikasyonu ve transkripsiyonu için bir replikaz kompleksi oluşturur
NSP13	932 aa uzunluğunda RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (Pol/RdRp), helikaz	ATP ile bağlanır ve çinko bağlama alanı ile replikasyon ve transkripsiyon sürecine katılır
NSP14	527 aa uzunluğunda Redaksiyon eksoribonükleaz alanı	3'-5' ekzoribonükleaz ve N7-guanin metil transferaz aktivasyonu
NSP15	346 aa uzunluğunda EndoRNAz	Mn ⁽⁺²⁾ bağımlı endoribonükleaz aktivitesine sahiptir
NSP16	298 aa uzunluğunda 2'-O-riboz metiltransferaz	5' yapısının metilasyonunu sağlar

*Yadav ve ark., 2021'den uyarlanmıştır.

2.1.3.3. Viral Replikasyon

Virüsün konak hücreye ilk önce bağlanması ve tutunması gerekir. SARS-CoV-2 S proteini hücrel giriş reseptörü olan ACE2'ye bağlanır. Reseptör bağlanmasına ek olarak, başta transmembran proteaz serin (TMPRSS) 2 olmak üzere, aynı zamanda TMPRSS4, furin, katepsin, tripsin gibi proteazlar tarafından S proteini, S1 ve S2 alt birimlerine proteolitik olarak ayrılır. Bu bölünme sonucunda, aktifleşen S2 alt birimi ile viral ve konakçı lipid çift katmanları birleşerek viral ribonükleoprotein kompleksi hücre içine salınır (Zawilska ve ark., 2021, Lamers ve Haagmans 2022).

Viral RNA genomu hücrede serbest kaldıktan sonra pozitif polariteli RNA hücre içerisinde polipeptit zincirine dönüştürülür. SARS-CoV-2 ORF1a ve ORF1ab, pp1a ve pp1ab poliproteinlerine çevrilir. Poliproteinlerden, papain benzeri proteaz (nsp3) ve ana proteaz (nsp5) tarafından gerçekleştirilen proteolitik bölünme sonucunda 16 adet nsp üretilir (Kadam ve ark., 2021). Nsp12 (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp), kofaktör olarak nsp7 ve nsp8 ile birlikte replikasyon-transkripsiyon kompleksi (RTC)'ni oluşturur. Daha sonra nsp3, 4 ve 6, RTC'nin bir araya getirildiği çift zarlı veziküller oluşturmak üzere hücre membranının yeniden düzenlenmesini indükler (Romano ve ark., 2020, Machhi ve ark., 2020). Farklı subgenomik RNA'lar ve genomik RNA'lar RTC tarafından sentezlenmeye başlar. Bu amaçla negatif polariteli RNA sentezlenir; bu RNA, başka bir

pozitif RNA sarmalına kopyalama veya mRNA'nın transkripsiyonu için kullanılır (Kadam ve ark., 2021).

SARS-CoV-2 proteinlerinin translasyonu için konakçı transfer RNA'yı kullanır. S, M ve E gibi zarla ilişkili yapısal ve yardımcı proteinlerin çoğu, endoplazmik retikulumla bağlı ribozomlar tarafından sentezlenirken, N proteini dahil olmak üzere diğer viral proteinler, konakçı hücrelerin serbest sitozolik ribozomları tarafından sentezlenir. N proteini, yeni sentezlenen pozitif polariteli RNA'yı çevreler ve nükleokapsidi oluşturur. Virion montajı, endoplazmik retikulum-Golgi ara bölmesi (ERGIC) bölgesinde gerçekleşir. ERGIC bölgesinde M proteini, S ve E gibi diğer yapısal proteinlerle heterotipik etkileşim yoluyla virion morfojenizini düzenler, böylece moleküler birleşme kolaylaşır. Ayrıca, M ve N protein etkileşimleri, E proteini ile birlikte zarf ile nükleokapsidin birleşmesine aracılık eder. Moleküler birleşme sonrası, golgi veziküllerinde paketlenmiş olan yeni virionlar plazma zarına taşınırlar ve sonunda ekzositoz yoluyla enfekte hücreden dışarıya salınırlar. Böylece vücudun diğer bölgelerine yayılım gerçekleşir (Yadav ve ark., 2021, Zawilska ve ark., 2021).

2.1.4. Epidemiyoloji

Aralık 2019'un sonlarında, Çin'in Hubei eyaletindeki Wuhan kentindeki birkaç sağlık tesisinden, nedeni bilinmeyen pnömonili hasta kümeleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne bildirildi. Hastaneye yatırıldığı belgelenen ilk 27 hasta arasında çoğu vaka, epidemiyolojik olarak Wuhan şehir merkezinde bulunan Huanan Deniz Ürünleri Toptan Satış Pazarı ile bağlantılıydı. 12 Ocak 2020'de virüsün tam genom analizi yapıldı. 13 Ocak 2020'de ilk impote vaka Tayland'ta görüldü (Hu ve ark., 2021).

30 Ocak'ta DSÖ, yeni koronavirüs salgınına uluslararası öneme sahip bir halk sağlığı acil durumu olarak ilan etti. 11 Şubat 2020'de ise ICTV yeni koronavirüsü "SARS-CoV-2" ve DSÖ hastalığı "COVID-19" olarak adlandırdı. COVID-19'un dünya çapında hızla yayılması ile DSÖ 11 Mart 2020'de, küresel COVID-19 salgınına pandemi olarak bildirdi (Hu ve ark., 2021).

Küresel olarak, 6 Nisan 2023 tarihi itibarıyla, DSÖ'ye bildirilen 6.893.190 ölüm dahil 762.201.169 doğrulanmış COVID-19 vakası olmuştur. Türkiye'de ise aynı tarihte 17.004.677 doğrulanmış COVID-19 vakası ile birlikte 101.419 ölüm bildirilmiştir (WHO, WHO/tr).

Dünya genelinde 3 Nisan 2023 tarihi itibariyle toplam 13.337.835.146 doz aşı yapılmıştır. Ülkemizde 28 Ocak 2023 tarihi itibariyle toplam 139.694.693 doz aşı uygulanmıştır (WHO/tr).

2.1.4.1. Rezervuar

Yarasalar, alfakoronavirüslerin ve betakoronavirüslerin önemli doğal rezervuarlarıdır. Çin'in Yunnan eyaletinden *Rhinolophus affinis*'te tespit edilen bir yarasa koronavirüsü olan RaTG13'ün tam uzunluktaki genom dizisi, SARS-CoV-2 genom dizisi ile %96,2 oranında benzer bulunmuştur (Zhou ve ark., 2020). Yine aynı bölgeden *Rhinolophus malayanus* yarasasında bulunan 'RmYN02' olarak adlandırılan yeni bir yarasa virüsü, genom genelinde SARS-CoV-2 ile %93,3 oranında aynı bulunmuştur (Zhou ve ark., 2020).

Yarasaların rezervuar olmasının yanı sıra bir diğer rezervuar olarak düşünülen yabani hayvan pangolinlerdir. Çin'e yasadışı yollarla ithal edilen Malaya pangolini ile SARS-CoV-2 genom yapısının yüksek oranda benzer olduğu bildirilmiştir (Xiao ve ark., 2020).

2.1.4.2. Bulaş Yolları

SARS-CoV-2'nin belirgin bulaş yolu solunum yoludur. Mevcut kanıtlara göre, COVID-19 virüsü öncelikle insanlar arasında solunum damlacıkları(>5 µm) ve temas yollarıyla bulaşır. Damlacık yolu ile bulaşma, solunum yolu semptomları (örneğin öksürme veya hapşırma) olan bir kişinin bulaşıcı solunum damlacıklarına maruz kalacak yakınlıkta (1 m içinde) olması durumunda gerçekleşebilir (Meyerowitz ve ark., 2021).

SARS-CoV-2 fomitler yolu ile bulaşabilir, ancak bu yol damlacık veya temas yoluyla bulaşmaya göre daha az sıklıkta bildirilen bulaş yoludur. Fekal-oral bulaşma da SARS salgını sırasında rapor edilmiştir. Ama SARS-CoV-2 'nin bu yolla bulaştığına dair yeterli kanıt yoktur (Harrison ve ark., 2020).

Gebe kadınlardan fetüse transplasental geçiş bildiren çalışmalar mevcuttur. Nadiren de olsa SARS-CoV-2'nin vertikal geçiş ile bulaşabileceği bildirilmiştir (Deniz ve Tezer 2022). Kan yolu ile ve cinsel yolla bulaşma ise bildirilmemiştir (Meyerowitz ve ark., 2021).

2.1.5. Patogenez ve İmmün Yanıt

ACE2, SARS-CoV-2 tarafından hücre girişi için kullanılan fonksiyonel bir reseptördür. ACE2, akciğerde özellikle tip 2 pnömositlerde, kalp, böbrek ve bağırsakta eksprese edilen ve esas olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili bir tip I membran proteinidir (Jin ve ark., 2020). SARS-CoV-2 S proteini ile ACE2 reseptörüne bağlandığı zaman ACE2 reseptörlerinin sayıca azalması ile denge ACE1 reseptörü yönüne kayar ve ACE1 tarafından anjiyotensin-2 (AT2) üretiminde artış meydana gelir. Artan AT2 üretimi potansiyel olarak pulmoner vasküler geçirgenliği artırır ve akciğer hasarına neden olur (Samudrala ve ark., 2020).

SARS-CoV-2'nin hücreye girişinde ACE2 reseptörü büyük rol oynar. ACE2 reseptörüne tutunmayı arttıran farklı reseptörler de bulunmaktadır. Yüksek yoğunluklu lipoproteinleri (HDL) tanıyan scavenger reseptörü (SR-B1)'nin, ACE2'ye bağımlı bir şekilde SARS-CoV-2 penetrasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Virüsün S1 alt birimi, viral alımı artıran kolesterol ve HDL bileşenlerine bağlanır. SR-B1 bu reseptörlerle etkileşime girdiği için, SR-B1 bulunan hücrelerin SARS-CoV-2'nin ACE2 reseptörü ile hücrelere daha kolay girdiği bulunmuştur. SR-B1'in, insan akciğer dokusunda ve çeşitli akciğer dışı dokularda ACE2 ile birlikte eksprese edildiği bildirilmiştir (Gusev ve ark., 2022).

SARS-CoV-2 S proteininin, Toll Like Reseptör (TLR)'lere, özellikle TLR4 dahil olmak üzere membran patern tanıma reseptörleri (PRR)'ne bağlanma yeteneğine dair öngörüler vardır. S proteininin TLR4'e bağlandığı ve hücre yüzeyinde ACE2 ekspresyonunu artırmak için TLR4 sinyalini aktive ettiği, böylece SARS-CoV-2'nin tip II pnömositlere penetrasyonunun kolaylaştığı varsayılmaktadır. Bu durum, hücre yıkımına, yüzey aktif madde üretiminin bozulmasına ve akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) gelişimine neden olur (Gusev ve ark., 2022).

COVID-19'da bir dizi immünolojik olay gerçekleşmekte ve buna bağlı semptomlar ve klinik tablolar oluşmaktadır. Bağışıklık sistemi, doğuştan gelen bağışıklık sistemi ve adaptif bağışıklık sistemi olarak ikiye ayrılır. Adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık sistemleri önemli ve güçlü yollarla birbirine bağlı olsa da, her biri farklı görevlere sahip farklı hücre tiplerinden oluşur (Sette ve Crotty 2021).

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, virüslerin varlığını saptamak için çeşitli PRR'ler kullanır. Plazmasitoid dendritik hücreler (pDC'ler) gibi özelleşmiş bağışıklık hücreleri, TLR7 aracılığıyla endozomdaki viral genomik RNA'yı saptar. Sırasıyla çeşitli hücrelerde bulunan TLR3 ve TLR8 (miyeloid hücre) endositozlu çift sarmallı RNA'yı (dsRNA) veya tek sarmallı RNA'yı (ssRNA) tanırlar. TLR reseptörleri endozomal bölgede bulunur ve daha sonraki aşamalarda IFN üretimini, antijen sunumunu ve kontrolsüz inflamasyonu tetikler (Salvi ve ark., 2021, Merad ve ark., 2022). PRR'ler, güçlü IFN tepkilerini indüklemek için sinyal kaskadları yoluyla bağlanır.

Ardından, tip I IFN'lerin ve çok sayıda ISG'nin transkripsiyonu indüklenir. Hücrenin enfeksiyona karşı tepkisi, PRR tarafından tanınan viral patojenle ilişkili moleküler (PAMP) tarafından başlatılır. Retinoik asitle indüklenebilir gen I (RIG-I) ve melanom farklılaşmasıyla ilişkili protein 5 (MDA5), mitokondriyal antiviral sinyal proteinini tetikler. Miyeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88), kinazlar, transkripsiyon faktörleri, NF- κ B gibi aşağı akış sinyal moleküllerinin aktivasyonu başlar. Bu durum genel olarak yüksek IFN-I-III üretimi ve proinflamatuvar hücresel stres ile sonuçlanır. PRR'nin hücreleri ilk uyarmasının sonucu, interferon tepkisi şeklinde pozitif bir geri besleme döngüsüdür. IFN-I-III, iki IFN-I (IFNAR1/IFNAR2) ve IFN-III'ün (IL-) hücre içi alanlarına doğrudan bağlı olan tirozin kinaz 2 (Tyk2) ve Janus kinaz (Jak) 1 kinazlarını içeren sinyal yollarını aktive eder (Gusev ve ark., 2022). Sonrasında IFN yanıtı gerçekleşir. IFN üretimi SARS-CoV-2 ile kodlanmış proteinler tarafından inhibe edilerek gecikmiş tip-I IFN yanıtı sergilemektedir. SARS-CoV-2 düşük tip I ve II IFN yanıtlarını indüklemenin yanı sıra interferon stimüle edici gen (ISG)'leri ve IL-1 β , IL6 ve tümör nekroz faktörü (TNF), birçok kemokin (CCL20, CXCL1/2/3/5/6 ve CXCL16) ile bir proinflamatuvar sitokin fırtınasını indükler (Blanco-Melo ve ark., 2020). Aşırı inflamatuvar yanıt ve hasar sonrasında vücutta özellikle akciğerler başta olmak üzere birçok organ etkilenecek ARDS, vasküler hasar, multiple organ yetmezliği gelişmektedir (Schultze ve Aschenbrenner 2021).

COVID-19 patogeneğinde birçok hücre yer almaktadır. Monositlerde ve akciğer makrofajlarında NOD benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren protein 3 (NLRP3)'ün yanı sıra kaspaz aktive edici apoptozla ilişkili bir proteinin (kaspaz aktive edici ve güçlendirici alan (CARD)) varlığı gösterilmiştir. Kaspaz-1 aktivasyonu ve plazma membranında bulunan gasdermin D por kompleksi ile birlikte piroptosis olarak bilinen

inflamatuvar litik hücre ölüm süreci başlar. Devam eden piroptozun sonucunda IL-1 β , IL-18 gibi sitokinler sentezlenir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu parakrin sinyallerinin, komşu hücrelerde piroptozu indükleyerek inflamatuvar yanıtı ve hastalığın şiddetini artırabileceği düşünülmektedir (Rodrigues ve ark., 2021). Akciğer parankimi içinde meydana gelen inflamatuvar süreç, öksürük refleksini başlatmaktan sorumlu sinir uçlarını uyarır. Bu nedenle, hastalar genellikle erken dönemde kuru öksürük ile başvururlar. TNF- α ve IL-1 β , vasküler geçirgenlikte ve adezyon molekülü ekspresyonunda artışa neden olan ve nötrofiller, monositler dahil olmak üzere daha fazla bağışıklık hücresinin toplanmasını indükleyen proinflamatuvar sitokinlerdir. Dokuların yüzeyindeki adezyon proteinlerine bağlanırlar ve yaralanma bölgesine geçerler. IL-8 nötrofilleri toplar ve diğer kemokinler monositleri enfeksiyon bölgesine çeker. Damar geçirgenliğindeki artış ile sıvı interstisyel boşluğa ve alveollere sızarak interstisyel ve pulmoner ödeme neden olur. Bu durum, nefes darlığına, bozulmuş oksijenasyona veya hipoksemiye yol açabilir (Rahman ve ark., 2021).

Doğal öldürücü (Natural killer [NK]) hücreleri, viral olarak enfekte olmuş hücrelerin saptanmasını ve ortadan kaldırılmasını sağlar. Bununla birlikte, şiddetli COVID-19'lu hastalarda, NK hücreleri, dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming growth factor beta [TGF- β]) sonucunda sayıca azalır. Antiviral fonksiyonlarını bozulur ve işlevsiz hale gelirler (Merad ve ark., 2022).

Adaptif bağışıklık sistemi, çoğu viral enfeksiyonun kontrolü için önemlidir. Adaptif bağışıklık sistemi B hücreleri, CD4⁺ T hücreleri ve CD8⁺ T hücreleri olmak üzere üç temel hücre tipinden oluşur (Sette ve Crotty 2021).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunda, lenfoid organlarda sunulan virüs hem humoral hem de hücrel bağışıklık tepkilerinin aktivasyonunu kolaylaştıran T yardımcı hücrelerini harekete geçirir (Li ve ark., 2022). CD4⁺ T hücreleri, yardımcı ve efektör hücre tiplerine farklılaşarak hücreleri toplama, doğrudan antiviral aktivitelere sahip olma ve doku onarımını kolaylaştırma gibi bir dizi özelliğe sahiptir. Virüse özgü CD4⁺ T hücreleri genellikle Th1 hücrelerine ve T foliküler yardımcı hücrelere farklılaşır. Th1 hücreleri, IFN γ ve ilgili sitokinlerin (IL-2) üretimi yoluyla antiviral etkiler oluşturur. Th2 hücreleri ise IL-4 ve IL-2 uyarımıyla aktive olur. Bunun sonucunda IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 gibi sitokinler salgılanır. Salgılanan sitokinler B hücrelerinin farklılaşmasını uyarır. Hafıza B

hücreleri, nötralize edici antikor yanıtının yanı sıra uzun vadeli hümmoral bağışıklığın gelişimi için kritik öneme sahiptir (Sette ve Crotty 2021, Us D 2016).

B hücreleri, IgM, IgA, IgG ve IgE gibi farklı antikorlar üreterek viral enfeksiyonlara karşı hümmoral immün yanıtta görev alır. Bu antikorlar yapıları, işlevleri, doku dağılımları ve yarı ömürleri ile birbirinden ayrılır. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda IgD ve IgM üretilen ilk antikor türleridir. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında semptomlar 5. gün civarında başlar ve birey enfeksiyondan yaklaşık 7-8 gün sonra IgM antikorları üretmeye başlar. IgM antikoru, virüsün mevcut olabileceğini veya yakın zamanda enfeksiyon geçiren bir hastayı ve virüse özgü bağışıklık tepkisinin başladığını gösterir (Long ve ark., 2020). IgG antikorları, serumda nispeten uzun bir yarı ömre sahiptir ve B hücre hafızası ile ilişkilidir. SARS-CoV-2'ye karşı IgG antikorları, enfeksiyondan yaklaşık 14 gün sonra oluşur. Genellikle antikorlar virüsün N ve S proteinine karşı gelişir (Li ve ark., 2022).

