



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

**CHİTİNASE-3-LİKE PROTEİN 1 VE IL 1ALFA COVID-19 İÇİN YENİ BİR
İNFLAMASYON BİYOMARKERİ MIDIR?**

Proje No: TSA-2020-8636

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Emine Parlak
Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

Dr. Öğretim Üyesi Esra Laloğlu
(Biyokimya)

14 Nisan 2021

ERZURUM

İÇİNDEKİLER

Önsöz:

“Chitinase-3-Like Protein 1 ve IL 1alfa Covid-19 İçin Yeni Bir İnflamasyon Biyomarkeri midir?” başlıklı projemiz COVID-19 geçirmekte olan hastalarda hastalık şiddeti ile chitinase 3-like protein 1 (YKL-40), IL-1 alfa ve IL 6 düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmakta olduğumuz tedavide bu ürünlerin kullanımının haklı kanıtı olup olmadığı konusunda bir ön çalışma niteliğindedir. BAP tarafından temel araştırma kapsamında desteklenmiştir (TSA-2020-8636).

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	7
2. YÖNTEM	8
3. BULGULAR	10
4.TARTIŞMA/SONUÇ	11
5. Tablo 1. Hasta ve Kontrol gruplarının serum düzeyleri	11
6. Şekil 1. Klinik şiddetine göre gruplandırdığımızda chitinase 3-like protein 1 box plot grafiği	12
7. Şekil 2. Klinik şiddetine göre gruplandırdığımızda IL 6 box plot grafiği	13
8. Şekil 3. chitinase 3-like protein 1 ile IL-6 arasındaki korelasyon grafiği	14
9. KAYNAKLAR	15

ÖZET

Giriş: COVID-19 hastalığı yeni bir koronavirüsün neden olduğu enfeksiyon hastalığıdır. Etken SARS CoV-2'dir. COVID-19 ölümcül olabilen bir enfeksiyondur. SARS-COV-2 enfeksiyonu ile inflamasyon arasında ilişki mevcuttur. SARS COV-2 enfeksiyonunda chitinase 3-like protein 1, IL-1 alfa ve IL-6 biyobelirteçleri inflamasyonda önemli role sahiptir.

Amaç: Bu çalışmada, Covid-19 hastalarında Chitinase-3-Like Protein 1'in, IL-1 alfa'nın ve IL-6 düzeylerinin enfeksiyonun şiddeti, prognoz açısından ilişkisinin araştırılmasıdır. COVID-19 hastalarında özellikle gerek takip edilmesi gereken biyobelirteçler olarak IL1 alfa ve chitinase 3 like 1 değerlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya SARS Cov-2 PCR pozitif 60 erişkin hasta (22 hafif, 25 orta ve 13 ağır) ve 50 sağlıklı kontrol (23'ü kadın, 27'i erkek) alındı. Alınan serum örneği -80 derecede saklandı. Chitinase 3-like protein 1 (YKL-40), IL-1 alpha ve IL-6 düzeyleri hastanemiz Klinik Biyokimya Laboratuvarında çalışıldı. İstatistik analizleri SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, United States) programı kullanılarak yapıldı.

Bulgular:

Serum Chitinase 3-like protein 1 düzeyi şiddetli hastalarda ($7185,5 \pm 1109,4$), orta ($3977,4 \pm 1260,3$), hafif ($1379,5 \pm 598,8$) ve kontrol ($329,5 \pm 128,4$) gruplarına göre istatistiksel anlamlı oranda yükseldi ($p < 0.001$). IL 1 alfa düzeyleri hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p = 0.083$)

IL-6 düzeyleri kontrol grubunda en düşük ($35,9 \pm 13,7$), hafif grupta ($89,1 \pm 23,4$), orta grupta ($156,2 \pm 29,6$), şiddetli grupta ($214,9 \pm 28,1$) en yüksek olmak üzere anlamlı olarak farklıydı ($p < 0.001$). Serum IL-6 ve chitinase 3-like protein 1 düzeyleri ($p < 0.001$, $r = 0.894$) arasında pozitif anlamlı ve güçlü bir korelasyon saptandı. Chitinase 3-like protein 1 ile hastalık şiddeti arasında ($p < 0.001$, $r = 0.905$) güçlü pozitif ve anlamlı

korelasyon vardı. Hastalık şiddetini göstermede faydalı bulundu. IL-6 ile hastalık şiddeti arasında ($p<0.001$, $r=0.870$) güçlü pozitif ve anlamlı korelasyon var. Hastalık şiddetini göstermede faydalı idi.

