T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SARS-COV-2'NİN K18-HACE2 TRANSGENİK FARE MİDESİNE ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Erva SEVİÇ YILMAZ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ

İSTANBUL

2023

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SARS-COV-2'NİN K18-HACE2 TRANSGENİK FARE MİDESİNE ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Erva SEVİÇ YILMAZ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ

İSTANBUL

2023

TEZ ONAYI

BEYAN

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

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38713

Erva Seviç Yılmaz

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim başladığı andan itibaren odasının kapısını her çaldığımda beni güler yüzle karşılayan, düşündürerek öğreten, çok yönlü bilgisiyle kendisine daima hayran bırakan, "Histolojideki taze kanlar" olarak bize destek olan danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu'na,

Histoloji eğitimimin mihenk taşlarını koyan, bana olan güveniyle zorlukların üstesinden gelmemi kolaylaştıran, akademik ve sosyal açıdan ilerlemem için, yeri geldiğinde zorlansam dahi, benim için elinden geleni yapan ve eğitimim boyunca bir tez danışmanından çok daha fazlası olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Kervancıoğlu Demirci'ye,

Teorik ve pratik tecrübelerini aktararak eğitimime katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Sibel Köktürk, Sayın Doç. Dr. Tuğba Kotil, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Ekiz Yılmaz'a,

Teknik bilgisiyle bana laboratuvarı öğreten, beni yüreklendiren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hasan Serdar Mutlu'ya,

Tezimin deney sürecinde beraber çalıştığımız, daima yardım eden ve her sorumu yanıtlayan Sayın Dr. Engin Alp Önen'e,

Bu yola birlikte baş koyduğumuz, çalışmaktan yorulduğumuz her anda beraber gülmeyi başarabildiğimiz ve birbirimizi geliştirdiğimiz asistan arkadaşlarım Dr. Şahika Yardım, Dr. Merve Keskin ve Biyolog Fatma Beyza Sağ'a,

Bir sabah kahvesinde buluştuğumuz, gün içinde ne zaman sıkıntıya düşsem gerek hayat tecrübeleriyle gerekse mesleki tecrübeleriyle yoluma ışık tutan Tıbbi Biyolog İlkay Özdemir, Biyolog Sibel Doğan ve Selahattin Ünal'a,

Beni kardeşleri gibi gören, destek olan ve ne zaman ihtiyacım olsa yardımlarını esirgemeyeceklerini bildiğim Dr. Feride Özdemir, Dr. Emel Usta, Dr. Aslı Erdoğan ve Dr. Serpil Telci'ye,

Tezime katkıları ve bana öğrettikleri için, titizlikle çalışan değerli elektron mikroskobu ekibi Biyolog Ebru Akyön, Biyolog Fadime Aktar ve Biyolog Funda Onar'a,

Hiçbir ricamı kırmayıp beni anlayışla karşılayan Arif Çoruk ve Alaaddin Taş'a,

Bizler için uğraşan daimî destekçimiz Gülcan Öztürk Altan'a,

Rotasyonum boyunca keyifle çalıştığım ve klinik embriyolojiye dair bilgi ve tecrübelerini aktaran Sayın Prof. Dr. Cemil Akgül, Dr. Sibel Bulgurcuoğlu Kuran, Dr. Ayşe Altun, Biyolog Kübra Nur Uzun ve Dr. Çiğdem Çelik'e,

Her şeyden önce "iyi bir insan" olma yolunda beni özveriyle yetiştiren, bugünlere getiren ve desteklerini bir an olsun esirgemeyen canım aileme; Nazmi, Aynur ve Ceyda Seviç'e ve daima yanımda olan, yüzümü güldüren, bana güç veren sevgili eşim Dr. Kerem Yılmaz'a

Teşekkür ederim.

Dr. Erva Seviç Yılmaz

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI I

BEYAN II

ÖNSÖZ III

İÇİNDEKİLER IV

TABLOLAR LİSTESİ VIII

ŞEKİLLER LİSTESİ IX

SEMBOLLER/ KISALTMALAR LİSTESİ XV

ÖZET 1

ABSTRACT 2

1. GİRİŞ VE AMAÇ 3

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1 Primitif Bağırsak ve Mide Gelişimi 5

2.1.1 Gelişimin Moleküler Kontrolü 6

2.1.2 Anatomik ve Histolojik Gelişim 7

2.2 İnsan Midesi Histolojisi 8

2.2.1 Tunika Mukoza 9

2.2.1.1 Özelleşmiş Mide Hücreleri 10

2.2.1.1.1 Yüzey Müköz Hücreleri 10

2.2.1.1.2 Müköz Boyun Hücreleri 11

2.2.1.1.3 Esas Hücreler 11

2.2.1.1.4 Parietal Hücreler 11

2.2.1.1.5 G Hücreleri 12

2.2.1.1.6 Enteroendokrin Hücreler 12

2.2.1.1.7 Tuft hücreleri....13

2.2.1.1.8 Kök Hücreler....13

2.2.2 Tunika Submukoza....14

2.2.3 Tunika Muskularis....14

2.2.4 Tunika Seroza....14

2.3 Fare Midesi Histolojisi....14

2.4 Koronavirüsler....17

2.4.1 SARS-CoV-2....18

2.4.1.1 Viral Yapısal Proteinler ve SARS-CoV-2'nin Konakçı Hücreye Girişi....18

2.4.1.2 SARS-CoV-2'nin Konakçı Hücreler Üzerine Etkisi....20

2.4.1.3 SARS-CoV-2'nin Organ Etkisi....22

2.5 Hücre Ölüm Yolakları....25

2.5.1 Apoptoz....26

2.5.1.1 İntrinsik Yolak....27

2.5.1.2 Ekstrinsik Yolak....28

2.5.2 Piroptoz....30

2.5.3 Nekroptoz....33

2.5.4 SARS-CoV-2 ve Hücre Ölüm Yolakları İlişkisi....34

2.6 Galektin-3 Proteini....36

2.6.1 Galektin-3'ün Hücre Ölüm Yolakları ile İlişkisi....37

2.6.2 Galektin-3'ün SARS-CoV-2 ile İlişkisi....38

3. GEREÇ VE YÖNTEM....40

3.1 Virüs İzolasyonu ve Hayvan Deneyi Uygulamaları....40

3.2 Işık Mikroskobik İnceleme....40

3.2.1 Histokimyasal Boyama 41
3.2.2.1 Hematoksilen-Eozin 41
3.2.2.2 Periyodik Asit-Schiff.....42
3.2.2.3 Alsiyan mavisi-Tartrazin.....42
3.2.2 İmmünohistokimyasal Boyama.....43
3.2.2.1 Primer Antikor Uygulaması 44
3.2.2.1.1 SARS-CoV-2.....44
3.2.1.1.2 Apoptoz.....44
3.2.1.1.3 Piroptoz 44
3.2.1.1.4 Nekroptoz.....44
3.2.1.1.5 Galektin-3.....44
3.3 Elektron Mikroskobik İnceleme 44
3.4 İstatistiksel Analiz.....45
3.5 Şematik Tasarım 45
4. BULGULAR 46
4.1 Histopatolojik Bulgular.....46
4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular.....59
4.2.1 SARS-CoV-2 59
4.2.2 Apoptoz.....62
4.2.3 Piroptoz 64
4.2.4 Nekroptoz.....67
4.2.5 Galektin-3.....70
4.3 Elektron Mikroskobik Bulgular.....73
5. TARTIŞMA.....84

KAYNAKLAR.....90

ETİK KURUL KARARI.....99

ÖZGEÇMİŞ.....100

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Primitif bağırsak kısımları ve gelişen yapılar 6

Tablo 2-2. İnsan ve fare midesinin morfolojik ve histolojik karşılaştırması..... 16

Tablo 4- 1. Histopatolojik hasar skorlamaları.....55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2- 1. Fare midesinin şematik gösterimi. Ön midede keratinleşmiş çok katlı yassı epitel izlenmektedir. Z çizgisi, mide içinde, keratinleşmiş çok katlı yassı epitelden tek katlı prizmatik epitel geçişinde görülmektedir. Glandüler mukozada bez yapıları parenkimayı oluşturmaktır. Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 50 µm..... 16

Şekil 2- 2. SARS-CoV-2 yapısal proteinlerini ve konakçı hücre tutunmasını gösteren şema. Viral spike proteininin S1 alt birimi konak hücrelerine girişte ACE2'ye doğrudan bağlanır. Virüs konakçı hücre ile temas ettiğinde S1 ve S2 alt birimleri birbirinden ayrılır. ACE2'ye tutunma sonrası TMPRSS2, S2 alt birimini parçalar. Bu parçalanma ile S2 alt birimi aktiflenir ve virüs-konakçı kaynaşması başlar. 20

Şekil 4- 1. Kontrol grubunda genel histolojik yapı. Ön mideye ait nonglandüler mukoza (ng) ve midenin glandüler mukozası (gl) izlenmektedir. Submukoza ve tunika muskularis olağan görünümdedir. Z çizgisi (Z) seçilmektedir ve glandüler mukozada gastrik çukurcuklar ile bez yapıları izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 4X. Ölçek 200 µm.....47

Şekil 4- 2. Kontrol grubunda yüzey epiteli. Fareye ait, insandan farklı olarak, ön midenin keratinize olmuş çok katlı yassı epiteli (asterisk) ve glandüler mukozanın tek katlı prizmatik yüzey epiteli (ok) normal görünümdedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 47

Şekil 4- 3. Kontrol grubunda fundus bezleri. A. Yüzey müköz hücreleri (asterisk) lümene bakan tarafta izlenmektedir. B. Gastrik bezlerin boyun kısmında eozinofilik sitoplazmalı parietal hücreler (ok) ve bazale yakın yerleşim gösteren esas hücre topluluğu (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm..... 48

Şekil 4- 4. SARS-CoV-2 grubunda epitelde dökülme. SARS-CoV-2 grubunda kardiya bölgesinde yüzey epitelinde (p) dökülme (asterisk) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 49

Şekil 4- 5. SARS-CoV-2 grubunda glandüler hücre morfolojisinde bozulma. Fundus bezlerinde glandüler hücreler arası alanda genişleme ve ödem (asterisk) izlenmektedir.

Glandüler hücrelerde sitoplazmik vakuoller (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 50

Şekil 4- 6. SARS-CoV-2 grubunda doku hasarı. A. Epitel bütünlüğünün korunduğu görülürken, yer yer hasarlı alanlara (asterisk) rastlanmıştır. B. Lümene yakın kısımlarda damarda konjesyon (ok) ve hidropik dejenerasyon gözlenen glandüler hücreler (ok başı) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm. 50

Şekil 4- 7. SARS-CoV-2 grubunda doku hasarı. A. Epitel dokunun tamamında hasar izlenmektedir. Lümene bakan yüzey epitelinde bütünlüğün bozulduğu (ok başı) görülmektedir. B. Gastrik bezlerin bazalindeki hücrelerin sitoplazmalarında belirgin olmak üzere dokunun tamamında vakuolizasyon (ok) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektifler: 10X, 40X. Ölçek: 50 µm. 51

Şekil 4- 8. SARS-CoV-2 grubunda doku hasarı. Epitel bütünlüğünün korunduğu görülürken piknotik nüveli hücreler (ok) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 52

Şekil 4- 9. SARS-CoV-2 grubunda inflamasyon. Subepitelyal alanda lenfositten zengin hücre infiltrasyonu (asterisk) ve ödem görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 53

Şekil 4- 10. SARS-CoV-2 grubunda kas hasarı. Tunika muskulariste longitudinal ve sirküler uzanım gösteren kas hücrelerinde vakuolizasyon (ok) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 54

Şekil 4- 11. Histopatolojik hasarın istatistiksel değerlendirmesi. Anlamlı farklılık düzeyleri (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (* $p<0.05$, ** $p<0.008$, *** $p<0.0008$, **** $p<0.0001$)..... 55

Şekil 4- 12. Kontrol grubunda nötral müsinler. Epitel bütünlüğünün korunduğu ve lümene bakan yüzey boyunca, apikal sitoplazmada devamlı PAS pozitif reaksiyon izlenmektedir. PAS. Objektif 10X. Ölçek 50 µm. 56

Şekil 4- 13. SARS-CoV-2 grubunda nötral müsinler. SARS-CoV-2 grubunda epitel hasarının olduğu bölgelerde (asterisk), nötral müsinlerin kaybı nedeniyle PAS pozitif

reaksiyonun olmadığı nötral müsinlerin kaybı görülmektedir. PAS. Objektif 10X. Ölçek 50 µm. 57

Şekil 4- 14. Kardiya bölgesinde asidik müsinler. A, B. Kontrol grubunda asidik müsinler (ok) mavi görülmektedir. C, D. SARS-CoV-2 grubunda mavi-yeşil görünümde asidik müsinler (ok başı) izlenmektedir. Alsiyan mavisi-Tartrazin. Objektifler: A ve C 10X, B ve D 40X. Ölçek 50 µm. 58

Şekil 4- 15. Pilor bölgesinde asidik müsinler. A, B. Kontrol grubunda pilorik bölgede gastrik epitel bazalinde asidik müsinler (ok başı) görülmektedir. C, D. SARS-CoV-2 grubunda pilorik bölgeye yakın alanlarda asidik müsinler (ok başı) daha az izlenmektedir. Alsiyan mavisi-Tartrazin. Objektifler: A ve C 10X, B ve D 40X. Ölçek 50 µm. 59

Şekil 4- 16. Kontrol grubunda SARS-CoV-2 nükleokapsid immünohistokimyasal boyaması. A. Fundus bezlerinde, organın geri kalan kısmına benzer şekilde, SARS-CoV-2 pozitifliği izlenmemiştir. B. Yüzey epiteli boyunca immünoreaktivite görülmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm. 60

Şekil 4- 17. SARS-CoV-2 grubunda SARS-CoV-2 nükleokapsid immünohistokimyasal boyaması. A, B. Mide fundus bezlerinde yüzey epitelinde SARS-CoV-2 pozitifliği izlenmektedir. SARS-CoV-2 pozitif alanlar (ok başı) ve pozitif olmayan (asterisk) alanlar ile boyun kısmındaki parietal hücrelerde SARS-CoV-2 pozitifliği (ok) görülmektedir. C. Bazale yakın yerleşimli parietal hücrelerin tamamı SARS-CoV-2 pozitif (ok) izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektifler: A 10X, B ve C 40X. Ölçek 50 µm. ... 61

Şekil 4- 18. Kontrol grubunda kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen apoptoz. Kontrol grubunda yüzey epitelinde yer yer hafif (ok) kaspaz-3 pozitifliği izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 62

Şekil 4- 19. SARS-CoV-2 grubunda kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen apoptoz. SARS-CoV-2 grubunda epitel bütünlüğü korunmuş alanlarda değişken şiddette kaspaz-3 pozitifliği izlenmektedir. Yüzey müköz hücrelerde şiddetli (ok) ve parietal hücrelerde orta şiddette (ok başı) pozitif immünoreaktivite görülmüştür. Mukozanın bazalinde yerleşim gösteren esas hücrelerde immünorekativite (asterisk) görülmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 63

Şekil 4- 20. Apoptoz skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (* $p<0.05$) 64

Şekil 4- 21. Kontrol grubunda Gasdermin D immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen piroptoz. Gasdermin D ile doku genelinde immünoreaktivite izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 65

Şekil 4- 22. SARS-CoV-2 grubunda Gasdermin D immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen piroptoz. Gasdermin D ile yapılan boyamada epitelin lümene bakan yüzde Gasdermin D pozitifliği daha şiddetliyken (ok başı), bezin iç kısımlarında parietal hücrelerde orta şiddette pozitif immünoreaktivite (ok) görülmektedir. Gastrik bezlerin bazalinde esas hücrelerde yer yer hafif Gasdermin D pozitifliği (daire) izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 66

Şekil 4- 23. Piroptoz skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (* $p<0.05$) (GSDMD: Gasdermin D) 67

Şekil 4- 24. Kontrol grubunda MLKL immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen nekroptoz. Mukoza boyunca nonspesifik hafif MLKL pozitifliği görülmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 68

Şekil 4- 25. SARS-CoV-2 grubunda MLKL immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen nekroptoz. Fundus bezlerinde yüzeyde ve mukozanın iç kısmında pozitif immünoreaktivite izlenmektedir. Yüzey müköz hücrelerinde (ok) MLKL pozitifliği görülmektedir. Parietal hücrelerde (ok başı) orta-şiddetli MLKL pozitifliği görülürken, esas hücrelerde (daire) immünorekativite görülmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 69

Şekil 4- 26. Nekroptozun skorlaması. Anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. ($p=0,3926$) 70

Şekil 4- 27. Kontrol grubunda Galektin-3 immünohistokimyasal boyaması. A. Bazale yakın yerleşim gösteren hücrelerde pozitif immünoreaktivite izlenmektedir. B. Parietal hücrelerde (ok) ve esas hücrelerde (ok başı) yer yer değişken şiddette Galektin- 3

pozitifliği görülmüştür. DAB-Hematoksilen. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm. 71

Şekil 4- 28. SARS-CoV-2 grubunda Galektin-3 immünohistokimyasal boyaması. A. Lümene bakan tarafta immünoreaktivite görülmezken, bazalde hafif Galektin-3 pozitifliği izlenmiştir. B. Birkaç esas hücre (ok başı) hafif pozitif immünoreaktivite gösterirken, parietal hücrelerde (ok) pozitiflik görülmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm. 72

Şekil 4- 29. Galektin-3 skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (* $p<0.05$) 73

Şekil 4- 30. Kontrol grubunda parietal hücrelerin TEM görüntüsü. Parietal hücrelerin (P) ökromatik nükleusları, genişlemiş mitokondrileri (m) ve tübülovezikül sistemi (tv) oluşturan tübül yapıları görülmektedir. Büyütme 5000X..... 74

Şekil 4- 31. Kontrol grubunda esas hücre ve entreoendokrin hücrenin TEM görüntüsü. Apikal sitoplazmasında farklı boyutlardaki zimojen granüller (asterisk) ile lümene (L) bakan esas hücreler (E) görülmektedir. Elektron yoğun salgı granülleri (ok başı) ile seçilebilen enteroendokrin hücre (Ee) izlenmektedir. Büyütme 4000X..... 75

Şekil 4- 32. Kontrol grubunda müköz hücrelerin TEM görüntüsü. Parietal hücre (P) etrafında yerleşim gösteren iki müköz hücre (M) görülmektedir. Sitoplazma apikalinde elektron geçirgen görünümde mukus salgısı (mu) izlenmektedir. Büyütme 5000X..... 76

Şekil 4- 33. SARS-CoV-2 grubunda parietal hücrelerin TEM görüntüsü. Solda ökromatik nükleusu (n) ile normal görünümde parietal hücre (P1) izlenmektedir. Sağda piknotik nükleuslu (ok) hasarlı bir parietal hücre (P2) görülmektedir. Büyütme 4000X..... 77

Şekil 4- 34. SARS-CoV-2 grubunda esas hücrelerin TEM görüntüsü. İki parietal hücre (P) arasında bazal yerleşimli esas hücreler (E) görülmektedir. Zimojen granüller (ok) ve iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ağı (gER) seçilmektedir. Büyütme 4000X. 78

Şekil 4- 35. SARS-CoV-2 grubunda müköz hücrelerin TEM görüntüsü. Apikal sitoplazmasında mukus salgısı (mu) ile dolu müköz hücreler (M) görülmektedir. Hasarlı müköz hücre (ok) izlenmektedir. Büyütme 4000X. 79

Şekil 4- 36. SARS-CoV-2 grubunda enteroendokrin hücrenin TEM görüntüsü. Sitoplazmasında çok sayıda elektron yoğun salgı granülleri (ok başı) içeren, endokrin aktivitesi artmış enteroendokrin hücre (Ee) görülmektedir. Büyütme 4000X. 80

Şekil 4- 37. SARS-CoV-2 grubunda düz kas hücresinin TEM görüntüsü. Hafif kondanse olmuş nükleusu ile hasarlı kas hücresi görülmektedir. Büyütme 10000X. 81

Şekil 4- 38. SARS-CoV-2 grubunda viral partikül benzeri yapıların TEM görüntüsü. Parietal hücrede membrana yakın yerleşim gösteren 70-110 nm boyutlarında viral partikül benzeri yapılar (ok) izlenmektedir. Büyütmeler: Üst ultramikrograf 50000X, alt ultramikrogaf 75000X. 82

Şekil 4- 39. SARS-CoV-2 grubunda viral partikül benzeri yapıların TEM görüntüsü. Üst ultramikrografta parietal hücrede, alt mikrografta müköz hücrede vezikül içinde viral partikül benzeri yapılar izlenmektedir. Büyütme 40000X. 83

Şekil 5- 1. SARS-CoV-2 ve hücre ölüm yolakları ilişkisi. Apoptoz: Viral spike proteinin (S) konakçı hücre membranına tutunması ve viral genomun hücre içine alınmasıyla birlikte aktiflenen NFκB yolağı, hücrede inflamatuar sitokinlerin salınmasını ve akut inflamatuar hücrelerin kemotaksisini indükleyebilir. Ayrıca spike protein ölüm reseptörlerini etkileyerek hücrede, ekstrinsik apoptoz yolağını başlatabilir. Nekroptoz: İnflamatuar sürecin başlamasıyla hücrelerde nekrozom kompleksleri oluşur. MLKL fosforile olarak hücre membranında hasar meydana getirir ve nekroptoz gerçekleşebilir. Nekroptoz sonucunda açığa çıkan DAMP ve PAMP'lar inflamatuar süreci besleyerek hasarı şiddetlendirir. Piroptoz: DAMP ve PAMP'lar ile NFκB yolağının doğrudan etkisi inflamazom oluşumu indükleyerek kaspaz-1'i aktifler ve GSDMD porlarının oluşumu tetiklenir. Böylelikle hücre piroptoza gidebilir. Ayrıca IL-1ß gibi inflamatuar sitokin salınımı, hasara katkı sağlamaktadır. Koruyucu bir etken olabilecek Galektin-3'ün SARS-CoV-2 ile enfekte hücrede azaldığı çalışmamızda gösterilmiştir.....87

SEMBOLLER/ KISALTMALAR LİSTESİ

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

nm: Nanometre

ACE2: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2

AIM2: Absent in melanoma 2

APAF-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

Bcl-2: B hücreli lenfoma-2

BH3: Bcl-2-benzeri domain-3

BMP-4: Kemik morfogenetik protein-4

COVID-19: Koronavirüs-19 hastalığı

CRP: C-reaktif protein

DAB: 3,3'-diaminobenzidin

DAI: İntrasitoplazmik RNA/DNA ligandı

DAMP: Tehlikeyle ilişkili moleküler kalıp

ERGIC: Endoplazmik retikulum-golgi ara bölmesi

FasL: Fas Ligandı

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FLIP: Kaspaz-8 inhibitör protein

G-CSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör

GSDMD: Gasdermin D

H. pylori: Helikobakter pilori

hACE2: İnsan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2

HCl: Hidroklorik asit

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü

HTLV-1: İnsan T-lenfotropik virüs tip 1

IFN: İnterferon (Tip I, gama [γ])

IgE: İmmünglobulin E

IL: İnterlökin

IP10: İnterferon γ ile indüklenen protein 10

IQR: Çeyrekler açıklığı

LDH: Laktat dehidrogenaz

MERS: Orta Doğu Solunum Sendromu

MERS-CoV: Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü

MLKL: Psödokinaz karma soy kinaz etki alanı benzeri

NFκB: Nükleer faktör kappa beta

NLR: Lösin bakımından zengin nükleotid bağlayıcı alan

NLRP3: NLR ailesi, pirin alanı içeren-3

PAMP: Patojenle ilişkili moleküler kalıp

PARP: Poli ADP-riboz polimeraz

PAS: Periyodik Asit-Schiff

PBS: Fosfat tamponlu salin

RIPK3: Reseptör-etkileşimli serin-treonin kinaz 3

SARS: Şiddetli Akut Solunum Sendromu

SARS-CoV: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü

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

SHH: Sonic Hedgehog sinyal yolağı

STING: İnterferon genlerinin uyarıcısı

tBID: parçalanmış BH3-etkileşim alanı

TEM: Geçirimli elektron mikroskobu

TGF-ß: Transforme edici büyüme faktörü beta

TLR: Toll benzeri reseptör

TMPRSS-2: Konak tip II transmembran serin proteaz enzimi

TNF: Tümör nekrozis faktör

TNFR: Tümör nekrozis faktör reseptörü

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VIP: Vazoaktif inhibitör peptit

ÖZET

SARS-CoV-2'nin K18-hACE2 Transgenik Fare Midesine Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskobu Düzeyinde Araştırılması

Giriş: 2019'da pandemi başlatarak kitlesel ölümlere neden olan SARS-CoV-2'nin, çeşitli organlarda varlığı ve yaptığı hasarlar literatürde gösterilmiştir. Bu çalışmada amacımız, virüsün sindirim sisteminde özellikle mide duvarındaki etkisini araştırmaktır.

Gereç ve yöntem: İnsan ACE2 reseptörü eksprese eden K18-hACE2 transgenik farelerden, kontrol grubu (n=10) ve insandan izole edilmiş SARS-CoV-2 inhale ettirilmiş SARS-CoV-2 (n=10) grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu. Enfeksiyon sonrası 8.günde, akut dönemde farelerin mideleri diseksiyonla çıkartılarak mikroskobik incelemeler için tespit edildi. Parafin kesitler, histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle histopatolojik inceleme, apoptoz, piroptoz, nektroptoz, SARS-CoV-2 ve Galektin-3 değerlendirmesi için ışık mikroskobunda; epon ince kesitler, geçirimli elektron mikroskobunda incelenerek değerlendirildi.

Bulgular: Işık mikroskobik incelemelerde, SARS-CoV-2 grubunda mide bez epitelinde dökülme, doku genelinde hasar ve hasarlı alanlarda nötral ve asidik müsinlerin kaybı, bazı alanlarda apoptoz ve piroptoz artışı ile Galektin-3 ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Nekroptoz, gruplar arası anlamlı fark göstermemiştir. Subepitelyal lenfositten zengin hücre infiltrasyonu ve ödem görülmüştür. Tunika muskulariste longitudinal ve sirküler uzanım gösteren kas gruplarında vakuolizasyona saptanmıştır. Elektron mikroskobik incelemede, parietal hücrelerin belirgin şekilde etkilendiği ve parietal hücrelerin sitoplazmasında virüs benzeri yapıların olduğu görülmüştür. Enteroendokrin hücrelerde aktivite artışı saptanmıştır. SARS-CoV-2 grubunda mide mukozasında görülen hasar, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($p<0,0001$).

Sonuçlar: SARS-CoV-2'nin mide duvarında hasara ve hafif inflamasyona yol açtığı, özellikle tunika mukozada bez epitelini ve parietal hücreleri etkilediği görülmüştür. Doku hasarıyla birlikte ortaya çıkan fonksiyon bozukluğu, asidik dengenin ve koruyucu bariyerlerin kaybı; midede sekonder etkenlere yatkınlık oluşturabilir. Galektin-3'ün bu süreçte azalması; dokunun, hasara açık hale gelmesine sebep olabilir. Uzun dönem hasarın açığa kavuşturulması için farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *apoptoz, galektin-3, gastrik mukoza, mide, piroptoz, SARS-CoV-2, transgenik fareler*

ABSTRACT

Investigation of the Effect of SARS-CoV-2 on K18-hACE2 Transgenic Mice Stomach by Light and Electron Microscopy

Objective: SARS-CoV-2 started a pandemic in 2019 and caused mass deaths. Its presence and damages has been shown in various organs in the literature. In this study, we aimed to investigate the effect of the virus in the digestive system, especially to the stomach wall.

Materials and methods: Two groups were formed from human ACE2 receptor expressing K18-hACE2 transgenic mice as control group (n=10) and SARS-CoV-2 (n=10) group inhaled SARS-CoV-2 isolated from human. On the 8th day postinfection, the stomachs of mice in the acute phase were dissected and fixed for microscopic examinations. Paraffin sections were examined by histochemical and immunohistochemical methods for histopathologic examination, apoptosis, pyroptosis, nectroptosis, SARS-CoV-2 and Galectin-3 evaluation under light microscope and epon thin sections were examined under transmission electron microscope.

Results: Light microscopic examinations revealed gastric glandular epithelial shedding, widespread tissue damage and loss of neutral and acidic mucins in damaged areas, increased apoptosis and pyroptosis in some areas and decreased galectin-3 expression in the SARS-CoV-2 group. There was no significant difference regarding necroptosis between the groups. Subepithelial lymphocyte-rich cell infiltration and edema were observed. Vacuolization was detected in longitudinal and circular muscles in the tunica muscularis. Electron microscopic examination showed that parietal cells were markedly affected, and virus-like particles were observed in the cytoplasm of parietal cells. Increased activity was detected in enteroendocrine cells. The gastric mucosal damage in the SARS-CoV-2 group was found to be statistically different compared to the control group ($p<0.0001$).

Conclusions: SARS-CoV-2 caused damage and mild inflammation on the gastric wall, especially affecting the glandular epithelium and parietal cells in the tunica mucosa. Dysfunction resulting from tissue damage, loss of gastric acidity and protective barriers may predispose the stomach to secondary infections. The reduction of galectin-3 in this process may cause the tissue to become vulnerable to damage. Different studies are needed to clarify the long-term damage.

Keywords: *apoptosis, galectin-3, gastric mucosa, pyroptosis, SARS-CoV-2, stomach, transgenic mice*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

2019 yılında tüm dünyayı etkisi altına alan pandemiye SARS-CoV-2 (Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2)'nin neden olduğu bilinmektedir. Başlangıçta solunum sistemi olmak üzere virüsün çeşitli organlarda varlığı ve yaptığı hasar gösterilmiştir. Hasarın patogenezinde virüsün hücre içine girişinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Viral spike proteini, konak hücrede ACE2 (Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2) reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanmayla ortaya çıkan kompleks, TMPRSS-2 (Konak tip II transmembran serin proteaz) enzimi aracılığıyla hücre içine giriş için proteolitik süreci başlatır. Tip II alveolar epitel hücrelerinde yüksek oranda olmak üzere tüm vücutta farklı lokalizasyonlarda eksprese edilen ACE2, insanlarda SARS-CoV-2'nin hücresel giriş reseptörü olarak kabul görmüştür. ACE2 reseptörü insan mide dokusunda ve diğer gastrointestinal organlarda farklı histolojik bölgelerde tanımlanmıştır (1-4). hACE2 (İnsan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2) reseptörüne sahip deney hayvanları kullanılarak yapılan bir çalışmada ACE2 reseptörlerinin gastrointestinal sistem epitel hücrelerinde yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir (5). Bu durumda, midenin ve genel olarak gastrointestinal sistemin virüs için hedef olabileceği açıktır. Literatürdeki olgularda bulantı, kusma, iştah kaybı ve diyare gibi semptomlar bildirilmiş ve virüsün gastrointestinal sistemi etkileyebildiği gösterilmiştir (6, 7).

Çalışmamızda SARS-CoV-2 ile enfekte edilmiş K18-hACE2 transgenik farelerde mide dokusunda meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. SARS-CoV-2 ile enfekte insanlarda mide ile ilişkili semptomlara sebep olabilecek, virüsün asidik mide pH'ında varlığı ve virüs kaynaklı morfolojik değişikliklerin mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.

Virüsün etki mekanizmasını açıklamaya yönelik çeşitli çalışmalarda SARS-CoV-2 ve programlanmış hücre ölüm tipleri ilişkilendirilmiştir (8-10). Genetik olarak değişikliğe uğramış, onarılamayacak derecede hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması gibi patolojik durumlarda gerçekleşebilen hücre ölümü apoptozdur (11). Edinilmiş bağışıklık yanıtta rol oynayarak, çeşitli mikroorganizmalar ve tehlike sinyalleri ile uyarılan hücrelerde inflamatuar kaspazların etkisiyle meydana gelen, hücre membranında porlar oluştururken IL-1ß (İnterlökin-1ß) gibi inflamatuar sitokinlerin salınımına yol açan kontrollü hücre ölüm yolağı piroptozdur (12). Kaspaz bağımsız olarak gerçekleşen ve patojenler, interferonlar gibi çevresel etkenlerin hücre membranına ulaşmasıyla aktiflenen çeşitli reseptörlerin uyarımı ile membranda porlar oluşturan, tehlike ve patojen ilişkili moleküler kalıpların salınmasına sebep olarak inflamasyon

sürecini güçlendiren hücre ölümü nekroptozdur (11). Postmortem COVID-19 (Koronavirüs-19 hastalığı) hastalarından ve SARS-CoV-2 enfekte hACE2 reseptörüne sahip farelerden alınan akciğer doku örnekleri üzerine yapılan bir çalışmada; akciğerlerde belirgin inflamasyon gösterilmiştir ve hücre ölüm yolaklarından nekroptoz ve apoptoz varlığı öne sürülmüştür (13). Çalışmamızda SARS-CoV-2'nin etki edebileceği programlanmış hücre ölüm yolağı tipleri midede araştırılmıştır.

SARS-CoV-2'ye dair vaka bildirimleri incelendiğinde; akciğerde görülebilen destrüktif hasarın gastrointestinal sistem organlarında daha hafif seyirli olduğu gözlenmiştir. Bu durum, koruyucu bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Hem COVID-19 ile ilgili yapılmış çalışmalarda hem de farklı hastalıklarda Galektin-3'ün proinflamatuar etkileri ön planda tutulmuş olsa da Galektin-3'ün intraselüler anti-apoptotik etkisi de bilinmektedir (14-16). Çalışmamızda viral hasar, hücre ölümünün yanında koruyucunun Galektin-3 olabileceği düşünülerek araştırılmıştır. Diğer taraftan apoptoz ve diğer hücre ölüm tiplerinin varlığı, hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması adına dokunun işleyişinin bozulmadan yenilenmesi sürecine katkı sağlıyor olabilir.

Çalışmamızda SARS-CoV-2 ile enfekte K18-hACE2 farelerin mideleri histolojik olarak incelenerek; olası histomorfolojik değişikliklerin, hasarın ve inflamasyonun ortaya konması, bunların hangi hücre ölümü mekanizmasıyla meydana geldiğinin gösterilmesi ve olası koruyucu faktörlerin durumu araştırılmıştır. SARS-CoV-2'nin akut dönemde transgenik fare midelerine etkisi incelenerek, insanda olabilecek patolojilere ışık tutulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Primitif Bağırsak ve Mide Gelişimi

Embriyolojik gelişimin dördüncü haftasında kranial, kaudal ve lateral yönde katlanmalar meydana gelir. Bu dönemde kranial kıvrılma ile merkezi sinir sistemi gelişmeye başlar ve embriyonun baş kısmının ağırlığı artar. Böylelikle öne doğru bir kıvrılma meydana gelir ve kalp, proksimalden ventrale doğru yönlenir. İlkel ağız boşluğu yani stomodeum ortaya çıkar.

Amniyon kesesinin lateral katlanmalarıyla vitellus kesesi embriyo içine doğru kıvrılır, uzar ve primitif bağırsak kanalını oluşturur. Bu kanal; ağız tarafında orofaringeal membran ile, kaudal uçta ise kloaka membranı ile sınırlıdır.

Embriyolojik köken olarak solunum sistemi ve ürogenital sistemin bir kısmı ile benzerlikler gösteren sindirim sistemi, farklı germ yapraklarından gelişen yapıları içermektedir. Epitel ve bez yapılarının büyük kısmı endodermden gelişir. Endoderm, primitif bağırsak gelişimi sırasında pozisyona yön verir. Sindirim kanalının kas ve bağ dokusu splanknik mezodermden gelişir. Oluşacak organları inerve eden sinirler ve pleksus yapıları ise ektoderm kökenlidir. Ayrıca stomoduem ve proktodeum epiteli de ektodermden köken almaktadır (17, 18).

Primitif bağırsak kanalı, ön, orta ve son bağırsak olmak üzere üç kısımda incelenmektedir. Ön, orta ve son bağırsak sınırları ve bu bölgelerden gelişen yapılar, ilgili kaynaktan modifiye edilerek Tablo 2-1'de özetlenmiştir (19).

Tablo 2-1. Primitif bağırsak kısımları ve gelişen yapılar

Primitif bağırsak kanalı[i]		
Ön bağırsak*	**Orta bağırsak****	**Son bağırsak*****
Farinks taslağı	Duodenum distali	Transvers kolon 1/3 distali
Tonsilla palatina ve tükrük bezleri parenkiması	Jejenum	İnen kolon
Alt solunum sistemi	İleum	Sigmoid kolon
Özefagus	Çekum	Rektum
Mide	Apendiks vermiformis	Anal kanal üst 1/3 kısmı
Duodenum (Pankreatik kanalın açıldığı bölümün proksimali)	Çıkan kolon	Mesane epiteli
Karaciğer ve intrahepatik safra yolları	Transvers kolon 2/3 proksimali	Üretranın bir kısmı
Safra kesesi ve safra yolları		
Pankreas		
*Ön bağırsak çölyak trunkus ile beslenir.		
**Orta bağırsak superior mezenterik arter ile beslenir.		
***Son bağırsağın büyük bölümü inferior mezenterik arter ile beslenir. Kaudal bölgeyi ise rektal arter ve internal pudendal arter besler.		
[i]Primitif bağırsağın tamamında venöz dönüş portal ven ile sağlanır.		

2.1.1 Gelişimin Moleküler Kontrolü

Primitif bağırsak ve mide gelişiminde moleküler düzeyde farklı indüksiyon faktörleri rol oynamaktadır. Çeşitli sinyaller ve büyüme faktörleri ilkel bağırsak kanalının gelişimine yön vermektedir. Yapılan çalışmalarda kranial tarafta yani ön bağırsak tarafında Sox2 gen ekspresyonunun özefagus ve mide gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir (20, 21). FGF (Fibroblast büyüme faktörü), erken anterior-posterior eksen oluşumundan sorumlu tutulmaktadır. Primitif bağırsağın farklılaşmasının moleküler kontrolü, Hox ve ParaHox genleri

ile SHH (Sonic Hedgehog) sinyalleri aracılığıyla yürütülür (22). Gelecekteki midenin ön bağırsak bölgesinde nereye yerleşeceğini belirleyen transkripsiyon faktörleri Hoxa-5 ve Barx-1'dir. Bu faktörler Wnt sinyalinin inhibisyon etkisini ortadan kaldırarak etki gösterirler. Çevre ektoderm ve mezodermden kaynaklanan FGF-4, transforme edici büyüme faktörü ailesinin üyeleri ve aktivinler de endoderm gelişimine katkı sağlar. Gastrik mezodermden kaynaklanan FGF-10, mide bezlerinin farklılaşmasında rol oynar (19, 20, 23).

Endoderm ile splanknik mezoderm arasında bağırsak tüpü boyunca SHH genleri eksprese olur. SHH ekspresyonunu kontrol eden Hox genleridir ve gastrointestinal sistemde sınırların belirlenmesine ve sfinkterlerin oluşmasına doğrudan katkı sağlarlar. Hem mezodermal hem de endodermal hücrelerden salınırlar (18). SHH ile, endodermal epitelin proliferasyonu tüm kanal boyunca sağlanırken epitel ile sindirim kanalı arasındaki kasların farklılaşması da gerçekleşir. Bu durum, mezodermal faktörler ile FoxF proteini kontrolündedir (18, 20). Mide ve ince bağırsak bileşkesini ayırarak sfinkter görevi gören pilorun oluşumunda mezodermden salınan BMP-4 (Kemik morfogenetik protein-4) etkisinde indüklenen transkripsiyon faktörleri Sox-9 ve Nkx 2.5 etkilidir (23).

2.1.2 Anatomik ve Histolojik Gelişim

Mide gelişimi; bölgesel genişlemeler, pozisyonel değişiklikler ve farklı moleküllerin senteziyle birlikte histolojik özelliklerin oluşması gibi ardışık olaylar sonucunda tamamlanır.

Ön bağırsak basit bir tübüler yapıda iken dördüncü haftanın ortalarında distal kısımda iğsi bir genişleme ortaya çıkarır. Bu genişleme, yani mide taslağı, karın duvarına dorsal ve ventral mezogastrium ile bağlıdır. Başlangıçta orta hatta yerleşim gösteren bu genişleme, büyüme devam ettikçe ventrodorsale doğru ilerler. İki hafta sonra primitif midenin dorsal yüzü, ventral yüzden daha hızlı büyüyerek ağırlık yapar ve sol kenara doğru gelerek büyük kurvaturu oluşturur. Ventral parça da içe katlanarak sağ tarafa doğru küçük kurvaturu oluşturur.