Nötralizan antikorlar, SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş çoğu insanda, serokonversiyon ile aynı zaman diliminde hızla gelişir (Sette ve Crotty 2021). Amaç, virüsün yapısal bileşenlerini hedef alarak viral enfeksiyonların hafifletilmesi veya virüsün enfeksiyon oluşmadan tamamen bloke edilmesidir. SARS-CoV-2'de nötralizan antikorlar virüsün S proteininde yer alan RBD bölgesini ve NTD alanını hedef alır (Li ve ark., 2022).

CD8⁺ T hücreleri, enfekte olmuş hücreleri öldürme yetenekleri nedeniyle birçok viral enfeksiyonun temizlenmesi için kritik öneme sahiptir. Akut COVID-19'da SARS-CoV-2'ye özgü CD8⁺ T hücreleri, IFN γ , granzim B, perforin ve CD107a gibi güçlü moleküller ile sitotoksik efektör fonksiyonlar oluşturur (Sette ve Crotty 2021).

2.1.6. Klinik Özellikler

COVID-19, asemptomatik enfeksiyondan multiple organ yetmezliği, ARDS ve şoka kadar gidebilen çeşitli klinik durumlarla karakterizedir. Virüsün kuluçka süresi ortalama 1-14 gün olmakla birlikte genellikle 3-7 gündür. SARS-CoV-2, semptom başlangıcından birkaç gün önce üst solunum yolunda replike olmaya başlar (Rahman ve ark., 2021). Ardından hastalığın başlangıcında ateş belirgin olmak üzere öksürük ve miyalji, balgam, boğaz ağrısı, baş ağrısı, hemoptizi ve gastrointestinal semptomlar gelişir. Hastalığın ilerlemesi halinde nefes darlığı, pnömoni, ARDS, mekanik ventilasyon ihtiyacının olması ile birlikte yoğun bakıma yatış gerçekleşebilir (Huang ve ark., 2020).

DSÖ, COVID-19'un şiddetine göre hastaları sınıflandırmıştır. Pnömoni ve hipoksi belirtileri olmadan gelişen COVID-19 tanılı semptomatik hastalar hafif hasta grubu, klinik pnömoni belirtileri (ateş, öksürük, dispne) olup, oda havasında oksijen satürasyonu (SpO_2) $\geq$ %90 olan hastalar orta hasta grubu, klinik pnömoni ve solunum hızı > 30 nefes/dk; şiddetli solunum sıkıntısı veya oda havasında $SpO_2 < \%90$ ağır hasta grubu olarak sınıflandırılmıştır. Kritik hasta grubu ise, bir hafta içerisinde pnömoninin ve solunum semptomlarının kötüleşmesi, akciğerde bilateral opasiteler ve lobar veya pulmoner kollaps ile beraber ARDS tablosunun gelişmesi olarak sınıflandırılmıştır. ARDS hafif, orta ve ciddi olmak üzere üç kısımda değerlendirilir. Ayrıca bu hasta grubunda sepsis ve septik şok tabloları da görülebilir (WHO, 2020).

COVID-19'da bazı biyokimyasal ve inflamatuvar değişiklikler meydana gelmektedir. Lenfopeni, nötrofili, nötrofil-lenfosit oranındaki artış, trombositopeni, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve bilirubin seviyelerinde artış, C-reaktif protein (CRP), laktat dehidrojenaz (LDH), kreatinin, kreatin kinaz (CK), kardiyak troponin I ve N-terminal pro-beyin natriüretik peptid ve D-Dimer seviyelerinde artış, protrombin zamanı (PT) uzaması, proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TNF- α) artışı gibi değişiklikler oluşmaktadır. Bu değişikliklerden lenfopeni, nötrofil-lenfosit oranındaki artış, LDH yüksekliği, D-Dimer artışı, sitokin seviyelerinin yükselmesi kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (Velavan ve Meyer 2020, Chen ve ark., 2021).

COVID-19'da radyolojik olarak ağırlıklı olarak alt loblarda olmak üzere iki taraflı, periferik veya arka loblarda buzlu cam opasiteleri görülür. Az sayıda vakada ise, özellikle yaşlılarda olmak üzere, buzlu cam opasifikasyonlarının üzerine binen konsolidasyonlar bulunur. Daha sonraki hastalık evrelerinde multifokal konsolidasyonlar, kalınlaşmış interlobüler ve intralobüler bantlar, bronşektazi, plevral kalınlaşma ve subplevral bantlar oluşur (Ramdani ve ark., 2021).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunda en sık solunum sistemi ile ilgili komplikasyonlar görülmektedir. Kritik hastalarda ARDS görülürken, COVID-19 sonrası dönemde kronik solunum yetmezliği ve kalıcı akciğer fibrozu gelişmektedir (Esendağlı ve ark., 2021).

Kardiyovasküler komplikasyonlar olarak miyokardit, akut miyokardiyal infarktüs, aritmi, kardiyojenik arrest ve kalp yetmezliği bildirilmiştir. Bir diğer komplikasyon ise venöz tromboembolik olaylarla ilişkilidir (Long ve ark., 2020). COVID-19'da, tromboz

eğilimi nedeniyle hem arteriyel hem de venöz tromboz bildirilmiştir. Spesifik olarak arteriyel tromboz, serebral enfarktüs, miyokardiyal enfarktüs; venöz tromboz ise, derin ven trombozunu (DVT) ve pulmoner tromboembolizmi (PTE) içerir. Artan D-Dimer, Von Willebrand faktörü (VWF) ve FXIII seviyeleri, koagülopati ile birlikte trombositopeninin varlığı sonucunda dissemine intravasküler koagülopati (DIC)'ye neden olmaktadır (Asakura ve Ogawa 2021, Zhang ve ark., 2021).

COVID-19'da yaygın olarak baş ağrısı, myalji, baş dönmesi, anosmi, tat kaybı görülürken ağır vakalarda bilişsel bozukluklar, nöbet, akut ensefalopati, stroke, koma gibi nörolojik komplikasyon görülebilir (Sarioğlu ve ark., 2023).

İmmün sistem disregülasyonu nedeni ile artan kontrolsüz sitokin salınımı sonucunda sitokin fırtınası meydana gelmektedir. Sitokin fırtınasına bağlı ateş, adenopati, hepatosplenomegali, anemi, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve inflamasyona sekonder intravasküler pıhtılaşma kaskadlarının aktivasyonu ile makrofaj aktivasyon sendromu (MAS) gelişmektedir (McGonagle ve ark., 2020).

Ayrıca sitokin fırtınası, MAS ve lenfopeni dahil olmak üzere bağışıklık tepkileri ile endotel disfonksiyonu, hiperkoagülasyon, rabdomiyoliz ve sepsis mekanizmaları ile akut böbrek hasarı gelişmesinde rol oynayabilir (Ahmadian ve ark., 2021).

2.1.7. Tanı

Aktif COVID-19 enfeksiyonunun hızlı ve doğru laboratuvar teşhisi, pandemi kontrolünün temel taşlarından biridir. COVID-19 tanısında rutin laboratuvarlarda, SARS-CoV-2 antijenlerini saptama, antikor testleri ve nükleik asit amplifikasyon testleri gibi farklı tanı yöntemleri kullanılmaktadır (Lai ve Lam 2021).

Tanıda, nazofaringeal sürüntüler, nazofaringeal aspiratlar, orofaringeal, anterior nazal ve orta konka sürüntüleri veya bunların bir kombinasyonu kullanılarak üst solunum yolu örnekleri sıklıkla tercih edilen örnek tipleridir. Bunun yanı sıra balgam, endotrakeal aspirat ve brokoalveolar lavaj sıvıları, kan ve dışkı örnekleri de tanıda kullanılabilir. Kullanılacak teste göre örnek seçimi yapılmalıdır (Lai ve Lam 2021).

COVID-19 teşhisinde altın standart yöntem olarak nükleik asit amplifikasyon testleri kullanılmaktadır. SARS-CoV-2 nükleik asit tespiti için yaygın olarak kullanılan gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PZR) ve dizi analizi

olmak üzere iki yöntem vardır. Yüksek maliyetlerin bir sonucu olarak, klinik teşhiste dizi analizinin rutin laboratuvarlarda kullanımı sınırlıdır. Genel olarak kantitatif (RT-PZR) RT-qPZR, COVID-19'un nihai teşhisi için yüksek özgüllüğe sahiptir. Nükleik asit amplifikasyon testleri, SARS-CoV-2 N, E ve S genlerini ve orf1a ve orf1b bölgelerini ve RdRp'yi hedefler. Bununla birlikte, testin duyarlılığı, numune alma sırasındaki viral yüke, RNA ekstraksiyon tekniğine, numune alma kaynağı ve hastalık aşamasına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Yanlış pozitif sonuçlar ise, numunelerin çapraz kontaminasyonu ile ilişkili olabilir (Mohamadian ve ark., 2021, Lai ve Lam 2021).

COVID-19 tanısında döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), CRISPR tekniği, droplet dijital PZR gibi yöntemlerde geliştirilmektedir (Mohamadian ve ark., 2021).

Moleküler yöntemler, asemptomatik enfeksiyonlarda ve epidemiyolojik çalışmalarda uygulanamazken serolojik testler, surveyans çalışmalarında ve aşı yanıtlarını değerlendirmek için kullanılabilir (Anka ve ark., 2021).

Antijen testleri, solunum örneklerinde SARS-CoV-2 viral proteinlerinin varlığını tespit eder. Genellikle N proteini yaygın olarak kullanılan hedeftir. Ticari olarak temin edilebilen kitlerin çoğunluğunda, burun boşluğundan veya nazofarenksten alınan numuneler kullanılır. Kan ve tükürük de kullanılan örneklerdir. Lateral flow immunoassay (LFIA), mikroakışkan immüno Floresans testleri ve kromatografik dijital immünoanalizler gibi farklı teknolojiler kullanır. Ticari kitlelere göre özgüllükleri ve duyarlılıkları değişmektedir. Testin uygulanmasının kolay olması ve 15-30 dakikada sonuç verebilmesi testin avantajlarından biridir. Bu testler hasta başı testleri (POCT'ler) olarak da adlandırılırlar (Dinnes ve ark., 2020, Lai ve Lam 2021).

SARS-CoV-2'ye karşı antikorların varlığı, yakın zamanda veya geçmiş bir COVID-19 enfeksiyonunun aşı yanıtını gösterebilir. LFIA antikor testleri, gerçekleştirmesi kolay ve hızlı olma avantajlarına sahiptir, ancak birçok testin duyarlılığı düşüktür. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve kemilüminesans immünoassay (CLIA) ise daha yüksek hassasiyetlere sahiptir. SARS-CoV-2'ye karşı T hücresi tepkilerini ölçmek için enzim bağlantılı immüno spot (ELISpot) testleri kullanılabilir. Kullanılan teste bağlı olarak IgM, IgA, IgG veya total antikorlar saptanabilir. Ek olarak testler, saptadıkları spesifik antikorlara göre değişir; bunlar arasında RBD'ye karşı antikorlar, N proteini, S

proteini veya her ikisinde karşı gelişen antikorlar saptanır (Ong ve ark., 2021). Genellikle kan numunesi kullanılmaktadır. Bu testler antikor tespitine dayandıkları için, antikor yanıtının ortalama 14-21 gün içerisinde gerçekleşmesi nedeni ile antikor testlerinin akut hastalık tanısında kullanılması önerilmez (Filchakova ve ark., 2022).

Bir diğer antikor testi ise, nötralizasyon testleridir. Bir hastanın antikorlarının SARS-CoV-2 enfektivitesini nötralize etme ve enfeksiyonu hafifletme yeteneğini ölçen serolojik testlerdir. COVID-19 nötralizasyon testleri, rutin laboratuvar testleri arasında yer almamaktadır. İn vitro ortamda hücre kültüründe üretilen canlı SARS-CoV-2 virüslerinin kullanılması nedeni ile BGS-3 laboratuvarlarda çalışılması gerekir (Özdemir ve Arslan 2021).

2.2. MİKORNA (miRNA)

Bir organizmanın genetik materyali hem hücre dokularını hem de hücre homeostazını ve dahili fonksiyonlarını kontrol eden düzenleyici mekanizmayı kodlamada merkezi bir rol oynar. Genom, DNA tarafından kodlanmış olsa da, genomdan türetilen karmaşık biyolojik işlemi gerçekleştirebilmek için birçok RNA kopyalanır. Bununla birlikte, insan genomunun yalnızca %1-2'si proteinleri kodlar. RNA'lar kodlama yapan RNA ve kodlama yapmayan RNA (non-coding RNA–ncRNA) olarak iki grupta sınıflandırılır (Bautista-Becerril ve ark., 2021).

NcRNA'lar, 200 nükleotitten daha kısa ve 200 nükleotitten uzun ncRNA (long ncRNA)'lar olmak üzere iki gruba ayrılır. Kısa ncRNA, küçük nükleolar RNA (snoRNA), mikro RNA (miRNA), dairesel RNA (circRNA) olmak üzere sınıflandırılır (Beermann ve ark., 2016). MiRNA'lar 19-22 nükleotit uzunluğunda protein kodlamayan küçük RNA'lardır. miRNA'lar, miR öneki ve ardından bir kimlik numarası ile adlandırılır. Özellikle aynı diziler varsa, fazladan son ekler (harfler veya sayılar) eklenir. miRNA öncüsünün 3' veya 5' ucuna göre -3p ve -5p eklerinin kullanımı söz konusudur. Kan dahil olmak üzere tüm vücut sıvılarında bulunur ve bozulmaya karşı oldukça dirençlidirler. Sıvı tipine özgü miRNA'lar, çevre dokularla ilişkili fonksiyonel rollere sahiptir. Vücut sıvılarındaki spesifik miRNA konsantrasyonlarının çeşitli fizyopatolojik durumların saptanması ve izlenmesi için biyobelirteçler olarak kullanıma potansiyeline sahiptir (Weber ve ark., 2010, Narožna ve Rubiś 2021).

2.2.1. Tarihçe

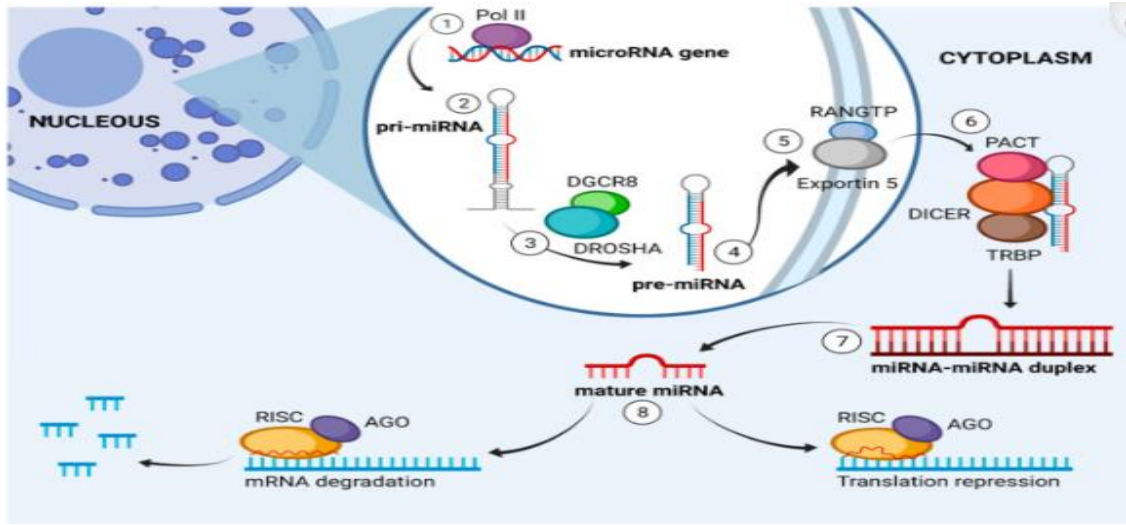
MiRNA'lar ilk olarak gelişimsel zamanlamayı etkileyen heterokronik mutantları araştıran bir araştırma yoluyla *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)'ta genetik yaklaşımla tanımlandı. İlk rapor edilen miRNA 1993 yılında *C. elegans*'ın gelişim evrelerini düzenleyen 22 nükleotid uzunluğundaki *lin-4*'dir (Lee ve ark., 1993). Ardından 2000 yılında 21 nükleotid uzunluğundaki *let-7* tanımlanmıştır (Pasquinelli ve ark., 2000). İlk miRNA'ların keşfinden günümüze kadar farklı canlılarda binlerce miRNA bildirimi olmuştur. Birçok miRNA'nın bildirimi nedeni ile bu amaçla bir veri tabanı geliştirilmiştir. miRBase veri tabanı, yayınlanmış miRNA dizilerinin ve açıklamalarının yer aldığı bir veri tabanıdır. Şu ana kadar 38589 miRNA girişi olmuştur ve bunların 2000'den fazlası insan genomundan bildirilmiştir (Kozomara ve ark., 2019).

2.2.2. MiRNA Yapı ve Sentezi

MiRNA'lar ağırlıklı olarak genomun intragenik ve intergenik bölgelerinde bulunur. Kodlamayan genlerden veya proteinleri kodlayan genlerin intronlarından kopyalanırlar. Olgun bir miRNA'nın sentezi için kanonik yol, uzun primer transkriptleri (pri-miRNA'lar) sentezleyen RNA polimeraz II ile çekirdekte başlar. Pri-miRNA'lar 500 ila 3000 nükleotid uzunluğunda olup, 3' ucunda tipik bir poli-A kuyruğu ve 5' ucunda 7-metilguanozin başlığı ile karakterize edilir. Pri-miRNA'lar, ribonükleaz III enzim ailesinin üyesi olan çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz (DROSHA)'a bağlanır. Ardından, çift sarmallı RNA'ya bağlayıcı bir protein görevi olan DiGeorge sendromu kritik bölge 8 (DGCR8) ile birlikte bir mikroişlemci kompleksi oluşur. Bu mikroişlemci kompleksi, pri-miRNA'yı 70 ila 80 nükleotit uzunluğunda bir öncü miRNA (pre-miRNA)'ya dönüştürür (Liu ve ark., 2014, Benz ve ark., 2016).