Sonuç:

Serum chitinase 3-like protein 1 ve IL-6 seviyeleri ile COVID-19 enfeksiyonunun klinik seyri arasında doğrusal ilişki bulundu. Bu sonuçlar biyomarker inhibitörlerinin hastalığın tedavisinde kullanılabileceklerine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Coronavirüs, Covid-19, Chitinase-3 like protein 1, IL-1 alfa, inflamasyon, İnflamatuvar biyobelirteç, SARS-CoV-2

SUMMARY

Introduction: COVID-19 disease is an infectious disease caused by a novel coronavirus. The agent is SARS CoV-2. COVID-19 is a potentially fatal infection. An association exists between SARS-COV-2 infection and inflammation. The biomarkers chitinase 3-like protein-1, IL-1 alpha, and IL-6 play an important role in inflammation in SARS COV-2 infection.

Aim: This study investigated the association between chitinase 3-like protein-1, IL-1 alpha and IL-6 levels and severity of infection in terms of prognosis in Covid-19 patients.

The aim was to investigate the value of IL-1 alpha and chitinase 3 like-1 values as biomarkers requiring particular monitoring in Covid-19 patients.

Method: Sixty adult SARS Cov-2 PCR-positive patients (22 mild, 25 moderate, and 13 severe) and 50 healthy controls (23 female, 27 male) were included in the study. Serum specimens were stored at -80 degrees. Chitinase 3-like protein-1 (YKL-40), IL-1 alpha, and IL-6 levels were studied in our hospital's clinical biochemistry laboratory. Statistical analyses were performed on SPSS 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results:

Mean serum Chitinase 3-like protein-1 levels in the severe disease patients (7185.5 ± 1109.4) were significantly higher than in the moderate (3977.4 ± 1260.3), mild (1379.5 ± 598.8), and control (329.5 ± 128.4) groups ($p=0.001$). No difference was observed in IL-1 alpha levels between the patient and control groups ($p=0.083$). IL-6 levels differed significantly, being lowest in the control group (35.9 ± 13.7), 89.1 ± 23.4 in the mild group, 156.2 ± 29.6 in the moderate group, and highest in the severe group (214.9 ± 28.1) ($p=0.001$). Positive, significant, powerful correlation was determined between serum IL-6 and chitinase 3-like protein-1 levels ($p<0.001$, $r=0.894$). Chitinase 3-like protein-1 was powerfully, significantly positively correlated with severity of disease ($p<0.001$, $r=0.905$), and was found to be useful in showing disease severity. IL-6 was also powerfully, significantly positively correlated with severity of disease ($p<0.001$, $r=0.870$), and was useful in showing disease severity.

Conclusion:

Serum chitinase 3-like protein-1 and IL-6 levels exhibited a linear correlation with the clinical course of COVID-19 infection. These results indicate that biomarker inhibitors may be capable of use in treating the disease.

Keywords: Coronavirus, Covid-19, Chitinase 3-like protein-1, IL-1 alpha, inflammation, inflammatory biomarker, SARS-CoV-2

GİRİŞ:

COVID-19 hastalığına neden olan SARS CoV-2 zarflı bir RNA virüsüdür(1). SARS-CoV-2, alveoler ve gastrointestinal epitel hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak doğal ve edinilmiş bağışıklık sistemini aktive ederek çok sayıda sitokin salınmasına neden olur. T hücre ve monosit/makrofaj aktivasyonu ile gözlenen aşırı sitokin salınımının oluşturduğu inflamatuvar yanıt, vasküler permeabiliteyi artırır, alveollerde eksüdatif sıvı birikimine yol açar. Ciddi solunum yetmezliği oluşturabilmektedir.