Gelişmekte olan mide, longitudinal ekseni boyunca, saat yönünde 90 derece rotasyona uğrar. Bu dönüş ile eş zamanlı olarak dört değişiklik meydana gelir: Midenin ventral kenarı yani küçük kurvatur sağa taşınır; midenin dorsal kenarı yani büyük kurvatur sola taşınır; orta hatta yer alan kaudal uç sağa ve yukarı çıkarken, kranial uç sola ve aşağıya iner; midenin karın arka duvarına tutunduğu yapı dorsal mezogastrium, mideyle birlikte ilerler ve omental bursayı

meydana getirir. Midenin yaptığı bu rotasyon ile erişkin midesinin ön duvarını sol vagusun, arka duvarını ise sağ vagusun inerve etmesi açıklanabilmektedir (17, 19).

Midenin histolojik olarak dört tabakası (mukoza, submukoza, muskularis ve seroza) fetal dönemde 15. hafta civarında görünür haldedir. 15. haftadan doğuma kadar giden süreçte hücre farklılaşmaları, tabakaların kalınlığında ve salgılar üzerinde değişiklikler meydana gelmiştir. Fetal dönemin 8-10. haftalarında midede, yalancı çok katlı prizmatik epitel bulunmaktadır ve mukozanın kıvrılmasıyla gastrik çukurcuklar meydana gelir. 15-20. haftalara gelindiğinde tek katlı kübikten prizmatik epitele doğru geçiş gösterir. Bu dönemde asiner bez yapısına rastlanırken, eozinofilik görünümlü hücre toplulukları "parietal hücreler" olarak tanımlanmıştır. Parietal hücrelerin intrinsik faktör salgısı, 14.haftada tespit edilmesine rağmen 25. hafta civarında belirgin bir artış göstermektedir. HCl (Hidroklorik asit) salgısının ise 32.haftadan önce tespit edilmediği bildirilmiştir (24). 22. haftanın sonlarına doğru gelindiğinde mide yüzey epitelinin tek katlı prizmatik şekilde olduğu net olarak görülmektedir. Ayrıca gelişen mukozanın kıvrılmasıyla oluşan gastrik çukurcuklarda, mukus salgılayan "müköz boyun hücreleri" gözlenir. 22. haftanın devamında müsküler tabaka seçilmektedir ve submukoza ile beraber büyüyen fetüse uygun şekilde kalınlaşmıştır. 24. haftaya gelinliğinde mide bez yapılarında genişlemeler ve uzamalar görülürken tübüler bezler tanımlanmıştır. 28. haftada bezlerde genişlemeler ve kıvrılmalar devam ederken, bazal yerleşimli, bazofilik boyanan "esas hücreler" görülmeye başlanmıştır (24). Farklı bir çalışmada esas hücrelerin 12.-13. Haftada görüldüğü bildirilmiştir (25). Büyüyen ve gelişen fetüs midesi, 32-34. haftalara ulaştığında erişkin ile benzer görünüme kavuşmuştur. Midedeki hücrelerin farklılaşması mezenkimal kökenli büyüme faktörleri, hormonlar ve çeşitli transkripsiyon faktörleri kontrolünde gerçekleşir (24). Enteroendokrin hücreler, gastrin ve somatostatin salgılayan hücreler 8. hafta, glukagon ve ghrelin salgılayanlar 10. hafta, serotonin salgılayanlar 11.hafta olmak üzere içerdikleri hormona göre gelişimin farklı zamanlarında tanımlanmışlardır (26).

2.2 İnsan Midesi Histolojisi

İnsan midesi kardiya, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere beş anatomik bölümde incelenmektedir. Histolojik olarak ise kardiya, fundus ve pilor olmak üzere üç kısımda incelenir ve anatomik lokalizasyon ile uyumlu, aynı isimle anılan bezlere sahiptir (27).

Mide, sindirim kanalının genel yapısına ait 4 histolojik katmanı içerir:

1. Tunika mukoza
2. Tunika submukoza
3. Tunika muskularis
4. Tunika seroza

2.2.1 Tunika Mukoza

Temelde koruma, absorbsiyon ve salgılama fonksiyonları gösteren mukoza; epitel örtü ile altındaki lamina propria ve muskularis mukoza tabakalarından oluşur. Muskularis muskoza sindirim sistemine özeldir ve bu katman tunika mukoza içinde yer alan düz kas tabakasıdır (28).

Dışarıdan gelen maddelerin ilk teması mukoza ile olur ve epitelin koruma işlevi devreye girer. Epitelde yer alan özelleşmiş hücreler, salgıladıkları glikoprotein içeriği bakımından zengin mukus salgısı ile besinlerin mide içindeki hareketi kolaylaştırırken yüzey epiteli üzerinde koruyucu bir tabaka oluşturarak mideyi asidik etkiden korur. Mukoza tabakasının asiditesi, lümene bakan kısımlarda nötr (pH 7.0) olarak ölçülür ve gastrik çukurcuklarda daha asidik (pH 2.0) hale gelir. Midenin kendi enzimleri tarafından sindirilmesine karşı savunma mekanizmasını oluşturan yüzey, bazale yakın hücrelerden gelen bikarbonat salgısı ile desteklenmektedir (29). Koruyucu faktörlerin etkilenmesi ve bariyerin bozulması ile çeşitli maddeler submukozaya kadar ilerleyebilir.

Midenin lümene bakan kısmı incelendiğinde, makroskobik olarak düzgün bir yüzeye sahip olmadığı görülür. Bu görünümden, mukoza ve submukoza tabakalarının iç yüze doğru katlanmasıyla oluşan ruga kıvrımları sorumludur. Mide dolduğunda kıvrımların kaybolup düzleşmesi, değişen hacme göre midenin şekil almasını kolaylaştırır. Mikroskop altında incelendiğinde de midenin lümene bakan kısımlarında gastrik çukurcuklara (foveola) rastlanır. Yüzey epitelinin her milimetre karesinde yaklaşık 90-100 foveola vardır. Her üç-yedi basit, dallı, tübüler tipteki mide bezi salgılarını bir foveola tabanına boşaltır (28, 29). Mide epitelinin sindirilmiş besinlere yönelik doğrudan emilim fonksiyonu yoktur, sadece hücre zarından geçebilen maddeler (su, iyon, lipitte çözünen maddeler vb.) için emilim söz konusu olabilir (27).

Mide, örtü ve bez epitelini birlikte bulundurur. Mide yüzeyinin tamamını örten yüzey epiteli, tek katlı prizmatik epiteldir. Gastrik çukurcukların da iç döşemesini yapar. Mide bezleri ise salgı yaparak sindirim fonksiyonunun gerçekleşmesine katkı sağlar (30).

Epitel altında yer alan ve bağ doku desteğini sağlayan lamina proprianın büyük kısmı, fundus bölgesinde fundus bezleri ile kaplanmıştır. Diğer alanlarda lamina propria, kardiya ve pilor bezleri ile kaplıdır. Gastrik salgıya katkı sağlayan kıvrımlı tübüler yapıdaki bezler, mukus salgılar ve esas hücre içermez (31). Lamina propriada fibroblastlara, plazma hücrelerine, lenfosit, makrofaj, eozinofil gibi immün yanıtta rol oynayabilecek hücre topluluklarına ve retiküler lifler gibi bağ doku elemanlarına yer yer rastlanır. Yaygın veya nodüler tipte lenfoid doku içerebilir (30).

Kardiya ve pilor bölgeleri dışında kalan geniş bir yüzeyi kaplayan ve sıklıkla "fundus bezleri" olarak anılan esas mide bezleri, gastrik çukurcukların bazalinden muskularis mukozaya dek uzanır. Günde yaklaşık iki litre olmak üzere mukus, HCl, pepsin ve intrinsik faktör içeriğine sahip salgı açığa çıkaran bez epiteli, özelleşmiş hücrelerden oluşmaktadır (27).

İçte dairesel, dışta longitudinal uzanan çift katlı mukozal kas tabakası gastrointestinal sisteme özgüdür. İç katmandan gelen kas liflerinin lamina propriaya ilerlemesiyle, sentezlenmiş gastrik salgıların lümene bırakılmasına destek olduğu öngörülmektedir (30). Bu tabakanın altında da mide mukozasını mide duvarındaki kaslara bağlayan sıkı bağ dokusu, submukoza bulunur.

2.2.1.1 Özelleşmiş Mide Hücreleri

2.2.1.1.1 Yüzey Müköz Hücreleri

Yüzey müköz hücreleri, tek katlı prizmatik örtü epiteli arasında konumlanmış prizmatik şekilli hücrelerdir ve oval nükleusları bazale yakın konumlanmıştır. Gastrik mukus salgılar ve yüzey müköz hücreleri; kardiya, fundus ve pilor olmak üzer üç bölgede de ortaktır (29). Müsin granüllerini salgılamak için özelleşmiş granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi cisimciği sitoplazmada bazale yakın yerleşiktir. Müsin salgısı jel benzeri yoğun kıvamlıdır ve Periyodik Asit-Schiff ile pozitif boyanarak midenin lümene bakan kısımlarında, sitoplazmanın apikalinde görülür. Epiteli kalın bir tabaka halinde sararak yüksek potasyum ve bikarbonat içeriğiyle asidik kimusun vereceği hasardan mide yüzeyini korur. İnflamasyon gibi durumlarda artan

Prostoglandin E_2 salgısı, bikarbonat sekresyonunu uyarırken lamina propriada genişlemeye sebep olur. Bu sayede mukoza tabakasının kalınlığı artmış olur ve korumaya katkı sağlanır (30). Müköz hücreler midenin kardiya ve pilor bölgelerinde mide bezlerinde bulunan ana hücre tipidir (29).

2.2.1.1.2 Müköz Boyun Hücreleri

Müköz boyun hücreleri; midenin gövdesinde, fundustaki bezlerin boyun kısmında yer yer parietal hücre komşuluğunda bulunur. Yüzey müköz hücreler ile benzerlik gösterse de "çözünebilen mukus" salgılar ve müsinojen içeriği yüzey müköz hücrelere kıyasla daha azdır. Yalnızca vagal sinir uyarımı ile gerçekleşen bu salgı, mide dinlenme halinde iken gerçekleşmez. Bu sebeple sitoplazmaları müsin granülleri ile kaplı değildir. Yüzey müköz hücrelerine kıyasla daha kısadırlar ve yuvarlak nükleusa sahiplerdir (27, 29).

2.2.1.1.3 Esas Hücreler

Esas hücreler (Şef, zimojen hücreler); protein sentezinin yoğun olduğu, granüllü endoplazmik retikulum içeriğiyle bazofilik boyanma gösterirler. Midenin gövdesinde, fundus bezlerinde yoğun olarak bulunurlar. Apikal sitoplazmada yer alan salgı granülleri asidofilik zimojen granüllerdir. Zimojen granüller uygun koşullar altında aktifleşen enzim öncülleridir. Esas hücreler protein sindiriminden sorumlu pepsin enzimi öncüsü pepsinojeni ve etkinliği daha az olan lipaz enzimini salgılar. Mide asidi salgılanmasına neden olan uyaranlar, aynı zamanda pepsinojenlerin salgılanmasını da teşvik eder. Pepsinojenin asidik pH altında, parietal hücrelerden salınan HCl ile etkileşmesi, aktif pepsin enzimini açığa çıkarır (29, 30).

2.2.1.1.4 Parietal Hücreler

Parietal hücreler (Oksintik Hücreler); gastrik bezlerin boyun kısmında yer alan üçgen şekilli, büyük hücrelerdir. Bazen çift çekirdekli olabilir, enerji gereksinimi yüksektir ve yoğun mitokondri içeriğiyle belirgin asidofilik boyanma gösterirler (28).

Parietal hücreler aktif salgı fonksiyonu gösterir ve işleve yetişebilecek düzeyde özelleşmiş hücre içi kanallar sistemine, kanaliküllere sahiptir. Kanaliküller, mikrovillus uzantıları içerir ve bu sayede bezin lümeni ile etkileşime açıktır. Kanaliküller ile komşuluk gösteren sitoplazmada vezikül ve tübüllerden meydana gelen tübüloveziküler sistem membranları, H^+/K^+ ATPaz proton pompası için kaynaktır ve asit salgısı sırasında aktif rol

oynayarak hidrojen iyonlarının kanalikül lümeni ile sitoplazma arasında geçişine olanak sağlar. Salgılanan hidrojen iyonları klorür ile birleşerek HCl üretimi gerçekleşir (30).

Parietal hücreler, HCl salgısını tetikleyen gastrin, asetilkolin M_3 ve histamin H_2 olmak üzere üç farklı membran reseptörüne sahiptir. Mideden salınan peptit yapılı gastrin hormonu, gastrin reseptörlerini uyararak HCl salgısının temelini oluşturur. Hücre içi kanaliküler sistemde lümene atılan iyonların bir araya gelmesiyle salgılanan HCl, protein sindirimde hem mekanik hem de kimyasal düzeyde rol almaktadır. Diyetle alınan proteinlerin hidrolizi ve esas hücreler tarafından salgılanan pepsinojenin aktif formu olan pepsine dönüşümü için gereklidir. HCl ayrıca bakteriyostatik etkilidir (30). Prostaglandinlerin HCl salgısını engellediği bilinmektedir (29). B12 vitamininin bağırsaktan emilimi için glikoprotein bağlantısı gereklidir ve bu işlevi sağlayan intrinsik faktör, parietal hücreler tarafından salınır (28).

2.2.1.1.5 G Hücreleri

G hücreleri olarak da anılan gastrin hücreleri antrum boyunca bulunur. Bu endokrin hücreler, besinler mideye girdiğinde mide içeriğinin asiditesinin azalmasına yol açar ve mide genişlemesine yanıt olarak asit uyarıcı hormon olan gastrini salgılar. Gastrin kan dolaşımına girer ve dolaşımdan mide gövdesinin mukozasına taşınır, burada parietal hücrelerin dış zarındaki reseptör bölgelerine bağlanır. Oluşan gastrin-reseptör kompleksi, membrana bağlı ATPaz enziminin de aktiflenmesiyle parietal hücrelerden hidrojen iyonlarının üretilmesini ve salgılanmasını sağlayan reaksiyonu başlatır (29).

2.2.1.1.6 Enteroendokrin Hücreler

Gastrointestinal epitel boyunca dağınık yerleşim gösteren diffüz nöroendokrin hücreler, midede fundus bezlerinin bazalinde daha sık yerleşim gösterirler ve boyanma özellikleri nedeniyle “enteroendokrin hücre, enterokromaffin hücre, argentaffin hücre, argirofil hücre” olarak isimlendirilirler. Peptit yapıda ürünler salgılayan bu hücreler, lümen ile bağlantısına göre kapalı veya açık tip olarak adlandırılırlar. Her iki tip, kan yoluyla salgı ürünlerini hedef hücrelere gönderir. Doğrudan lümenle bağlantılı açık tip enteroendokrin hücrelerin salgısı, parakrin etkiyle de çevredeki hücrelerin faaliyetlerine etki edebilir (28, 30).

Enteroendokrin hücreler peptid içerikli salgıları ile orantılı gelişmiş granüllü endoplazmik retikuluma ve Golgi aygıtına sahiptir. Sitoplazma içeriğinde yüksek miktardaki salgı vezikülleri, histokimyasal boyamalar sırasında kaybolur ve hücreye daha şeffaf bir

görünüm kazandırır. Farklı salgı içerikleri nedeniyle spesifik tanımlamaları immünohistokimyasal yöntemler ve TEM (Geçirimli elektron mikroskobu) değerlendirmeleri ile yapılmış ve 17 farklı tip belirlenmiştir. Tanımlanan hücrelerin salgı içeriklerine gastrin, histamin, somatostain, enkefalin, bombesin, VIP (vazoaktif inhibitör peptit), serotonin ve ghrelin örnek verilebilir (30).

2.2.1.1.7 Tuft hücreleri

Kemirgenlerde sindirim sisteminde (tükürük bezleri, mide, safra kesesi ve safra kanalı, ince bağırsak, çekum ve kolon), solunum sisteminde (burun boşluğu, trakea ve alveolar epitel), üretrada ve timusta tanımlanan tuft hücresi; insanlarda trakeada, ince bağırsakta, midede ve safra kesesinde gözlenmiştir (32).

Fırça, soliter kemoreseptör, mikrovillöz, fibrilovezikül ve kaveolar hücreler gibi çeşitli isimler altında tanımlanan tuft hücrelerinin şekli; kesit düzlemine bağlı olarak armut, fıçı, şişe ve kadeh şeklinde olabilmektedir. Hücre iskeleti sitokeratin-18 ve nörofilamentler gibi ara filamentleri içerir (33). Tuft hücrelerinin en karakteristik özellikleri, künt ve uzun yüzey mikrovillusları ile apikal sitoplazmadaki çok sayıda veziküldür. Hücrelerin apikal çevresinde bağlantı kompleksi mevcuttur. Yüzey mikrovillusları (200-300 nm genişliğinde; 500-1200 nm uzunluğunda) kalın, parmak benzeridir ve distal uçta künttür. Mikrovillusların distal ucundan uzanan mikrofilamentler, supranükleer sitoplazmaya dek uzanır. Mikrotübüller, supranükleer sitoplazmada hücrenin uzun eksenine paraleldir ve belirgin tübülovezikül bir ağ oluşturur. Tuft hücrelerinde sitoplazma boyunca dağılmış bol miktarda glikojen partikülleri, lizozom benzeri cisimler, bir veya daha fazla belirgin Golgi cisimciği ve supranükleer bölgede yerleşmiş peroksizomlar bulunmaktadır. Orta sayıda var olan mitokondriler; mikrotübüller ve tübülovezikül sistem ile tonofibril demetleri arasında, hücrenin uzun eksenine paralel olarak yer alır. Granüllü endoplazmik retikulum az gelişmiştir. Lümene bakan tarafta endositozda rol oynayan birçok kaveola mevcuttur (34).

Çok sayıda morfolojik çalışmaya rağmen, tuft hücrelerinin işlevleri hala belirsizdir. Kemoresepsiyon için hücresel ve moleküler düzeyde görevli olduğu düşünülmektedir (34).

2.2.1.1.8 Kök Hücreler

Gastrik bez yapısının isthmus kısımlarında yer alır. Bu bölgede kök hücreler sayıca çoğalabilir veya farklılaşıp diğer hücrelere dönüşebilir. Kök hücrelerden köken alarak 60-90

gün aralığında esas ve enteroendokrin hücreler yenilenirken, parietal hücrelerde bu süre 150-200 gün kadardır. Müköz boyun hücrelerinin ömrü yaklaşık bir hafta iken yüzey müköz hücrelerinde bu süre çok daha kısadır (29).

2.2.2 Tunika Submukoza

Düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında olmakla beraber geniş lenf ve kan damarları içerir. Ayrıca submukozal (Meissner) pleksusu oluşturan ganglion hücreleri buraya yerleşmiştir. Doğrudan tunika muskulariste ve submukozada yer alan kasların otonomik inervasyonundan sorumludur (30).

2.2.3 Tunika Muskularis

Üç katmanlı yoğun düz kas tabakası içte oblik, ortada sirküler ve dışta longitudinal uzanır. Yer yer üç katmana rastlanmasa da fonksiyona göre özelleşme söz konusudur. Sirküler kas tabakasının pilorda, kimus içeriğinin duodenuma iletilmesine yardımcı sfinkter görevi gördüğü bilinmektedir. Kas tabakaları arasında inervasyondan sorumlu myenterik (Auerbach) pleksusu yer almaktadır (30).

2.2.4 Tunika Seroza

Midenin en dış katmanı olan seroza, tek katlı yassı epitel formundaki mezotelden ve epitel altı bağ dokusundan meydana gelir. Kan ve lenf damarları açısından zengin bir bölgedir. Sinir dallanmaları, sindirim kanalı duvarına dek serozada yol alır. Adipoz doku en dışta yer alır (30).

2.3 Fare Midesi Histolojisi

Fare midesi, insandan farklı olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Kısmi depo görevi gören nonglandüler kısım olarak adlandırılan ön mide ve bez yapısını içinde bulundurarak parenkimal doku özelliği gösteren glandüler kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2-1). Glandüler kısım sırasıyla

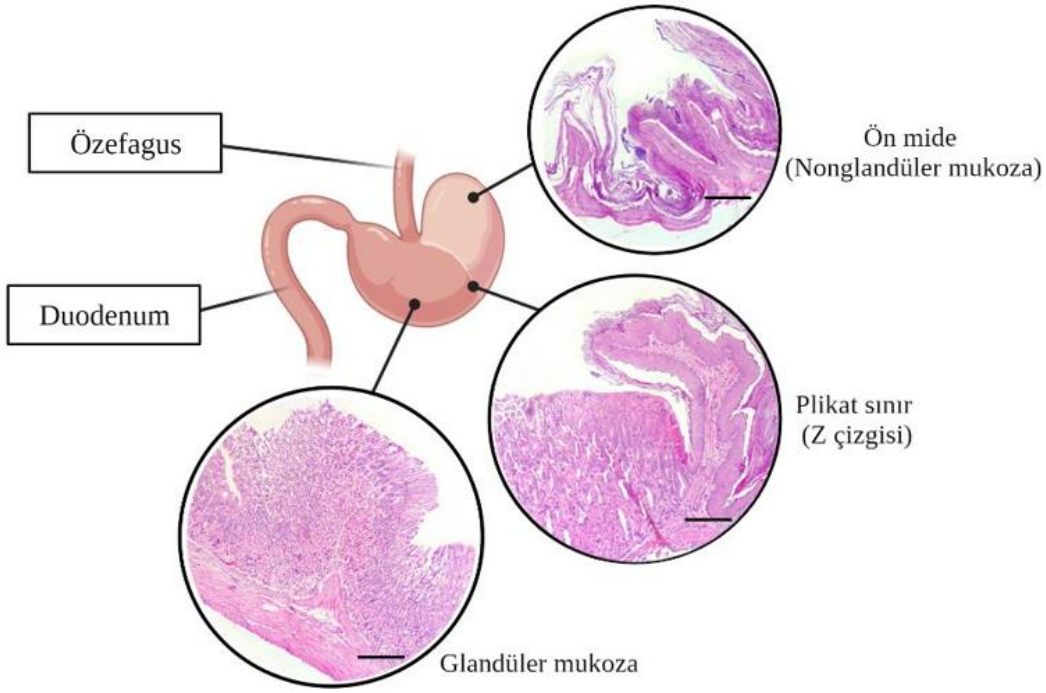
kardiya, fundus, antrum ve pilor olmak üzere dört bölümde incelenir. Histolojik açıdan tüm vertebralılarda olduğu gibi mukoza, submukoza, muskularis ve seroza katmanlarına sahiptir.

Tunika mukoza epitel, lamina propria ve muskularis mukozadan oluşur. Mukoza, glandüler ve nonglandüler olarak belirgin ayrımı olan, makroskobik olarak da gözle görülür iki farklı histolojik özellik sergilemektedir. Özefagus bitiminden kardiyaya uzanan bölüm, nonglandüler kısım olarak değerlendirilir ve ön mide olarak adlandırılır. Midenin yaklaşık 2/3 ön kısmını kaplar ve alınan besinlerin kısmi süreli depolanmasından sorumludur (35). Nonglandüler mukoza, üstte keratinleşmiş yaklaşık 5 kattan oluşan çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Lamina propria ve muskularis mukoza ile devam eder.

Midenin glandüler-nonglandüler bileşkesinde kalın keratinize çok katlı yassı epitelin oluşturduğu bir sınır göze çarpmaktadır (Şekil 2-1). Plikat sınır veya Z çizgisi olarak adlandırılan geçiş bölgesi, insanlardaki gastroözefagial bileşke ile benzerlik göstermektedir (36). Plikat sınır ile gözle görülür şekilde ayrılabilen ve pilora dek uzanan kısım, glandüler mukoza ile örtülüdür (35, 37). Bu bölüm farelerde midenin parenkimasını oluşturmaktadır.

Glandüler mukoza plikat sınıra bitişik kardiya ile başlar. Kardiya bölgesi granül içermeyen mukoza hücreleri ile kaplıdır. Kardiyadan sonra sırasıyla, fundus, antrum ve pilor gelir. Fundus bezleri ve antrumdaki bezler basit, düz, tübüler tiptedir. Bu bölgedeki gastrik çukurcuklar insana kıyasla daha düz görünse de müköz boyun hücreleri, parietal hücreler ve esas hücreleri barındırır. Pilora gelindiğinde ise sadece müköz hücreler izlenmektedir. Glandüler mukozanın tamamı tek katlı prizmatik epitel ile örtülüdür ve bezlerin boyun kısımlarında kök hücre öncüllerine rastlanırken bazal kısımlara doğru endokrin hücreler görülebilmektedir (35, 37).

Submukoza destek elemanlarını ve submukozal pleksusu içermektedir. Tunika muskularis tabakasında içte sirküler ve dışta longitudinal uzanım gösteren iki katmanlı kas tabakası bulunmaktadır. Myenterik pleksus da tunika muskulariste yerleşmiştir. Tunika seroza mezotel ile döşelidir ve çeşitli bağ dokusu elemanları ile sinir, kan damarları ve lenfatikleri barındırır (38).



Şekil 2- 1. Fare midesinin şematik gösterimi. Ön midede keratinleşmiş çok katlı yassı epitel izlenmektedir. Z çizgisi, mide içinde, keratinleşmiş çok katlı yassı epitelden tek katlı prizmatik epitel geçişinde görülmektedir. Glandüler mukozada bez yapıları parenkimayı oluşturmaktır. Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 50 µm.

Tablo 2-2. İnsan ve fare midesinin morfolojik ve histolojik karşılaştırması

	İnsan mide dokusu	**Fare mide dokusu**
Morfoloji	▪ Ön mide yoktur. ▪ Tamamı glandüler mukozadır. ▪ Kardiya, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere 5 kısımda incelenir.	▪ Ön mide (2/3 kısmı kaplayan) vardır. ▪ Glandüler mukoza kardiya, fundus, antrum ve pilor olmak üzere 4 kısımda incelenir.
Histoloji	Tunika mukoza, submukoza, muskularis ve seroza tabakalarını içerir.	Tunika mukoza, submukoza, muskularis ve seroza tabakalarını içerir.
	▪ Gastroözefagial bileşkede çok katlı yassı epitelden prizmatik epitele geçiş gözlenir.	▪ Ön mide mukozasını, özefagusa benzer şekilde, keratinleşmiş çok katlı yassı epitel döşer.

	▪ Mukozanın tamamı tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir.	▪ Midenin içindeki Z çizgisinde keratinleşmiş çok katlı yassı epitelden tek katlı prizmatik epitele geçiş gözlenir. ▪ Midenin son 1/3 kısmını oluşturan glandüler mukozayı tek katlı prizmatik epitel örter.
	Tunika muskularis içten dışa oblik, sirküler ve longutudinal uzanan üç katmanlı kas tabakasıdır.	Tunika muskularis içte sirküler, dışta longitudinal uzanan iki katmanlı kas tabakasıdır.

2.4 Koronavirüsler

Zarflı ve tek zincirli RNA virüsleri grubunda yer alan koronavirüs ailesi; alfa, beta, delta ve gama koronavirüsler olmak üzere 4 alt tipte incelenebilir. Farklı derecelerde patojenite ve immünite ile kendilerini gösterebilirler. SARS (Şiddetli Akut Solunum Sendromu) ile 2002 yılında tanımlanan SARS-CoV (Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü) ve MERS (Orta Doğu Solunum Sendromu) ile 2012 yılında ortaya çıkan MERS-CoV (Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü) beta koronavirüs ailesinde yer almaktadır. SARS-CoV ve MERS-CoV, farklı sistemleri etkiliyor olsa da öncelikli olarak solunum sisteminde ölümcül seyreden pnömonilere yol açmaktadır (5, 39). 2019 yılında ortaya çıkan ve SARS-CoV ile benzerliği nedeniyle etkeni SARS-CoV-2 olarak tanımlanan; ateş, öksürük, nefes darlığı semptomları ile akut solunum sıkıntısı sendromuna ilerleyebilen COVID-19, pandemi haline gelmiştir (5).

Semptomlar ve laboratuvar değerlendirmeleri açısından SARS, MERS ve COVID-19 arasında belirgin farklılıklar olmadığı bildirilmiş ve lenfopeni, her üç enfeksiyonda da hastalığın habercisi olarak belirlenmiştir. Sıklıkla damlacık yoluyla bulaştıkları düşünülmektedir. Öncelikli solunum sistemi etkileniminin yanında, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma, şok, gastrointestinal sistem etkilenimiyle birlikte sıvı elektrolit dengesizliği ve çoklu organ yetmezliği, her üç viral enfeksiyonda benzer şekilde görülebilmektedir. Ancak in vitro çalışmalar; viral etkenlerin yayılım hızı, reseptör kullanımı ve konak yanıtı dikkate alındığında, patogenezlerde farklılık olabileceğini düşündürmektedir.

Örneğin; SARS-CoV-2'nin viral yükü, hastaneye başvuru sırasında en yüksektir, yani semptomların başladığı ilk birkaç gün içindedir. Bu durum SARS-CoV'da 10 gün iken, MERS-CoV'da iki haftadır (39). Ortaya çıkan semptomlar benzer olsa da gerçekleşme paternleri ve süreleri farklılık göstermektedir.

2.4.1 SARS-CoV-2

2.4.1.1 Viral Yapısal Proteinler ve SARS-CoV-2'nin Konakçı Hücreye Girişi

SARS-CoV-2; zarflı, tek sarmallı pozitif RNA içeren, bir β koronavirüstür. Viral partiküller oval veya yuvarlak olup sivri uçludur (40). Virüsün boyutunun farklı çaplarda 60-140 nm veya 70-110 nm olabileceği gösterilmiştir (41, 42).

SARS-CoV ile %79, MERS-CoV ile %50 yapısal benzerlik gösteren SARS-CoV-2, 29903 nükleotid içeren genoma sahiptir. Kendisine ait protein yapılarını kodlayabilmektedir. Yapısal proteinler membran proteini, nükleokapsid proteini, zarf proteini ve spike proteinidir. Yapısal proteinler, konakçıya ait hücre membranı ile bir kompleks oluşturur ve viral genetik materyal olan RNA'yı içinde bulunduran zarflı bir virüs partikülü haline gelerek tüm vücutta yayılır. Replikasyon için şart olmayan ancak konakçı bağışıklık yanıtını engelleyebilen birkaç aksesuar proteini de virüsün kendisi kodlayabilmektedir (39, 43).

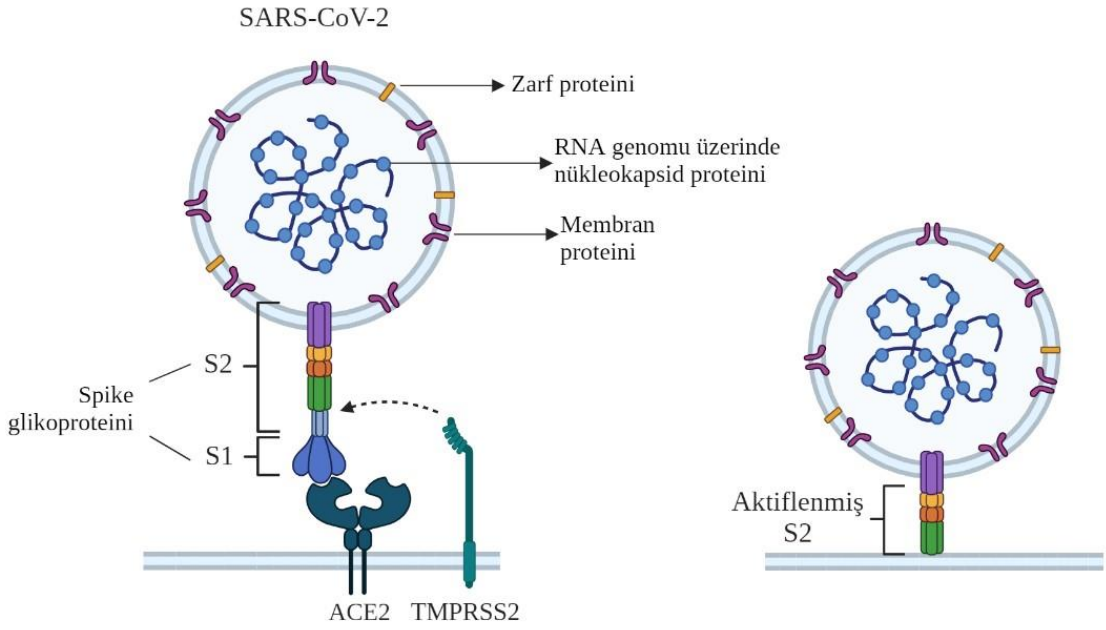
Nükleokapsid proteini, viral RNA'ya bağlı olarak bulunur ve viral replikasyonda doğrudan rol oynamaktadır. Membran proteini, viral yapının dengelenmesinde rol oynar ve hücrede viral parçacıkların yenilenmesine katkı sağlar. Zarf proteini, viral parçacıkların birleştirilmesinde görev alır ve SARS-CoV-2'nin tomurcuklanması ve serbestleştirilmesi aşamalarında virüsün vücutta yayılmasından sorumlu olduğu, viral yükü oluşturduğu düşünülmektedir (39, 44).

Yapısal spike proteini, HIV'in (İnsan immün yetmezlik virüsü) gp120 proteini gibi hücre yüzeyi reseptörlerini tanıyarak, virüsün hücrelere girmesini sağlar (40). Spike proteininin S1 alt birimi, konak hücrelerine giriş için kullanılan ACE2'ye doğrudan bağlanır. Konakçı hücre membranına tutunmayı ve membranla kaynaşmayı sağlayan S2 alt birimidir. Virüs konakçı hücre ile temas ettiğinde S1 ve S2 alt birimleri birbirinden ayrılır. Hedef hücrede ACE2'ye bağlanma sonrası, bir transmembran serin proteaz olan TMPRSS2, spike proteini S2 alt birimini parçalar. Bu parçalanma sayesinde S2 alt birimine ait trimerler aktiflenir ve virüs-

konakçı lipid membran katmanları kaynaşmaya başlar. Füzyon için; S2 membrana girer, ardından S2'de iki heptad tekrarı birleşir ve birlikte antiparalel altı sarmal bir demet oluşturur. Demet oluşumu, hücresel ve viral membranların birleşerek viral genomun sitoplazmaya salınmasına zemin hazırlar (45).

Virüsün konakçı hücre içine girişine aracılık eden bir diğer mekanizma katepsin L'dir. Katepsin L ile endozomlarda virüse ait spike proteini aktiflenir ve TMPRSS2 bulunmayan hücrelere giriş gerçekleşir. Aktiflenen enzimler ile virüse ait ribonükleoprotein kompleksi hücre içine salınır (43, 46). Virüsün konakçı hücreye füzyonu ve RNA genomunun hücre içine alınması, literatürde bu şekilde açıklanmaktadır.

Virüsün konak hücreye füzyonu ile viral genom, endoplazmik retikuluma ait replikazı hedef alır ve meydana getirdiği replikasyon bölgesi ile kendi yapısal proteinlerini sentezlemeye başlar (46). Viral RNA-Nükleokapsid protein kompleksi, spike, membran ve zarf proteinleri ile ERGIC'e (Endoplazmik retikulum- Golgi ara bölmesi) girer ve tamamen yeni bir SARS-CoV-2 üretir. Yeni üretilen SARS-CoV-2, ekzositoz yoluyla konakçı hücreden salındığı düşünülmektedir (47). Bunun yanı sıra enfekte deneklerde hücre içinde serbest virüs veya virüs benzeri partiküllere rastlanabilmektedir (48). Aynı zamanda, hedef hücreler parçalanır veya sinsityum oluşturur ve diğer lezyonlar meydana gelir (39).



Şekil 2- 2. SARS-CoV-2 yapısal proteinlerini ve konakçı hücre tutunmasını gösteren şema. Viral spike proteininin S1 alt birimi konak hücrelerine girişte ACE2'ye doğrudan bağlanır. Virüs konakçı hücre ile temas ettiğinde S1 ve S2 alt birimleri birbirinden ayrılır. ACE2'ye tutunma sonrası TMPRSS2, S2 alt birimini parçalar. Bu parçalanma ile S2 alt birimi aktiflenir ve virüs-konakçı kaynaşması başlar.

2.4.1.2 SARS-CoV-2'nin Konakçı Hücreler Üzerine Etkisi

SARS-CoV-2, tipik bir viral patojen gibi invazyon ve replikasyon ile başlayan viremi fazından geçer ve hücresel hasar ortaya çıkarır. Konakçıda meydana gelen düzensiz immün yanıtla birlikte akut faz reaksiyonu başlar ve zamanla azalan viral yük, iyileşme fazını gösterir. İlk kritik aşamadan sonra, inflamatuar yanıt kademeli olarak çözülür, hasarlı organ zamanla iyileşir ancak kronik kritik hastalık, kalıcı inflamasyon, immünsupresyon ve katabolizma süreci de ortaya çıkabilmektedir (39).

SARS-CoV-2 ile enfeksiyonda en yüksek viral yükün erken evrede olduğu bilinmektedir. Zamanla azalan viral yüke rağmen ağır seyreden olgular, immünolojik yanıtın başlamasıyla ilişkilendirilmiştir. Önemli ölçüde yükselmiş sitokin seviyeleri de patolojinin immün kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda, ağır seyirli olgulara dair en çok kabul edilen görüş; düzensiz ve şiddetli bağışıklık yanıtının yoğun bir inflamasyona

sebep olduğu yönündedir. Ayrıca dolaşıma karışan virüs, diğer organlara yayılımda etkilidir (39, 40).

SARS-CoV-2'nin vücuda girmesi ve hücre hasarı sürecinde, konakçı hücreye girişinin rol oynadığı ve esas hedefinin ACE2 olduğu bilinmektedir. ACE2 reseptörü taşıyan transgenik fareler ile reseptör taşımayan transgenik fareler karşılaştırıldığında; akciğerlerde viral replikasyon ve interstisyel pnömoni gibi organ patolojileri ile kilo kaybı ve hayvanların ölümü gibi genel durum belirteçlerinin, ACE2 reseptörü taşıyan farelerde gözlendiği bildirilmiştir (49). Virüsün hücre içine girişini sağlayan ACE2 reseptörünün dağılımı, vücudun hangi kısımlarının virüsten etkilenebileceğini gösterebilir. Tek hücreli RNA dizileme teknolojisi kullanılarak yapılan bir çalışmada akciğerdeki nötrofillerin, monositlerin, B ve T hücreleri gibi farklı bağışıklık hücrelerinin, alveolar tip I ve tip II hücrelerinin yüksek seviyede ACE2 eksprese ettiği gösterilmiştir. Gastrointestinal sistemde özofagus, mide, ileum ve kolon da ACE2-pozitif hücrelere sahiptir. Bağırsakların muskularis mukozasında ve tunika muskularisinde yer alan düz kas hücreleri ile enterositler ACE2 pozitiftir. Böbreğin proksimal tübül hücreleri, karaciğerin hepatositleri ve dalaktaki çeşitli hücreler ACE2 ekspresyonu gösterir. Endotel hücreleri ile damar duvarında yer alan düz kas hücreleri, nazal mukozadaki destek hücreleri ve trombositler, eritrositler, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler olmak üzere kemik iliği ve kan hücrelerinin tümü ACE2 pozitiftir. Makrofajlar, akut bağışıklıkta etkili olmalarının yanı sıra ACE2-pozitif hücrelerle sıklıkla etkileştikleri için SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında önemli rol oynamaktadır (1, 4, 45). Bu durumda tüm vücut SARS-CoV-2 için açık bir hedeftir. Ayrıca, yüzey plazma rezonans analizinden elde edilen sonuçlara göre; SARS-CoV-2'nin spike proteini, ACE2'ye karşı SARS-CoV'unkinden 10-20 kat daha fazla afiniteye sahiptir. Bu da SARS-CoV-2 yayılma potansiyelinin daha yüksek olduğunu açıklamaktadır (47).

Viral giriş sonrası anjiyotensin II'deki yükselmeler ve ACE2 ekspresyonundaki azalma, NFκB (Nükleer faktör kappa beta) aktivasyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katkıda bulunur. İnflamatuar genlerin ekspresyonu TNF-α (Tümör nekroz faktörü alfa), IL-1, IL-6, G-CSF (Granülosit koloni uyarıcı faktör), IP10 (İnterferon γ ile indüklenen protein 10) ve monosit kemoatraktan protein-1 gibi proinflamatuar sitokinlerin salınmasına yol açar (40). Dolaşımda var olan interferonlar, JAK-STAT1/2 sinyal yolağını aktifler ve parakrin etki sayesinde virüsle savaşacak genlerin sentezi başlatılır (43). GM-CSF (Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör), CD14+ hücreleri, CD16+ hücreleri ve monositleri aktive ederek IL-6 gibi inflamatuar sitokinlerin daha fazla salınmasına neden olur (40). Sitokin dalgalanması,

serbest nitröz oksit ve artmış endotelin-1 seviyeleri, reaktif trombositoz; akut hipoksik değişikliklere neden olan ve pulmoner damarlara yerleşen emboliye sebep olabilir. Ayrıca endotel disfonksiyonuna katkıda bulunabilir. Oksijen eksikliğine bağlı hipoksi ile indüklenebilir faktörlerin aktivasyonu, anjiyogenezin kompanzasyon için devreye girmesi, fibrinojen seviyesinin yükselmesi ve pıhtılaşma faktörlerinin tüketimi gerçekleşir. Ayrıca plazminojen aktivatör inhibitörü-1 seviyeleri, perfüzyon eksikliğine ve pulmoner disfonksiyona neden olan fibrin tükenmesinin azalmasına yol açar (50).

