



ARAŞTIRMA / RESEARCH

COVID-19 hastalarında anjiyotensin 2 (ACE2) genin ekspresyon seviyesi

Expression level of the angiotensin 2 (ACE2) gene in patients with COVID-19

Ebubekir Dirican¹, İsmail Erkan Aydın², Şeyda Tuba Savrun²

¹Bayburt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Programı, Bayburt, Turkey

²Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Acil Tıp Anabilim Dalı, Ordu, Turkey

Cukurova Medical Journal 2021;46(4):1508-1515

Abstract

Purpose: Coronavirus disease -19 (COVID-19) is caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARSCoV2). The angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) can play a vital role in regulating the pathological changes of various diseases, including COVID-19. The aim of this study was to analyze the expression of the ACE2 gene in Turkish COVID-19 patients.

Materials and Methods: Eighty COVID-19 PCR test positive patients and 80 PCR test negative healthy volunteers were included in the study. RNA isolation was carried out from all samples. The RT-PCR device was used to analyze the expression of the ACE2 gene.

Results: A significant difference was found in the age, Lactate dehydrogenase (LDH), ferritin and C-reactive protein (CRP) levels of the COVID-19 patients compared to the healthy volunteers. Based on the gene expression results, it was found that ACE2 gene expression was significantly higher in COVID-19 patients compared to healthy volunteers. In patients with COVID-19, a significant difference was found between the expression of the ACE2 gene and the levels of Blood urea nitrogen (BUN), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT) and CRP.

Conclusion: ACE2 gene expression was high in the COVID-19 patients and showed differences based on clinical data. Thus, the expression of ACE2 can have paradoxical effects that support the pathogenicity of SARSCoV2 but, conversely, limit viral infection. The availability of ACE2 receptors may increase the susceptibility and / or disease course of COVID-19.

Keywords: COVID-19, ACE-2, Lactate dehydrogenase, CRP, BUN, Hemoglobin

Öz

Amaç: Coronavirus hastalığı-19 (COVID-19), şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'den (SARS-CoV-2) kaynaklanır. Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), COVID-19 dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patolojik değişikliklerini düzenlemede hayati bir rol oynayabilir. Bu çalışmanın amacı ACE2 genin ekspresyonunu Türk COVID-19 hastalarında analiz etmektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 80 COVID-19 PCR testi pozitif hasta ve 80 PCR testi negatif olan sağlıklı gönüllü birey çalışmaya dahil edildi. Tüm örneklerden RNA izolasyonu yapıldı. ACE2 geninin ekspresyonunu analiz etmek için RT-PZR cihazı kullanıldı.

Bulgular: COVID-19 hastalarının yaş, Laktat dehidrojenaz (LDH), ferritin ve C-reaktif protein (CRP) seviyelerinde sağlıklı gönüllülere kıyasla anlamlı bir fark bulundu. Gen ekspresyon sonuçlarına göre, ACE2 geni ekspresyonu COVID-19 hastalarında sağlıklı gönüllülere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. COVID-19 hastalarında ACE2 geninin ekspresyonu ile Kan üre nitrojeni (BUN), Hemoglobin (HGB), Hematokrit (HCT) ve CRP seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulundu.

Sonuç: ACE2 gen ekspresyonu COVID-19 hastalarında yüksek bulundu ve klinik verilere göre farklılıklar gösterdi. Bu nedenle, ACE2'nin ekspresyonu, SARSCoV2'nin patojenitesini destekleyen ancak tersine viral enfeksiyonu sınırlayan paradoksal etkilere sahip olabilir. ACE2 reseptörlerinin mevcudiyeti, COVID-19'un duyarlılığını ve/veya hastalık seyrini artırabilir.

Anahtar kelimeler: COVID-19, ACE-2, Laktat dehidrojenaz, CRP, BUN, Hemoglobin

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Ebubekir Dirican, Bayburt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Programı, Bayburt, Turkey E-mail ebubekirdirican@bayburt.edu.tr
Geliş tarihi/Received: 13.08.2021 Kabul tarihi/Accepted: 05.10.2021 Çevrimiçi yayın/Published online: 27.10.2021

GİRİŞ

Sars-CoV-2 virüs enfeksiyonu 2019'un son aylarında görülmeye başladı. Sonraki dönemde enfeksiyon tüm dünyaya yayılmaya başladı. 2020 Mart ayından ise bu süreç Dünya Sağlık Örgütü tarafından pandemi olarak ilan edildi ¹. Avrupa Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (European Centre of Disease Prevention and Control) enfeksiyondan etkilenmiş ülkelerde yaklaşık 5.899.866 vakanın olduğunu ve bunlar içerisinde 364.891 kişinin enfeksiyondan dolayı öldüğünü tahmin ettiklerini belirtmişlerdir (<https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>).

