

Sayı : 72011914-604.01.0336875

Konu : Proje Sonuç Raporu

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİNE

İlgi : Proje Sonuç Raporu

Yürütücüsü olduğum 2021/2-33 M nolu projeye ait sonuç belgeleri ekte sunulmaktadır.
Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

e-imzalıdır

Doç. Dr. Ekrem AKSU

Öğretim Üyesi

Ek:

- 1- sonuç raporu (2 Sayfa)
- 2- teslim sonuç belgesi (1 Sayfa)
- 3- covid BAP sonuc raporu kitapçığı (19 Sayfa)





T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
SONUÇ RAPORU

F-6

Proje Adı

Covid-19 Uyarımlı Endotel Hasar ve NET formasyonu Moleküler Mekanizması

Proje No	Başlama Tarihi	Bitiş Tarihi	
2021/2-33 M	20-05-2021	19-07-2023	
Rapor Türü	Raporun Kapsadığı Dönemin Tarihleri		
Sonuç Raporu	20-11-2022	19-07-2023	
Bilimsel Araştırmalar Birimi Tarafından Sağlanan Destek Miktarı	Gelişme Raporu Döneminde Harcanan	Şimdiye Kadar Harcanan	Kalan
32.129,70 TL		27.373,44 TL	4.756,26 TL
Destek Sağlayan Diğer Kuruluşların Katkısı	Gelişme Raporu Döneminde Harcanan	Şimdiye Kadar Harcanan	Kalan

SAĞLANAN DESTEKTEN ŞİMDİYE KADAR YAPILAN HARCAMALARIN FASILLARA GÖRE DAĞILIMI

Fasıl	Harcanan	Kalan
TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	26.778,72 TL	4.750,98 TL
HİZMET ALIMLARI	594,72 TL	5,28 TL

RAPOR DÖNEMİNE AİT İLGİLİ YAYINLAR

No	Yayın
	Bulunmamaktadır

RAPOR DÖNEMİNE AİT İLGİLİ FİKRİ MÜLKİYETLER

No	Fikri Mülkiyet Adı	Fikri Mülkiyet No	Alındığı Ülke	Tescil Tarihi
				Bulunmamaktadır

RAPOR DÖNEMİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR VE ELDE EDİLEN SONUÇLAR

Sonuç Rapor Özeti :

Tamamı hastaneye yatırılmayan, hastalık şiddetinin her seviyesinde ki COVID-19 mağdurlarını etkilediği için, COVID-19 sonrası süreç tam olarak anlaşılamamıştır. Uzun süreli COVID-19 semptom kategorilerinden biri olan, kardiyovasküler bozukluklar (akut kalp yetmezliği, çarpıntı, hipotansiyon, venöz tromboembolik hastalıklar, aritmiler, miyokardit ve artmış kalp hızı dahil), viral enfeksiyona sistemik bir inflamatuvar yanıtı kaynaklanabilir. Hücre dışı kalp boşluklarında istilacı virüslerle savaşan NET'ler (nötrofil hücre dışı tuzakları), COVID-19, hiperinflamasyon ve sitokin fırtınaları nedeniyle birikir. Çalışmamız, COVID-19 sekeli olarak kardiyovasküler bozukluklara odaklanmaktadır. NET'lerin bu bozukluklardaki rolünü belirlemek için PAD4, MPO, MMP-9 ve H3Cit düzeylerini ölçmeyi amaçladık. Yöntemler: COVID-19 öyküsü ile ilişkili uzun süreli kardiyak komplikasyonları olan kırk hasta ve kırk sağlıklı birey, bu çalışmaya dahil edildi. Bulgular: COVID-19 sonrası ve kontrol grupları arasında PAD4, H3Cit ve MPO plazma seviyelerinde anlamlı farklılıklar bulduk ($p < 0.05$). PAD4 mRNA ekspresyon seviyeleri, kontrol deneklerine kıyasla COVID-19 sonrası grupta daha düşük ve MMP-9 mRNA seviyeleri daha yüksekti. Sonuç: Bu bulgular, PAD4, MPO, MMP-9 ve H3Cit'in, NET düzensizliğinin potansiyel biyobelirteçleri olduğunu ve özellikle kardiyovasküler bozukluklar olmak üzere COVID-19 sonrası semptomlara neden olabileceğini düşündürmektedir. Anahtar Kelimeler: Kardiyovasküler anormallikler, sitrulline Histon H3, nötrofil hücre dışı tuzakları, peptidilarginin deiminazlar 4, akut post -COVID-19 sendromu

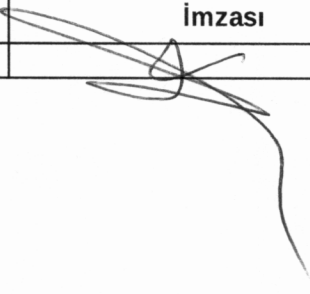
Rapor içeriği için lütfen eke bakınız.