Yapılan çalışmalarda makrofaj inflamatuar protein-1α, CRP (C-reaktif protein), D-dimer ve ferritin seviyelerinin enfeksiyonun erken döneminde yükseldiği ve prognozu öngörmede kullanılabileceği yönünde görüşler mevcuttur (39). Serum IL-6, IL-8 ve TNF düzeylerinin sağkalım hakkında bilgi sağladığı bilinmektedir (43). Bu durumda artmış sitokin seviyelerinin COVID-19 seyrinde önemli olduğu söylenebilir.

Enfeksiyon sırasında sitokinlerin plazma seviyelerinde artış, immün yanıtta rol oynayan hücrelerin bağışıklık yanıtlarını etkiler (43). SARS-CoV-2 ile enfekte vakaların bağışıklık yanıtı incelendiğinde, B ve T hücreleri ile virüsün vücuda girer girmez ortadan kaldırılmasında ve iyileşmede rol oynayan nötralizan antikor titrelerinin doğru orantılı olduğu bulunmuş ve bu durumda her iki hücre tipinin de immün yanıtta rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, CD4/CD8 T lenfosit oranında belirgin düşüş gözlenirken, aktivasyonda artış saptanmıştır. Lenfopeninin altında yatan mekanizmalar için, hematopoetik dokunun etkilenmesi veya viral partiküllerin doğrudan hücre hasarı etkisi olduğu tahmin edilmektedir. Th17 ve sitotoksik CD8 T lenfositlerin sayıca artışı, inflamatuar yanıtın arttığının göstergesidir (39). Viral replikasyonun artışı ile doğru orantılı, viral kalıntıların doğrudan asetilkolin reseptörleri ile etkileşimi artmaktadır. Bu durumda kolinerjik reseptörler üzerinden etki eden anti-inflamatuar yolun baskılanması da patogenezde rol alabilir (39).

2.4.1.3 SARS-CoV-2'nin Organ Etkisi

SARS-CoV-2 vücuda girdikten sonra nötralizan antikor durumuna göre nötralize edilir veya hücrelerde ACE2 reseptörü aracılığıyla konakçı hücrelere girerek replike olur. Genel vücuda giriş yolunun inhalasyon olduğu düşünüldüğü için; SARS-CoV-2 ilk solunum sistemini tutmaktadır.

Akciğerlerin histopatolojik incelemesinde, interstisyel pnömoni ve diffüz alveolar hasar gösterilmiştir. İnterstisyel ve intraalveolar ödem, hiyalin membranlar, mikrovasküler tromboz, kapiller konjesyon ve tip 2 pnömositlerde reaktif hücre hiperplazisi gözlenmiştir (51). Ayrıca SARS-CoV-2 pozitifliği immünohistokimyasal olarak tip 1 ve tip 2 pnömositlerde gösterilmiştir (52). Çoğu akciğerde interstisyel lökositlerin, özellikle de lenfositlerin azlığı görülürken, makrofajlarda artış görülmüştür. Bazı vakalarda bronkopnömoni, pulmoner emboli ve alveolar hemoraji izlenmiştir (51).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında akciğer dışında, kalp ve böbrek başta olmak üzere multisistemik etkilenim söz konusudur. Ayrıca endotel disfonksiyonuyla birlikte pıhtılaşma bozukluğu olduğu gösterilmiştir (43).

Kalbin histopatolojik incelemesinde, kardiyomiyositlerde SARS-CoV-2 partikülleri RNA sekanslama, immünohistokimya ve elektron mikroskobu ile tanımlamıştır (53). Doğrudan viral invazyonun neden olduğu miyokardiyal hasar tam olarak anlaşılamamıştır ancak kardiyomiyositlerde sarkomer hasarı ve miyofibril kaybı gösterilmiştir (54). Yapılan çalışmalarda, elektrolit bozuklukları ve Ca^{2+}/Kalmodulin bağımlı protein kinaz 2'nin oksidasyonunun SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında görülen aritmilerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak, SARS-CoV-2 tarafından tetiklenen hipoksemi ve solunum fonksiyon bozukluğu da kalbin kasılma fonksiyonunu etkileyebilir. IL-6 üretimindeki aşırı artış, VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) ekspresyonunun artmasına, damar geçirgenliğinin bozulmasına ve kardiyak tamponada ilerleyebilecek efüzyona neden olabilmektedir (40, 50).

Böbreğin histopatolojik incelemesinde, akut tübüler hasar ve yaygın damar içi pıhtılaşma saptanmıştır. TEM ile yapılan incelemelerde podositlerin, endotel hücrelerinin ve proksimal tübüler epitel hücrelerinin belirgin aktivasyonu gözlenmiştir. Podositlerde ve proksimal tübül epitel hücrelerinde elektron yoğun granüllere sahip virüs benzeri partiküller (70-110 nm) tespit edilmiştir (51). Podositlerin etkilenimiyle filtrasyon bariyeri hasar alabilmektedir ve proksimal tübül epitel hücrelerinin hasarı ile emilim fonksiyonu etkilenebilmektedir. Ayrıca böbrekler, hipoksiye oldukça duyarlıdır ve hipoksi sonucunda aldosteron retansiyonu artar. Bu durum sıvı tutulumunu artırarak altta yatan böbrek hasarını kötüleştirmektedir. Zamanla artan intraglomerüler basınç, filtrasyon bariyerine zarar verir. Tübüler fibroblastlar, onarım için NFκB ve ETS proto-onkogeni 1 gibi mediyatörleri salgılar ancak tübüler atrofi, inflamasyon ve fibrozis ile sonuçlanan hasarın şiddeti giderek artar (50).

SARS-CoV-2 enfekte bireylerde meydana gelen pıhtılaşma aktivasyonu, endotel disfonksiyonu ile açıklanmaya çalışılmıştır. Doğrudan endotelin enfekte olması ile pıhtılaşma kaskadı aktiflenir. Başlangıçta akciğerde olmak üzere tüm organlarda mikrosirkülasyon bozularak tromboza sebep olur ve organ disfonksiyonu ortaya çıkabilir. SARS-CoV-2 ile enfekte transgenik fareler ile yapılan bir çalışmada; perivasküler inflamasyon, alveolar ödem ve hemorajinin eşlik ettiği interstisyel pnömoni ile trombosit aktivasyonu gösterilmiştir. Endotel hücre bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte vasküler geçirgenlikte artış ve pulmoner tromboz bildirilmiştir (55). SARS-CoV-2'nin uzun dönem etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, viral partiküllere rastlanmış ve üreme sisteminde endotel disfonksiyonu ile ilişkilendirilmiş bozukluklar bildirilmiştir (56).

SARS-CoV-2'nin nörolojik hasara neden olabileceği mekanizma için ACE2 reseptörleri ile ilişkili doğrudan hasar düşünülmektedir. Ayrıca, akciğerde alveolar gaz değişim bölgesinde kısıtlanma sebebiyle merkezi sinir sisteminde hipoksi ortaya çıkar. Beyindeki mitokondrilerde anaerobik metabolizma ve asit metabolitlerinin aşırı birikimi nedeniyle; hücrelerin şişmesi, interstisyel ödem, serebral kan akışının engellenmesi, iskemi ve tıkanıklık çıkabilir (40).

Gastrointestinal sistem de SARS-CoV-2'nin potansiyel hedefindedir. ACE2'nin COVID-19'da sindirim organı hasarını tetikleyen bir faktör olduğu ön görülmektedir. İnsanlarda karaciğerde, özefagusta, midede, ince bağırsak ve kolonda ACE2 proteininin ekspresyonu bilinmektedir (3, 57-59). Bu durum, SARS-CoV-2'nin ACE2 aracılığıyla sindirim sistemine girişi için bir yol olabileceğini düşündürmektedir. İnsanlarda biyopsi örnekleri incelendiğinde; mide, duodenum ve rektum epitelinde viral RNA ve nükleokapsid proteini immünfloresan yöntemle tespit edilmiştir (57). Dışkıdaki viral RNA'nın, solunum testleri ile eş zamanlı pozitif olduğu (1-12 gün); solunum testleri negatif çıktıktan sonra bile uzun süre tespit edilebilir kaldığı (ortanca süre 22 gün) gösterilmiştir (57, 60, 61). SARS-CoV-2 RNA'nın varlığı, alternatif bir enfeksiyon yolu olarak potansiyel fekal-oral bulaşmaya işaret edebilir. Gastrointestinal sistemdeki yüksek viskoziteli mukus, viral RNA ve virüs partiküllerini koruyarak virüsün enfektivitesini korumasına yardımcı olabilir ve virüs, daha sonra dışkılama yoluyla atılabilir. Bu durum, SARS-CoV-2'nin fekal-oral bulaşmasını desteklemektedir (62).

Gastrointestinal semptomlar, solunum semptomlarının başlangıcından önce ortaya çıkabilir. Bağırsak epiteli eksojen patojenlerle doğrudan temas halindedir ve SARS-CoV-2 ile enfekte yabani hayvanların tüketilmesinden sonra, ince bağırsak epitel hücrelerinin virüsten ilk etkilenen hücreler olduğu ve ishalin, enfeksiyona dair önemli bir işaret olabileceği tahmin

edilmektedir (40). Literatürde SARS-CoV-2 enfekte bireylerde ilk belirti olarak ishalin bildirildiği vakalar da mevcuttur. Hastaneye yatış sırasında sadece gastrointestinal semptomları olan dokuz hastadan beşinde, 2-5 gün içinde tipik semptomlar geliştiği ve SARS-CoV-2 pozitif hastaların yarısından fazlasında ilk belirtilerin bulantı, kusma ve ishal olduğu bildirilmiştir (45, 63). Görülen bu semptomlar, dokudaki hasar ve fonksiyonel bozukluklar kaynaklıdır.

SARS-CoV-2 tarafından indüklenen inflamatuar yanıt, gastrointestinal kanalın doğrudan hasar görmesine, emici enterositlerin tahrip olmasına, potansiyel olarak malabsorpsiyona, enterik sinir sisteminin etkilenimiyle bağırsak sekresyonunda bozulmaya yol açabilir (50). Ayrıca inflamatuar koşullar, gastrointestinal sistemdeki çok katmanlı bariyer sistemini bozarak bağırsak epitelinde ACE2 ekspresyonunu artırır. Bu da SARS-CoV-2'nin bağırsak epitel hücrelerine girişini arttırır (62). Hiperinflamasyon ve düzensiz immün yanıt, sitokin artışına yol açarak yaygın hasara ve paralitik ileus ve hemorajik kolit gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilir.

2.5 Hücre Ölüm Yolakları

Hücrenin fiziksel veya kimyasal bir etken aracılığı ile hasara uğraması sonucu gelişen hücre ölümü, programlanmış hücre ölümüdür. Embriyonik gelişimden hücrelerin bağışıklık yanıtına kadar birçok fizyolojik süreçte hücre ölümü rol oynamaktadır. Makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositoz yapan bağışıklık hücreleri; bakteri, mantar ve parazitleri hedef alır. Birçok patojen, konakçı hücreleri istila ederek fagositler ve diğer hücre içi savunma hatları tarafından tespit edilmekten kaçınır. Enfekte hücrenin varlığını sürdürmesi konakçıyı tehdit eder ve çözüm, enfekte hücrenin öldürülmesidir. Enfekte hücrelerin öldürülmesi, hücre içi ya da hücre dışı mekanizmalarla gerçekleştirilebilir. Hücrenin kendisi, tehlikeye girmiş durumunu tespit edebilirse; apoptoz, nekroptoz ve piroptoz gibi programlı hücre içi ölüm mekanizmalarını aktive edebilir. Birçok hücre içi patojen, programlı hücre ölümünden kaçar veya bunu engeller. Son savunma hattı, enfekte hücrelerin hücre dışı apoptozunu indükleyebilen doğal öldürücü hücreler ve sitotoksik T lenfositler gibi, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemindeki sitotoksik hücrelerdir (64).

Her gün milyarlarca hücre ölür ve fagositler tarafından uzaklaştırılır. Ancak enfeksiyon, kronik inflamasyon ve doku hasarı gibi durumlarda çok sayıda hücrenin aniden ölmesi ve birikmesi halinde bu sistem zorlanabilir. Ani ve kontrolsüz hücre ölümü, hücre dışı boşluğa

büyük miktarda hücresel içerik salınımına neden olur. Salınan moleküller, DAMP'lar (Tehlikeyle ilişkili moleküler kalıp) gibi, hasar sinyalleri olarak işlev görür. Hücre dışı alanda DAMP'ların varlığı, tehdidi ortadan kaldırmak ve doku onarımını teşvik etmek için fagositleri ve diğer bağışıklık hücrelerini harekete geçiren güçlü bir bağışıklık yanıtı ortaya çıkartır. Enfeksiyon sırasında PAMP'ların (Patojenle ilişkili moleküler kalıp) varlığı, enfeksiyonu kontrol etmek için spesifik antimikrobiyal bağışıklık tepkilerini düzenler. Hücreler bağışıklık yanıtlarını uyarlamak için ölümlerini düzenleyebilirler (11).

Geri dönüşü olmayan hücre hasarı ve patolojik süreçlere bağlı hücre ölümü, nekroz olarak adlandırılır. Hücre organellerinin şişmesi, plazma membranının yırtılması, sitoplazmada vakuolizasyon ve nihayetinde hücrenin parçalanması ve hücre içi içeriğin çevre dokuya dökülerek doku hasarına yol açmasıyla sonuçlanan kontrolsüz bir hücre ölümüdür. Apoptoz gibi programlı hücre ölümünün aksine nekroz, hücre dışından gelen zararlı uyaran nedeniyle meydana gelir ve hemen her zaman inflamatuar yanıtlarla ilişkilidir. Tipik olarak nekroz, kaspaz aktivasyonu veya normal gelişim ile ilişkili değildir ve hasar veya patolojiye yanıt olarak hücre ölümüne sebep olur. Nekroz, piroptoz ve nekroptoz gibi programlı hücre ölüm yolakları ile yakından ilişkilidir (65).

Programlanmış hücre ölümü apoptotik ve apoptotik olmayan şeklinde temelde ikiye ayrılır. Apoptotik olmayan programlı hücre ölümleri vakuolizasyonla seyreden otofaji, entoz, paraptoz; mitokondri ilişkili mitoptoz, partanatoz; demir metabolizması ile bağlantılı ferroptoz; immün sistem etkisiyle gerçekleşen piroptoz ve diğer dış etkenlere göre gerçekleşen nekroptoz olarak sıralanabilir (12).

2.5.1 Apoptoz

Apoptoz, enzim aktivasyonuyla hücrenin kendi nükleer DNA'sının ve çeşitli sitoplazmik proteinlerinin yıkımına neden olan, hücrenin programlı ölümü olarak tanımlanmaktadır. Apoptotik hücrelerin temel karakteristiği hücrenin büzüşmesi (piknoz), membran tomurcuklanması, apoptotik cisimciklerin oluşumu, DNA fragmantasyonu ve kromatin kondenzasyonudur (12).

Dokuların gereksinim duyulmayan kısımlarının uzaklaştırılması, bölgede istenen sabit hücre sayısının korunması, embriyogenez sırasında sürekli hücre döngüsü ve doku

rejenerasyonunun özellikle gerekli olduğu doğum sonrasında, doku oluşumunun gerçekleşmesi adına fizyolojik durumlarda olabileceği gibi; genetik olarak değişikliğe uğramış, onarılamayacak derecede hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması gibi patolojik durumlarda gerçekleşebilen hücre ölümüdür. Apoptotik hücrelerin plazma membranı sağlam kalır ve ölen hücrenin parçaları dışarı çıkamaz. Böylece, makrofajların apoptotik hücreleri hızla ortadan kaldırmasıyla inflamatuar yanıt meydana gelmez (11).

Apoptoz, sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz ailesinin bir üyesi olan "kaspaz" enzimlerin aktivasyonuyla düzenlenir. Apoptoz tetiklenmesinden membran tomurcuklanmasına, DNA fragmantasyonundan fosfolipid asimetrisinin bozulmasına kadar sürecin tamamında kaspaz enzimleri rol almaktadır. Apoptozun temeli; Bcl-2 (B hücreli lenfoma-2) ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin sentezi ve yıkımı ile başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz -6 ve kaspaz-7) arasındaki dengeyle düzenlenir. Mitokondriden sitokrom c salınımı, süreçte önemli rol oynar (11). Farklı mekanizmalar ile aktiflenen ve çeşitli moleküllerin görev aldığı intrinsik ve ekstirinsik yolak mevcuttur.

2.5.1.1 İntrinsik Yolak

İntrinsik (Mitokondriyal) apoptoz yolağı; çeşitli çevresel faktörler, büyüme faktörlerinin azalması, DNA hasarı, reaktif oksijen radikallerinin artması, elektrolit taşınımında bozulma, mitojenik stimülasyon artışı gibi hücre içi dengenin bozulduğu durumlarda tetiklenebilmektedir (66).

Apoptozun intrinsik yolu mitokondri aracılığı ile gerçekleşir. Mitokondrilerde apoptoz sürecini başlatabilen sitokrom c proteini ve endojen apoptoz inhibitörlerini nötralize eden proteinler yer almaktadır. Hücrenin ölmesini veya yaşamaya devam etmesini belirleyen temel olay mitokondriyal geçirgenliktir. Mitokondriyal membranlar geçirgen hale geldiğinde, sitokrom c sitoplazmaya sızarak kaspaz aktivasyonunu ve apoptotik hücre ölümünü tetikler (8). Başlangıçta mitokondriyal kanallar açılır ve membranlar arası mitokondri boşluğundan yaklaşık 40 farklı protein salınır. Sitokrom c, sitoplazmaya geçerek adaptör APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) proteinine bağlanır. ATP bağımlı konformasyonel değişim gerçekleşir ve bu oluşuma pro-kaspaz-9 eklenir, apoptozom adı verilen kompleksler oluşur. Böylelikle kaspaz-9 aktifleşir ve ardından pro-kaspaz-3'ü aktifleştirerek intrinsik yolak üzerinden apoptoz tamamlanır (66).

Mitokondriyal geçirgenliğin ve intrinsik apoptozun denetleyicisi; prototipi Bcl-2 olan, mitokondri dış membranında yerleşik protein ailesidir. Bu proteinlerin sentezinin kontrolünde, DNA hasarına ilk yanıt veren transkripsiyon faktörü p53 yer almaktadır. Sağlıklı hücreler büyüme faktörlerinin yanı sıra yaşam sinyallerini aldıkça anti-apoptotik Bcl-2'yi ve Bcl-xL'yi sentezler. Bu proteinler membranda por oluşturabilen Bax ve Bak proteinlerini antagonize ederek pro-apoptotik moleküllerin mitokondriyal çıkışını sınırlar ve böylelikle mitokondriyal membranların bütünlüğü korunmuş olur (11).

Hücreler, büyüme faktörleri ve yaşam sinyalleri eksikliğinde, DNA'ya zarar verecek etkenlerle karşılaştıklarında veya hatalı katlanmış proteinlerin aşırı birikimi sonucunda çok sayıda sensör aktifleştirir. Bu sensörlere Bcl-2 ailesinin korunmuş domainlerinden üçüncüsünü içerdikleri için BH3 (Bcl-2-benzeri domain-3) proteinleri denir. BH3 proteinleri pro-apoptotik Bax ve Bak proteinlerini aktifler. Bu proteinler dimerize olarak mitokondri membranına girer ve sitokrom c gibi mitokondriyal proteinlerin sitozole geçebileceği kanallar oluşturur. Diğer taraftan BH3 proteinleri, anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL moleküllerini inhibe ederek mitokondriyal proteinlerin sitozole geçişini hızlandırır. Sitokrom c, çeşitli kofaktörlerle kaspaz-9'u aktifler. Mitokondriden sitozole geçen diğer proteinler, kaspaz antagonistlerini bloke ederek apoptozun fizyolojik inhibitörleri gibi görev yapar. Tüm bu etkileşimlerin sonucu; nükleer parçalanmaya ve apoptotik cisimlerin oluşumuna yol açan kaspaz kaskadı aktivasyonudur (67).

2.5.1.2 Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik apoptoz yolağı, kendi kendini aktiflemiş lenfositlerin ortadan kaldırılmasında ve aktiflenmiş sitotoksik T lenfositler tarafından hedef hücrelerin öldürülmesinde görev alır. Hücre dışı bir sinyalin veya ligandın plazma membranındaki reseptörüne bağlanması ile aktiflenen bu yolakta, birçok hücrenin yüzeyinde "ölüm reseptörleri" adı verilen ve apoptozu indükleyen moleküller görev almaktadır. Bu sebeple "plazma membran reseptör aracılı yolak" olarak da isimlendirilir. Ölüm reseptörlerinin çoğu TNF reseptör ailesinin üyesidir ve hücre ölümü sırasında sitoplazmada diğer proteinlerle etkileşime girmelerini sağlayan "ölüm bölgesi" içerirler. TNFR1 ve Fas (CD95), ölüm reseptörlerinin prototipidir.

FasL (Fas Ligandı), aktive edilmiş T lenfositlerde eksprese edilen bir membran proteinidir. Bu T hücreleri, Fas eksprese eden hedefleri tanıdığında; Fas molekülleri, FasL ile bağlanır. Bununla birlikte ölüm bölgesi, adaptör proteinlere bağlanır. Bu bağlanma ile kaspaz-

8 bölgede aktiflenir ve diğer kaspaz enzimlerinin zincirleme reaksiyonları gerçekleşir. Aktive kaspaz-8, doğrudan apoptoza yol açan pro-kaspaz-3, 6 ve 7'yi parçalayarak kaspaz-3, 6 ve 7'yi aktive eder. Kaspaz-3'ün aktivasyonu, kaspaz-3 tarafından bölündükten sonra aktif hale gelen ve DNA üzerinde doğrudan onarım etkili olan enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) gibi proteinleri aktive eder. Mitokondriyal membran çeşitli hücre içi ve dışı uyaranlardan kaynaklanan hasardan sonra daha geçirgen hale gelir ve sitokrom c'nin iç ve dış mitokondriyal membranlar arasındaki sitoplazmaya salınmasına izin verir. Sitokrom c, APAF1'e bağlanarak pro-kaspaz-9'u toplar ve parçalar. Sitokrom c, APAF1 ve aktive kaspaz-9 apoptozomu oluşturur ve bu da kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eder.

Ölüm reseptörü DAI (İntrasitoplazmik RNA/DNA ligandı) sitoplazmada lokalizedir ve doğrudan DNA veya RNA'ya bağlanır. Bu reseptörü eksprese eden hücrelerin, virüsler ve bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından uyarılmasıyla, eksojen nükleik asitlerin tanınması sağlanır. Böylece patojenin uzaklaştırılması için hücrelerin apoptozu indüklenir (68).

Apoptotik hücrelerin kendi fagositozlarını indüklemelerinin yanında inflamasyonu sınırladığı ve çevredeki doku hasarının onarımına yönelik çeşitli metabolitlerin salınımından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, apoptotik lenfositlerin ve makrofajların hücre membran bütünlüğünü koruduklarını ve eş zamanlı olarak özgün inflamasyon baskılayıcı metabolitleri sentezlediklerini açığa çıkarmıştır. Metabolit sentezindeki temel mekanizmanın panneksin-1 kanallarının kaspaz-1 ile ilişkili olarak açılmasıyla aktiflendiği düşünülmektedir. Metabolitlerin salınımıyla birlikte; çevre hücrelerde gen transkripsiyonlarının indüklenmesi ve yeniden düzenleme yoluyla inflamasyonun baskılanarak hücre çoğalmasının tetiklendiği gösterilmiştir. Bu süreç doku onarımını da desteklemektedir (69).

Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik aktivasyon yolları bağımsız olarak mevcut değildir. Aktive kaspaz-8, BH3-etkileşim alanını parçalar ve tBID'ı (parçalanmış BH3-etkileşim alanı) oluşturur. tBID mitokondriyal hasara ve sitokrom c salınımına neden olarak intrinsik apoptoz yolunu tetikler. Kaspaz-8, birçok hücre tipinde Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik Bid üyesini aktifleyerek mitokondriyal apoptoz yolağını besler (68). Her iki yolda da kaspaz-9 ve kaspaz-8 aktive edildikten sonra bölünür ve çok sayıda hedefi parçalayan ek kaspazları aktive eder. Aktive olan kaspazların hedefi etkilemesiyle, DNA'yı ve nükleer proteinleri parçalayan nükleaz enzimleri de aktiflenir. Çekirdek matriksinin ve hücre iskeletinin diğer bileşenlerinin yıkımına neden olan kaspazlar, apoptozun karakteristik hücresel parçalanmasını gerçekleştirir (12, 67).

Hücre proteinlerinden ve kaspaz antagonisti olarak işlev gören FLIP (Kaspaz-8 inhibitör protein), ölüm reseptörünün kaspaz tarafından aktiflenmesini önler. Bazı virüslerin FLIP ürettiği ve böylece virüsle enfekte hücreleri canlı tutabildiği gösterilmiştir (70).

2.5.2 Piroptoz

Edinilmiş bağışıklık yanıtta rol oynayan, çeşitli mikroorganizmalar ve tehlike sinyalleri ile uyarılan hücrelerde inflamatuar kaspazların etkisiyle inflamasyonun başladığı kontrollü hücre ölüm yolağı piroptozdur. "Gasdermin aracılı programlanmış hücre ölüm yolağı" olarak da bilinmektedir (12). Piroptozun morfolojik özellikleri arasında kromatin kümelenmesi, hücre membranında por oluşumu ve geçirgenliğinin artışı ile seyreden hücre şişmesi sayılabilir (11).

Piroptoz; tehlikeye giren hücreyi ortadan kaldırarak, aynı zamanda inflamatuar bir yanıt ortaya çıkararak hücre içi enfeksiyona karşı savunma sağlayabilir. Piroptozun hücre içi patojenlere karşı etkisi; inflamazomlar tarafından patojenin tespit edilmesi, membranda porlar meydana gelmesi ve por kaynaklı hücre içi tuzak olarak adlandırılan özelleşmiş bir alanda patojenlerin sıkıştırılmasıyla patojenlerin yayılımının sınırlandırılmasıdır. Ayrıca hasarla ilişkili moleküller (DAMP-PAMP) ve eikosanoidler dahil olmak üzere nötrofil kemoatraktanlarının sentezini artırır (64).

Piroptoz, sitozolik kontaminasyonu tespit eden inflamazomlar tarafından başlatılmaktadır. IL-1 reseptörü ve TNFR gibi toll benzeri veya sitokin reseptörlerinin etkileşimi, NFκB sinyalini ve inflamazom kompleksi alt birimlerinin transkripsiyonunu tetikler. İnflamazom, sitozolik bir uyarana yanıt olarak oligomerize olan ve sensör proteini (NLR [Lösin bakımından zengin nükleotid bağlayıcı alan], AIM2 [Absent in Melanoma 2] ve Pirin gibi) içeren bağışıklık sensörleridir. Birçok durumda adaptör proteinler de inflamazoma dahil edilir. İnflamazomlar çok sayıda patojene karşı savunma sağlarken anormal şekilde aktive olmaları halinde immünpatolojilere ve sepsise yol açar.

Piroptozun mekanizmasında Gasdermin D'nin bölünmesi ile tetiklenen kaspaz-1 ve kaspaz-11 aktivasyonu rol oynamaktadır. Gasdermin D, bağışıklık hücrelerinde ve bağırsak epitel hücrelerinde sentezlenmektedir. İnsanlarda Gasdermin D, birbirleri ile bağlı C-terminal alan ve N-terminal alandan oluşur. N-terminal alan, doğrudan bir gasdermin gözeneği oluşturur ve gözenek oluşturucu bölge olarak adlandırılır. Piroptotik gözenek oluşturma aktivitesi ise C-

terminal alanı tarafından kontrol altında tutulur. Aktivasyon üzerine, kaspaz-11/4/5 ile C-terminal alan, N-terminal alandan ayrılır. Serbest kalan N-terminal alan, daha sonra hücre membranına entegre olur ve burada oligomerleşerek yaklaşık 10-15 nm çapında membranda şişme ve membran yırtılmasına neden olan büyük gözenekler oluşturur. Gasdermin D, N-terminal alan içinde kaspaz-3 tarafından bölünebilir, bu durumda N-terminal alan inaktive olur ve böylece kaspaz-3 apoptozu başlattığında piroptoz önlenir. Piroptoz sırasında kaspaz-1, membran yırtılmasından önce olgun sitokinleri oluşturmak için IL-1ß ve IL-18'i parçalar. IL-1ß ve IL-18 sitozole sınırlı proteinlerdir. Gasdermin gözeneğinin 10-15 nm'lik çapı, IL-1ß'nın (4,5 nm) ve IL-18'in (5,0 nm) geçişine izin verir. Bu sitokinlerin lizis öncesinde hücrelerden salındığı da bilinmektedir. Gasdermin gözeneği daha büyük molekülleri sınırlayacak kadar küçüktür; 25-30 nm çapındaki ribozomlar ve daha büyük organeller gözeneklerden geçemez (64).

Gasdermin D gözeneği, kardiyolipin veya fosforile baş grupları içeren lipozomlara karşı yüksek afiniteye sahipken; fosfatidilinositol trifosfat ve fosfatidilserin için daha düşük bir afiniteye sahiptir. Gasdermin D, yüksüz fosfatidilinositolü, fosfatidilkolini ve fosfatidiletanolamini bağlamaz. Fosfatidilinositol fosfat türleri ve fosfatidil serin, plazma membranının sitozolik yaprağı ile sınırlı olduğundan, Gasdermin D sadece sitozolik yüzden porlar oluşturabilir. Böylece hücre, komşuluğundaki hücrelerden kaynaklanan Gasdermin D'den korunmuş olur. Kardiyolipin, iç mitokondriyal membranın ve bakteriyel membranların bir bileşenidir ancak Gasdermin D'nin mitokondrinin iç membranına etkisi belirsizdir (64).

Gasdermin D porunun açık olması, plazma membranının normal geçirgenlik bariyerini kırar. Normalde sitozolde düşük konsantrasyonda sodyum ve yüksek konsantrasyonda potasyum bulunurken ekstraselüler sıvıda tam tersidir. Plazma membranında bir gözenek açıldığında, konsantrasyon gradienti ve elektriksel gradient bozulur. Başlangıçta hücre dışına minimum net potasyum akışı ile sonuçlanır. Buna karşılık, sodyum hücre içine çekilir ve beraberinde su getirerek hücre hacminin artmasına neden olur. Eğer az sayıda gasdermin poru mevcutsa, hücre hacmini azaltmak için; iyonları ve beraberinde suyu, kanallar ile atmaya çalışır. Gasdermin gözenekleri hücrelerin telafi edici kapasitesini aşan sayıda ise, hücre hacmi giderek artar. Hacim, membran kapasitesini aştığında; plazma membranı büyük sıvı dolu balonlar halinde kortikal hücre iskeletinden ayrılır. Bu balonlar morfoloji ve bileşim açısından apoptotik bleblerden farklıdır. Kısa bir süre sonra, çözünebilir sitozolik içeriği serbest bırakan bir membran yırtılması olayı meydana gelir. Bu yırtılma LDH (Laktat dehidrogenaz) gibi çözünebilir proteinleri hemen dağıtacak kadar büyüktür, ancak organeller korunur. Yırtılma

olayından sonra ozmotik basıncın eşitlendiği ve daha fazla hacim artışının olmadığı düşünülmektedir (64).

Piroptoz iki farklı yolak üzerinden gerçekleşebilmektedir:

Kanonik yol olarak adlandırılan ve doğrudan kaspaz-1 ilişkili piroptoz, çeşitli mikroorganizmalar ile enfekte olmuş konak hücreleri etkilemektedir ve inflamasyonun temel sorumlusudur (9). Bu yolağın ana düzenleyicisi NLR ailesinden NLRP3 (NLR ailesi, pirin alanı içeren-3)'tür. NLRP3, DNA reseptörü AIM2 ve Pirin reseptörü; PAMP ve DAMP gibi hücre içi etmenleri tespit ederek inflamazomları meydana getirir (68). İnflamazomların aktiflenmesi için K^+ çıkışı, Ca^{2+} sinyali, reaktif oksijen radikalleri, mitokondriyal işlev bozukluğu ve lizozomal yırtılma gibi ikincil olaylar gereklidir. Aktiflenen inflamazomlar, kaspaz-1'i dimerizasyona uğratır ve IL-1ß, IL-18 gibi inflamatuar sitokinler ortaya çıkar. Diğer taraftan kaspaz-1 aktivasyonuyla Gasdermin D oligomerize olarak hücre membranına kilitlenir ve membranda porların açılmasına sebep olur. Hücre içi potasyum dengesi bozulur ve geri dönüşsüz hücre ölüm süreci başlar (67).

Kanonik olmayan yolakta ise ana tetikleyici olarak Gram negatif bakterilere ait olan lipopolisakkaritler rol oynamaktadır ve kaspaz-11, Gram negatif bakterilerin etkinliğinden sorumludur. Doğrudan kaspaz-4, kaspas-5 ve kaspaz-11 ile etkileşen lipopolisakkaritler; Gasdermin D'nin N-terminal peptidini ayırarak hücre membranına yerleşmesini ve porlar oluşturmasını tetikler (9, 71).

Piroptoz, enfekte olmuş hücrelerin doğrudan ortadan kaldırılmasını sağlarken ölen konak hücrelerin sitoplazmik içeriklerini de serbestleştirir. Böylelikle inflamasyon kaskadı tetiklenir. Lokal inflamasyonla birlikte immünite aktiflenir ve patojen, vücuttan uzaklaştırılmış olur (71).

Gasdermin E de piroptozda rol oynamaktadır. TNF ve ölüm reseptörleri tarafından aktiflenen kaspaz-8 ve sitokrom c salınımıyla aktiflenen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleyerek apoptozu gerçekleştirir. Apoptoz için aktifleşen kaspaz-3, Gasdermin E'nin N-terminal peptidini ayırarak hücre membranında porların oluşumunu tetikler ve piroptoz yolağını başlatır (9).

Apoptoz hücreleri apoptotik cisimlere dönüştürürken, piroptoz hücreleri hücre içi tuzaklara dönüştürür. Piroptozu tanımlayan membran yırtılması olayı çözünebilir sitozolik

içeriği hemen dağıtır. Bununla birlikte, gözenekli olmasına rağmen plazma membranı büyük ölçüde sağlam kalır, böylece organeller ve canlı hücre içi bakteriler içeride sıkışıp kalır. Apoptotik cisimler tipik olarak makrofajlar tarafından yok edilir. Buna karşılık, piroptozda oluşan por kaynaklı hücre içi tuzaklar, nötrofiller tarafından ortadan kaldırılır (64).

2.5.3 Nekroptoz

Düzenli gerçekleşen nekroz şeklinde tanımlanan nekroptoz; kaspaz bağımsız gerçekleşen, inflamasyonla sonuçlanan programlanmış hücre ölümüdür ve temelde TNFR1'in aktive olması sonucu meydana gelir. Hücrede şişme ve plazma membranında yırtılma oluşturması sebebiyle morfolojik özellikler bakımından nekroz ile benzerlik gösterse de hücre ölüm reseptörleri ile düzenlenmesi apoptoza yakınlık gösterir (11, 72). Karakteristikleri olarak hücre şişmesi, sitoplazmada granülasyonda artış, mitokondriyal membran geçirgenliği, membran bütünlüğü kaybı ve hücresel içerikle birlikte inflamatuar ajanların dışarı çıkması sayılabilir (12, 67). Nekroptozun inflamatuar mediyatörlerin salınmasıyla tetiklendiği ve nörodejenerasyon biçimlerinde, iskemi ve enfeksiyonun neden olduğu hücre ölümlerinde rol aldığı bilinmektedir (65).

Düzensiz nekrozun aksine, nekroptoz daha fizyolojik ve programlanmış bir nekroptotik ölüm türüdür ve apoptoz ile birkaç temel süreci paylaşır (65). Nekroptoz, hücre içi veya hücre dışı çeşitli faktörler tarafından tetiklenmektedir. Patojenler, interferonlar gibi çevresel etkenlerin hücre membranına ulaşmasıyla aktiflenen TNFR1, ölüm reseptörleri (Fas/FasL), TLR4 ve TLR3 (Toll benzeri reseptör 3 ve 4), IFN-I (İnterferon tip 1) ve TNF-α üretimini indükleyerek nekroptoza yönlendiren retinoik asitle indüklenebilir gen-1 ve STING (İnterferon genlerinin uyarıcısı) gibi sitozolik nükleik asit reseptörlerinin; transdüksiyon yoluyla gerekli sinyali hücre içine taşıması, bu yolağı başlatır. Hücreye ulaşan ölüm reseptörlerine ait sinyaller ile RIPK3 (Reseptör-etkileşimli Serin-Treonin Kinaz 3)'ün fosforilasyonu gerçekleşir ve beraberinde RIPK1 de aktiflenir. RIPK1 ve RIPK3 birlikteliğinde bir kompleks oluşur. Bu kompleks MLKL (Psödokinaz karma soy kinaz etki alanı benzeri) ile bir araya gelerek serin-treonin aminoasitlerini fosforile eder ve nekrozomu oluşturur (67). Nekrozomlar, hücre membranının iç kısmına göç eder. Diğer taraftan nekrozom oluşumu ile NFκB sinyal yolağı indüklenerek inflamatuar sitokinlerin, DAMP'ların ve PAMP'ların salınımı gerçekleşir ve proinflamatuar süreç başlamış olur. MLKL'nin kendisi, pozitif yükü ile membrandaki negatif

yüklü fosfotidilinozitol ile etkileşir ve hücre membranında porlar oluşturur. Bu durumda membran bütünlüğü ve hücre içi kalsiyum dengesi bozulmaya başlar ve geri dönüşsüz hücre ölümü gerçekleşir (11, 72).

Eksojen maddeler tarafından aktive edildiğinde, apoptoz veya nekroptozun hangisinin meydana geleceğinin belirleyicisi RIPK3 ve kaspaz 8'dir. Kaspaz-8'in mikroorganizmalar veya farmakolojik ajanlar ile doğrudan inhibisyonu, nekroptozu başlatabilmektedir. Çünkü; RIPK1'in aktivasyonu için, kaspaz-8 inhibisyonu gereklidir (11). Hücreler RIPK3'ü eksprese ediyor ve kaspaz-8 inhibe oluyorsa nekroptoz gerçekleşir (8).

Nekroptoz, patojenlerle savaşmak için çok önemli bir konak savunma mekanizmasıdır. Enfekte hücrelerde viral klirens, DAMP'ların salınmasıyla inflamatuar bir ortam yaratılması ve enfeksiyonla doğrudan mücadelede bağışıklık sistemi hücrelerini ve sitokinleri/kemokinleri toplamak için kullanılabilir. Buna karşılık virüsler, konakçı programlı hücre ölümünü etkisiz hale getirmek için, çoğunlukla apoptoz yolunu bloke ettiği bilinen farklı stratejiler geliştirmiştir. Bu durumda, nekroptoz yolağının aktivasyonu; konağı kurtarabilir ve enfeksiyonla savaşabilir konumda tutar (8). Bununla birlikte, çeşitli virüslerin nekroptotik hücre ölümünden kaçmak için RIPK1/RIPK3 kompleks oluşumunu inhibe ettiği bilinmektedir (11). Bazı virüsler (Örn; Poxvirüsler) kaspaz-1 ve kaspaz-8'i inhibe eden serpinler kodlar. Serpinler, apoptozu engelleyebilir, ancak nekroptozu indüklemek için doğal bir öncül sinyali sağlar (8). Nekroptoz, patojenlerle mücadelede önemini korumaktadır.

2.5.4 SARS-CoV-2 ve Hücre Ölüm Yolakları İlişkisi

Hücre ölümü, sağlıklı hücrelerin işlevlerini gerçekleştirebilmeleri için daha iyi bir ortam oluşturmak üzere; hasarlı veya enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan bir süreçtir (8). SARS-CoV-2 ile enfekte hücrelerin vücuttan uzaklaştırılmasında; apoptoz, piroptoz ve nekroptozun rol oynayabileceği düşünülmektedir (13).

