



**SARS COV-2 ENFEKSİYONUNDA OTOFAJİ VE APOPTOZUN  
KARŞILIKLI İLİŞKİSİNİN ÖNEMİNİN ANALİZİ**

**Senem KOÇAK**

**DOKTORA TEZİ  
İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2024**

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Senem KOÇAK

17.07.2024

# SARS COV-2 ENFEKSİYONUNDA OTOFAJİ VE APOPİTOZUN KARŞILIKLI İLİŞKİSİNİN ÖNEMİNİN ANALİZİ

(Doktora Tezi)

Senem KOÇAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2024

## ÖZET

Çin'in Wuhan kentinde 2019 yılında etkeni bilinmeyen pnömoni vakaları bildirilmiştir. 2020 yılında virüs genomu tanımlandıktan sonra Sars-Cov2 virüsü, Coronavirüs ailesinin 17. üyesi olarak tanımlanmıştır. Sars-Cov2 virüsü, hücrelerin fonksiyonları üzerinde etkili olan bir virüstür. Bu durumda zarar gördüğünü algılayan hücre ya ölüme (programlanmış hücre ölümleri) gider ya da otofaji gibi koşullar normale dönene kadar kendini korumaya alır. Fakat otofaji çok fazla indüklenirse; hücre bu kez otofajik ölüme gider. Tez çalışmasının ana hipotezinde aslında bu iki önemli yolağının karşılıklı etkileşiminin önemi yer almaktadır. Apoptoz ile otofaji arasındaki karşılıklı etkileşime katkı sağladıkları düşünülen Beclin-1 (BECN-1), Survivin (SVN), Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 $\alpha$ ) ve Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- $\beta$ 1)'in COVID-19 hastalığında birlikte nasıl bir etki gösterdiği henüz tespit edilmemiştir. Bu bilgiler ışığında tez çalışmamıza konu olan otofaji ve apoptozun karşılıklı etkileşiminin COVID-19 hastalığındaki önemi araştırılmış, bu moleküllerin hastaların kliniğine ve laboratuvar bulgularına yansımaları istatistiksel dayanaklarla ele alınmıştır. Çalışma sonuçlarına göre pnömoni gelişen hastalarda BECN-1 (p=0,014) ve SVN'nin (p=0,004) düzeylerinin asemptomatik hastalara göre düşüklüğü tespit edilmiş ve bu düşüklüğün anlamlı bir farkta olduğu görülmüştür. Benzer düşüklükler HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'de de bulunmuştur. Bu moleküllerin sağ kalımla anlamlı ilişkisi bulunmamışken; komorbiditesi olan hastalarda komorbiditesi olmayan hastalara göre düzeylerinde anlamlı düşüklükler görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışma; COVID-19 hastalarında pnömoni gelişen hastalara göre asemptomatik hastalarda serum BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 düzeylerinin anlamlı artışı ilk kez ortaya koymuştur.

Bilim Kodu : 1039.12  
Anahtar Kelimeler : Sars-Cov2, Apoptoz, Otofaji  
Sayfa Adedi : 136  
Danışman : Prof. Dr. Resul KARAKUŞ

ANALYZING THE IMPORTANCE OF THE INTERRELATIONSHIP OF  
AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN SARS COV-2 INFECTION

(M. Sc. Thesis)

Senem KOÇAK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2024

ABSTRACT

After cases of unknown pneumonia were reported from China, the virus genome was identified and Sars-Cov2 virus has been shown to be the 17th member of the coronavirus family. Virüs affects the cells. In this case, the cell that senses that it has been damaged either dies or protects itself until conditions return to normal, such as autophagy. But if autophagy is induced too much, the cell goes into autophagic death. Our hypothesis is the importance of the interplay of these two important pathways. It has not yet been determined how Beclin-1 (BECN-1), Survivin (SVN), Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 $\alpha$ ) and Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- $\beta$ 1), which are thought to contribute to the mutual interaction between apoptosis and autophagy in COVID-19 disease. The importance of the mutual interaction of autophagy and apoptosis in COVID-19 disease, which is the subject of our thesis study, and its reflection on the clinical and laboratory findings of the patients were investigated. According to the results of the study, BECN-1 and SVN levels were found to be lower in patients who developed pneumonia compared to asymptomatic patients and this decrease was found to be significantly different. Similar decreases were found in HIF-1 $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. While these molecules were not significantly associated with survival, their levels were significantly lower in patients with comorbidities compared to patients without comorbidities. In conclusion, this study demonstrated for the first time that this molecules levels were significantly increased in asymptomatic patients compared to patients who developed pneumonia in COVID-19 patients.

Bilim Kodu : 1039.12

Key Words : Sars-Cov2, Apoptosis, Autophagy

Page Number : 136

Supervisor : Prof. Dr. Resul KARAKUŞ

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sürecinde bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan, sabırla tez çalışmamda rehberliğini esirgemeyen, zor anlarımda hep yanımda olup destek veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Resul KARAKUŞ'a; doktora süresince gerek verdikleri eğitimlerle gerekse hayata dair tecrübeleri ile ufkumu açan Sayın Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL'e ve Sayın Prof. Dr. Ümit BAĞRIAÇIK'a, desteklerini her konuda hep hissettiğim ve bugünkü bana çok şey katan değerli hocam Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK'a, Prof. Dr. Aydan İKİNCİOĞULLARI'na, Prof. Dr. Figen DOĞU'ya, Doç. Dr. Şule HASKOLOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyeleri Kübra BASKIN ve Candan İSLAMOĞLU'na; tez döneminde, laboratuvar süreçlerinde yanımda olan, ne zaman ihtiyaç duysam bana hep destek olan sevgili arkadaşlarım Dr. Öğr.Üyesi Dr. Melek Yaman ve Dr. Öğr.Üyesi Dr. Nihan Örüklü ve Dr. Milad ABBASI'ye; bu zorlu doktora sürecinde birlikte yürüdüğüm, desteklerini hissettiren, zor anları çekilir kılan Prof. Dr. Kibriya FİDAN ve Doç Dr. Çiğdem EROL'a; ders sürecimde desteklerini gördüğüm Deniz BAYRAKOĞLU ve Meltem ARIKAN'a; her anında yanımda olan, düştüğümde kaldıran, bugünlerimin en büyük mimarı canım, biricik anneme; sevgisi ve sabırla doktora eğitimimin her aşamasında bana güç veren, varlığıma değer katan canım kardeşime ve oralarda bir yerlerde beni gördüğünü ve hep destek verdiğini hissettiğim canım babama, hayatıma dokunduğunuz için sonsuz sevgi, saygı, teşekkür ve minnetlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Sars- Cov2'nin Epidemiyolojik Özellikleri.....	4
2.2. Sars-Cov2 Virüsünün Bulaş Yolları ve Semptomları .....	5
2.3. Sars-Cov2 Virüsünün Yapısı ve Proteinleri .....	5
2.4. Virüs-Konak İnteraksiyonunun Başlangıcı .....	7
2.5. Konak İmmün Sisteminin Sars-Cov2 Virüsüne Cevabı.....	8
2.5.1. İnnate immün yanıt .....	8
2.5.2. Adaptif immün yanıt .....	9
2.6. COVID-19 Laboratuvar Bulguları ve Prognoz .....	10
2.7. COVID-19'un İmmünopatogenezi.....	11
2.8. COVID-19'da Hücre Ölümleri.....	13
2.8.1. Apoptoz.....	13
2.8.2. Otofaji .....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. Çalışma Grupları .....	45
3.2. Serum Örneklerinin Toplanması .....	45

**Sayfa**

3.3. ELISA Yöntemi ile Serum BECN-1, SVN, TGF- $\beta$ 1 ve HIF-1 $\alpha$ Düzeylerinin Belirlenmesi .....	46
3.4. Test Protokolü .....	46
3.5. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler .....	47
3.6. İstatiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR .....	49
4.1. Demografik Veriler .....	49
4.2. Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi .....	50
4.3. Apoptoz ve Otofaji Belirteçlerinin Değerlendirilmesi .....	65
4.4. BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$ ve TGF- $\beta$ 1'in Sağ kalıma etkisi .....	69
4.5. Risk Faktörleri.....	70
5. TARTIŞMA .....	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	91
KAYNAKLAR .....	93
EKLER.....	129
EK-1. Etik Kurul Onayı .....	130
EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu .....	132
ÖZGEÇMİŞ .....	135

**ÇİZELGELERİN LİSTESİ**

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik bilgileri .....	50
Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen hastaların laboratuvar bulguları .....	50
Çizelge 4.3. Gruplandırılan hastaların değişen kan hücre düzeyleri .....	51
Çizelge 4.4. Tanı Grubu, Komorbidite ve Sağ kalım hasta gruplarının laboratuvar bulguları ve anlamlılık ilişkileri .....	56
Çizelge 4.5. Tanı Grubu, Komorbidite ve sağ kalım hasta gruplarının apoptoz ve otofaji belirteçleri ile anlamlılık ilişkileri .....	66
Çizelge 4.6. Laboratuvar referans değerlerine göre gruplandırılan laboratuvar bulgularının BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$ ve TGF- $\beta$ 1 ile ilişkisi .....	68
Çizelge 4.7. Gruplarda ve laboratuvar bulgularında lojistik regresyon analizi ile BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$ ve TGF- $\beta$ 1'nin risk faktörleri .....	72
Çizelge 4.8. BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$ ve TGF- $\beta$ 1'in laboratuvar bulgularıyla korelasyon analizi .....	73

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün küresel raporu (31.03.2024) .....	4
Şekil 2.2. Sars-Cov2 virüsünün hücreye giriş ve hücreden çıkış mekanizmaları.....	6
Şekil 2.3. Sars-Cov2 İmmünopatogenezi .....	12
Şekil 2.4. SVN'nin moleküler mekanizmaları.....	17
Şekil 2.5. Otofajinin alt tipleri .....	24
Şekil 2.6. Beclin-1 kompleksi.....	25
Şekil 2.7. Koronavirüs enfeksiyonlarında Otofaji .....	28
Şekil 2.8. Bcl-2-BECN-1 kompleksi ve BECN-1'in kompleksteki rolü.....	32
Şekil 2.9. COVID-19'da HIF1- $\alpha$ 'nın rolü .....	41
Şekil 2.10. Çalışma hipotezi.....	44
Şekil 4.1. Tanı gruplarına göre asemptomatik hastalar ve pnömoni gelişen hastalar arasında lenfosit sayısının değişimi ve anlamlılık analizi .....	51
Şekil 4.2. Tanı gruplarına göre asemptomatik hastalar ve pnömoni gelişen hastalar arasında nötrofil/lenfosit oranının değişimi ve anlamlılık analizi.....	52
Şekil 4.3. Tanı gruplarına göre asemptomatik hastalar ve pnömoni gelişen hastalar arasında bazofilsayısının değişimi ve anlamlılık analizi .....	52
Şekil 4.4. Tanı gruplarına göre asemptomatik hastalar ve pnömoni gelişen hastalar arasında eozinofil sayısının değişimi ve anlamlılık analizi.....	53
Şekil 4.5. Sağ kalım gruplarına göre analizini yapılan kan hücrelerinden mortalite görülen ve görülmeyen hastalar arasında lenfosit sayısının değişimi ve anlamlılık analizi .....	53
Şekil 4.6. Sağ kalım gruplarına göre analizini yapılan kan hücrelerinden mortalite görülen ve görülmeyen hastalar arasında nötrofil/lenfosit oranının değişimi ve anlamlılık analizi .....	54
Şekil 4.7. Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yapılan analizde lenfosit sayısının değişimi ve anlamlılık analizi .....	54
Şekil 4.8. Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yapılan analizde nötrofil/lenfosit oranının değişimi ve anlamlılık analizi .....	55

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.9. Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yapılan analizde monosit sayısının değişimi ve anlamlılık analizi .....	55
Şekil 4.10. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Fibrinojen yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	56
Şekil 4.11. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından D-Dimer yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	57
Şekil 4.12. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından CRP yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	57
Şekil 4.13. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Sistatin C yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	58
Şekil 4.14. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Ferritin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	58
Şekil 4.15. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından CK yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	58
Şekil 4.16. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Troponin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	59
Şekil 4.17. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Prokalsitonin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	59
Şekil 4.18. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Kalsiyum düşüklüğünün anlamlılık ilişkisi.....	59
Şekil 4.19. Sağ kalıma göre laboratuvar bulgularından D-Dimer yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	60
Şekil 4.20. Sağ kalıma göre laboratuvar bulgularından CRP yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	60
Şekil 4.21. Sağ kalıma göre laboratuvar bulgularından Sistatin C yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	60
Şekil 4.22. Sağ kalıma göre laboratuvar bulgularından Ferritin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	61
Şekil 4.23. Sağ kalıma göre laboratuvar bulgularından Prokalsitonin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	62
Şekil 4.24. Sağ kalıma göre laboratuvar bulgularından Kalsiyum düşüklüğünün anlamlılık ilişkisi.....	62

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.25. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından D-Dimer yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	63
Şekil 4.26. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından CRP yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	63
Şekil 4.27. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Sistatin C yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	64
Şekil 4.28. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Ferritin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	64
Şekil 4.29. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Troponin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	64
Şekil 4.30. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Prokalsitonin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi.....	65
Şekil 4.31. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Kalsiyum düşüklüğünün anlamlılık ilişkisi.....	65
Şekil 4.32. Trombosit sayısı (medyan) ve TGF- $\beta$ 1 düzeyi arasındaki anlamlılık ilişkisi.....	67
Şekil 4.33. BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$ ve TGF- $\beta$ 1'in tanı grubuna göre anlamlılık ilişkisi.....	69
Şekil 4.34. Kaplan-Meier Sağ kalım eğrileri .....	70

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklamalar

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\lambda$	Delta

### Kısaltmalar

### Açıklama

<b>ACE2</b>	Angiotensin converting enzyme
<b>AIF</b>	Apoptosis-inducing factor
<b>Ang II</b>	Anjiyotensin II
<b>Apaf-1</b>	Apoptosis protease activating factor-1
<b>ARDS</b>	Acute respiratory distress syndrome
<b>Bcl2</b>	B cell leukemia/lymphoma 2
<b>BECN-1</b>	Beclin-1
<b>BID</b>	BH3 interacting-domain
<b>BIR</b>	Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat
<b>BOK</b>	Bcl-2-related ovarian killer
<b>cFLIP</b>	FAAD (Fas-Associated death domain protein) benzeri IL-1 dönüştürücü enzim inhibitör protein
<b>cGAS</b>	Cyclic GMP–AMP synthase
<b>CMA</b>	Chaperone-mediated autophagy
<b>CQ</b>	Klorokin
<b>CRS</b>	Cytokine release syndrome
<b>Cyt-c</b>	Sitokrom C
<b>DAI</b>	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor
<b>DAMP</b>	Danger/damage associated molecular pattern
<b>DH</b>	Dendritik hücreler
<b>DIC</b>	Disseminated intravascular coagulation

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DRAM</b>	Damage-regulated modulator of autophagy
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virüsü
<b>ERGIC</b>	Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment
<b>ERLIN1</b>	ER lipid raft-associated protein 1
<b>FAAD</b>	Fas-associated death domain protein
<b>FP</b>	Füzyon peptid
<b>HCQ</b>	Hidroksiklorokin
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor 1
<b>HR1</b>	Heptad repeat 1
<b>HR2</b>	Heptad repeat 2
<b>HSP60</b>	Heat shock protein 60
<b>HSP90</b>	Heat shock protein 90
<b>IFI16</b>	Gamma-İnterferon-inducible protein 16
<b>IFN</b>	İnterferon
<b>Ig</b>	İmmünglobulin
<b>INCENP</b>	Inner centromere protein
<b>LPM-1</b>	Latent membran proteini-1
<b>MAVS</b>	Mitochondrial antiviral-signaling protein
<b>MDA-5</b>	Melanoma differentiation-associated protein 5
<b>Mers</b>	Middle east respiratory syndrome
<b>MHCI-II</b>	Major histocompatibility kompleks I- II
<b>MHV</b>	Mouse hepatit virüsü
<b>MYD88</b>	Myeloid differentiation primary response 88
<b>NAFLD</b>	Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı
<b>NFK<math>\beta</math></b>	Nuclear factor kappa
<b>NLR</b>	Nod like reseptör
<b>NLRP3</b>	NOD-, LRR- and Pyrin domain-containing protein 3
<b>NSP</b>	Non-structure protein
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>PARP</b>	poli ADP-Riboz polimeraz
<b>pDH</b>	Plazmasitoid dendritik hücre
<b>PI3K</b>	Fosfoinozidit 3-kinaz
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptors
<b>PTEN</b>	Fosfataz ve tensin homologu
<b>RAAS</b>	Renin-anjiyotensin-aldesteron -sistemi
<b>RBD</b>	Receptor binding domain
<b>RdRp</b>	RNA-bağımlı rna polimeraz
<b>RRL</b>	RIG like reseptör
<b>RNA</b>	Ribonükleik asid
<b>Sars</b>	Severe acute respiratory syndrome
<b>SMAC</b>	Second mitochondria-derived activator of caspase
<b>SNARE</b>	Soluble NSF attachment protein receptors
<b>ssRNA</b>	Single-stranded RNA
<b>STAT</b>	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon faktörlerinin aktivatörü
<b>STING</b>	Stimulator of interferon gene
<b>SVN</b>	Survivin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TLR</b>	Toll-like reseptör
<b>ULK</b>	UN51 benzeri Ser/Thr kinazlar
<b>XIAP</b>	X-Linked inhibitor of apoptosis protein

## 1. GİRİŞ

Dünya 1800'lü yıllardan bugüne birçok pandemiye ve endemiye neden olan enfeksiyonlarla mücadele etmiştir. "21. yüzyıl" pandemisi olarak adlandırılan Sars-Cov2 enfeksiyonu, 2019 yılında Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmıştır. Sars-Cov2, asemptomatik bireylerin de bulaştırıcılığının yüksek olmasıyla Sars-Cov ve Mers-Cov enfeksiyonlarına göre daha hızlı yayılmıştır. Sars-Cov2 virüsünün kendisinin mi yoksa konak immün yanıtında ortaya çıkardığı mekanizmalarla mı bu kadar komplikasyona neden olduğu halen araştırmalara konu olmaktadır. Virüsün solunum yolu hücrelerini hedef almasından dolayı oluşan disregüle yanıtlar, akciğer kapasitesinin düşmesi, pulmoner doku hasarları, akciğer fonksiyonunda gerileme gibi ciddi akciğer hasarlarını da ortaya çıkarmaktadır.

Sars-Cov2 virüsünün neden olduğu enfeksiyon özellikle immün hücre profilleri üzerinde etki göstermektedir. Özellikle lenfopeni ve hatta lenfopeniye eşlik eden CD4+ T hücre ve CD8+ T hücre düşüklükleri, makrofaj, dendritik hücre (DH) profilleri, COVID-19'da önem arz etmektedir. Sars-Cov2 virüsünün hücre ölümleri üzerinde etkinliği gösterilmiştir. Özellikle lenfopeninin ana mekanizmasının hücre ölümleri olduğu üzerinde durulmaktadır. COVID-19 hastalığında, özellikle apopitozun ve otofajinin önemli olduğu düşünülmektedir. Bu bilgilere bağlı kalarak geliştirdiğimiz bu tez çalışmamızın ana hipotezinde aslında bu iki önemli yolağının karşılıklı etkileşiminin önemi yer almaktadır. Apopitoz ile otofaji arasındaki karşılıklı etkileşime katkı sağladıkları düşünülen Beclin-1 (BECN-1), Survivin (SVN), Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 $\alpha$ ) ve Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- $\beta$ 1)'in COVID-19 hastalığında birlikte nasıl bir etki gösterdiği henüz tespit edilmemiştir. Bu bilgiler ışığında tez çalışmamıza konu olan otofaji ve apopitozun COVID-19 hastalığındaki önemi araştırılmış, istatistiksel dayanaklarla bu ilişki ele alınmıştır.