Pre-miRNA'lar, exportin-5 RanGTP'ye bağlı bir mekanizma yoluyla çekirdekten sitoplazmaya aktarılır. Sitoplazmada, bir RNaz III endonükleaz olan Dicer proteini ve protein kinaz R aktivatörü (PACT) veya transaktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein (TRBP) yardımcı faktörleri ile bir kompleks oluşur. Bu kompleks, pre-miRNA'yı işleyerek olgun bir miRNA dubleks olarak adlandırılan, 17-24 nükleotit uzunluğunda çift sarmallı miRNA (ds-miRNA)'yı oluşturur. Argonaute proteini (AGO) yardımıyla, iki iplikçikten biri parçalanır ve diğeri (AGO'ya bağlı) işleme tabi tutulur. Bireysel miRNA duplekslerinin 5' (5p) ve 3' (3p) dizilerinden türetilen olgun miRNA'ların oranları değişir ve her iki zincir de bazı miRNA'lar için işlevseldir. Karışıklığı önlemek için, 5' ve 3' uçlarından gelen olgun miRNA'lar sırasıyla -5p ve -3p son ekleriyle belirtilir. Daha sonra

AGO bağımlı miRNA zinciri, RNA kaynaklı susturma kompleksine (RNA induced silencing complex-RISC) dahil edilir. Bu yeni kompleks, hedef mRNA'nın 3' veya 5' çevrilmemiş bölge (Untranslated region-UTR)'sindeki tamamlayıcı dizilere veya kısmi tamamlayıcılara bağlanır. Hedef mRNA'ların; ağırlıklı olarak 3' UTR bölgelerine komplementer nükleotid dizilimlerine sahip miRNA'lar, mRNA'ları destabilize ederek veya yıkarak ilgili genlerin susturulmasını sağlarlar (Benz ve ark., 2016, Kabekkodu ve ark., 2018, De Sousa ve ark., 2019, Matsuyama ve Suzuki 2019).



Şekil 2.2.1. Klasik miRNA sentez yolağı (Bautista-Becerril ve ark., 2021).

Kanonik miRNA biyogenezi klasik yol olsa da, miRNA sentezi için farklı alternatif yollar mevcuttur. Birkaç farklı RNA sınıfı yapısal ve işlevsel olarak miRNA'lara benzer; ancak, kanonik biyogenez yolundaki bir veya daha fazla adımı atlarlar. Drosha ve DGCR8, kanonik miRNA'ları işlemek için gereklidir ve bunların yokluğunda kanonik olmayan (non-kanonik) miRNA'lar üretilir. Non-kanonik miRNA'ların biyogenezinde, Drosha'dan ve Dicer'den bağımsız yollar dahil olmak üzere birkaç yol vardır. İyi bilinen bir non-kanonik yolda (mirtron), belirli dalları ayrılmış intronlar, pre-miRNA saç tokaları olarak işlev görebilir. Drosha/DGCR8'den bağımsız olan mirtron yolunda, intronlar splizomlar tarafından lariat mirtronlarına işlenir ve lariat dal ayırma enzimi tarafından dallara ayrılır ve ardından pre-miRNA saç tokalarına katlanırlar. Daha sonra, bu pre-miRNA kanonik yollarla benzer formda devam etmek için, exportin-5 tarafından sitoplazmaya aktarılır. Ve sentez sitoplazmada kanonik yola benzer şekilde devam eder (Saliminejad ve ark., 2019). Ayrıca miRNA sentezinde 3' ve 5' kuyruk mirtronları, transfer

RNA ve miR-451 yolağı gibi farklı birçok alternatif yolak da bulunmaktadır (Matsuyama ve Suzuki 2019).

2.2.3. MiRNA'nın Biyolojik Etkileri

Özellikle, miRNA'lar insan genomunun yaklaşık %1'ini temsil eder, ancak tüm protein kodlayan genlerin %60 kadarını düzenleyebilir ve yüzlerce mRNA'nın transkripsiyonunu etkileyebilir. MiRNA'lar, büyüme, çoğalma, farklılaşma, gelişme, metabolizma, enfeksiyon, immünite, apoptoz, organel biyogenezi, DNA onarımı ve kendini yenileme dahil olmak üzere hücresel işlevin her yönünü potansiyel olarak düzenleyebilirler. Değişen biyolojik fonksiyonlara yol açan miRNA'ların düzensizliği, karsinogenez gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynar (Kabekkodu ve ark., 2018). MiRNA'lar, antiviral savunma, onkogenез gibi çeşitli biyolojik süreçlerde çok önemli bir faktördür. Dolaşımdaki miRNA'lar, konak-patojen etkileşimlerinde önemli bir rol oynar ve patojene karşı konak tepkilerini oluşturur (Auvinen 2017).

Virüsler hücre içine girdiği zaman direkt ve indirekt etkilere yol açabilir. Enfeksiyondan sonra, RNA virüsü genomu, miRNA RISC kompleksinin miRNA viral 5' UTR, 3' UTR veya kodlama bölgelerindeki tamamlayıcı nükleotitlere bağlandığı zaman sitoplazmaya salınır. 5' UTR'ye bağlanan miRNA, RNA stabilitesine ve artmış viral replikasyona yol açar. 3' UTR'ye miRNA bağlanması, viral translasyonun inhibisyonuna veya artan RNA stabilitesine ve viral translasyona yol açabilir. İndirekt etki ise, viral RNA, PRR, TLR3, TLR7 ve RIG-I veya MDA5 tarafından tanınır ve IFN sinyal kaskadı aktive olur. IFN- α , IFN- β ve viral replikasyonu inhibe eden ISG'lerin sayısı artar. Viral enfeksiyon, IFN ve ISG indüksiyonu ayrıca hücre içindeki miRNA ekspresyonunda değişikliklere yol açabilir. Bu, viral replikasyon için gerekli olan hücresel proteinlerin yanı sıra, IFN sinyal kaskadında veya ISG ekspresyonunda ve işlevinde yer alan proteinleri yukarı veya aşağı doğru düzenler. Sonuç olarak, miRNA seviyelerindeki bu virüs aracılı değişiklikler, ya proviral ya da antiviral bir ortamla sonuçlanır (Trobough ve ark., 2017).

2.2.4. MiRNA ve Viral Hastalıklar

Virüs ve konakçı arasındaki etkileşimler kompleks ve karmaşıktır. Hücre içi replikasyon döngüleri nedeniyle, virüslerin konakçı hücrelerde hayatta kalmak ve çoğalmak için konakçı tarafından kodlanmış miRNA'ları kullanmalarını veya bunlardan kaçınmalarını sağlayan mekanizmaları mevcuttur. Virüsler, viral mRNA'ları hedefleyen hücresel miRNA'lardan kaçınabilir veya bazı anahtar proteinlerle etkileşime girerek

miRNA yolunu bloke edebilir/bozabilir. Ayrıca kendi miRNA'larını veya hücrel miRNA'ları kendi yararlarına kullanabilirler. Aksine, konakçı hücrenin endojen miRNA'ları da viral mRNA'ları hedefleyebilir. Bununla birlikte, hücrel miRNA'lar aynı zamanda HCV-miR-122 ilişkisinde olduğu gibi viral replikasyonu artırabilir (Piedade ve Azevedo-Pereira 2017).

Konak miRNA'lar, TLR tarafından virüsle ilişkili nükleik asidin tanınmasından sonra doğal yanıtı düzenleyerek viral enfeksiyona etki edebilir. MiR-126'nın, pDC'lerde TLR7 ve TLR9'un ekspresyonunu, tip I IFN aracılı doğuştan gelen bağışıklık tepkisi için çok önemli olan sinyal yollarında etkili olduğu bulunmuştur (Agudo ve ark., 2013).

Konak miRNA, TLR aracılı doğal immün yanıt sinyal yollarını düzenleyerek influenza A virüs replikasyonunu inhibe edebilir. H7N9 ile enfekte olmuş Th1 hücrelerinde miR-let-7e, konakçı hücrelerin bağışıklık tepkisini arttırarak hemagglütinin ekspresyonunu azaltır ve konakçı hücrelerin TLR4'ünün aracılık ettiği inflamatuvar cevaba katılarak virüsün replikasyonunu inhibe eder. Ayrıca IL-1 ve IL-6'yı hedefleyip anti-inflamatuvar sürece katılarak aşırı inflamatuvar yanıtı önler. Ek olarak, influenza A virüs enfeksiyonu sürecinde miR-200a, miR-29c, miR-650, miR-206 gibi miRNA'lar TLR sinyal yollarını etkileyerek, virüs replikasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder ve IFN ekspresyonunu indükler (Liao ve ark., 2021). MiR-155'in aşırı ekspresyonu ile inflamatuvar faktörlerin ekspresyonu ve NF- κ B faktörünün aktivasyonu artar. Sfingosin-1-fosfat reseptörü 1 (S1PR1), miR-155'in hedefidir. S1PR1, endotel hücrelerinde, bağışıklık hücrelerinde, lenfositlerde, makrofajlarda, kasta ve diğer doku hücrelerinde yaygın olarak ifade edilir. MiR-155, S1PR1'i hedefleyerek influenza A kaynaklı inflamasyonu aktif olarak düzenler (Shen ve ark., 2020). İnfluenza virüsü ile konakçı arasındaki etkileşimler sırasında, konakçı miRNA'lar virüs replikasyonunu doğrudan ve dolaylı olarak inhibe eder. Bununla birlikte, bazı miRNA'ların antiviral yanıt yolunu negatif olarak düzenleyebildiği, antiviral faktörlerin ekspresyonunu azaltabildiği ve influenza virüsünün replikasyonunu desteklediği bildirilmiştir (Liao ve ark., 2021). MiR-21-3p'nin aşırı ekspresyonu, influenza virüsü ile enfekte olmuş hücrelerde viral genlerin ekspresyon seviyelerini ve viral titrelerini önemli ölçüde artırmaktadır. IFN gibi antiviral faktörlerin ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır (Shi ve ark., 2020).

Çeşitli çalışmalarda, Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu sırasında virüs replikasyonunun ve patogenezinin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan birkaç miRNA

tanımlanmıştır. MiR-122, HCV genomik RNA'sının 5' UTR'sine bağlanarak viral replikasyonu ve translasyonu artırır. MiR-130a ekspresyonu, HCV ile enfekte hastalardan alınan karaciğer biyopsisinde yukarı regüle edilir ve antiviral interferon ile indüklenebilir trans-membran proteini hedefleyerek HCV replikasyonunu kolaylaştırır; miR-130a'nın yıkımı, hepatositlerde HCV replikasyonunu inhibe eder (Pascut ve ark., 2021).

Hücrel miRNA'lar, endojen mRNA hedeflerinin düzenlenmesi yoluyla virüs replikasyonunu dolaylı olarak artırabilir veya azaltabilir. MiR-21'in, HCV tarafından indüklenen tip I IFN üretiminde yer alan MyD88'i ve interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 1 (IRAK1)'i hedefleyerek baskılanmış IFN aracılı antiviral yanıtı neden olur, böylece viral replikasyonu artırır. Ayrıca artan miR-21, PTEN (kromozom 10'da silinen fosfataz ve tensin homoloğu) yoluyla stellat hücrelerin aktivasyonuna neden olarak hepatik fibrozisi tetikler. IFN ile indüklenen miR-196 ve miR-448'in ise, viral replikasyonun inhibisyonu için HCV genomik RNA'nın core ve NS5A kodlama bölgesini doğrudan hedef aldığı gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2014, Oura ve ark., 2020).

Genel olarak miRNA'lar, hücrel bir anti-viral savunma görevi görebilir veya virüs replikasyonunu veya kalıcılığını destekleyen hücrel bir ortam oluşturmaya yardımcı olmak için virüs tarafından kullanılabilir (Lamontagne ve ark., 2015). MiR-122, karaciğerde en çok bulunan miRNA olması sebebiyle hepatotropik virüslerde en sık araştırılan miRNA'dır. MiR-122, Hepatit B virüsü (HBV) yaşam döngüsünde antiviral bir rol alır. MiR-122 aşırı ekspresyonunun HBV ekspresyonunu inhibe ettiğini, endojen miR-122'nin tükenmesinin transfekte edilmiş hücrelerde HBV üretiminin artmasına neden olduğunu bildirilmiştir (Qiu ve ark., 2010). MiR-122 HBV ile enfekte hastalarda önemli ölçüde yukarı regüle edilir ve Huh7 ve HepG2 hücrelerinde HBV replikasyonunu inhibe edebilir. Genel olarak, miR-122, HCV ve HBV'ye göre viral replikasyonu artırabilir ve inhibe edebilir. Başka bir deyişle, hücrel miRNA'lar, artırıcı veya baskılayıcı mekanizmalarla viral yaşam döngülerini etkiler (Wei ve ark., 2013).

HBV ile ilişkili karaciğer hastalıklarında miR-148a, miR-96, miR-29c ve miR-602 gibi bazı miRNA'lar karaciğer dokularında anormal şekilde eksprese edilmiştir. Bu miRNA'lar virüs enfeksiyonu ve hastalık ilerlemesi ile ilişkilidir (Fan ve Tang 2014). MiR-602, kronik hepatitin çok erken evresinden HBV'nin neden olduğu siroz ve hepatoselüler karsinom (HCC)'a kadar aşırı eksprese edilmektedir. HCC'de miR-602'nin aşırı eksprese edildiği ve hedef tümör baskılayıcı genin ekspresyonunun normal karaciğere

kıyasla azaldığı bulunmuştur. HBV aracılı HCC için miR-602 erken bir teşhis belirteci olarak kullanılabilir (Yang ve ark., 2010).

HIV-1 enfeksiyonu sırasında miRNA ekspresyon profillerindeki değişiklikler araştırılmıştır. Bazı çalışmalar, HIV-1 yardımcı ve düzenleyici genlerini hedef alarak hücrel miRNA'ların, viral RNA'ları hedefleyerek HIV-1 replikasyonunu etkilediğini göstermiştir. MiR-29a ve miR-29b'nin HIV-1 nef gen ekspresyonunu hedeflediğini, bunun sonucunda nef gen translasyonunun baskılanmasına ve ardından viral yükte azalmaya neden olduğu bilinmektedir. MiR-133b, miR-138, miR-326, miR-149 ve miR-92a'nın HIV viral replikasyonunu %40 oranında azalttığı gösterilmiştir. MiR-326 5'UTR, miR-133b ve miR-138 env, miR-149 gag ve miR-92a pol gen bölgelerini hedefleyerek viral replikasyonun baskılanmasına yol açar (Chinniah ve ark., 2022).

Hücrel miRNA'lar ayrıca, virüs replikasyonunu veya konak savunmasını düzenleyerek HIV-1 replikasyonunu da module eder. MiR-146a'nın aşağı regülasyonu, CD4⁺ T hücrelerinde viral girişi teşvik eden CXCR4 ko-reseptörünün aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır (Chinniah ve ark., 2022). Yapılan in vitro bir çalışmada miRNA-155'in, üçlü motif içeren protein 32 (TRIM32)'nin HIV aktive edici etkilerini inhibe ederek HIV-1 latensini güçlendirebileceği gösterilmiştir (Ruelas ve ark., 2015). Özellikle monositlerde bulunan altı hücrel miRNA'nın (miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-20a, miR-93 ve miR-106b), pürin açısından zengin element bağlayıcı protein a (Pur-a)'nın baskılanmasıyla bağlantısı mevcuttur. Sonuç olarak, bu miRNA'ların monositlerde inhibisyonu, Pur-a ekspresyonunu artırarak HIV enfeksiyonunda bir artışa neden olur (Shen ve ark., 2012).

Monositlerde HIV-1 enfeksiyonunu kısıtlayan miR-198'in Cyclin T1'i baskıladığı mRNA'yı ve protein ekspresyonunu hedeflediğini ve aşağı regüle ettiğini, bunun da daha sonra enfekte monositlerde ve makrofajlarda HIV'in tat aracılı transkripsiyonel aktivasyonunu bozduğunu bildirmişlerdir. MiR-198'in aşırı ekspresyonu, makrofajlarda HIV replikasyonunu inhibe eder, bu da hücre tipine özgü mekanizmaların miRNA'lar tarafından yürütülen bir etki olabileceğini düşündürmektedir (Sung ve Rice, 2009).

2.2.5. COVID-19 ve MiRNA

Viral enfeksiyonlarda doğrudan veya dolaylı olarak enfeksiyon seyrine etki eden dolaşımdaki konakçı miRNA'ların çeşitliliğini ve önemini bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. Dolaşımdaki miRNA'ların viral enfeksiyonda, hücrel antiviral yanıtlarda

veya karmaşık düzenleyici yolları düzenleyerek virüslerin replikasyonu ve yayılmasında önemli rollere sahip olduğu gösterilmektedir. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında diferansiyel olarak eksprese edilen konakçı tarafından kodlanmış dolaşımda bulunan miRNA'lar bildirilmiştir. Yapılan bir araştırmada sağlıklı donörler ile COVID-19 hastalarının plazmasında dolaşan miRNA'lar karşılaştırılmıştır. Plazmada SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda diferansiyel olarak eksprese edilen toplam sekiz miRNA tanımlanmıştır; bunlardan miR-17-5p ve miR-142-5p aşağı regüle edilirken, miR-15a-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-23a-3p, miR-92a-3p ve miR-320a yukarı regüle edilmiştir. Enfeksiyonun erken evresinde miR-19a-3p, miR-19b-3p ve miR-92a-3p ortaya çıkmaya başlamıştır. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun teşhisi için bu miRNA'ların potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Fayyad-Kazan ve ark., 2021). Diğer bir çalışmada sağlıklı bireyler ile şiddetli COVID-19 ve influenza-ARDS hastalarından alınan serum örneklerinde kardiyomiyositlere özgü miRNA'ların ekspresyonu araştırılmıştır. MiR-21, miR-155, miR-208a ve miR-499'un serum konsantrasyonları, COVID-19 hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla önemli ölçüde artmıştır. MiR-155, miR-208a ve miR-499, COVID-19 ve influenza-ARDS hastalarını ayırt etmede net bir ayrım göstermiştir. Bulgular, COVID-19'un spesifik bir yanıtı ve kardiyak tutulumu olduğunu desteklemektedir (Garg ve ark., 2021). Ek olarak, de Gonzalo-Calvo ve arkadaşları yoğun bakımda yatan COVID-19 hastalarının dolaşımdaki miRNA profilini incelemiştir. Kan örneklerinde miR-16-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-132-3p, miR-192-5p ve miR-323a-3p'nin yoğun bakıma yatıp eks olan hastalarda baskılandığı gösterilmiştir. MiR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-148a-3p, miR-199a-5p ve miR-491-5p, servisteki hastalara kıyasla yoğun bakım ünitesi hastalarında yukarı regüle edilmiştir. MiR-192-5p ve miR-323a-3p, şiddetli COVID-19'un klinik fazında, yoğun bakımda hayatta kalmayanları hayatta kalanlardan ayırmıştır ve diğer laboratuvar parametrelerinden daha yüksek bir mortalite tahmininde bulunduğu bildirilmiştir. Dolaşımdaki miRNA profillemesi, kritik COVID-19 hastalarında riske dayalı hasta sınıflandırması için yararlı bir araç olarak ortaya konulmaktadır (de Gonzalo-Calvo ve ark., 2021).