Bazı bireylerin Sars-CoV-2 enfeksiyonuna daha duyarlı olmasının altında yatan mekanizmaların araştırılması ve bunların bir alt grubunun neden ağır pnömoni, akut respiratuar distres sendromu (ARDS) ve ölüme yatkın olduğunu anlamamızı, COVID-19 için daha iyi bir yaklaşımın ve daha etkili tedavilerin ortaya çıkmasını sağlayacaktır ². Bu çalışmada biz Sars-CoV-2'in primer reseptörü olan Anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE2)'yi araştırmayı hedefledik. Böylece gelecekte, ACE2'nin COVID-19 hastalığının ilerlemesi üzerinde nasıl bir etkiye sahip olabileceği ve dolayısıyla potansiyel bir terapötik stratejide nasıl kullanılabileceğine dair yeni fikirlerin ortaya çıkmasına ışık tutacağına inanıyoruz.

ACE2, 805-amino asit monokarboksipeptidaz tip I transmembran glikoproteini olup, 2000 yılında keşfedilmiştir. ACE2 geni, Xp22 kromozomunda bulunur ve oldukça polimorfiktir. ACE2, özellikle akciğer alveolar epitel hücreleri, kalp, böbrek ve gastrointestinal sistem olmak üzere birçok dokuda eksprese olmaktadır ³. ACE2, yakın zamanda COVID-19'a neden olan virüsün giriş reseptörü olarak tanınan çok işlevli bir transmembran protein olduğu belirlenmiştir. Renin-anjiyotensin sisteminde (RAS), ACE2, anjiyotensin II'yi (Ang II) anjiyotensin 1-7'ye (Ang 1-7) ayırır; bunun, esas olarak bir reseptör olan Mas aracılığıyla RAS'ın aktivasyonunu engellemek için iskelet kası dahil birçok organda hücrel tepkiler uyguladığı düşünülmektedir ⁴. ACE2, renin-anjiyotensin sisteminin ve kan basıncının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. ACE2 ayrıca integrin sinyali dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesinde de görev almaktadır ⁵.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, ACE2'nin birden fazla organda ki yaygın dağılımı ve ifadesi, COVID-19'un çeşitli klinik sonuçlarını anlamamız için kritik öneme sahip olabileceğini düşünüyoruz. Bu yüzden, bu

çalışmada COVID-19 olan hastalarda ve PCR testi negatif olan bireylerde ACE2 genin mRNA ekspresyonunu karşılaştırmayı ve klinik-demografik verilerle olan ilişkisini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin toplanması

Bu çalışmaya Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Etik Kurul'unun B.30.2.ATA.0.01.00/343-36 sayılı onayı ve Sağlık Bakanlığı izniyle COVID-19 enfeksiyon şüphesiyle Ordu Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Servisi'ne başvurmuş olan 80 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR=PCR) testi pozitif olan COVID-19 hastası ve 80 test sonucu negatif olan sağlıklı gönüllü bireyler dahil edilmiştir. Yüksek ateş, öksürük, nefes darlığı, baş ağrısı, boğaz ağrısı, burun akıntısı, kas ve eklem ağrısı, halsizlik, koku ve tat alma duyusu kaybı, ishal gibi belirtiler taşıdığı için COVID-19 olduğundan şüphelenilen tüm hastalar çalışmaya dahil edildi.

DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) örgütünün yönergelerine göre, PCR testi ile SARS-CoV-2 RNA tanısı konan 18 yaş üstü hastalar, semptom durumlarına bakılmaksızın çalışmaya dahil edildi. Çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yapılmıştır. Tüm örneklerden 1 hemogram tüpünde 2 cc kan alındı. RT-PCR gen ekspresyon deneyleri yapılncaya kadar kan örnekleri (-20° C)'de saklandı.

Uygulama

RNA izolasyonu

RNA izolasyon işlemi için EcoSpin kandan total RNA izolasyon kiti (Katalog no: E2075, Ecotechbiotechnology, Türkiye) tercih edildi. Tüm RNA izolasyon işlemleri Bayburt Üniversitesi, SHMYO, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvar'ında gerçekleştirildi.