Sars-Cov2 virüsü, hücrelerin fonksiyonları üzerinde etkili olan bir virüstür. Virüsün zarar verdiği hücrelerde, zararı en aza indirme mekanizmaları işlemektedir. Bu durumda zarar gördüğünü algılayan hücre ya ölüme (programlanmış hücre ölümleri) gider ya da otofaji gibi koşullar normale dönene kadar kendini korumaya alır. Fakat otofaji çok fazla indüklenirse; hücre bu kez otofajik ölüme gider. Ayrıca otofaji immün yanıtın güçlenmesine olanak sağlayan önemli bir mekanizmadır. Bu stratejilerle COVID-19 hastalığında nasıl rol aldığını anlamamız için özellikle otofajik yolağını ve moleküllerini konu alan daha çok çalışmanın yapılmasına ihtiyaç vardır. Otofajinin viral replikasyonunu azaltan bir mekanizma olduğu

gösterilmiştir. Bu düşüncelere bağlı olarak tezimizin hipotezinde, asemptomatik hasta grubunda apoptozun indirgenmesi ve otofajinin desteklenmesi için BECN-1, SVN ve HIF-1 $\alpha$  düzeyinin artması; immün modülasyonda rol alan TGF- $\beta$ 1'in bu moleküllere zıt yönde etki etmesi, buna karşın pnömoni gelişen veya ölüm görülen hastalarda BECN-1, SVN ve HIF-1 $\alpha$  düzeyinin azalması ve TGF- $\beta$ 1 düzeyinin artması yer almaktadır. Apoptoz aslında pek çok virüsün evazyon mekanizmaları arasındadır. Yine benzer şekilde konak immün savunmasında enfekte hücrelerin apoptoza teşvik edilmesi, enfeksiyonla baş etmede önemlidir. Fakat konağın bu savunma stratejisini virüs kendi lehine de çevirmektedir ve böylece enfeksiyonun şiddeti artmaktadır. Bu bağlamda geliştirdiğimiz hipotezimiz ile tez çalışmamızda araştırılan moleküllerin hastalığın şiddetine katkısı hakkında yorumlar yapabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Çin'in Wuhan kentinde 2019 yılında etkeni bilinmeyen pnömoni vakaları bildirilmiştir. Daha sonra enfeksiyon ajanının Beta Coronavirüs olduğu ve Akut Solunum Sendromuna (acute respiratory distress syndrome (ARDS)) neden olduğu tespit edilmiştir [1]. Hastalığa Koronavirüs Hastalığı-19 (COVID-19) adı verilmiştir [2]. 2020 yılında virüs genomu tanımlandıktan sonra Sars-Cov2 virüsü, Coronavirüs ailesinin 17. üyesi olarak tanımlanmıştır [3]. Hastaların çoğu öksürük, orta şiddette ateş ve kas ağrısı ile hafif semptom gösterirken; birçoğu da hiç belirti vermemektedir. Fakat COVID-19 hastalığı, kronik hastalıkları (diyabet, hipertansiyon) olan bireylerde ciddi seyretmekte hatta mortalite nedeni olabilmektedir [4].

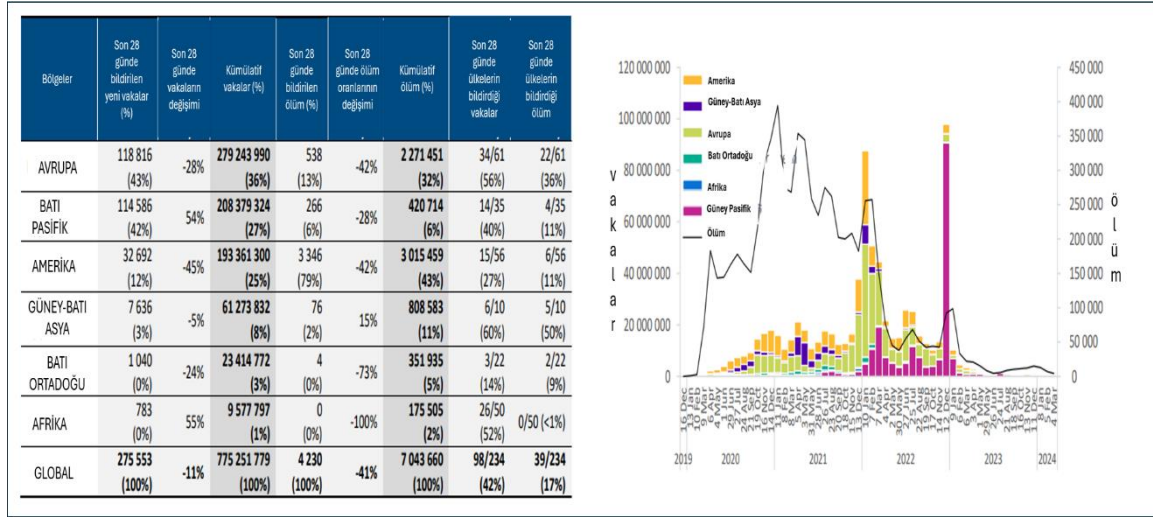
Sars-Cov2 virüsü solunum epitel hücrelerine, makrofajlara, tip II pnömositlere, perisitlere ve kas hücrelerine saldırarak, hücre içine girmektedir [5]. COVID-19 hastalığının pnömoni ilişkili akciğer hasarı önemli klinikopatolojik özelliğidir. Terminal döneminde ARDS görülmektedir [6]. Hastalarda kanda düşmüş O<sub>2</sub> saturasyonu, hayatı tehdit edici hipoksi ortaya çıkmaktadır. Ayrıca akut miyokardiyal hasar ve tromboemboli, iskemi ile karakterize kardiyovasküler sistem hasarı da görülmektedir. Bununla birlikte, izole akciğer hasarı COVID-19 ölümlerinin önde gelen nedeni olabilmektedir [7-11].

COVID-19'un organ/doku hasarı sistemik inflamasyon sonucunda gelişir. Koronavirüsler epitel hücre hasarı ve nekroz yoluyla epitel dokulara doğrudan hasar verme yeteneğine sahiptir. COVID-19'da organ/doku hasarının ana nedeninin bağışıklık sistemi aktivasyonu/pertürbasyonu olduğunu gösteren kanıtlar vardır [7]. COVID-19 virüsü monosit ve makrofajların çeşitli inflamatuvar sitokinlerini salgılamalarını indükleyici etki göstermektedir [4-12].

Coronaviridae alt ailesinin genetik ve antijenik [13] kriterlerine dayanarak yapılan gruplandırılmasında dört gruba ayrıldığı görülmektedir Alfa-Koronavirüs, Beta-Koronavirüs, Gamma-Koronavirüs, Delta-Koronavirüs [14]. Alfa ve Beta-Koronavirüsler sadece memelileri enfekte etmektedirler [14]. Gamma ve Delta-Koronavirüsler ise genellikle kuşları enfekte etmekle birlikte birkaç tipinin memelileri de enfekte ettiği bildirilmiştir [15]. Alfa ve Beta-Koronavirüs ailesine ait olan dört koronavirüsün (N263, 229E, 0043 ve HKU) genellikle insanlarda neden olduğu hastalık spektrumu basit soğuk algınlığından

(%10-30) ağır akut solunum sendromuna (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) kadar değişkenlik gösterebilmektedir [16].

21. yüzyıl pandemisi konulu 31 Mart 2024 itibariyle hazırlanan küresel rapora göre 775 milyondan fazla doğrulanmış vaka ve 7 milyondan fazla ölüm görülmüştür (Şekil 2.1) [17]



Şekil 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün küresel raporu (31.03.2024) [17]

## 2.1. Sars- Cov2'nin Epidemiyolojik Özellikleri

Aralık 2019'da Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Çin'in Wuhan şehrinde etyolojisi bilinmeyen deniz ürünleri satan pazarla temaslı pnömoni vakası bildirdi. 5 Ocak 2020'de DSÖ Çin'de görülen etyolojisi bilinmeyen 44 pnömoni vakası daha yayınladı. 11 hastanın ciddi bulguları olduğu bildirildi. Bu bulgular yüksek ateş, dispne, akciğer radyografisinde pulmoner infiltrasyonlardı [1]. İnsanda şu ana kadar tespit edilmemiş yeni bir koronavirüs olduğu söylendi ve 10 Ocak 2020'de *Shanghai Public Health Clinical Center & School of Public Health* bu virüsün tüm genomik dizisini dünya ile paylaştı. Virüsün, Sars-CoV ve Mers-Cov gibi bir zoonotik olduğu düşünüldü. 11 Mart 2020'de Dünya Sağlık Örgütü pandemi ilan etti.

Enfekte kişilerin yaşları 4 hafta ile 90 yaş ve üzeri olarak bildirilmesine rağmen çocuklarda ve bebeklerde daha az vaka bildirilmiştir [18,19]. Erkekler bildirilen vakaların %59-68'ini temsil etmektedir [20,21]. Ancak, yaşlı bireyler (>75 yaş) çok daha yüksek ölüm oranlarına sahiptir [22].

## 2.2. Sars-Cov2 Virüsünün Bulaş Yolları ve Semptomları

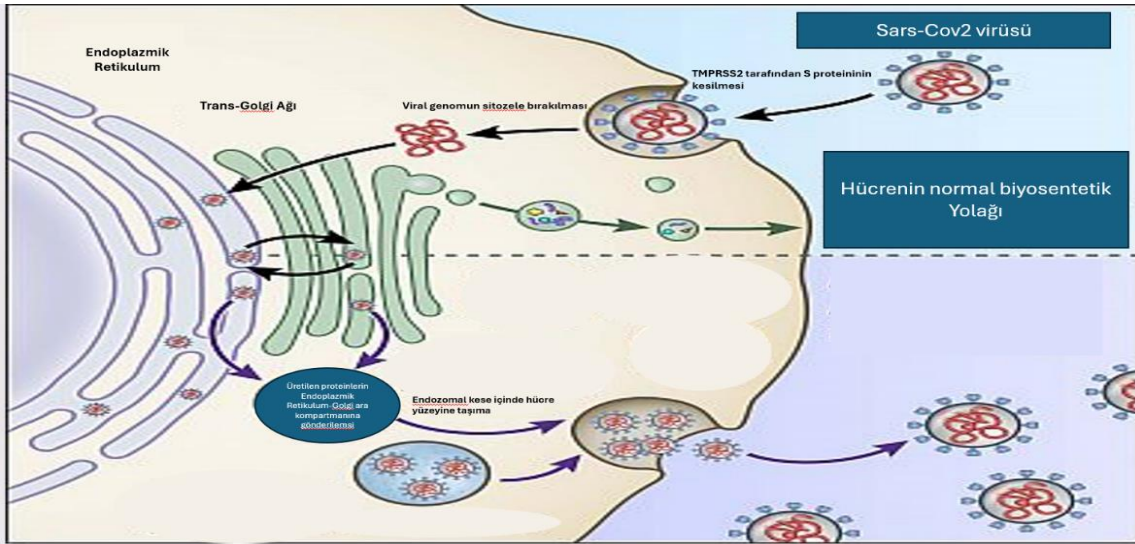
Virüsün genellikle öksürük sonucu oluşan damlacıklar yolu ile insandan insana bulaştığı [23], kontamine yüzeylere dokunulmasından sonra el hijyenine dikkat edilmediğinde kişinin kendi yüzüne dokunması ile de bulaşın olduğu bildirilmektedir. Hastaların dışkıında virüs partikülü bulunduğundan fekal-oral yolla bulaş [24] da söz konusu olabilmektedir. Sars-Cov2 için çeşitli çalışmalarda çeşitli kuluçka dönemleri gösterilmiştir. Bununla birlikte virüse maruziyet sonrası semptomların 5.1 gün içinde ortaya çıktığı (medyan değer) ve enfekte kişilerin neredeyse tamamının 12 gün içinde tüm semptomlara sahip olduğu tahmin edilmektedir [25]. Bu durum bireylerin enfekte olduklarının farkında olmadan virüsü yayma olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Virüse maruz kalan her birey semptom göstermemektedir bu nedenle orta veya ağır bireyler tanımlanabileceği gibi asemptomatik bireyler de tanımlanmaktadır [25]. Sars-Cov enfeksiyonlarında viral yük, semptomların başlamasından 10 gün sonra zirve yaparken bu durumun Sars-Cov2 enfeksiyonunda 5-6 gün olduğu bilinmektedir [25]. COVID-19 hastalarında ARDS'nin ise semptom başlangıcından ortalama 8-9 gün sonra geliştiği rapor edilmektedir. Sars-Cov2'nin neden olduğu viral pnömoni ile ilişkili en yaygın semptomlar ateş, öksürük, boğaz ağrısı, baş ağrısı, miyalji, yorgunluk ve nefes darlığıdır. Bunlarla birlikte tat ve koku kaybı, gastrointestinal semptomlar da görülmektedir [26,27]. Hastalık şiddeti yaş, cinsiyet gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişebilirken, komorbiditenin de (diyabet, kardiyovasküler sorunlar veya hipertansiyon, malinite gibi) hastalığın şiddetiyle güçlü ilişkisi vardır [28,29].

## 2.3. Sars-Cov2 Virüsünün Yapısı ve Proteinleri

Sars-Cov2'nin iki tip yarasa orjinli ağır akut solunum sendromu benzer koronavirüslerinden *bat-SL-CoVZC45* ve *bat-SL-CoVZXC21* ile %88 oranında benzer olduğu görülmüştür [13]. Yapısında çeşitli yapısal proteinler, yapısal olmayan proteinler ve aksesuar proteinler bulunmaktadır. Yapısal proteinlerinden en önemlileri yaklaşık 230 amino asitlik Membran glikoproteini (M), 1300 amino asitlik Spike (S) proteini, yaklaşık 100 amino asitlik zarf (E) proteini ve 380-450 amino asitlik nükleokapsid (N) proteindir [30].

Koronavirüslere adını veren S (Spike) proteini, virüs yüzeyinde çıkıntılar oluşturup, virüsün reseptörüne bağlanmasında ve membran füzyonunda rol oynamaktadır. S proteini S1 ve S2 adı verilen iki alt birimden oluşur. S proteini virüs partikülünün yüzeyinde ekspresse edilen

bir proteindir. S1 alt ünitesi bir amino sonlanma bölgesi ve bir reseptör bağlanma bölgesi (Receptor Binding Domain (RBD)) içerir [31]. RBD, hedef hücredeki Angiotensin Converting Enzyme (ACE2)'ye bağlanır ve enfeksiyon prosesi başlar. RBD ve ACE2 etkileşimi Sars-Cov2 virionunun endositozisini tetikler ve endozomal proteazlar aktifleşir. S2 alt ünitesinde ise füzyon peptid bölgesi (FP) iki adet 7'li tekrarlayan bölge içeren HR1 ve HR2 olarak adlandırılan alt ünitelerinden oluşur. Endozom içindeki virüsün S1 alt ünitesi kesilip, ayrılırken S2'nin HR1 (Heptad Repeat 1) ve HR2 bölgeleri biraraya gelerek konağın membranıyla füzyon oluşturur [31]. Daha sonra virion konağın sitoplazmasına genetik materyalini bırakır. Sars-Cov-2 RBD'si Sars-Cov RBD'si ile %72'lik benzerlik göstermektedir. Ancak Sars-Cov2 RBD'sinin Sars-Cov RBD'sine göre ACE2'ye bağlanma affinitesinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Viral genom konak hücrenin sitoplazmasına bırakıldıktan sonra viral proteinlerin üretimi ve replikasyon başlamaktadır. Üretilen proteinler Endoplazmik Retikulum-Golgi ara kompartmanına (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)) gönderilerek virüs partikülü birleştirilmekte ve endozomal kese içinde hücre yüzeyine taşınarak yeni oluşan virüs partikülleri hücreden uzaklaşmaktadır [32] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sars-Cov2 virüsünün hücreye giriş ve hücreden çıkış mekanizmaları [33]

ACE2; Renin-Anjiyotensin-Aldesteron -Sistemi (RAAS) üyesidir. Bu enzim kan basıncı ve sıvı dengesinden sorumludur. Akciğerde önemli göreve sahip bu enzim vazodilatasyonu inhibe ederek, vasküler permeabiliteyi artırır. ACE2'nin gastrointestinal sistemde başka bir görevi ise bağırsak ekolojisi veya lokal innate immün yanıtın regülasyonuna etki göstermesidir. ACE2'yi ekspresse

eden çeşitli organlar vardır ve ACE2 sirkülasyonda da bulunmaktadır. Akciğer, kalp, böbrek, beyin hücreleri, enterositler, keratinositler, alveolar makrofajlar ACE2 ekspresye etmektedir [11]. Canlıların yaşamı boyunca ACE2 ekspresyonu değişiklikler gösterirken; hastalıklara (hipertansiyon, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar) göre de ekspresyon düzeyi değişmektedir. Fakat Sars-Cov2 enfeksiyonunun şiddetiyle ACE2 ekspresyon düzeyinin korelasyonunu gösteren çalışmalar halen kesin sonuçlar vermemektedir [11].

M proteini, koronavirüslerin zarf proteinidir. Viral hücre içi dengenin sağlanmasında rol oynar [34]. E proteini, koronavirüslerin en küçük proteinidir. Virüsün üretiminde, maturasyonunda ve tomurcuklanarak konak hücreden ayrılmasında rol alan virülans faktördür. Ayrıca konak hücre inflamazomunun oluşumunu da tetiklemektedir. N proteini, konak hücrenin endoplazmik retikulum-Golgi aygıtı çevresinde lokalize olan viral RNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol alan virülans faktördür [34].

Sars-Cov2 yaklaşık 30000 bazlık RNA genomuna sahiptir. Genomunda, genomun en büyük parçasını oluşturan yaklaşık 20000 bazlık açık okuma çerçeveleri (Open Reading Frame (ORF)) olarak adlandırılan genler oluşturmaktadır. ORF'lerde durdurucu kodonlar bulunmamaktadır ve 16 gen tarafından 27 yapısal olmayan protein (non-structure protein (nsp)) kodlanmaktadır. Koronavirüslere ait olan kaygan RNA dizisi (frame shift) sayesinde virüslere özgü bir okuma mekanizması bulunmaktadır. Ribozomda RNA polimeraz nsp1'den nsp10' a kadar durmadan ilerlerken RNA polimeraz; RNA'nın bu kaygan dizisine geldiğinde durup, ancak tekrar geriye gittiğinde ilerleyebilmektedir. Bu yöntemle farklı bir okuma stratejisi kullanılmaktadır. Genomun 3' ucunda bulunan ORF3 ve ORF10 genleri spike proteinin de içinde bulunduğu yapısal ve aksesuar proteinleri kodlamaktadır. ORF4 geni E proteinini, ORF5 geni M proteinini, ORF9 geni ise N proteinini kodlamaktadır [35]. 3' uçta bulunan bu genlerin RNA okumaları 3' yönden 5' yöne doğru yani ters yönde olmaktadır ve okuma sonunda negatif polariteli bir RNA ortaya çıkmaktadır. Bu negatif polariteli RNA, RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi sayesinde pozitif polariteli RNA'ya dönüştürülmesi gerekmektedir çünkü insan RNA polimerazları sadece pozitif polariteli RNA'ları okuyarak protein üretebilmektedir [36].