Şiddetli COVID-19 vakalarında, bağışıklık sisteminin proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salgılanmasıyla karakterize edilen SARS-CoV-2'ye hiperinflamatuvar bir yanıt geliştirdiği bilinmektedir. Klinik kanıtlar, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna sekonder sitokin fırtınası oluşumunun, ciddi vakalarda hızlı kötüleşme ve yüksek ölüm oranı ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Hiperinflamatuvar yanıt, COVID-19'un ciddiyetinin ve

prognozunun belirleyicisi olarak kabul edilir ve bu süreç, dolaşımdaki miRNA'ların düzenlenmesiyle de ilişkilidir (Liang ve ark., 2023). Sitokinlerin düzenlenmesindeki rolleri ve ayrıca endotel fonksiyonunu düzenleyen genetik reseptörler nedeniyle miRNA'lar ile inflamatuvar immün yanıt arasında yakın bir ilişki vardır. Yapılan bir çalışma, COVID-19 hastalarında miR-146a, miR-21 ve miR-142'nin aşağı regülasyonunun inflamatuvar süreci desteklediğini ve şiddetlendirdiğini göstermiştir. miR-146'ın azalması proinflamatuvar NF- κ B yolunun ve mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz yolunun aktivasyonuna neden olur. Ek olarak, interlökin üretimini şiddetlendiren IRAK-1, IRAK-2 ve tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 6'nın (TRAF-6) ekspresyonunu artırır (Tang ve ark., 2020). miR-146a ile IL-6 dengesinin bozulması, proinflamatuvar sitokinlerin modülasyonunu bozabilir ve hiperinflamatuvar bir durumu indüklemek için salgılanmalarını kolaylaştırabilir. MiR-146a'nın aşağı regülasyonunun, yetersiz konak antiviral yanıtı ile sonuçlanması, daha uzun süreli ve aşırı sitokin salınımı göstermesi ve dokulardaki inflamatuvar hasarı sınırlayacak bir geri bildirim mekanizmasının olmaması nedeniyle, şiddetli COVID-19'da altta yatan faktörlerden biri olabileceği öne sürülmüştür (Roganović 2021). Ayrıca proinflamatuvar sitokinlerin (TNF/IL-12) miR-21 birikimini arttırdığı ve makrofajlarda bir anti-inflamatuvar yanıtı indüklediği de doğrulanmıştır. Yukarı regüle edilmiş miR-19a/b seviyeleri, TGF- β sinyal yolu tarafından sağlanan immünoşüpresif ve antiinflamatuvar rolü inhibe ederek COVID-19 hastalarında görülen inflamatuvar fırtınaya dahil olabilir. TGF- β sinyal kaskadı, düzenleyici T hücrelerini indükleyerek, B ve T hücrelerinin işlevini inhibe etmenin yanı sıra M2 makrofaj yanıtını destekleyerek önemli bir immünoşüpresif ve antiinflamatuvar rol oynar (Fayyad-Kazan ve ark., 2021).

NLRP3, kaspaz-1'i aktive ederek doğuştan gelen bağışıklığı tetikler ve ardından inflamatuvar yanıtı indükleyerek IL-1 β ve IL-18 gibi sitokinlerin üretimini artırır. Dolaşımdaki miR-223'ün, NLRP3, IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 dahil olmak üzere çeşitli faktörleri hedefleyerek antioksidan ve antiviral etkisinin olduğu ve inflamasyonu kontrol altına aldığı; serum miR-223-3p'nin SARS-CoV-2'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Huang ve ark., 2021, Houshmandfar ve ark., 2021).

COVID-19'da ölen hastaların yayınlanan otopsi raporları, virüsün öncelikle akciğerlere saldırdığını ve akut akciğer hasarına yol açtığını ortaya koymaktadır. Bir fare modelinde miR-486-5p'nin IL-1 β , TNF- α ve IL-6 ekspresyonunu artırarak inflamatuvar

yanıtı arttırdığı ve apoptozu inhibe eden OTUD7B aktivitesini inhibe ederek aşırı akciğer hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Luo ve ark., 2020). Yapılan çalışmalarda, dolaşımdaki miR-486-5p ve miR-146a, COVID-19'da önemli ölçüde yukarı regüle edilmiştir ve bunlardan dolaşımdaki miR-146a, kısa vadeli mortaliteyi tahmin etmek için kullanılabildiği ifade edilmiştir (de Gonzalo-Calvo ve ark., 2021). Aksine, COVID-19'da diferansiyel olarak eksprese edilen başka bir miRNA olan miR-16-5p, enfeksiyondan sonra akciğer hasarına karşı koruyucu bir mekanizma ile ilişkilendirilmiştir (Tang ve ark., 2020). MiR-16-5p'nin aşırı ekspresyonu inflamasyonu azaltabilir ve fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)'ı doğrudan inhibe edebilir, böylece NF- κ B aktivasyonunu ve TNF- α üretimini etkileyebilir (Zhang ve ark., 2019). SARS-CoV-2'nin bronkoalveolar kök hücrelerde miR-223 ekspresyonunu aşağı regüle ettiği bulunmuştur. MiR-223'ün inhibisyonu, ACE2 reseptörlerini artırır, viral replikasyonu güçlendirir ve çoklu inflamatuvar kaskadlarını aktive eder. Bunun sonucunda, akciğer hücreleri sürekli yıkıma, artan proinflamatuvar sitokinlere ve onarım kapasitelerinin kaybına maruz kalır. Ayrıca miR-223'ün daha düşük seviyelerinin, COVID-19'un ciddi klinik belirtileriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Mirzaei ve ark., 2021, Demiray ve ark., 2021). MiR-21, farklı düzenleyici yollarda rol oynayan ve neoplastik ve diğer hastalıklarda dolaşımda değişen seviyelerde bol miktarda bulunan bir miRNA'dır. Özellikle, koronavirüslerin miR-21 için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. SARS-CoV-2 veya inflamatuvar veya diğer etkilenen süreçler, dolaşımdaki miR-21 seviyelerini değiştirebilir. Bu durum makrofajların alternatif aktivasyonuna, PI3K yoluyla insan solunum yollarının yeniden şekillenmesine, PTEN proteininin düzenlenmesine ve düz kas proliferasyonuna yol açar. Programlanmış hücre ölümü reseptörü 4 (PDCD4), E-kadherin, metalloproteinaz 2, NF- κ B ve IL-12'nin doku inhibitörü gibi yolaklardaki mRNA'ları hedefleyerek daha ciddi hastalıklarda akciğerin yeniden şekillenmesini artırır (Jiang ve ark., 2019). Ek olarak, yapılan bir çalışmada miR-21'in yukarı regülasyonu, ventilasyon süresinin ve vazopresör desteğinin daha uzun süre devam edilmesi ile ilişkili bulunmuştur (Garg ve ark., 2021). Sonuç olarak, dolaşımdaki miRNA'lar, COVID-19 sürecinde akut akciğer hasarının oluşumu ve gelişimi için önemli moleküler hedefler olabilir ve patogeneze dair yeni bilgiler sağlayabilir.

MiR-21, kalpteki fibroblastların ERK-MAP kinaz sinyal yolunu değiştirerek antiapoptotik bir etki gösterir. Böylece, miR-21'in yukarı regülasyonu, fibroblastların hayatta kalmasını artırarak fibrozis ve hipertrofiye neden olur ve kardiyak disfonksiyon ile sonuçlanır (Kukreja ve ark., 2011). COVID-19 hastalarında önemli ölçüde artan ve

kardiyovasküler hasar ile endotelial inflamasyon, fibroblast proliferasyonu, apoptoz ve piroptoz ile ilişkili bir diğer miR, miR-155'tir. Bu değişiklikler, kalp yetmezliğine yol açan hipertrofi ve ventriküler disfonksiyona neden olur. COVID-19 hastalarının %23'ünde kalp yetmezliği gözlenmiştir ve miR-155 gibi miRNA'ların katıldığı düzenleyici yollar, kalp yetmezliği riskini artırabilir (Bautista-Becerril ve ark., 2021). Yapılan klinik bir çalışmada COVID-19 hastalarında miR-21 ve miR-155'in seviyeleri yüksek bulunmuştur (Garg ve ark., 2021).

MiR-208 ve miR-499, kalp kasına özgü miRNA'lardır. miR-208, kardiyomiyositlerde hemoglobin β ağır zincirinin ekspresyonunu düzenler, artışı kardiyak hipertrofi ve fibrozis ile ilişkilidir. MiR-499, p53, kalsinörin ve dinamin GTPaz 1 ile ilgili sitozolik protein gibi proteinler aracılığıyla hipoksi ve iskeminin neden olduğu apoptozu ve miyokardiyal hasarı engeller. Ek olarak, hasar veya yaralanma sonrası onarımı desteklemek için kardiyak kök hücrelerin yapısal ve işlevsel farklılaşmasından da sorumludur. Bu miRNA'ların değiştirilmesi, COVID-19 ile bu hastalıkta meydana gelen kardiyovasküler komplikasyonlar arasında güçlü bir ilişki olabileceğini düşündürür (Bautista-Becerril ve ark., 2021). Ayrıca bir fare modelinde miR-15b'in yukarı regülasyonu daha yüksek aritmi insidansı ile ilişkilendirilmiştir (Niu ve ark., 2020). MiR-133, kardiyak fibrozis, kardiyak hipertrofi ve aritmi için gerekli olan kardiyak hücrelerin proliferasyonuna, farklılaşmasına, hayatta kalmasına, hipertrofik büyümesine ve elektriksel iletimine katılmaktadır (Pieri ve ark., 2023). Bildirilen bir çalışmada dolaşımdaki miRNA'ların COVID-19 şiddeti ve 28 günlük mortalite ile ilişkisi incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, miyosit türevli miRNA olan miR-133a ve miR-208b şiddetli hastalığı olan hastalarda saptanırken, miR-133a 28 günlük mortalite ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, miR-133a'nın yukarı regülasyonu, inflamasyonun neden olduğu miyosit hasarını yansıtmaktadır (Gutmann ve ark., 2022).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan kritik hastaların %25'inde özellikle altta yatan hastalığı olanlarda akut böbrek hasarı yüksek mortalite oranları ile ilişkilidir. COVID-19'da miR-29'un azalması kollajen I, kollajen III, fibrillin ve renal elastin dahil olmak üzere hücre dışı matriste materyal birikimini artıran hücreleri aktive ederek yeniden şekillenmeyi indükleyebilir. Bu durum glomerüler fibrozis ve akut böbrek hasarı ile sonuçlanır (Bautista-Becerril ve ark., 2021). SARS-CoV-2 enfeksiyonundaki bir diğer miRNA, miR-18a'dır. Azalması, böbrek dokusunda kollajen ve fibrin oluşumunu

destekleyerek trombospondin-1 üretimini hızlandırabilir. Ayrıca miR-18a'nın, VEGF seviyelerini azaltarak renal disfonksiyona yol açabileceği öne sürülmüştür (Widiasta ve ark., 2020).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında dolaşımdaki miRNA'lar önemli bir değişikliği tetikleyebilir ve çoklu organ komplikasyonlarında kritik bir rol oynayabilir. Ayrıca miRNA'lar COVID-19'un ilerlemesini takip etmek için biyobelirteçler ve terapötik hedefler olarak kullanılabilir (de Gonzalo-Calvo ve ark., 2021).

Birçok virüse karşı konakçının bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde konakçı miRNA'lar önemli bir rol oynamaktadır. MiRNA'ların virüs replikasyonu ve konak savunması gibi görevlerinin olduğu bilinmektedir. SARS-CoV-2 pandemik bir virüs olması nedeni miRNA'ların COVID-19 patogenezindeki rolünün anlaşılması önemlidir. Bu çalışmada, SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırarak miR-1307, miR-155, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR-19a-3p, miR19b-3p, miR-16, miR-590, miR-let-7b-3p serum düzeylerini incelemek ve bu miRNA'ların klinik tabloyla ilişkisini belirleyerek patogenezdaki rolünün anlaşılmasına katkı ve fayda sağlamak amaçlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı ve Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, İlaç ve Tıbbi Cihaz dışı Araştırmalar Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi (Sayı: 2022/3754). Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 221518027 no'lu proje kapsamında desteklendi.

3.1. Örneklerin Toplanması

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli bölümlerden gelen solunum yolu örneklerinden SARS-CoV-2 pozitif hastalar belirlendi. SARS-CoV-2 pozitif hastanın, eş zamanlı kan isteminin olup olmadığı, yaş, cinsiyet ve hastanın klinik seyri Hastane Bilgi İşlem Sistemi'nde kayıtlı veriler üzerinden tespit edildi. Hastaya ait kan örneği varsa hasta çalışmaya alındı. Hastanın laboratuvara ulaşan kan numunesinden, çalışılan test sonrası arta kalan serum örnekleri kullanıldı. Serum örnekleri miRNA ekstraksiyon ve real time PZR yöntemi ile

seviye ölçümleri yapıncaya kadar -80°C'ye konarak saklandı. Ayrıca hastaların kliniği DSÖ kriterlerine göre hafif, orta ve ağır grup olarak sınıflandırıldı.

Kontrol grubu, hastanemize rutin kan tetkiki için gelen kişilerin laboratuvarımıza ulaşan kanları, Hastane Bilgi İşlem Sistemi'nde kayıtlı veriler üzerinden değerlendirilerek kronik hastalığı olmayan, yakın zamanda COVID-19 veya başka bir enfeksiyon geçirmemiş kişiler arasından seçildi. Yine bu kişilerin rutin testleri sonrası arta kalan serum örnekleri çalışmada kullanıldı.

PZR yöntemi ile COVID-19 tanısı konan 70 hasta ve herhangi bir hastalığı olmayan 30 kontrol grubunun periferik kan örneklerinden 10 miRNA'nın (miR-1307, miR-155, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR-19a-3p, miR19b-3p, miR-16, miR-590, miR-let-7b-3p) gerçek zamanlı PZR yöntemi ile seviye ölçümlerinin gerçekleştirilmesi için numuneler çalışma gününe kadar saklandı.

3.2. SARS-CoV-2 Tespiti

Nazofaringeal sürüntü alınan hastaların örnekleri vNAT™ viral taşıma besiyeri içerisinde 2-8°C taşıma koşullarında laboratuvarımıza ulaştırıldı. Test, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon (qRT- PZR) yöntemiyle çalışıldı. SARS-CoV-2 RNA tespiti için Bio-Speedy COVID-19 RT qPZR (Bioksen, İstanbul) kitleri ve Rotorgene Q (Qiagen, Almanya) termal döngü cihazı kullanıldı. Eşik döngü sayısı (Ct)<38 olan sigmoidal eğriler pozitif olarak değerlendirildi.

3.3. MiRNA analizi

MiRNA izolasyonu amacıyla SanPrep Column MicroRNA Mini-Prep Kiti (Bio Basic Inc., Toronto, Kanada) kullanıldı. MiRNA'dan cDNA elde edilmesi miRNA All-In-One cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Materials (abm) Inc., Richmond, Kanada) ticari kiti ile gerçekleştirildi. MiRNA seviye ölçümleri ise real time PZR kiti (Applied Biological Materials (abm) Inc., Richmond, Kanada) ile yapıldı. Bu amaçla aşağıda yer alan kimyasallar, cihazlar ve laboratuvar gereçleri kullanıldı:

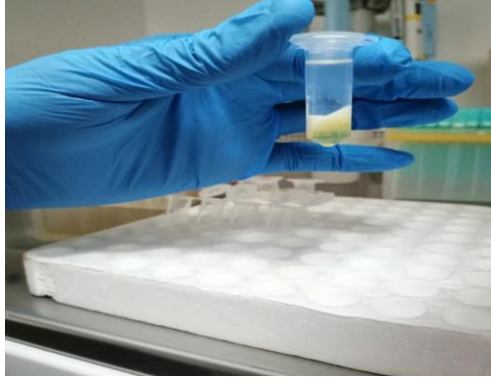
-miRNA izolasyon kiti

- miRNA ekstrakte edici
- Kloroform

- %100 Etanol
- RPE solüsyon
- RNAaz içermeyen su
- cDNA izolasyon kiti
 - RNA
 - 2X miRNA cDNA sentez süpermiks
 - Enzim miks
 - Nükleaz içermeyen su
- BlasTaq™ 2X qPZR Master Miks
- Abm U6 Referans Gen Primerleri
- Hedef miRNA Primerleri
- Mikrosantrifüj cihazı
- Vorteks karıştırıcı
- Etüv
- Mikrosantrifüj tüpleri
- Mikropipet seti ve steril filtreli mikropipet uçları
- Spin Kolonlar
- Toplama Tüpleri
- Termal Döngü Cihazı
- Real Time PZR (LightCycler® 96) cihazı
- Roche LightCycler® 96 Multiwell Plate (Çok kuyucuklu plak)

3.3.1. MiRNA İzolasyonu

1. 500 µl serum örneği RNase bulundurmeyen ependorf tüplere aktarıldı.
2. Numunenin tamamen parçalanması için serum örneğinin üzerine 1 ml miRNA ekstrakte edici eklendi ve oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi.
3. Serum üç faza ayırmak için çözeltiye 0.2 ml kloroform eklendi ve 30 saniye vortekslendi. Ardından 4 °C'de 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Elde edilen süpernatanttan 540 µl alındı ve 1.5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine %100 etanolden 180 µl eklendi ve birkaç kez pipetleme işlemi yapılarak karıştırıldı.
5. Daha sonra çözelti spin kolona aktararak ağzı kapatıldı. 12.000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüjlendi. Elde edilen 690 µl çözelti 1.5 ml'lik RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı.
6. 690 µL çözeltiye 460 µl %100 etanol eklenerek birkaç defa pipetleme yapıldı. Karıştırılan çözelti yeni bir spin kolona aktararak 2 dakika 12.000 x g'de santrifüjlendi. Ve akışta kalan sıvı atıldı.
7. Spin kolonuna 0.5 ml RPE çözeltisi eklenerek 30 saniye 12.000 x g'de santrifüj edildi. Akışta kalan sıvı atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
8. Etanolün tamamen uzaklaşması için spin kolon tekrar 12.000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi.
9. Spin kolon sütunu yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne konularak 30-50 µl RNaz içermeyen su eklendi. 2 dakika bekletildi. Ardından 30 saniye boyunca 12.000 x g santrifüj edildi. Tüpte kalan çözelti miRNA içermekte olup elde edilen miRNA'lar -20°C'de saklandı.



Resim 1. Üç Faza Ayrılmış Serum Örneği

3.3.2. MiRNA’lardan cDNA Elde Edilmesi

1. Her bir numune için tüm bileşenler belirtilen miktarlarda kit önerileri doğrultusunda hazırlandı (Tablo 3.1).

2. Total hacim 20 µl olacak şekilde kitin çalışma protokolüne uygun olarak çalışıldı.

3. Daha sonra hazırlanan karışıma termal döngü (Bio-Rad Laboratories, Inc., Türkiye) cihazında ısı protokolü uygulandı. Karışım 37°C’de 30 dakika, ardından 50°C’de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 85°C’de 5 dakika ısıtılarak reaksiyon durduruldu. Ve cDNA’lar elde edildi.