İlk önce 100 µl tam kan örneği, EcoSpin RBCL Buffer ve EcoSpin Lysis/Binding Buffer kullanılarak lizat hazırlandı. Diğer aşamalar ise ilgili firmanın ticari kitindeki tavsiyelere göre takip edilerek tüm örneklerin RNA izolasyonları başarıyla gerçekleştirildi. RNA izolasyon işlemlerinin ardından Nanodrop (Epoch Spectrophotometer System and Take3 Plate (BioTek, Winooski Vermont, USA)) cihazında 260/280 nm dalga boyunda RNA konsantrasyonları ve saflık dereceleri belirlendi. İlgili kitin firmasının önerisine göre, gen ekspresyon

deneyleri birkaç gün içinde yapılıncaya kadar, RNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

cDNA Sentezi

cDNA sentez reaksiyonu için Bio-Rad İscript cDNA kiti (Katalog no:1708890, USA) tercih edildi. Tüm örneklerin cDNA sentez işlemleri Bayburt Üniversitesi, SHMYO, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvar'ında gerçekleştirildi. 4 µl 5x iScript reaction miks, 1 µl of iScript reverse transcriptase, 8 µl RNA örneği ve üzeri 20 µl'ye tamamlamak için PCR grade su eklendi ve thermalcycler cihazında ilgili kitin tavsiye ettiği sıcaklıklara göre program ayarlanıp, reaksiyon gerçekleştirildi. RT-PCR gen ekspresyon deneyleri yapılıncaya kadar cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

Gen ekspresyon aşaması

ACE2 mRNA ekspresyon işlemleri için SsoAdvanced Universal *SYBR Green* Supermix (Bio-Rad) (Katalog no:1725270, USA) kiti tercih edildi. mRNA ekspresyon deneyleri için Atatürk Üniversitesi, DAYTAM araştırma merkezinde mevcut olan Bio-Rad CFX-96 RT-PCR cihazında gerçekleştirildi.

mRNA ekspresyon analiz için reaksiyon başına 10 µl SsoAdvanced Universal *SYBR Green* Supermix (Bio-Rad), 5 µl cDNA (100 ng), 1 µl forward primer (250-500 nM), 1 µl reverse primer (250-500 nM) ve 3 µl PCR grade su kullanıldı. İlgili firmanın master miks kitinde önerilmiş olan reaksiyon koşullarına göre PCR programı ayarlanıp, her örnek için reaksiyon iki kez (duplicate) gerçekleştirildi. Beta-actin referans (housekeeping) gen olarak tercih edildi. PCR reaksiyonunun sonunda ACE2 genin rölatif ekspresyon analizleri için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanıldı. ACE2 gen ekspresyonunun belirlenmesi için Beta-actinle normalize edilerek tüm değerlendirmeler yapıldı.

Bu çalışmada insan Beta actin ve ACE2 genleri için tercih edilmiş olan primer dizileri aşağıda gösterilmiştir;

Beta-actin için primer dizileri;

Primer-F: 5- CCTCCTGAGCGCAAGTACTC -3

Primer-R: 5- TGCTTGCTGATCCACATCTG -3

ACE2 için primer dizileri;

Primer-F:5- CCATTGGTCTTCTGTACCCG -3

Primer-R:5- GACCATCCACCTCCACTTCTC -3

Biyokimyasal ve hematolojik verilerin toplanması

COVID-19 şüphesiyle Ordu Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Servisi'ne başvurmuş ve PCR testi yapılmış olan sağlıklı ve hasta bireyler çalışmaya dahil edildi. COVID-19 şüphesiyle başvurmuş olan kişilerin, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından önerilen ve rutin bakılan kreatinin, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), ferritin, beyaz küre (WBC), hemoglobin (HGB), platelet (PLT), nötrofil (NEU), lenfosit (LYM) ve C-reaktif protein (CRP) gibi hematolojik ve biyokimyasal test sonuçları hastane veri tabanı üzerinden her bir hasta için geriye dönük olarak alındı. COVID-19 PCR testi pozitif ve negatif bireylerin klinik verileri, laboratuvar referans değerlerine göre ortalama±standart sapmaya göre dağılımları ve istatistiksel analizler sonucu aralarındaki farklar belirlendi.