#### **2.4. Virüs-Konak İnteraksiyonunun Başlangıcı**

Alveolar epitelyal tip 2 hücreler tüm ACE2 ekspresye eden hücrelerin %83'ünü içerir ve diğer respiratuar virüslerin örneğin influenzanın akciğerde neden bu kadar hasar yaptığını açıklar. Akut

akciğer hasarı innate immün yanıtla tetiklenir [38]. Alveolar endotelial hücreler ve makrofajlar Pattern Recognition Receptors (PRR)'leri aracılığıyla virüse ait Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP)'ları tanır. Th<sub>1</sub> polarizasyonu ilişkili proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin sentezlenmesine neden olur [38]. Üretilen Tip 1 interferonlar (İFN) ve İFN-stimüle genler immün sistem regülasyonunda oldukça önemlidir. Diğer innate komponentler Natural Killer (NK hücreler), kompleman ve koagülünasyon sistem, doğal antikolar, diğer sitokinler Sars-Cov2 immün yanıtında görev almaktadırlar. T ve B hücrelerin rol aldığı adaptif immün yanıt, semptomlardan yaklaşık 1 hafta sonra gelişmektedir [37].

## 2.5. Konak İmmün Sisteminin Sars-Cov2 Virüsüne Cevabı

Virüsün tanınmasından, virüse karşı verilen immün yanıtın son aşamasına kadar konağa ait pek çok molekül ve hücre virüs elimünasyonu için savaşmaktadır. Bu savaş sonunda virüse karşı istenen yanıtın yanında bir de istenmeyen yanıtlar da ortaya çıkmaktadır. Sars-Cov2 enfeksiyonunda en çok karşılaşılan bu durum bir immün disregülasyon durumudur. Konak immün yanıtı hem innate immün yanıtla hem de adaptif immün yanıtla virüse karşı koymaya çalışmaktadır.

### 2.5.1. İnnate immün yanıt

Konak immün sistemi, PRR'ler ile virüse ait PAMP'ları ve özellikle hücrel stres veya hücrel hasar sonucu ortaya çıkan DAMP (Danger/Damage Associated Molecular Pattern)'ları tanıyarak immün yanıtı başlatır. PRR'ler özellikle Toll-like reseptörler (TLR), RIG like reseptörler (RLR), Nod like reseptörler (NLR), C-tip lektin like reseptörler ve sitoplazmada bulunan virüse ait DNA, RNA gibi serbest molekülleri tanıyan cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), IFI16 (Gamma-interferon-inducible protein 16), STING (Stimulator of interferon gene), DAI (DNA-dependent activator of İFN-regulatory factor) gibi reseptörlerdir. Koronavirüs enfeksiyonlarında özellikle viral ssRNA genomunu tanıyan TLR7 ve TLR8 ile viral genomunu tanıyan RIG-I/MDA-5 (melanoma differentiation-associated protein 5) önemlidir. Koronavirüslerin TLR7 ile tanınması; hücre içinde MYD88 (Myeloid differentiation primary response 88), MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein) gibi adaptör moleküllerin aktivasyonunu ve IRF7/8 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesini ve bunun sonucunda da İL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin, İFN- $\alpha$  ve İFN- $\beta$  gibi Tip 1 İnterferonların (İFN), İFN- $\lambda_{1-4}$  gibi Tip III İnterferonların oluşumunu tetiklemektedir [39]. TLR7 X-linked bir gen tarafından kodlanmaktadır ve cinsiyet farklılığının bu genin ifadenemesindeki önemini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. TLR7 kadınlarda daha iyi

ifadelenmektedir [40]. Bu durum COVID-19 vakalarındaki cinsiyet farklılığının hastalığın seyri ve şiddeti üzerindeki etkisini açıklamaya yardımcı olabilmektedir. NLRP3'ün (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) indüklenmesiyle de İL1 $\beta$ , İL-18 gibi COVID-19'un immünopatogenezinde önemli olan pro-inflamatuar sitokinlerin üretilmesini sağlayan pro-kaspaz1 aktive olmaktadır. Daha sonra aktive pro-kaspaz1 öncü formda üretilen İL1 $\beta$ , İL-18'i aktive eden efektör kaspaz1'e dönüşür. Bu sırada inflamasyonun diğer mediyatörleri olan İL-6, tümör nekrozis faktör (TNF), prostaglandinler ve lökotrienlerin üretimi tetiklenir. Aktifleştiren NLRP3 inflamazomu ayrıca enfekte hücrenin piroptozuna da neden olmaktadır [41,42].

PRR aktivasyonu ile konak hücrede, hücre içi sinyal yolları aktifleşerek sitokin sentezi yapılmasıyla başlayan innate immün yanıt başlar. Tip I ve Tip III interferonlar ile TNF- $\alpha$ , İL-6, İL-1, İL-18 üretilen önemli sitokinlerdir. Bu sitokinler hedef hücrelere karşı antiviral yanıtları başlatmakla birlikte aynı zamanda edinsel immün yanıtın da tetiklenmesine de neden olmaktadır.

### 2.5.2. Adaptif immün yanıt

CD4+ T hücreleri, B hücrelerinin antikor üretmelerine yardımcı olmakta ve diğer immün hücrelerinin yanıtlarını yönetmektedir. Buna karşılık CD8+ T hücreler ise enfekte hücreleri öldürerek, viral yayılımı engellemektedir. Sars-Cov2 enfeksiyonunda ise T hücreleri bu koruyucu yanıtlarına karşın immüdisregülasyona bağlı gelişen immünopatolojilerden de sorumludurlar. Yine Sars-Cov ile yapılan araştırmalar ışığında T hücrelerin virüse karşı geliştirdiği immün yanıt anlaşılmasına çalışılmıştır. Sars-Cov enfeksiyonlarında bildirilen lenfopeniye orta ve ciddi şiddette seyreden COVID-19 hastalarındaki CD4+ T hücre ve CD8+ T hücre sayılarının da düşüklüğünün eşlik ediyor olması bu iki salgında da benzer durumların yaşandığına işaret etmektedir. Özellikle düşük CD8+ T hücre oranı bildirilen yoğun bakım ihtiyacı olan COVID-19 hastalarında hastalığın şiddeti ve mortalitesi ile lenfopenin ilişkisi bulunmaktadır [43-46]. İFN-I ve TNF $\alpha$ 'nın T hücrelerin lenfoid organlarda alıkonmasını sağlayarak kana geçişini engelledikleri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [47,48]. Bu bilgilerle İL-6'nın Fas/FasL gibi aktivasyon indüklü hücre ölümlerinin COVID-19 hastalarının lenfoid organlarında gösterilmesi [49,50], lenfopeninin nedenleri arasında olabilmektedir.

COVID-19'dan iyileşen hastalarda yapılan çalışmalarda CD4+ T hücrelerinin düzeyinin CD8+ T hücre düzeyine göre arttığı; GranzimA, GranzimB ve perforin gibi moleküllerin ekspresyonlarının düştüğü gösterilmektedir [51]. Bu bilgilere dayanarak Sars-Cov2 enfeksiyonunda hastalığın

immünopatolojisinde sitotoksik etki gösteren CD8+ T hücrelerinin yoğun rol oynadığı iyileşme görüldüğünde sitotoksik etkinin yerini CD4+ T hücrelerine bıraktığı, CD4+ T hücrelerinin aktive olması sonucunda da humoral immün yanıtın devreye girdiği hatta nötralizan antikorların üretilebildiği, virüsle tekrar karşılaşıldığında da koruyucu immünitenin ortaya çıkabileceği mümkün görünmektedir [52].

Sars-Cov2 enfeksiyonlarında tetiklenen humoral immün yanıt sonucunda ortaya çıkan virüs spesifik IgM, IgG, IgA ve nötralizan IgG yapısındaki antikorlar ve kinetikleri gösterilmiştir [53]. Yapılan bir çalışmada antikorların serokonversiyon günleri belirtilmiştir. Bu çalışmaya göre ilk semptomdan yaklaşık 10 gün sonra IgA, ilk semptomdan 5 gün sonra ise IgM ve IgG'nin pozitif oldukları bildirilmektedir [54]. Aynı çalışmada ağır COVID-19 hastalarında; hastalığın ağır seyirli olmayanlarına göre artmış IgA ve IgG düzeyleri rapor edilmektedir [55]. Sars-Cov2'ye karşı gelişen humoral immün yanıtta en can alıcı konu hafıza B hücre yanıtının ömrüdür. Sars-Cov2'nin serokonversiyonu şüphesiz etkili T hücre yanıtına bağlıdır. Affinite maturasyonunun, sınıf dönüşümünün önemli elemanı olan T hücrelerinin Sars-Cov2 enfeksiyonlarında rollerini gösteren birçok çalışma mevcuttur.

## 2.6. COVID-19 Laboratuvar Bulguları ve Prognoz

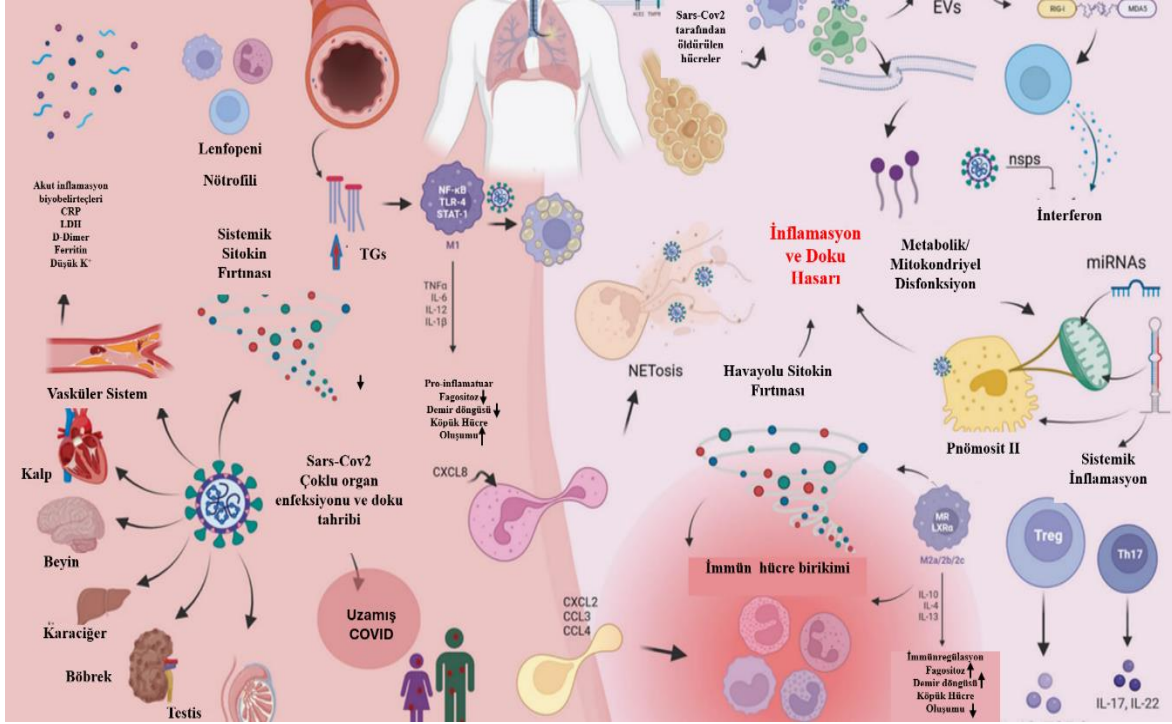
Genellikle hastalığın erken safhalarında non-spesifik semptomlar olarak adlandırılan öksürük ve ateş görülebilmektedir. Bu durumda hastaların hematolojik bulguları normal seyredebilmektedir [55].

Hastalıkta ortalama periferik kan lökositleri düzeyi  $4,5-11,0 \times 10^9/L$ , lenfosit düzeyi  $1,3-4,5 \times 10^9/L$  olarak bildirilmektedir [56,57]. Bununla birlikte şiddetlenen COVID-19 hastalığında özellikle nötrofil sayısı artma eğilimindedir ( $>10\ 000/mm^3$ ), düşmüş T lenfosit ( $<1500$  hücre  $mm^3$ ) (özellikle CD4+ ve CD8+ T hücrelerin düşüklüğü) hafif seyreden olgularda bile bildirilmiştir [56,57]. Enfeksiyonun erken fazında viral klarens için üretilen Tip 1 İnterferonlar tarafından viral replikasyonu engellemek için önemli belirteç olsa da T hücre yorgunluğu, sitokin fırtınası gibi durumlara da neden olduğu bildirilmektedir. Enfekte hastaların çoğunda (hastalığın şiddetli seyredenleri hariç); CD4+ T hücrelerinin (özellikle Th1) yanıtlarının CD8+ T hücreler üzerinde baskın rol üstlendiği gösterilmiştir [58]. Ayrıca hastalığın hafif seyredenlerde ağır seyredenlere kıyasla efektör ve merkezi hafıza T hücrelerinin daha iyi gelişmesi ve hafıza T hücrelerinin oluşumunun iyileşme ile korelasyonu gösterilmiştir [59]. Orta ve şiddetli COVID-19'da periferik T hücre kaybının birçok nedeni olduğu gösterilmekte ve inflamatuvar sitokin ortamının lenfositlerin

vasküler duvara doğrudan bağlanmasının önemli olduğu vurgulanmaktadır [60]. Sitokin fırtınası COVID-19 hastalığının laboratuvar bulgularını büyük ölçüde etkilemektedir ve bazı sitokinlerin düzeyi hastalık için biyobelirteç olabilmektedir. İL-6 ( $> 40\text{pg/ml}$ ), plazma C-reaktif protein (CRP) ( $\geq 10 \text{ mg/ml}$ ), Prokalsitonin (PCT) ( $\geq 0,5 \text{ ng/ml}$ ) ve serum Ferritinin ( $> 300 \text{ ng/ml}$ )'in yükselen düzeyleri özellikle ARDS gelişimiyle ilişkilendirilmiştir [61,62]. İL-6'nın artan düzeyi ölümlle ilişkilendirilmiş ve hastaneye yatış ihtiyacı olan hastalarda; yatış boyunca artan düzeyi hayatta kalma riskiyle korele bulunmuştur. Bununla birlikte serum CRP, Prokalsitonin ve Ferritinin zayıf prognostik faktörler oldukları gösterilmiştir. Sars-Cov2 diğer sistemik koagülopatilere (DIC (Disseminated intravascular coagulation) veya trombotik mikroanjyopati) neden olmaktadır [63].

## 2.7. COVID-19'un İmmünopatogenezi

COVID-19 hastalarında görülen lenfopeninin yaşa ve komorbiteye bağlı olabileceği düşünülse de immün sistemin Sars-Cov2 enfeksiyonu boyunca baskılanması mümkün olabileceği de düşünülmektedir. Yapılan immünohistokimyasal analizlerde Sars-Cov2'nin, sekonder lenfoid organları direkt infekte ettiği ve hücre ölümlerine neden olduğu görülmüştür. Sars-Cov2 enfeksiyonu lenf folikül deplesyonu, dalak nodül atrofisi, histiosit hiperplazisi ve lenfosit deplesyonu gibi ciddi doku ve hücre hasarlarına da neden olmaktadır [64]. Sars-Cov2 ile enfekte hastaların sağlıklı bireylerle karşılaştırıldıklarında %80'inde lenfopeni ve artmış nötrofil/lenfosit oranı bildirilmektedir [65]. Sars-Cov'un neden olduğu pulmoner lezyonların histopatolojik incelemelerinde sadece ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonları gibi non-spesifik inflamatuvar yanıtlar değil, ciddi alveolar epitelyal hücre döküntüleri, alveolar septal genişlemesi, alveolar septa hasarı da gözlenmektedir [66]. (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Sars-Cov2 İmmünopatogenezi [67]

Sars-Cov enfeksiyonları nekrozis, infiltrasyon ve hiperplazilere neden olmaktadır. Koronavirüslerin en patolojik etkisi pulmoner interstitiyal arteriyel duvarlarında inflamatuvar yanıtla bağlı gelişen hasarlardır [68].

Solumun yolu epitel hücrelerinde viral replikasyon, virüse bağlı piroptoza da neden olabilmektedir. İL-1 $\beta$ , piroptoza neden olan önemli bir sitokindir ve Sars-Cov2 enfeksiyonu boyunca oldukça yoğun görülmektedir [41,42].

Sitokin İlişkili Sendromlar (cytokine release syndrome (CRS)), kontrolsüz sistemik inflamasyona ve makrofaj, DH, NK, T ve B hücrelerinin uzun süren aktivasyonu ile karakterizedir. CRS’de, yüksek düzeyde TNF $\alpha$ , İL-1 $\beta$ , İL-6, İL-12, İL-18, İL-33, İFN $\gamma$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanında CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 gibi kemokinlerin yüksekliği de söz konusudur. Sars-Cov2’nin sistokin fırtınasının oluşumuna katkısı birkaç mekanizma ile açıklanmaktadır [69]. Sars-Cov2’de de viral proteinlerin PRR’ler ile interaksyonu aşırı immün yanıtın ortaya çıkmasına neden olabilmektedir [70,71]. Sars-Cov2’nin hücrelere giriş için ACE2 reseptörüne ihtiyaç duyması da sitokin fırtınasının ortaya çıkışında önemli bir etken olabilmektedir. Virüs, ACE2’ye bağlandığında endositozla hücre içine alınmaktadır. ACE2, Anjiyotensin II’nin (AII) sirkülasyonda artışına neden olan bir enzimdir [72,73]. AII’nin artan

düzeıy iñflamatuar süreci başlatmakta iken bu sürece PAMP-PRR interaksiyonu ve sinyal yolaklarının aktivasyonu da dahil olmaktadır. Kuba ve arkadaşları anjiyotensin II (AII) reseptör blokerlerinin Sars-Cov2 enfeksiyonunda ARDS gelişimin azaltabileceğini göstermişlerdir ve bu yolağın koronavirüs enfeksiyonundaki önemini vurgulamışlardır [74].

## 2.8. COVID-19’da Hücre Ölümleri

Hücre ölümü hasar görmüş veya enfekte hücrelerin yerine daha sağlıklı olanların gelmesi için ortaya çıkan süreçtir. Programlanmış hücre ölümleri üç ana mekanizma ile karakterizedir: (1) Apoptoz, (2) Piroptoz, (3) Nekroptoz. Enerji bağımlı bu mekanizmalar birçok moleküler yolak ve düzenleyici genleri içine almaktadır [75].