Çeşitli çalışmalar SARS-CoV-2 enfeksiyonunun akciğer epitel hücreleri, bağışıklık hücreleri ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinde apoptozu indükleyebildiğini göstermektedir. SARS-CoV-2'nin lenfoid hücrelerde CD95 üzerinden apoptozu indükleyerek lenfopeniye sebep olduğu yönünde görüşler mevcuttur. Ayrıca, enfeksiyon sırasında ortaya çıkan sitokin fırtınası da lenfositlerin apoptozunu

indükleyebilmektedir (8). SARS-CoV-2'de ve SARS-CoV'da bulunan ve virüs salınımına katkı sağlayan ORF3a, iyon kanalı olarak işlev gören bir viroporindir. Çeşitli hücre hatları üzerinde yapılan deneyler; ORF3a'nın, Bcl-2'yi etkilemeden kaspaz-8'in bölünmesini ve aktivasyonunu indüklediğini ortaya koymuştur. Bu da ORF3a'nın apoptozu, ekstrinsik yolak üzerinden indüklediğini düşündürmektedir (8). Ayrıca virüsün spike proteininin, apoptozun merkezi bir düzenleyicisi olan kaspaz-3 yolunu aktive ederek apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (73). Çalışmalar apoptozun, enfekte hücreleri ortadan kaldırdığı ve viral yayılmayı önlediği için; SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı koruyucu bir mekanizma olabileceğini öne sürmektedir (74).

Piroptoz, inflamazomlar tarafından başlatılan, proinflamatuar sitokinlerin porlar aracılığıyla salınabildiği programlanmış hücre ölümüdür. Literatürde, SARS-CoV-2 enfeksiyonunda piroptozun görüldüğüne dair kanıtlar mevcuttur. SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş kardiyomiyositlerde viral spike proteininin, NLRP3 inflamazomunu aktifleyerek piroptotik hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (75). Ayrıca SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında gözlenen piroptoz aktivasyonu, hayatı tehdit edebilen sitokin fırtınası sendromuna yol açabilir ve piroptoz sırasında oluşan NLRP3'ün prognozu gösterdiği düşünülmüştür (76, 77).

Nekroptoz, hücreler apoptoz geçiremediğinde ortaya çıkan, inflamasyona ve hücre hasarına neden olabilen programlanmış hücre ölümüdür. Çeşitli çalışmalar SARS-CoV-2'nin akciğer epitel hücreleri, endotel hücreleri ve bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinde nekroptozu indükleyebildiğini göstermiştir (78, 79). SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonrasında Calu-3 hücrelerinde, fosforile MLKL'nin membranı boyunca arttığı gözlenmiştir ve SARS-CoV-2 enfekte hücrelerin ultraviyole ışınları kullanılarak inaktive edilmesiyle virüs replikasyonunun ve MLKL'nin fosforilasyonunun engellendiği bildirilmiştir (8).

Bu hücre ölüm yolları arasındaki ilişki karmaşıktır ve aralarındaki etkileşimin SARS-CoV-2 patogenezi üzerinde önemli etkileri olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, nekroptozun aktivasyonu, NLRP3 inflamazomunu aktive edebilen ve piroptozu tetikleyebilen DAMP'ların salınmasına yol açabilir (80). Enfekte hücrelerin ölümüyle birlikte daha fazla PAMP ve DAMP salınımı gerçekleşir. Makrofajların ve nötrofillerin bu bölgeye kemotaksisiyle proinflamatuar sitokin sentezi başlar. Bu, COVID-19'un şiddetine katkıda bulunabilecek kendi kendini potansiyalize eden bir inflamatuar sürece ve hücre ölümü döngüsüne yol açabilir (81).

2.6 Galektin-3 Proteini

Galektin ailesi; hücre-hücre ve hücre-matriks adhezyonu, bağışıklık yanıtı, inflamasyon süreci, tümör gelişimi, nöral dejenerasyon, yara iyileşmesi gibi oldukça farklı süreçlerde rol oynayan ß-galaktozit bağlayıcı lektinlerdir (82, 83). Galektinler, esas olarak hücre içinde yerleşim göstermektedir ve hücre dışında matriks glikanlarına bağlanarak, hücre içinde sitozoldeki ve nükleustaki proteinlerle etkileşerek sinyal iletimi gibi önemli süreçlerde görev alabilirler. Memelilerde bugüne kadar 15 farklı galektin tipi tanımlanmıştır. Dokuya özgü dağılım gösterebilen alt tipleri vardır. Galektinlerin tümü, karbonhidrat bağlanmasından sorumlu 130 aminoasitlik korunmuş karbonhidrat tanıma alanı içerirler ve glikokonjugatlara bağlanma afinitesi gösterirler (82).

Galektinlerin hücre yüzeyinde spesifik reseptörleri yoktur ancak biyolojik rollerini hücre tipine göre nükleer, sitoplazmik veya ekstraselüler konumlanması belirler. Spesifik bir reseptörü olmaması ve farklı bağlantılar kurabilmesi sebebiyle vücutta çeşitli roller üstlenebilirler. Uygun koşullar altında her galektin, hücre membranında özellikli oligosakkarit yapısı içeren bir yüzeye veya hücre dışı matriks proteinlerine doğrudan bağlanabilir. Galektin ailesi, endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi aracılığıyla salgılanabilir olmaları ile hücre dışında fonksiyon gösterebilirler (82, 84). Hücre içinde öncelikle sitoplazmada, bazı durumlarda nükleusta lokalize olurlar. Hücre içi fonksiyonlarını karbonhidrat bağlamadan, doğrudan hücre içi ligandlarla etkileşerek, sinyal iletimi yoluyla gerçekleştirirler (82).

Literatürde Galektin-3'ün özelliklerine ve fonksiyonlarına dair diğer galektinlere kıyasla daha geniş bilgi yer almaktadır. Galektin-3 ekspresyonu en fazla akciğerdedir, ikinci sırada gastrointestinal sistem yer almaktadır. Gastrointestinal sistemde özefagus, mide, duodenum, ileum ve kolon epitel hücrelerinde hücre içinde ve hücre yüzeyinde gösterilmiştir. Stromal ekspresyon ise yalnızca kolon epitelinde tespit edilmiştir (77).

Galektin-3 çok değerlikli karbonhidrat gruplarına bağlanarak pentamerler oluşturur ve bu sayede lektin ve başka çok değerlikli glikokonjugatlardan oluşan düzenli diziler meydana getirerek transmembran sinyal olaylarını başlatabilir (83). Galektin-3'ün hücre içi fonksiyon gösterebilmesi için, serin6 ve serin12 kalıntılarında fosforilasyon gerçekleştirmelidir (82). Hücre dışı matriks proteinleri ile doğrudan temas kurabilen Galektin-3, sitozolden salınarak bazal membran lamininine ve monosit veya makrofaj yüzeyindeki özgün integrinlere bağlanabilir. Bu sayede hücrelerin ekstraselüler matriks ile etkileşimine izin verirken hücreler

arası adhezyonu güçlendirmektedir (82, 84).

İnsanlarda Galektin-3 seviyesi, monositler makrofajlara farklılaştıkça yükselmektedir (85). Farklı bağışıklık hücrelerinde sentezi değişkenlik gösterebilmektedir. Normalde T lenfositlerde Galektin-3 bulunmazken, HTLV-1 (İnsan T-lenfotropik virüs tip 1) ve HIV viral etkenleriyle karşılaşma durumunda aktifleşen anti-CD3 veya ConA'nın indüklemesiyle CD4+ ve CD8+ T lenfositlerden ekspresyonu artar. Paraziter enfeksiyonlar sırasında makrofajlarda ve B lenfositlerde de ekspresyonu artmıştır (85).

Galektin-3'ün inflamasyon sürecinde etkili olduğu bilinmektedir. Galektin-3 eksikliği olan farelerde mast hücrelerinde IgE (immünglobulin E) aracılı yanıtta azalma gözlenmiştir. Peritonit modeli oluşturulduğunda, Galektin-3 eksikliği olan farelerde daha düşük düzeyde lökositer infiltrasyona rastlanmıştır (82).

Galektin-3'ün endojen varlığı veya enfeksiyon durumlarında pozitif geri besleme ile sentezinin artması, inflamasyon sürecine doğrudan müdahale etmektedir. Bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını ve matürasyonunu etkilemektedir. Mast hücreleri, nötrofiller, monositler ve T hücreleri gibi lenfoid ve miyeloid hücreleri aktive ederek süperoksit anyon üretimi ve IL-1, IL-2 ve IL-8 gibi sitokin üretimini tetiklediği bilinmektedir. Rekombinant Galektin-3'ün insan monositleri ve makrofajlarının göçünü indüklemede bir kemokin gibi işlev görebileceği yönünde çalışmalar mevcuttur ancak sorumlu reseptörler henüz belirlenmemiştir (86).

Yara iyileşmesi ve re-epitelizasyon üzerine yapılan bir araştırmada Galektin-3 eksikliği olan farelerde kornea dokuları incelenmiş ve re-epitelizasyonda belirgin yavaşlama görülmüştür. Ayrıca eksojen Galektin-3 kullanımı ile Galektin-3 bulunduran farelerde yara iyileşmesi hızlanmış; ancak Galektin-3 içermeyen farelerde herhangi bir değişiklik olmamıştır (87). Bu durumda Galektin-3'ün yara iyileşmesinde rol oynadığı kabul edilirken, bu süreci hangi mekanizma ile düzenlendiği henüz açıklanmamıştır.

2.6.1 Galektin-3'ün Hücre Ölüm Yolakları ile İlişkisi

Galektin-3'ün farklı hücresel mekanizmalarda rol oynadığı bilinmektedir ve ölüm yolakları üzerindeki etkisi araştırılmaya devam etmektedir. Hem apoptozun düzenleyicisi hem

de nekrozun bir aracı olarak hücre ölüm yollarında rol oynadığı gösterilmiştir. Galektin-3'ün çeşitli hücre tiplerinde ve farklı koşullar altında apoptozu modüle ettiği gösterilmiştir (88).

Galektin-3'ün p53 geni tarafından baskılandığı bilinmektedir ve baskılandığı durumda hücrede apoptotik aktivitede belirgin artış gösterilmiştir. Galektin-3'ün anti-apoptotik etkisinin sitozolde konumlanmasıyla gerçekleştiği bildirilmiştir. Hücrede apoptotik uyarı varlığında serin6'nın fosforilasyonu gerçekleşmektedir ve bu durum Galektin-3'ün nükleustan sitozole translokasyonu ile sonuçlanır. Hücre içi Galektin-3 varlığının apoptoza direnç kazandırdığı düşünülmektedir (83, 89). Anti-apoptotik etkinin araştırıldığı bir çalışmada Galektin-3'ü olan ve olmayan farelerde peritoneal makrofajlar incelenmiştir. Lipopolisakkarit ve IFN-γ tarafından indüklenen ekstrinsik apoptoz yolağına karşı Galektin-3 eksikliği olan farelerin daha duyarlı olduğu bulunmuştur (82). Galektin-3'ün Bcl-2'ye bağlanarak anti-apoptotik işlevi inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği, aşırı ekspresyonu halinde ise pro-apoptotik protein Bax'a bağlanarak apoptozu azalttığı bildirilmiştir (90, 91). Ayrıca T hücrelerinde ve nötrofillerde apoptozu indüklediği bir başka çalışmada gösterilmiştir. Çıkan sonuçlar doğrultusunda eksojen Galektin-3'ün apoptozu indüklediği ve endojen Galektin-3'ün anti-apoptotik etkinlik gösterdiği düşünülmektedir (86).

H5N1 virüsü ile enfekte edilmiş farelerin akciğerlerinin incelendiği araştırmada, Galektin-3 eksikliği olan grupta daha düşük IL-1ß ve NLRP3 inflamazom seviyeleri saptanmış ve Galektin-3'ün inflamasyonu ve piroptozu desteklediği bildirilmiştir (92). Ayrıca Galektin-3'ün lipopolisakkarit glikanlarına bağlanarak kanonik olmayan yolakta inflamazom aktivasyonuyla piroptozu indüklediği gösterilmiştir (93).

Galektin-3'ün nekroptozdaki rolünü belirlemek için yapılan bir çalışmada; Galektin-3 eksikliği olan grupta RIPK1, RIPK3 ve MLKL seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu moleküller, Galektin-3 eksikliği olan grupta daha fazla bulunmuştur ve Galektin-3'ün anti-nekroptotik özelliği vurgulanmıştır (94).

2.6.2 Galektin-3'ün SARS-CoV-2 ile İlişkisi

Galektin-3; inflamasyon, bağışıklık ve hücre ölüm yolları dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayan çok işlevli bir proteindir. Proinflamatuar transkripsiyon faktörü NF-kB'yi aktiflediği ve IL-6 ile TNF-α salınımını uyardığı

bilinmektedir. COVID-19 sırasında gözlenen gastrointestinal semptomlar, Galektin-3'ün patogenezde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (95).

Galektin-3'ün makrofajlar ve nötrofiller gibi inflamatuar hücrelerin aktivasyonunu arttırarak proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasına yol açtığı ve SARS-CoV-2 nedenli sitokin fırtınasında rol oynadığı düşünülmektedir (96, 97). Ek olarak, Galektin-3, trombositlerin ve pıhtılaşmanın aktivasyonu yoluyla SARS-CoV-2 etkisiyle gözlenen endotel disfonksiyonuna ve tromboza katkıda bulunabilir (98).

SARS-CoV-2'ye ait viral S1 proteini, insan Galektin-3'ü ile moleküler yapı açısından oldukça benzerlik göstermektedir. Galektin-3 inhibitörlerinin terapötik kullanımı ile SARS-CoV-2'nin bağlanmasının teorik olarak bozulacağı yönünde görüşler mevcuttur. Ayrıca Galektin-3 inhibisyonu ile IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuar mediyatörlerin salınımında azalma ve antiinflamatuar IL-10 düzeylerinde artış gösterilmiştir (95). SARS-CoV-2 ile enfekte bireyler üzerinde yapılan bir çalışmada; ağır seyreden olgularda Galektin-3 seviyelerinin, hafif seyirlilere göre önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir. Galektin-3 seviyeleri ile inflamatuar belirteçler, semptomların şiddeti ve mortalite arasında doğru orantılı bir ilişki bulunmuştur (97, 99, 100). SARS-CoV-2 ile enfeksiyon durumunda gözlenen stresle ilişkili artmış Galektin-3 seviyelerinin, fibroblastlardaki TGF-ß (Transforme edici büyüme faktörü beta) reseptörlerini indükleyerek dokuda fibrozisi tetiklediği düşünülmektedir. Galektin-3 aracılı bu mekanizma; akciğer, karaciğer, böbrek ve kalpte gösterilmiştir (14, 15).

Farklı çalışmalar Galektin-3'ün bağışıklık tepkisini düzenleyerek ve doku onarımını teşvik ederek SARS-CoV-2 ile enfeksiyona karşı koruyucu bir role sahip olabileceğini öne sürmüştür. Galektin-3'ün aşırı bağışıklık tepkisini baskılayabilen ve doku hasarını önleyebilen düzenleyici T hücrelerini, farklılaşma yolunda yönlendirdiği gösterilmiştir (96, 101).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Virüs İzolasyonu ve Hayvan Deneyi Uygulamaları

SARS-CoV-2 ile enfekte COVID-19 hastasından alınan solunum sistemi örneğinden virüs izole edilmiş (Alfa varyant) ve aşı geliştirme çalışması kapsamında Vero CCl-81 hücrelerinde çoğaltılmıştır (102). K18-hACE2 fareler, kontrol (n=10) ve SARS-CoV-2 enfekte (n=10) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. SARS-CoV-2 grubuna, biyogüvenlik düzeyi-3 kabinde intranazal $5x10^3$ TCID50/50µl canlı virüs uygulanmıştır. Virüs uygulamasından 7 gün sonra, 8.günde deney hayvanları sakrifiye edilmiştir. Nekropsi esnasında mide dokuları alınmış ve ışık mikroskobu takibi için formaldehit, elektron mikroskobu takibi için glutaraldehit fiksatiflerinde tutulmuştur. Sonrasında çalışmamız için kullanılmıştır. Koçak Farma İlaç ve Kimya San. A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan çalışmamız için etik kurul izni alınmıştır. (Karar no:2022-2) ("SARS-CoV-2'nin K18-hACE2 Transgenik Fare Midesine Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskobu Düzeyinde Araştırılması" başlıklı çalışmada toplam 20 adet olmak üzere, 10 adet herhangi bir ajanla enfekte edilmemiş kontrol grubu ve 10 adet SARS-CoV-2 aktif virüs ile enfekte K18-hACE2 transgenik farelerin [Jackson Lab, ABD]; yeni hayvan sakrifikasyonu olmadan, daha önce 37258 ID numaralı projede etik kurul izni alınmış ve sakrifiye edilmiş, ışık mikroskobu takibi için formaldehit, elektron mikroskobu takibi için glutaraldehit fiksatiflerindeki farelerden kullanılması için İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne resmi dilekçe verilmiş olup; yeni çalışmaya uygun etik kurul izni alınması halinde, çalışmanın gerçekleştirilmesi ve desteklenmesi uygun görülmüştür.) Daha önceki çalışmanın dokuları kullanıldığı için, verilen virüs dozuna göre ölen deney hayvanları, çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2 Işık Mikroskobik İnceleme

Dokuların takibi, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Işık Mikroskobu Laboratuvarında manuel (elde takip) olarak yapıldı. Işık mikroskobu ile incelenecek mide doku örnekleri parafin kasetlere yerleştirildi ve etiketlendi. %10 nötral tamponlu formalin pH 7.0 içinde en az 24 saat tespit edildi. Sırasıyla doku takip protokolüne uygun şekilde %70 Etanol ile 1 saat, %90 Etanol ile 1 saat, %96 Etanol ile 1 saat (2 kez), %100 Etanol ile 1 saat (2 kez), toluen ile ışık kaynağı altında kontrollü şeffaflandırma yapılarak, parafinde 4 saat bekletildi.

Kesit yüzeyine uygun olacak şekilde gömme işlemi tamamlandı ve parafin blok haline getirilen doku örnekleri, ışık mikroskobu laboratuvarındaki Rotary Mikrotom (Leica RM2255, Almanya) ile 4 µm kalınlığında kesildi. Doku kesitleri histokimyasal boyama için rodajlı lamlara, immünohistokimyasal boyama için pozitif şarjlı lamlara (Lam SuperFrost, Menzel Glaser, Thermo Scientific, ABD) alındı.

3.2.1 Histokimyasal Boyama

4 µm kalınlığındaki doku kesitleri tüm histokimyasal boyama işlemleri öncesinde; 56ºC'deki etüvde en az 1 saat bekletildi ve deparafinizasyon işleminin tamamlanması için toluene alındı. Kesitler, sırasıyla azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %70) geçirildikten sonra distile suya indirildi ve histokimyasal boyama işlemleri başlatıldı.

Tüm histokimyasal boyamalar; boyanma paterni, hücrelerin ayırt edilmesi, morfolojik yapı ve hasar açısından ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Değerlendirmeler insan midesine benzerliği ve parenkimal doku özelliği gösterdiği için, fare midesinin glandüler tarafında yapıldı. Görüntülemeler Zeiss Primostar 3 fotomikroskobu (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Almanya) ile 4X, 10X ve 40X objektifte fotoğraflandı. Boyamaların gruplar arası karşılaştırılması ve skorlanması, çift kör şekilde iki araştırmacı tarafından yapıldı.

3.2.2.1 Hematoksilen-Eozin

Dokudaki hücresel yapıların, dokunun genel yapısının ve morfolojisinin değerlendirilmesi için yapılan temel boyamada hematoksilen ve eozin kullanıldı.

Toz halindeki hematoksilen, absolu alkolde (%100) çözdürüldükten sonra ılık distile su ile karıştırıldı ve potasyum alum eklendi. Daha sonra kaynama noktasına getirilen karışıma sodyum iyodat eklendi ve soğutuldu. Çözeltinin soğumasıyla asetik asit eklenerek, Harris hematoksilen kullanıma hazır hale getirildi.

Distile suya indirilmiş kesitler olgunlaşmış Harris hematoksilen boyasında 5 dakika bekletildi. Nükleer boyanmanın ışık mikroskobu altında gözlemlenmesinin ardından çeşme suyuna alınan dokular, çeşme suyu altında 15 dakika yıkandı. Daha sonra eozin boyasında 1 dakika bekletildi. Distile suya alınan doku kesitleri dehidratasyon işlemi için sırasıyla yükselen alkol serisinden (%70, %90, %96, %100) geçirildi ve toluene alındı. 30 dakika toluende bekleyen dokular, Entellan (Merck KGaA, Almanya) kullanılarak uygun boyutta lamel seçilerek kapatıldı.

Gastrik hasarın histopatolojik değerlendirmesi için literatürdeki puanlama sistemi modifiye edilerek kontrol ve SARS-CoV-2 grubu karşılaştırıldı (103-105). Epitel dejenerasyonu, hemoraji veya fokal nekroz, glandüler hücre morfolojisinde bozulma, inflamatuar hücre infiltrasyonu ve kas tabakası hasarı olmak üzere 5 kriter üzerinden değerlendirme yapıldı. Skorlama, iki histolog tarafından çift kör olarak yapıldı. Puanlama, her bir kriter için 0-3 aralığında (hasar yok, hafif, orta, ağır) olup toplam en düşük 0 iken en yüksek 15 olarak belirlendi.

3.2.2.2 Periyodik Asit-Schiff

Mide dokusundaki nötral müsinlerin gösterilmesi ve değerlendirilmesi için PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyaması yapıldı.

Toz halde bulunan periyodik asit, distile su içinde çözdürülerek 1/100 derişimde periyodik asit çözeltisi hazırlandı. Schiff reaktifi için, kaynatılmış distile su içinde bazik fuksin çözdürüldü. Oluşan çözelti 50ºC'ye kadar soğutulduktan sonra potasyum metabisülfit ($K_2S_2O_5$) eklendi. Oda sıcaklığına gelince konsantre HCl eklenip karıştırıldı ve ardından aktif kömür ilavesiyle karanlıkta gece boyunca bekletildi. Ertesi gün filtre kağıdı kullanılarak süzülen çözelti kullanıma hazır hale getirildi.

Distile suya indirilmiş kesitler, periyodik asit çözeltisinde 5 dakika bekletildi. Ardından distile su ile yıkama yapıldı ve Schiff reaktifinde +4ºC'de 15 dakika bekletildi. Çeşme suyunda 10 dakika yıkama yapıldı. Harris hematoksilen kullanılarak çekirdek boyanması sağlandıktan sonra çeşme suyunda yıkanan dokular dehidratasyon işlemi için sırasıyla yükselen alkol serisinden (%70, %90, %96, %100) geçirildi ve toluene alındı. 30 dakika toluende bekleyen dokular, Entellan kullanılarak uygun boyutta lamel seçilerek kapatıldı.

3.2.2.3 Alsiyan mavisi-Tartrazin

Mide dokusundaki asidik müsinlerin gösterilmesi ve değerlendirilmesi için Alsiyan mavisi-Tartrazin boyaması yapıldı.

Toz halinde bulunan Alsiyan mavisi, distile su içinde çözdürüldü ve filtre edilerek kullanıldı. Toz halinde bulunan Tartrazin %1 asetik asit içeren distile suda çözdürülerek kullanıma hazır hale getirildi.

Distile suya indirilmiş kesitler potasyum permanganat ve sülfirik asit ile 5 dakika okside edildikten sonra sodyum metabisülfit ile ağartıldı. Ardından çeşme suyunda 5 dakika boyunca

bekletildi. 30 dakika Alsiyan mavisi solüsyonunda tutulan doku kesitleri, distile suda çalkalama sonrası çeşme suyunda 5 dakika bekletildi. Nükleus boyanması Harris hematoksilen ile sağlandıktan sonra asit-alkol (%96 etil alkol ile hazırlanmış %1'lik HCl solüsyonu) ile farklılaştırma işlemi uygulandı. Çeşme suyunda 5 dakika bekletilen doku kesitleri distile suda çalkalandıktan sonra 30 saniye tartrazin solüsyonu ile muamele edildi. Distile suda yıkanan preparatlar hızlıca %95 ve %100 alkolden geçirilerek toluene alındı. 30 dakika sonra Entellan kullanılarak uygun boyutta lamel seçilerek kapatıldı.

3.2.2 İmmünohistokimyasal Boyama

Pozitif şarjlı lam üzerine alınan 3 µm kalınlığındaki kesitler, 56ºC'deki etüvde 1 saat bekletildi. 30'ar dakika olacak şekilde iki kez toluenden geçirildi. Deparafinizasyon işlemi tamamlandıktan sonra her biri 5 dakika olacak şekilde azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %70) geçirilen doku kesitleri distile suya indirildi ve sonrasında dokuda var olan peroksidaz aktivitesini baskılamak için %3 hidrojen peroksit-metanol solüsyonunda 10 dakika karanlıkta bekletildi. Sonra, PBS (Fosfat tamponlu salin) (Distile suda Na_2HPO_4, $NaH_2PO_4 \cdot H2O$, NaCl ve KCl tuzlarının çözünmesi ile elde edilen çözelti, pH 7.4) ile yıkandı. Antijen geri kazanımı için, formalin fiksasyonu ile maskelenen antijenik bölgelerin açığa çıkarılması amacıyla doku örnekleri sitrat tamponu (pH 6.0) içinde, mikrodalga kullanılarak yüksek güçte 3 kez kaynatıldı ve inkübe edildi. Daha sonra, PBS ile yıkandı. Nonspesifik bağlanmayı önlemek için bloklama solüsyonu (Ultra V Block, TA-125-UB, UltraVision™ Large Volume Detection System) ile 10 dakika uygulandı. Primer antikor uygulaması gece boyunca +4 ºC'de yapıldı. Sonra, PBS ile yıkandı. Antijenin iki aşamada indirekt olarak işaretlenebilmesi için ikincil bir antikor kullanılarak (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, TP-125-BN, UltraVision™ Large Volume Detection System) 10 dakika bekletildi. Daha sonra, PBS ile yıkandı. Antijen-antikor bağlanmasını görselleştirmek için Streptavidin Peroksidaz (TS-125-HR, UltraVision™ Large Volume Detection System) solüsyonunda 10 dakika bekletilerek primer ve sekonder antikorlara enzim etiketleri eklendi. Sonrasında PBS ile yıkandı. Kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (DAB Chromogen & Substrate system, LAB VISION, TA-125-HD) kullanıldı. Daha sonra, distile su ile çalkalandı. Hematoksilen içinde 1 dakika bekletilerek karşıt boyama tamamlandı ve mikroskop altında kontrol edildi. Sonra, çeşme suyunda çalkalandı. Preparatlar, %96 ve %100 alkolde hızlıca dehidre edildi ve toluen ile muamele edildi.

Son olarak, preparatlar kromojene uygun kapatıcı kullanılarak (Entellan) lamellerle kapatıldı ve karanlıkta saklandı.

Antikorlara yönelik boyanma paterni, hücrelerin ayırt edilmesi, spesifik hasarın incelenmesi ışık mikroskobu altında gerçekleştirildi. Görüntülemeler Zeiss Primostar 3 fotomikroskobu (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Almanya) ile 4X, 10X ve 40X objektifte fotoğraflandı. Boyamaların gruplar arası karşılaştırılması, iki araştırmacı tarafından çift kör olarak yapıldı.

3.2.2.1 Primer Antikor Uygulaması

3.2.2.1.1 SARS-CoV-2

Monoklonal Anti-SARS-CoV-2 nükleokapsid protein antikoru (ab271180, [EPR24334-118], Abcam, ABD), mide dokusunda virüsün tespit edilmesi için ile 1:100 dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletildi.

3.2.1.1.2 Apoptoz

Monoklonal bölünmüş-kaspaz-3 antikoru (NB100-56708, [31A1067], Novus Biologicals, ABD), apoptoz hücre ölüm yolağının tespiti için 14 µg/ml dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletildi.

3.2.1.1.3 Piroptoz

Poliklonal Gasdermin D antikoru (PA5-116815, Invitrogen, ABD), piroptoz hücre ölüm yolağının tespiti için 14 µg/ml dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletildi.

3.2.1.1.4 Nekroptoz

Monoklonal MLKL (p Ser345) antikoru (NBP2-66953, Novus Biologicals, ABD), nekroptoz hücre ölüm yolağının tespiti için 14 µg/ml dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletildi.

3.2.1.1.5 Galektin-3

Monoklonal Galektin-3 antikoru, midedeki Galektin-3 proteinin tespiti için 12 µg/ml dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletilmiştir. (NB300-538, [A3A12], Novus Biologicals, ABD)

3.3 Elektron Mikroskobik İnceleme

1 mm^3 büyüklüğündeki mide doku örnekleri, %2,5 gluteraldehit ile hazırlanmış fiksatifte 4 saat süreyle +4ºC'de bekletildi. Doku takibine başlamadan önce örnekler, fosfat

tamponlu salin çözeltisine alındı. +4ºC'de %1'lik osmik asitle 1 saat süreyle sekonder fiksasyonu yapılan doku örnekleri, PBS ile yıkandı. Ardından +4ºC'de %1'lik uranil asetatta 1 saat bekletildi. PBS ile tekrar yıkandı. Oda ısısında karıştırılarak, sırasıyla yükselen alkol serisinden (%70, %90, %96, %100) geçirildi ve 10 dk süreyle geçiş maddesi olan propilen oksitte bekledildi. Daha sonra çeşitli oranlarda (1:1, 1:3) propilen oksit epon (Epon 812, Sigma Aldrich, ABD) karışımlarında 1'er saat bekletildi. Saf eponda 1 saat bekleme sonrası kapsüllere gömme işlemi uygulandı. Doku örneği içeren kapsüller 60ºC etüve konarak 18 saatte polimerize edildi. Polimerleşen ve blok haline getirilen doku örneklerinde, blok trim cihazı (Leica, EM TRIM2, Almanya) kullanılarak, kesit yüzeyi açıldı. Elmas bıçak ile ultramikrotom (Leica, EM UC7, Almanya) kullanılarak ince (60-90 nm kalınlığında) kesitler alındı. Su havuzuna alınan kesitler, formvar kaplı bakır gridler üzerine aktarılıp kapalı petriler içinde kurutuldu. Dokular TEM (Jem 1011, JEOL, ABD) ile inceleme için hazır hale getirildi. İnceleme sırasında kontrol ve SARS-CoV-2 grubu arasındaki karşılaştırma, iki araştırmacı tarafından gözlemsel olarak yapıldı. Hücrelerin genel morfolojisi ve hücre içi meydana gelen değişiklikler incelendi.

3.4 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için İstanbul Üniversitesi lisanslı programı Graphpad Prism 10.0.2 (GraphPad Software, San Diego, ABD) kullanıldı. Verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Toplam gastrik hasar, yüzey epiteli hasarı, birlikte değerlendirilen hemoraji veya fokal nekroz varlığı, glandüler hücre morfolojisinde bozulma, inflamatuar hücre infiltrasyonu ve kas hasarı skorlamalarında; apoptoz, piroptoz, nekroptoz ve Galektin-3'ün semikantitatif skorlamalarında, normal dağılım göstermeyen verilere Mann-Whitney U testi uygulandı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen veri grupları medyan ve IQR (çeyrekler açıklığı) olarak ifade edildi ve karşılaştırmalar Whiskers-Tukey grafikleri ile gösterildi.

3.5 Şematik Tasarım

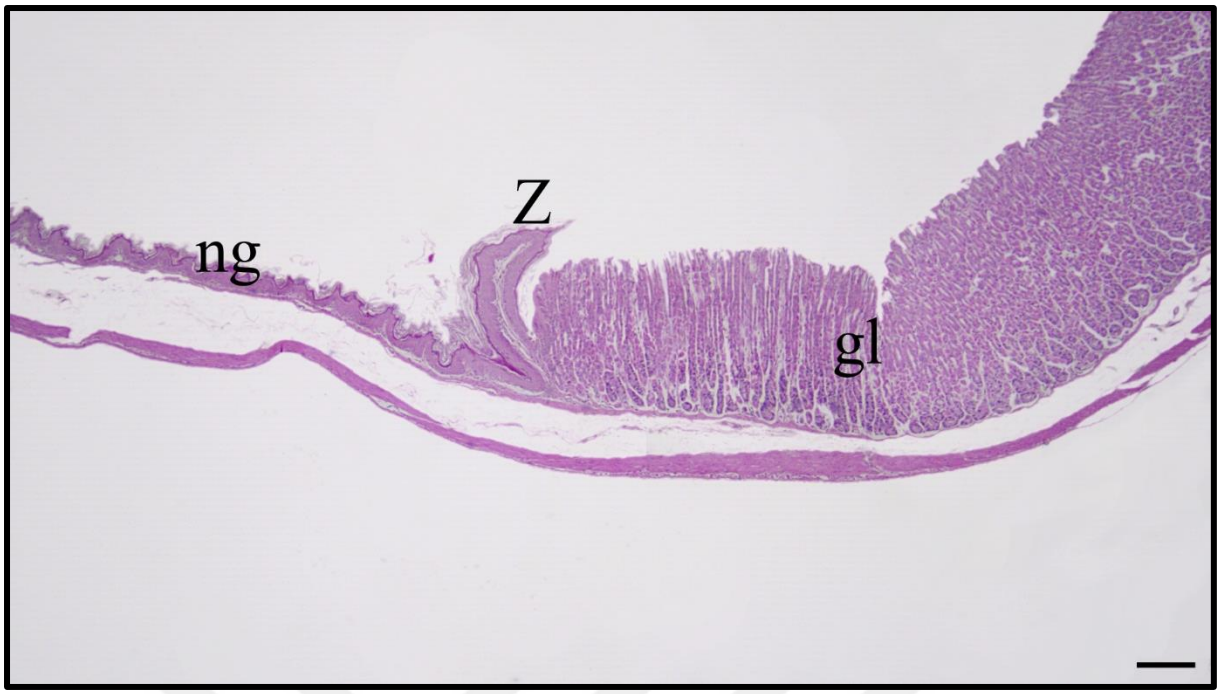
Şekil 2-1, Şekil 2-2 ve Şekil 5-1 görsel tasarım aracısı Biorender (Toronto, Kanada) ile ücretsiz sürüm dahilinde hazırlandı. Açık kaynak olarak kullanılabilen Şekil 2-1, ilgili kaynaktan modifiye edildi (106).

4. BULGULAR

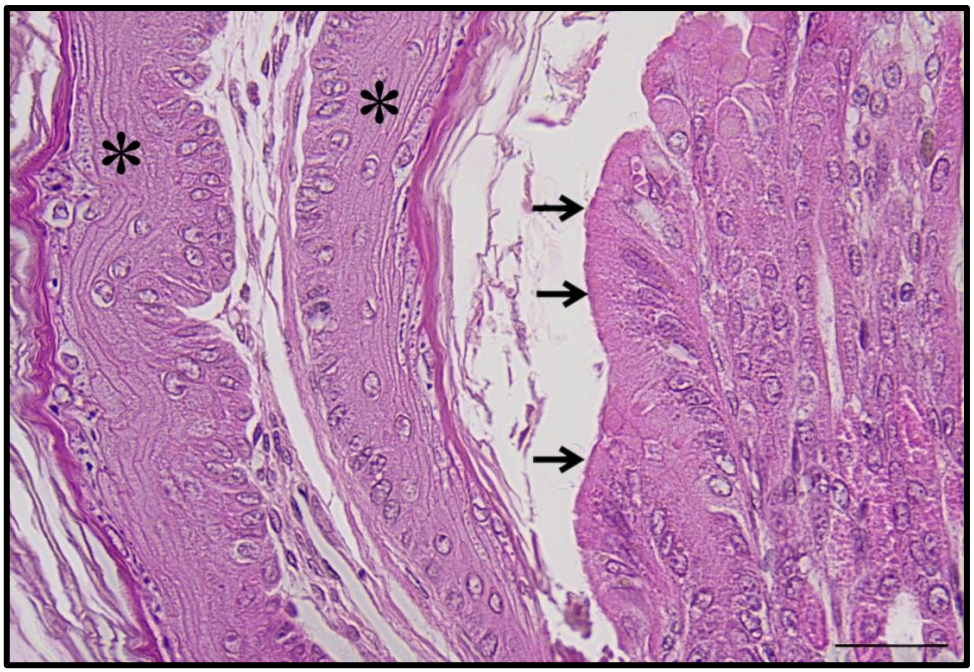
4.1 Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait Hematoksilen-Eozin boyalı preparatlar incelendiğinde, glandüler ve nonglandüler olmak üzere her iki mukoza tabakası ayırt edilebilmiştir. Glandüler tarafta bütünlüğü korunmuş tek katlı prizmatik epitel ile gastrik bezlerle dolu mukozada, parietal hücreler ve esas hücreler izlenmiştir. Lamina propriada bağ doku elemanlarına rastlanmıştır. Ayrıca muskularis mukoza normal olarak gözlenmiştir. Glandüler ve nonglandüler mukoza geçişinde plika sınırı (Z çizgisi) görülmüştür. Nonglandüler mukozada keratinleşmiş çok katlı yassı epitel gözlenmiştir. Submukoza ile tunika muskularis olağan görünümde izlenmiştir (Şekil 4-1, Şekil 4-2, Şekil 4-3).

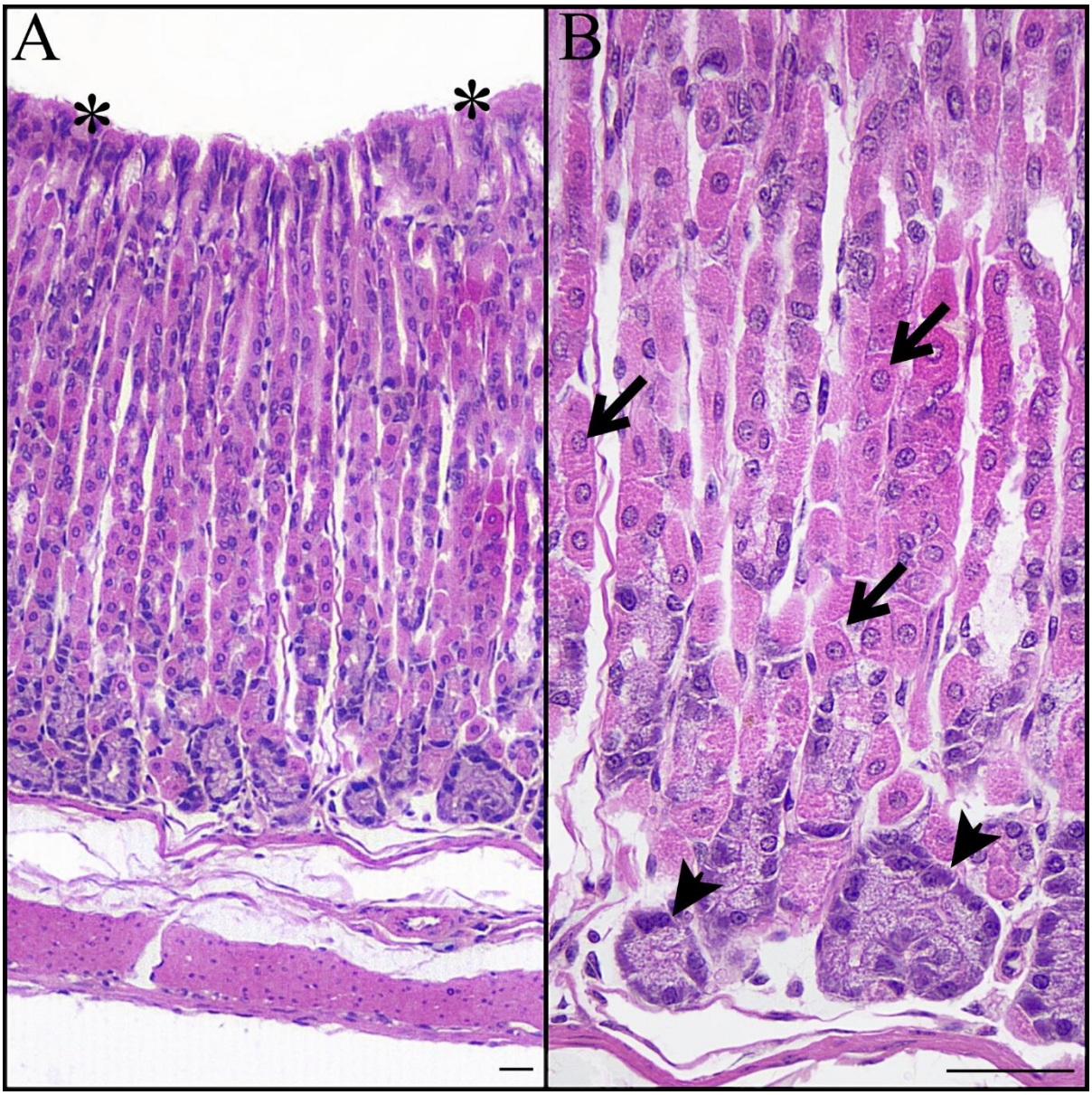
SARS-CoV-2 grubu incelendiğinde, nonglandüler mukoza bütünlüğünün korunmuş olduğu ancak glandüler mukozada hasar varlığı gözlenmiştir. Gastrik yüzey epitelinde yer yer dökülme görülmüştür (Şekil 4-4). Epitel hasarı arttıkça doku bütünlüğünde de kayıp izlenmiştir ve interstisyumda genişleme gözlenmiştir (Şekil 4-5). Epitel bütünlüğü korunsa da dokunun genelinde hasar görülürken, lümene yakın alanlarda konjesyonlu damarlara ve hidropik dejenerasyon gözlenen hücrelere rastlanmıştır (Şekil 4-6, Şekil 4-7). Lümene bakan yüzde piknotik nüveli hücreler görülmüştür (Şekil 4-8). SARS-CoV-2 grubunda ek olarak, örnekler arasında değişken seviyelerde olmak üzere subepitelyal lenfositik hücre infiltrasyonu ve ödem gözlenirken, yer yer serbest eritrositlere rastlanmıştır (Şekil 4-9). Kas dokuda sitoplazmada vakuolizasyon görülmüştür (Şekil 4-10).