İstatistiksel analizler

Tüm verilerin istatistiksel analizleri Graphed Prism 7.04 (GraphPad Software, San Diego, USA) ve SPSS 16 (SPSS Inc., Chicago, USA) paket programlarıyla gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen örnek sayısı için herhangi bir power analizi yapılmadı. Normal dağılan değişkenleri tanımlamak için Ortalama±Sd kullandık. Verilerin dağılımlarını belirlemek için D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov normalizasyon testleri yapıldı. Normalizasyon test sonucuna göre 't test (ve nonparametrik)' veya 'One-way ANOVA (ve nonparametrik)' testlerden biri tercih edilir. Fakat verilerimiz normal dağılmadığı için iki grup arasındaki ilişkiyi belirlemede bir nonparametrik test olan Mann-Whitney test tercih edildi. Sağlıklı gönüllüler ve COVID-19 pozitif olan hastalar arasındaki ACE2 gen ekspresyon dağılımlarının analizi için Mann-Whitney test kullanıldı. COVID-19 (+) ve negatif olan örneklerin klinik verilerinin dağılımının belirlenmesinde Mann-Whitney test tercih edildi. Son olarak ACE2 gen ekspresyonunun COVID-19 hastalarının klinik-demografik verileri ile olan ilişkisinin belirlenmesinde de Mann-Whitney testi kullanıldı. Analiz sonucuna göre, p<0.05'ten küçük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

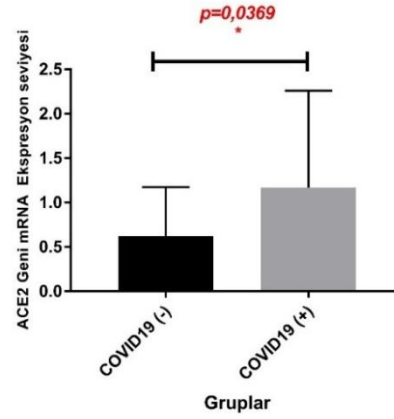
Bu çalışmaya 80 COVID-19 PCR testi pozitif ve 80 negatif olan toplam 160 birey dahil edilmiştir.

COVID-19 pozitif olan hastaların yaşları 19 ile 92 arasında yer alıyordu. COVID-19 negatif olan sağlıklı bireylerin yaşları ise 21 ile 92 arasında yer alıyordu. COVID-19 hastaların yaş ortalaması 57.78 iken, sağlıklı örneklerin yaş ortalaması 45.75 olarak belirlendi. COVID-19 hastaların yaş, LDH, ferritin ve CRP değerlerinin COVID-19 negatif örneklerle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu belirlendi ($p= 0.0002$; $p= 0.0201$; $p= 0.0318$; $p<0.0001$, sırasıyla).

Ortalama LDH seviyesi COVID-19 hastalarında 232.89 U/L, ortalama ferritin seviyesi 201.44 $\mu\text{g/L}$ ve ortalama CRP seviyesi 4.41 mg/dL olarak belirlendi. Diğer taraftan COVID-19 hastaların kreatinin, AST, ALT, WBC, HGB, PLT, NEU ve LYM değerleri sağlıklı örneklerle kıyasla yüksek olduğu halde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Tablo 1’de COVID-19 pozitif ve negatif olan bireylerin yaş ve biyokimyasal verilerin dağılımları özetlenmiştir.

ACE2 geni mRNA ekspresyon seviyesinin COVID-19 hastalarında, sağlıklı örneklerle kıyasla anlamlı

derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.0369$) (Grafik 1).



Grafik 1. ACE2 geni mRNA ekspresyon seviyesinin COVID-19 (+) ve negatif olan örneklerdeki dağılımı

Tablo 1. COVID-19 pozitif ve negatif olan örneklerin klinik verilerinin dağılımı

Parametre (Referans aralığı)	COVID-19 (+) (n=80) (ortalama±SD)	COVID-19 (-) (n=80) (ortalama±SD)	<i>p</i>
Yaş (Yıl)	57.78±20.52	45.75±18.27	***0.0002
Kreatinin (0.50-0.90 mg/dL)	0.89±0.35	0.83±0.61	0.1098
AST (0-32 U/L)	24.5±12.43	21.9±13.34	0.0661
ALT (0-33 U/L)	24.5±21.71	21.26±13.10	0.5471
LDH (135-214 U/L)	232.89±80.05	208.88±73.04	*0.0201
Ferritin (30-400 $\mu\text{g/L}$)	201.44±220.10	120.14±104.05	*0.0318
WBC (4.49-12.6 10 ³ / UL)	7.62±5.38	7.38±3.11	0.7202
HGB (12.3-15.3 g/dL)	12.98±1.94	12.92±2.04	0.9085
PLT (150-450 10 ³ / UL)	232.49±64.12	230.38±90.49	0.5249
NEU (1.8-6.98 10 ³ / UL)	4.95±2.93	4.85±2.84	0.9113
LYM (1.26-3.35 (0 ³ / UL)	1.959±3.04	1.84±0.98	0.3279
CRP (0-0.5 mg/dL)	4.41±5.98	1.69±4.15	****<0.0001