### 2.8.1. Apoptoz

Doku homeostazisi için merkezi rol oynayan apoptoz, birçok molekülün de katıldığı yolaklarla fizyolojik veya patolojik olaylarda rol oynamaktadır [75]. Programlanmış hücre ölümleri arasında en sık görülen ölüm mekanizmasıdır. Apoptozun morfolojik değişiklikleri hücrenin küçülmesi, kromatinin yoğunlaşması ve parçalanması, apoptotik cisimciklerin oluşması ile karakterize edilir. Aslında apoptoz fizyolojik ve patolojik olaylarda hücre sel denge nin korunması için önemli bir mekanizmadır [76,77]. İntrinsik ve ekstrinsik olarak iki yolakla aktive olmaktadır. Ekstrinsik yolağı TNF ailesi üyeleri olan ölüm reseptörü olarak bilinen reseptörler tetiklerken; intrinsik yolakta tetikleyici unsur mitokondriyel yolaktır [78]. Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) ve kaspaz 9 interaksiyonuna “**apoptozom**” adı verilmektedir ki bu kompleks kaspaz 3,6 ve 7’yi aktive etmektedir [79]. İntrinsik veya mitokondriyel yolak ise DNA hasarı gibi faktörlerle stimüle edilmekte ve bu durum mitokondri membran permeabilizasyonunu etkileyerek sitokrom c’nin (Cyt c) sitoplazmaya salınımına neden olmaktadır [80]. Apoptozun disregülasyonu, çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilir. Viral enfeksiyon sürecinde de apoptoz görülmektedir. Aslında apoptoz, enfekte hücrelerinin ölüm mekanizması olduğu için yararlı bir mekanizmadır fakat virüs evazyonunda bu mekanizmayı kullanabilmekte ve hatta konak apoptoz mekanizmalarını inhibe edebilmektedir. Virüs, evazyon mekanizması olarak aslında immün yanıt hücrelerinde apoptozu indükleyerek, immün yanıtı kaçırmaktadır. Sonuç olarak virüsler apoptoz ile ölüm ve inflammatuar bir çevre yaratmakta ve bu durum aslında konak için apoptoz mekanizmasının iki ucu keskin bıçak olduğunu ortaya koymaktadır. Virüsler ölüm

reseptörlerini ve ligandlarının ekspresyonunu artırmaya eğilimlidirler bu yolla reseptör aracılı apoptoza hücreyi, dokuyu, organizmayı hazırlamaktadırlar. Her virüse özgü kullanılan farklı apoptotik yolak ve molekülleri vardır [81]. Mers-Cov ise alveolar hücrelerin apoptozunu indüklemektedir. Alveolar hücrelerin ölümüyle başlayan inflamasyon yayılarak alveolar yüzeyde geniş çapta hasar ortaya çıkarmaktadır [82]. Mers-Cov ayrıca T hücrelerini de enfekte etmektedir ve intrinsik, ekstrinsik hücre ölüm yolaklarını tetiklemektedir bu durum Mers-Cov enfeksiyonunda görülen ölüm oranının Sar-Cov ve Sars-Cov2'ye göre daha fazla olmasının nedenini açıklamaktadır [83]. Virüsler sadece viral partikülleri serbest bırakmak için konak hücre apoptozunu teşvik etmekle kalmaz, bazı durumlarda replikasyonları için hücrelerin tüm olanaklarını kullanmak amacıyla çeşitli inhibisyon mekanizmalarını indüklerler. Dolayısıyla konak hücreler virüs replikasyonunu durdurmak için apoptozu teşvik etse de virüsler bu süreci engellemek için örneğin ölüm reseptörlerinin ortologlarını ifade ederek veya konak hücre ölüm sinyallerini antagonize ederek proteinlerini kodlayacak mekanizmalar geliştirirler. Elbette Sars-Cov2 virüsünün de hücre apoptozunu etkileyecek stratejileri bulunmaktadır.

### Apoptoz ve Sars-Cov2

Sars-Cov2 ile enfekte hasta akciğer örneklerinde ve enfekte primatların akciğer örneklerinde apoptoz belirlenmiştir ve ARDS ile ilişkisi açığa çıkarılmıştır [84]. Primat çalışmalarında alveolar tip1 ve tip2 hücrelerinde, vasküler endotel hücrelerde, makrofajlarda ve T hücrelerinde intrinsik ve ekstrinsik yolaklarının Sars-Cov2 ile tetiklendiği bildirilmiştir. Solunum epitel hücrelerinde, vasküler endotel hücrelerde SARS-Cov2 ile indüklenen apoptoz üzerine yapılan bir dizi çalışma bu ortak görüşte buluşmuştur [85-88]. Sars-Cov2 hayvan modellerinde akut böbrek enfeksiyonu sırasında renal tübüler hücrelerde de apoptoz görülmüştür [89]. İmmün yanıt disregülasyonu Sars-Cov2 enfeksiyonunda birçok patolojik olayın ortaya çıkmasına neden olmaktadır [90,91]. Bu olaylardan biri de lenfopenidir. Apoptozunun lenfopeni nedeni olabileceğini gösteren iki çalışmada azalmış CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde [49] FasL'in ekspresyonlarının arttığı [50] ağır seyirli hastalarda gösterilmiştir. Aynı zamanda apoptoz ilişkili kaspazların aktivasyonu [92] COVID-19'un ağır seyrettiği hastaların T hücrelerinde görülmüştür. Cyt c salınımının eşlik ettiği düzensiz şekiller ve tamamlanmamış kristallara sahip işlevsiz mitokondri, hastaların T hücrelerinde tespit edilmiştir [93]. Ayrıca COVID-19'un lenf nodundaki (LN'ler) B

hücrelerinde yüzey FasL ekspresyonu, Sars-Cov2 tarafından indüklenen B hücre apoptozunu kanıtlamaktadır [94].

Yapılan çalışmalar makrofajlar ve dendritik hücrelerde hasarlı mitokondri ve kaspaz 3 aktivasyonuna bağımlı apoptozu göstermiş ve bu hastalarda anti-İFN $\gamma$  yanıtının etkili olduğu vurgulanmış [95] ve İFN $\gamma$  indüklü kaspaz8 aracılı makrofoj hücre ölümü gösterilmiştir [96]. Ayrıca viral enfeksiyonlar sırasında Tip 1 İFN (İFN $\alpha$  ve İFN $\beta$ ) sekrete ettiğini bildiğimiz pDH'lerin [97], ağır seyirli COVID-19 hastalarında düzeyi düşmektedir.

### Sars-Cov2 Tarafından Konak Apoptozunun İnhibisyonu

Sars-Cov2'nin erken aşamada replikasyon için yeterli zaman ve yer elde etmek amacıyla eliminasyondan kaçınmak için apoptoz inhibisyonunu kullanacağı düşüncesi de ortaya atılmıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda Sars-Cov2'nin, hücre ölüm mekanizmalarının düzenleyici molekülleri olan hücrel FAAD (Fas-associated death domain protein) benzeri İL-1 dönüştürücü enzim inhibitör proteininin (cFLIP) up regülasyonuna direkt veya indirekt olarak müdahale ettiği gösterilmiştir [98]. cFLIP, Kaspaz8/10'u baskılayan bir proteindir. Sars-Cov2 enfeksiyonunun başlangıcında miRNA-155'in yukarı regülasyonunun görülmesinin, c-FLIP'i aktive eden forkhead transkripsiyon faktörü O 3a'nın (FoXO3a) ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir [99]. Ayrıca NFK $\beta$  (Nuclear Factor kappa) yolağı üzerinden bazı apoptotik inhibitör moleküllerinin (cFLIP, XIAP ve Bcl2) üretimini de sağlamaktadır. Sars-Cov2 enfeksiyonu anında NFK $\beta$ 'nin aktive olduğu bilgisiyle [90,100] bu moleküllerin de beraberinde üretiliyor olması mümkündür. Ayrıca Sars-Cov2'nin nsp13 ve ORF9 proteinlerinin NFK $\beta$  yolağıyla interaksyon kurduğunu gösteren proteomiks çalışması [101] Sars-Cov2'nin hücrelerin apoptoz mekanizmalarına müdahale edebileceğinin göstergesidir.

### Sars-Cov2 Tarafından Konak Apoptozunun İndüksiyonu

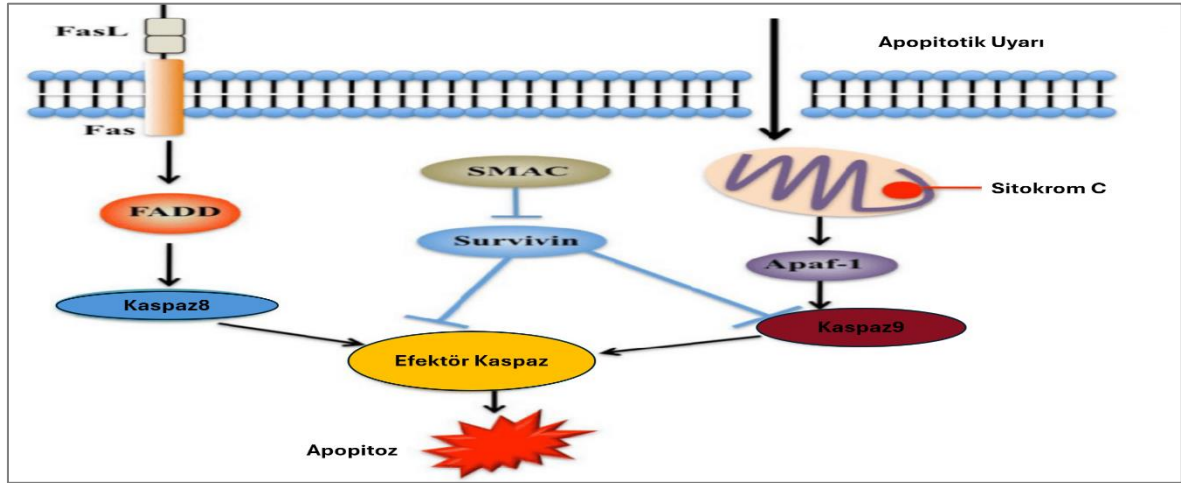
Sars-Cov ORF3a'nın önceki bulgularına benzer şekilde [102,103] Sars-Cov2 ORF3a'nın da apoptozdan sorumlu olan ve virüs salınımını teşvik eden hücre içi homeostazı bozmak için hücre zarında bir iyon kanalı oluşturma yeteneğine sahip virioporin olarak tanımlanmaktadır [104,105]. Başka bir çalışma, Sars-Cov2 ORF3a'nın ekstrinsik yolak için kaspaz8'i doğrudan kesip, aktive ederek ve BID (BH3 interacting-domain) aracılığıyla intrinsik yolu aktive

ederek, sitokrom c salınımına ve kaspaz9 aktivasyonuna yol açarak apopitozu etkili bir şekilde indükleyebileceğini göstermiştir [106]. Hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada ise TNF $\alpha$  regülasyonu ve TNF $\alpha$  indüklü apopitozun ortaya çıkmasında Sars-Cov2 proteini olan ORF7b'nin etkisi gösterilmiştir [107]. Ayrıca yapısal protein olan E proteininin bir iyon kanalı gibi davranarak apopitozu indüklediği [108] ve yine yapısal bir protein olan M proteininin hem bir pro-apopitotik protein olan BOK'u (Bcl-2-related ovarian killer) inhibe ederek [109], FasL'ın hücre yüzeyinde ekspresyonunu artırarak ekstrinsik apopitozu teşvik ettiği [110] gösterilmiştir. Normal hücre koşullarında apopitoz da bir denge halindedir ve bu denge mekanizmalarında çeşitli moleküller rol oynamaktadır. Bu moleküllerden biri de apopitoz inhibitör ailesi üyesi olan SVN'dir. SVN, anti-apopitotik molekül olması yanında hücre bölünmesinde etkilidir.

### Apoptozda Survivin

BIRC5 olarak da bilinen SVN, evrimsel süreçte korunmuş ökaryotik proteinlerden birisidir. Hücre bölünmesinde rol almaktadır ve hücre ölümlerini inhibe etmektedir. Özellikle proliferen olan hücrelerde ekspresyon edilmektedir bu nedenle kanser hücrelerinde iyi tanımlanmış ve onko-terapötik yaklaşımlara konu olmuştur.

SVN, embriyonik ve fetal organlarda yaygın olarak ifade edilir [111]. Yetişkinlerde SVN kemik iliği kök hücrelerinin, timositlerin [112] oluşumuna katılır ve eritrositlerin farklılaşmasında rol oynar [113]. SVN ayrıca lökositlerin farklılaşması ve DH'lerin hayatta kalması ve olgunlaşması için de gereklidir [114]. Organ rejenerasyonunda da rol oynar ve epitelyal hücre proliferasyonunu destekler (Şekil 2.4) [115].



Şekil 2.4. SVN'nin moleküler mekanizmaları [123]

SVN, apoptoz inhibitörü protein ailesinin (IAP) en küçük üyesidir. Bu proteinler hücre mitozunun regülasyonunda ve apoptoz inhibisyonunda önemli bir rol oynar. 1997 yılında Ambrosini, insan 17. kromozomunda (q25) bulunan SVN genini klonlamıştır [117]. Bu gen 147 kb uzunluğundadır ve dört ekzonu, beş intronu bulunmaktadır. İnsan SVN'si 142 amino asit içeren 16,5-kDa'lık bir proteindir. SVN iki fonksiyonel domain içerir: (1) N-terminalinde Baculoviral IAP tekrarı (BIR) (100 aa) (2) C-terminalinde bir  $\alpha$ -sarmal (42 aa). Hem BIR hem de  $\alpha$ -helikal bölgeler mitozun regülasyonda rol oynar. Buna karşılık, apoptoz düzenleme bölgesi sadece BIR'i içerir [118]. SVN çekirdekte, sitoplazmada, mitokondride, eksozomlarda, hücre zarının dış yüzeyinde ve hücre dışı matriks içinde bulunur. SVN'nin çoklu işlevleri arasında asetilasyon, ubikitinasyon ve özellikle fosforilasyon da dahil olmak üzere kapsamlı posttranslasyonel modifikasyonlar yer almaktadır [118]. SVN ile aktive olan hücre mitozu çekirdekte gerçekleşir ve bu süreç SVN'nin fosforilasyonuna bağlıdır. Nükleer SVN'nin Ser20, Thr34 ve Thr48'de fosforilasyonu; mitoz bölünme, hücre proliferasyonu ve hücre canlılığı için gerekli olan doğru kromozom hizalanmasını sağlar. SVN Aurora-B kinaz, INCENP (Inner centromere protein) ve Borealin ile birlikte Thr117'sinde fosforillendiğinde kromozomal/mikrotübül bağlanmasını ve sitokinezi düzenler [119].

SVN'nin, 89-130. rezidülerinin asetilasyonu SVN dimerizasyonunu ve nükleer translokasyonuna neden olmaktadır. SVN'nin 99-142. rezidüsü ise mikrotübüller ile etkileşime girmektedir. SVN'nin Lys63'teki ubikitinasyonu, mikrotübüllerin dinamik ilişkisini kontrol ederek kromozom hizalanmasını düzenler [123].

SVN'nin aynı zamanda apopitoz ile ilişkili amino rezidüsü bulunmaktadır. Ser20, XIAP'ye bağlanır. Thr34 ise sitokrom c salınımını antagonize eder [121]. Tümör oluşumu için nükleer SVN'nin rol aldığı çeşitli mekanizmalar vardır. Çok sayıda çalışma, nükleer SVN'nin kanser hücrelerinde görülen kırılmış DNA çift iplikçiklerinin onarımını DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PKCs) [122] alt birimi ve Ku70 (DNA onarım alt birim proteini) (123) ile interaksiyon kurarak desteklediğini, poli ADP-riboz polimeraz (PARP) aktivasyonunu azaltarak DNA hasarını düşürdüğünü [124] göstermiştir. Sonuç olarak, kromozomal aberasyonları artıp, SVN'yi aşırı eksprese ederek apopitozunu azaltan hücre, tümör hücrelerine dönüşür [125]. Kanserle ilişkisi üzerinde oldukça çalışma bulunan SVN'nin ayrıca kanser hastalarında kemoterapiye karşı direnci artırdığı da bilinmektedir [126].

Mitokondriyal SVN ise apopitoz indükleyici proteinlere bağlanarak apopitozu inhibe eder. Apopitozu indükleyen iki protein, Cyt-c (sitokrom C) ve SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase) apopitozom kompleksinin oluşumuna katılırlar [127]. Bu durum pro-kaspaz9'u aktive eder [128]. Mitokondriyal SVN'nin Thr34'ten fosforilasyonu, Cyt-c'nin salınımını antagonize eder. Ek olarak, Leu64,87 ve Asp70,71 fosforilasyonu ise apopitozom kompleksinin oluşumunu engeller [118,119,129]. Ayrıca SVN, kaspaz bağımsız yolağında AIF (apoptosis-inducing factor)'e bağlanarak apopitozu inhibe eder [119]. SVN'nin Thr48'deki fosforilasyonu anti-apopitotik fonksiyonu için kritik öneme sahiptir [126]. HSP90 (Heat shock protein 90) ve HSP60, SVN'nin 79-90 rezidüsüne bağlanır ve moleküler şaperonlar olarak hareket ederek SVN stabilitesini ve apopitoz inhibisyon fonksiyonunu güçlendirir [129-131].

SVN, Adenomatöz polipozis koli proteini (APC) [132], retinoblastoma proteini (pRB, RB1 olarak da bilinir) [133], fosfataz ve tensin homologu (PTEN) ve dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF $\beta$ ) [134] tarafından indirekt baskılanırken; forkhead box O3 (FOXO3) ve p53 (TP53 olarak da bilinir) [135] tarafından doğrudan baskılanır.

Ayrıca SVN; Hipoksi indükleyici faktör 1 (HIF1), nükleer faktör  $\kappa$ B hücreleri (NF $\kappa$ B), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon faktörlerinin aktivatörü (STAT) ve  $\beta$ -katenin dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörü tarafından aktive edilir. Bununla birlikte STAT transkripsiyonel faktör ailesi tarafından regüle edilen İL-4 ve İL-6 gibi sitokinler, SVN'nin ekspresyonunu indüklemektedir [136].

SVN, hücreleri apoptotik ve otofajik ölüme karşı korur. Sitoplazma içindeki lokalizasyonu SVN anti-apoptotik aktivitesi için çok önemlidir çünkü SVN'nin nükleer lokalizasyonu bu fonksiyonunu ortadan kaldırır [137], mitokondriyal yerleşimi bu aktiviteyi artırır [138]. Kaspaz aktivitesinin hem homodimerik hem de monomerik durumlarda SVN ekspresyonu ile azaldığına şüphe olmasa da [139], diğer IAP'lerin aksine SVN sadece tek bir BIR alanına sahiptir ve fizyolojik konsantrasyonlarda kaspazlara bağlanmaz. SVN ayrıca apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'in (Apaf-1) mitokondriden salınmasını önleyebilir veya ikinci mitokondriyal kaynaklı kaspaz aktivatörünü (Smac; Diablo olarak da bilinir) diğer IAP'lerden uzak tutabilir [140].

Homeostazi korumak için, bazal düzeyde otofaji, kusurlu organelleri ve yanlış katlanmış proteinleri uzaklaştırmak için çalışır. Besin tükenmesi gibi strese yanıt olarak, kısa süreli hayatta kalmayı sağlamak için otofaji indüklenir. Bununla birlikte, katabolik bir geri dönüşüm sistemi olarak aşırı otofaji nihayetinde bir hücreyi öldürür, bu da kanser bağlamında tümör baskılayıcı bir süreçtir. Protein kinaz B (AKT1 olarak da adlandırılır), fosfoinozimid 3-kinaz (PI3K) sinyal yolunu aktive eden [148] ve SVN ifadesini artıran sitokin tedavisi otofajik ölümü engelleyebilir [142].

SVN, kanser dışında, otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda da aşırı eksprese edilir. Otoimmün hastalıkta, SVN ekspresyonu otoreaktif lenfositlerde apoptozu önler ve otoantikörlerin ve sitokinlerin üretimini artırır. Romatoid artrit (RA) [143,144], myastenia gravis (MG) [145], multiple skleroz (MS) [146], sistemik lupus eritematosus (SLE) [147], inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) [148] ve sistemik skleroz (SSc) [149] gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıkta yüksek SVN düzeyleri tespit edilmiştir.