Koronavirüs ile ilişkili şiddetli akut solunum sendromunun patogeneğinde, yüksek plazma inflamatuvar sitokinleri [interlökinler (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), içeren bir sitokin fırtınası yer alır. Bu durum hastalığın şiddeti ile orantılıdır.

Chitinase-3 like-1 (CHI3L1), inflamasyon, endotel disfonksiyonu, remodellingde rol oynayan ve inflamasyon için noninvaziv prognostik biyobelirteç olarak kabul edilen bir glikoproteindir (2).

IL-1 alfa ise ateş, fibrozis ve inflamasyonun uyarıldığı viral enfeksiyonlarda düzeyi artan bir sitokindir. COVID-19 enfeksiyonunda düzeyinin arttığını gösteren yayınlar mevcuttur (3).

GENEL BİLGİLER

COVID-19 hastalığına neden olan SARS CoV-2 zarflı bir RNA virüsüdür. Bulaşması insandan insana damlacık yoluyla ve kirli yüzeylerle temas eden ellerin ağız, burun ve göze teması yoluyla bulaştığı gösterilmiştir. Ciddi solunum yetmezliği oluşturabilmektedir (7).

Hastalığın inkübasyon süresi ortalama 4-6 gün arasındadır. Virüs, klinik semptomların başlamasından 1-2 gün önce ve hastalık semptomlarından iki hafta sonra hastaların solunum sekresyonlarında bulunabilir (8).

Hastalığın belirtileri yorgunluk, ateş, kuru öksürük, miyalji ve dispne olduğu ve daha az yaygın semptomların ise burun tıkanıklığı, baş ağrısı, burun akıntısı, boğaz

ağrısı, kusma, ishaldir. Ağır vakalar dispne ve/veya hipoksemiye sahiptir ve daha sonra septik şok ve ardından Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS)'na girebilmektedir (9).

Koronavirüs ile ilişkili şiddetli akut solunum sendromunun patogenezinde, yüksek plazma inflamatuvar sitokinler [interlökinler (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), tümör nekroz faktörü (TNF- α) ve interferon (INF ve kemokinleri içeren bir sitokin fırtınası yer alır. Bu durum hastalığın şiddeti ile orantılıdır. Vaka fatalite hızı ülkelere göre (%14,67-2,30) değişmektedir (10).

Hastalardan orofaringeal ve nazofaringeal sürüntü örnekleri aynı tüp içinde birlikte alındı. Viral taşıma besiyerine konuldu. Solunum yolu örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'sı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile arandı. PT-PZR pozitif olan kesin olgular çalışmaya alındı.

Chitinase-3 like-1 (CHI3L1), inflamasyon, endotel disfonksiyonu, remodellingde rol oynayan ve inflamasyon için noninvaziv prognostik biyobelirteç olarak kabul edilen bir glikoproteindir.

Günümüzde COVID-19 için güvenilirliği ve etkinliği kanıtlanmış spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Bu çalışmada bulacağımız sonuçlar yol gösterici olacaktır.

Bu çalışmada, Covid-19 hastalarında chitinase 3-like protein 1, IL-1 alpha ve IL-6'nın bir inflammatuvar biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini göstermeyi amaçladık.

MATERYAL VE YÖNTEM:

Çalışmaya SARS Cov-2 PCR pozitif 60 erişkin hasta (22 hafif, 25 orta ve 13 ağır) ve 50 sağlıklı kontrol (23'ü kadın, 27'i erkek) alındı. Kan örnekleri, sağlıklı kontroller ve COVID-19 nedeni ile yatan hastalardan antekübital bölgeden deneyimli kişiler tarafından biyokimya tüplerine (Becton Dickinson) alınan kan numuneleri 30 dk oda sıcaklığında pıhtılaşmaları sonrası santrifüj edilerek serum örnekleri ayrıldı. -80°C derecede dondurularak analiz edilinceye kadar saklandı. Analiz işlemleri için serum örnekleri uygun koşullarda çözümleri sağlandıktan sonra tüm analizler tek