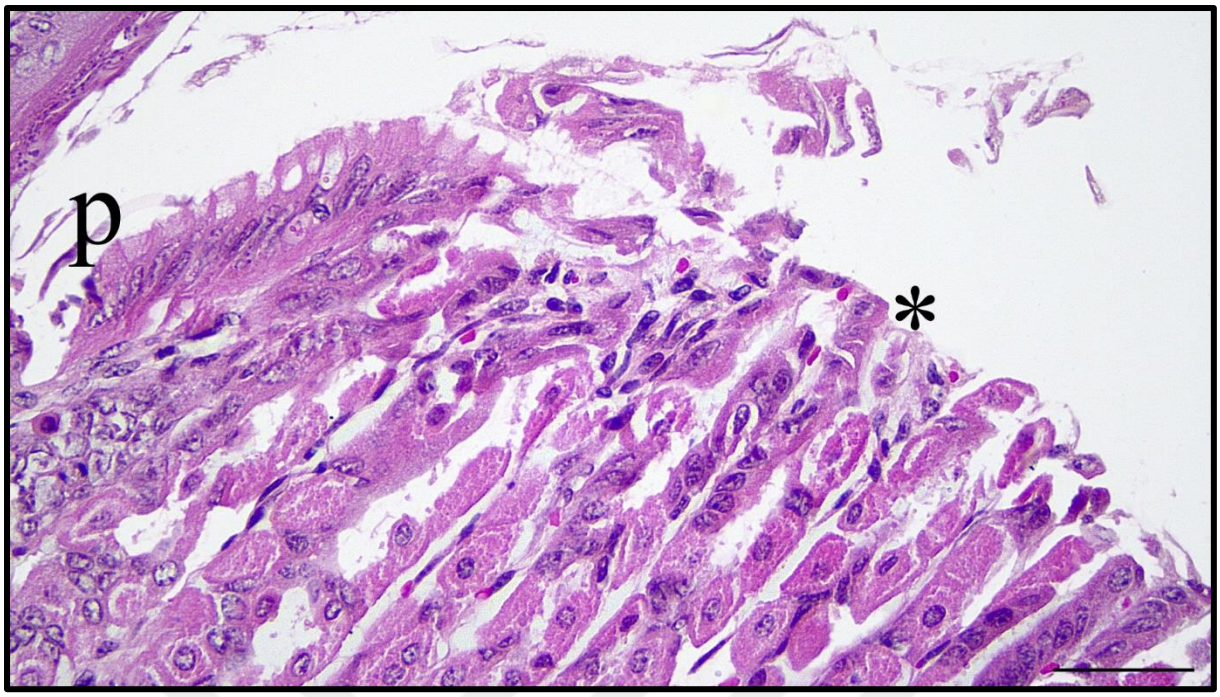
Şekil 4- 1. Kontrol grubunda genel histolojik yapı. Ön mideye ait nonglandüler mukoza (ng) ve midenin glandüler mukozası (gl) izlenmektedir. Submukoza ve tunika muskularis olağan görünümdedir. Z çizgisi (Z) seçilmektedir ve glandüler mukozada gastrik çukurcuklar ile bez yapıları izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 4X. Ölçek 200 µm.



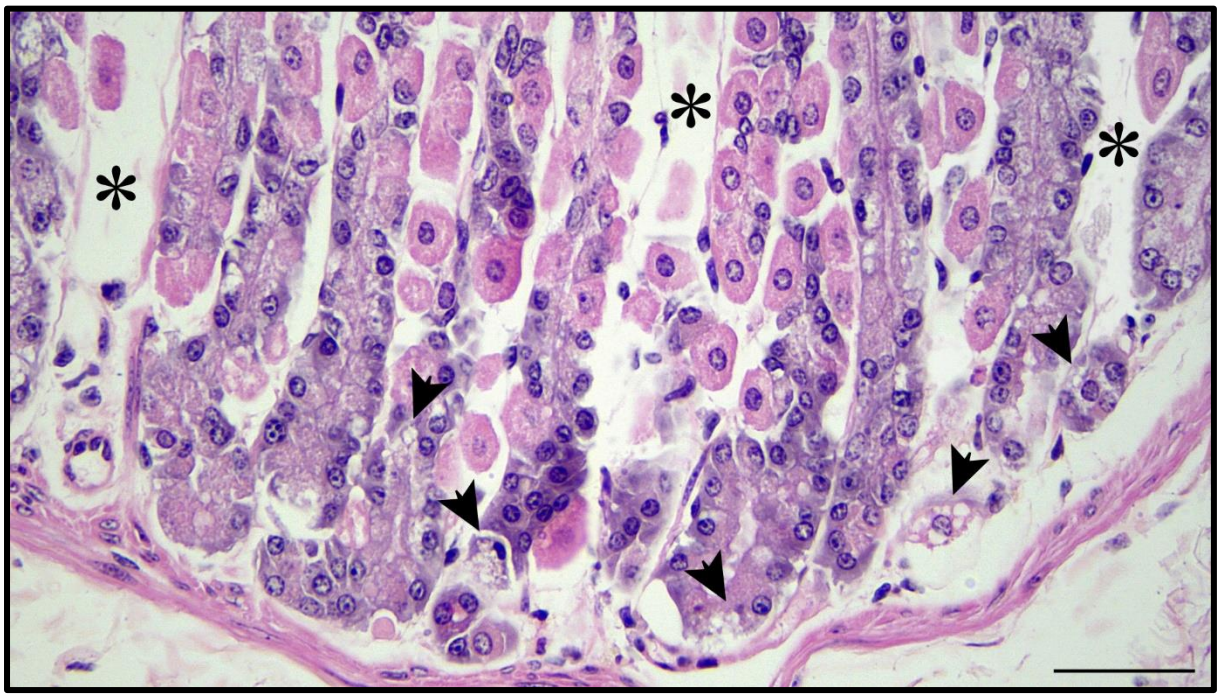
Şekil 4- 2. Kontrol grubunda yüzey epiteli. Fareye ait, insandan farklı olarak, ön midenin keratinize olmuş çok katlı yassı epiteli (asterisk) ve glandüler mukozanın tek katlı prizmatik yüzey epiteli (ok) normal görünümdedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



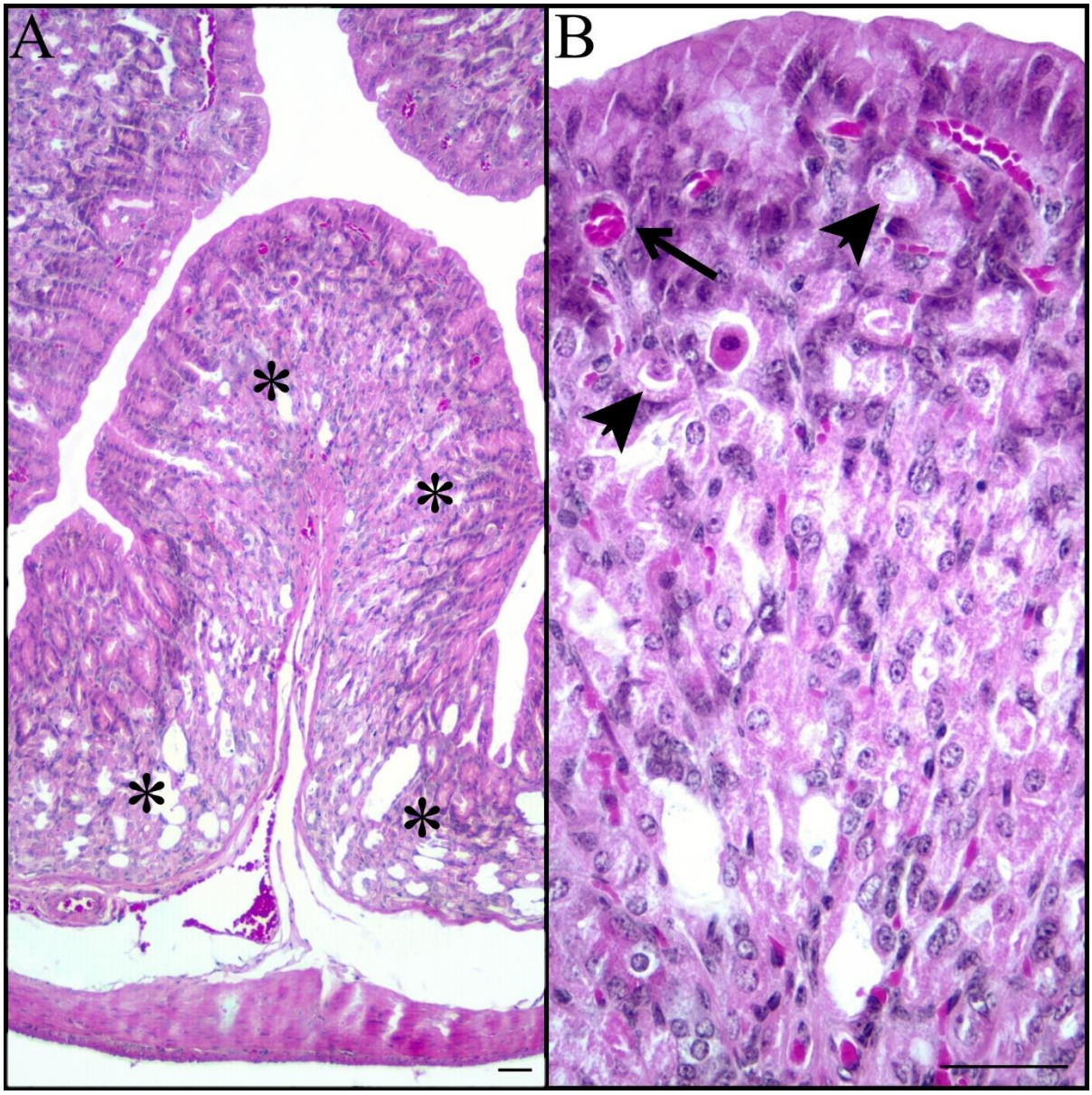
Şekil 4- 3. Kontrol grubunda fundus bezleri. A. Yüzey müköz hücreleri (asterisk) lümene bakan tarafta izlenmektedir. B. Gastrik bezlerin boyun kısmında eozinofilik sitoplazmalı parietal hücreler (ok) ve bazale yakın yerleşim gösteren esas hücre topluluğu (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm.



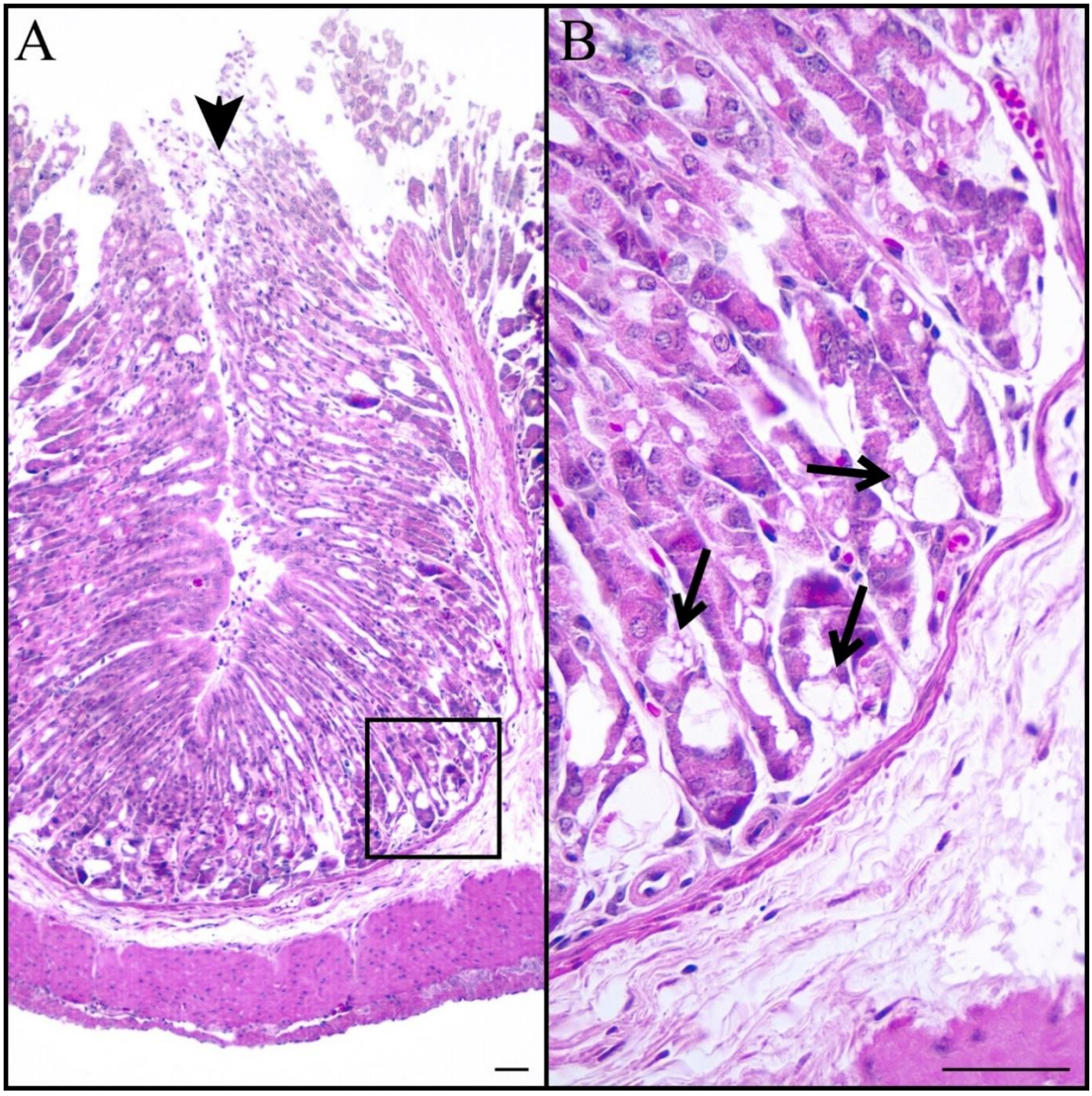
Şekil 4- 4. SARS-CoV-2 grubunda epitelde dökülme. SARS-CoV-2 grubunda kardiya bölgesinde yüzey epitelinde (p) dökülme (asterisk) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



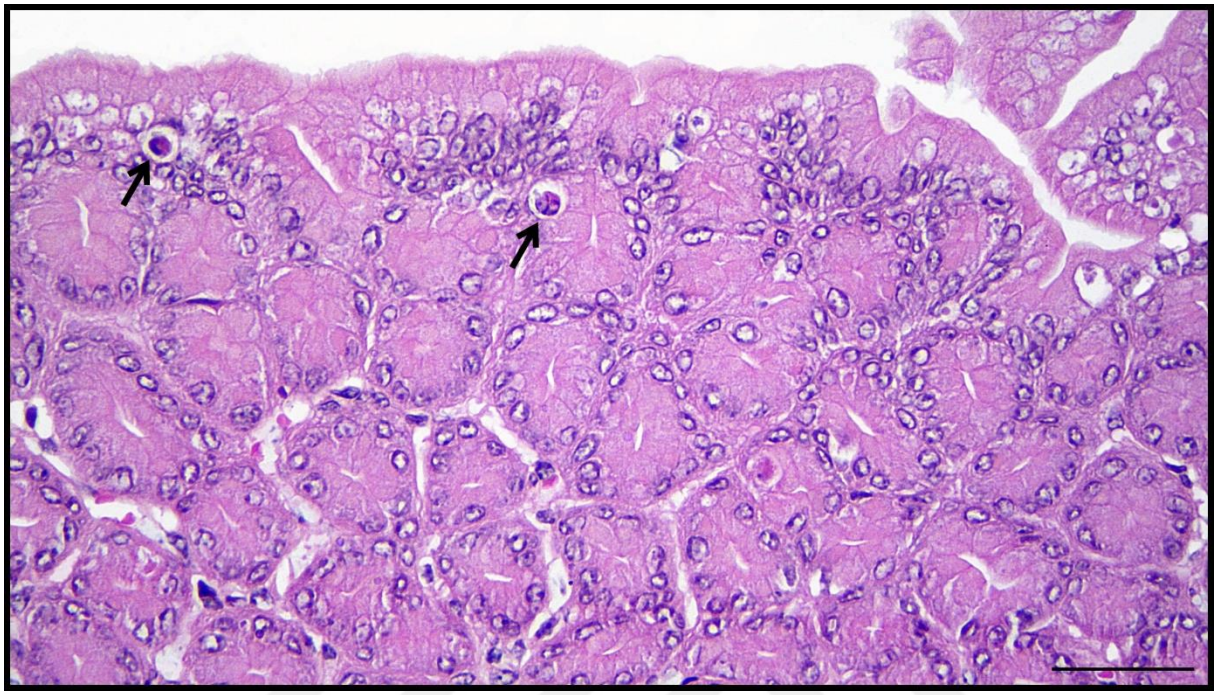
Şekil 4- 5. SARS-CoV-2 grubunda glandüler hücre morfolojisinde bozulma. Fundus bezlerinde glandüler hücreler arası alanda genişleme ve ödem (asterisk) izlenmektedir. Glandüler hücrelerde sitoplazmik vakuoller (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



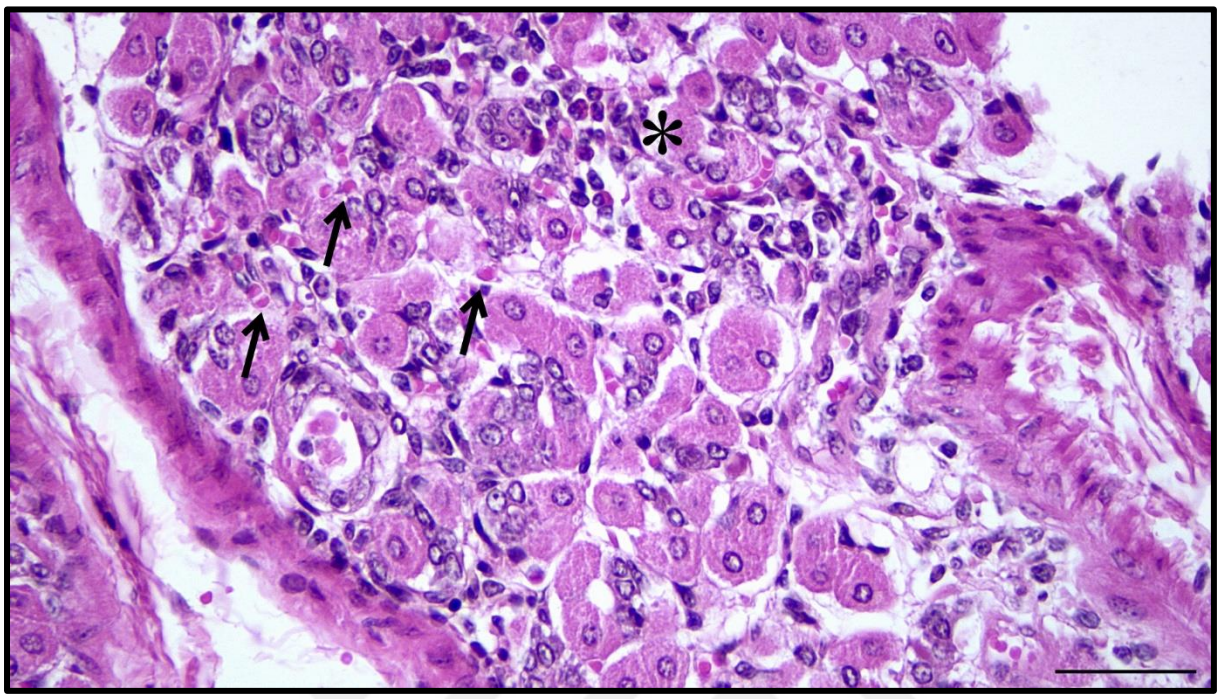
Şekil 4- 6. SARS-CoV-2 grubunda doku hasarı. A. Epitel bütünlüğünün korunduğu görülürken, yer yer hasarlı alanlara (asterisk) rastlanmıştır. B. Lümene yakın kısımlarda damarda konjesyon (ok) ve hidropik dejenerasyon gözlenen glandüler hücreler (ok başı) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm.



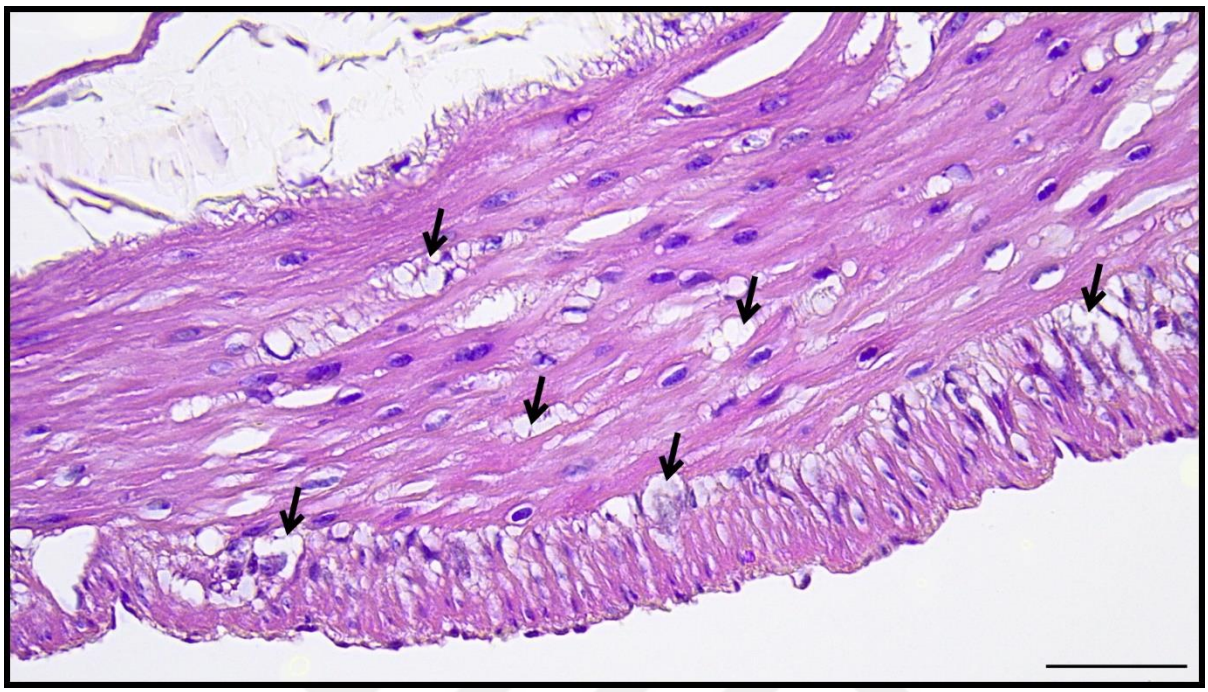
Şekil 4- 7. SARS-CoV-2 grubunda doku hasarı. A. Epitel dokunun tamamında hasar izlenmektedir. Lümene bakan yüzey epitelinde bütünlüğün bozulduğu (ok başı) görülmektedir. B. Gastrik bezlerin bazalindeki hücrelerin sitoplazmalarında belirgin olmak üzere dokunun tamamında vakuolizasyon (ok) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektifler: 10X, 40X. Ölçek: 50 µm.



Şekil 4- 8. SARS-CoV-2 grubunda doku hasarı. Epitel bütünlüğünün korunduğu görülürken piknotik nüveli hücreler (ok) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.

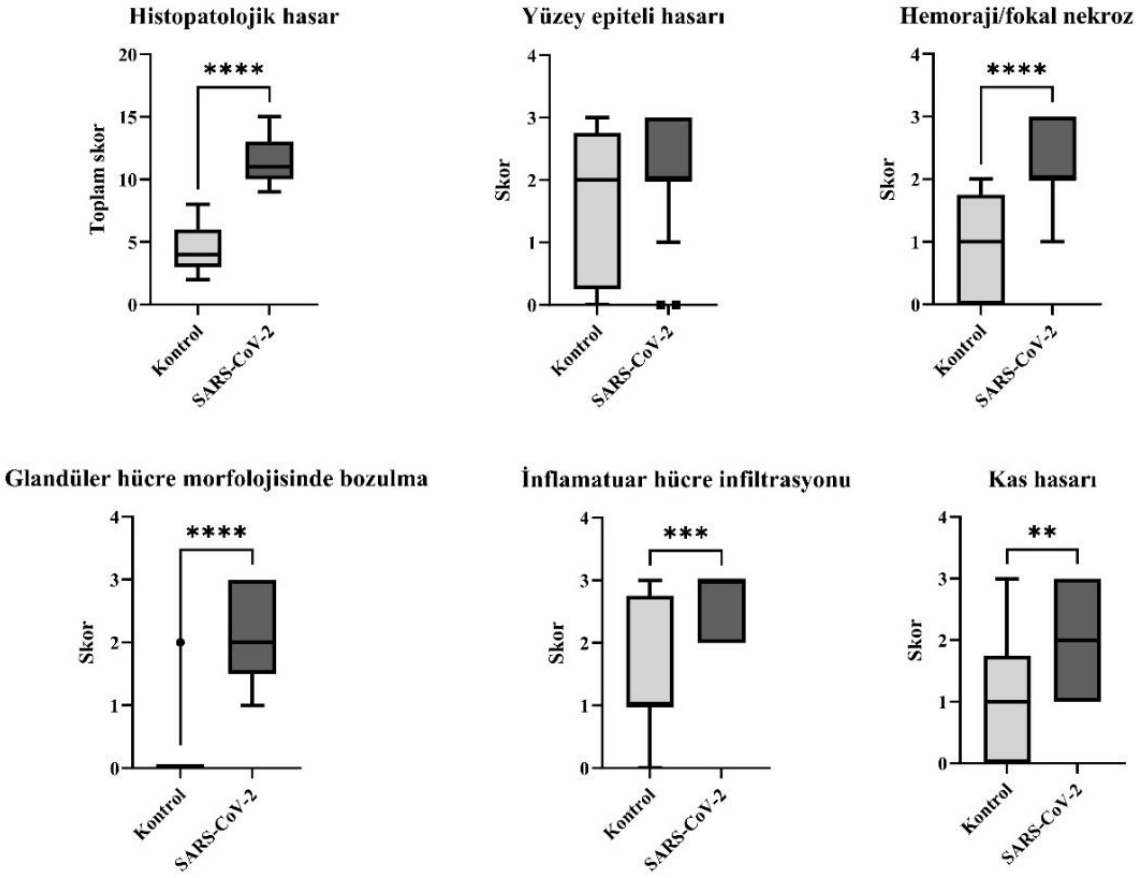


Şekil 4- 9. SARS-CoV-2 grubunda inflamasyon. Subepitelyal alanda lenfositten zengin hücre infiltrasyonu (asterisk) ve ödem görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



Şekil 4- 10. SARS-CoV-2 grubunda kas hasarı. Tunika muskulariste longitudinal ve sirküler uzanım gösteren kas hücrelerinde vakuolizasyon (ok) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.

Histopatolojik hasarın skorlaması yapıldığında, her değerlendirme kriterine göre veriler incelenmiş ve normal dağılım göstermemiştir. Toplam gastrik hasar skoru, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($p<0,0001$) ve SARS-CoV-2 grubunda hasar, kontrol grubuna göre yüksektir. Yüzey epiteli hasarı değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.22$) ancak mikroskobik değerlendirmede SARS-CoV-2 grubunda epitel hasarı daha geniş yüzey boyunca izlenmiştir. Hemoraji veya fokal nekroz varlığı skorlamada birlikte değerlendirilmiş olup, SARS-CoV-2 grubunda yüksektir ($p<0,0001$). Her iki grup arasında glandüler hücre morfolojisinde bozulma, anlamlı fark göstermiştir ($p<0,0001$). İnflamatuar hücre infiltrasyonu SARS-CoV-2 grubunda daha yüksektir ($p=0,0008$). Kas hasarı karşılaştırıldığında, hasarın SARS-CoV-2 grubunda daha fazla olduğu görülmüştür ($p=0,008$) (Şekil 4-11). Histopatolojik hasar skorlamaları Tablo 4- 1'de sunulmuştur.



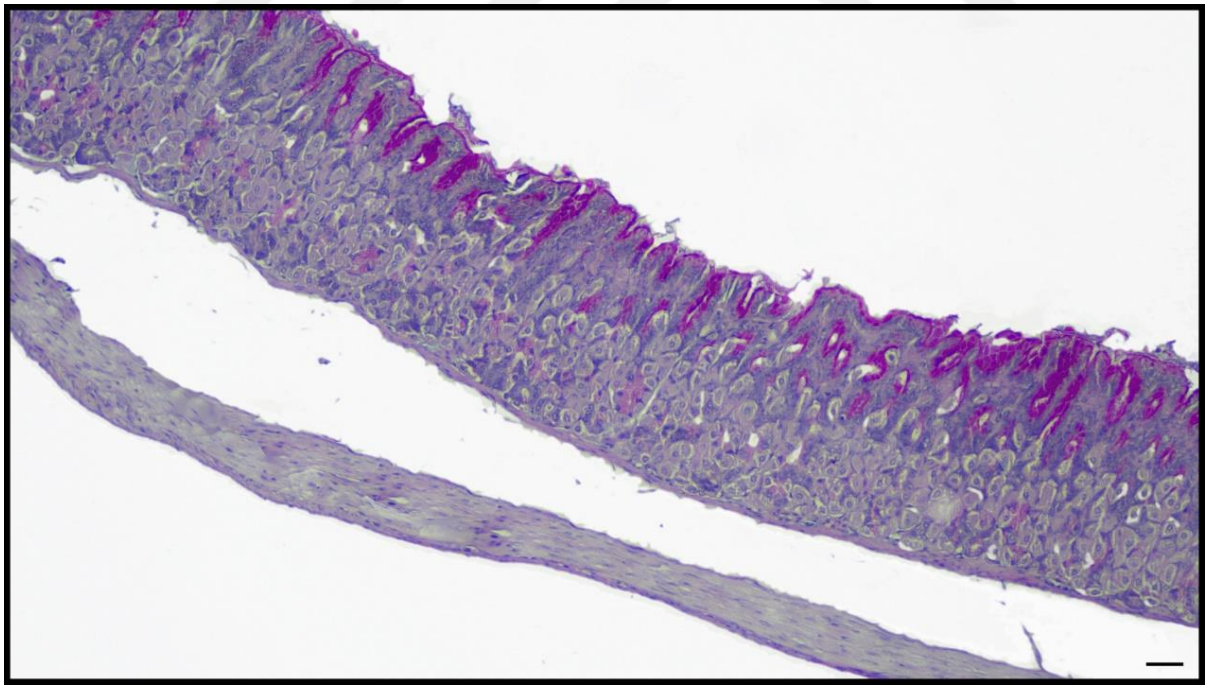
Şekil 4- 11. Histopatolojik hasarın istatistiksel değerlendirmesi. Anlamlı farklılık düzeyleri (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (* p<0.05, ** p<0.008, *** p<0.0008, **** p<0.0001)

Tablo 4- 1. Histopatolojik hasar skorlamaları

İstatistiksel değerler	Toplam skor		Epitel hasarı		Hemoraji veya fokal nekroz		Glandüler hücre morfolojisinde bozulma		İnflamatuar hücre infiltrasyonu		Kas hasarı	
	Kontrol	SARS-CoV-2	Kontrol	SARS-CoV-2	Kontrol	SARS-CoV-2	Kontrol	SARS-CoV-2	Kontrol	SARS-CoV-2	Kontrol	SARS-CoV-2
Minimum	2	9	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1
Birinci çeyrek	3	10	0,25	2	0	2	0	1,5	1	2	0	1
Medyan	4	11	2	2	1	2	0	2	1	3	1	2
Üçüncü çeyrek	6	13	2,75	3	1,75	3	0	3	2,75	3	1,75	3
Maksimum	8	15	3	3	2	3	2	3	3	3	3	3
IQR	6	6	3	3	2	2	2	2	3	1	3	2
Ortalama	4,533	11,6	1,563	2,059	0,9375	2,412	0,125	2,059	1,5	2,706	0,9375	1,882

Kontrol grubuna ait nötral müsinlerin boyanma paterni incelendiğinde, epitel devamlılığı ile uyumlu belirgin PAS pozitif reaksiyon gösteren alanlar saptanmıştır. SARS-CoV-2 grubuna ait doku örneklerinde epitel bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte PAS pozitif reaksiyon kaybı gözlenmiştir (Şekil 4-12, Şekil 4-13).

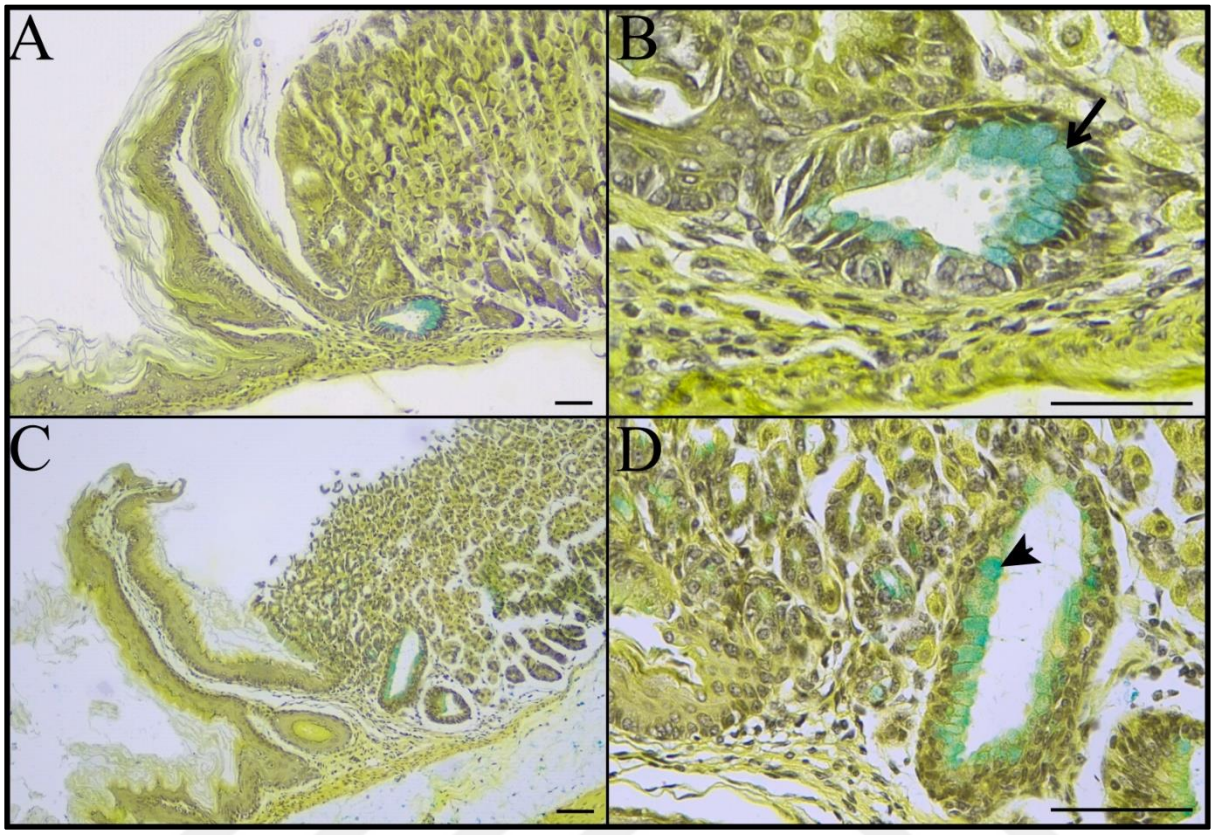
Asidik müsinler değerlendirildiğinde, her iki grupta da kardiya bölgesinde asidik müsinlere rastlanmıştır (Şekil 4-14). Kontrol grubunda pilorda, esas hücre topluluklarının arasında asidik müsinler görülürken, SARS-CoV-2 grubunda pilorik bölgede asidik müsinler daha az izlenmektedir (Şekil 4-15).



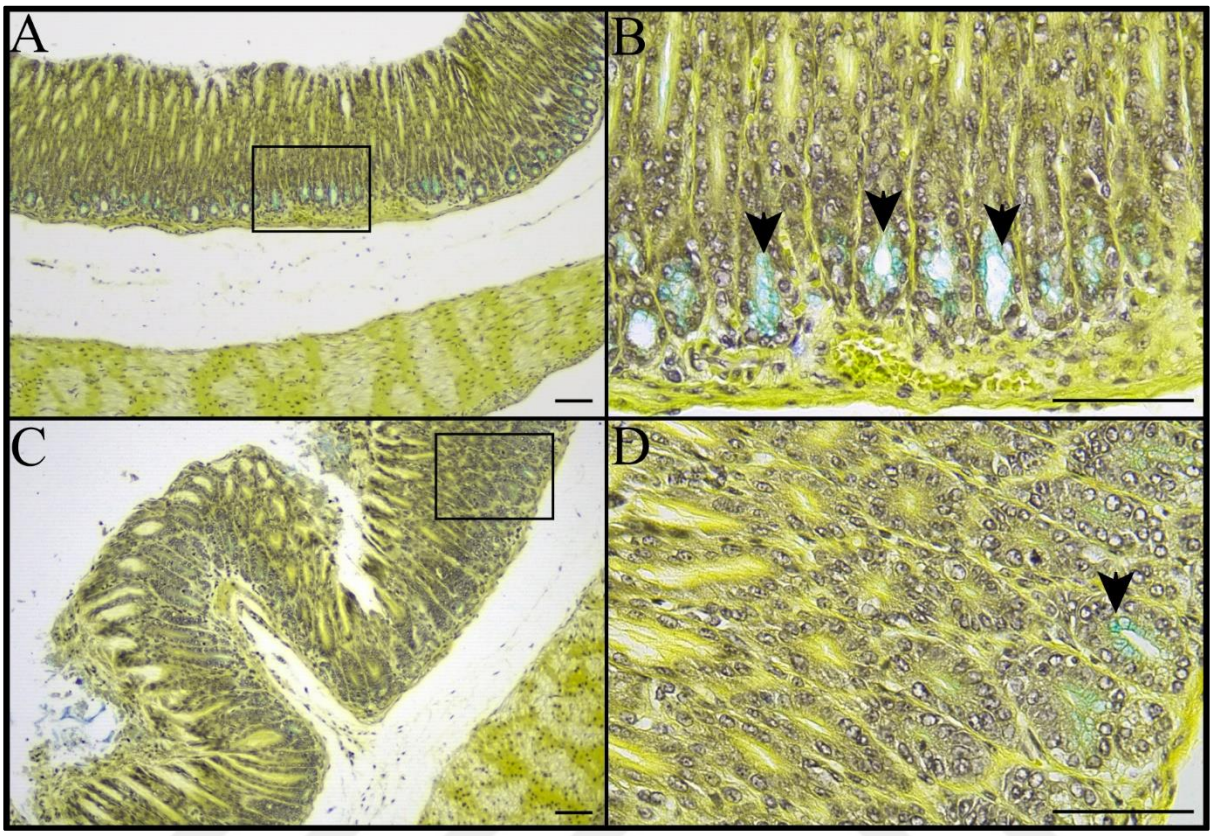
Şekil 4- 12. Kontrol grubunda nötral müsinler. Epitel bütünlüğünün korunduğu ve lümene bakan yüzey boyunca, apikal sitoplazmada devamlı PAS pozitif reaksiyon izlenmektedir. PAS. Objektif 10X. Ölçek 50 μm.



Şekil 4- 13. SARS-CoV-2 grubunda nötral müsinler. SARS-CoV-2 grubunda epitel hasarının olduğu bölgelerde (asterisk), nötral müsinlerin kaybı nedeniyle PAS pozitif reaksiyonun olmadığı nötral müsinlerin kaybı görülmektedir. PAS. Objektif 10X. Ölçek 50 µm.