### Viral enfeksiyonlarda Survivin

Tümör dokularında SVN ekspresyonunun onkovirüslerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar, meme kanseri ve nazofarengeal sarkomlarda Epstein-Barr virüsü (EBV) ile SVN'nin ilişkisini göstermektedir [150]. Papilloma virüs 16'nın indüklediği servikal kanser hastalarında da SVN ekspresyonu bildirilmektedir [151]. Ayrıca önemli viral proteinlerin de SVN ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmektedir. Bunlar arasında, İnsan papilloma virüsü 16 E6 proteinlerini, EBV'nin latent membran proteini-1'i (LPM-1), adenovirüs 2'nin E1B-55k proteinini saymak

mümkündür [150]. Bu proteinler kısmen p53 onkoproteinini parçalayarak ve kısmen CDK4 ile kompleks oluşumunu teşvik ederek, SVN ekspresyonunu regüle etmektedirler. HIV virüsünün bir aksesuar geni olan Vpr, SVN promotorunu doğrudan etkileyerek, ekspresyonunu indükler [152]. Kaposi sarkomu ile ilişkili virüs olan insan herpes virüsü 8, kodladığı K7 proteini ile mitokondride SVN regülasyonuna katılarak, anti-apoptotik etki gösterir [153].

Virüslerin SVN ile etkileşimine ek olarak, hücre içi hayatta kalmalarını kolaylaştıran diğer anti-apoptotik mekanizmaları da etkilediğini biliyoruz. Fakat SVN'nin koronavirüs enfeksiyonlarında hangi yönde rol aldığı şimdye kadar tam olarak tanımlanamamıştır.

### Sars-Cov2 enfeksiyonunda Survivin

COVID-19 hastalığında SVN'nin rolünü konu alan birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların ortak noktası ağır seyirli COVID-19 hastalarında görülen lenfopeninin nedeninin apoptoz olduğu ve bu hasta serumlarında SVN düzeyinin düşük olduğu yönündedir. Ayrıca Kahrizi ve arkadaşları bir çalışmada SVN sinyal yolağının düzenlenmesindeki bozulma uzun süreli kalp hasarına yol açabileceğini bildirmişlerdir. Bu bağlamda, Sars-Cov2 'nin viral replikasyonu ve immün kaçıışı desteklemek için, SVN düzeylerini düşürdüğü ve kalp hasarına karşı koruma sağlayan başlıca onarıcı süreçleri ortadan kaldırdığı belirtilmiştir [154]. Bu bilgilere bağlı kalan başka bir görüş ise uzamış COVID-19 hastalığında özellikle kalp semptomları üzerinde SVN düzeyinin etkili olabileceği yönündedir [155].

Sonuç olarak, COVID-19 patogenezinde SVN'nin düşük ekspresyonunu ve XIAP'nin aşağı regülasyonu ve kaspazların yukarı regülasyonu gibi ilgili hedef genlerinin düzensizliği ortaya çıkmaktadır. Bu yolağın düzensizliğinin lenfopeninin olası nedenlerinden biri olabileceği görülmektedir. Bu bağlamda, COVID-19'lu hastalarda SVN'nin aşağı regülasyonu ile lenfositlerin apoptoza direnci arasındaki korelasyon değerlendirilmiş, bu da SVN'nin ve apoptotik yolun lenfositlerin hayatta kalmasını kontrol etmedeki rolünü göstermiştir. Bu bağlamda SVN ve ilgili apoptotik yolak, ağır seyreden COVID-19 hastalarında lenfopeninin olası nedenleri arasında olabilir; ancak bu alanda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

### HIF-1 $\alpha$ ve Survivin

Tümör mikroçevresinde gözlenen hipoksik koşullar, tümör anjiyogenezi, evazyon, metastaz ve terapötik direnç gibi biyolojik süreçler için önemlidir [156]. Hipoksiye yanıt olarak hücreler, dimerik bir protein kompleksi olan HIF-1 $\alpha$ 'nın ve HIF-1 $\beta$ 'nin, HIF-1 transkripsiyon faktörü tarafından genleri, ifadelenir [157]. Hipoksik koşullarda HIF-1'in ekspresyonunun artması, hücre fonksiyonlarıyla ilişkili pek çok başka genin de ifadelenmesini indüklemektedir [158].

HIF-1 $\alpha$ ; meme, akciğer ve pankreas gibi kanser türlerinde kanser hücrelerinin SVN ekspresyonunu düzenler [159,160]. Örneğin, pankreas ve meme kanseri hücrelerinde HIF-1 $\alpha$ 'nın susturulduğu çalışmalarda SVN düzeyinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [161]. Daha ileri çalışmalar, HIF-1 $\alpha$ 'nın doğrudan ekspresyonu aktive etmek için SVN promotoruna doğrudan bağlandığını bildirmiştir [161]. Malign lenfoma hücrelerinde, NF- $\kappa$ B'nin, HIF-1'in aberan aktivasyonuna aracılık ettiği ve bu NF- $\kappa$ B/HIF-1 aksının da SVN üzerinde etkisi olduğu tespit edilmiştir [162]. Yapılan başka bir çalışmada adenoid kistik karsinoma hastalarının doku örneklerinde HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 'in SVN ile birlikte ekspresse edildikleri gösterilmiştir. Bu hastalarda SVN'nin inhibe edilmesinin HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 'in ifadesinin düşüklüğüne neden olduğu bildirilmiştir [160].

### TGF- $\beta$ ve Survivin

TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta), üç izoformu olan oldukça işlevsel bir sitokin olarak bilinmektedir. Bu 3 izoform: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3'tür [163]. TGF- $\beta$ , epitelyal, hematopoetik ve nöronal hücreler gibi çeşitli hücreler tarafından inaktif formda üretilmektedir [164]. TGF- $\beta$  süper ailesi sinyalizasyon düzenleyicileri çeşitli fizyolojik ve patolojik birçok olaylara aracılık yaparlar [165,166]. Hücre içi TGF- $\beta$  sinyalizasyonundaki birçok kritik adıma Smad proteinleri aracılık eder. Bununla birlikte, Smad'dan bağımsız sinyal iletim yolları da TGF- $\beta$ 1'in biyolojik aktivitelerini kontrol ederler [167,168].

TGF- $\beta$ , sinyal yolak proteinleri olan Smad2 ve Smad3; tümör hücrelerinin proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadırlar [169]. TGF- $\beta$ , aslında hücre apoptozunu indükleyerek hücre büyümesini engelleme kabiliyeti nedeniyle bir tümör baskılayıcısıdır. [170]. Son yıllarda, TGF- $\beta$ 'nin SVN'nin önemli negatif düzenleyicisi

olduğu gösterilmiştir [171]. Genel olarak, TGF- $\beta$  sinyal yolağı, Smad2 ve 3'e bağlı bir mekanizma aracılığıyla transkripsiyonel düzeyde SVN ekspresyonunu baskılamaktadır [171]. Ayrıca Rb/E2F4 baskılayıcı kompleksinin Rb bileşenin TGF- $\beta$  tarafından Smad3'e bağımlı bir mekanizma aracılığıyla hipofosforilasyonuna yol ağtığı ve bu baskılayıcı kompleksin de SVN promotörüne bağlanarak, fonksiyonunu baskıladığı başka çalışmalarla gösterilmiştir [172].

### 2.8.2. Otofaji

Hücreler hem fizyolojik koşullar hem de hipoksi ve besin yoksunluğu gibi stres koşulları altında bu değişikliklere uyum sağlamaya çalışırlar [173]. Bu nedenle, farklı olaylar karşısında farklı yolaklarla otofaji mekanizması düzenlenir. Otofaji, hücrelerin istenmeyen bu evre koşullarına uyum sağlayabilmeleri için besinleri ve organelleri geri dönüştürebilen bir bozunma yoludur ve hücrenel bir yolaktır [174]. Ayrıca otofaji, yanlış katlanmış ve uzun ömürlü proteinleri parçalayarak, hasarlı organelleri de ortadan kaldırır [175]. Özellikle açlık, hatalı katlanmış proteinler, hasarlı organeller ve inflamasyonlar gibi çeşitli stresler altında hücre otofajiyi hemen devreye sokmaktadır [176]. Otofajik yolakların aktivasyonu başladığında çift lipid tabakasından türetilen ve "fagofor" olarak da bilinen izolasyon membranı oluşur. Daha sonra fagofor membranı, "otofagozom" adı verilen, hedeflenen organeli düzenlemek için uzar ve kıvrılır. Otofagozom olgunlaştıktan sonra sonunda bir lizozom ile birleşir [177].

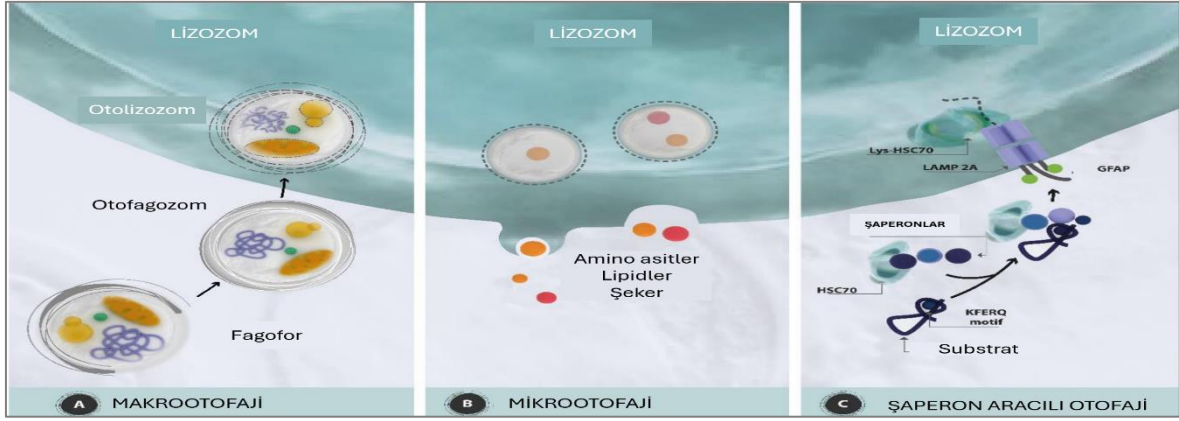
"Otofaji" ilk olarak Nobel Ödüllü (1974) Belçikalı Biyokimyacı "Dr. Christian de Duve" tarafından keşfedilmiş ve tanımlanmıştır [178]. "Otofaji" Yunanca "autóphagos (kendini yeme)" kelimesinden türetilmiştir.

Otofajinin aktivasyonu sırasında, otofaji ile ilişkili birçok gen (ATG (autophagy-related genes)) otofagozomların oluşumu, uzaması ve füzyonuna katılır. Genel olarak, beslenme stresi öncelikle bir besin dengesizliği tarafından tetiklenir. Otofaji, beslenme açlığı ve aşırı besin stresi de dahil olmak üzere beslenme stresleri tarafından farklı yolaklarla indüklenebilir. Amino asitler veya enerji açlığı gibi besin maddelerinin açlığı, mTOR kompleks 1 (mTORC1) [179] veya AMPK (AMP ile aktive olan proteinkinaz) sinyal yolu aracılığıyla [180] otofaji aktivasyonunu tetikler. Bununla birlikte, besin fazlalığı, özellikle yüksek glikoz konsantrasyonları da otofajiyi indüklebilir. Birçok durumda otofaji,

hücrelerin ve organizmaların normal fizyolojisini koruyan temel düzenleyicidir. Ancak otofaji, aşırı aktivasyonunun bir sonucu olarak hücre ölümüne de neden olabilir. "**Otozis**" terimi, hücre ölümü sırasında büyük miktarda otofagozom birikimi ile karakterize edilen otofajik hücre ölümünü tanımlamaktadır [181].

### Otofajik mekanizmalar

Otofajinin lizozomlarla interaksiyona girme mekanizmasına göre üç alt tipi vardır: makrootofaji [182], mikrootofaji [183] ve şaperon aracılı otofaji [184] (Şekil 2.5). Bu üç alt tip farklı moleküler mekanizmalarla desteklenir. Ortak noktaları, parçalamak veya bozmak için hedefi lizozoma yönlendirmeleridir. Mikrootofaji, sitoplazmik materyalin lizozomal membran aracılığıyla lizozomlara sokulduğu ve parçalanmanın burada meydana geldiği mekanizmadır. Şaperon aracılı otofaji (chaperone-mediated autophagy (CMA), tanımlanmış bir pentapeptit modeli (KFERQ) içeren proteinlerin parçalanması için şaperon HSC70 ve eş şaperonlar aracılığıyla lizozomlara doğrudan translokasyon ile karakterize edilir. Makrootofaji, parçalanabilir içeriği sitoplazmadan taşıyan ve parçalanma için lizozomlara yönlendiren otofagozom adı verilen çift membranlı alt hücresel yapıların oluşumu ile karakterize edilir. Daha sonra hücreler bu bozunma ürünlerini yeniden kullanır. Makrootofajideki kilit olay, otofagozom adı verilen ve sitoplazmanın rastgele kısımlarını çevreleyen ve tutan ya da tek tek sitozolik bileşenleri seçici olarak hedef alan yeni bir organelin, de novo oluşumudur. Başlangıçta, fagofor veya membran izolasyonu olarak adlandırılan çift membranlı fincan şeklindeki yapılar sitozolik içeriği içine alır. Bu membranın kaynağı kimi zaman plazma membranı, kimi zaman golgi membranı, kimi zaman da endoplazmik retikulum membranı olabilmektedir [185]. Çift membranın genişlemesi, mikrotübüller tarafından taşınan otofagozomun tamamlanmasıyla sona erer. Otofagozomun lizozom ile füzyonu, hapsedilen içeriğin parçalanması için bir otolizozom oluşturur.



Şekil 2.5. Otofajinin alt tipleri [193]

Moleküler düzeyde, makrotofaji iki ana kompleks tarafından başlatılır: (a) UN51 benzeri Ser/Thr kinazlar (ULK) kompleksi ve (b) fagozor birleşme bölgesine (PAS) alınan sınıf III fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) [187]. ULK kompleksi ULK1/2 ailesini ve ATG13'ü içerir [188]. Beclin-1 (BECN-1) kompleksi olarak da tanımlanan PI3K kompleksi ise Vps34, p15 (VPS15), BECN-1 (ATG6) ve Barkor'u (ATG14) içerir [189] (Şekil 2.6). BECN-1, ER membranında lokalize olur ve anti-apoptotik dimer Bcl-2 ve Bcl-XL tarafından düzenlenir. Otofaji aktive edildiğinde; BECN-1, Bcl-2 kompleksinden ayrılır ve Vps34 ile koordine olur [190]. Ardından, toplu PI3K kompleksi, fagozoru yüzeyinde toplanır [191]. Otofagozomun uzatılması ve kapatılmasından iki ubiquitin benzeri kompleks sorumludur. İlk kompleks, Atg7'nin (autophagy related protein 7) Atg5 ile etkileşimiyle başlatılır ve bu da Atg12'ye kovalent olarak bağlanır [192]. Bu kompleks, fagozoru uzatan Atg5-Atg12-Atg16 kompleksini oluşturmak için Atg16 ile etkileşime girer. Atg9 ile Atg2 ve Atg18 arasındaki etkileşim, Trans-Golgi Ağı arasındaki trafikten sorumludur. Atg4B, başka bir ubiquitin benzeri komplekste, mikrotübülle ilişkili protein 1 hafif zincir 3'ü (LC3) ayırarak, LC3-I oluşumuna yol açar [193]. Otofajik bir sinyal üzerine LC3-I; Atg7, Atg3 ve Atg12-Atg5-Atg16L multimerleri tarafından otofagozomun bir belirteci olarak kabul edilen LC3-II formunun oluşumu için bir fosfatidiletanolamin (PE)'e konjuge edilir [194]. Daha sonra, dynein ve diğer motor proteinler mikrotübüller boyunca otofagozomların taşınmasında rol oynar [195]. Son olarak, SNARE proteinleri (Soluble NSF Attachment Protein Receptors) otofagozomlarla birleşen lizozomlar üzerinde toplanır ve bu durum içeriklerin parçalanmasına olanak sağlar [196].



otofajinin indüksiyonu için gereklidir ve Atg4'ü aktive eder. Ayrıca, hipoksi ve egzersiz gibi çeşitli stresler ROS'a bağlı otofajiyi indükler [204,205].

Otofaji tipik olarak hücre canlılığını artırır. Bununla birlikte, düzenlenmesindeki değişiklikler birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Son zamanlarda, artan kanıtlar otofajinin konak hücrelerin viral enfeksiyondan kaçması için güçlü bir araç olduğunu göstermiştir. Otofaji, viral enfeksiyona karşı koymak, istilacı virüsleri parçalamak ve antijen işlemeyi ve adaptif immün sistem tepkilerini kolaylaştırmak için innate immün sistem tarafından aktive edilir [206]. Bununla birlikte, hepatit C, Zika, Sars-Cov ve Mers-Cov gibi bazı RNA virüsleri, replikasyonları için otofagozomları kullanabilir [207-209]. Sars-Cov2 ile enfekte hastaları tedavi etmek için bilinen iki otofajik inhibitör olan klorokin (CQ) ve hidrosiklorokin (HCQ) kullanımı, otofajinin COVID-19 patogenezindeki rolü hakkında sorular ortaya çıkarmıştır [210]. Ayrıca, diğer otofaji modülatörleri COVID-19 ile ilgili tedaviler için in vitro ve in vivo olarak aktif bir şekilde çalışılmaktadır. Aralıklı oruç (intermittent fasting (IF)), Sars-Cov2 enfeksiyonuna karşı umut verici bir önleyici yaklaşım olarak önerilmiştir çünkü bu diyet kısıtlaması otofajiyi aktive eder ve immün yanıtın aktive olmasına aracılık eder [211].