oturumda Atatürk Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Müdürlüğü Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında yapıldı. Biyokimya Analizleri Serum örneklerinde çalışıldı. Serum chitinase 3-like protein 1, IL-1 alpha ve IL-6 düzeyleri enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemiyle "Human Endocan ELISA Kit" (Elabscience, USA) kullanılarak, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda ölçüldü. Serum CRP (mg/L), AST(U/L), ALT(U/L),ve LDH(U/L) düzeyleri biyokimya laboratuvarında bulunan Beckman Coulter AU5821 cihazında, ferritin(ng/ml) ve troponin-I(ng/L) düzeyleri Beckman Coulter Dxl800 cihazında, prokalsitonin(ng/ml) düzeyi ise Roche Cobas 6000 cihazında ticari kitler kullanılarak ölçüldü. ESR düzeyleri Westergreen yöntemi ile StaRRsed cihazında çalışıldı ve sonuçlar mm/h cinsinden verildi. White blood cell (WBC), lenfosit ve nötrofil sayımları Sysmex XN-9000 (Japan) cihazı ile ölçüldü ve cells/ μ L cinsinden kaydedildi. D-dimer düzeyi (ng/ml) ise Radiometer AQT90 flex cihazı ile ölçüldü.

istatistik analizleri:

Verilerin kaydedilmesi ve istatistiksel değerlendirmeler için "SPSS 20.0 for Windows" (SPSS Inc., IL, ABD) programından yararlanıldı. Elde edilen verilere ait tanımlayıcı istatistikler kategorik değişkenler için sayı ve %, numerik değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren testlerin gruplar arasındaki karşılaştırılmasında student t testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılığın önemlilik derecesi ise post hoc Tukey testi ile belirlendi. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı bakımından farkın istatistiksel analizi normal dağılım göstermediği için Ki-kare (χ^2) analizi ile yapıldı.

Sonuçlar arasındaki ilişkiler ise "Pearson" analizi ile değerlendirildi. Serum Chitinase 3-like protein 1 ve IL-6'nın duyarlılık, özgüllük, eğrinin altında kalan alan (AUC) ve 'cut off' değerini hesaplamak için belli bir yöntemin öngörü gücünün ifadesi olan 'ROC' eğrisi kullanıldı. $P < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR:

Çalışmaya SARS Cov-2 PCR pozitif 60 erişkin hasta (22 hafif, 25 orta ve 13 ağır) ve 50 sağlıklı kontrol (23'ü kadın, 27'i erkek) alındı. Gruplar arasında yaş bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0.89$). Gruplar arasında cinsiyet bakımından anlamlı farklılık yoktu ($p=0.55$).

Serum Chitinase 3-like protein 1 düzeyi şiddetli hastalarda ($7185,5 \pm 1109,4$), orta ($3977,4 \pm 1260,3$), hafif ($1379,5 \pm 598,8$) ve kontrol ($329,5 \pm 128,4$) gruplarına göre istatistiksel anlamlı oranda yüksekti ($p=0.001$). IL 1 alfa düzeyleri hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0.083$).

IL-6 düzeyleri kontrol grubunda en düşük ($35,9 \pm 13,7$), hafif grupta ($89,1 \pm 23,4$), orta grupta ($156,2 \pm 29,6$), şiddetli grupta ($214,9 \pm 28,1$) en yüksek olmak üzere anlamlı olarak farklıydı ($p=0.001$). Hasta ve Kontrol gruplarının Serum chitinase 3-like protein 1, IL-1 alpha ve IL-6 düzeyleri Tablo 1'de verildi.

Serum IL-6 ve chitinase 3-like protein 1 düzeyleri ($p<0.001$, $r=0.894$) arasında pozitif anlamlı ve güçlü bir korelasyon saptandı. Chitinase 3-like protein 1 ile hastalık şiddeti arasında ($p<0.001$, $r=0.905$) güçlü pozitif ve anlamlı korelasyon vardı. Hastalık şiddetini göstermede faydalı bulundu. IL-6 ile hastalık şiddeti arasında ($p<0.001$, $r=0.870$) güçlü pozitif ve anlamlı korelasyon var. Hastalık şiddetini göstermede faydalı idi.