EK: [Proje Sonuç Raporu.pdf](#)

Doç. Dr. Ekrem AKSU
Dip. Tes. No: 85842
Üz. Tes. No: 69361
K. S. Ü. Kardiyoloji A.B.D.

Demirbaş[Taşınır Alımları

Proje Kapsamında Demirbaş Niteliğinde Taşınır Alınmamıştır.

Proje Yürütücü Unvanı, Adı SOYADI	İmzası	Tarih
Doç.Dr. Ekrem AKSU		13-09-2023



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİNE

Proje Numarası :	2021/2-33 M
Projenin Adı :	Covid-19 Uyarımlı Endotel Hasar ve NET formasyonu Moleküler Mekanizması
Projenin Türü :	Münferit Proje (M)
Proje Yön. Unv.-Adı-Soyadı :	Doç.Dr. Ekrem AKSU
Görev Yeri :	Tıp Fakültesi
Bölümü :	Dahili Tıp Bilimleri
Sözleşmeye Göre Projenin	
Başlangıç Tarihi :	20-05-2021
Bitiş Tarihi :	19-07-2023
Alınan Ek Süre :	12 Ay
Sonuç Raporu Tarihi :	13-09-2023
Proje Bütçesi :	32.129,70 TL
Alınan Ek Ödenek :	0,00 TL
Projenin Toplam Bütçesi :	32.129,70 TL
Harcanan Miktar :	27.373,44 TL
Proje Kalan Bütçesi :	4.756,26 TL
İşyeri Telefon Numarası :	(344)300-3399
Cep Telefon Numarası :	(532)777-6119
Proje Yöneticisinin İş Adresi :	
Demirbaş[Taşınır Alımları	Proje Kapsamında Demirbaş Niteliğinde Taşınır Alınmamıştır.

Projemin sonuç raporunun kabulünü arz ederim 09/10/2023

Doç.Dr. Ekrem AKSU
(İmza)

Projemin Sonuç Raporunun, Üniversitemiz BAP/Kütüphane İnternet Sayfasında;

- 1.Yayınlanmasına İzin Vermiyorum. ☐
- 2.Sadece Özetin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. ☐
- 3.Tam Metin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. ☒
4. Tarihinden İtibaren Tam Metin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. ☐



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM
ÜNİVERSİTESİ**

**COVID-19 UYARIMLI ENDOTEL HASAR VE NET
FORMASYONU MOLEKÜLER MEKANİZMASI**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

YIL KAHRAMANMARAŞ

2023

**COVID-19 UYARIMLI ENDOTEL HASAR VE NET
FORMASYONU MOLEKÜLER MEKANİZMASI**

Proje No: 2021/2-33 M

**Doç. Dr. Ekrem AKSU
Dr.Öğr.Üyesi Lütfiye ÖZPAK
Öğr. Gör. Dr. Bekir Mehmet KELLEÇİ
Prof. Dr. Mustafa ÇELİK**

2023 KAHRAMANMARAŞ

ÖNSÖZ

NET 'lerin aracılık ettiği Covid 19 sonrası gelişen patolojilerin anlaşılması açısından, hastalık ile ilişkili NETozisin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunmayı hedeflemekteyiz. Bu bilimsel araştırma projesi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi tarafından proje numarası 2021/2-33 M ile desteklenmiştir. Destekleri için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

Projenin başlama tarihi 20/05/2021 ve bitiş tarihi 19/07/2023'tür.