AST; Aspartate aminotransferase, ALT; Alanine aminotransferase, LDH; Lactate dehydrogenase, WBC; White blood cell, HGB; hemoglobin, PLT; Platelet, NEU; Neutrophil, LYM; Lymphocyte, CRP; C-reactive protein. * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 2. COVID-19 hastalarında ACE-2 gen ekspresyonu ile klinik veriler arasındaki ilişkinin belirlenmesi

	Kan seviyesi	ACE2 ortalama gen ekspresyon seviyesi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ mean) (fold change)	*p
BUN (6-18 mg/dL)	Normal	1.239	*0.0450
	Yüksek	0.700	
Kreatinin (0.50-0.90 mg/dL)	Normal	1.036	0.8349
	Yüksek	1.388	
AST (0-32 U/L)	Normal	1.064	0.2102
	Yüksek	1.505	
ALT (0-33 U/L)	Normal	1.061	0.3061
	Yüksek	1.713	
LDH (135-214 U/L)	Normal	1.040	0.6976
	Yüksek	1.202	
Ferritin (30-400 µg/L)	Normal	1.337	0.3929
	Yüksek	0.860	
HGB (12.3-15.3 g/dL)	Normal	1.270	*0.0228
	Düşük	0.754	
HCT (%) (35.7-43.8)	Düşük	0.577	*0.0103
	Yüksek	2.125	
PLT (150-450 10 ³ / UL)	Normal	1.122	0.1322
	Düşük	2.544	
NEU (1.8-6.98 10 ³ / UL)	Yüksek	1.148	0.6857
	Normal	1.220	
LYM (1.26-3.35 10 ³ /UL)	Normal	1.143	0.4889
	Düşük	0.981	
CRP (0-0.5 mg/dL)	Normal	1.980	*0.0248
	Yüksek	0.979	

BUN; Blood urea nitrogen, AST; Aspartate aminotransferase, ALT; Alanine aminotransferase, LDH; Lactate dehydrogenase, WBC; White blood cell, HGB; hemoglobin, HCT; Hematocrit, MCV; Mean corpuscular volume, PLT; Platelet, NEU; Neutrophil, LYM; Lymphocyte, CRP; C-reactive protein.

*p<0.05 istatiks olarak anlamlı

COVID19 hastalarında ACE2 geninin mRNA ekspresyonu ile BUN, HGB, HCT ve CRP seviyeleri arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0450$; $p=0.0228$; $p=0.0103$; $p=0.0248$, sırasıyla) (Tablo 2). Fakat ACE2 genin mRNA ekspresyonu ile diğer (AST, ALT, kreatinin gibi) klinik veriler arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 2).

COVID-19 hastalarında ACE2 geni ekspresyonun erkek bireylerde kadınlara kıyasla yüksek olduğu, fakat istatiks olarak anlamlı fark bulunamadı

($p=0.7910$) (Tablo 3). Bununla birlikte, COVID-19 hastalarının sahip oldukları diğer ek hastalıklarına göre, ACE2 geni ekspresyonunu analiz ettiğimizde, ek hastalığı olanların başka hastalığı olmayanlara kıyasla daha yüksek ACE2 gen ekspresyonuna sahip oldukları saptandı ($p>0.05$). KOAH, hipertansiyon, diyabet, kronik böbrek rahatsızlığı, yatış durumu, mortalite durumu ve akciğer tutulumu olan bireylerin ACE2 geni ekspresyonu yüksek olduğu belirlendi, ancak istatiks olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 3).