-PZR aşamasına geçmeden önce elde edilen cDNA’ların Nanodrop ile ölçümleri yapılarak, tüm örnekler 100 ng olacak şekilde sulandırıldı ve kullanıma hazır hale getirildi.



Resim 2. Termal Döngü Cihazı

Tablo 3.1. cDNA miks içeriği

Bileşen	Miktar
2X miRNA cDNA sentez süpermiks	10 µl
Enzim miks	2 µl
RNA	5 µl
Nükleaz içermeyen su	3 µl
Total hacim	20 µl

3.3.3. Real Time PZR

cDNA'ların referans gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve ilgili bölgeleri işaretlemek amacıyla BlasTaq™ 2X qPZR Master Miks ve U6 Primer Master Miks'leri üretici firma önerileri doğrultusunda Tablo 3.2'de belirtilen miktarlara göre hazırlandı.

Tablo 3.2. BlasTaq™ 2X qPZR Master Miks ve U6 Primer Master Miks İçeriği

Bileşen	Miktar
Master Miks	10 µL
Forward Primer	0.5 µL
Reverse Primer	0.5 µL
Su	4 µL
cDNA (100 ng)	5 µL
Total Hacim	20 µL

Hazırlanan referans gen real time PZR miks'leri ve hedef gen real time PZR miks'leri, uygun cDNA'lar ile LightCycler® 96 sistemine ait 96 mikro kuyucuklar üzerinde birleştirildikten sonra tablo 3.3'te yer alan ısı protokolü uygulandı. Real time PZR işlemi Light Cycler96 termal döngü cihazında gerçekleştirildi. Son olarak, eşik döngü (Ct) değerleri kaydedildi.

Tablo 3.3. PZR Isı Protokolü

İlk Denatürasyon	95°C’de 3 dakika (dk)
Denatürasyon (Bu döngü 40 kez tekrarlandı)	95°C’de 15 saniye (sn)
Primerlerin bağlanması ve uzaması (annealing/ekstensiyon) (Bu döngü 40 kez tekrarlandı)	60°C’de 1 dk
Erime Eğrisi	95°C’de 10 sn 65°C’de 1 dk 97°C’de 1 sn
Soğutma	40°C’de 1 dk

3.4. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma, kategorik değişkenler için frekans ve yüzde değerleri verildi. Kategorik değişkenlerin analizinde Ki kare testi kullanıldı. ΔC_t değerlerinin analizinde t testi ya da ANOVA testi kullanıldı. Relatif ekspresyonların hesaplanmasında Livak'ın $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanıldı ve $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ değerleri hesaplandı (Livak ve Schmittgen 2001). Analizler R 4.2.2. programı ile yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma grubumuz, qRT-PZR ile COVID-19 tanısı konmuş 70 hasta ve 30 sağlıklı bireyden oluşturuldu. Hasta grubu 41 (%58.57) erkek, 29 (%41.43) kadın hastadan oluşmakta olup, hastalardan 14 (%20)'ü hayatını kaybetmiştir. Hasta grubu hafif, orta, ağır hasta olmak üzere üç gruba ayrıldı. Kontrol grubunda ise 15 (%50) erkek, 15 (%50) kadın birey bulunmaktadır. Çalışma gruplarına ait demografik veriler Tablo 4.1'de yer almaktadır.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik veriler

Değişken	Kontrol, n = 30 ¹	Hafif, n = 20 ¹	Orta, n = 25 ¹	Ağır, n = 25 ¹	p ²
Yaş	36.03±8.89	40.05±18.33	65.60±8.13	66.88±11.72	<0.001
Cinsiyet					0.003
Erkek	15.00 (50.00%)	5.00 (25.00%)	17.00 (68.00%)	19.00 (76.00%)	
Kadın	15.00 (50.00%)	15.00 (75.00%)	8.00 (32.00%)	6.00 (24.00%)	

¹Mean±SD; n (%)

²One-way ANOVA; Pearson's Chi-squared test

Belirlenen referans genlerin ve hedef mikroRNA'ların Ct değerleri ile Δ CT değerleri hesaplandı. Hasta ve kontrol grubu ile 10 farklı miRNA'nın düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubu miRNA değerlerinin karşılaştırılması

Değişken	Kontrol, n= 30 ¹	Hasta, n = 70 ¹	p ²
miR-1307	12.00±1.17	11.38±0.94	0.014
miR-155	15.77±2.11	15.53±1.57	0.6
miR-146	13.28±2.18	12.14±1.21	0.011
miR-26a-5p	14.91±1.78	13.38±1.55	<0.001
miR-21	19.31±5.39	15.44±1.90	<0.001
miR-19b-3p	11.98±1.88	11.40±1.61	0.15
miR-19a-3p	11.71±1.89	10.42±1.14	0.001
miR-16	10.30±0.97	10.46±2.03	0.6
miR-590	13.94±1.70	13.85±1.66	0.8
miR-let7b-3p	16.71±1.38	14.32±1.62	<0.001

¹Mean±SD²Welch Two Sample t-test

Daha sonra COVID-19 hastalarından, hastalığı hafif, orta ve ağır geçiren hastalar ile on miRNA'nın ifade düzeyleri karşılaştırıldı (Tablo 4.3). Ve kontrol grubu ile hafif, orta ve ağır hasta grupları karşılaştırılarak Δ CT değerlerine ait istatistiksel veriler Tablo 4.4'te belirtildi.

Tablo 4.3. Hastalık şiddetine göre grupların miRNA değerlerinin karşılaştırılması

Değişken	Hafif, n = 20 ¹	Orta, n = 25 ¹	Ağır, n= 25 ¹	p ²
miR-1307	11.44±1.23	11.57±0.87	11.14±0.71	0.069
miR-155	15.38±0.95	15.08±1.56	16.10±1.84	0.063
miR-146	11.96±1.49	12.19±1.14	12.24±1.06	0.7
miR-26-5p	13.16±1.47	13.03±1.91	13.91±1.06	0.10
miR-21	15.30±1.87	15.74±2.33	15.25±1.43	0.6
miR-19b-3p	11.46±1.00	11.18±2.36	11.57±1.02	0.7
miR-19a-3p	10.38±1.11	10.02±1.30	10.85±0.84	0.032
miR-16	10.88±0.74	10.13±1.13	10.47±3.14	0.5
miR-590	13.63±1.52	14.37±1.49	13.52±1.87	0.2
miR-let7b-3p	14.73±1.59	13.90±1.91	14.41±1.24	0.2

¹Mean±SD; n (%)²One-way ANOVA; Pearson's Chi-squared test; Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test

Tablo 4.4. Kontrol grubu ile her hasta grubunun karşılaştırılması

Değişken	Kontrol, n = 30 ¹	Hafif, n = 20 ¹	Orta, n = 25 ¹	Ağır, n = 25 ¹	p ²
miR-1307	12.00±1.17	11.44±1.23	11.57±0.87	11.14±0.71	0.020
miR-155	15.77±2.11	15.38±0.95	15.08±1.56	16.10±1.84	0.2
miR-146	13.28±2.18	11.96±1.49	12.19±1.14	12.24±1.06	0.013
miR-26a-5p	14.91±1.78	13.16±1.47	13.03±1.91	13.91±1.06	<0.001
miR-21	19.31±5.39	15.30±1.87	15.74±2.33	15.25±1.43	<0.001
miR-19b-3p	11.98±1.88	11.46±1.00	11.18±2.36	11.57±1.02	0.4
miR-19a-3p	11.71±1.89	10.38±1.11	10.02±1.30	10.85±0.84	<0.001
miR-16	10.30±0.97	10.88±0.74	10.13±1.13	10.47±3.14	0.6
miR-590	13.94±1.70	13.63±1.52	14.37±1.49	13.52±1.87	0.3
miR-let7b-3p	16.71±1.38	14.73±1.59	13.90±1.91	14.41±1.24	<0.001

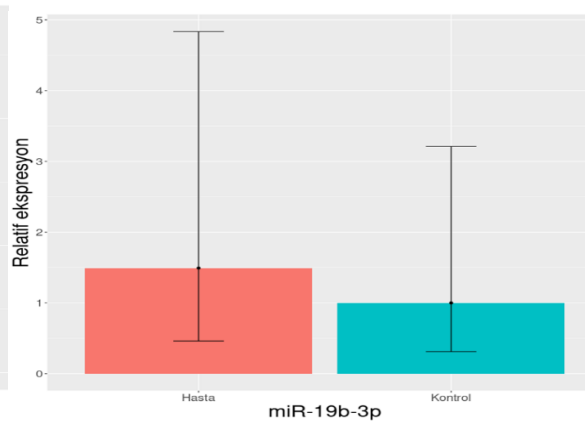
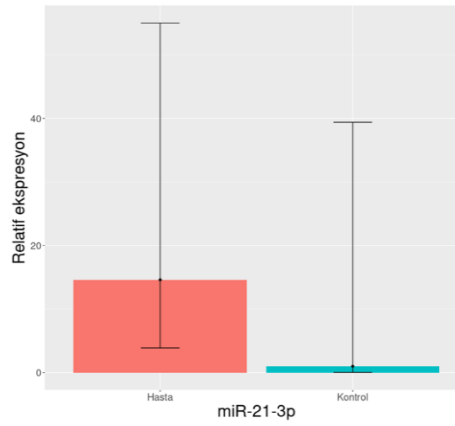
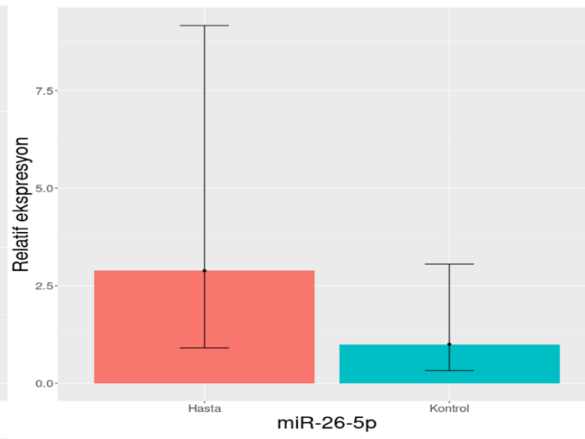
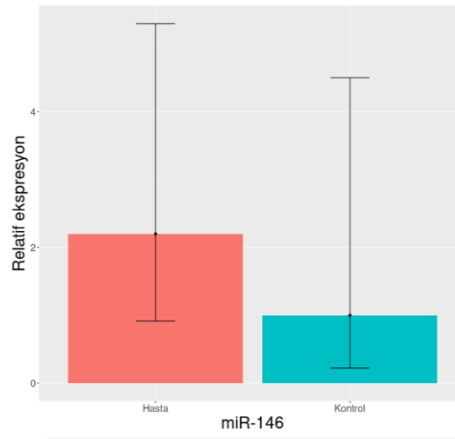
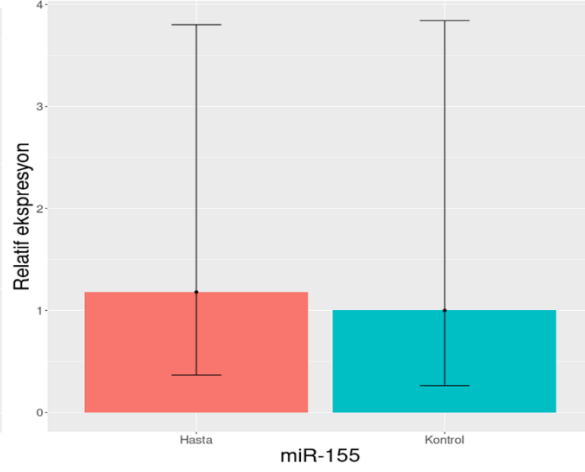
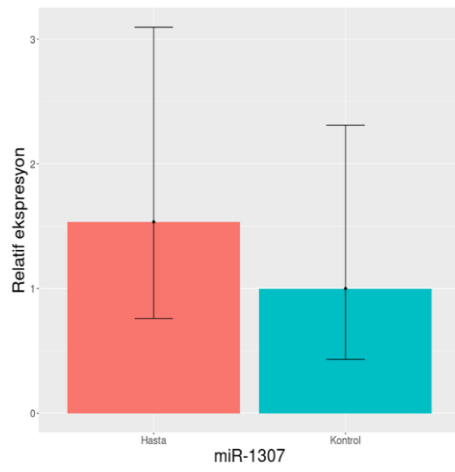
¹Mean±SD; n (%)²One-way ANOVA; Pearson's Chi-squared test

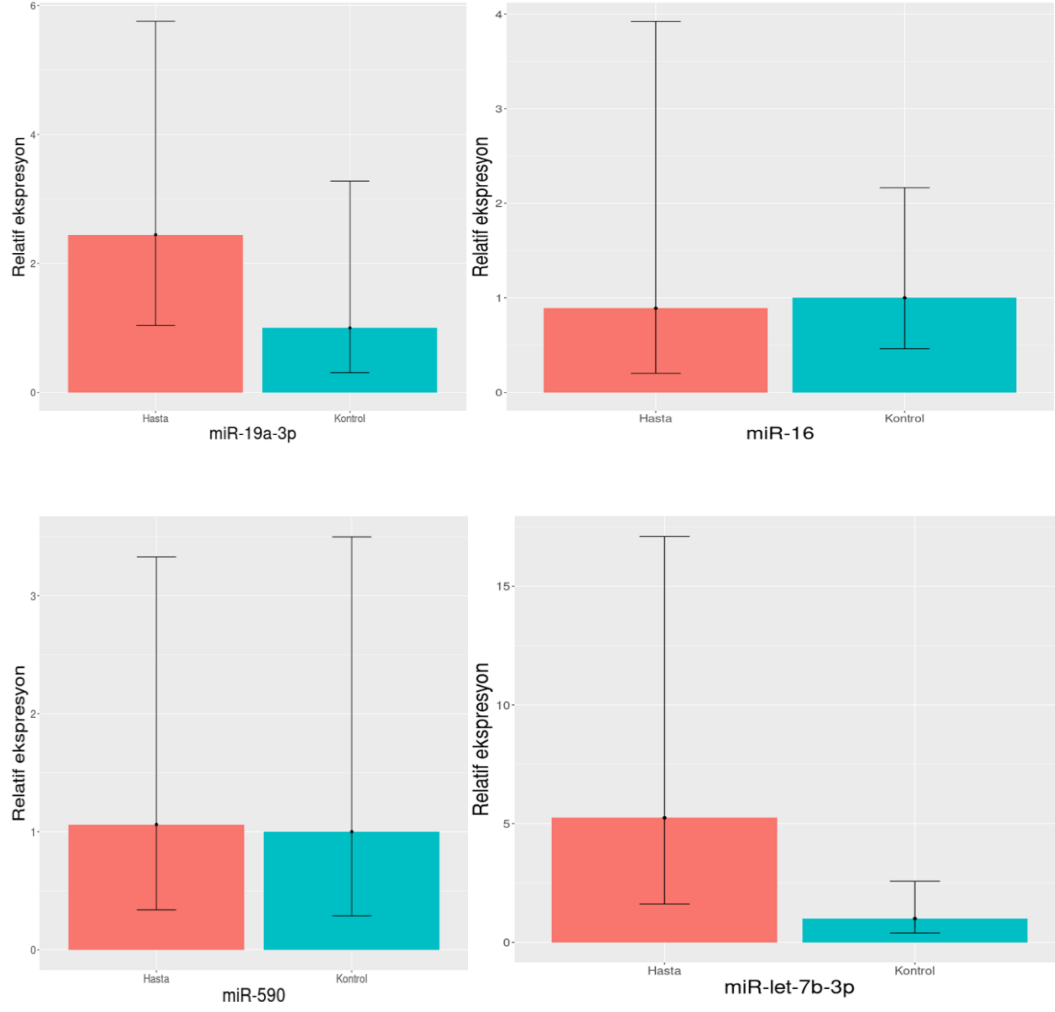
Ardından $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri analiz edildi. Ve bu değerlere göre hasta ve kontrol grubu arasındaki miRNA ekspresyon düzeyleri ve farklılıkları belirlenerek miRNA'ların ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve Tablo 4.5'te verildi. MiRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar ise Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	miRNA	Normalizasyon	Kalibrasyon	Relatif Ekspresyon
Hasta	miR-1307	11.380	-0.617	1.534
Kontrol	miR-1307	11.997	0.000	1.000
Hasta	miR-155	15.530	-0.238	1.180
Kontrol	miR-155	15.768	0.000	1.000
Hasta	miR-146	12.141	-1.138	2.200
Kontrol	miR-146	13.279	0.000	1.000
Hasta	miR-26a-5p	13.385	-1.529	2.885
Kontrol	miR-26a-5p	14.913	0.000	1.000
Hasta	miR-21	15.442	-3.868	14.601
Kontrol	miR-21	19.310	0.000	1.000
Hasta	miR-19b-3p	11.398	-0.578	1.493
Kontrol	miR-19b-3p	11.976	0.000	1.000
Hasta	miR-19a-3p	10.423	-1.290	2.445
Kontrol	miR-19a-3p	11.713	0.000	1.000
Hasta	miR-16	10.465	0.169	0.890

Kontrol	miR-16	10.296	0.000	1.000
Hasta	miR-590	13.854	-0.086	1.061
Kontrol	miR-590	13.939	0.000	1.000
Hasta	miR-let-7b-3p	14.320	-2.391	5.245
Kontrol	miR-let-7b-3p	16.711	0.000	1.000





Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubu miRNA'larının ekspresyon düzeyindeki farklılıkları

Çalışmanın bir sonraki adımı olarak hafif, orta ve ağır kliniğe sahip COVID-19 hastaları kontrol grubu ile kıyaslanarak miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve veriler Tablo 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.6. Kontrol grubu ile COVID-19 hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	miRNA	Normalizasyon	Kalibrasyon	Relatif Ekspresyon
Hafif	miR-1307	11.443	-0.554	1.468
Orta	miR-1307	11.574	-0.423	1.341
Ağır	miR-1307	11.136	-0.861	1.817
Kontrol	miR-1307	11.997	0.000	1.000
Hafif	miR-155	15.381	-0.387	1.308
Orta	miR-155	15.083	-0.685	1.607
Ağır	miR-155	16.095	0.327	0.797
Kontrol	miR-155	15.768	0.000	1.000
Hafif	miR-146	11.956	-1.323	2.501
Orta	miR-146	12.190	-1.089	2.127
Ağır	miR-146	12.240	-1.038	2.054
Kontrol	miR-146	13.279	0.000	1.000

Hafif	miR-26a-5p	13.165	-1.748	3.360
Orta	miR-26a-5p	13.032	-1.881	3.684
Ağır	miR-26a-5p	13.913	-1.001	2.001
Kontrol	miR-26a-5p	14.913	0.000	1.000
Hafif	miR-21	15.300	-4.010	16.111
Orta	miR-21	15.743	-3.567	11.853
Ağır	miR-21	15.255	-4.055	16.624
Kontrol	miR-21	19.310	0.000	1.000
Hafif	miR-19b-3p	11.460	-0.515	1.429
Orta	miR-19b-3p	11.177	-0.799	1.740
Ağır	miR-19b-3p	11.569	-0.407	1.326
Kontrol	miR-19b-3p	11.976	0.000	1.000
Hafif	miR-19a-3p	10.385	-1.328	2.510
Orta	miR-19a-3p	10.022	-1.691	3.229
Ağır	miR-19a-3p	10.854	-0.859	1.814
Kontrol	miR-19a-3p	11.713	0.000	1.000
Hafif	miR-16	10.876	0.580	0.669
Orta	miR-16	10.134	-0.162	1.119
Ağır	miR-16	10.466	0.171	0.888
Kontrol	miR-16	10.296	0.000	1.000
Hafif	miR-590	13.631	-0.308	1.238
Orta	miR-590	14.366	0.426	0.744
Ağır	miR-590	13.520	-0.419	1.337
Kontrol	miR-590	13.939	0.000	1.000
Hafif	miR-let-7b-3p	14.735	-1.976	3.934
Orta	miR-let-7b-3p	13.897	-2.814	7.031
Ağır	miR-let-7b-3p	14.411	-2.300	4.925
Kontrol	miR-let-7b-3p	16.711	0.000	1.000

MiR-1307-3p, miR-146, miR-26a-5p, miR-21, miR-19a-3p, miR19b-3p, miR-let-7b-3p'nin serum ekspresyon düzeyleri COVID-19 hastalarında daha yüksek tespit edildi. MiR-16'da azalmış ekspresyon seviyesi gözlemlendi. MiR-155 ve miR-590 ekspresyon seviyesi COVID-19 hastalarında kontrol grubuna göre değişkenlik göstermedi.