### Otofajinin fizyolojik rolü

İmmün sistem de dahil olmak üzere hücresel sistemlerde otofaji, genellikle koordineli ve birbirine bağlı ve kararlı bir süreçtir. Metabolizma ve hücre taşıma gibi normal hücre fizyolojik süreçlerde de yer alır. Otofaji, gereksiz ve zararlı hücre sağ kalım bileşenlerinin seçici olarak parçalanmasından sorumlu olduğundan, hücre homeostazında önemli olduğu düşünülmektedir. Otofajinin adaptif ve innate immün yanıtındaki işlevi; mikroorganizmaların uzaklaştırılması, inflamasyonun düzenlenmesi, immün düzenleyicilerin üretimini ve antijen sunumunu içerir [212]. Otofaji, özellikle TLR sinyallerini etkileyerek ve inflamatuvar aktivasyonu atlayarak inflamasyonu kontrol eder. Ayrıca endojen inflamatuvar agonistlerini uzaklaştırarak ve katepsin K, lizozim, İL-6, İL-8 ve DAMP'lar gibi immün moleküllerin sekresyonunu etkileyerek innate immün yanıt sinyal yollarıyla inflamasyonu düzenler. Otofaji, T hücre repertuarının immün yanıtına katılmasında, maturasyonunda ve polarizasyonunda önemli bir rol oynar. Bu aynı zamanda B1 hücrelerinin ve plazma hücrelerinin hayatta kalması ve işlev görmesi için de gereklidir [212,213]. Otofaji, MHCII (Major histocompatibility kompleks II) antijeninin sunumuna katılır ve MHCI sunumunu da

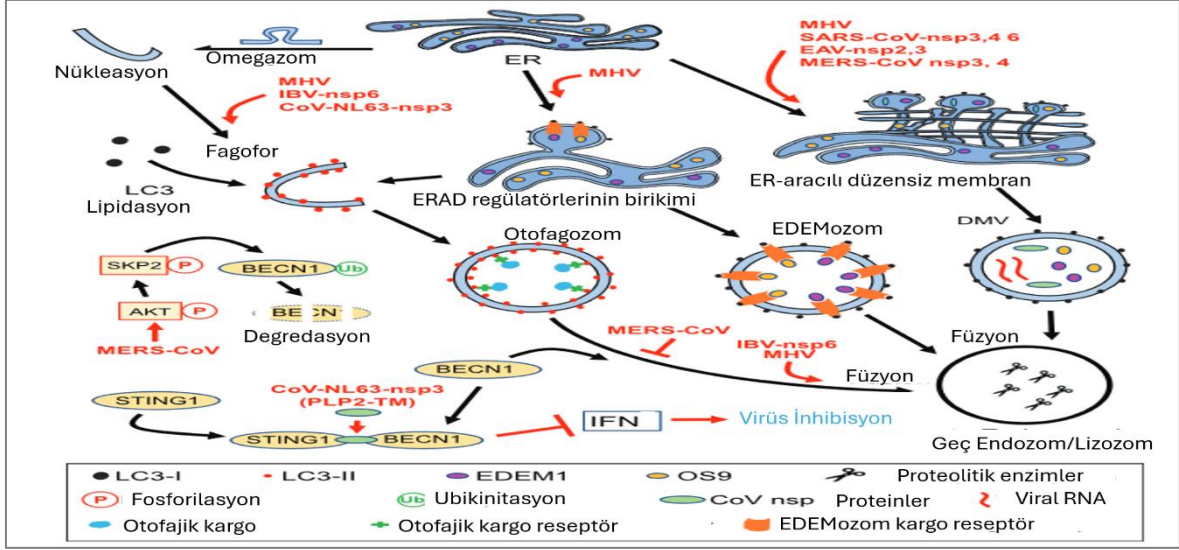
etkileyebilir [212]. Başlıca proteostatik sistemlerden biri olan otofaji, kümelenmiş proteinlerin ve yıkılmış hücresel organellerin uzaklaştırılmasındaki rolü nedeniyle hücreleri proteotoksisteden korur.

### COVID-19 ve Otofaji

Otofaji, viral enfeksiyonun neden olduğu strese yanıt olarak hızla aktive edilebilir. Enfeksiyon sırasında, spesifik yabancı viral proteinleri fagozomla almak ve daha sonra bunları otofagozomlara paketlemek ve ardından lizozomlar tarafından ortadan kaldırmak için seçici otofaji başlatılır bu durum için “ksenofaji” terimi de kullanılır.

Viral enfeksiyon sırasında, PRR ailesinden TLR'lerin viral PAMP'ları tanınmasıyla başlayan immün yanıt otofajiyi indüklemekten sorumlu birincil mekanizmadır. TLR sinyali, MyD88 veya TRIF'in BECN-1 ile etkileşimini artırır ve otofajiyi teşvik etmek için BECN-1'in Bcl-2'den ayrılmasını destekler. TLR ile indüklenen otofaji, ubiquitine bağımlı bir şekilde gerçekleşen seçici otofajiye (ksenofaji olarak bilinir) aittir. Virüs organizmaya girdiğinde, viral nükleokapsid geç endozom veya lizozom tarafından sitoplazmada açığa çıkarılmak üzere kaplanmamıştır. TLR sinyal yolları, kapsidi açılmış istilacı virüslerin spesifik dsRNA, ssRNA veya dsDNA'sı tarafından aktive edilir. NF- $\kappa$ B, IRF3/7 ve API-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonundan sorumlu olan TLR'ler ile MyD88 veya TRIF arasındaki etkileşim, virüslere karşı temel immün yanıt olan İFN-I oluşumunu ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını tetikler ve ayrıca innate immün yanıt için diğer molekülleri, hücreleri uyarır [214,215].

Otofajinin Koronavirüs enfeksiyonundaki rolü daha önce 2002-2003 yıllarındaki Sars-Cov salgını sırasında ortaya çıkmıştır. Otofajinin, Koronavirüs replikasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Bu veri fare hepatit virüsünün (MHV) model çalışmalarına dayanmaktadır. Araştırmacılar MHV'nin otofajinin ayırt edici özelliği olarak kabul edilen otofagozom benzeri organel (çift zarlı veziküller [DMV'ler]) oluşumunu indükleyebildiğini DMV'lerdeki viral replikasyon komplekslerinin LC3 ve ATG12 gibi birçok otofaji proteini ile birleştiğini bildirmişlerdir [216] (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Koronavirüs enfeksiyonlarında Otofaji [224]

ATG5'in knockout edildiği bir çalışmada MHV replikasyonunun düzensiz olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, otofajinin otofagozom benzeri organel (DMV) oluşumunda ve MHV replikasyonunda önemli bir patofizyolojik mekanizmada rol oynayabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır [216]. Daha sonra, aynı çalışma grubu Sars-Cov'ların otofaji ile ilişkisini araştırmıştır. Neredeyse benzer bir bulgu rapor etmişlerdir. Viral replikasyon anahtar proteinlerinin otofagozom endojen LC3 ile füzyonu söz konusudur. Bu nedenle, otofajinin Sars-Cov replikasyonu üzerinde yakın bir kontrol rolü olduğu öne sürülmektedir [218].

2011 yılında Cottam ve arkadaşları enfeksiyöz bronşit virüsü olarak adlandırılan başka bir CoV suşu üzerinde çalışmıştır. Otofajiyi indükleyebilen bir viral replikaz proteini nsp6'yı ortaya çıkarmışlardır [219]. Bu çalışma, koronavirüslerin otofaji ile ilişkili patojenik uyarıcı olabileceği üzerinde tartışmıştır. Bu bulguların aksine, başka bir çalışma aksi sonuçları bildirmiştir. Snijder ve arkadaşları otofajiye özgü proteinlerin (LC3 veya GFP-LC3) Sars-Cov'un viral replikasyon/transkripsiyon kompleksleri ile herhangi bir füzyonunu tespit edememiştir. Ayrıca, Sars-Cov'lar ve hatta MHV viral replikasyonu için gerekli olan hiçbir otofaji proteini tespit edilmemiştir. Dolayısıyla, gözlemleri otofajinin viral replikasyon sürecine doğrudan dahil olmadığını düşündürmüştür [220].

Son çalışmalara göre ise düzensiz otofaji mekanizmasını COVID-19'un indüklendiği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, Sars-Cov2 genomu üzerinde yapılan bir analiz çalışması 351 klinik örneğin sekanslarını inceleyerek, nsp6 (otofagozom oluşumu üzerinde indükleyici

etkisi olan bir proteindir) proteininde mutasyonlar tespit etmişlerdir [221]. Bu bulgu, nsp6 ile Sars-Cov2 'nin otofajiyile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur.

Viral enfeksiyonla ilgili olarak endoplazmik retikulumda (ER) katlanmamış proteinlerin birikmesine bir yanıt olarak aktive edilen önemli bir hücre içi yolak olan katlanmamış protein yanıtını (UPR) dikkate almak çok önemlidir. UPR genellikle koronavirüs enfeksiyonu sırasında aktive olur çünkü bu süreç virüs replikasyonunu, viral proteinlere kaynak sağlamak için aşırı protein biyosentezini ve katlanmasını, DMV'lerin oluşumu için ER membranının kullanılmasını gerektirir [222,223]. Ayrıca, UPR ve otofaji birbiriyle bağlantılıdır ve UPR'nin indüksiyonu potansiyel olarak otofajiyi kolaylaştırabilir veya teşvik edebilir. Bu nedenle, Sars-Cov2 enfeksiyonu muhtemelen hücrelerde UPR indüksiyonu yoluyla da otofajiyi indükleyebilmektedir.

İleriye dönük olarak, Sars-Cov2 enfeksiyonunda otofajinin etkisini anlamak, terapötik yaklaşımlar geliştirmek için koronavirüs otofaji çalışmalarının geçmişini iyi analiz etmek önemlidir. Bu analizlerden biri de, her koronavirüsün otofaji yolaklarıyla, kendine özgü bir şekilde etkileşime girme olasılığının yüksek olduğudur. Otofajik yolağı inhibe eden klorokin ve türevleri gibi terapötikler, COVID-19 için tedavi olarak önerilmiştir. Bu nedenle, bu ve diğer hücre içi yolakların Sars-Cov2 'yi nasıl etkilediğini ve bu etkileşimlerde diğer koronavirüslere benzer olup olmadığını anlamak, bu ve gelecekteki koronavirüs salgınlarıyla yüzleşmede önemlidir. Sars-Cov2 enfeksiyonu ve otofajinin karşılıklı etkisine işaret eden literatür birikimi, COVID19 için klinik çalışmalarda bulunan ilaçların %58'inin otofaji modülatörleri olduğu gerçeğine ek olarak [224] COVID-19 ile mücadele için otofaji alanında araştırma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır.

### Otofaji'de BECN-1

Otofaji; normal hücrelerde, hücre bileşenlerinin dönüşümünden sorumlu olduğu bir süreçtir. Bu süreç, fizyolojik olarak yeniden şekillenmeye maruz kalan veya bazı patolojik yollarla zarar gören hücrelerde indüklenir. İndüklenmiş otofaji, otofajik hücre ölümü (tip II hücre ölümü olarak da bilinir) olarak adlandırılan ve hücrenin kendi kendini yemesine ve nihayetinde hücre ölümüne yol açan aşırı otofaji biçimini barındırır. Araştırmacılar, programlı hücre ölümünün bu apoptotik olmayan formunu, kanser, nörodejeneratif, kardiyovasküler, diyabet, karaciğer hastalıkları ve viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere

birçok hastalıkta gelişim ve farklılaşma ve yıkım sırasında fizyolojik yeniden şekillenmenin bir nedeni olarak tanımlamıştır [225].

Otofajik yolağın anahtar düzenleyici proteini olan BECN-1 (Bcl-2-interacting protein1), apoptotik hücre ölümü yolunun düzenleyici proteinlerinin yanı sıra otofaji sürecinin çeşitli bağlayıcı ortaklarıyla etkileşime girer ve bu iki hücre süreci arasındaki etkileşimin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve bu durumun çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşulların düzenlenmesinde etkisi bulunur [226]. Bu alandaki kapsamlı araştırmalar, patolojik olarak zarar görmüş hücrelerin hayatta kalma yanlısı olan otofajik durumdan, apoptotik ölüme geçişiyle sonuçlanan ve otofajiyi inhibe etmek için genetik ve terapötik yaklaşımların kullanılma olasılığını artırmıştır. Bu yaklaşımlar farklı kanser türlerinde iyi sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Bulgular klinik uygulamalarda çok iyi bir şekilde ortaya konmamış olsa da, sinerjik bir hücre ölümü biçiminin bu gelişmekte olan alanın heyecan ve umut verici bir yaklaşımıdır.

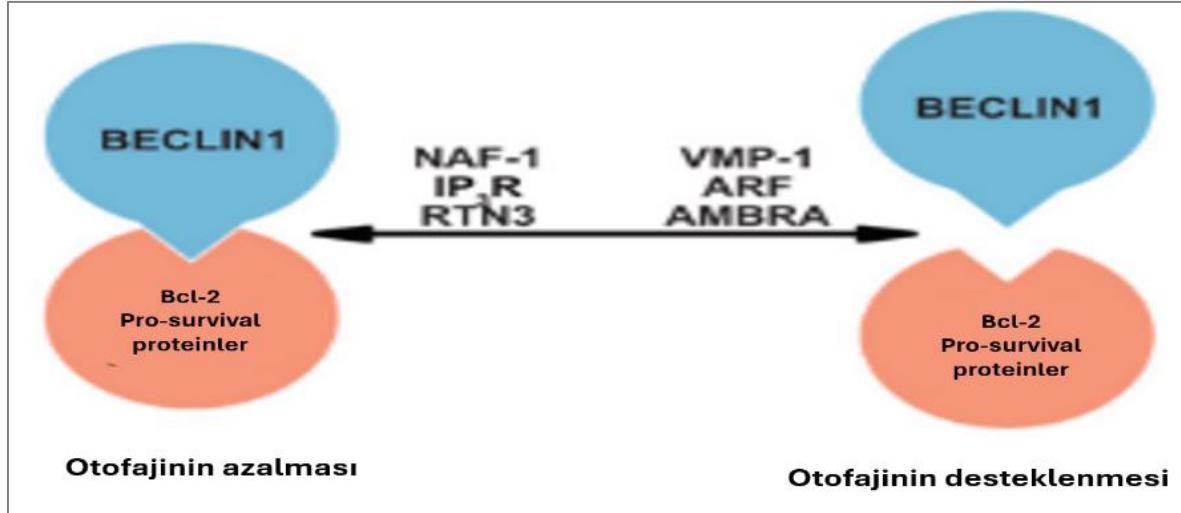
450 amino asit uzunluğunda olan BECN-1 proteini, 3 temel fonksiyonel domaine sahiptir. (1) N terminal bölge (1-150 a. asit): çoklu fosforilasyon alanlarıdır [227,228] ve Bcl-2 proteinleri ile interaksyonun kurulduğu BH3 (Bcl-2 homology 3) domaini buradadır (2) CC domain (174-266 a.asit); UVRAG veya ATG14 ile interaksyon kurar (3) BARA ( $\beta$ - $\alpha$  autophagy-specific (BARA)) domain (266-450 a. asit) membranla interaksyon kurar. CC domainin son bölümü ve BARA domaini evrimsel olarak korunmuşlardır.

BECN-1, PI3K Sınıf III C1 ve C2 komplekslerinde bir iskele görevi görür ve ilişkili lipid kinaz aktivitesini allosterik olarak düzenler. Her iki kompleks de VPS34, VPS15 ve BECN-1 olmak üzere üç çekirdek proteinden oluşur, ancak dördüncü çekirdek alt birimi ve beşinci alt birimi molekülde farklılık gösterir. C1 kompleksin dördüncü alt birimi ATG14'tür ve bu kompleks otofajide özellikle otofagozomal çift membranın oluşumunda rol oynar [229-232]. ATG14, BECN-1 dahil diğer C1 alt birimlerine ihtiyaç duymaksızın, sırasıyla otofagozomal lizozomal füzyon ve endositik trafiğin faaliyetini kolaylaştırmak için t-SNARE kompleksi (STX17 ve SNAP29) ve SNARE efektör proteini Snapin ile etkileşime girer [233-235]. C2 kompleksinde ise dördüncü çekirdek alt birim UVRAG'dir. C2'nin rolü C1'den farklıdır [236]. Otofajiye ek olarak, C2'nin endositik trafikte ve lizozomal aktivasyonda rol oynadığı bildirilmektedir [236,237]. Otofagozom ve endozomların oluşması için C1 ve C2 'nin BECN-1'e gerek duymaktadır ancak PI3K komplekslerinin tüm üyelerinin otofagozom ve

endozomal olgunlaşmanın sonraki adımlarını yönlendirmek için mevcut olmasının önemli olup olmadığı tam olarak anlaşılmamıştır.

Otofaji, VPS34 kompleksinin aktivasyonu ile başlar. Bu kompleksin anahtar proteini ve otofaji sürecinin anahtar düzenleyicisi BECN-1'dir. Otofajinin regülasyonunda rol alan oldukça fazla molekül bulunmaktadır. BECN-1, otofaji için pozitif regülatör bir moleküldür. Otofagozomal biyogenezinde rol alır. Mayada bulunan ATG6/VPS30 ilk kez keşfedilen BECN-1 ortoloğudur [238,239]. Memelilerde ise yapılan çalışmalar BECN-1'in rolünün anti-apoptotik molekül olan Bcl-2 ile ilişkili bir protein olmasının keşfiyle anlaşılmasını sağlamıştır [226]. BECN-1 hem otofaji hem de membran trafik işlevlerini, başta vakuolar protein ayırma ile ilişkili protein 15 (VPS15), VPS34, UV radyasyon direnci ile ilişkili gen ürünü (UVRAG) ve otofaji ile ilişkili protein 14 (ATG14) olmak üzere diğer birkaç proteinle etkileşime girerek gerçekleştirir. Bu proteinler, sırasıyla ATG14 veya UVRAG'nin mevcut olup olmasına bağlı olarak iki farklı Sınıf III PI3K kompleksinde (Kompleks 1 (C1) ve Kompleks 2 (C2) olmak üzere) bir araya gelirler. Bu kompleksler içinde, katalitik lipid kinaz alt birimi olan VSP34, PtdIns'in fosforilasyonundan sorumludur bu sayede efektör proteinlerin yolak işlevine katkısı yoluyla otofaji ve/veya membran trafiği işlevleri gerçekleşir [240].

BECN-1 ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi arasındaki etkileşim, çeşitli sinyal yollarının ve proteinlerin PI3K aktivitesini, otofajiyi ve apoptozu modüle etmek için her iki proteinle nasıl birleşebileceği önemlidir. Bcl-2, BECN-1 üzerinde "ayırıcı" bir etkiye sahiptir, burada ikisi arasındaki bağlanma C1 ve C2 oluşumu için mevcut BECN-1 düzeylerini azaltır ve böylece otofaji inhibe edilir [241]. Birçok kinaz ve proteinin BECN-1 veya Bcl-2'yi hedef aldığı, bağlanma afinitelerini etkilediği ve böylece kalp sağlığının korunması, nörodejenerasyon ve uzun ömürlülük dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçleri etkileyecek şekilde otofajiyi teşvik ettiği veya azalttığı keşfedilmiştir. BECN-1, BH3 domaini aracılığıyla Bcl-2 ailesinin üyelerine bağlanır. Anti-apoptotik proteinler Bcl-2 ve Bcl-XL ile kompleks halinde olan BECN-1'in bu bölgesine karşılık gelen peptitlerin kristal yapıları, pro-apoptotik BH3 proteinlerin bağlanma durumunu yansıtmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Bcl-2-BECN-1 kompleksi ve BECN-1'in kompleksteki rolü [404]

Bu etkileşim, otofaji ve apoptozun bu iki kritik hücrel süreci arasındaki çapraz etkileşiminin birincil bölgesidir; ancak, BECN-1'in Bcl-2'ye bağlanma yoluyla apoptozu etkileyip etkilemediği tam belirgin değildir. En azından bir çalışma, diğer pro-apoptotik BH3 proteinlerinin aksine, BECN-1'in Bcl-2 üzerinde aynı nötralize edici etkilere sahip olmadığını göstermiştir [242].