Tablo 3. ACE2 geni ekspresyonunun COVID-19 hastalarının cinsiyet ve ek hastalık durumlarına göre dağılımı

Parametreler	ACE2 Geni ekspresyonu kat değimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ mean) (fold change)	*p
Ek hastalık		
Var	0.6986	0.5199
Yok	0.5836	
KOAHI		
Var	0.8025	0.6096
Yok	0.6986	
Kardiyovasküler Hastalık		
Var	0.7506	0.6037
Yok	0.8484	
Hipertansiyon		
Var	0.9812	0.2865
Yok	0.8308	
Diyabetes Mellitus		
Var	1.129	0.3531
Yok	0.7506	
Kronik böbrek rahatsızlığı		
Var	0.9098	0.9550
Yok	0.8166	
Cinsiyet		
Kadın	0.8025	0.7910
Erkek	0.8308	
Yatış durumu		
Var	1.096	0.7069
Yok	0.8484	
Mortalite durumu		
Var	1.031	0.2683
Yok	0.634	
Akciğer tutulum durumu		
Var	1.123	0.7270
Yok	0.8308	

KOAHI: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı; *p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

TARTIŞMA

COVID-19 pandemisi küresel bir sağlık sorunudur⁶. 200'den fazla ülkenin etkilendiği ve 194.549.418 vakayla ciddi bir sağlık sorunu olarak yer almaktadır. SARS-CoV-2'nin enfeksiyonuna ve hücrel girişine, koronavirüsün spike glikoproteini ve konakçı hücrel SARS-CoV reseptörü ACE2 aracılık etmektedir^{7,8}. Fakat ACE2 ile viral partikül arasındaki etkileşimleri ve ayrıca kofaktörlerin bu süreç üzerindeki etkisini incelemek için daha fazla karakterizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır^{9,10}. Bizde bu çalışmada Türk COVID-19 hastalarında ACE2 genin mRNA ekspresyonunu COVID-19 hastalarında analiz ettik. Literatüre PUBMED veri tabanına baktığımızda: Türk COVID-19 hastalarında ACE2 geni ekspresyonu ile ilgili pek fazla çalışma göremedik. Bu yüzden ACE2 genin Türk COVID-19 hastalarındaki ekspresyon profilini ortaya koyma

adına çalışmamızın önemli olduğuna inanıyoruz. Ayrıca yeni yapılacak çalışmalara da ışık tutacağımızı ümit ediyoruz.

COVID-19 hastalarının klinik verilerini sağlıklı örneklerle kıyasladığımızda; COVID-19 hastaların yaş, LDH, ferritin ve CRP seviyelerinin COVID-19 negatif olan örneklerden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğunu belirledik. Diğer taraftan COVID-19 hastaların kreatinin, AST, ALT, WBC, HGB, PLT, NEU ve LYM değerleri PCR testi negatif olan örneklerle kıyasla daha yüksek olduğu halde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık. Ayrıca COVID-19 hastalarında ACE2 geni ekspresyonun erkek hastalarda kadın hastalara kıyasla yüksek olduğunu, fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. Gholizadeh ve ark. (2020) da bizimle benzer sonuçları bulmuşlardır. COVID-19 hastalarında CRP, LDH, AST ve ALT seviyelerini

yüksek bulduklarını bildirmişlerdir¹¹. Özellikle CRP seviyesinin bir inflamatuvar yanıt faktörü olduğu, makrofaj ve adipozitler tarafından karaciğerden üretildiğini biliyoruz. O yüzden COVID-19 hastalığında da CRP seviyesinin artması beklenen bir durum olduğunu söyleyebiliriz. Guan ve ark. (2020) ise COVID-19 hastalarında AST ve ALT seviyelerini anormal oranda bulduklarını rapor etmişlerdir¹².

Gen ekspresyon sonuçlarımıza baktığımızda; ACE2 genin ekspresyon seviyesinin COVID-19 hastalarında sağlıklı örneklerle kıyasla anlamlı seviyede yüksek olduğunu gördük. COVID-19 hastalarında ACE2 geninin mRNA ekspresyonu ile BUN, HGB, HCT ve CRP seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulundu. Fakat ACE2 genin mRNA ekspresyonu ile diğer (AST, ALT, kreatinin gibi) klinik veriler arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Literatüre baktığımızda, bazı çalışmalarda COVID-19 hastalarında ACE2 geni ekspresyonunun düşük, bazı çalışmalarda ise ACE2 geni ekspresyonunun yüksek olduğu rapor edilmiştir. Biz bu durumu hastaların COVID-19 enfeksiyonu dışında başka ek hastalıklarının olması, ACE2 ekspresyonunun artmasına veya azalmasına sebep olabileceğini düşünmekteyiz. ACE2 ekspresyon seviyeleri, daha yüksek yaş hasta gruplarıyla karşılaştırıldığında, 10 yaşın altındaki çocukların nazal epitelinde daha düşük olduğu; bu yaşa bağlı ACE2 ekspresyonunun, gençler arasında SARS-CoV-2'ye daha düşük duyarlılığı açıklamaya yardımcı olabileceği belirtilmiştir¹³. Üst solunum yolunun nazal epitelinde, daha düşük ACE2 ekspresyonu, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun bulaş oranını azaltmada yardımcı olabileceği bildirilmiştir¹⁴.