Şekil 4- 14. Kardiya bölgesinde asidik müsinler. A, B. Kontrol grubunda asidik müsinler (ok) mavi görülmektedir. C, D. SARS-CoV-2 grubunda mavi-yeşil görünümde asidik müsinler (ok başı) izlenmektedir. Alsiyan mavisi-Tartrazin. Objektifler: A ve C 10X, B ve D 40X. Ölçek 50 µm.

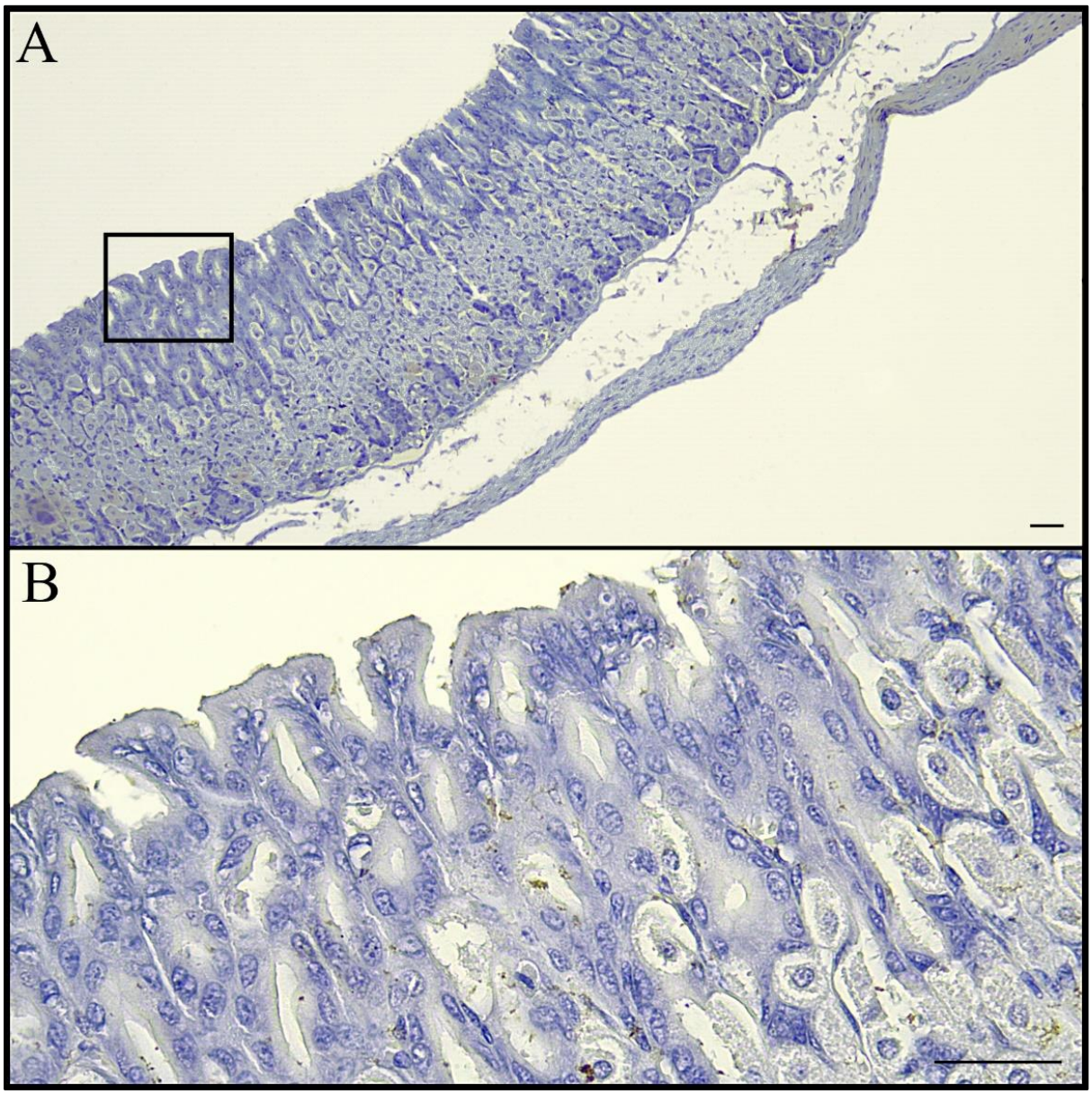


Şekil 4- 15. Pilor bölgesinde asidik müsinler. A, B. Kontrol grubunda pilorik bölgede gastrik epitel bazalinde asidik müsinler (ok başı) görülmektedir. C, D. SARS-CoV-2 grubunda pilorik bölgeye yakın alanlarda asidik müsinler (ok başı) daha az izlenmektedir. Alsiyan mavisi-Tartrazin. Objektifler: A ve C 10X, B ve D 40X. Ölçek 50 µm.

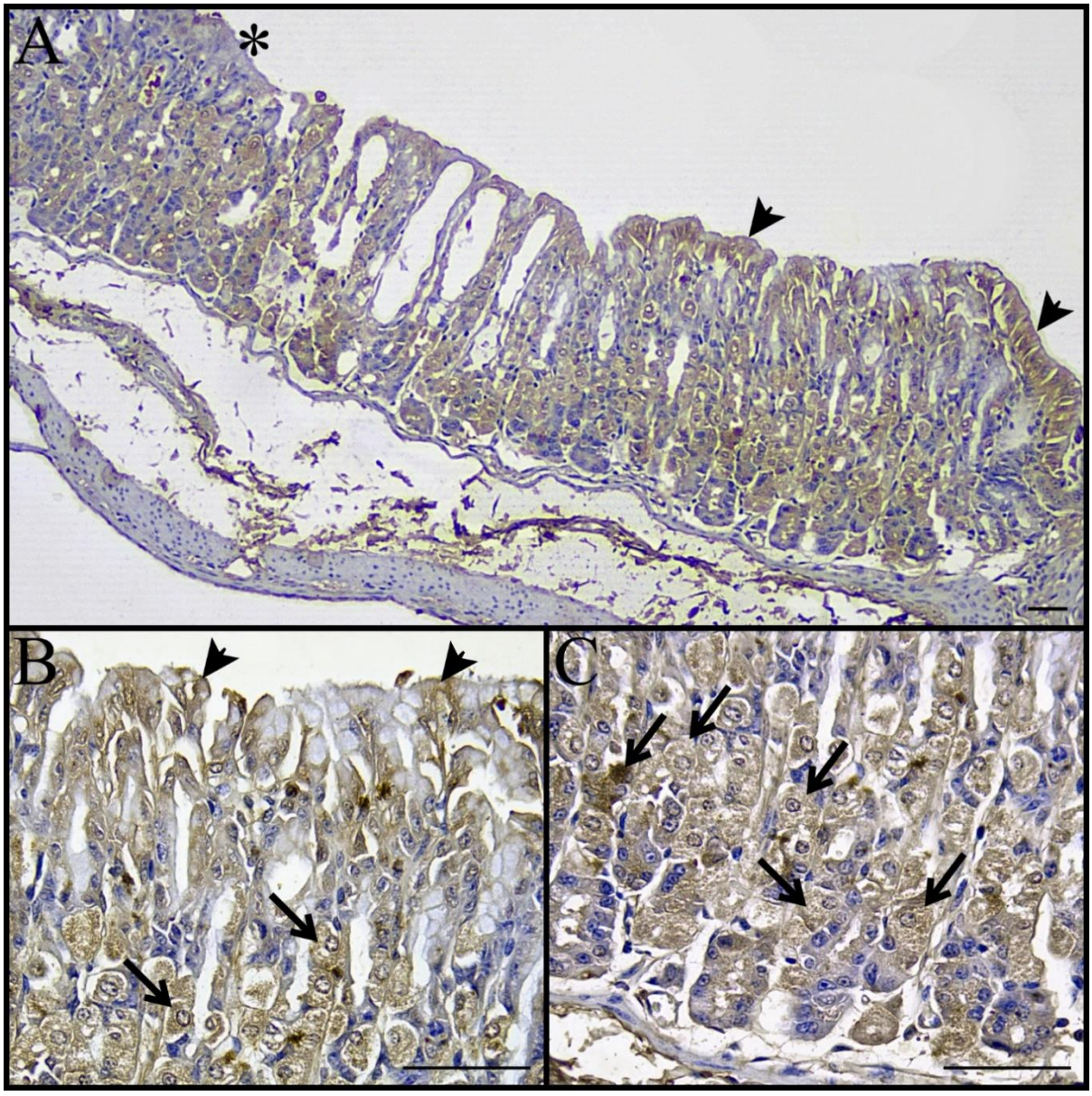
4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1 SARS-CoV-2

Viral nükleokapsid immünohistokimyasal boyaması, SARS-CoV-2 grubuna ait mide dokusunda SARS-CoV-2 için karakteristik parçalı boyanma paterninde, parietal hücreler daha belirgin olmak üzere tüm yüzey epiteli boyunca SARS-CoV-2 pozitif immünoreaktivite görülmüştür. (Şekil 4-16, Şekil 4-17).



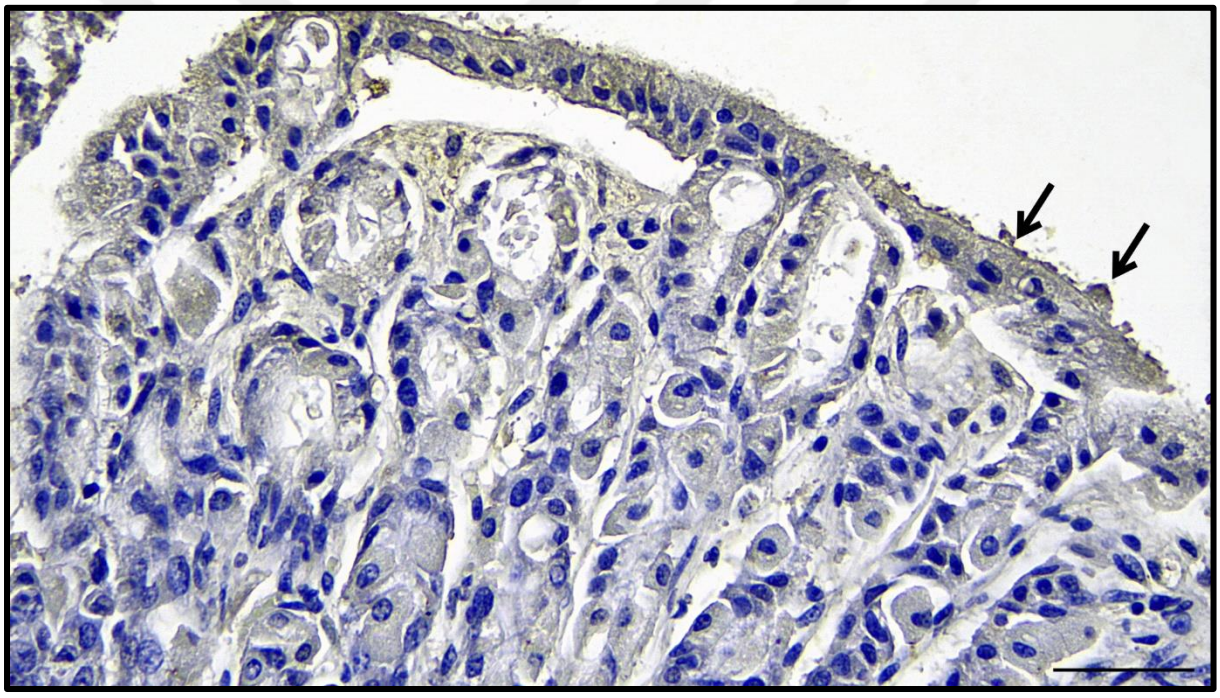
Şekil 4- 16. Kontrol grubunda SARS-CoV-2 nükleokapsid immünohistokimyasal boyaması. A. Fundus bezlerinde, organın geri kalan kısmına benzer şekilde, SARS-CoV-2 pozitifliği izlenmemiştir. B. Yüzey epiteli boyunca immünoreaktivite görülmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm.



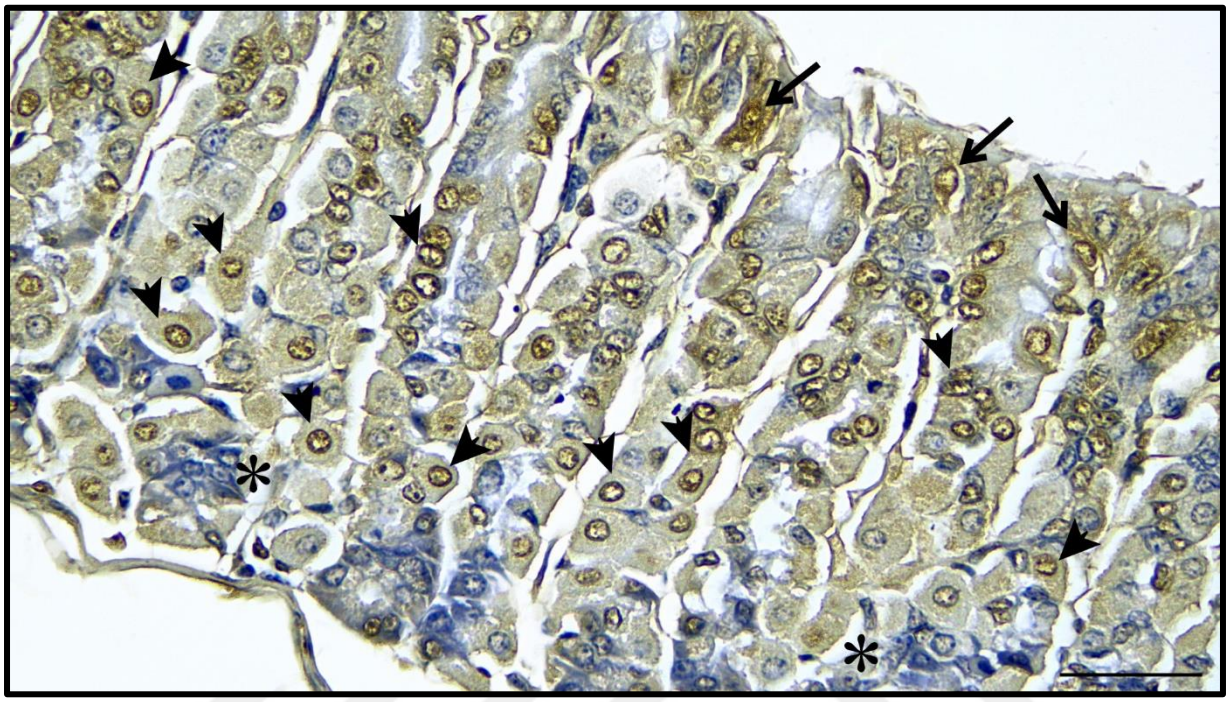
Şekil 4- 17. SARS-CoV-2 grubunda SARS-CoV-2 nükleokapsid immünohistokimyasal boyaması. A, B. Mide fundus bezlerinde yüzey epitelinde SARS-CoV-2 pozitifliği izlenmektedir. SARS-CoV-2 pozitif alanlar (ok başı) ve pozitif olmayan (asterisk) alanlar ile boyun kısmındaki parietal hücrelerde SARS-CoV-2 pozitifliği (ok) görülmektedir. C. Bazale yakın yerleşimli parietal hücrelerin tamamı SARS-CoV-2 pozitif (ok) izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektifler: A 10X, B ve C 40X. Ölçek 50 µm.

4.2.2 Apoptoz

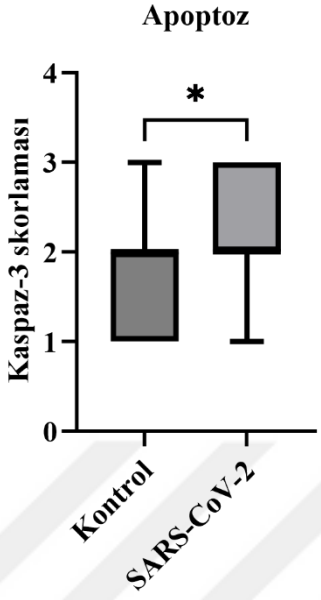
Apoptozun immünohistokimyasal değerlendirmesinde; kontrol grubunda yüzey epitelinde ayrışma olan alanlarda hafif kaspaz-3 pozitifliği gözlenirken, SARS-CoV-2 grubunda gastrik mukoza boyunca orta ve şiddetli pozitif immünorekativite izlenmiştir (Şekil 4-18, Şekil 4-19). Kaspaz-3, semikantitatif değerlendirilmiştir. Veriler normal dağılım göstermemektir. Apoptoz açısından gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ve SARS-CoV-2 grubunda apoptozun daha fazla olduğu görülmüştür (*p=0,0279*) (Şekil 4-20).



Şekil 4- 18. Kontrol grubunda kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen apoptoz. Kontrol grubunda yüzey epitelinde yer yer hafif (ok) kaspaz-3 pozitifliği izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm.



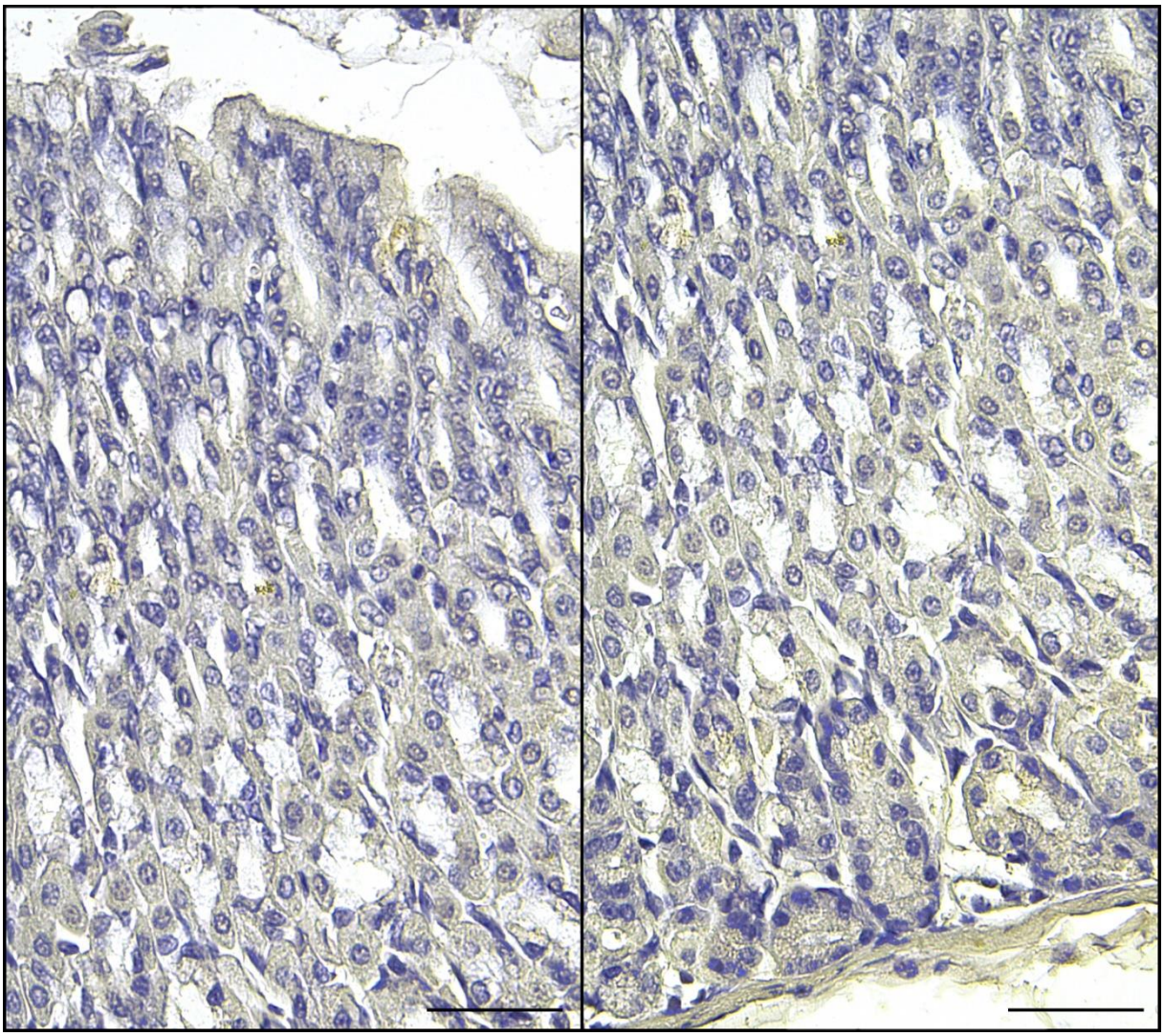
Şekil 4- 19. SARS-CoV-2 grubunda kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen apoptoz. SARS-CoV-2 grubunda epitel bütünlüğü korunmuş alanlarda değişken şiddette kaspaz-3 pozitifliği izlenmektedir. Yüzey müköz hücrelerde şiddetli (ok) ve parietal hücrelerde orta şiddette (ok başı) pozitif immünoreaktivite görülmüştür. Mukozanın bazalinde yerleşim gösteren esas hücrelerde immünorekativite (asterisk) görülmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



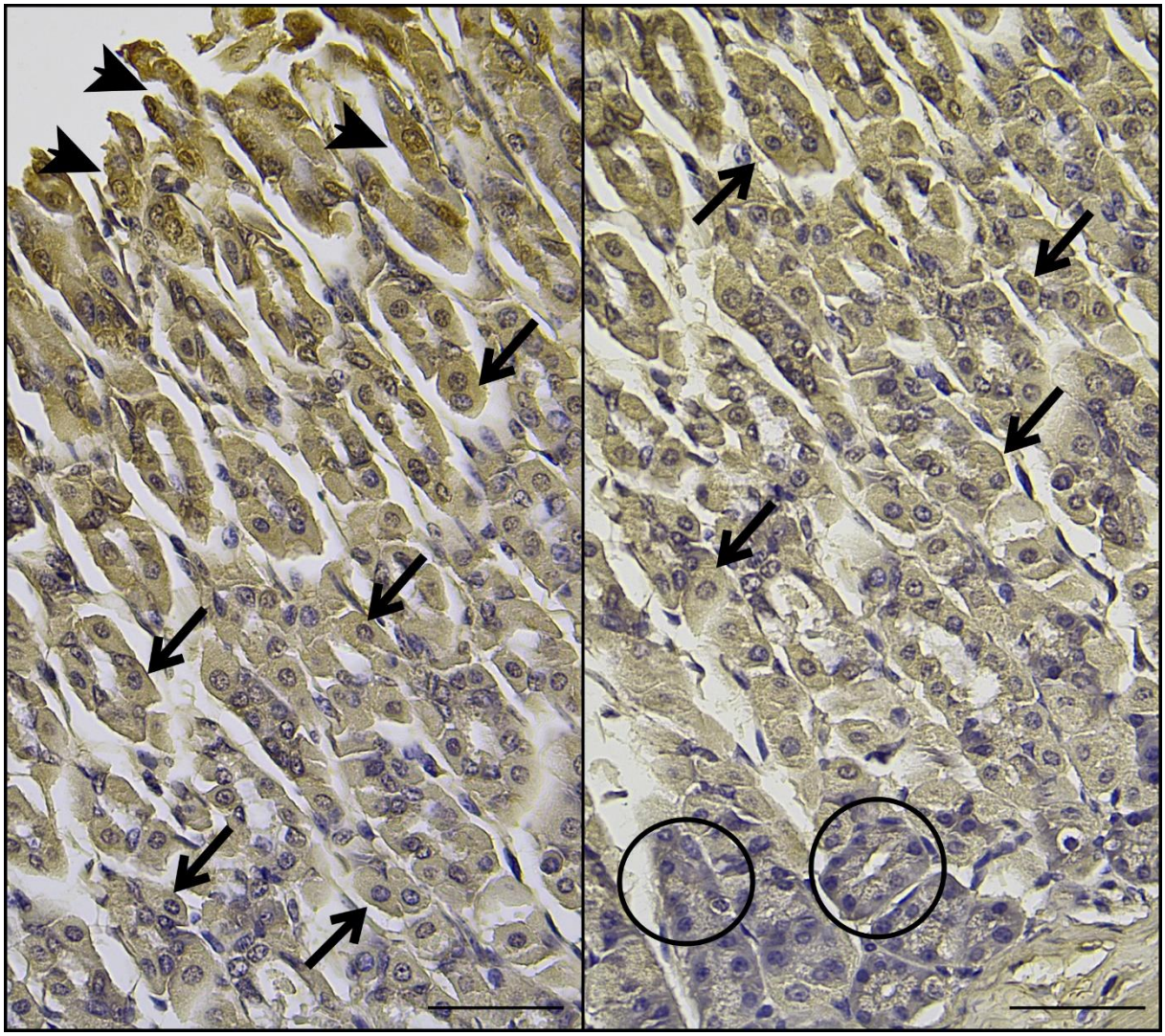
Şekil 4- 20. Apoptoz skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (* $p<0.05$)

4.2.3 Piroptoz

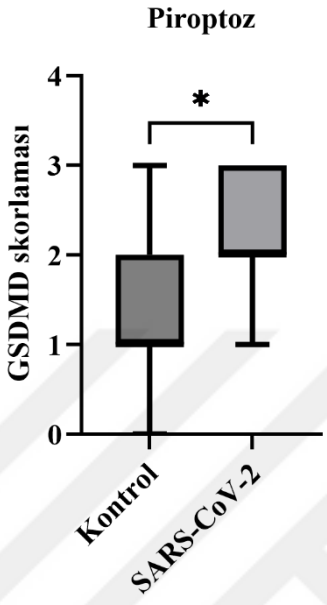
Piroptozun immünohistokimyasal değerlendirmesinde, kontrol grubunda Gasdermin D ile immünoreaktivite görülmemiştir. SARS-CoV-2 grubunda epitel yüzeyinde yoğun olmak üzere gastrik mukozanın iç kısımlarına uzanan, değişken şiddette Gasdermin D pozitifliği görülmüştür (Şekil 4-21, Şekil 4-22). Gasdermin D semikantitatif değerlendirilmiştir. Veriler normal dağılım göstermemektir. Piroptoz açısından gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ve SARS-CoV-2 grubunda piroptozun daha fazla olduğu görülmüştür ($p=0,0265$) (Şekil 4-23).



Şekil 4- 21. Kontrol grubunda Gasdermin D immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen piroptoz. Gasdermin D ile doku genelinde immünoreaktivite izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



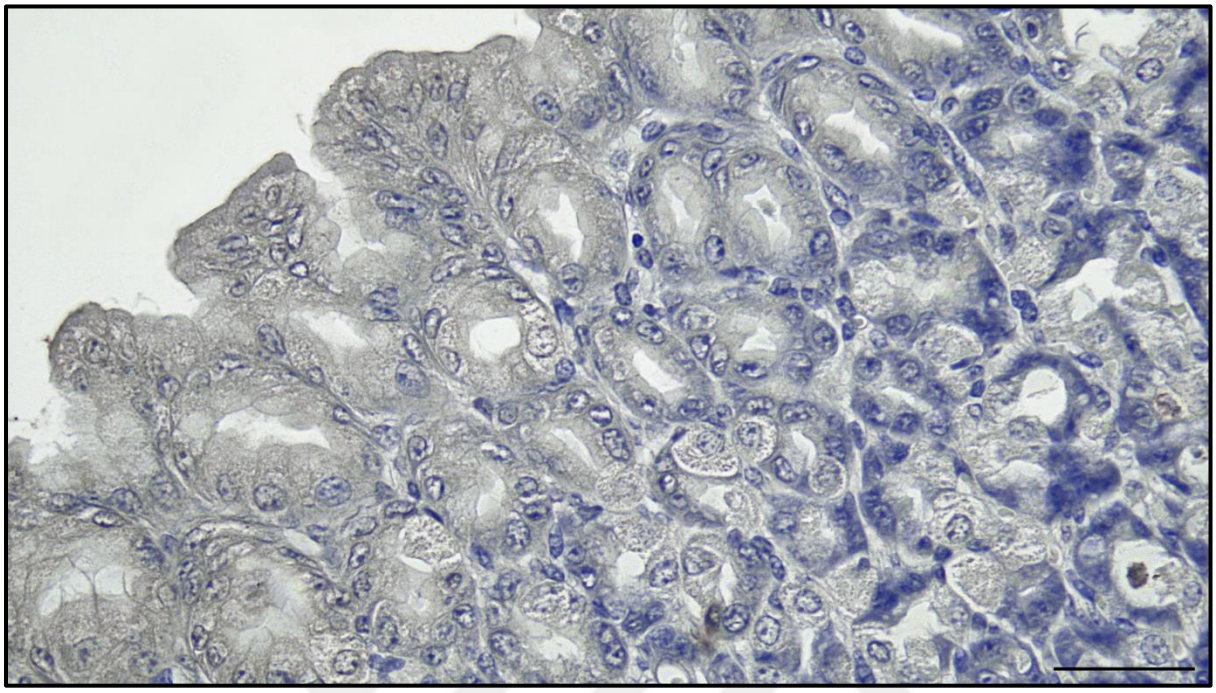
Şekil 4- 22. SARS-CoV-2 grubunda Gasdermin D immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen piroptoz. Gasdermin D ile yapılan boyamada epitelin lümene bakan yüzde Gasdermin D pozitifliği daha şiddetliyken (ok başı), bezin iç kısımlarında parietal hücrelerde orta şiddette pozitif immünoreaktivite (ok) görülmektedir. Gastrik bezlerin bazalinde esas hücrelerde yer yer hafif Gasdermin D pozitifliği (daire) izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



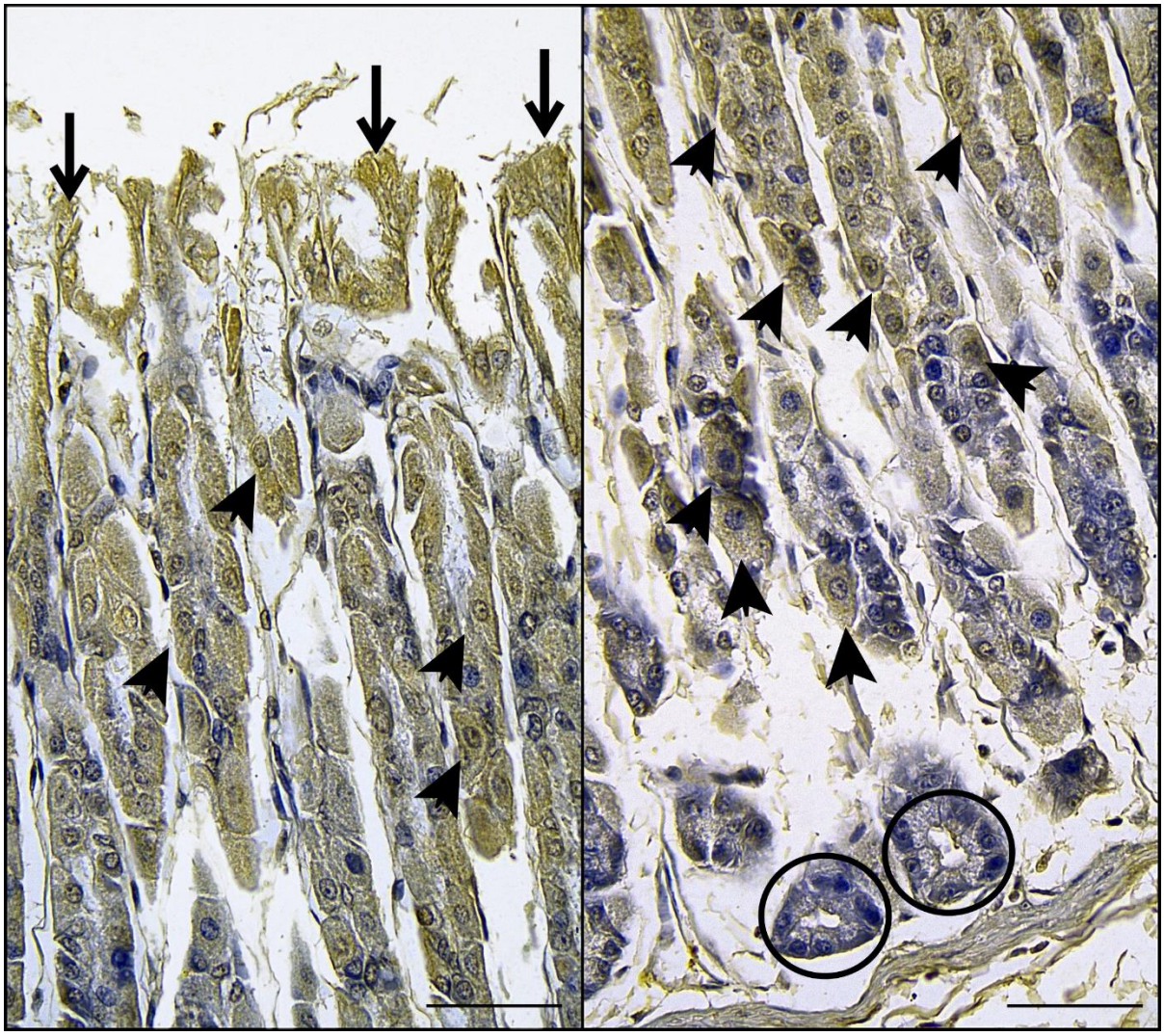
Şekil 4- 23. Piroptoz skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (* *p<0.05*) (GSDMD: Gasdermin D)

4.2.4 Nekroptoz

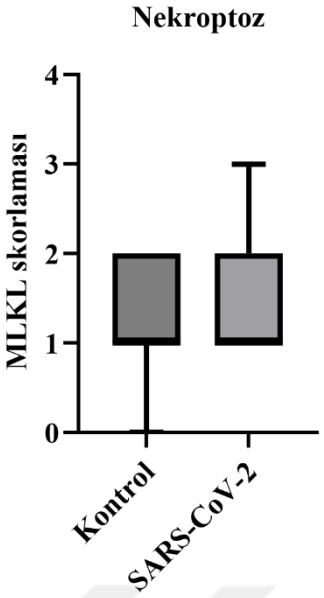
Nekroptozun immünohistokimyasal değerlendirmesinde; kontrol grubunda genel olarak immünoreaktivite görülmezken birkaç örnekte nadiren hafif MLKL pozitifliği izlenmiştir. SARS-CoV-2 grubunda yüzey epitelinde ve parietal hücrelerde, birkaç örnekte nadiren hafif de olsa, genel olarak orta ve şiddetli MLKL pozitif immünoreaktivite gözlenmiştir (Şekil 4-24, Şekil 4-25). MLKL semikantitatif değerlendirilmiştir. Veriler normal dağılım göstermemiştir. Nekroptoz açısından gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (*p=0,3926*) (Şekil 4-26).



Şekil 4- 24. Kontrol grubunda MLKL immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen nekroptoz. Mukoza boyunca nonspesifik hafif MLKL pozitifliği görülmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



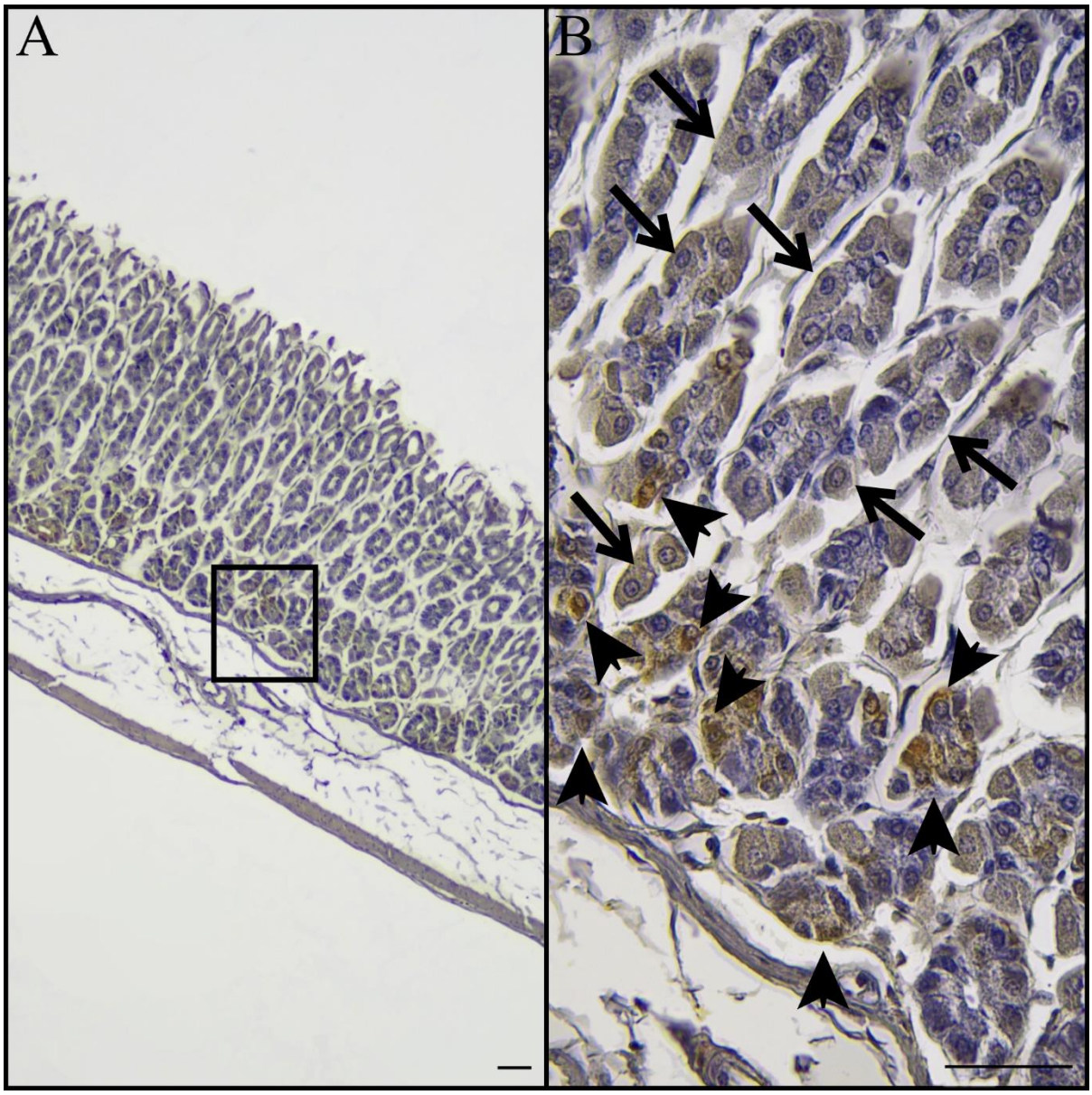
Şekil 4- 25. SARS-CoV-2 grubunda MLKL immünohistokimyasal boyaması ile gösterilen nekroptoz. Fundus bezlerinde yüzeyde ve mukozanın iç kısmında pozitif immünoreaktivite izlenmektedir. Yüzey müköz hücrelerinde (ok) MLKL pozitifliği görülmektedir. Parietal hücrelerde (ok başı) orta-şiddetli MLKL pozitifliği görülürken, esas hücrelerde (daire) immünorekativite görülmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



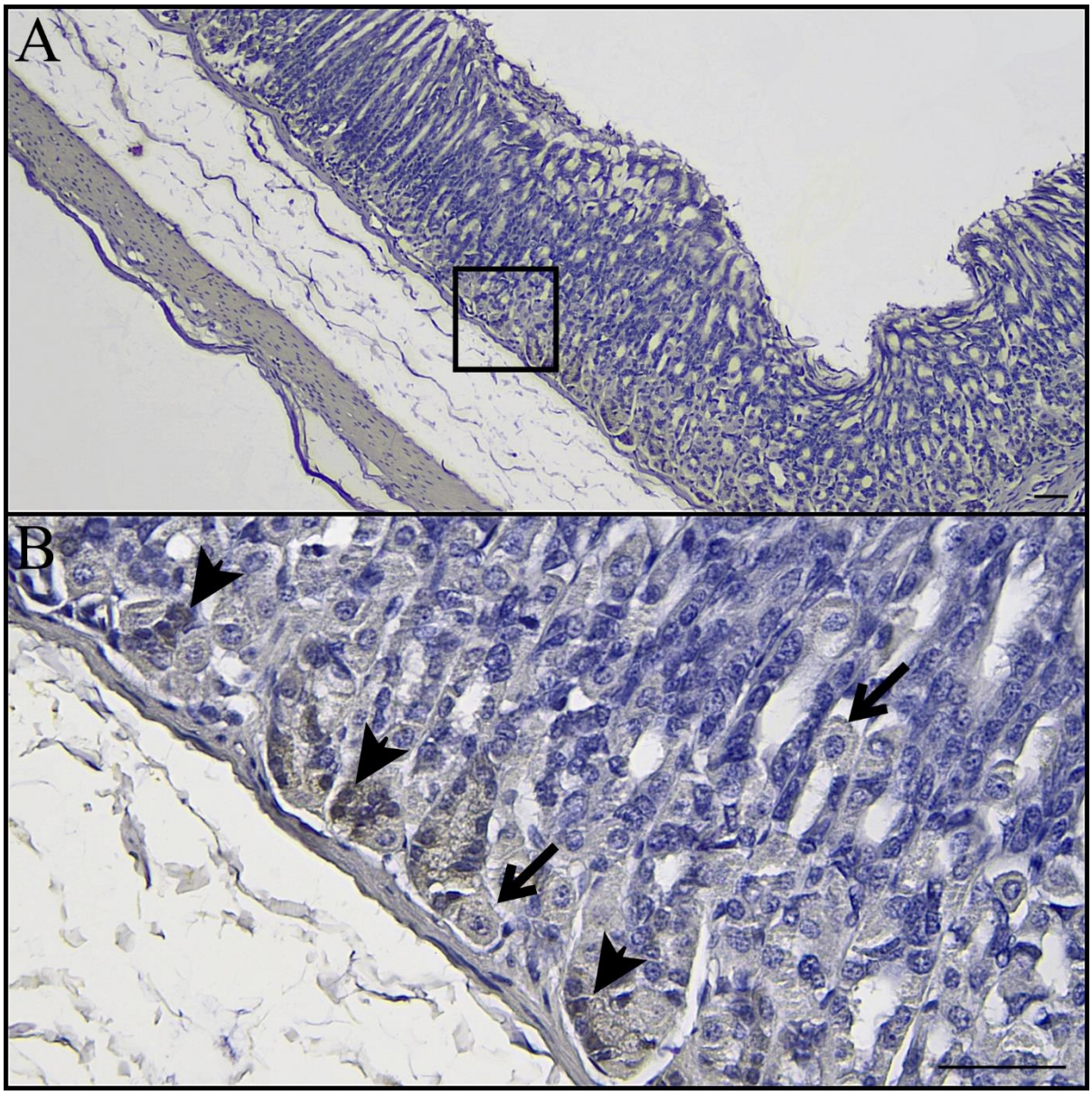
Şekil 4- 26. Nekroptozun skorlaması. Anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (*p=0,3926*)

4.2.5 Galektin-3

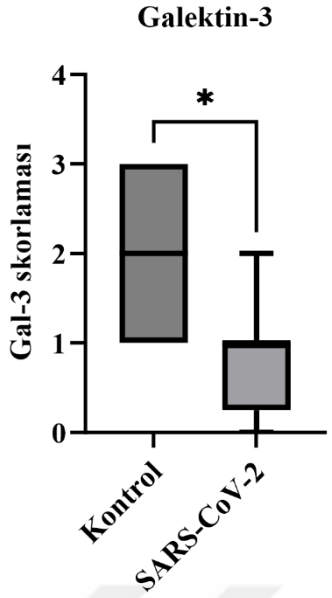
Galektin-3 pozitifliği; kontrol grubunda bazale yakın yerleşimli esas hücrelerde şiddetli, parietal hücrelerde orta şiddetli görülmüştür. SARS-CoV-2 grubunda nadiren esas hücrelerde hafif pozitif immünoreaktivite gözlenirken, parietal hücrelerde Galektin-3 pozitifliği görülmemiştir (Şekil 4-27, Şekil 4-28). Galektin-3 semikantitatif değerlendirilmiştir. Veriler normal dağılım göstermemektir. Gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ve Galektin-3'ün kontrol grubunda, SARS-CoV-2 grubuna kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (*p=0,0211*) (Şekil 4-29).