5. TARTIŞMA

SARS-CoV-2, önemli morbidite ve mortalite ile ilişkili bir pandemi olan COVID-19'un nedenidir. COVID-19 için tanısal biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin geliştirilmesine katkıda bulunabilecek alternatifler araştırılmaktadır. MiRNA'lar, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklıkta bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını, gelişimini ve aktivasyonunu düzenleyen çeşitli biyolojik süreçlerde kilit oyuncularındır (Guterres ve ark., 2020). Konak miRNA'lar viral gen ekspresyonunu baskılayarak viral replikasyonun azalmasına neden olur; bu viral baskı, viral gecikmeye katkı sağlayabilir (Piedade ve Azevedo-Pereira 2017). Ayrıca miRNA'lar COVID-19'da gerçekleşen komplikasyonlara katkı sağlayabilir, inflamatuvar cevapta da rol oynayarak enfeksiyonu arttırabilir veya sınırlandırabilir.

Çalışmamızda COVID-19 hastalarında miR-1307'nin ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre yukarı regüle idi. MiR-1307-3p ve miR-1307'nin daha önce akciğer dokusuyla ilişkili miRNA'lardan biri olduğu gösterilmiştir. Yenidoğanlarda akciğer gelişiminde özellikle önemli bir hedef olarak bildirilmiştir (Herrera-Rivero ve ark., 2018). Mir-1307 ekspresyonu insan kardiyak ve perikardiyak yağdan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerde aspirine yanıt olarak araşidonik asit metabolizması ile ilişkilendirilmiştir (Ruan ve ark., 2020). Ayrıca, miR-1307-3p dahil olmak üzere birkaç miRNA'nın, TGF- β gibi inflamatuvar tepkilerde yer aldığı gösterilmiştir. TGF- β ailesi, diğer işlevlerin yanı sıra alveolarizasyonu önemli ölçüde şekillendirerek ve hücre dışı matriks bileşimini ve doku homeostazını kontrol ederek doğum öncesi ve sonrası akciğer gelişiminde kritik roller oynar. TGF- β sinyali bu nedenle hem pulmoner hem de kardiyovasküler hastalıklarla güçlü bir şekilde bağlantılıdır. miR-1307'nin akciğerdeki rolü nedeni ile SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda oksijen bağımlılığı, acil mekanik ventilasyon ihtiyacı ve artan pulmoner enfeksiyon riski gibi kalıcı sorunlar ile ilişkisi olabilir (Arişan ve ark., 2020). Yapılan bir biyoinformatik analizde konakçı miR-1307'nin SARS-CoV-2 için bağlanma bölgeleri içerdiği bildirilmiştir (Imperatore ve ark., 2022). MiR-1307-3p'nin artan ifadesi, SARS-CoV-2 replikasyonunda bir azalmaya yol açar. MiR-1307-3p, apoptozu indüklemek ve proliferasyonu inhibe etmek için BCL2 gibi anti-apoptotik proteinleri etkileyebilir. Ek olarak, hücre döngüsü proliferasyonunu önlemek için PI3K yolunu inhibe edebilir (Balmeh ve ark., 2020). Arişan ve arkadaşlarının yaptığı in vitro bir çalışmada SARS-CoV-2 ile enfekte Vero hücrelerinde miR-1307'nin baskılanmasının viral enfeksiyonun sitotoksik

etkilerini önlediği bildirilmiştir (Arişan ve ark., 2022). Çalışmamızda miR-1307'nin hasta grupları arasında ağır grupta daha fazla eksprese olduğunu bulunduk. Konak-virüs etkileşimleri göz önüne alındığında, bu miRNA'nın COVID-19'da hem terapötik bir hedef olarak hem de hastalığın ciddiyetini tahmin etmek için kullanılabileceğini düşünüyoruz.

Çeşitli virüs enfeksiyonlarında önemli bir düzenleyici olan miRNA-155, birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynar. Esas olarak JAKs-STAT'ları, TLR ve NF- κ B sinyal yolunu düzenler. MiRNA-155'in makrofajlarda NF- κ B sinyal yolunu uyardığı ve TNF- α ve IL-6 üretimini indüklediği gösterilmiştir. Serum miR-155, sitokin sinyal baskılayıcı protein 1 (SOCS1)'i hedefleyerek ve Janus kinaz 2/sinyal dönüştürücüyü ve transkripsiyon 3 aktivatörünü (JAK2/STAT3) sinyal yolunu inhibe ederek inflamasyonu düzenler, bu da dolaşımdaki miR-155'in çok önemli bir rol oynayabileceğini gösterir. Ayrıca viral replikasyon ve antiviral yanıtta da katılır (Jiang ve ark., 2019). COVID-19 hastalarında yapılan bir çalışmada miR-155'in serum seviyesinin yukarı regüle olduğu bildirilmiştir (Garg ve ark., 2021). COVID-19'da yapılan başka çalışmada ise serum miR-155'in azaldığı ve hastalığın klinik seyri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Kassif-Lerner ve ark., 2022). Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyesi farklılığı az olmakla birlikte ağır hasta grubunda miR-155'in seviyesinin azaldığını tespit ettik. Bu çalışma, miR-155 ile ilgili yapılmış çalışmalara göre daha geniş hasta grubu içermektedir ve ağır COVID-19 hastalarında serum seviyesinin azaldığını doğrulamaktadır.

Virüslere karşı konakçının doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde konakçı miRNA önemli bir rol oynar. İnflamasyonu modüle eden miR-146a, bir virüse karşı bağışıklık reaksiyonu tarafından indüklenen ilk miRNA'lar arasındadır. Ayrıca, son analizler, miR-146'nın SARS-CoV-2 genomunu hedefleyebildiğini göstermektedir (Roganović 2021). Bu miRNA, proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin negatif regülasyonunda önemli bir rol oynar, böylece inflamatuvar yanıtın şiddetini modüle eder. MiR-146a, bağışıklık hücrelerinin proliferasyonunu düzenlemede ve inflamatuvar yanıtları inhibe etmede kritik bir role sahiptir. MiR-146 seviyeleri, TLR kaynaklı hücre içi sinyaline göre yukarı veya aşağı doğru düzenlenir. TLR3, miR-146 seviyesini yukarı regüle eden PI3K-JNK ve NF- κ B sinyal yollarını aktive eder. TLR2 sinyali, proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler üreterek inflamatuvar yanıtları artıran IRAK1-TRAF6, NF κ B yolunu aktive eder. MiR-146a'nın aktivasyonu, IRAK1 ve TRAF6'yı inhibe ederek proinflamatuvar

sitokinleri azaltır (Lee ve ark., 2016). MiR-146a, IRAK1 ve TRAF6'yı hedefleyerek doğal öldürücü hücrelerde (NK hücreleri) IFN- γ , üretimini negatif olarak düzenler ve ardından NF- κ B sinyal kaskadı inhibisyonu yapar (Wang ve ark., 2018). Ayrıca miR-146a, TRAF6'yı hedefleyerek enfekte makrofajlarda nitrik oksit (NO) üretimini azaltır ve bu mekanizma aracılığıyla hücre içi konak savunmasını azaltır. Artan miR-146a ekspresyonu, TNF- α , IL-1 β gibi proinflatuvar sitokinlerin indüklenmesini azaltır ve IL-6, IRAK-1 ve TRAF-6'yı hedefleyerek anti-inflatuvar bir etki gösterir (Testa ve ark., 2017). MiR-146'nın inflamasyonu ve NK hücre degranülasyonunu azaltmadaki rolü, çeşitli patolojik durumlarda ve diğer viral enfeksiyonlarda değişebilir. Karotis ateroskleroza olan hastalarda miR-146a'nın ekspresyon seviyelerinin periferik kanda yükseldiği gösterilmiştir (Huang ve ark., 2020). Gebe kadınlarda yapılan bir çalışmada, COVID-19 hastalarında miR-146 seviyesi yukarı regüle bulunmuştur. MiR-146'nın artışının, dokularda inflamatuvar hasarı sınırlayarak ve NK'ya bağlı sitotoksiteyi negatif olarak düzenleyerek şiddetli COVID-19'un kontrolüne katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Saulle ve ark., 2021). On sekiz COVID-19 hastası ve on beş sağlıklı bireyin dahil edildiği bir çalışmada miR-146 ekspresyon seviyesinin COVID-19'da sağlıklı gruba göre hasta grubunda 2,8 kat yüksek olduğu bildirilmiştir (Donyavi ve ark., 2021). Bir başka çalışmada ise, hafif COVID-19 hastalarında sağlıklı katılımcılara göre 2,3 kat daha fazla miR-146 ve şiddetli hastalarda 1,9 kat daha fazla miR-146 ekspresyonu bildirilmiştir (Kassif-Lerner ve ark., 2022). Çalışmamızda serum miR-146 seviyeleri hasta grubunda daha yüksek seviyede tespit edildi. Bu durum miR-146'nın inflamasyonu sınırlaması ile açıklanabilir. SARS-CoV-2'nin konak bağışıklığından kaçmak için miR-146'nın yukarı regülasyonuna neden olabileceğini de olası sebepler içerisinde. Ancak bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızda miR-146, hafif ve orta hasta gruplarında ağır hasta grubuna göre, daha yüksek seviyede eksprese edilmesine rağmen hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. Literatürdeki diğer çalışmalar değerlendirildiğinde COVID-19'da hastalık şiddeti için miR-146'nın değişken düzeylerde eksprese edildiği görülmektedir.

MiR-26, kalbe özgü olmamakla birlikte vücutta en çok kardiyovasküler sistemde bulunmaktadır. MiR-26a-5p, kardiyak miyosit biyolojisinde kardiyak hipertrofi, oksidatif stres ve atriyal fibrilasyon gibi durumlarda görev alır (İçli ve ark., 2014). İn vitro ve in vivo bir kardiyak iskemi/reperfüzyon (I/R) yaralanma modelinde miR-26a-5p'nin miyokardiyal I/R hasarındaki ekspresyonu ölçülmüştür. Ayrıca, miR-26a-5p'nin artmış

ekspresyonu, PI3K/AKT sinyal yolunu aktifleştirmektedir. PI3K/AKT sinyal yolunun aktifleşmesi ile PTEN ekspresyonu inhibe olmakta ve apoptoz inhibe edilmektedir. MiR-26a-5p'nin bu yolakla kardiyomiyositler üzerinde koruyucu etkisi olduğu tahmin edilmiştir (Xing ve ark., 2020). Başka bir fare deney modelinde ise, miR-26a-5p'nin kardiyak hipertrofisi olan farelerde aşağı regüle edildiği ve miR-26a-5p'nin aşırı ekspresyonunun, hipertrofik kalp belirtilerini tersine çevirdiği bildirilmiştir (Shi ve ark., 2021). Çalışmamızda COVID-19 hastalarında miR-26a-5p serum seviyesi 2.8 kat daha yüksek düzeyde eksprese edildiği bulundu. MiR-26a-5p'in kardiyoprotektif etkileri göz önüne alındığında, bu miRNA'nın COVID-19'da kalbi koruma yönünde düzenlendiği düşünülmektedir. Ek olarak ağır COVID-19 hastalarında kardiyak komplikasyonların görüldüğü bilinmektedir. Çalışmamızda ağır hasta grubunda diğer gruplara göre miR-26a-5p'nin daha düşük seviyede tespit edilmesi de bu durumu destekler niteliktedir.

Literatürde COVID-19 hastalarında miR-26a-5p'in araştırıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Park ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma 17 konakçı miRNA'nın, SARS-CoV-2 genomunun nadiren mutasyona uğramış ve korunmuş 3' UTR dizileriyle etkileşime girebildiğini ortaya çıkarmıştır. Bunlar arasında en önemli şekilde yukarı regüle edilen miRNA'lar miR-26a-5p, miR-92a-3p, miR-23a-3p, miR-103a-3p ve miR-181a-5p olmuştur. Bu miRNA'ların proinflamatuvar yanıtların baskılanması ve viral replikasyonun inhibisyonu ile ilgili olduğu tahmin edilmektedir (Park., ve ark., 2021). COVID-19 hastalarının post-mortem akciğer biyopsilerinin incelendiği bir çalışmada ise, akciğer dokularında miR-26a-5p'nin kontrol grubuna göre aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Centa ve ark., 2021). Çalışmamızın bu konuda literatürdeki eksikliği gidereceğini düşünmekteyiz.

MiR-21, birçok memeli hücre tipinde mikroRNA ailesinin en yüksek düzeyde ifade edilen üyelerinden biridir. Ekspresyonu solid tümörler, kalp yaralanması ve doku hasarı dahil olmak üzere birçok durumda artar (Sheedy 2015). MiR-21 ayrıca CCL20'yi (CC motifli kemokin ligandı 20) ve MYC'yi (bir regülatör genler ve proto-onkogenler ailesi) doğrudan hedefler, aşırı ekspresyonu T-hücresi aktivasyonunu teşvik eder (Maranini ve ark., 2022). MiR-21, kardiyak fibroblastlarda ERK-MAP kinaz sinyal yolunu düzenleyerek kardiyak yapı ve işlevi düzenler. İnterstisyel fibrozis ve kardiyak disfonksiyonun öncüsü olarak hareket eder. Yukarı regülasyonu, fibrozis ve hipertrofiye neden olarak kardiyak işlev bozukluğuna neden olan fibroblastların hayatta kalmasını kolaylaştırır (Thum ve ark.,

2008). Nersisyan ve arkadaşları viral genomla doğrudan bağlanma yoluyla tüm insan koronavirüslerini potansiyel olarak düzenleyen miR-21-3p, miR-195-5p, miR-16-5p, miR-3065-5p, miR-424-5p ve miR-421 dahil altı miRNA'yı tanıtmışlardır. MiR-21-3p'nin insan koronavirüs RNA'larına bağlama ve SARS-CoV-2 tarafından indüklenen enfeksiyon sırasında fare akciğerlerinde dramatik bir şekilde yukarı regüle edilme olasılığı en yüksek olan miR olduğunu bildirmişlerdir (Nersisyan ve ark., 2020). MiR-21, IL-1 reseptör 1'in 3'-UTR'sine bağlanarak negatif olarak düzenler (Zhang ve ark., 2020). Yapılan bir çalışma, COVID-19'da miR-125b, miR-138, miR-199a ve miR-21 ekspresyonunu TNF- α , IL-1 β ve IL-6'daki artışla ilişkilendirmiştir (Fani ve ark., 2021). Farklı bir klinik çalışmada miR-21'in yukarı regülasyonu, kronik miyokardiyal hasar ve inflamasyonun bir göstergesi olabileceği ifade edilmiştir (Garg ve ark., 2021). Altı şiddetli ve altı orta kliniğe sahip COVID-19 hastalarında yapılan bir çalışmada azalan miR-146a-5p, miR-21-5p seviyesinin muhtemelen şiddetli COVID-19'un biyobelirteçleri olabileceği öne sürülmüştür (Tang ve ark., 2020). Çalışmamızda miR-21'in serum seviyesinde 14.6 kat artış gözlemlendi. MiR-21, SARS-CoV-2 enfeksiyonunda tanınabilir. Ağır COVID-19 hastalarında miR-21 artmış serum seviyesi, kardiyak hasarla; hafif hasta grubunda ise T hücre aktivasyonu ile ilişkilendirilebilir. Ancak hasta grupları arasındaki ekspresyon farklılıkları nedeni ile bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Onkogenik miRNA olarak tanımlansa da miR-19 ailesinin de normal doku gelişiminin düzenlenmesinde önemli roller oynadığı bulunmuştur. MiR-19 ailesi seviyesinin hassas kontrolü, doku homeostazını ve organizmaların normal gelişimini korumak için gereklidir. MiR-19'un kalp, damar ve nöronların gelişimi ve hastalıklarında fonksiyonel mekanizmaları mevcuttur (Li ve ark., 2019). Özellikle miR-19a, astımlı hastaların T hücrelerinde yukarı regüle edilir ve PTEN'in doğrudan hedeflenmesiyle TH2 sitokin üretimini ve hava yolunda inflamatuvar sinyali destekler (Simpson ve ark., 2014). MiR-19a'nın şiddetli astımda TGF- β reseptör 2 sinyali yoluyla bronşiyal epitel hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Haj-Salem ve ark., 2015). MiR-19a'nın artmış ekspresyonu pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinde PTEN'i inhibe ederek PI3K/AKT sinyal yolu ile pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinin hücre proliferasyonunu ve göçünü arttırmıştır (Zhao ve ark., 2019). MiR-19b, Bcl2 benzeri 11 genini hedefleyerek Bcl-2-etkileşimli hücre ölümü aracısı proteinini azaltarak iskemiye bağlı kalp yetmezliğini tersine çevirir ve kardiyomiyosit apoptozunu inhibe eder (Yang ve ark., 2019). Otuz üç COVID-19 hastasında yapılan miR çalışmasında

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun teşhisi için plazma miR-19a-3p, miR-19b-3p ve miR-92a-3p potansiyel biyobelirteçler olarak araştırılmıştır. Artmış serum miR-19a/b seviyeleri, TGF- β sinyal yolu tarafından sağlanan immünoşüpresif ve antiinflamatuvar rolü inhibe ederek COVID-19 hastalarında görülen inflamasyona katkıda bulunabilir (Fayyad-Kazan ve ark., 2021). Bu çalışmada COVID-19 hastalarında serum miR-19a-3p, miR-19b-3p seviyelerinde yukarı regülasyon tespit edildi. Hasta grupları arasında farklılıklar olması nedeni ile hastalık sınıflaması için bu miRNA'ların kullanılamayacağını ancak COVID-19 için biyobelirteç olacağını düşünüyoruz. Bu miRNA'lar farklı hastalıklarda bildirilmesine rağmen viral hastalıklarla ilişkisini açıklayan çalışmalar mevcut değildir. COVID-19'da bu miRNA'ların daha fazla araştırılması faydalı olacaktır.