Chitinase 3-like protein 1 için covid hastalarını sağlıklılardan ayırmak için cut of değeri 576,65 pg/ml alındığında spesifitesi %95 sensitivitesi %87 olarak belirlenmiştir (ROC curve AUC=0.96 p değeri $p<0.001$). Serum chitinase 3-like protein 1 düzeyi için ROC curve grafiği Şekil 1' de gösterildi. IL-6 için covid hastalarını sağlıklılardan ayırmak için cut of değeri 61,88 pg/ml alındığında spesifitesi %98 sensitivitesi %89 olarak bulundu (ROC curve AUC=0.97, $p<0.001$). Serum IL 6 düzeyi için ROC curve grafiği Şekil 2' de gösterildi. Chitinase 3-like protein 1 ile IL-6 arasındaki korelasyon grafiği Şekil 3'de gösterildi.

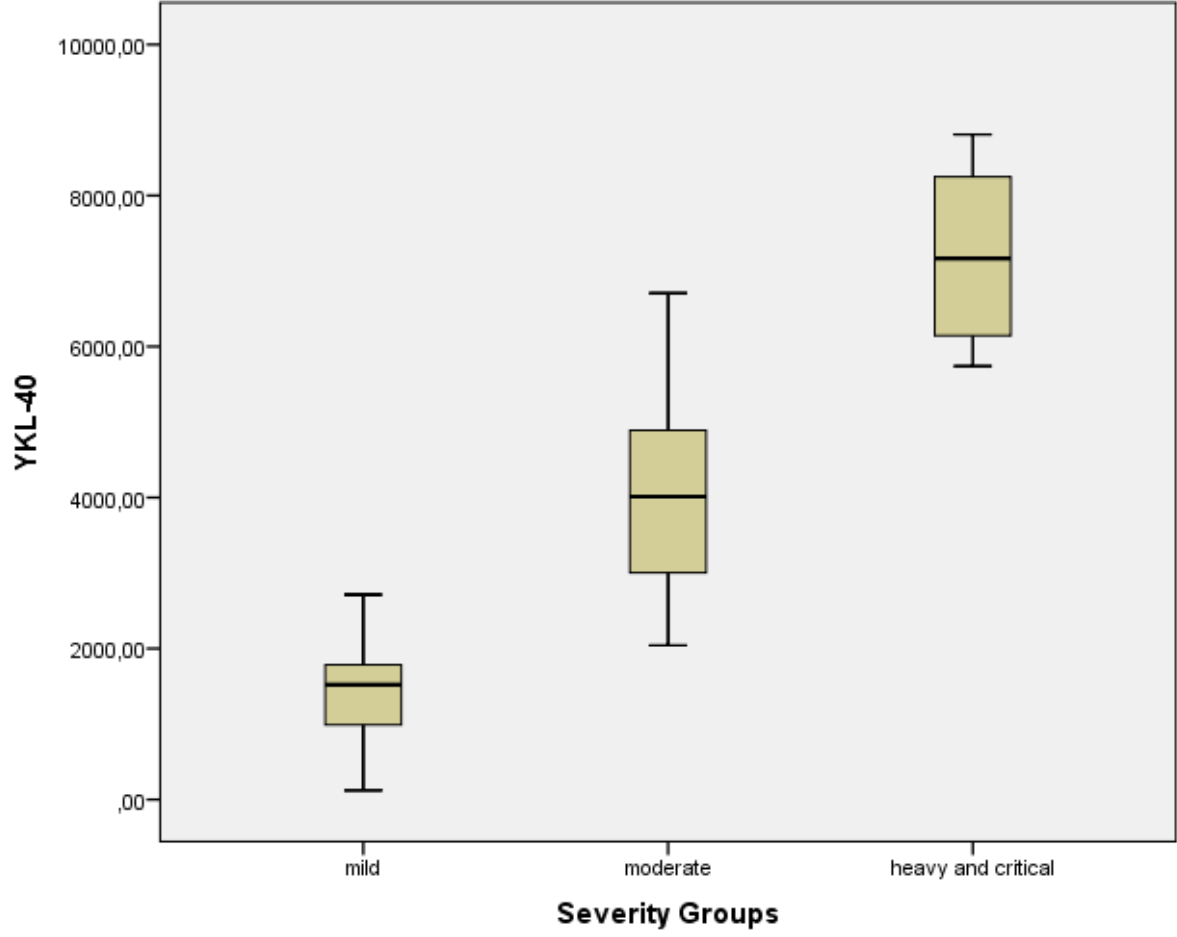
SONUÇLAR:

Serum IL 1 alfa düzeyleri hasta ve kontrol grubu arasında farklı değildi. Hastalık şiddeti ile arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Serum chitinase 3-like protein 1 ve IL-6 seviyeleri ile COVID-19 enfeksiyonunun klinik seyri arasında doğrusal ilişki bulundu. Hafif olgularda düşük, orta olgularda daha yüksek, şiddetli hastalarda en yüksektir. Kontrollerde en düşüktür. Serum IL-6 ve chitinase 3-like protein 1 düzeyleri arasında pozitif korelasyon mevcuttur. Serum IL-6 ve chitinase 3-like protein 1 düzeyleri arasında pozitif anlamlı ve güçlü bir korelasyon saptandı. Chitinase 3-like protein 1 ve IL 6 düzeyleri ile hastalık şiddeti arasında pozitif ve anlamlı korelasyon vardı. Hastalık şiddetini göstermede Chitinase 3-like protein 1 ve IL 6 faydalı bulundu. Chitinase 3-like protein 1 ve IL 6 düzeyleri yüksek olan kişilerde enfeksiyonun daha ağır seyretmesi bu markerları inhibe ederek hastalığın tedavisine ve seyrine katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Tablo 1. Hasta ve Kontrol gruplarının değişik parametrelerin serum düzeylerinin karşılaştırılması