Şekil 4- 27. Kontrol grubunda Galektin-3 immünohistokimyasal boyaması. A. Bazale yakın yerleşim gösteren hücrelerde pozitif immünoreaktivite izlenmektedir. B. Parietal hücrelerde (ok) ve esas hücrelerde (ok başı) yer yer değişken şiddette Galektin- 3 pozitifliği görülmüştür. DAB-Hematoksilen. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm.



Şekil 4- 28. SARS-CoV-2 grubunda Galektin-3 immünohistokimyasal boyaması. A. Lümene bakan tarafta immünoreaktivite görülmezken, bazalde hafif Galektin-3 pozitifliği izlenmiştir. B. Birkaç esas hücre (ok başı) hafif pozitif immünoreaktivite gösterirken, parietal hücrelerde (ok) pozitiflik görülmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektifler: A 10X, B 40X. Ölçek 50 µm.



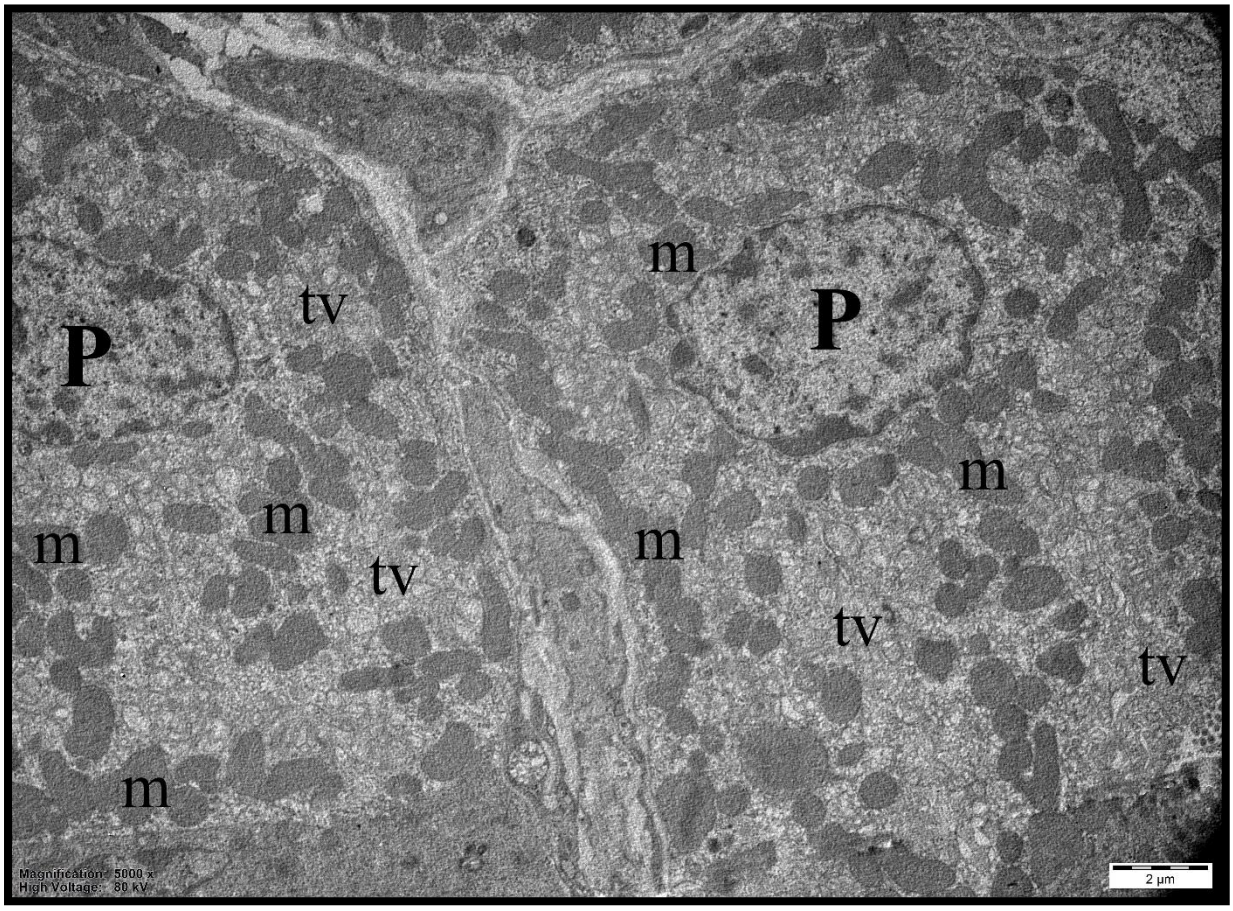
Şekil 4- 29. Galektin-3 skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (* $p<0.05$)

4.3 Elektron Mikroskobik Bulgular

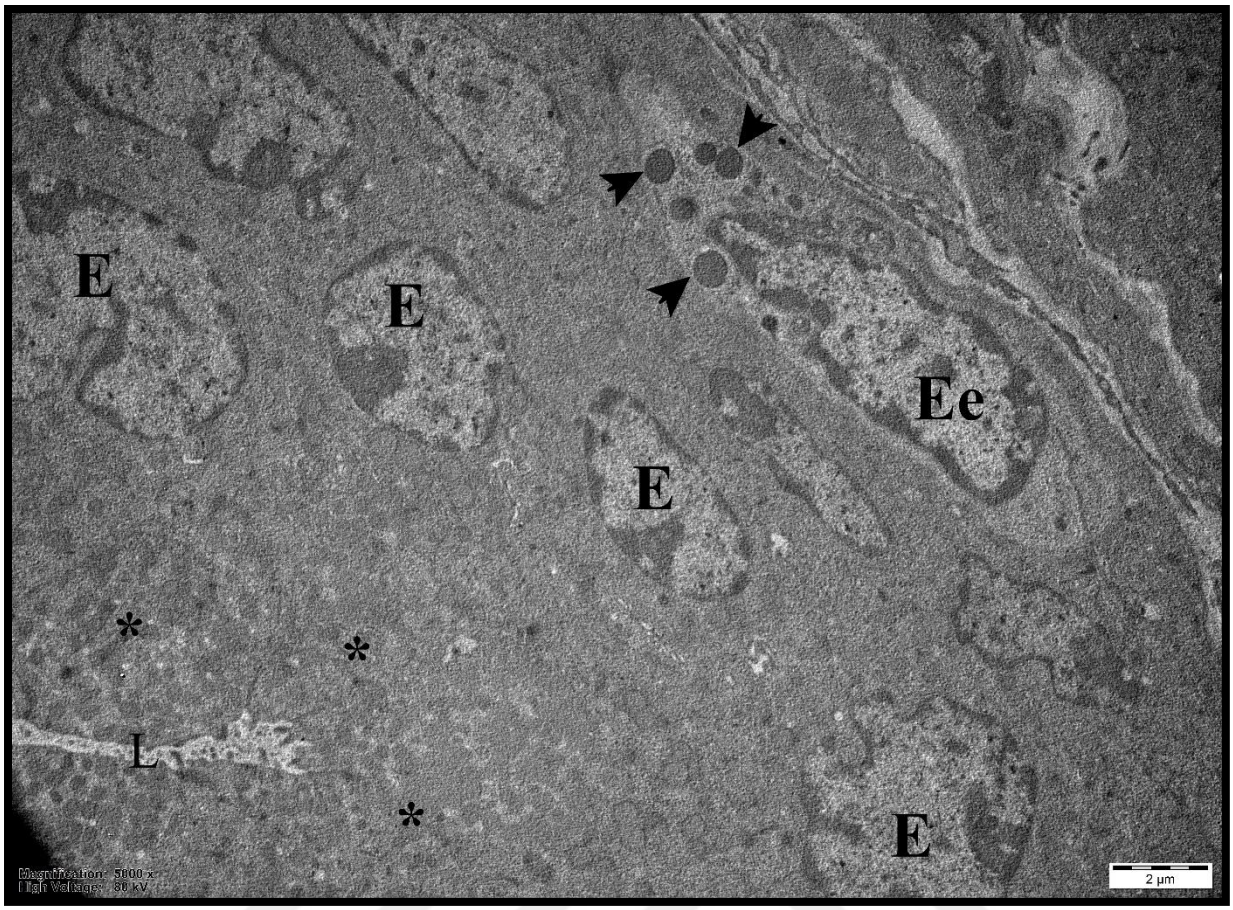
Her iki grupta glandüler mukozanın ultrastrüktürel yapısı incelenmiştir.

Kontrol grubunda parietal hücrelerde bol sayıda genişlemiş mitokondriler ve intakt görünümdeki hücre membranına dek uzanan tübülovezikül sistem görülmüştür (Şekil 4-30). Esas hücrelerin apikalinde zimojen granüller ve iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ağı izlenmiştir. Elektron yoğun boyanan salgı granülleri ile enteroendokrin hücreler görülmüştür (Şekil 4-31). Müköz hücrelerde, elektron geçirgen görünümde mukus izlenmiştir (Şekil 4-32).

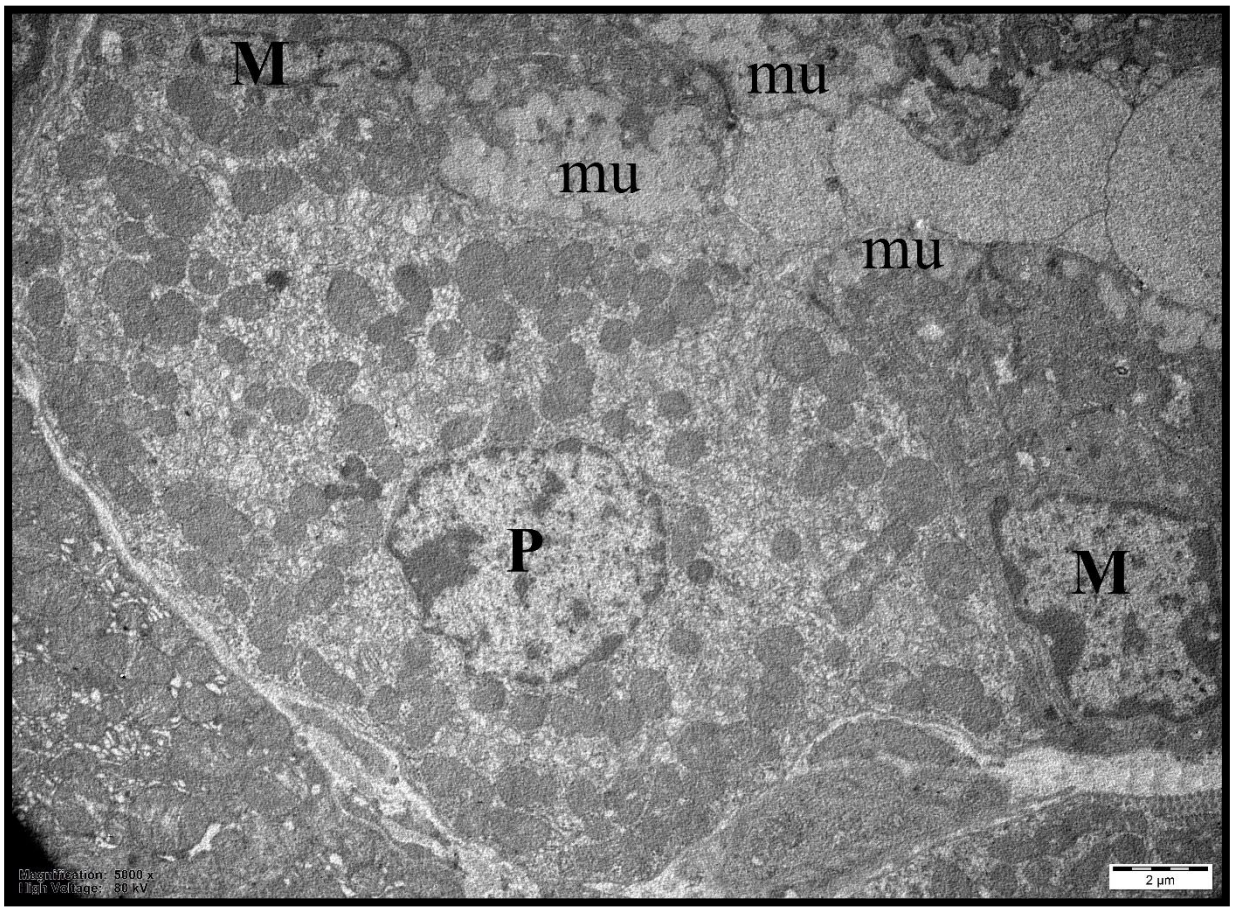
SARS-CoV-2 grubunda, piknotik nüveli birkaç parietal hücre görülmüştür (Şekil 4-33). Esas hücrelerde belirgin hasar görülmemiştir (Şekil 4-34). Hasarlı müköz hücrelere rastlanmıştır (Şekil 4-35). Enteroendokrin hücrelerde sayıca artmış elektron yoğun salgı granülleri izlenmiştir (Şekil 4-36). Hafif kondanse olmuş nükleusu ile hasarlı kas hücresi görülmüştür (Şekil 4-37). Parietal hücrelerin hücre membranına yakın kısımlarında 70-110 nm boyutlarında bol sayıda vezikül içinde veya serbest olmak üzere viral partikül benzeri yapılara rastlanmıştır (Şekil 4-38, Şekil 4-39).



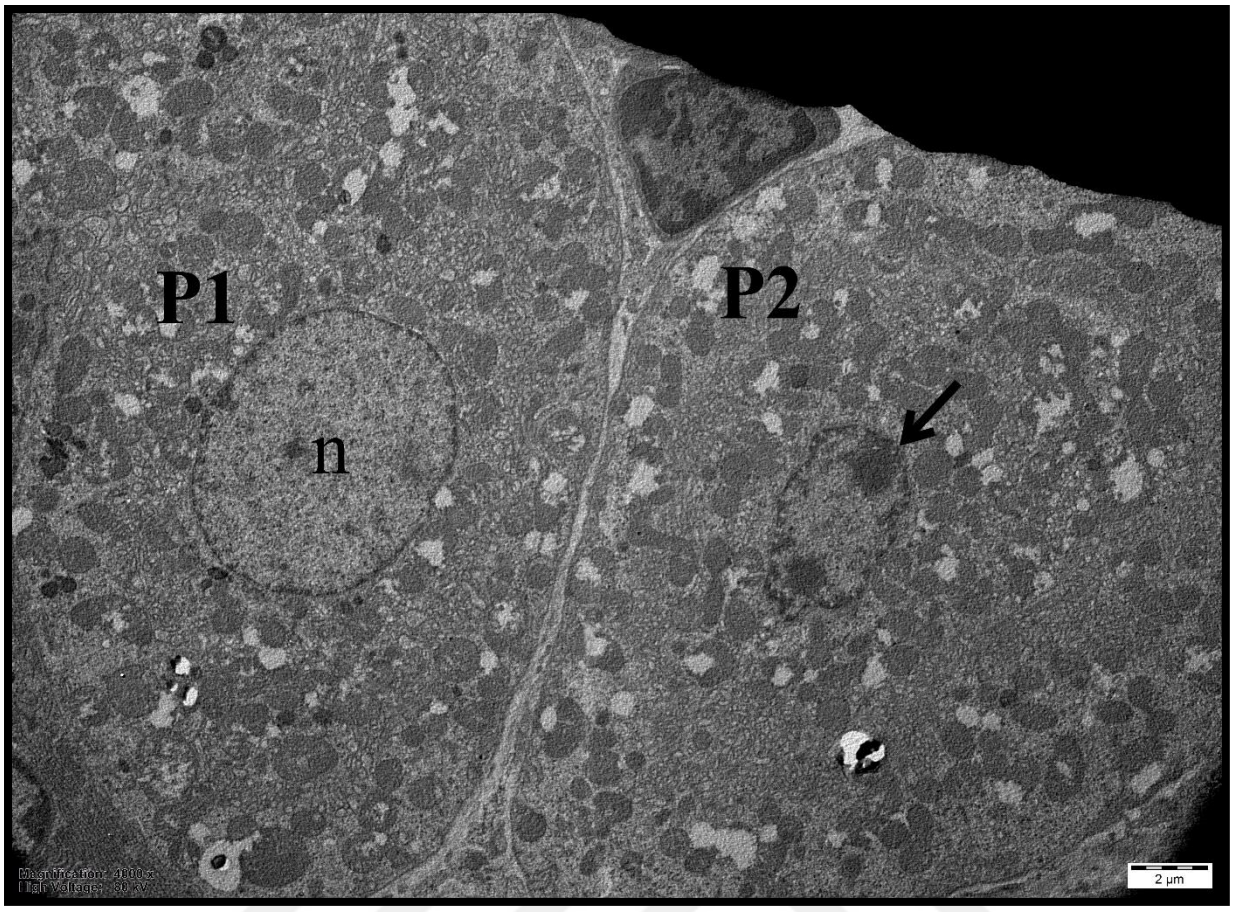
Şekil 4- 30. Kontrol grubunda parietal hücrelerin TEM görüntüsü. Parietal hücrelerin (P) ökromatik nükleusları, genişlemiş mitokondrileri (m) ve tübüloveziküler sistemi (tv) oluşturan tübül yapıları görülmektedir. Büyütme 5000X.



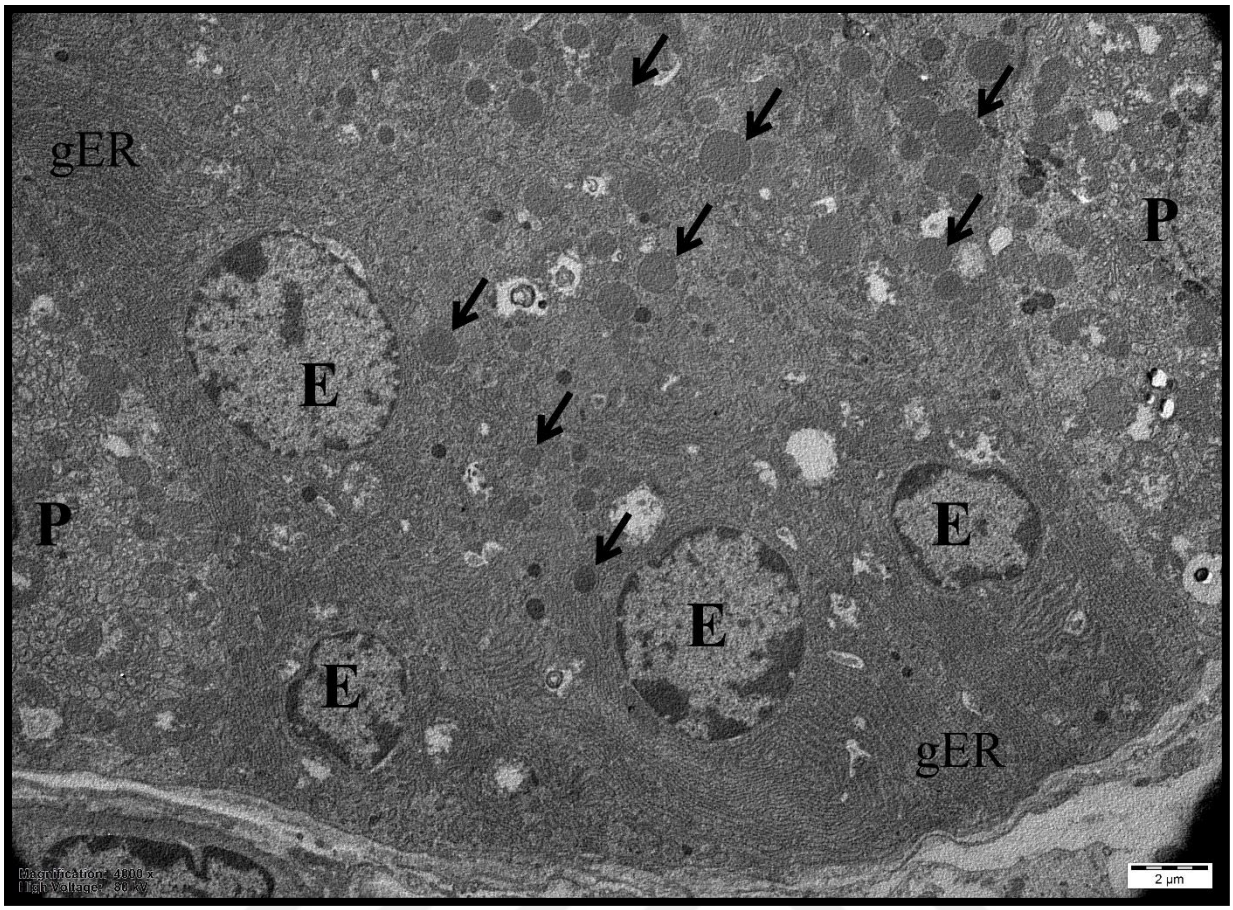
Şekil 4- 31. Kontrol grubunda esas hücre ve entreoendokrin hücrenin TEM görüntüsü. Apikal sitoplazmasında farklı boyutlardaki zimojen granüller (asterisk) ile lümene (L) bakan esas hücreler (E) görülmektedir. Elektron yoğun salgı granülleri (ok başı) ile seçilebilen enteroendokrin hücre (Ee) izlenmektedir. Büyütme 4000X.



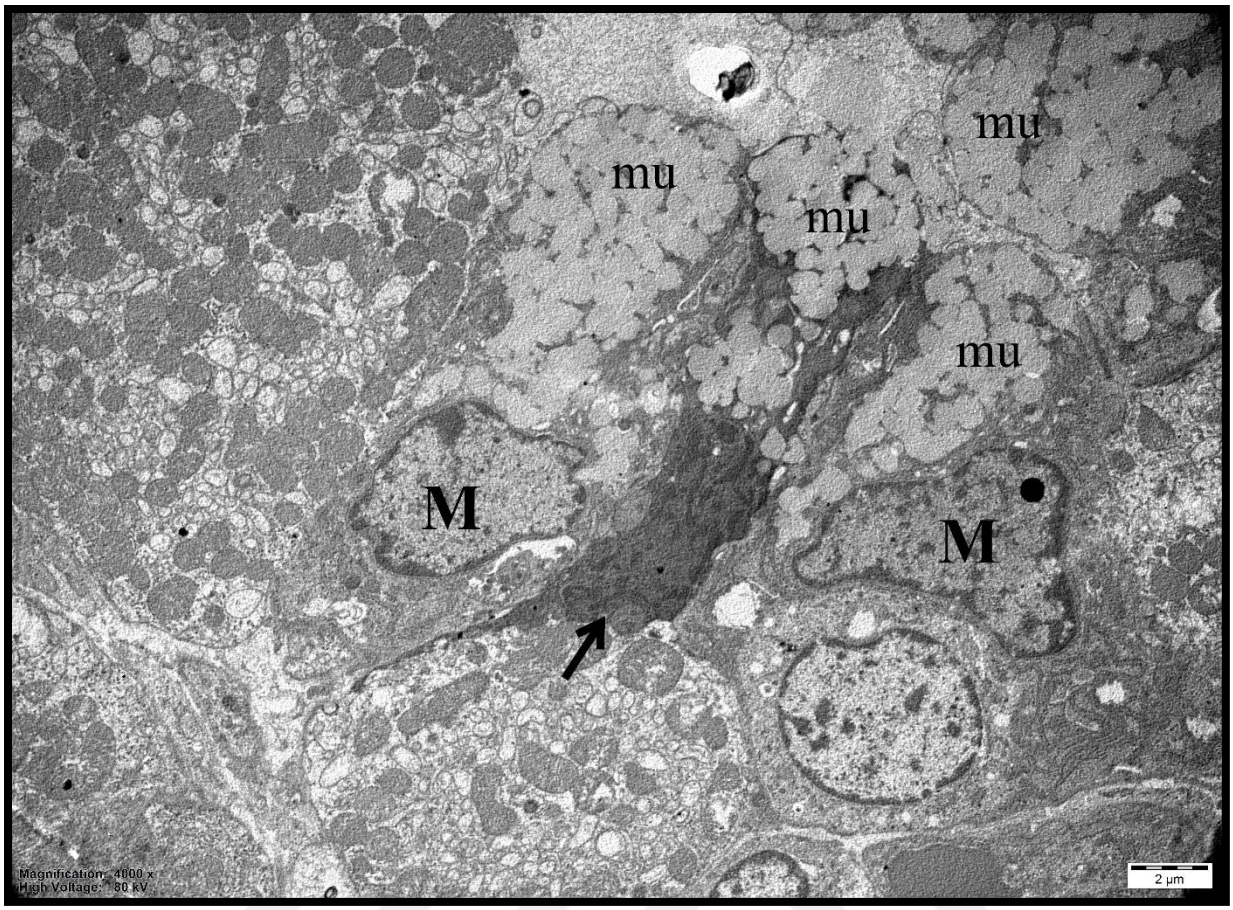
Şekil 4- 32. Kontrol grubunda müköz hücrelerin TEM görüntüsü. Parietal hücre (P) etrafında yerleşim gösteren iki müköz hücre (M) görülmektedir. Sitoplazma apikalinde elektron geçirgen görünümde mukus salgısı (mu) izlenmektedir. Büyütme 5000X.



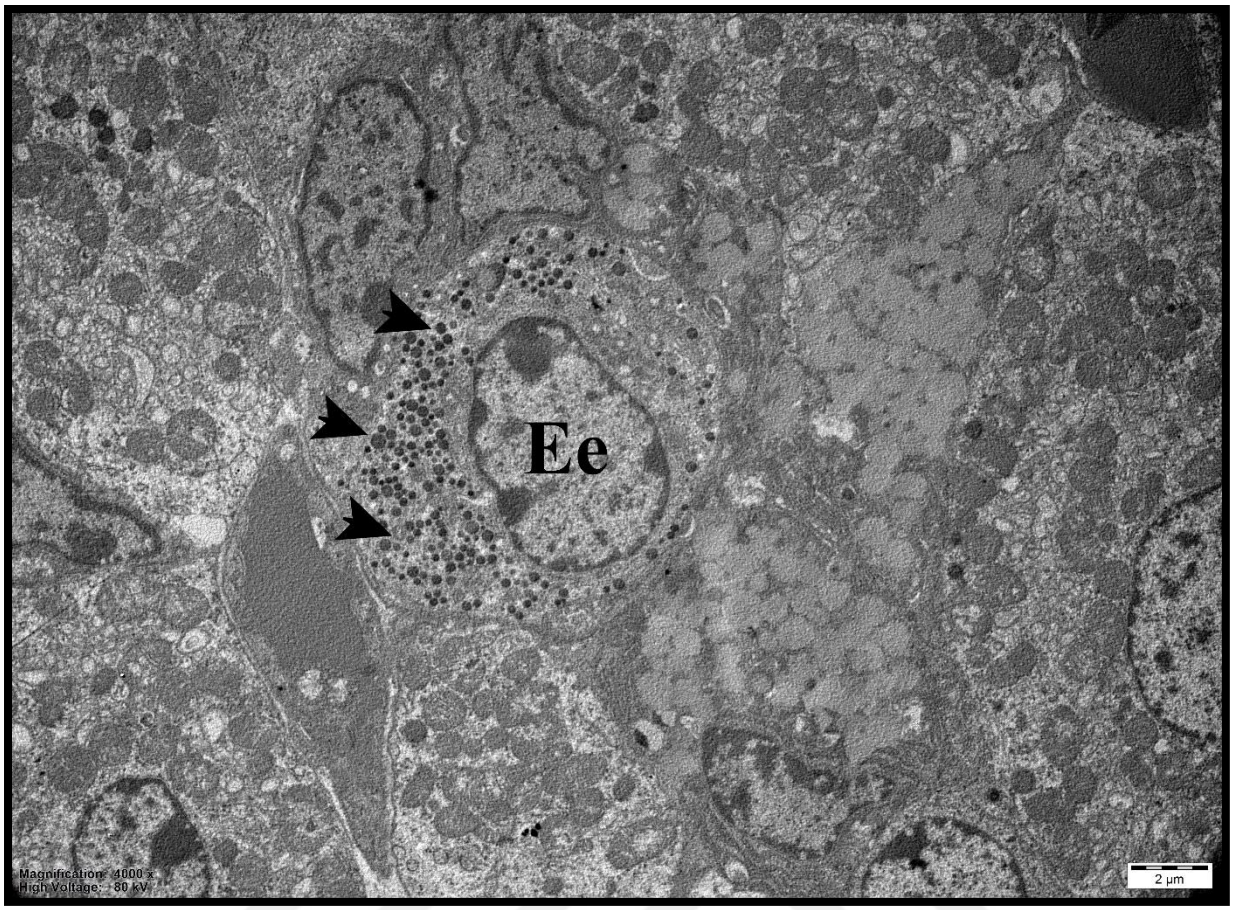
Şekil 4- 33. SARS-CoV-2 grubunda parietal hücrelerin TEM görüntüsü. Solda ökromatik nükleusu (n) ile normal görünümde parietal hücre (P1) izlenmektedir. Sağda piknotik nükleuslu (ok) hasarlı bir parietal hücre (P2) görülmektedir. Büyütme 4000X.



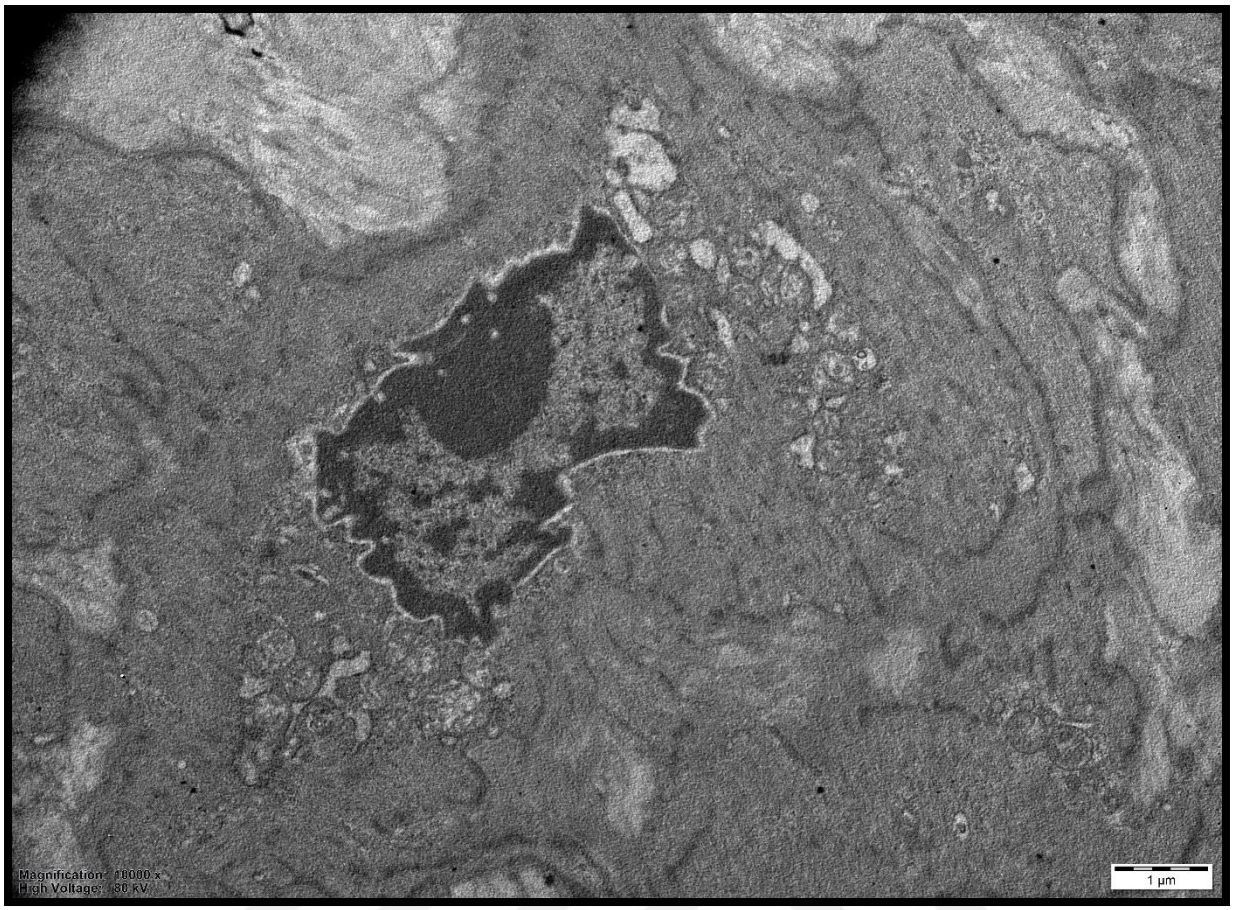
Şekil 4- 34. SARS-CoV-2 grubunda esas hücrelerin TEM görüntüsü. İki parietal hücre (P) arasında bazal yerleşimli esas hücreler (E) görülmektedir. Zimojen granüller (ok) ve iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ağı (gER) seçilmektedir. Büyütme 4000X.



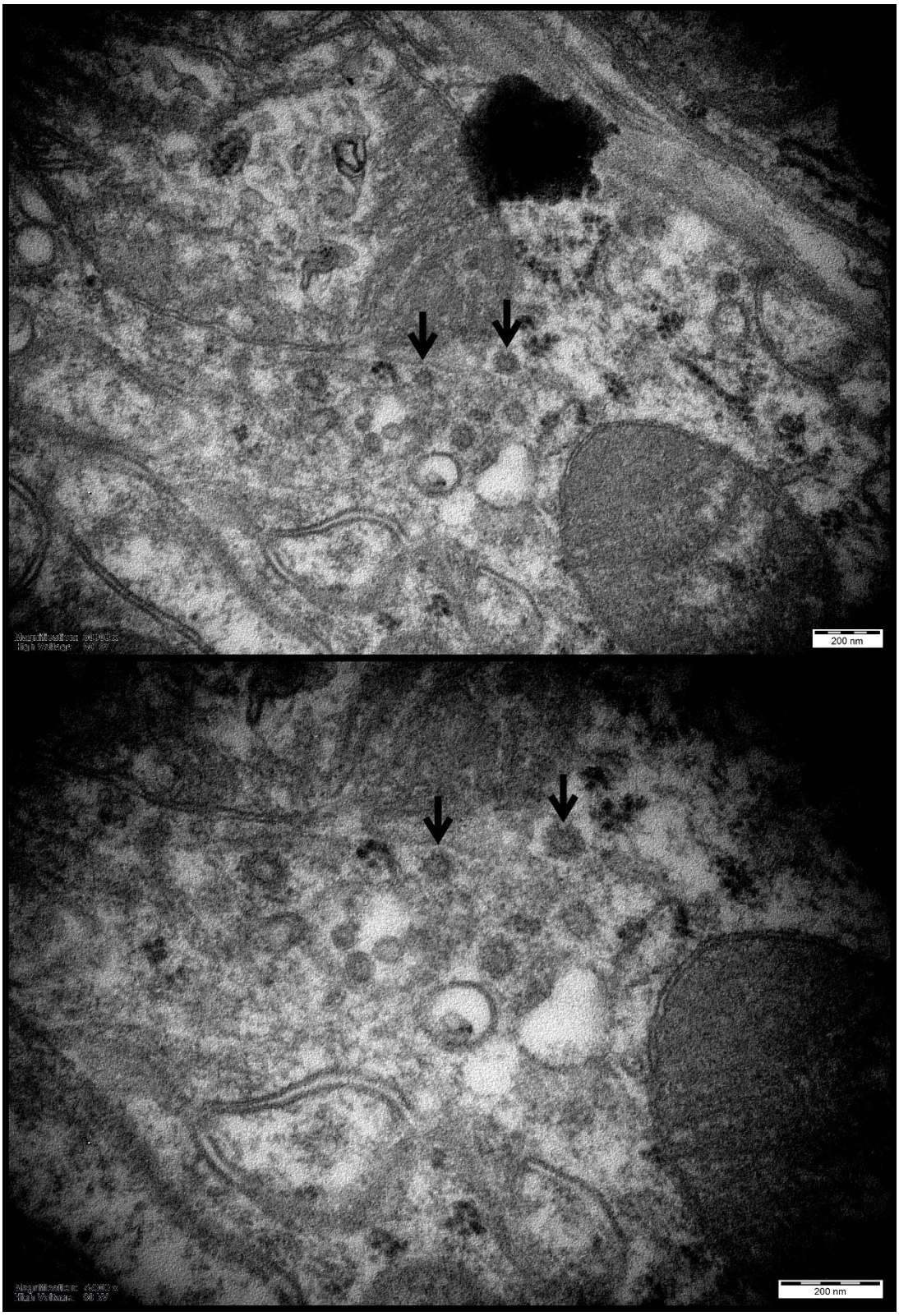
Şekil 4- 35. SARS-CoV-2 grubunda müköz hücrelerin TEM görüntüsü. Apikal sitoplazmasında mukus salgısı (mu) ile dolu müköz hücreler (M) görülmektedir. Hasarlı müköz hücre (ok) izlenmektedir. Büyütme 4000X.