Çeşitli organlarda, dokularda ve hücre tiplerinde ACE2 ekspresyon profili, 2019-nCov'un potansiyel enfeksiyon yolları için bize bir biyoinformatik kanıt sağlar ve bu da sunulan semptomlarla ilişkili olabilir¹⁵. Sigara içenlerin solunum yollarında daha yüksek ACE2 ekspresyon seviyesine sahip oldukları, bu da SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında daha yüksek ACE2 ekspresyonu için bir risk etkisi hipotezini desteklemektedir¹⁶. Başka araştırmaların bulgularına göre; hipertansiyonlu bireylerde ve anjiyotensin reseptör bloker tedavisi sonrasında daha yüksek ACE2 ekspresyon düzeylerinin beklenebileceğini bildirilmiştir^{17,18}. Chai ve ark. (2020) spesifik ACE2'nin akciğerlerde olduğu kadar karaciğerde de eksprese olduğu ve bu durumun COVID-19 hastalarında karaciğer hasarı oluşturabileceğini belirtmişlerdir¹⁹.

ACE2 yüksekliği, COVID-19 hastalık şiddeti ile yerleşik risk faktörleri hipertansiyon, önceden var olan kalp hastalığı ve böbrek hastalığı arasında bir bağlantı olabileceği bildirilmiştir²⁰. Artan dolaşımdaki ACE2, majör kardiyovasküler hastalık riskinin artmasıyla da ilişkilendirilmiştir²¹. ACE2 reseptörlerinin ekspresyonu, akciğerin tip II alveolar epitel hücreleri, kalp, ileum, böbrek, endotel ve mesanenin hücrelerinde daha fazla bulunmuştur^{15,22,23}. Bu çalışmada, COVID-19 hastalarının sahip oldukları diğer başka hastalıklara göre ACE2 geni ekspresyonunu analiz ettiğimizde, ek hastalığı olanların olmayanlara kıyasla daha yüksek ACE2 gen ekspresyonuna sahip olduklarını saptadık. KOAH, hipertansiyon, diyabet, kronik böbrek rahatsızlığı, yatış durumu, mortalite durumu ve akciğer tutulumu olan bireylerin ACE2 geni ekspresyonunun yüksek olduğu belirlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları vardır. İlk olarak daha fazla COVID-19 hasta örneğinde çalışılabileseydi ve daha fazla klinik verilerle ACE2 geni ekspresyonunun önemini ortaya koymada değerli olabilirdi. İkincisi tüm PCR testi negatif olan örneklerin klinik-demografik bilgilerine de ulaşılabileseydik ACE2 geni ekspresyonunun yüksek veya düşük çıkma durumlarını klinik-demografik verilere göre ekspresyon farklılıklarını açıklamamızda bize farklı ipuçları sunabilirdi. ACE2 genindeki ekspresyon farklılıklarının COVID-19 hastalığının şiddetini etkileyebileceğini ve tedavide yönlendirici olabileceğini düşünüyoruz.

Bu sonuçlar Türk COVID-19 hastalarında ACE2 geni ekspresyonunun sağlıklı kişilere kıyasla yüksek olduğunu ve klinik verilere göre farklılıklar gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır. Bireylerin yaşı veya klinik verileriyle bu farklılığı açıklayabilmemiz için mutlaka gelecekte daha geniş hasta popülasyonunda ACE2 geni ekspresyonunu analiz edilmesi ve öneminin ortaya konması hastalığın prognozunu tahmin etmemizde yardımcı olacaktır.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: ED, İEA, ŞTS; Veri toplama: ED, İEA, ŞTS; Veri analizi ve yorumlama: ED, İEA, ŞTS; Yazı taslağı: ED, İEA, ŞTS; İçeriğin eleştirel incelenmesi: ED, İEA, ŞTS; Son onay ve sorumluluk: ED, İEA, ŞTS; Teknik ve malzeme desteği: ED, İEA, ŞTS; Süpervizyon: ED, İEA, ŞTS; Fon sağlama (mevcut ise): yok.
Etik Onay: Bu çalışma için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 24.06.2021 tarih ve 36/5 sayılı karar ile etik onay alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Author Contributions: Concept/Design : ED, İEA, ŞTS; Data acquisition: ED, İEA, ŞTS; Data analysis and interpretation: ED, İEA,

ŞTS; Drafting manuscript: ED, İEA, ŞTS; Critical revision of manuscript: ED, İEA, ŞTS; Final approval and accountability: ED, İEA, ŞTS; Technical or material support: ED, İEA, ŞTS; Supervision: ED, İEA, ŞTS; Securing funding (if available): n/a.