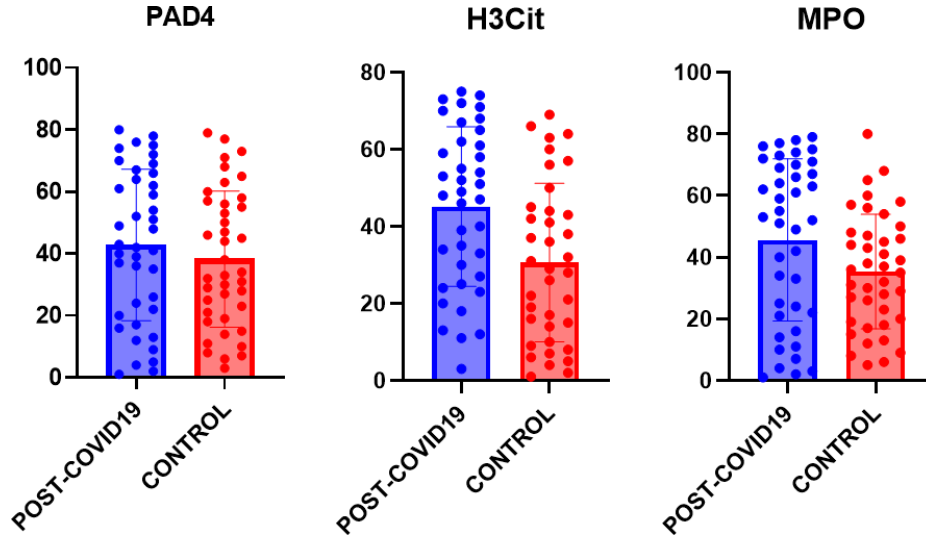
Proje Yürütücüsü
Doç. Dr. Ekrem AKSU

İÇİNDEKİLER

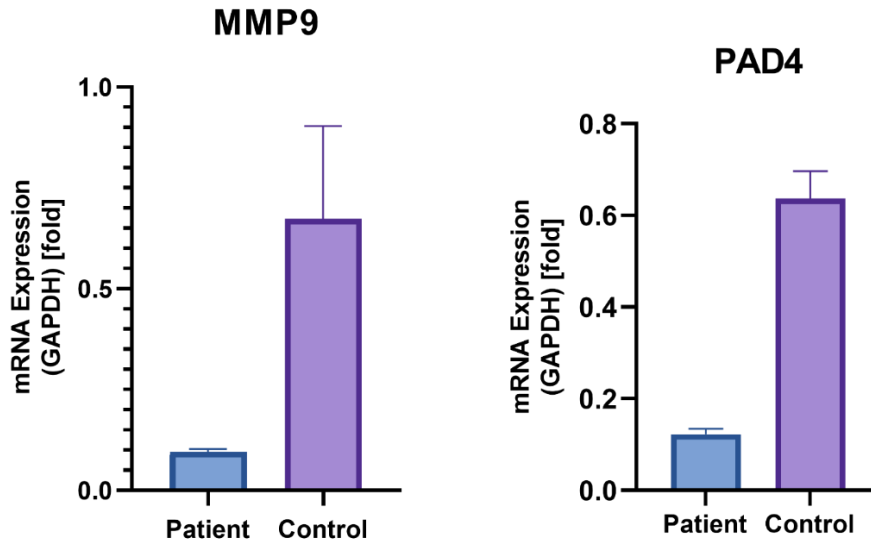
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM (METOD).....	3
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	4
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	6
KAYNAKLAR	7

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. NET formasyonundan sorumlu Plasma molekülleri seviyesi



Şekil 2. NET formasyonundan sorumlu Plazma moleküllerinin mRNA ekspresyonu seviyesi



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

α	: Alfa (Yol üstyapısının servis yeteneğine göre değişen bir katsayı)
mm	: Milimetre
sn	: Saniye
kg/mm ³	: Kilogram/milimetreküp

KISALTMALAR

AÇ	: Asfalt Çimentosu
AASHTO	: American Association of State Highway and Transportation Officials (Amerikan Eyalet Yol ve Ulaşım Kuruluşları Birliği)
BSK	: Bitümlü Sıcak Karışım