MiR-16, inflamasyon ve programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde görev alır. MiR-16'nın ateroskleroz, akut akciğer hasarı ve sepsiste antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinmektedir. Ayrıca, antiviral tepkiler için kritik olan T hücrelerinin hayatta kalması, farklılaşması ve çoğalması üzerinde değişikliklere neden olur (Eyileten ve ark., 2022). Lacedonia ve arkadaşlarının idiyopatik pulmoner fibrozis hastalarının serumunda miR-16 düzeylerinde bir azalma bildirmiştir (Lacedonia ve ark., 2021). Kalp yetmezliği ile ilgili yapılan bir meta-analizde düşük miR-16-5p ve miR-27a seviyeleri ekspresyonu olan hastalarda sağkalımın azaldığı gösterilmiştir (Yang ve ark., 2021). Yapılan bir biyoinformatik analizde miR-16'nın SARS-CoV-2-konak etkileşiminden sorumlu genleri hedefleme yeteneğini ortaya çıkarmıştır (Jafarinejad-Farsangi ve ark., 2020). Bir diğer biyoinformatik analizde ise ACE2 ile ilgili bağlantıları etkileme yeteneği olabileceği öne sürülmüştür (Wicik ve ark., 2020). Eyileten ve arkadaşlarının yaptığı analizde COVID-19 hastalarında miR-16 ekspresyonu ile mortalite arasında bir korelasyon bulunmamakla birlikte hastanede daha uzun süre kalan bireylerde anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (Eyileten ve ark., 2022). Bu çalışmada miR-16, COVID-19 hastalarında daha düşük ekspresyona sahipti. De Gonzalo-Calvo ve arkadaşlarının yoğun bakım ünitesinde yatan 36 ve serviste yatan 43 COVID-19 hastasının kan örneklerinde miR-16 seviyesinin servis hastalarında yüksek, yoğun bakım hastalarında düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (de Gonzalo-Calvo ve ark., 2021). Çalışmamızda hasta gruplarında miR-16 ekspresyon düzeyinde farklılıklar mevcuttur. Bu nedenle miR-16'nın hastalığın şiddeti hakkında bize ön fikir veremeyeceği kanısına varıldı.

MiR-590-3p, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4H geninin intronunda yer alan bir gen tarafından kodlanan, yakın zamanda tanımlanmış bir miRNA'dır. Son çalışmalar, miR-590-3p'nin miyokard hasar oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermiştir. Örneğin, miR-590-3p, miyokardın inflamatuvar kaynaklı hasarını hafifletmek için NF- κ B sinyal yolunu hedef alabilir. MiR-590-3p kardiyak fibroblastların kollajen sentezini, çoğalmasını, göçünü düzenlemektedir. Ayrıca, miR-590-3p'nin kardiyomiyositlerin proliferasyonunu desteklediği ve apoptozu inhibe ettiği bulunmuştur (Liu ve ark., 2020). MiR-590-3p'nin kalp üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır. SARS-CoV-2 spike proteini ile transfekte edilmiş hücrelerde, miR-148a ve miR-590 gibi miRNA'larla yüklü eksozomlar salınarak santral sinir sistemi hasarının gelişebileceği öne sürülmüştür (Mishra ve Banerjee, 2021). COVID-19 patogeneğinde miR-590 deneysel çalışmalarda araştırılmış olup yapılan klinik çalışmamızda COVID-19 hastalarında miR-590 ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmedi.

MiR-Let-7b-3p'nin birkaç yolak üzerinden etkileri olduğu bildirilmiştir. TNF üzerinden doğrudan veya IL-1 sekresyonunun uyarılmasıyla dolaylı olarak ateşe neden olabilir; kaşeksinin indüksiyonunda yer alır. Belirli koşullar altında, hücre proliferasyonunu uyarabilir ve hücre farklılaşmasını indükleyebilir. Düzenleyici T-hücresi (Treg) işlevini bozabilir. TGF- β aracılığıyla akciğer fibrozisine katkıda bulunabilir. NF κ B-1 genini hedefleyerek NF-kappa-B yolağı ile inflamasyon, bağışıklık, farklılaşma, hücre büyümesi, tümör oluşumu ve apoptoz üzerinde etkilere sahiptir (Maranini ve ark., 2022). MiR-16, miR-21, let-7b, let-7e ve miR-146a'nın COVID-19 hastalarının akciğer dokusunda diferansiyel olarak eksprese edilen genleri (örn. STAT1, CCND1 ve CXCL-10) hedefleyebileceği iddia edilmiştir. Bu genler sitokin sentezinde yer alan sinyal yollarına katılmaktadır (Jafarinejad-Farsangi ve ark., 2020). Bir biyoinformatik analizde, let-7'nin S ve M proteinlerini hedefleyerek SARS-CoV-2 replikasyonunu baskıladığı doğrulanmıştır. Aynı çalışmada let-7, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ve VEGF- α dahil olmak üzere birçok sitokin ve kemokinin ekspresyonunu inhibe ederek çoklu inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu baskılayabilir (Xie ve ark., 2021). Daha önce let-7e'nin influenza virüsünün viral replikasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Liao ve ark., 2021).

Donyavi ve arkadaşları, COVID-19 hastalığının akut fazında let-7b-3p'nin ekspresyon seviyesinin akut COVID-19 sonrası döneme göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (Donyavi ve ark., 2021). Çalışmamızda COVID-19

hastalarında let-7b-3p'nin ekspresyon seviyesi beş kat artış gösterdi. Hasta grupları arasında ise ekspresyon düzeyinde farklılıklar olup istatistiksel olarak fark bulunmadı. Bu çalışma COVID-19 hastalarında let-7b-3p'nin arttığını bildiren çalışmalardan biridir. Let-7b-3p'nin inflamasyonu ve viral replikasyonu baskılaması olasıdır. Ancak bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde miRNA'ların viral enfeksiyonlarda rol oynadığına dair çalışmalar bulunmasına karşın pandemik SARS-CoV-2 enfeksiyonu esnasında eksprese edilen konak miRNA'lara dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmaların bir kısmı biyoinformatik analizlere veya hayvan deneylerine dayanmaktadır. Bu çalışma, özellikle COVID-19'da inflamatuvar yanıtta anormal miRNA ekspresyon paternlerine odaklandı. Çalışmamız bölgemizden bildirilen ilk çalışma olup, ülkemizden bildirilen çalışmaların ise ilklerindendir. SARS-CoV-2'ye karşı bağışıklık tepkisini yönlendiren potansiyel miRNA'ların araştırılmasına ve SARS-CoV-2'nin neden olduğu klinik tabloların mekanizmalarının açıklanmasına fayda sağlayacaktır. Çalışmamızda araştırdığımız miRNA'lardan miR-26a-5p'in ve miR-21'in birbirine zıt etkili olduğu tespit edildi. MiR-26a-5p'nin kardiyoprotektif etkileri söz konusu iken miR-21'in kardiyak hasarla ilişkili olması dikkat çekicidir.

MiRNA'ların COVID-19 patogenezinde farklı rollerde yer almakta olduğunu görmekteyiz. MiRNA'lar viral replikasyonun baskılanmasından, hastalığın komplikasyonlarına kadar birçok mekanizma da görev almaktadır. SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 hastalığının patogenezinin anlayabilmemiz için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. MiRNA'lar COVID-19 için tanısal biyobelirteç ve terapötik hedef olabilirler. Çalışmamızda değişen miRNA ekspresyon düzeyleri tespit edildi. Hastalığın patogenezinin anlaşılmasında in vivo ve in vitro deneyler ile birlikte klinik çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR

- AbdelHamid SG, Refaat AA, Benjamin AM, Elmawardy LA, Elgendy LA, Manolly MM, et al. Deciphering epigenetic(s) role in modulating susceptibility to and severity of COVID-19 infection and/or outcome: a systematic rapid review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021;28:54209–54221. doi: 10.1007/S11356-021-15588-6.
- Agudo J, Ruzo A, Tung N, Salmon H, Leboeuf M, Hashimoto D, et al. The miR-126–VEGFR2 axis controls the innate response to pathogen-associated nucleic acids. *Nat. Immunol.* 2013;15 54–62.
- Ahmadian E, Hosseiniyan Khatibi SM, Razi Soofiyan S, Abediazar S, Shoja MM, Ardalan M, et al. Covid-19 and kidney injury: Pathophysiology and molecular mechanisms. *Rev Med Virol.* 2021;31(3):e2176. doi: 10.1002/rmv.2176.
- Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol.* 2021;93(4):e12998. doi: 10.1111/sji.12998.
- Arişan ED, Dart A, Grant GH, Arisan S, Cuhadaroglu S, Lange S, et al. The Prediction of miRNAs in SARS-CoV-2 Genomes: hsa-miR Databases Identify 7 Key miRs Linked to Host Responses and Virus Pathogenicity-Related KEGG Pathways Significant for Comorbidities. *Viruses.* 2020;12(6):614. doi: 10.3390/v12060614.
- Arişan ED, Dart DA, Grant GH, Dalby A, Kancagi DD, Turan RD, et al. microRNA 1307 Is a Potential Target for SARS-CoV-2 Infection: An in Vitro Model. *ACS Omega.* 2022;7(42):38003–38014. doi: 10.1021/acsomega.2c05245.
- Asakura H, Ogawa H. COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol.* 2021;113(1):45–57. doi: 10.1007/s12185-020-03029-y.
- Auvinen E. Diagnostic and Prognostic Value of MicroRNA in Viral Diseases. *Mol Diagn Ther.* 2017;21(1):45–57. doi: 10.1007/s40291-016-0236-x.
- Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses.* 2021;13(6):1115.
- Balmeh N, Mahmoudi S, Mohammadi N, Karabedianhajiabadi A. Predicted therapeutic targets for COVID-19 disease by inhibiting SARS-CoV-2 and its related receptors. *Inform Med Unlocked.* 2020;20:100407. doi: 10.1016/j.imu.2020.100407.
- Barbu MG, Condrat CE, Thompson DC, Bugnar OL, Cretoiu D, Toader OD, et al. MicroRNA Involvement in Signaling Pathways During Viral Infection. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:143. doi: 10.3389/FCELL.2020.00143.
- Bautista-Becerril B, Pérez-Dimas G, Sommerhalder-Nava PC, Hanono A, Martínez-Cisneros JA, Zarate-Maldonado B, et al. miRNAs, from Evolutionary Junk to Possible Prognostic Markers and Therapeutic Targets in COVID-19. *Viruses.* 2021;14(1):41. doi: 10.3390/v14010041.
- Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, Thum T. Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev.* 2016;96(4):1297–325. doi: 10.1152/physrev.00041.2015.

- Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):78. doi: 10.3390/ijms17010078.
- Bhatraju PK, Ghassemieh BJ, Nichols M, Kim R, Jerome KR, Nalla AK, et al. Covid-19 in critically ill patients in the Seattle region - case series. *N Engl J Med.* 2020;382:2012–22. doi: 10.1056/NEJMoa2004500.
- Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Möller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 2020;181(5):1036-1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.
- Centa A, Fonseca AS, da Silva Ferreira SG, Azevedo MLV, de Paula CBV, Nagashima S, et al. Deregulated miRNA expression is associated with endothelial dysfunction in post-mortem lung biopsies of COVID-19 patients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2021;320(3):L405-L412. doi: 10.1152/ajplung.00457.2020.
- Chams N, Chams S, Badran R, Shams A, Araji A, Raad M, et al. COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Front Public Health.* 2020;8:383. doi: 10.3389/fpubh.2020.00383.
- Chen Z, Xu W, Ma W, Shi X, Li S, et al. Clinical laboratory evaluation of COVID-19. *Clin Chim Acta.* 2021;519:172-182. doi: 10.1016/j.cca.2021.04.022.
- Chinniah R, Adimulam T, Nandlal L, Arumugam T, Ramsuran V. The Effect of miRNA Gene Regulation on HIV Disease. *Front Genet.* 2022;13:862642. doi: 10.3389/fgene.2022.862642.
- de Gonzalo-Calvo D, Benítez ID, Pinilla L, Carratalá A, Moncusí-Moix A, Gort-Paniello C, et al. Circulating microRNA profiles predict the severity of COVID-19 in hospitalized patients. *Transl Res.* 2021;236:147-159. doi: 10.1016/j.trsl.2021.05.004.
- De Sousa MC, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action via miRNA Editing. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:6249. doi: 10.3390/ijms20246249.
- De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster, VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(8):523-534.
- Demiray A, Sarı T, Çalışkan A, Nar R, Aksoy L, Akbubak IH. Serum microRNA signature is capable of predictive and prognostic factor for SARS-CoV-2 virulence. *Turk. J. Biochem.* 2021;46:245–253.
- Deniz M, Tezer H. Vertical transmission of SARS CoV-2: a systematic review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2022;35(14):2655-2662. doi: 10.1080/14767058.2020.1793322
- Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;8(8):CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705.
- Donyavi T, Bokharaei-Salim F, Baghi HB, Khanaliha K, Alaei Janat-Makan M, Karimi B, et al. Acute and post-acute phase of COVID-19: Analyzing expression patterns of miRNA-29a-3p, 146a-3p, 155-5p, and let-7b-3p in PBMC. *Int Immunopharmacol.* 2021;97:107641. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107641.

- Esendağlı D, Yilmaz A, Akçay Ş, Özlü T. Post-COVID syndrome: pulmonary complications. *Turk J Med Sci.* 2021;51(SI-1):3359-3371.
- Eyileten C, Wicik Z, Simões SN, Martins-Jr DC, Klos K, Włodarczyk W, et al. Thrombosis-related circulating miR-16-5p is associated with disease severity in patients hospitalised for COVID-19. *RNA Biol.* 2022;19(1):963-979. doi: 10.1080/15476286.2022.
- Fan HX, Tang H. Complex interactions between microRNAs and hepatitis B/C viruses. *World J Gastroenterol.* 2014;20(37):13477-92. doi: 10.3748/wjg.v20.i37.13477
- Fani M, Zandi M, Ebrahimi S, Soltani S, Abbasi S. The role of miRNAs in COVID-19 disease. *Future Virol.* 2021;16(4):301–306. doi: 10.2217/fvl-2020-0389.
- Fayyad-Kazan M, Makki R, Skafi N, El Homsy M, Hamade A, El Majzoub R, et al. Circulating miRNAs: Potential diagnostic role for coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Infect Genet Evol.* 2021;94:105020. doi: 10.1016/j.meegid.2021.105020.
- Filchakova O, Dossym D, Ilyas A, Kuanysheva T, Abdizhamil A, Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta.* 2022;244:123409. doi: 10.1016/j.talanta.2022.
- Garg A, Seeliger B, Derda AA, Xiao K, Gietz A, Scherf K. et al. Circulating cardiovascular microRNAs in critically ill COVID-19 patients. *Eur J Heart Fail.* 2021;23(3):468–75. doi: 10.1002/ehf.2096.
- Gupta P, Cairns MJ, Saksena NK. Regulation of gene expression by microRNA in HCV infection and HCV-mediated hepatocellular carcinoma. *Virol J.* 2014;11:64. doi: 10.1186/1743-422X-11-64.
- Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1716. doi: 10.3390/ijms23031716.
- Guterres A, de Azeredo Lima CH, Miranda RL, Gadelha MR. What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19? *Infect Genet Evol.* 2020;85:104417. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104417.
- Gutmann C, Khamina K, Theofilatos K, Diendorfer AB, Burnap SA, Nabeebaccus A, et al. Association of cardiometabolic microRNAs with COVID-19 severity and mortality. *Cardiovasc. Res.* 2022;118:461–474. doi: 10.1093/cvr/cvab338.
- Haj-Salem I, Fakhfakh R, Bérubé JC, Jacques E, Plante S, Simard MJ, et al. MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGFβR2 gene in severe asthma. *Allergy.* 2015;70(2):212–9. doi: 10.1111/all.12551
- Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100-1115. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004
- Hasöksüz M, Kilic S, Saraç F. Coronaviruses and sars-cov-2. *Turk J Med Sci.* 2020;50(9):549-556.
- Herrera-Rivero M, Zhang R, Heilmann-Heimbach S, Mueller A, Bagci S, Dresbach T, et al. Circulating microRNAs are associated with Pulmonary Hypertension and

Development of Chronic Lung Disease in Congenital Diaphragmatic Hernia. *Sci. Rep.* 2018;8:10735. doi: 10.1038/s41598-018-29153-8.

Houshmandfar S, Saeedi-Boroujeni A, Rashno M, Khodadadi A, Mahmoudian-Sani MR. miRNA-223 as a regulator of inflammation and NLRP3 inflammasome, the main fragments in the puzzle of immunopathogenesis of different inflammatory diseases and COVID-19. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2021;394(11):2187-2195. doi: 10.1007/s00210-021-02163-6.

<https://covid19.who.int/> Erişim tarihi: 6 Nisan 2023

<https://covid19.who.int/region/euro/country/tr>

Hu B, Guo H, Zhou P, & Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):141-154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7.

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

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. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5

Huang P, He XY, Xu M. The Role of miRNA-146a and Proinflammatory Cytokines in Carotid Atherosclerosis. *Biomed Res Int.* 2020;2020:6657734. doi: 10.1155/2020/6657734.

Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(9):2114-2127. doi: 10.1038/s41423-021-00740-6.

Icli B, Dorbala P, Feinberg MW. An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2014;24(6):241-8. doi: 10.1016/j.tcm.2014.06.003.

Imperatore JA, Cunningham CL, Pellegrine KA, Brinson RG, Marino JP, Evanseck JD, et al. Highly conserved s2m element of SARS-CoV-2 dimerizes via a kissing complex and interacts with host miRNA-1307-3p. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(2):1017-1032. doi: 10.1093/nar/gkab1226.

Jafarinejad-Farsangi S, Jazi MM, Rostamzadeh F, Hadizadeh M. High affinity of host human microRNAs to SARS-CoV-2 genome: an in silico analysis. *Noncoding RNA Res.* 2020;5(4):222–231.

Jiang C, Guo Y, Yu H, Lu S, Meng L. Pleiotropic microRNA-21 in pulmonary remodeling: Novel insights for molecular mechanism and present advancements. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2019;15:1–9.