BECN-1 ile Bcl-2 etkileşiminde, Bcl-2 yerine yer değişikliği yapacak başka bir protein, otofajinin teşvik edilmesini de sağlıyor olabilmektedir. Örneğin, ER transmembran proteini VMP-1, BECN-1 ile kendi etkileşimini kolaylaştırmak ve BECN-1'i otofagozomların üretildiği ER'ye lokalize etmek için Bcl-2'nin yerini alır. BECN-1:Bcl-XL kompleksi de bilinmeyen bir mekanizma aracılığıyla ARF tümör baskılayıcısının zorla ekspresyonu ile yer değiştirir [243]. Bunun aksine, BECN-1:Bcl-2 etkileşimini artıran faktörler, çeşitli hastalıklarda BECN-1 aracılı otofajiyi inhibe eder. Otofajiyi teşvik eden bir başka rekabetçi bağlayıcı protein de BECN-1 tarafından düzenlenen otofajiyi aktive edici molekül olan AMBRA'dır. Bazal koşullar altında AMBRA, dynein motor kompleksi ile etkileşim yoluyla BECN-1'i hücre iskeletine bağlar [244]. AMBRA'nın ULK1'e bağlı fosforilasyonu ile sonuçlanan otofajiyi uyarıcı koşullar, onu ve BECN-1'i hücre iskeletinden serbest bırakarak otofagozom biyogenez bölgelerine taşınmasına izin verir [244]. AMBRA, Bcl-2 tarafından sekestre edilebilir, ancak otofajiyi indükleyen koşullar altında, bunun yerine serbest bırakır. Alternatif olarak, Bcl-2'nin c-JUN N-terminal kinaz 1 (JNK1) tarafından fosforilasyonu BECN-1 ile etkileşimini azaltır [245]. Hem doğrudan BECN-1'e bağlanan hem de hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz (ERK) yoluyla Bcl-2 fosforilasyonunu teşvik ederek, iki farklı

mekanizma yoluyla otofajiyi indükleyen bir başka molekül de HMGB1'dir [246]. BECN1-Bcl-2 etkileşiminin modülasyonu ile otofajinin düzenlenmesi kanser veya kalp fonksiyon bozukluğunun tedavisi için terapötik olarak hedeflenebilir bir yol olabileceği düşünülmektedir. Bcl-2 ile bağlanması azaltılmış BECN-1'in, hayvan deneylerinde iskelet kası, böbrek ve kalpte artmış otofaji ile ilişkisi gösterilmiştir. Yine hayvan deneylerinde otofajinin artışının gösterilmesi, beyinde amiloid birikiminin azalması [247], spontane tümör oluşumunun azalması, kardiyak ve renal patolojilerin azalması [248] ve yaşam sürelerinde genel artışı sağlamıştır. Otofajiyi azaltmak için BECN-1:Bcl-2 etkileşimini artıran MST1 aracılı BECN-1 fosforilasyonunun sonucu olarak Bcl-2 ve Bax arasındaki etkileşim azalmakta ve Bax aktivasyonuna bağlı olarak miyokard enfarktüsü sırasında apoptoz uyarılmaktadır [249]. Burada BECN-1:Bcl-2 etkileşimini hedeflemek kalp yetmezliklerinde avantajlı olabilir. Bununla birlikte, artan otofajinin faydaları yanında otofajiyi engellemenin de avantajlı olabileceği durumlar vardır. Örneğin yerleşik tümörlerde artan otofajinin; besin eksikliği ve hipoksik ortamlarda moleküler substratların sağlanması, mitokondriyal homeostazi teşvik etmesi, apoptoza karşı koruma ve epitelden mezenkimal geçiş ve metastatik süreç sırasında hayatta kalmayı sağlaması gösterilmiştir [250-252].

BECN-1'in SVN ile etkileşimini gösteren çalışma sayısı oldukça azdır. Niu ve arkadaşları glioblastoma hücrelerinde BECN-1 ve SVN'nin fiziksel etkileşimde olduğunu ve BECN-1'in susturulmasıyla SVN'nin down regüle olması ve hücrelerin TRAIL-indüklü apoptoza uğradıklarını göstermiştir [253].

### Koronavirüslerde BECN-1

Otofaji yolağında, BECN-1 proteininin etkisi önemlidir. Ayrıca BECN-1, otofagozomun lizozom ile füzyonunu teşvik eder [233]. Influenza A M2, HIV ve HSV-1 dahil olmak üzere negatif polariteli RNA virüsleri ve DNA virüslerinin proteinleri, viral replikasyonu artırmak için otofagozomun oluşumunu veya otofagozomun lizozom ile füzyonunu engellemek için BECN-1'i hedef almaktadır [254-257]. BECN-1, HSV-1 gibi hücre içi patojenlerin otofajik degradasyonunu teşvik ederken aşırı interferon üretimini önleyerek cGAS ile innate immün yanıtı negatif olarak düzenler [258]. Viral proteinlerin BECN-1 ile etkileşimi, viral replikasyonu artırmaya ve innate immün yanıtı değiştirmeye yöneliktir. Koronavirüs proteinleri BECN-1'i çeşitli şekillerde aşağı regüle eder. Koronavirüslerin BECN-1 aktivitesini modüle etmek için farklı stratejileri vardır. HeLa, HEK293T ve MCF-7

hücrelerinde otofagozom oluşumunu indüklediği bilinen HCoV-NL63'ün nsp3 proteininin PLP2TM domaini, otofagozomların lizozomlarla füzyonunu engellemek için BECN-1'e bağlanır [259]. Spesifik olarak, nsp3 PLP-TM domaini, BECN-1'in STING1 ile kompleks oluşturması için uygun hale getirir, bu da İFN üretiminin uyarılmasını önler. BECN-1 ile HCoV-NL63'ün PLP2TM domaini arasındaki etkileşim en iyi şekilde karakterize edilmiş olsa da, BECN-1'in diğer koronavirüslerin nsp3 proteinlerinin PLP domainleriyle de ilişki kurması mümkündür; örneğin, Sars-Cov ve PEDV (domuz epidemik diyare virüsünün) virüslerinde, BECN-1'in siRNA ile devre dışı bırakılması üzerine, nsp3 proteinlerinin işlev göremediği ve virüs replikasyonlarının azaldığı gösterilmiştir [259-261]. Diğer koronavirüsler BECN-1'i dolaylı olarak protein düzeyini düşürerek aşağı regüle edebilir. Hücresel E3 ubiquitin ligaz SKP2, BECN-1'i ubiquitinleştirerek parçalanmasına neden olur. SKP2 bu nedenle otofajinin negatif bir düzenleyicisi olarak görev yapar. AKT1 kinaz, SKP2'yi fosforilasyon yoluyla aktive eder. Mers-Cov'un AKT1'in fosforilasyonunu ve dolayısıyla kinaz aktivitesini artırdığı bulunmuştur [262]. AKT1'in aktivasyonundaki bu artış, SKP2'nin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açarak otofajik yolun ilerlemesini durdurur [263]. Bu hipotez, VeroB4 hücrelerinin Mers-Cov ile enfeksiyonu üzerine SKP2 fosforilasyonundaki artışını ve BECN-1'in degradasyonundaki artışını desteklediği görüşüyle viral replikasyonu artıran bir mekanizma olarak nitelendirilmektedir [263]. Bu nedenle Mers-Cov, BECN-1 degradasyonunu teşvik ederek konak hücre otofajisine müdahale eder. Bu viral enfeksiyonlar anında BECN-1 parçalanması, otofagozomların lizozomlarla füzyonunu engelleyerek hücresel çift membranlı yapılarda bulunan viral replikasyon komplekslerini potansiyel olarak korumaktadır [264]. Diğer birçok RNA virüsünde olduğu gibi, koronavirüslerin de virüs replikasyonunu artırmak için hücresel otofaji yolağı ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Konak sitoplazmasında ER türevi çift membranlı veziküllerin gelişimi otofagozom gelişimine o kadar benzemektedir ki bu durum koronavirüslerin hücresel otofaji yolunu taklit ettiğini düşündürmektedir. Birçok RNA virüsü için, bu çift zarlı veziküller genom replikasyon bölgeleri olarak hizmet etmekte ve virüs kaynaklı çift membran veziküllerin, koronavirüs RNA sentezinin yeri olduğuna dair kanıtlar çalışmalarla desteklenmektedir [265]. Son çalışmalar sayesinde otofaji ile ilgili süreçlerin Sars-Cov2 enfeksiyonunda kritik bir rol oynayabileceği ve otofaji modülasyonunu hedef alan terapötik yaklaşımların klinik iyileşmede faydalı olabileceği düşünceleri ortaya çıkmıştır [266-268]. Koronavirüs enfeksiyonu sırasında, otofaji, viral replikasyonu engellemek için anti-viral bir mekanizma olarak işlev görebilir [266]. Öte yandan, bazı virüsler otofajiyi kullanabileceği evazyon mekanizmaları ile viral replikasyon aracı olarak

kullanmaktadır [266]. Viral enfeksiyon sırasında katlanmamış protein yanıtı (UPR), endoplazmik retikulum (ER) stresi tarafından aktive edilebilen kritik bir hücre içi yolaktır. Bu yolak katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [267]. Aktive UPR, viral enfeksiyon sırasında, otofajinin aktive edilmesiyle katlanmamış proteinlerin bozunması, ER stresini hafifletir ve homeostazı geri kazandırır [222]. Ayrıca, UPR ve otofaji birbiriyle yakından ilişkili mekanizmalardır ve Sars-Cov2 enfeksiyonu UPR indüksiyonu yoluyla otofajiyi aktive edebilir. BECN-1'in deregüasyonu kanser ve diyabetik böbrek hastalığı da dahil olmak üzere bazı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [270-272]. Okuyan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BECN-1 düzeyinin ağır seyirli COVID-19 hastalarında arttığı gösterilmiş ve bu artışın viral replikasyon tarafından indüklenen UPR aracılı-ER stresi kaynaklı olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca COVID-19'un hastalık şiddetinin öngörülebilmesi için BECN-1 bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceği ve BECN-1 aracılı otofaji modülasyonunun umut verici bir yaklaşım olabileceği bildirilmiştir [273].

#### BECN-1 ve HIF1- $\alpha$

Hipoksik koşullar altında, HIF-1 $\alpha$  otofaji kaskadını indükler, hasarlı mitokondriyi ortadan kaldırır ve hücreleri apoptotik ölümden korumak içinse reaktif oksijen türlerini (ROS) sınırlar [274]. Bununla birlikte, otofaji ve hipoksinin kanserde, özellikle de tümör progresyonundaki rolü hala tartışmalıdır. Son çalışmalar, hipoksinin indüklediği otofaji ile ilişkili gen olan BECN-1 ekspresyonunun hastalığın şiddetiyle ve tedaviye yanıtta önemli olabileceğini göstermiştir [275]. Otofajinin karsinogenezdeki rolü çift taraflıdır ve hücre içi içeriğe bağlıdır. Otofaji, tümör oluşumunun ilk aşamasında engelleyici bir rol oynarken diğer taraftan otofaji, kanser hücrelerini hücre stresinin neden olduğu hücre ölümüne karşı korur. Bununla birlikte, hücre stres, kanser hücrelerinde devam ederse, tümör hücresi aşırı otofaji nedeniyle ölür [276,277]. Otofajinin tümör baskılanmasına katkısında otofaji düzenleyicilerinden biri olan BECN-1'in rolü önemlidir, tümör baskılayıcı bir rolü vardır ve ayrıca çeşitli tümörlerde monoalellik olarak silinmiştir [276,278]. Bu bağlamda kusurlu bir otofaji, çeşitli tümörlerin karsinogenezine katkıda bulunabilir. Wei ve arkadaşlarının glioblastoma multiforme'de radyoterapiye direnç ve tedavi başarısızlığında HIF1- $\alpha$  ve BECN-1 aracılığıyla otofajinin rolünü araştırmışlardır. Hastalığın kötü prognozunda HIF1- $\alpha$ 'nın aşırı ekspresyonunun etkisi ve HIF1- $\alpha$  ekspresyonunun BECN-1 aracılı otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca HIF1- $\alpha$ 'nın susturulduğu hücre hatlarında BECN-1

düzeyinin de düştüğü ifade edilmiştir. Araştırmada HIF1- $\alpha$  ve BECN-1 karşılıklı iletişimi glioblastoma multiformde ortaya konmuştur [279]. Fakat özellikle viral enfeksiyonlarda hatta COVID-19 hastalığında bu ilişkiyi ortaya koyan çalışma bulunmamaktadır.

### BECN-1 ve TGF $\beta$

TGF- $\beta$ , hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptoz, inflamasyon, anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve tümörigenez gibi süreçlerde önemli roller oynar [280]. TGF- $\beta$ 'nin etkileri genellikle 3 TGF- $\beta$  ligandı tarafından kontrol edilir, latent protein kompleksleri olarak TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3 salgılanır. Bu ligandların reseptörlerine bağlanmadan önce proteolitik bölünme ile aktive edilmesi gerekir [281]. Birçok virüsün TGF- $\beta$ 'nin fonksiyonunu kendi lehine çevirme mekanizmaları vardır. Örneğin HCV Core proteinin TGF- $\beta$  üretimini indüklediğini Taniguchi ve arkadaşları göstermiştir [282]. Ayrıca bu çalışmada, HCV çekirdek anti-anjiyojenik bir faktör olan trombospodin (THBS), TGF- $\beta$  sinyal aktivasyonunu indüklediği gösterilmiştir. HCV ROS üretimini artırarak da TGF- $\beta$  üretimini indüklemektedir [283]. Bununla birlikte HCV core proteini, p21 transkripsiyon faktörünün aşırı ekspresyonu yoluyla TGF- $\beta$ 'nin üretimini baskılayabilmektedir [284]. HBV X proteininin ise Lee ve arkadaşları tarafından SMAD4 ile doğrudan interaksiyon kurarak SMAD kompleksinin stabilizasyonuna ve TGF- $\beta$ 'nin sinyalinin oluşumuna katkı sağlar [285]. İnsan papilloma virüsü ile ilgili yapılan çalışmalarda ise HPV enfeksiyonu ile servikal dokudaki TGF- $\beta$  yolağının aktivasyonu arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bu çalışma HPV-pozitif servikal kanserlerde TGF- $\beta$  düzeylerinin yükseldiğini bildirmiştir. Bu artışı da E6/E7 proteinlerinin TGF- $\beta$  promotoruna bağlanarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir [286]. İnfluenza A virüsü sepsisi olan hastalarda, kan TGF- $\beta$  düzeyleri klinik şiddet skorları ile negatif korelasyon göstermektedir [287]. Tutarlı bir şekilde, TGF- $\beta$  aktivitesi artan hayvan modellerinde, hem viral titrelerde hem de pulmoner inflamasyonda azalmaya bağlı olarak ölümcül influenza enfeksiyonuna karşı direnç kazanılmaktadır [288,289]. Sars-Cov da TGF- $\beta$  sinyalini hedeflemektedir [290,291]. Sars-Cov PIpro (papain-like protease) proteininin insanda ROS ile indüklenen p38 MAPK aracılığıyla STAT3 aktivasyonu ve doğrudan TGF- $\beta$  düzeyinde artışa neden olduğu gösterilmiştir [292]. Ayrıca, Sars-Cov nükleokapsid (N) proteini de SMAD3/4 kompleksinin oluşumunu engelleyerek Sars-Cov ile enfekte konak hücrelerde TGF- $\beta$  ile indüklenen apoptozu inhibe eder [292]. Bu arada, N proteini ayrıca SMAD3 ile etkileşime girer ve SMAD3-p300 kompleksini artırarak plazminojen aktivatör inhibitörü- 1 (PAI-1) düzeylerini artırır ve dolayısıyla doku fibrozisi indüklenir [291]. TGF-

$\beta$  aracılı immünoşupresyon viral enfeksiyona da katkıda bulunabilir. Viral enfeksiyon sırasında yüksek TGF- $\beta$  ekspresyonu sadece İFN yanıtları, NK fonksiyonları ve makrofaj aktivitesi gibi innate immün yanıtlarını bozmakla kalmaz, aynı zamanda T hücrelerinin ve B hücrelerinin tepkilerini de bastırır. Bu durumu kendi lehine çevirmeye çalışan virüsler ise TGF- $\beta$  hedefli evazyon stratejileri geliştirmiştir. TGF- $\beta$ 'nın BECN-1'e etkisini gösteren çalışma sayısı azdır. Kiyono ve arkadaşlarının TGF- $\beta$  indüklü otofajide BECN-1 mRNA ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir [293].

### COVID-19 hastalığında Otofaji ve Apoptozun etkileşimi

BECN-1 ve SVN: Otofaji hücrel bir geri dönüşüm sürecidir ve çoğunlukla hücrel homeostazı düzenleyen hayatta kalma yanlısı bir mekanizmadır. Aksine, apoptoz geniş ölçüde korunmuş ve ayrıntılı bir programlanmış hücre ölümü sürecidir ve bu iki sürecin genellikle hücre içinde karşıt güçler olduğu bilinmektedir. Otofajinin hücreleri apoptozdan koruyabileceği konusunda hemfikir olunmasına rağmen, mekanik bağlantı henüz tam aydınlatılmamış, sürece katılan moleküller henüz tam olarak tanımlanamamıştır. Bu durumun açıklığa kavuşturulması belki de başta kanser olmak üzere pek çok otoimmün ve otoinflamatuar hastalıkların ve hatta enfeksiyon hastalıkların tedavisine yeni terapötiklerin eklenmesine umut ışığı olabilmektedir. Fitzwalter ve arkadaşları otofajinin apoptozla karşılıklı etkileşimini sağlayan transkripsiyonel bir mekanizma tanımlamışlardır. Otofajiyi düzenleyen transkripsiyon faktörü FOXO3a'nın artan ekspresyonunun otofajiyi inhibe ederek, apoptoz duyarlılığına neden olmak için pro-apoptotik BBC3/PUMA geninin transkripsiyonunu uyardığı bu çalışmada gösterilmiştir [294]. Böylece, genomdaki tek bir transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi aracılığıyla düzenlenen bu iki süreç arasındaki bağlantı, bu iki sürecin birlikte hareket ettiğini göstermiştir.

Brunelli ve arkadaşlarının çalışması buna bir başka örnektir. Araştırmacılar PINK1'in otofaji ve apoptoz arasındaki çapraz konuşmadaki rolünü araştırmışlardır. Nöroblastom hücrelerinde PINK1 ve BECN-1 arasındaki etkileşimin otofagozom oluşumunu destekleyerek, apoptozun başlatılmasından sorumlu olduğunu gözlemlemişlerdir [295]. Aynı araştırmacı grup staurosporin (apoptoz uyarıcı) etkisi altında BECN-1'in pro-apoptotik kesilmesinin bozulmasındaki rolünün PINK1'e ait olduğunu göstermişlerdir. İlginç bir şekilde, artan otofaji fazı staurosporin ile indüklenen apoptozdan önce görülmektedir ve bununla ilgili olarak, PINK1 otofajiden

apoptoza geçişi düzenlediği düşünülmektedir. PINK1 düzeyleri tedaviyi takiben aşamalı olarak azalmaktadır. PINK1- BECN-1 etkileşimi bu süreçte kilit bir rol oynayabilir, çünkü çalışmada bu moleküllerin mutantlarının etkileşime giremedikleri için anti-apoptotik etki göstermediği vurgulanmıştır [295].