ÖZET

Tamamı hastaneye yatırılmayan, hastalık şiddetinin her seviyesinde ki COVID-19 mağdurlarını etkilediği için, COVID-19 sonrası süreç tam olarak anlaşılamamıştır. Uzun süreli COVID-19 semptom kategorilerinden biri olan, kardiyovasküler bozukluklar (akut kalp yetmezliği, çarpıntı, hipotansiyon, venöz tromboembolik hastalıklar, aritmiler, miyokardit ve artmış kalp hızı dahil), viral enfeksiyona sistemik bir inflamatuvar yanıttan kaynaklanabilir. Hücre dışı kalp boşluklarında istilacı virüslerle savaşan NET'ler (nötrofil hücre dışı tuzakları), COVID-19, hiperinflamasyon ve sitokin fırtınaları nedeniyle birikir. Çalışmamız, COVID-19 sekeli olarak kardiyovasküler bozukluklara odaklanmaktadır. NET'lerin bu bozukluklardaki rolünü belirlemek için PAD4, MPO, MMP-9 ve H3Cit düzeylerini ölçmeyi amaçladık. COVID-19 öyküsü ile ilişkili uzun süreli kardiyak komplikasyonları olan kırk hasta ve kırk sağlıklı birey, bu çalışmaya dahil edildi. COVID-19 sonrası ve kontrol grupları arasında PAD4, H3Cit ve MPO plazma seviyelerinde anlamlı farklılıklar bulduk ($p < 0.05$). PAD4 mRNA ekspresyon seviyeleri, kontrol deneklerine kıyasla COVID-19 sonrası grupta daha düşük ve MMP-9 mRNA seviyeleri daha yüksekti. Bu bulgular, PAD4, MPO, MMP-9 ve H3Cit'in, NET düzensizliğinin potansiyel biyobelirteçleri olduğunu ve özellikle kardiyovasküler bozukluklar olmak üzere COVID-19 sonrası semptomlara neden olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kardiyovasküler anormallikler, sitrulline Histon H3, nötrofil hücre dışı tuzakları, peptidilarginin deiminazlar 4, akut post -COVID-19 sendromu.

ABSTRACT

The post-COVID-19 process is not completely understood as it affects COVID-19 survivors at all levels of disease severity, not all of whom are hospitalized. One of the long-lasting COVID-19 symptom categories, cardiovascular disorders (including acute heart failure, palpitations, hypotension, venous thromboembolic diseases, arrhythmias, myocarditis, and increased heart rate), may derive from a systemic inflammatory response to the viral infection. NETs (neutrophil extracellular traps) that fight invading viruses in extracellular cardiac spaces accumulate due to COVID-19, hyperinflammation and cytokine storms. Our study focuses on cardiovascular disorders as COVID-19 sequelae. To determine the role of NETs in these disorders, we aimed to measure levels of PAD4, MPO, MMP-9, and H3Cit. Forty patients with long-term cardiac complications associated with a history of COVID-19 and forty healthy people were included in this study. We found significant differences in PAD4, H3Cit, and MPO plasma levels between the post-COVID-19 and control groups (p values < 0.05). The expression levels of PAD4 mRNA were lower and MMP-9 mRNA levels were higher in the post-COVID-19 group compared with the control subjects. These findings suggest that PAD4, MPO, MMP-9, and H3Cit are potential biomarkers of NET dysregulation and may cause post-COVID-19 symptoms, especially cardiovascular disorders.

Keywords: Cardiovascular abnormalities, citrullinated Histone H3, neutrophil extracellular traps, peptidylarginine deiminase 4, post-acute COVID-19 syndrome

1. GİRİŞ

Coronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19), akut şiddetli solunum sendromu-koronavirüs-2 virüsü (SARS-CoV-2) olarak adlandırılan RNA virüsünden kaynaklanır ve çok çeşitli tıbbi komplikasyonlara sahiptir (1). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre, dünya genelinde 30 Kasım 2022 itibarıyla 639 milyondan fazla doğrulanmış COVID-19 vakası mevcut olup bunların en az 6 milyonu hayatını kaybetmiştir (2). Asemptomatikten, hafif ya da ağır seyreden, bazıları yoğun bakım gerektiren, ciddi komplikasyonları olan ve vücutta farklı organ ve sistemleri etkileyen hastalığın klinik seyri ve uzun dönem etkileri henüz tam olarak anlaşılamamıştır (3). Tüm olgular değerlendirildiğinde asemptomatik olguların %30'unun, hastanede bakım gerektiren olguların ise %80'inin COVID sonrası durumlara sahip olabileceği belirlenmiştir (4,5). COVID sonrası gelişen bazı sistemik belirtiler, semptomlar “uzun süreli” “uzun COVID 19”, “kalıcı COVID 19 semptomları” veya “postCOVID sendromu” olarak adlandırılıyor ve haftalar, aylar hatta yıllar boyunca devam edebiliyor. Bunlardan biri taşikardi, çarpıntı, disritmi, göğüs ağrısı ve sıkışmayı içeren kardiyak bulgulardır (6,7).

Nötrofillere bağlı bir hücre ölümü biçimi olan NETosis'te yer alan NET'ler, histonlar ve granüler proteinlerle çevrelenmiş DNA ağlarıdır. Hücre dışı alandaki istilacı patojenleri yakalayıp yok ederler (8,9). Kovid 19'da miyokard bozukluğunun olası mekanizması; Hiperinflamasyon ve sitokin fırtınasının neden olduğu miyokardit, solunum yetmezliği ve hipoksinin neden olduğu kardiyak miyosit hasarı, hiperkoagülasyon gelişimi ve koroner mikrovasküler tromboz, kalp dahil birçok organdaki endotel hasarıdır (10). Koroner arter trombozunun en sık görülen kalp krizi nedeni, NET'in kardiyak ekstraselüler boşluklarda birikmesi sonucu hem sistolik hem de diyastolik fonksiyon bozukluğuna yol açmasıdır (11).