Jiang K, Yang J, Guo S, Zhao G, Wu H, Deng G. Peripheral Circulating Exosome-Mediated Delivery of miR-155 as a Novel Mechanism for Acute Lung Inflammation. *Mol Ther.* 2019;27(10):1758-1771. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.07.003.

Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses.* 2020;12(4):372. doi: 10.3390/v12040372.

- Kabekkodu S, Shukla V, Varghese V.K, Souza J.D, Chakrabarty S, Satyamoorthy K. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biol. Rev.* 2018;93:1955–1986. doi: 10.1111/brv.12428.
- Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol.* 2021;61(3):180-202. doi: 10.1002/jobm.202000537.
- Kassif-Lerner R, Zloto K, Rubin N, Asraf K, Doolman R, Paret G, et al. miR-155: A Potential Biomarker for Predicting Mortality in COVID-19 Patients. *J Pers Med.* 2022;12(2):324. doi: 10.3390/jpm12020324.
- Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang, SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol.* 2020;85:104502. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(1):155-162.
- Kukreja RC, Yin C, Salloum FN. MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection. *Mol Pharmacol.* 2011;80(4):558-64. doi: 10.1124/mol.111.073528.
- Lacedonia D, Scioscia G, Soccio P, Conese M, Catucci L, Palladino GP, et al. Downregulation of exosomal let-7d and miR-16 in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2021;21:188. doi: 10.1186/s12890-021-01550-2.
- Lai CKC, Lam W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;538:226-230. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.069.
- Lamers MM, & Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(5):270-284.
- Lamontagne J, Steel LF, Bouchard MJ. Hepatitis B virus and microRNAs: Complex interactions affecting hepatitis B virus replication and hepatitis B virus-associated diseases. *World J Gastroenterol.* 2015;21(24):7375-99. doi: 10.3748/wjg.v21.i24.7375.
- Lee HM, Kim TS, Jo EK. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep.* 2016;49(6):311-8. doi: 10.5483/bmbrep.2016.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- Li D, Sempowski GD, Saunders KO, Acharya P, Haynes BF. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies for COVID-19 Prevention and Treatment. *Annu Rev Med.* 2022;73:1-16. doi: 10.1146/annurev-med-042420-113838.
- Li Q, Wang Y, Sun Q, Knopf J, Herrmann M, Lin L, et al. Immune response in COVID-19: what is next? *Cell Death Differ.* 2022;29(6):1107-1122. doi: 10.1038/s41418-022-01015-x.
- Li X, Teng C, Ma J, Fu N, Wang L, Wen J, et al. miR-19 family: A promising biomarker and therapeutic target in heart, vessels and neurons. *Life Sci.* 2019 Sep 1;232:116651. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116651.

- Li X, Zou X. An overview of RNA virus-encoded microRNAs. *ExRNA* 2019;1:37. <https://doi.org/10.1186/S41544-019-0037-6>.
- Liang Y, Fang D, Gao X, Deng X, Chen N, Wu J, et al. Circulating microRNAs as emerging regulators of COVID-19. *Theranostics*. 2023;13(1):125-147. doi: 10.7150/thno.78164.
- Liao Y, Guo S, Liu G, Qiu Z, Wang J, Yang D, et al. Host Non-Coding RNA Regulates Influenza A Virus Replication. *Viruses*. 2021;14(1):51. doi: 10.3390/v14010051.
- Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform*. 2014;15(1):1-19. doi: 10.1093/bib/bbs075.
- Liu JJ, Li Y, Yang MS, Chen R, Cen CQ. SP1-induced ZFAS1 aggravates sepsis-induced cardiac dysfunction via miR-590-3p/NLRP3-mediated autophagy and pyroptosis. *Arch Biochem Biophys*. 2020;695:108611. doi: 10.1016/j.abb.2020.108611.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Cardiovascular complications in COVID-19. *Am J Emerg Med*. 2020;38(7):1504-1507. doi: 10.1016/j.ajem.2020.04.048.
- Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):845-848. doi: 10.1038/s41591-020-0897-1
- Luo Q, Zhu J, Zhang Q, Xie J, Yi C, Li T. MicroRNA-486-5p Promotes Acute Lung Injury via Inducing Inflammation and Apoptosis by Targeting OTUD7B. *Inflammation*. 2020;43:975-84.
- Machhi J, Herskovitz J, Senan AM, Dutta D, Nath B, Oleynikov MD, et al. The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2020;15(3):359-386. doi: 10.1007/s11481-020-09944-5
- Maranini B, Ciancio G, Ferracin M, Cultrera R, Negrini M, Sabbioni S, et al. microRNAs and Inflammatory Immune Response in SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review. *Life (Basel)*. 2022;12(2):288. doi: 10.3390/life12020288.
- Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1):132. doi: 10.3390/ijms21010132.
- McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev*. 2020;19(6):102537. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102537.
- Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. 2022;375(6585):1122-1127. doi: 10.1126/science.abm8108.
- 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

- Mirzaei R, Mahdavi F, Badrzadeh F, Hosseini-Fard SR, Heidary M, Jeda AS, et al. The emerging role of microRNAs in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. *Int. Immunopharmacol.* 2021;90:107204
- Mishra R, Banerjee AC. SARS-CoV-2 Spike Targets USP33-IRF9 Axis *via* Exosomal miR-148a to Activate Human Microglia. *Front Immunol.* 2021;12:656700. doi: 10.3389/fimmu.2021.656700.
- Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmaeilzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med.* 2021;23(2):e3303. doi: 10.1002/jgm.3303.
- Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, Tarhriz V, Farjami A, Ghasemian Sorbeni F, et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virol J.* 2022;19(1):92. doi: 10.1186/s12985-022-01814-1.
- Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021;54(2):159-163. doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.022.
- Nakagawa S, Miyazawa T. Genome evolution of SARS-CoV-2 and its virological characteristics. *Inflamm Regen.* 2020;40:17. doi: 10.1186/s41232-020-00126-7.
- Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(10):165878.
- Narožna M, Rubiś B. Anti-SARS-CoV-2 Strategies and the Potential Role of miRNA in the Assessment of COVID-19 Morbidity, Recurrence, and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8663. doi: 10.3390/ijms22168663.
- Nersisyan S, Engibaryan N, Gorbonos A, Kirdey K, Makhonin A, Tonevitsky A. Potential role of cellular miRNAs in coronavirus-host interplay. *PeerJ.* 2020;8:e9994. doi: 10.7717/peerj.9994.
- Niu S, Xu L, Yuan Y, Yang S, Ning H, Qin X, et al. Effect of down-regulated miR-15b-5p expression on arrhythmia and myocardial apoptosis after myocardial ischemia reperfusion injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;530(1):54-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.
- Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, Chemaly RF, Moschopoulos CD, Skevaki C. How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(7):981-986. doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.001.
- Oura K, Morishita A, Masaki T. Molecular and Functional Roles of MicroRNAs in the Progression of Hepatocellular Carcinoma-A Review. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8362. doi: 10.3390/ijms21218362.
- Özdemir M, Arslan GK. Koronavirüs Enfeksiyonlarının Serolojik Tanısı. Özdemir M, Feyzioğlu B. Editörler. Her Yönüyle Pandemi Koronavirüsler: Klinik, Tanı ve Tedavi. 1. Baskı. Konya NEÜ Yayınları; 2021. s149-150.
- Park JH, Choi Y, Lim CW, Park JM, Yu SH, Kim Y, et al. Potential Therapeutic Effect of Micrnas in Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells against SARS-CoV-2. *Cells.* 2021;10(9):2393. doi: 10.3390/cells10092393.

- Pascut D, Hoang M, Nguyen NNQ, Pratama MY, Tiribelli C. HCV Proteins Modulate the Host Cell miRNA Expression Contributing to Hepatitis C Pathogenesis and Hepatocellular Carcinoma Development. *Cancers (Basel)*. 2021;13(10):2485. doi: 10.3390/cancers13102485.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9. doi: 10.1038/35040556.
- Paul S, Bravo Vázquez LA, Reyes-Pérez PR, Estrada-Meza C, Aponte Alburquerque RA, Pathak S, et al. The role of microRNAs in solving COVID-19 puzzle from infection to therapeutics: A mini-review. *Virus Res*. 2022;308:198631.
- Piedade D, Azevedo-Pereira JM. MicroRNAs as Important Players in Host-Adenovirus Interactions. *Front Microbiol*. 2017;8:1324. doi: 10.3389/fmicb.2017.01324.
- Pieri M, Vayianos P, Nicolaidou V, Felekis K, Papanephytous C. Alterations in Circulating miRNA Levels after Infection with SARS-CoV-2 Could Contribute to the Development of Cardiovascular Diseases: What We Know So Far. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):2380. doi: 10.3390/ijms24032380.
- Qiu L, Fan H, Jin W, Zhao B, Wang Y, Ju Y, et al. miR-122-induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398:771–777.
- Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Sah R, Alqumber MA, Haque S, Patel SK, et al. MERS-CoV: epidemiology, molecular dynamics, therapeutics, and future challenges *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021;20(1):1-14.
- Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik F Jr. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2021;14(5):601-621. doi: 10.1080/17512433.2021
- Ramdani H, Allali N, Chat L, El Haddad S. Covid-19 imaging: A narrative review. *Ann Med Surg (Lond)*. 2021;69:102489. doi: 10.1016/j.amsu.2021.102489.
- Ravi V, Saxena S, Panda PS. Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian J Med Microbiol*. 2022;40(2):182-186. doi: 10.1016/j.ijmmb.2022.02.005.
- Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med*. 2021;218(3):e20201707. doi: 10.1084/jem.20201707.
- Roganović J. Downregulation of microRNA-146a in diabetes, obesity and hypertension may contribute to severe COVID-19. *Med. Hypotheses*. 2021;146:110448. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110448.
- Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, Maga G, Berisio R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells*. 2020; 9(5): 1267.
- Ruan DT, Gao S, Shelat H, King B, Geng YJ. Differential expression of microRNA and arachidonic acid metabolism in aspirin-treated human cardiac and peri-cardiac fat-

- derived mesenchymal stem cells. *Vascul Pharmacol.* 2020;127:106651. doi: 10.1016/j.vph.2020.106651.
- Ruelas DS, Chan JK, Oh E, Heidersbach AJ, Hebbeler AM, Chavez L, et al. MicroRNA-155 Reinforces HIV Latency. *J. Biol. Chem.* 2015;290 (22),13736–13748.
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5451-5465. doi: 10.1002/jcp.27486.
- Salvi V, Nguyen HO, Sozio F, Schioppa T, Gaudenzi C, Laffranchi M, et al. SARS-CoV-2-associated ssRNAs activate inflammation and immunity via TLR7/8. *JCI Insight.* 2021;6:e150542.
- Samudrala PK, Kumar P, Choudhary K, Thakur N, Wadekar GS, Dayaramani R, et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *Eur J Pharmacol.* 2020;883:173375. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173375.
- Sarioğlu E, Yılmaz Sariatın S, Çoban T. Neurological Complications and Potential Effects of Covid-19: Symptoms and Conceivable Mechanisms. *Brain Hemorrhages.* 2023. doi: 10.1016/j.hest.2023.02.001.
- Saulle I, Garziano M, Fenizia C, Cappelletti G, Parisi F, Clerici M, et al. MiRNA Profiling in Plasma and Placenta of SARS-CoV-2-Infected Pregnant Women. *Cells.* 2021 Jul 15;10(7):1788. doi: 10.3390/cells10071788.
- Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell.* 2021 Apr 1;184(7):1671-1692. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.029.
- Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021;184(4):861-880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
- Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol.* 2015;6:19. doi: 10.3389/fimmu.2015.00019.
- Shen CJ, Jia YH, Tian RR, Ding M, Zhang C, Wang JH. Translation of Pur- α Is Targeted by Cellular miRNAs to Modulate the Differentiation-dependent Susceptibility of Monocytes to HIV-1 Infection. *FASEB J.* 2012;26 (11), 4755–4764.
- Shen SM, Jiang H, Zhao JN, Shi Y. Down-regulation of miR-155 inhibits inflammatory response in human pulmonary microvascular endothelial cells infected with influenza A virus by targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1. *Chin. Med. J.* 2020;133:2429–2436. doi: 10.1097/CM9.0000000000001036.
- Shi H, Li H, Zhang F, Xue H, Zhang Y, Han Q. MiR-26a-5p alleviates cardiac hypertrophy and dysfunction via targeting ADAM17. *Cell Biol Int.* 2021;45(11):2357-2367. doi: 10.1002/cbin.11685.
- Shi J, Feng P, Gu T. MicroRNA-21-3p modulates FGF2 to facilitate influenza A virus H5N1 replication by refraining type I interferon response. *Biosci. Rep.* 2020;40:BSR20200158. doi: 10.1042/BSR20200158.
- Shi S, Qin M, Cai Y, Liu T, Shen B, Yang F, et al. Characteristics and clinical significance of myocardial injury in patients with severe coronavirus disease 2019. *Eur. Heart J.* 2020;41:2070–2079. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa408.

- Simpson LJ, Patel S, Bhakta NR, Choy DF, Brightbill HD, Ren X, et al. A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine production, *Nat Immunol.* 2014;15(12):1162–1170. doi: 10.1038/ni.3026
- Sung TL, Rice AP. miR-198 Inhibits HIV-1 Gene Expression and Replication in Monocytes and its Mechanism of Action Appears to Involve Repression of Cyclin T1. *Plos Pathog.* 2009;5 (1),e1000263.
- Tang H, Gao Y, Li Z, Miao Y, Huang Z, Liu X, et al. The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19. *Clin Transl Med.* 2020;10(6):e200. doi: 10.1002/ctm2.200.
- Testa U, Pelosi E, Castelli G, Labbaye C. miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Noncoding RNA.* 2017;3(3):22. doi: 10.3390/ncrna3030022.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008;456(7224):980-4. doi: 10.1038/nature07511.
- Trobaugh DW, Klimstra WB. MicroRNA Regulation of RNA Virus Replication and Pathogenesis. *Trends Mol Med.* 2017;23(1):80-93. doi: 10.1016/j.molmed.2016.11.003.
- Us D. Temel İmmünoloji ve Seroloji. 1. Baskı. Ankara: Hipokrat Kitabevi; 2016.
- Velavan TP, Meyer CG. Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers. *Int J Infect Dis.* 2020;95:304-307. doi: 10.1016/j.ijid.2020.04.061.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020;181:281–292.e286. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058
- Wang H, Zhang Y, Wu X, et al. Regulation of human natural killer cell IFN- γ production by microRNA-146a via targeting the NF- κ B signaling pathway. *Front Immunol* 2018;9:293.
- Wang M, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:587269. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56(11):1733-41. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
- Wei YF, Cui GY, Ye P, Chen JN, Diao HY. MicroRNAs may solve the mystery of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2013;19(30):4867-76. doi: 10.3748/wjg.v19.i30.4867.
- Wicik Z, Eyileten C, Jakubik D, Simões SN, Martins DC, Pavão R, et al. ACE2 interaction networks in COVID-19: a physiological framework for prediction of outcome in patients with cardiovascular risk factors. *J Clin Med.* 2020;9:3743. doi: 10.3390/jcm9113743.

- Widiasta A, Sribudiani Y, Nugrahapraja H, Hilmanto D, Sekarwana N, Rachmadi D. Potential role of ACE2-related microRNAs in COVID-19-associated nephropathy. *Noncoding RNA Res.* 2020;5(4):153-166. doi: 10.1016/j.ncrna.2020.09.001.
- Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009;234(10):1117-1127.
- Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol.* 2012; 86(7): 3995–4008.
- World Health Organization (WHO). Clinical management of COVID-19: interim guidance, 27 May 2020. 2020. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196>
- 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. *Sci. (N. Y. N.Y.)* 2020;367:1260–1263. doi: 10.1126/science.abb2507
- Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, et al. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature.* 2020;583(7815):286-289.
- Xie C, Chen Y, Luo D, Zhuang Z, Jin H, Zhou H, et al. Therapeutic potential of C1632 by inhibition of SARS-CoV-2 replication and viral-induced inflammation through upregulating let-7. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):84. doi: 10.1038/s41392-021-00497-4.
- Xing X, Guo S, Zhang G, Liu Y, Bi S, Wang X, et al. miR-26a-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Braz J Med Biol Res.* 2020;53(2):e9106. doi: 10.1590/1414-431X20199106.
- Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, et al. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells.* 2021;10(4):821.
- Yang J, Yang XS, Fan SW, Zhao XY, Li C, Zhao ZY, et al. Prognostic value of microRNAs in heart failure: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2021;100(46):e27744. doi: 10.1097/MD.00000000000027744.
- Yang L, Ma Z, Wang D, Zhao W, Chen L, Wang G. MicroRNA-602 regulating tumor suppressive gene RASSF1A is overexpressed in hepatitis B virus-infected liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2010;9:803–808.
- Yang W, Han Y, Yang C, Chen Y, Zhao W, Su X, et al. MicroRNA-19b-1 reverses ischaemia-induced heart failure by inhibiting cardiomyocyte apoptosis and targeting Bcl2 l11/BIM. *Heart Vessels.* 2019;34(7):1221-1229. doi: 10.1007/s00380-018-01336-3.
- Zawilska JB, Lagodzinski A, Berezinska M. COVID-19: From the structure and replication cycle of SARS-CoV-2 to its disease symptoms and treatment. *J. Physiol. Pharmacol.* 2021;72(4), 479-501.

- Zhang K, Han Y, Zhao Y, Sun Y, Zou M, Fu Y, et al. Upregulated gga-miR-16-5p Inhibits the Proliferation Cycle and Promotes the Apoptosis of MG-Infected DF-1 Cells by Repressing PIK3R1-Mediated the PI3K/Akt/NF- κ B Pathway to Exert Anti-Inflammatory Effect. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1036. doi: 10.3390/ijms20051036.
- Zhang L, Chu Q, Liu X, Xu T. microRNA-21 negatively regulates NF- κ B signaling pathway via targeting IL1R1 in miiuy croaker. *Dev Comp Immunol.* 2020;105:103578. doi: 10.1016/j.dci.2019.103578.
- Zhang S, Amahong K, Sun X, Lian X, Liu J, Sun H, et al. The miRNA: a small but powerful RNA for COVID-19. *Brief. Bioinform.* 2021;22:1137–1149. doi: 10.1093/BIB/BBAB062.
- Zhang S, Zhang J, Wang C, Chen X, Zhao X, Jing H, et al. COVID-19 and ischemic stroke: Mechanisms of hypercoagulability (Review). *Int J Mol Med.* 2021;47(3):21. doi: 10.3892/ijmm.2021.4854.
- Zhao M, Chen N, Li X, Lin L, Chen X. MiR-19a modulates hypoxia-mediated cell proliferation and migration via repressing PTEN in human pulmonary arterial smooth muscle. *Life Sci.* 2019;239:116928. doi: 10.1016/j.lfs.2019
- Zhou H, Chen X, Hu T, Li J, Song H, Liu Y, et al. A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Curr. Biol.* 2020;30:2196–2203.
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-273.