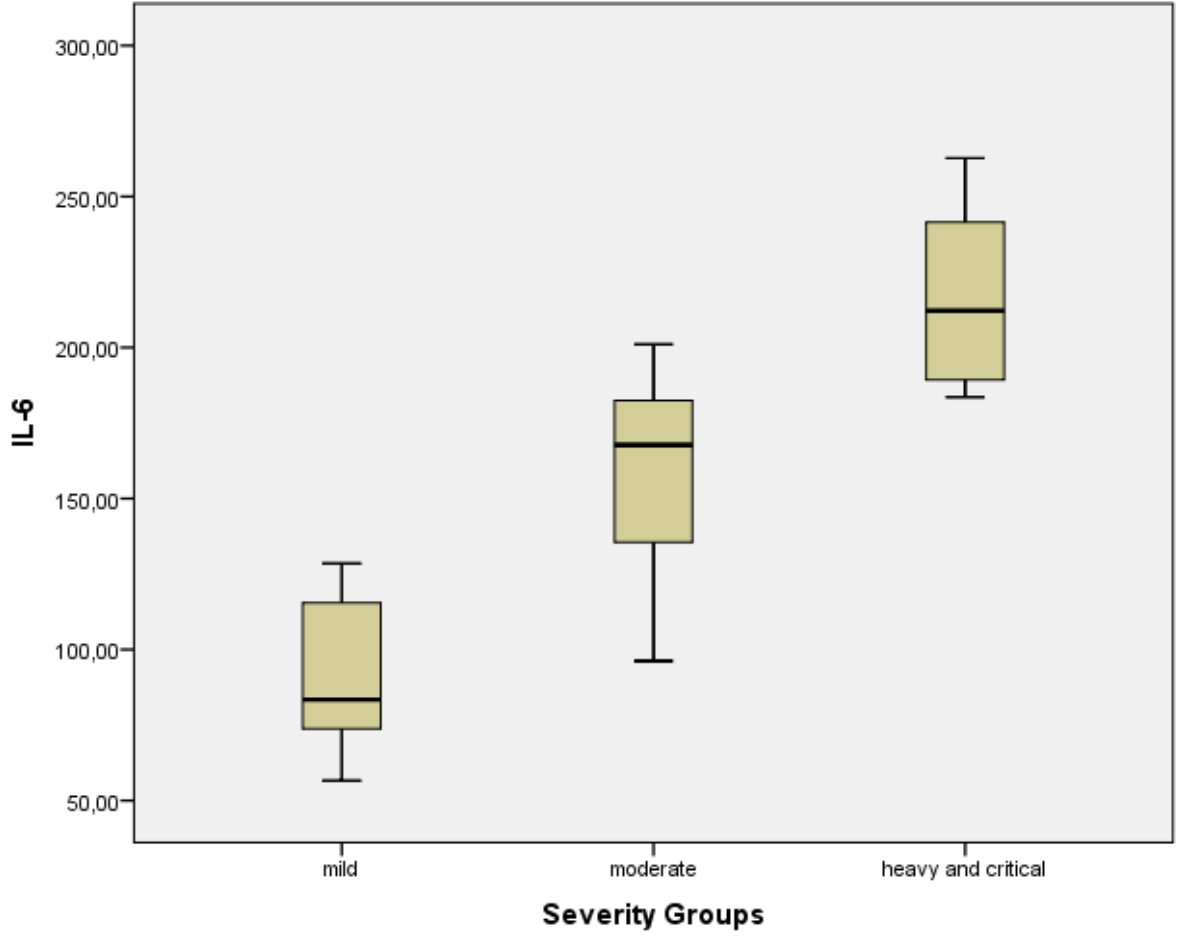
	Hasta	Kontrol	p
	Mean±sd	Mean±sd	
YKL-40	3706,11±2391,28	329,47±128,37	p<0.001
Yaş	52,62±14,95	52,2±16,28	p=0.89
IL-1 alpha	0,06±0,03	0,04±0,01	p=0.083
IL-6	145,04±55,18	35,95±13,71	p<0.001
Lenfosit	1461,87±711,34	2010,9±646,43	p<0.001
LDH	307,65±97,55	191,76±37,91	p<0.001
D-dimer	792,33±675,28	219,74±89,49	p<0.001
Sedimentasyon	28,9±26,08	8,92±3,59	p<0.001
CRP	35,65	2,06±0,77	p<0.001
Ferritin	363,27	212,98±60,82	p=0.004

Şekil 1. Klinik şiddetine göre gruplandığımızda chitinase 3-like protein 1 box plot grafiği