Post-Covid 19 ile ilgili çok fazla veri olmasa da iyileşme süresinden sonra ortaya çıkan semptomlar ilk elden virüsten kaynaklanmıyor, hastalık süresi boyunca vücudun iyileşmek için verdiği koagülopatiler ve inflamatuvar yanıtla ilgili. Kovid 19 nedenli pıhtılaşma bozuklukları, akut kalp yaralanmaları, tromboz, sepsis, solunum yetmezliği ve kalp yetmezliğinde kontrolsüz NET oluşumu görülmektedir (12). NET düzensizliğinin hastalık sonrası semptomlara da neden olabileceği, patojen istilasını nötralize eden ve NETosis'i yöneten genetik ve epigenetik faktörlerde bir dengesizliğin meydana geldiği bildirilmektedir (13).

Peptidilarginin deiminaz 4 (PAD4) nötrofil histonlarını sitrülileyerek, miyeloperoksidaz (MPO) nötrofil elastazı uyararak, NET oluşumu sırasında histon modifikasyonu yoluyla kromatin yoğunlaşmasını sağlar. Çalışmalar sitrulinlenmiş histon H3 (H3Cit) ve MPO-DNA kompleksinin COVID-19 hastalarında yükseldiğini bulmuş olup bunların plazma NET oluşumu için potansiyel biyobelirteçler olduğu düşünülmektedir (14,15). Matriks metaloproteinazlar (MMP'ler), hücre dışı matriksi bozma, doku yapısını düzenleme ve proteolizi indükleme kapasiteleri nedeniyle aterogenez

ve vasküler hasara neden olur. Çalışmalar NETosis sırasında salınan matriks metaloproteinaz-9 (MMP-9) miktarının endotel bütünlüğünde rol oynadığını göstermiştir (16). Miyokard bozukluklarında covid 19 sekellerinden biri olan NET'lerin rolünü belirlemek amacıyla NET oluşumunun moleküler mekanizmasında yer alan PAD4, MPO, MMP-9, H3Cit düzeylerini ölçmeyi amaçladık.

2. MATERYAL VE YÖNTEM (METOD)

Çalışma Populasyonu

Prospektif vaka-kontrol çalışmamız Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSU) Tıp Fakültesi Kardiyoloji Kliniğine başvuran 18-45 yaş arası bireylerden oluşmuştur. SARS CoV-2 enfeksiyonu öyküsü olan veya doğrulanmış ve en az iki ay süren kardiyolojik şikayetleri olan 40 hastanın yanı sıra, COVID 19 öyküsü olmayan ve elektrokardiyogramda (EKG) normal sinüs ritmi olan 40 sağlıklı birey dahil edildi (17). Sistemik hastalık öyküsü (diyabet, hipertansiyon, tiroid bozukluğu vb.), morbid obezite, kalp kapak hastalığı, sol ventrikül hipertrofisi, elektrolit dengesizliği, kalıcı kalp pili takılması, atriyal fibrilasyon, dal bloğu veya diğer intraventriküler iletim bozuklukları, sigara içme öyküsü olanlar, alkol kullanımı veya kalp sorunları dışlandı. Kalp ritmini etkileyen ilaçları (antiaritmikler, antihistaminikler vb.) kullananlar çalışmamıza dahil edilmedi.

Enzime bağlı immünosorbent Analizi (ELISA)

Kontrollerden ve hastalardan periferik kan toplandı. Kan örnekleri pıhtılaşmayı sağlamak için 30 dakika oda sıcaklığında saklandı ve daha sonra 4°C'de 2.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Serum toplandı, ters çevrilerek karıştırıldı ve 0,5 mL Eppendorf tüplerine bölündü ve sonraki işlem zamanına kadar -80°C'de saklandı. Üreticinin talimatlarını takip ederek serum PAD4, MPO, H3Cit (ELK Biyoteknoloji, ELK3904, ELK1062, ELK8743, Wuhan, Çin) seviyelerini değerlendirmek için kantitatif bir sandviç ELISA gerçekleştirildi. Reaksiyon ürününün emiciliği, bir mikro plaka okuyucu kullanılarak 450 nm'de ölçüldü.