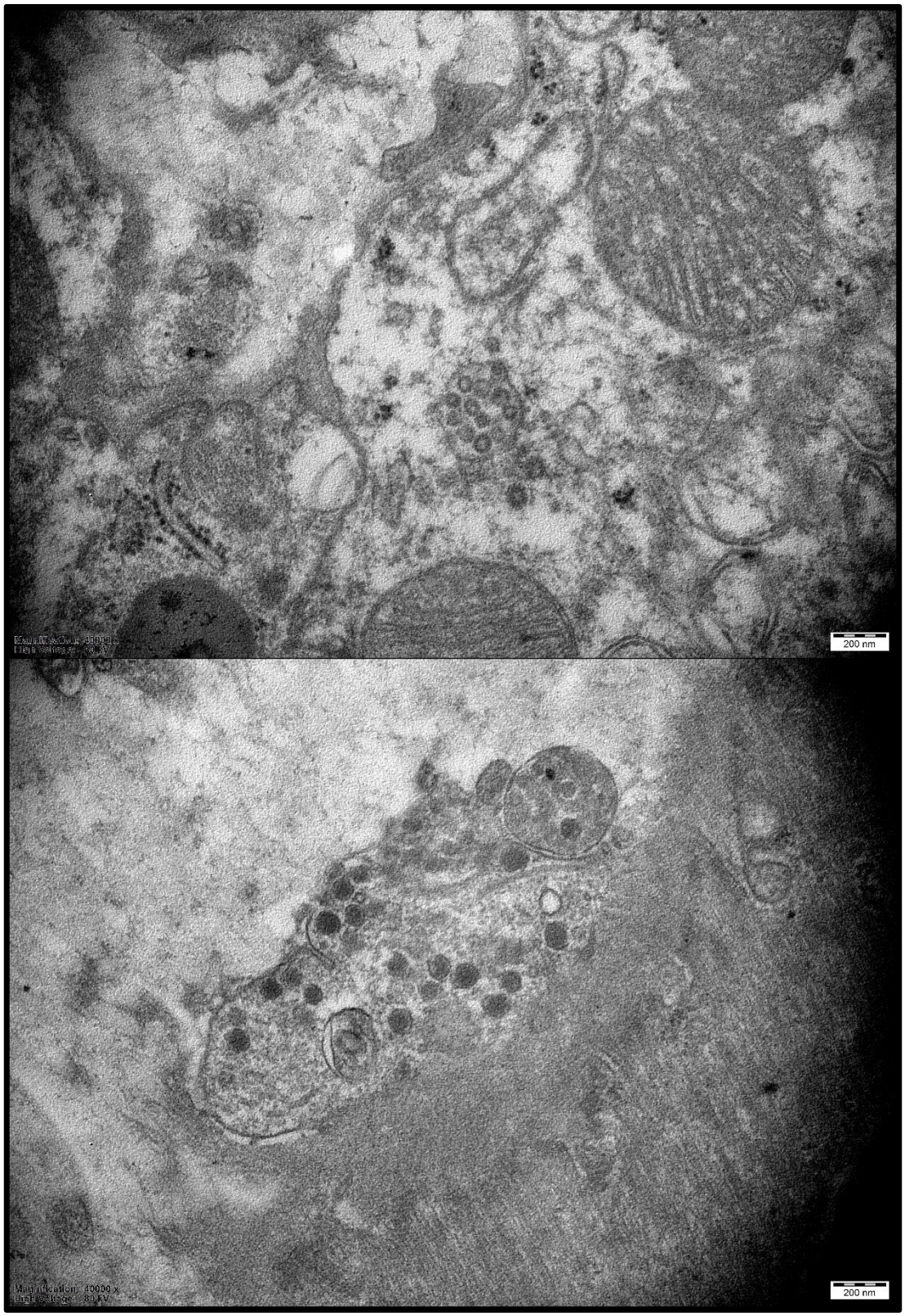
Şekil 4- 36. SARS-CoV-2 grubunda enteroendokrin hücrenin TEM görüntüsü. Sitoplazmasında çok sayıda elektron yoğun salgı granülleri (ok başı) içeren, endokrin aktivitesi artmış enteroendokrin hücre (Ee) görülmektedir. Büyütme 4000X.



Şekil 4- 37. SARS-CoV-2 grubunda düz kas hücresinin TEM görüntüsü. Hafif kondanse olmuş nükleusu ile hasarlı kas hücresi görülmektedir. Büyütme 10000X.



Şekil 4- 38. SARS-CoV-2 grubunda viral partikül benzeri yapıların TEM görüntüsü. Parietal hücrede membrana yakın yerleşim gösteren 70-110 nm boyutlarında viral partikül benzeri yapılar (ok) izlenmektedir. Büyütmeler: Üst ultramikrograf 50000X, alt ultramikrogaf 75000X.



Şekil 4- 39. SARS-CoV-2 grubunda viral partikül benzeri yapıların TEM görüntüsü. Üst ultramikrografta parietal hücrede, alt mikrografta müköz hücrede vezikül içinde viral partikül benzeri yapılar izlenmektedir. Büyütme 40000X.

5. TARTIŞMA

SARS-CoV-2'nin neden olduğu farklı sistemlere ait etkiler, literatürde araştırılmaya devam edilen bir konudur (107). Çalışmamızda, SARS-CoV-2'nin mide dokusunda meydana getirdiği akut histopatolojik değişiklikler incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, SARS-CoV-2'nin midede apoptoz, piroptoz, çeşitli koruyucu faktörlerin kaybı ve inflamasyon ile seyreden yapısal ve ince yapısal doku hasarına yol açtığını göstermiştir.

SARS-CoV-2'nin sıklıkla damlacık ve temas yoluyla bulaştığı bilinmektedir. Bu sebeple; çalışmamızda K18-hACE2 farelere virüs inhalasyonla bulaştırılarak enfeksiyon oluşturulmuştur. Virüs, postenfeksiyöz 8. günde midede ışık mikroskobu ve TEM ile tespit edilmiş ve etkileri histopatolojik olarak gözlenmiştir. Ayrıca COVID-19 vakalarında gözlenen diyare, karın ağrısı ve kusma gibi semptomlar, hastalığın bulaşında fekal-oral yolun da etkili olabileceğini düşündürmektedir ve literatürde, intragastrik yolla SARS-CoV-2 uygulanan hACE2 farelerin akciğerlerinde de viral RNA ve spike proteininin varlığı solunum sisteminde gösterilmiştir (5, 57).

Çalışmamızın gastrik mukoza incelemelerinde; SARS-CoV-2 grubunda mukozal bütünlüğün bozulduğu görülmüş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, gastrik mukozada daha yüksek hasar skoru tespit edilmiştir. Bu bulgular, virüsün mide dokusunda inflamatuar bir yanıt oluşturduğunu ve dokuda yaygın hasara neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışmamızda, SARS-CoV-2'nin mide dokusuna etkisiyle ilgili olarak, literatürden farklı şekilde, özellikle parietal hücrelerin hasar aldığı görülmüştür. Esas hücrelerin sitoplazmada parietal hücrelere kıyasla daha yüksek ACE2 eksprese ettiği bilinmektedir ve SARS-CoV-2'nin midedeki hedefinin esas hücreler olması beklenmektedir (2). Ancak çalışmamızda; SARS-CoV-2 nükleokapsid pozitifliği, fundus bezlerinde yüzey epitelinde ve parietal hücrelerde gösterilmiştir. Çalışmamızın ışık mikroskobik incelemeleri ile uyumlu, SARS-CoV-2 grubuna ait geçirimli elektron mikroskobik incelemelerde viral partiküllerin parietal hücrelerde görülmesi, hücresel etkilenimin parietal hücrelerde, diğer gastrik hücrelere kıyasla belirgin olması; virüsün özellikle parietal hücrelerde hasar oluşturması ve mide hücrelerinin farklı yenilenme süreleri ile açıklanabilir. Parietal hücrelerde 150-200 gün, esas ve enteroendokrin hücrelerde 60-90 gün, müköz boyun hücrelerde yaklaşık bir hafta süren rejenerasyon gözlenmektedir (27). Parietal hücrelerin yenilenme süresinin diğer hücrelere kıyasla daha uzun olması; bu hücrelerin, virüse daha uzun süre maruz kalacağını ve maruziyetin yol açtığı hasardan daha fazla etkilenebileceğini düşündürmektedir. Parietal hücrelerin fonksiyonu göz

önünde bulundurulduğunda, bu hücrelerin virüsten etkilenmesi çeşitli sonuçlara yol açabilir. Parietal hücreler tarafından üretilen HCl, 150-160 mmol/L arasında değişen bir konsantrasyonda bulunur ve mide ortamına düşük bir pH (1.0-2.0) verir. Parietal hücreler ve HCl, diyet proteininin sindirimini, inaktif pepsinojeni aktif pepsin enzimine dönüştürerek başlatmaktadır. Aynı zamanda HCl bakteriostatiktir ve besin ile mideye ulaşan bakterilerin çoğunu yok edebilmektedir (30). Parietal hücrelerin, SARS-CoV-2 etkiyle hasarlanarak fonksiyonunun etkilenmesi; pepsinojenin aktiflenememesi ve protein sindirimi bozulmasıyla sonuçlanabilir. Böylece çalışmamız, literatürde bildirilmiş dispeptik şikayetlere parietal hücrelerdeki şiddetli etkilenme ile açıklık getirebilmektedir (108, 109). Ayrıca uzun dönemde intrinsik faktör salgısının bozulmasıyla, megaloblastik anemi vakalarının artabileceği hipotezi de gelecekte düşünülebilir.

Çalışmamızda kontrol grubunda midenin yüzey epitelinin, kendi asit ortamına karşı koruyucu olan müsinleri salgıladığı gösterilmiştir. SARS-CoV-2 grubunda nötral müsinler, sağlam epitel boyunca gözlenirken; epitel bütünlüğü bozulduğunda nötral müsinlerde kayıp olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sağlıklı insanlarda fundus ve korpusta, kemirgenlerde kardiyada ve pilorda asidik müsinler beklenmektedir (110, 111). Kemirgenlerde pilorda olması gereken asidik müsinlere, çalışmamızda SARS-CoV-2 grubunda oldukça az rastlanmıştır. Nötral ve asidik müsinlerin kaybı, mide bariyerinin bozularak dokunun zarar görmesine sebep olabilir. Bu durum hem sindirim fonksiyonun bozulması hem de sekonder enfeksiyonlara yatkınlık ile sonuçlanabilir.

Histopatolojik incelemelerde, SARS-CoV-2 grubuna ait mide dokularında inflamasyonun ve ödemin az olduğu gözlenmiştir. SARS-CoV-2 grubunda bazı örneklerde lenfositten zengin hücre infiltrasyonuna rastlanırken, bazı örneklerde inflamasyon izlenmemiştir. Elde ettiğimiz bu bulgu, klinikte asemptomatik seyreden SARS-CoV-2 vakalarını açıklayabilmektedir. Midede görülen patolojilerin; bez epitelindeki hücrelerin hasarı ve hücre ölümü kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda gözlenen enteroendokrin hücrelerin aktivitesindeki artış da fonksiyon değişikliğinin bir göstergesi olabilir. Bazı örneklerde görülen kas hücrelerindeki hafif hasar ve sitoplazmik vakuolizasyon, midedeki etkilerin daha geniş düşünülmesi gerektiğine işaret etmektedir.

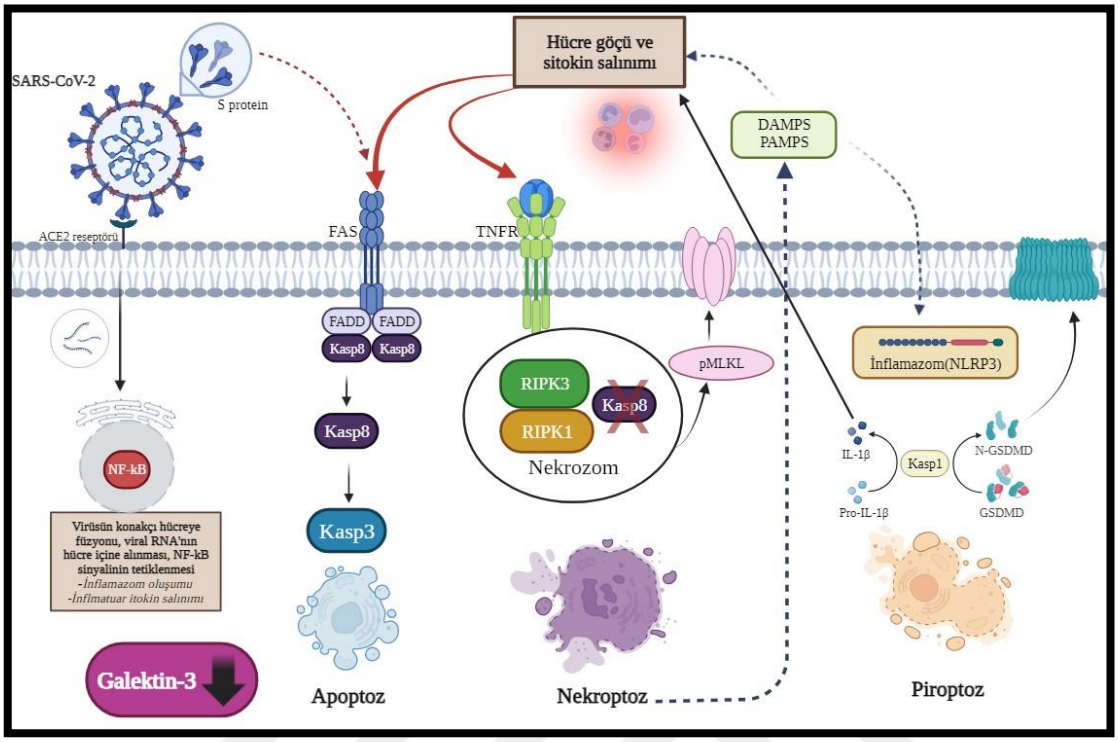
Mide, normal fonksiyonu dahilinde yüksek konsantrasyonda aside ve çeşitli endojen ve eksojen zararlı ajanlara maruz kalmaktadır. Bu nedenle mukozası sürekli yenilenmektedir. Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü, mide mukozasının fizyolojik hücresel döngüsünde yer alan iki temel parçadır (72). SARS-CoV-2 etkisiyle gözlenen organlardaki ciddi hasarın sorumlusunun indüklenmiş hücre ölümü olabileceği düşünülmelidir. Hücre ölüm yolları vücudun bağışıklık tepkisinin de bir parçasıdır ve virüslerle savaşmaya yardımcı olur. Bazı bireylerin virüsten diğerlerine göre daha ciddi şekilde etkilendiğini, SARS-CoV-2 tarafından indüklenen hücre ölüm yolları ile açıklayan çalışmalar bulunmaktadır (81). Ayrıca genetik yatkınlığın olması da hücre ölüm yollarının daha şiddetli aktivasyonunu mümkün kılabilmektedir (81). SARS-CoV-2 ve programlanmış hücre ölümü yolları arasındaki ilişkinin karmaşık olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda SARS-CoV-2'nin kontrol mideler ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak apoptozda ve piroptozda artışa yol açtığını; istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte gözlemsel olarak az sayıda midede de nekroptozu indükleyebileceğini gösterdik. Virüsün sebep olduğu konak hücrelerde apoptoz ve piroptoz artışının; SARS-CoV-2'nin hücre hasarı ve dolaylı olarak neden olduğu inflamasyon ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Apoptoz incelendiğinde, çalışmamızda SARS-CoV-2 grubunda görülen şiddetli kaspaz-3 pozitifliği, hem SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında hasarlı epitelin yenilenmesine katkı sağlayacak fizyolojik apoptozun hem de salınan sitokinlerin ölüm reseptörlerini uyarması ile gerçekleşen ekstrinsik apoptozun birlikte gerçekleşebilmesi ile açıklanabilir.

Piroptozun patojenlerle enfekte olmuş hücrelerde görülebilen bir hücre ölümü çeşidi olduğu bilinmektedir (64). Çalışmamızda SARS-CoV-2 grubunda Gasdermin D ile gösterilen piroptozun pozitif olduğu bölgeler ile SARS-CoV-2'nin pozitif boyandığı alanların uyumlu olduğunun görülmesi, virüsün etkilediği hücrelerde piroptozun görülmesi ile ilişkilendirilebilir.

Nekroptoz, artmış sitokin seviyeleri ve hücre ölüm reseptörlerinin uyarımı ile gerçekleşen başka bir hücre ölümü çeşididir ve virüs kaynaklı hasar ve salınan inflamatuar mediyatörlerin etkisiyle gerçekleşebileceği öne sürülebilir. Ancak çalışmamızda istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmaması, asemptomatik enfekte deneklerde sitokin seviyelerinin nispeten düşük olmasıyla ilişkili nekroptozun daha az görülebileceği ile açıklanabilir.

Bu hücre ölüm yolları, COVID-19'un şiddetine katkıda bulunmanın yanı sıra, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı konakçı bağışıklık yanıtını da etkileyebilir (Şekil 5-1).



Şekil 5- 1. SARS-CoV-2 ve hücre ölüm yolakları ilişkisi. Apoptoz: Viral spike proteinin (S) konakçı hücre membranına tutunması ve viral genomun hücre içine alınmasıyla birlikte aktiflenen NFκB yolağı, hücrede inflamatuar sitokinlerin salınmasını ve akut inflamatuar hücrelerin kemotaksisini indükleyebilir. Ayrıca spike protein ölüm reseptörlerini etkileyerek hücrede, ekstrinsik apoptoz yolağını başlatabilir. Nekroptoz: İnflamatuar sürecin başlamasıyla hücrelerde nekrozom kompleksleri oluşur. MLKL fosforile olarak hücre membranında hasar meydana getirir ve nekroptoz gerçekleşebilir. Nekroptoz sonucunda açığa çıkan DAMP ve PAMP'lar inflamatuar süreci besleyerek hasarı şiddetlendirir. Piroptoz: DAMP ve PAMP'lar ile NFκB yolağının doğrudan etkisi inflamazom oluşumu indükleyerek kaspaz-1'i aktifler ve GSDMD porlarının oluşumu tetiklenir. Böylelikle hücre piroptoza gidebilir. Ayrıca IL-1ß gibi inflamatuar sitokin salınımı, hasara katkı sağlamaktadır. Koruyucu bir etken olabilecek Galektin-3'ün SARS-CoV-2 ile enfekte hücrede azaldığı çalışmamızda gösterilmiştir.

SARS-CoV-2 ile enfekte vakalarda Galektin-3 seviyeleri enfeksiyon şiddeti ve mortalite ile ilişkilendirilmiştir (99). Galektin-3, hücre ölümüne karşı koruyucu veya tetikleyici olabilecek, farklı yolaklar üzerinden etkili bir proteindir (16). Çalışmamızda mide dokusunda Galektin-3 varlığı ve enfeksiyona karşı fonksiyonu üzerine incelemeler yapılmıştır. Kontrol grubunda Galektin-3 esas hücrelerde şiddetli pozitif immünoreaktivite göstermiştir. SARS-

CoV-2 grubunda ise Galektin-3 pozitifliği hafiftir. Bu durum, enfeksiyon sırasında Galektin-3 ekspresyonun azalmasıyla birlikte hücre ölümüne ve hasara karşı koruyucu mekanizmanın ortadan kalkabileceğini düşündürmektedir. Literatürde Galektin-3'ün intraselüler anti-apoptotik etkisi bildirilmiştir (16). Ancak çalışmamızda Galektin-3'ün sağlıklı midede esas hücrelerde olması, viral maruziyetle azalması ve viral hasarın da parietal hücrelerde olması; mide dokusundaki koruyucu etkinin ekstraselüler mekanizmalar ile yürütüldüğü düşünülmektedir. Galektin-3 ekspresyonunda azalmanın hücresel ölüm mekanizmalarını tetikleyebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamız, SARS-CoV-2'nin mide dokusunda apoptoz ve piroptoz gibi hücresel ölüm mekanizmalarını tetikleyebileceğini ve bu durumun, histopatolojik değişikliklerde rol oynayabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda gösterdiğimiz doku hasarının ve olası mekanizmaların fonksiyonel bozuklukla devam edebileceği (örneğin; gastrik pH dengesinin bozulması) ve daha uzun süreli viral maruziyetin yanında H. pylori (Helikobakter pilori) gibi sekonder bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık oluşturabileceği ihtimal, göz önünde bulundurulmalıdır. Altta yatan komorbidite varlığında, örneğin gastrik hasar veya enfeksiyonların da SARS-CoV-2'nin mide etkilenimine zemin hazırlayabileceği düşünülmelidir. Her iki durum birlikte değerlendirildiğinde, yakın dönemde akut gastrit, uzun dönemde kronik gastrit ve intestinal metaplazi gibi prekanseröz lezyonlar, hastanın tıbbi öyküsüne ve komorbiditelerine göre ortaya çıkabilir. Çalışmamızda K18-hACE2 farelerin kullanılması, komorbiditenin olmaması ve insan ACE2 reseptörlerine sahip fareler olmaları açısından bir avantajdır. Ancak kilo kaybı ve aktivite azalması gibi genel durum belirteçleri dışında, farelerde SARS-CoV-2'ye dair semptomatik değerlendirme yapılamamaktadır (112). Bu nedenle histopatolojik bulgular, literatürdeki vaka çalışmalarının semptomatik bulgularından yararlanarak bu bölümde tartışılmıştır. Ayrıca çalışmamızda virüsün akut dönem etkileri incelenmiştir. Hem postenfeksiyöz dönemde midedeki etkiler hem de olası sekonder enfeksiyonların uzun dönem etkileri gelecek araştırmaların konusu olabilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda SARS-CoV-2 enfeksiyonunun mide dokusunda meydana getirdiği hücresel ve histopatolojik değişiklikler incelenmiş, apoptozu ve piroptozu tetiklediği gösterilmiştir. Virüsün kolokalizasyonu düşünüldüğünde, viral yükün yüksek olduğu ve sistemik sitokin yanıtının daha şiddetli olduğu vakalarda hasarın da artabileceği öngörülebilir. Aynı zamanda yüzey epitelinin dökülmesi ve parietal hücrelerin yoğun etkilenmesinin, mide dokusunda koruyucu tabakanın azalmasına neden olabileceği görülmüştür. Galektin-3 düzeyindeki değişikliklerin, virüse karşı savunmanın zayıflamasına yol açabileceği önerilebilir.

Bu çalışma, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun mideye etkisinin anlaşılması ve potansiyel uzun vadeli etkileri için göz önünde bulundurulması gereken önemli veriler sunmaktadır. Gelecekteki araştırmalar, bu bulguların klinik sonuçlarını daha iyi anlamak ve tedavi stratejilerini geliştirmek için daha fazla bilgi sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Qi F, Qian S, Zhang S, Zhang Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. Biochem Biophys Res Commun. 2020;526(1):135-40.

2. An X, Lin W, Liu H, Zhong W, Zhang X, Zhu Y, et al. SARS-CoV-2 Host Receptor ACE2 Protein Expression Atlas in Human Gastrointestinal Tract. Front Cell Dev Biol. 2021;9:659809.

3. Liu Y, Wu Q, Wan D, He H, Lin H, Wang K, et al. Expression and Possible Significance of ACE2 in the Human Liver, Esophagus, Stomach, and Colon. Evid Based Complement Alternat Med. 2021;2021:6949902.

4. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. J Pathol. 2004;203(2):631-7.

5. Sun SH, Chen Q, Gu HJ, Yang G, Wang YX, Huang XY, et al. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. Cell Host Microbe. 2020;28(1):124-33 e4.

6. Chen F, Dai Z, Huang C, Chen H, Wang X, Li X. Gastrointestinal Disease and COVID-19: A Review of Current Evidence. Dig Dis. 2022;40(4):506-14.

7. Deep A, Verma K, Swaroop S, Kumar A, Rungta S. Novel coronavirus (COVID-19) and its potential G.I. manifestation: A review. J Family Med Prim Care. 2020;9(11):5474-9.

8. Paolini A, Borella R, De Biasi S, Neroni A, Mattioli M, Lo Tartaro D, et al. Cell Death in Coronavirus Infections: Uncovering Its Role during COVID-19. Cells. 2021;10(7).

9. Li J, Chen L, Zhou C, Bai Y, Zhao R, Zhang J, et al. Insight to Pyroptosis in Viral Infectious Diseases. Health. 2021;13(05):574-90.

10. Deshpande R, Zou C. Programmed Cell Death in SARS-CoV-2 Infection: A Short Review. Journal of Respiration. 2021;1(4):223-8.

11. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. Cell Mol Immunol. 2021;18(5):1106-21.

12. Betül Karademir Yılmaz SK. Programlı Hücre Ölümü ve Tipleri. In: Semra Koçtürk SV, editor. Hastalıkta ve Sağlıkta Hücre Ölümü. 1 ed2022. p. 2-111.

13. Li S, Zhang Y, Guan Z, Li H, Ye M, Chen X, et al. SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):235.

14. Caniglia JL, Asuthkar S, Tsung AJ, Guda MR, Velpula KK. Immunopathology of

galectin-3: an increasingly promising target in COVID-19. F1000Res. 2020;9:1078.

15. Garcia-Revilla J, Deierborg T, Venero JL, Boza-Serrano A. Hyperinflammation and Fibrosis in Severe COVID-19 Patients: Galectin-3, a Target Molecule to Consider. Front Immunol. 2020;11:2069.

16. Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. Tissue Antigens. 2004;64(1):1-12.

17. Moore P, Torchia Alimentary System. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 10 ed: Elsevier; 2016. p. 209-21.

18. Schoenwolf B, Brauer, Francis-West. Development of the Gastrointestinal Tract. Larsen's Human Embryology. 5 ed: ELSEVIER SAUNDERS; 2015. p. 341-74.

19. Eşrefoğlu M. Sindirim Sistemi. In: Eşrefoğlu M, editor. Embriyoloji. 1 ed. İstanbul: EMA Tıp Kitabevi YayıncılıkTic. Ltd. Şti.; 2022. p. 241-70.

20. McCracken KW, Wells JM. Mechanisms of embryonic stomach development. Semin Cell Dev Biol. 2017;66:36-42.

21. Raghoebir L, Bakker ER, Mills JC, Swagemakers S, Kempen MB, Munck AB, et al. SOX2 redirects the developmental fate of the intestinal epithelium toward a premature gastric phenotype. J Mol Cell Biol. 2012;4(6):377-85.

22. Singh V. Digestive Tract. Textbook of Clinical Embryology. 1 ed: Elsevier; 2012. p. 1140-157.

23. Carlson BM. Digestive and Respiratory Systems and Body Cavities. Human Embryology and Developmental Biology. 5 ed: Elsevier Saunders; 2013. p. 335-59.

24. Chimmalgi M. Study of Fetal Stomach Under Light Microscope. Journal of the Anatomical Society of India. 2005.

25. Murat TOSUN IT, Serpil KALKAN, Refik SOYLU. Mide'nin Gelişiminin 17 ile 32 Haftalar Arasındaki İnsan Fetuslerinde Histolojik Olarak Değerlendirilmesi. The Medical Journal of Kocatepe. 2004.

26. EŞRefoglu M, Taslidere E, Cetin A. Development of the Esophagus and Stomach. Bezmialem Science. 2018:175-82.

27. Eşrefoğlu M. Sindirim Kanalı. Özel Histoloji. 3 ed: İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd. Şti. ; 2021. p. 103-43.

28. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology TEXT AND ATLAS: McGraw-Hill Education; 2018.

29. Xiao S, Zhou L. Gastric Stem Cells: Physiological and Pathological Perspectives. Front

Cell Dev Biol. 2020;8:571536.

30. Michael H. Ross WP. Digestive System II: Esophagus and Gastrointestinal Tract. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 7 ed: Wolters Kluwer Health; 2016. p. 568-624.

31. Leslie P. Gartner JLH. Sindirim Sistemi: Oral Kavite ve Sindirim Kanalı. BRS: Hücre Biyolojisi ve Histoloji. 1 ed2016. p. 273-91.

32. Ting H-A, von Moltke J. The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond. The Journal of Immunology. 2019;202(5):1321-9.

33. Hendel SK, Kellermann L, Hausmann A, Bindslev N, Jensen KB, Nielsen OH. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. Front Immunol. 2022;13:822867.

34. Sato A. Tuft cells. Anat Sci Int. 2007;82(4):187-99.

35. M. Navarro JR, A. Carretero, V. Nacher and E. Domínguez. Digestive Tract. Morphological Mouse Phenotyping Anatomy, Histology and Imaging2017. p. 89-146.

36. Malewitz TD. Normal Histology of the Digestive Tract of the Mouse. Okajimas Folia Anat Jpn. 1965;41(1):21-47.

37. Piper M. Treuting MJAaSMD. Upper Gastrointesitnal Tract. Comparative Anatomy and Histology, A Mouse, Rat, and Human Atlas. 2 ed: Elsevier; 2018. p. 191-211.

38. Donald B. Mcmillan RJH. The Digestive System. An Atlas of Comparative Vertebrate Histology: Elsevier; 2018. p. 291-377.

39. Li C, He Q, Qian H, Liu J. Overview of the pathogenesis of COVID-19 (Review). Exp Ther Med. 2021;22(3):1011.

40. Zhang Y, Geng X, Tan Y, Li Q, Xu C, Xu J, et al. New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020;127.

41. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020;382(8):727-33.

42. Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, Savic S, Hopfer H, Deigendesch N, et al. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. Histopathology. 2020;77(2):198-209.

43. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2022;20(5):270-84.

44. Öztan G, İşsever H. Yeni Koronavirüsün (Covid-19) Moleküler Yapısı ve Genomik Karakterizasyonu. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi. 2020;3(2):61-71.

45. Mirmohammadi S, Kianmehr A, Arefi M, Mahrooz A. Biochemical parameters and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in vital organs: COVID-19 outbreak in Iran. New Microbes New Infect. 2020;38:100792.

46. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends in Immunology. 2020;41(12):1100-15.

47. Zhong P, Xu J, Yang D, Shen Y, Wang L, Feng Y, et al. COVID-19-associated gastrointestinal and liver injury: clinical features and potential mechanisms. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2020;5(1).

48. Kervancioglu Demirci E, Dursun M, Sevic E, Ergul RB, Onel M, Agacfidan A, et al. Evidence for residual SARS-CoV-2 in corpus cavernosum of patients who recovered from COVID-19 infection. Andrology. 2023;11(6):1016-22.

49. Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. Nature. 2020;583(7818):830-3.

50. Mir T, Almas T, Kaur J, Faisaluddin M, Song D, Ullah W, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Multisystem review of pathophysiology. Annals of Medicine & Surgery. 2021;69.

51. Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, Savic S, Hopfer H, Deigendesch N, et al. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. Histopathology. 2020;77(2):198-209.

52. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. Nature reviews microbiology. 2022;20(5):270-84.

53. Lindner D, Fitzek A, Bräuninger H, Aleshcheva G, Edler C, Meissner K, et al. Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases. JAMA Cardiology. 2020;5(11):1281-5.

54. Yang Y, Wei Z, Xiong C, Qian H. Direct mechanisms of SARS-CoV-2-induced cardiomyocyte damage: an update. Virology Journal. 2022;19(1):108.

55. Qin Z, Liu F, Blair R, Wang C, Yang H, Mudd J, et al. Endothelial cell infection and dysfunction, immune activation in severe COVID-19. Theranostics. 2021;11(16):8076-91.

56. Kervancioglu Demirci E, Dursun M, Seviç E, Ergül RB, Önel M, Ağaçfidan A, et al. Evidence for residual SARS-CoV-2 in corpus cavernosum of patients who recovered from COVID-19 infection. Andrology. 2023;11(6):1016-22.

57. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. Gastroenterology. 2020;158(6):1831-3 e3.

58. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. Science. 2020;369(6499):50-4.

59. Barbosa da Luz B, de Oliveira NMT, França dos Santos IW, Paza LZ, Braga LLVdM, Platner FdS, et al. An overview of the gut side of the SARS-CoV-2 infection. Intestinal Research. 2021;19(4):379-85.

60. Guo M, Tao W, Flavell RA, Zhu S. Potential intestinal infection and faecal-oral transmission of SARS-CoV-2. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(4):269-83.

61. Chen C, Gao G, Xu Y, Pu L, Wang Q, Wang L, et al. SARS-CoV-2-Positive Sputum and Feces After Conversion of Pharyngeal Samples in Patients With COVID-19. Ann Intern Med. 2020;172(12):832-4.

62. Zhang H, Shao B, Dang Q, Chen Z, Zhou Q, Luo H, et al. Pathogenesis and Mechanism of Gastrointestinal Infection With COVID-19. Front Immunol. 2021;12:674074.

63. Gao QY, Chen YX, Fang JY. 2019 Novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. J Dig Dis. 2020;21(3):125-6.

64. Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. Trends Cell Biol. 2017;27(9):673-84.

65. Khalid N AM. Necrosis 2023 [Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/.

66. Borys S, Khozmi R, Kranc W, Bryja A, Dyszkiewicz-Konwińska M, Jeseta M, et al. Recent Findings of the Types of Programmed Cell Death. Advances in Cell Biology. 2017;5(1):43-9.

67. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. 2018;25(3):486-541.

68. Wang H, Liu M, Zeng X, Zheng Y, Wang Y, Zhou Y. Cell death affecting the progression of gastric cancer. Cell Death Discov. 2022;8(1):377.

69. Medina CB, Mehrotra P, Arandjelovic S, Perry JSA, Guo Y, Morioka S, et al. Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. Nature. 2020;580(7801):130-5.

70. Vinay Kumar AKA, Jon C. Aster. Hücre Hasarı, Hücre Ölümü, ve Adaptasyonlar. In: Kumar V. AAK, Aster J.C., editor. Robbins Temel Patoloji. 10 ed2014. p. 1-28.

71. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. Immunol Rev. 2017;277(1):61-75.

72. Cui G, Yuan Y, Wang Y, Li Z. The expression of RIPK3 is associated with cell turnover of gastric mucosa in the mouse and human stomach. Journal of Molecular Histology. 2021;52(4):849-57.

73. Barhoumi T, Alghanem B, Shaibah H, Mansour FA, Alamri HS, Akiel MA, et al. SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein-Induced Apoptosis, Inflammatory, and Oxidative Stress Responses in THP-1-Like-Macrophages: Potential Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (Perindopril). Front Immunol. 2021;12:728896.

74. Zhu Z, Shi J, Li L, Wang J, Zhao Y, Ma H. Therapy Targets SARS-CoV-2 Infection-Induced Cell Death. Front Immunol. 2022;13:870216.

75. Ratajczak MZ, Bujko K, Ciechanowicz A, Sielatycka K, Cymer M, Marlicz W, et al. SARS-CoV-2 Entry Receptor ACE2 Is Expressed on Very Small CD45(-) Precursors of Hematopoietic and Endothelial Cells and in Response to Virus Spike Protein Activates the Nlrp3 Inflammasome. Stem Cell Rev Rep. 2021;17(1):266-77.

76. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF-alpha and IFN-gamma Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. Cell. 2021;184(1):149-68 e17.

77. Rodrigues TS, de Sa 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).

78. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. Int J Oral Sci. 2020;12(1):8.

79. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. Intensive Care Med. 2020;46(4):586-90.

80. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. Nat Immunol. 2012;13(3):255-63.

81. Bader SM, Cooney JP, Pellegrini M, Doerflinger M. Programmed cell death: the pathways to severe COVID-19? Biochem J. 2022;479(5):609-28.

82. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. Expert Rev Mol Med. 2008;10:e17.

83. Demetter P, Nagy N, Martin B, Mathieu A, Dumont P, Decaestecker C, et al. The galectin family and digestive disease. J Pathol. 2008;215(1):1-12.

84. Colin Hughes R. Galectins as modulators of cell adhesion. Biochimie. 2001;83(7):667-76.

85. Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. Int Arch Allergy Immunol. 2005;136(4):385-400.

86. Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. Scand J Immunol. 2007;66(2-3):143-58.

87. Cao Z, Said N, Amin S, Wu HK, Bruce A, Garate M, et al. Galectins-3 and -7, but not Galectin-1, Play a Role in Re-epithelialization of Wounds *. Journal of Biological Chemistry. 2002;277(44):42299-305.

88. Zhang M, Cheng K, Chen H, Tu J, Shen Y, Pang L, et al. Galectin-3 knock down inhibits cardiac ischemia-reperfusion injury through interacting with bcl-2 and modulating cell apoptosis. Arch Biochem Biophys. 2020;694:108602.

89. Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim H-RC, et al. Nuclear Export of Phosphorylated Galectin-3 Regulates Its Antiapoptotic Activity in Response to Chemotherapeutic Drugs. Molecular and Cellular Biology. 2004;24(10):4395-406.

90. Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. Cancer Res. 1999;59(16):4148-54.

91. Fukumori T, Kanayama HO, Raz A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. Drug Resist Updat. 2007;10(3):101-8.

92. Chen YJ, Wang SF, Weng IC, Hong MH, Lo TH, Jan JT, et al. Galectin-3 Enhances Avian H5N1 Influenza A Virus-Induced Pulmonary Inflammation by Promoting NLRP3 Inflammasome Activation. Am J Pathol. 2018;188(4):1031-42.

93. Lo TH, Chen HL, Yao CI, Weng IC, Li CS, Huang CC, et al. Galectin-3 promotes noncanonical inflammasome activation through intracellular binding to lipopolysaccharide glycans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(30).

94. Al-Salam S, Jagadeesh GS, Sudhadevi M, Tageldeen H, Yasin J. Galectin-3 Possesses Anti-Necroptotic and Anti-Apoptotic Effects in Cisplatin-Induced Acute Tubular Necrosis. Cell Physiol Biochem. 2021;55(3):344-63.

95. Caniglia JL, Guda MR, Asuthkar S, Tsung AJ, Velpula KK. A potential role for Galectin-3 inhibitors in the treatment of COVID-19. PeerJ. 2020;8:e9392.

96. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol. 2020;92(4):424-32.

97. Cervantes-Alvarez E, la Rosa NL, la Mora MS, Valdez-Sandoval P, Palacios-Jimenez

M, Rodriguez-Alvarez F, et al. Galectin-3 as a potential prognostic biomarker of severe COVID-19 in SARS-CoV-2 infected patients. Sci Rep. 2022;12(1):1856.

98. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. Immunol Rev. 2009;230(1):160-71.

99. Gajovic N, Markovic SS, Jurisevic M, Jovanovic M, Arsenijevic N, Mijailovic Z, et al. Galectin-3 as an important prognostic marker for COVID-19 severity. Sci Rep. 2023;13(1):1460.

100. Kazancioglu S, Yilmaz FM, Bastug A, Ozbay BO, Aydos O, Yucel C, et al. Assessment of Galectin-1, Galectin-3, and Prostaglandin E2 Levels in Patients with COVID-19. Jpn J Infect Dis. 2021;74(6):530-6.

101. Srejovic IM, Lukic ML. Galectin-3 in T cell-mediated immunopathology and autoimmunity. Immunol Lett. 2021;233:57-67.

102. Alp Onen E, Sonmez K, Yildirim F, Demirci EK, Gurel A. Development, analysis, and preclinical evaluation of inactivated vaccine candidate for prevention of Covid-19 disease. All Life. 2022;15(1):771-93.

103. Exposure to continuous darkness ameliorates gastric and colonic inflammation.

104. Kolgazi M, Ozdemir-Kumral ZN, Cantali-Ozturk C, Demirci EK, Yuksel M, Sirvanci S, et al. Anti-inflammatory effects of nesfatin-1 on acetic acid-induced gastric ulcer in rats: involvement of cyclo-oxygenase pathway. J Physiol Pharmacol. 2017;68(5):765-77.

105. Atasoy BM, Deniz M, Dane F, Ozen Z, Turan P, Ercan F, et al. Prophylactic feeding with immune-enhanced diet ameliorates chemoradiation-induced gastrointestinal injury in rats. Int J Radiat Biol. 2010;86(10):867-79.

106. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. J Biol Chem. 2020;295(37):12910-34.

107. Xu E, Xie Y, Al-Aly Z. Long-term gastrointestinal outcomes of COVID-19. Nature Communications. 2023;14(1):983.

108. Park S-k, Lee C-W, Park D-I, Woo H-Y, Cheong HS, Shin HC, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Fecal Samples From Patients With Asymptomatic and Mild COVID-19 in Korea. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2021;19(7):1387-94.e2.

109. Choudhury A, Tariq R, Jena A, Vesely EK, Singh S, Khanna S, et al. Gastrointestinal manifestations of long COVID: A systematic review and meta-analysis. Therapeutic Advances in Gastroenterology. 2022;15:17562848221118403.

110. HUȚANU E, DAMIAN A, RAȚIU I, RUS V, MATEI-LAȚIU M-C, MARTONOS C, et al. Histochemical Evaluation of Mucin-Secreting Cell Activity in the Stomach of the Wistar

Rat. Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine. 2022;79(2).

111. Prasanna LC. Analysis of the Distribution of Mucins in Adult Human Gastric Mucosa and Its Functional Significance. J Clin Diagn Res. 2016;10(2):AC01-4.

112. Moreau GB, Burgess SL, Sturek JM, Donlan AN, Petri WA, Mann BJ. Evaluation of K18-hACE2 Mice as a Model of SARS-CoV-2 Infection. Am J Trop Med Hyg. 2020;103(3):1215-9.

ETİK KURUL KARARI

ÖZGEÇMİŞ