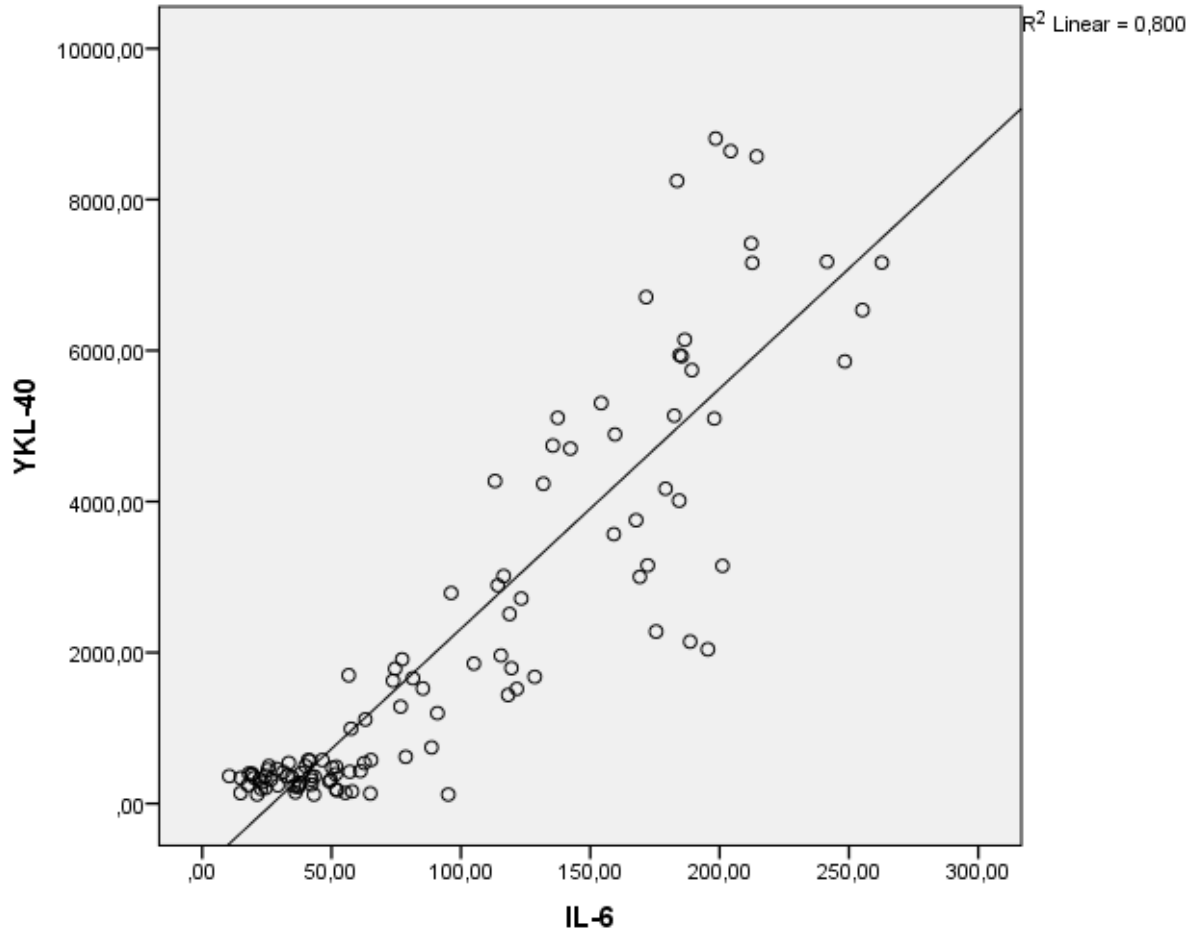
ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

Şekil 2. Klinik şiddetine göre gruplandırıdığımızda IL 6 box plot grafiği



ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

Şekil 3. chitinase 3-like protein 1 ile IL-6 arasındaki korelasyon grafiği



ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

KAYNAKLAR:

1. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Rehberi. 12 Nisan 2020.
2. Kim MJ, Shim DH, Cha HR, et al. Chitinase 3-like 1 protein plays a critical role in respiratory syncytial virus-induced airway inflammation. *Allergy*. 2019;74:685–697.
3. Conti P, Ronconi G, Caraffa AL, Gallenga C.E et al. Induction Of Pro-Inflammatory Cytokines (IL-1 And IL-6) And Lung Inflammation By Coronavirus-19 (Covi-19 Or Sars-Cov-2): Anti-Inflammatory Strategies. *Journal Of Biological Regulators & Homeostatic Agents*. DOI: 10.23812/CONTI-E
4. Alhazzani W, Møller MH, Arabi YM, et al. (2020). Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Intensive Care Med*, 1-34.doi: 10.1007/s00134-020-06022-5.
5. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, et al. (2016). Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of the macrophage activation syndrome: Re-analysis of a prior Phase III trial. *Critical Care Med*, 44(2); 275.
6. Zhang C, Wu Z, Li JW, Zhao H, et al. (2020). The cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID19 and Interleukin-6 receptor (IL6R) antagonist Tocilizumab may be the key to reduce the mortality. *Int J of Antimicrobial Agents*, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105954.
7. World Health Organization. Novel coronavirus situation report-2. January 22,2020.<https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situationreports/20200122-sitrep-2-2019-ncov.pdf>
8. Guan WJ, Ni ZY, Liang WH et al (2020) Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*, Feb 28;NEJMoa2002032. doi:10.1056/NEJMoa2002032.
9. Huang C, Wang Y, Li X, et al (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. pii: S01406736(20)30183-5.[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
10. Conti P, Ronconi G, Caraffa A, et al. (2020). Induction of proinflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *J of Bio Reg and Homeo Agents*, 14;34(2).
11. Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020; 395:1033.