Gerçek Zamanlı PCR

Lenfositler, üreticinin belirttiği şekilde Ficoll-Paque Plus çözeltisi kullanılarak heparinize edilmiş tam kandan izole edildi. Ayrılan mononükleer hücreler ve plazma daha sonra toplandı ve RNA izolasyonu için kullanılmaya kadar -80 ° C'de saklandı. Tedarikçiler tarafından tarif edildiği gibi buz üzerinde TRIzol reaktifi (Life Technologies) kullanılarak toplam RNA ekstraksiyonu yapıldı. Daha sonra toplam RNA'nın bütünlüğü ve saflığı, spektrofotometre ve agaroz jel kullanılarak ölçüldü. cDNA, ters transkripsiyon sistemi (Applied Biosystems™ Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti) kullanılarak sentezlendi. QPCR, ticari olarak temin edilebilen Taqman gen ekspresyon analiz kiti (Applied Biosystems) kullanılarak insan PAD4, MMP-9'unu ölçmek için gerçekleştirildi. İfade verileri, her numune için temizlik geni GAPDH kullanılarak normalleştirildi ve kat değişim değerleri, 2-ΔΔCt yöntemi kullanılarak hesaplandı.

İstatistik

Verilerin değerlendirilmesinde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi kullanılarak incelenmiştir. ELISA ve qPCR deneylerine yönelik istatistiksel analizler, iki kuyruklu Mann Whitney testi ve bağımsız örnekler t testi (Prism 8, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) kullanılarak yapıldı. $\leq 0,05$ 'lik bir P değeri anlamlı kabul edildi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışma grupları, hastalığın başlangıcından 3 ay sonra, kardiyolojik şikayetleri en az 2 aydır devam eden, COVID-19 enfeksiyon öyküsü olan 40 hasta ve COVID 19 öyküsü olmayan 40 sağlıklı bireyden oluşmuştur.

Histon sitrasyonu yoluyla kromatin yoğunlaşmasını indükleyerek NET oluşumunu destekleyen PAD4'ün plazma seviyeleri, COVID-19 sonrası grupta, COVID 19 öyküsü olmayan gruba göre daha yüksekti ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0,05$, $p = 0,38$) (Şekil 1A). COVID-19 sonrası grupta PAD4 mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre azalmıştı ve PAD4 mRNA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p \leq 0,05$, $p = 0,001$) (Şekil 2A). COVID-19 sonrası vakalarda MMP-9 mRNA düzeyleri de yüksek bulundu ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p \geq 0,05$, $p = 0,725$) (Şekil 2B). NET oluşumu için önemli plazma biyomoleküllerinden olan Sitrülin H3 ve MPO düzeylerinin COVID-19 sonrası grupta kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p \leq 0,05$, $p = 0,003$ ve $p = 0,0487$) (Şekil 1B, 1C).

TARTIŞMA

COVID-19 sonrası gelişen NET'lerin aracılık ettiği patolojileri anlamak için hastalıkla ilişkili NETosis'i yöneten moleküler mekanizmada yer alan PAD4, MPO, MMP-9 ve H3Cit biyomoleküllerinin hastadaki seviyelerini belirtmeyi amaçladık. COVID-19'dan sonra en az iki aydır kardiyolojik şikâyetleri olan grup. COVID-19 sekelleri ve moleküler mekanizmaları ile ilgili çalışmalar giderek yaygınlaşmaktadır ancak çalışmamız bu hasta grubunda bu biyobelirteçlerin birlikte araştırıldığı ilk çalışmadır.

Septik şok ve kritik COVID-19 vakalarının NET oluşumu açısından sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığı bir çalışmada, nükleozom içeriğindeki H3, dairesel H3, nötrofil elastaz ve MPO analiz edildi. Bu çalışmada, dolaşımdaki nükleozom ve nötrofil aktivasyon göstergelerinin COVID-19 ve septik şok gruplarında daha yüksek olduğu bulunmuştur (15). Hastanede yatan COVID-19 tanısı alan hastalarla sağlıklı bir grubu karşılaştıran başka bir çalışmada ise NET konsantrasyonunun Kovid-19 grubunda daha yüksek olduğu görüldü. Aynı çalışmada, COVID-19 grubunda plazma MPO düzeylerinin daha yüksek bulunması önceki bulguları doğruluyor. Bu araştırmayla tutarlı olarak çalışmamızda da plazma MPO düzeylerinin COVID-19 sonrası grupta daha yüksek olduğu görüldü. Aynı zamanda nötrofillerden NET salınımına aracılık eden arginin tabakalaşmasını katalize eden PAD4'ün, NET'lerde sistemik bir artış yarattığı belirlenmiştir (18). Bununla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da PAD4 plazma düzeylerinin COVID-19 sonrası grupta yüksek olduğu görüldü. COVID-19 sonrası tromboembolik olayların ve kardiyovasküler hastalıkların artması ve bunun