Ethical Approval: For this study, ethical approval was obtained from the Ethics Committee of Clinical Research of Atatürk University Faculty of Medicine with the decision No. 36/5 dated 24.06.2021.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors have stated that there are no conflicts of interest at the stage of preparation and publication of this article.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

KAYNAKLAR

- Gül Ü. COVID-19 and dermatology. *Turk J Med Sci.* 2020;50:1751–9.
- Scialo F, Daniele A, Amato F, et al. ACE2: The major cell entry receptor for SARS-CoV-2. *Lung.* 2020;198:867–77.
- Wiese O, Zemlin AE, Pillay TS. Molecules in pathogenesis: angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). *J Clin Pathol.* 2021;74:285–90.
- Yamamoto K, Takeshita H, Rakugi H. ACE2, angiotensin 1-7 and skeletal muscle: review in the era of COVID-19. *Clin Sci.* 2020;134:3047–62.
- Beacon TH, Delcuve GP, Davie JR. Epigenetic regulation of ACE2, the receptor of the SARS-CoV-2 virus 1. *Genome.* 2021;64:386–99.
- 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;382:727–33.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020;181:271–280.e8.
- Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science.* 2020;367:1444–8.
- Kowalczyk S, Bröer A, Tietze N, Vanslambrouck JM, Rasko JEJ, Bröer S. A protein complex in the brush-border membrane explains a Hartnup disorder allele. *FASEB J.* 2008;22:2880–7.
- Lin Q, Keller RS, Weaver B, Zisman LS. Interaction of ACE2 and integrin $\beta 1$ in failing human heart. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2004;1689:175–8.
- Gholizadeh P, Safari R, Marofi P, Zeinalzadeh E, Pagliano P, Ganbarov K et al. Alteration of liver biomarkers in patients with SARS-CoV-2 (COVID-19). *J Inflamm Res.* 2020;13:285–92.
- Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX et al. Clinical characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382:1708–20.
- Bunyavanich S, Do A, Vicencio A. Nasal gene expression of angiotensin-converting enzyme 2 in children and adults. *JAMA.* 2020;323:2427.
- Patel AB, Verma A. Nasal ACE2 levels and COVID-19 in children. *JAMA.* 2020;323:2386.
- 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;12:8.
- Smith JC, Sausville EL, Girish V, Yuan ML, Vasudevan A, John KM et al. Cigarette smoke exposure and inflammatory signaling increase the expression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 in the respiratory tract. *Dev Cell.* 2020;53:514–529.e3.
- Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension.* 2004;43:970–6.
- Wang X, Ye Y, Gong H, Wu J, Yuan J, Wang S et al. The effects of different angiotensin II type 1 receptor blockers on the regulation of the ACE-AngII-AT1 and ACE2-Ang(1–7)-Mas axes in pressure overload-induced cardiac remodeling in male mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;97:180–90.
- Chai X et al., Chai X, Hu L, Han W, Lu Z, Ke A et al. Specific ACE2 expression in cholangiocytes may cause liver damage after 2019-nCoV infection. *BioRxiv.* 2020; doi:10.1101/2020.02.03.931766
- Kragstrup TW, Singh HS, Grundberg I, Nielsen ALL, Rivellesse F, Mehta A et al. Plasma ACE2 predicts outcome of COVID-19 in hospitalized patients. *PLoS One.* 2021;16:e0252799.
- Narula S, Yusuf S, Chong M, Ramasundarahettige C, Rangarajan S, Bangdiwala SI et al. Plasma ACE2 and risk of death or cardiometabolic diseases: a case-cohort analysis. *Lancet.* 2020;396:968–76.
- Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med.* 2020;14:185–192.
- Zhang W, Zhao Y, Zhang F, Wang Q, Li T, Liu Z et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The experience of clinical immunologists from China. *Clin Immunol.* 2020;214:108393.