NET'lerle ilişkisi ve uzun süreli patolojiler üretmesi halen tartışmalıdır (19). COVID-19'da ortaya çıkan trombotik komplikasyonların mortalite ve morbiditeden sorumlu olduğu belirlendi. Çalışmalar, COVID-19 hastalarında trombozun hem arteriyel hem de akut koroner sendromu, venöz dolaşımı, derin ven trombozunu, pulmoner emboli ve kalp krizine neden olan etkileri etkilediğini göstermiştir. SARS-CoV-2 hastalarının kanında dairesel DNA, sitrulin H3 ve MPO-DNA kompleksinin varlığıyla kendini gösteren NET kalıntılarının bol olduğu, nötrofil-trombosit agregatlarının ve nötrofil aktivasyon göstergelerinin olduğu belirlendi. COVID-19 vakalarında artış (20). COVID-19 sonrası kardiyolojik şikayetleri olan hastalarla yaptığımız çalışmada NETosis'i aktive eden PAD4, MPO, MMP-9 ve H3Cit'in plazma düzeylerinin arttığı belirlendi. Histolojik çalışmalar NET artışının damar hasarına yol açtığını, ağır COVID-19 vakalarında NET kaynaklı immünotrombozun organ hasarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (21,22). NET açısından zengin trombüsler, trombositler ve fibrinler akciğerlerde, kalplerde ve böbreklerde bulunmuştur (20,23).

Koroner arter hastalığı şüphesi olan 282 kişiyle yapılan bir çalışmada, koroner tomografik anjiyografi ve NET belirteçlerinin (sitrulin H3, MPO-DNA kompleksi) ölçümü, bu belirteçlerin aynı zamanda koroner hastalığın şiddeti, protrombotik durum ve majör yan etkilerle de ilişkili olduğunu tespit etmiştir. kalp bozukluklarının etkileri. Bu çalışmada NET oluşumunun ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (24). Histolojik çalışmalar, fare ve insan aterosklerotik lezyonlarının lümeninde NET'lerin varlığını göstermiştir (25). Kontrolsüz NET oluşumunun Kovid-19 sonrası kalp-damar bozukluklarına yol açabileceği hipoteziyle yola çıktığımız bu çalışmada, NETosis'in moleküler mekanizmasında yer alan biyobelirteçlerin durumu, kalp-damar bozuklukları, COVID-19 ve NET'in kesişimindeki sonuçlarla ilişkilendirilmektedir. .

COVID-19 hastalarında MMP-9'un arttığı ve bunun in vitro olarak trombosit ve nötrofil aktivasyonunu ve NET oluşumunu uyardığı rapor edilmiştir (26). Başka bir çalışmada ise nötrofil aktivasyon belirteçleri NET ve MMP9, yoğun bakım gerektiren COVID-19 vakalarında hastalığın şiddeti ile ilişkilendirilmiştir (27). Bu çalışmada, MMP9 mRNA düzeylerinin, COVID-19 hastalarında kontrol grubuna göre literatürle uyumlu olarak daha yüksek olduğu tespit edildi.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma, PAD4, MPO, MMP-9 ve H3Cit'in NET düzensizliğinde potansiyel biyobelirteçler gibi görüldüğünü ve bunun da özellikle kardiyovasküler bozukluklar olmak üzere bazı COVID-19 sonrası semptomlara neden olabileceğini ortaya koyuyor.

KAYNAKLAR

1. Ambrosino P, Calcaterra IL, Mosella M, Formisano R, D'Anna SE, Bachetti T, et al. Endothelial Dysfunction in COVID-19: A Unifying Mechanism and a Potential Therapeutic Target. *Biomedicines*. 2022; 10(4):812.
2. Allan M, Lièvre M, Laurenson-Schaefer H, Barros S, Jinnai Y, Andrews S, et al. The World Health Organization COVID-19 surveillance database *International Journal for Equity in Health*. 2022;21:167.
3. Ceban F, Ling S, Lui LMW, Lee Y, Gill H, Teopiz KM, et al. Fatigue and cognitive impairment in Post-COVID-19 Syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2022;101:93-135.
4. Tenforde MW, Kim SS, Lindsell CJ, Rose EB, Shapiro NI. Symptom Duration and Risk Factors for Delayed Return to Usual Health Among Outpatients with COVID-19 in a Multistate Health Care Systems Network - United States, March-June 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(30):993-998.
5. Huang Y, Pinto MD, Borelli JL, Mehrabadi MA, Abrihim H, Dutt N, et al. COVID Symptoms, Symptom Clusters, and Predictors for Becoming a Long-Hauler: Looking for Clarity in the Haze of the Pandemic. *medRxiv*. Preprint. 2021.
6. Chilosi M, Doglioni C, Ravaglia C, Martignoni G, Salvagno GL, Pizzolo G, et al. Unbalanced IDO1/IDO2 Endothelial Expression and Skewed Keynurenine Pathway in the Pathogenesis of COVID-19 and Post-COVID-19 Pneumonia. *Biomedicines*. 2022;10(6):1332.
7. Visco V, Vitale C, Rispoli A, Izzo C, Virtuoso N, Ferruzzi GJ, et al. Post-COVID-19 Syndrome: Involvement and Interactions between Respiratory, Cardiovascular and Nervous Systems. *J. Clin. Med*. 2022;11:524.
8. Henry BM, Oliveira MHS, Cheruiyot I, Benoit J, Rose J, Favaloro EJ, et al. Cell-Free DNA, Neutrophil extracellular traps (NETs), and Endothelial Injury in Coronavirus Disease 2019-(COVID-19-) Associated Acute Kidney Injury. *Mediators Inflamm*. 2022;2022:9339411.
9. Zhang R, Sun C, Han Y, Huang L, Sheng H, Wang J, et al. Neutrophil autophagy and NETosis in COVID-19: perspectives. *Autophagy*. 2022;1-10.
10. Bavishi C, Bonow RO, Trivedi V, Abbott JD, Messerli FH, Bhatt DL. Special Article - Acute myocardial injury in patients hospitalized with COVID-19 infection: A review. *Prog Cardiovasc Dis*. 2020;63(5):682-689.
11. Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem*. 2017;424(1-2):123-145.
12. Thierry AR. Host/genetic factors associated with COVID-19 call for precision medicine. *Precis Clin Med*. 2020;3(3):228-234.

13. Pollitt KJG, Peccia J, Ko AI, Kaminski N, Cruz CSD. COVID-19 vulnerability: the potential impact of genetic susceptibility and airborne transmission. *Hum Genomics*. 2020;14(1):17.
14. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010;207(9):1853-62.
15. Morimont L, Dechamps M, David C, Bouvy C, Gillot C, Haguët H, et al. NETosis and Nucleosome Biomarkers in Septic Shock and Critical COVID-19 Patients: An Observational Study. *Biomolecules*. 2022;12(8):1038.
16. Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(7):1417-24.
17. Soriano JB, Murthy S, Marshall JC, Relan P, Diaz JV. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(4):e102-e107.
18. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, Lima Md, Nascimento DC, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med*. 2020 Dec 7;217(12):e20201129.
19. Zhu Y, Chen X, Liu X. NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond *Front Immunol*. 2022;13:838011.
20. Ackermann M, Anders HJ, Bilyy R, Bowlin GL, Daniel C. Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death Differ*. 2021;28(11):3125-3139.
21. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009;15(6):623-5
22. Morris G, Bortolaschi CC, Puri BK, Olive L, Marx W, O'Neil A, et al. Preventing the development of severe COVID-19 by modifying immunothrombosis. *Life Sci*. 2021;264:118617.
23. Nicolai L, Leunig A, Brambs S, Kaiser R, Weinberger T, Weigand M, et al. Immunothrombotic dysregulation in covid-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation*. 2020;142:1176–89.
24. Borissoff JJ, Joosen IA, Versteijlen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a pro-thrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2032–40. 27.
25. Megens RTA, Vijayan S, Lievens D, Döring Y, van Zandvoort MAMJ, Grommes J, et al. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2012;107:597–8.
26. McKenna E, Wubben R, Isaza-Correa JM, Melo AM, Mhaonaigh AU, Conlon N, et al. Neutrophils in COVID-19: Not Innocent Bystanders. *Front Immunol*. 2022;13:864387.

27. TJ, Gonye ALK, Freeman SS, Kaplonek P, Gushterova I, Kays KR, et al. Longitudinal characterization of circulating neutrophils uncovers phenotypes associated with severity in hospitalized COVID-19 patients. *Cell Rep Med.* 2022;3(10):100779.