Öte yandan, otofaji ve apoptozun karşılıklı etkileşiminde,  $Ca^{2+}$  bağımlı olan sinyal iletim yolları da etkilidir [296]. Aslında  $Ca^{2+}$ , hücrenin hayatta kalması ve büyümesi, nöronal gelişim ve/veya hücre fonksiyonlarının sürdürülmesi dahil olmak üzere temel fizyolojik fonksiyonların koordine edilmesinde kritik öneme sahiptir. Proteinler/pompalar/ $Ca^{2+}$  kanalları ve farklı organellerde  $Ca^{2+}$  depolanması arasındaki koordinasyon, hücre homeostaz için sitozolik  $Ca^{2+}$  düzeylerinin korunmasında kritik öneme sahiptir.  $Ca^{2+}$  homeostazı, iç ER depolarından  $Ca^{2+}$  tükenmesi ile aktive olan SOCE (store-operated  $Ca^{2+}$  entry) mekanizması ile düzenlenir.  $Ca^{2+}$ 'ın hücrenin hayatta kalmasını destekleyen otofajiyi ve programlanmış hücre ölümü süreçlerini de düzenlediği bilinmektedir. Son zamanlarda,  $Ca^{2+}$  ilişkili olabileceği üzerinde durulan karmaşık bir lipid-lipid ağının ve lipid-protein etkileşimlerinin, hücre homeostazını düzenleyen çeşitli sinyal yollarının aktivasyonunu teşvik ettiğinden söz edilmektedir [297]. Bu şekilde, spesifik plazma membranı mikro domainleri (lipid rafları), spesifik sinyal iletim yollarını (Proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, stres yanıtları ve otofaji gibi hücre programları) düzenleyerek hücrelerin kaderlerini belirlemektedir. Lipid mikrodomanları sadece plazma membranında değil [298], aynı zamanda ER, Golgi aparatı, endozomlar, lizozomlar dahil olmak üzere hücre içi organellerin membranında da bulunur. Bu bölgelerde, hücre içi kolesterol homeostazı ve hücre kaderinin düzenlenmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip kilit reaksiyonlar katalize edilebilir. Mitokondri ile ilişkili membranlar (MAM'lar) apoptoz, otofaji ve tümör büyümesinin düzenlenmesinde kritik "merkezler" olarak sınıflandırılmıştır. Son zamanlarda, MAM'lar içinde fiziksel ve işlevsel platformlar olarak bu lipid mikrodomanlarının varlığının keşfi, otofajik sürecin erken aşamalarının altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına katkıda bulunmuştur [299]. Özellikle, ER lipid mikrodomanlarına benzeri mikro alan proteinlerinin, (ERLIN1 (ER lipid raft-associated protein 1) ve (ERLIN2(ER lipid raft-associated protein 2))), MAM'larla ilişki kurarak hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında mitokondri-ER etkileşimini yönlendirebileceği ve böylece hayatta kalma ve ölümü düzenleyebileceği ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda, Kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) homeostazının, vücuttaki fizyolojik süreçlerin sürdürülmesi için gerekliliği daha da önem kazanmaktadır.  $Ca^{2+}$ 'daki olumsuz değişim inflamasyon, fibrozis, bozulmuş bağışıklık fonksiyonu ve

hızlanmış yaşlanma gibi çeşitli patolojik durumların yanı sıra patojenin hücreye girişi, apoptoz ve otofaji gibi hücre ölüm mekanizmalarında da önemlidir. ARDS, kanser, septik şok ve COVID-19'da hipokalsemi, yaygın bir semptomdur [301]. Bu durumda hipokalsemi hem potansiyel koruyucu hem de zararlı etkilere neden olabilmektedir. Güncel araştırma sonuçları, serum  $Ca^{2+}$  miktarının azalmasının COVID-19'un ağır seyri ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir [302].

Otofaji ve apoptoz arasındaki karşılıklı etkileşim, multiple romatizmal hastalıklar da dahil olmak üzere birçok hastalığın patolojisinde gösterilmiştir. Otofaji ve apoptoz arasındaki denge romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve Sjögren sendromunun patogenezinde rol oynayabilir [300]. Hem otofaji hem de apoptoz homeostazı koruyan mekanizmalar viral enfeksiyonlarda da önemli roller oynarlar. Önceki çalışmalar virüsle enfekte olmuş hücrelerde otofaji ve apoptoz yollarının karmaşık bir şekilde oluştuğunu göstermiştir. Bu çalışmalara göre enfeksiyonun erken evresinde apoptozun geç indüklendiği ya da otofaji indüksiyonunu apoptozu inhibe ettiği ya da viral replikasyon ve otofaji inhibisyonunun apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bazı viral enfeksiyonlarının otofaji bozukluğu olan hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini ve apoptozu aktive edebileceği de gösterilmiştir.

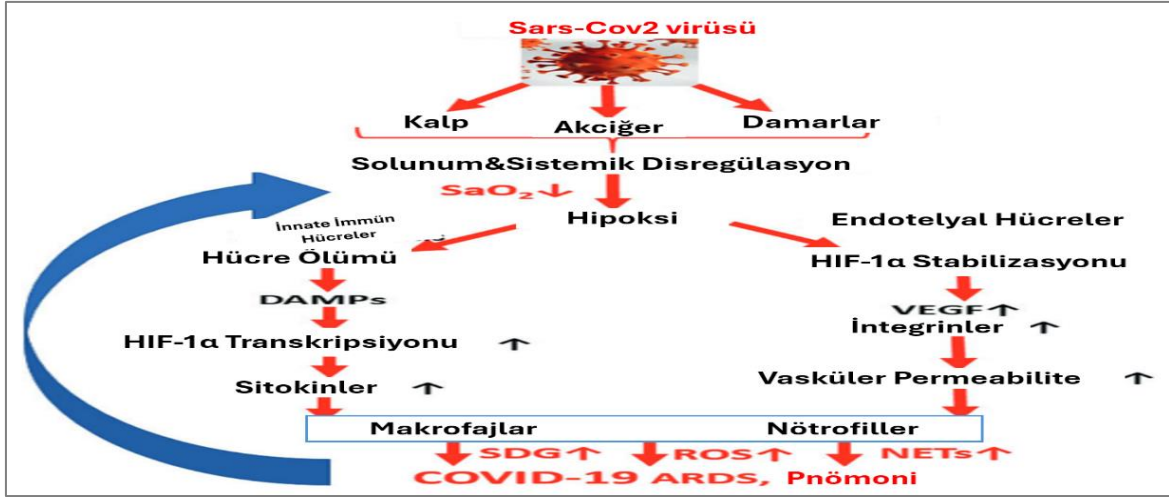
Otofaji ile apoptoz tamamen ayrı süreçler değildir, bu iki hücre sürecini aynı süreklilik olarak düşünmek gerektiği çalışmalarla gösterilmektedir. Bazı durumlarda, otofajik membranlar veya otofaji ile ilgili proteinler apoptozu veya nekroptozu aktive edebilmektedir. Bu nedenle, hücre ölümleri hastalık sürecinde veya enfeksiyon anında etkili immün yanıtın yanı sıra aynı zamanda hücrelerin kaderini belirlemede de birbirleriyle oldukça bağlantılıdır. Otofaji ve apoptoz arasındaki denge, klasik apoptoz ve otofaji ile ilişkili molekülleri içeren moleküler etkileşimler tarafından düzenlenmektedir [303,304].

### COVID-19'da Diğer Moleküllerin Rolü HIF1- $\alpha$ ve COVID-19

COVID-19 çoğu hastada hafif seyretmekle birlikte, hastalığın şiddetinin belirleyici özelliği, genellikle akciğer hasarıyla orantısız olan sistemik düşük oksijen düzeyleridir (hipoksemi). Bu derin hipokseminin Sars-Cov2'nin konakçı hücreleri enfekte etme yeteneğini değiştirebileceğini gösteren kanıtlar vardır. Hipoksinin, Epstein-Barr virüsünün replikasyonunu artıran [304,305] ancak HIV ve influenza

enfeksiyonunu baskılayan bir durum olduğu yani virüs replikasyonunu düzenlediği bildirilmiştir [307,308]. Hipoksi sinyali ile viral enfeksiyon arasındaki etkileşimin aslında virüsün konağa girişine özgü olduğunu ve hem konak hücreye hem de viral türe bağlı değişiklik gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca, hipoksinin akciğer pulmoner arter düz kas hücrelerinde (PASMC'ler), hematopoitik kök hücre öncüllerinde ve hepatokarsinom hücrelerinde [309] ACE2 ekspresyonunu indüklediği veya bazı durumlarda baskıladığı gösterilmiştir. Düşük oksijenin hem ACE2 ekspresyonu hem de Sars-Cov2 replikasyonu üzerindeki etkilerinin hücreye bağlı olması muhtemel olduğundan Wing ve arkadaşları hipoksik durumda Sars-Cov2'nin akciğer epitelyal hücrelerine girişinin ve replikasyonunun değişimlerini göstermişlerdir [316]. HIF-1 $\alpha$  aynı zamanda glikoliz ve inflamatuvar yanıtta önemli bir aktivatördür, bu da HIF-1 $\alpha$ 'nın COVID-19 patogenezi üzerindeki etkilerine işaret etmektedir [310,311].

Memeli hücreleri, oksijene bağımlı ve bağımsız stres sinyalleri tarafından düzenlenen HIF-1 $\alpha$  veya HIF-2 $\alpha$  alt birimlerinden oluşan, heterodimerik bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) tarafından düzenlenen bir transkripsiyonel yanıt yoluyla düşük oksijene uyum sağlar. Oksijen bol olduğunda, yeni sentezlenen HIF1- $\alpha$  alt birimleri HIF prolil-hidroksilaz domain (PHD) enzimleri tarafından hızla hidroksile edilir ve poliubikitinyasyon ve proteazomal degradasyon için hedeflenir. Buna karşılık, oksijen sınırlı olduğunda, HIF1- $\alpha$  alt birimleri çekirdeğe translokasyon yapar, HIF-1 $\beta$  ile dimerize olur ve hücre metabolizması, proliferasyon ve immün düzenlemede yer alan genlerin transkripsiyonunu aktive eder [312,313]. Hipoksinin veya HIF aktivasyonunun akciğer epitel hücrelerindeki Sars-Cov2 yaşam döngüsünü nasıl etkilediğini tanımlamak, hastalığın patogenezi hakkındaki bilgilerimiz için oldukça yararlı olacaktır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. COVID-19’da HIF1- $\alpha$ ’nın rolü [314]

Özellikle renal anemi tedavisinde kullanılan ilaçların (Çin’de ve Japonya’da kullanılan Roxadustat ve ayrıca Japonya’da kullanılan Daprodustat [314,315]) Sars-Cov2 enfeksiyonlarındaki rolleri araştırılmıştır [316]. Bu bağlamda Wing ve arkadaşları hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarında ACE2 ekspresyonundaki HIF’a bağlı Sars-Cov2’nin naif hedef hücelere girişini sınırlayacağını düşünerek, Roxadustat ile muamele ettikleri Sars-Cov2 ile enfekte ettikleri hücrelerde ACE2 ekspresyonunun düştüğünü HIF sinyal yolağında rol alan özellikle HIF prolyl hydroxylase 3 genini aktive ederek, göstermişlerdir.

Araştırmacılar HIF-1 $\alpha$ ’nın ACE2’yi düzenlemedeki rolüyle tutarlı olarak Sars-Cov2’nin hücelere girişini baskıladığını rapor etmişlerdir [316]. Codo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise monositlerin HIF prolyl hidroksilaz inhibitörü BAY 85-3934 (Molidustat) ile muamelesinin Sars-Cov2 RNA düzeylerini, HIF-1 $\alpha$  ’ya bağımlı bir şekilde artırdığını gösterilmiştir [317]. Bu sonuç Wing ve arkadaşlarının çalışmasıyla çelişmektedir ve bu durumun hücre tiplerine özgü farklılıklarla ilgili olabileceği vurgulanmaktadır. Bu nedenle Sars-Cov2 baskılamasının HIF-1 $\alpha$  ’ya bağlı mekanizmalarını karakterize etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır; bu mekanizmalar viral RNA replikasyonu ve/veya stabilitesi için gerekli konak faktörlerinin HIF-1 $\alpha$  regülasyonuna katkılarının ortaya çıkarılmasıyla daha iyi anlaşılacaktır.

COVID-19 transkriptom çalışmalarında Sars-Cov2, konak immün yanıtını, metabolik yollarını, hücre ölümünü, hücre döngüsünü, viral yanıtları ve apoptotik süreçleri nasıl değiştirdiği gösterilmektedir [317]. Bu çalışmalara göre de hem HIF’in oksijen yolu ile düzenlenmesi hem de HIF-1 $\alpha$  sinyal yolağının, COVID-19 hastalarının periferik kan hücrelerinde disregüle olduğu

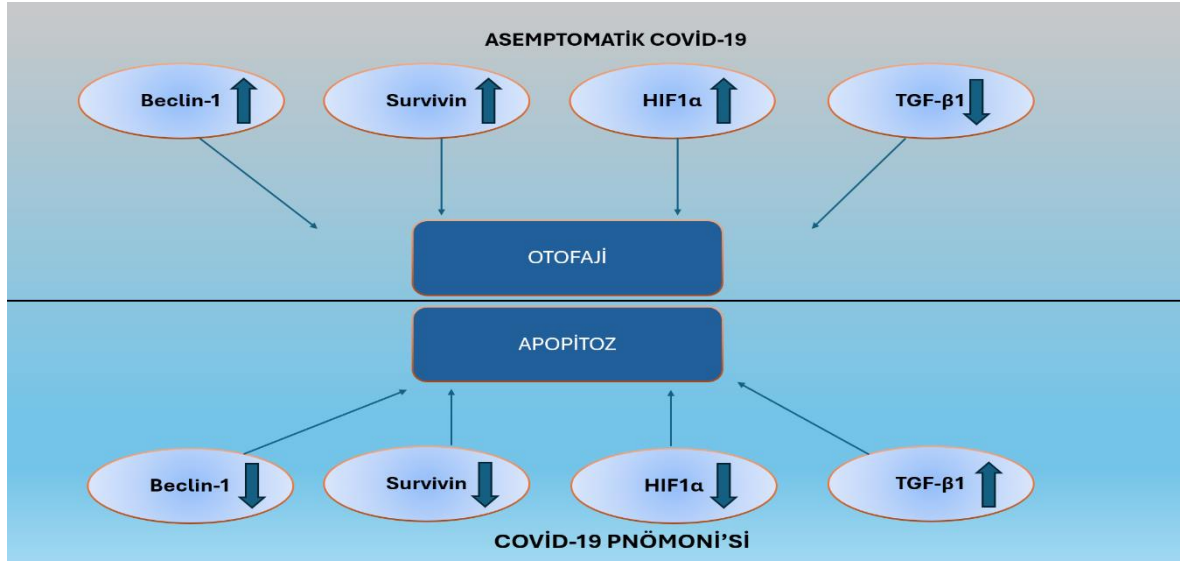
gösterilmiştir. Ayrıca, klinik örneklerin analizleri çalışmalarında, HIF-1 $\alpha$  ve inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarının COVID-19 hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla belirgin şekilde ortaya çıktığını, genç hastalara kıyasla yaşlı hastalarda önemli ölçüde provoke olduğunu ve genç sağlıklı bireylere kıyasla yaşlı sağlıklı bireylerde de yükseldiği gösterilmiştir [318]. Önceki çalışmalar COVID-19 mortalitesinin yaş arttıkça katlanarak arttığını bildirmektedir [319]. Bu verilere göre de yaşlı hastalarda ortaya çıkan HIF-1 $\alpha$  ve aşırı inflamatuvar yanıtların hastalık şiddetine ve ölüme yol açabileceği ortaya çıkmaktadır. Sars-Cov2 ile enfekte Caco2 hücrelerinde HIF-1 $\alpha$  ile birlikte artan İL-1 $\beta$ , İL-6 ve İFN- $\beta$  düzeyleri gösterilmiştir [320]. Tian ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise Sars-Cov2 Orf3a proteininin (önceki çalışmalarda hücre ölümüne, lizozomal hasara ve hücre apoptozuna neden olduğunu gösterilmiş [318]), HIF-1 $\alpha$  ve proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonlarında rol oynadığı bulunmuştur. Öte yandan hipoksi, nükleer faktör  $\kappa$ B ve MIP1 $\alpha$  aracılığıyla HIF-1 $\alpha$  üzerinden nötrofil apoptozunu azaltmaktadır. Bu nedenle, HIF-1 $\alpha$  aktivasyonunun ARDS'de nötrofil apoptozunun bozulmasında rol oynadığı da düşünülmektedir [321].

### TGF- $\beta$ ve COVID-19

TGF- $\beta$ 'nin immün sistem hücrelerinin gelişimini, farklılaşmasını, tolerans indüksiyonunu ve homeostazını etkilediği bilinmektedir. Buna göre, TGF- $\beta$ 'nin farklı hücrelerdeki pleiotropik etkilerinin dengesi, immün yanıt veya tolerans oluşumuna katkıda bulunur. Hem immünosupresif hem de pro-inflamatuvar etkileri teşvik eden paradoksal ikili rolüyle TGF- $\beta$ , immünolojik dengenin korunması için çok önemlidir [322,323]. TGF- $\beta$ 1 ise, immün sistem regülasyonunda rol oynayan başlıca TGF- $\beta$  izoformudur [324]. Artan TGF- $\beta$ 1 sinyali, T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve dendritik hücreler gibi efektör hücrelerinin doğrudan inhibisyonu yoluyla konakçı immün yanıtının baskılanmasını sağlar. Bu etki, Treg hücrelerinin aktivasyonu ile de güçlendirilir [325]. Pleiotropik etkili TGF- $\beta$ 1 ve özellikle yüksek İL-6 aktivitesi ile immün hücreleri uyarabilir ve özellikle Th17 yolağı üzerinden inflamasyonu yönlendirebilir [326]. TGF- $\beta$ 1 ve İL-6, Th17 hücrelerinin indüksiyonunu ve proinflamatuvar İL-17 salgılanmasını sağlar. Th17 yolağı aktivasyonu doku fibrozisine de katkıda bulunabilir [327]. Ayrıca, İL-17 güçlü bir nötrofil kemokinidir ve COVID-19 hastalarının kanında mutlak nötrofil sayısının, nötrofil yüzdesinin değişimi ve nötrofil: lenfosit oranının artması, hastalığın şiddetiyle ilişkilendirilmiştir [328]. TGF- $\beta$ 'nin çok sayıda hastalığın patogeneğinde rol aldığı bilirse de COVID-19 hastalığının seyri ve şiddetindeki rolü her geçen gün daha da belirginleşmektedir. ARDS'li hastalarda, TGF- $\beta$ 1'in enfeksiyonun erken evresinde akciğerlerde ve plazmada biriktiği [329-331] ve TGF- $\beta$ 'nin bu bağlamda

Zivancevic-Simonovic ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada olduğu gibi COVID-19 hastalığının şiddetiyle ilişkisi olan trombostopeniye katkısı araştırılmıştır. Araştırma bulgularına göre ise TGF- $\beta$ 1'in düşük serum değerleri, COVID-19'un şiddetiyle ilişkilendirilmiştir [332]. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease)) bulunan COVID-19 hastalarında TGF- $\beta$ 1'in rolünü tespit etmek için yapılan başka bir çalışmada ise TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonunun hastalığın şiddeti ve komplikasyonlarının (ileri solunum desteği ihtiyacı, YBÜ'ye (yoğun bakım ünitesi) kabul, iyileşme süresi, nozokomiyal enfeksiyon gelişimi ve mortalite) gelişimini öngörmede iyi bir ayırt edici doğruluk göstermiş ve sonuç olarak; TGF- $\beta$ 1, NAFLD hastalarında COVID-19 şiddetini ve olumsuz sonuçları öngörmek için etkili bir biyobelirteç olabileceği vurgulanmıştır [333]. Viral enfeksiyonların da dahil olduğu enfeksiyon anında, TGF- $\beta$ 1 aktivasyonu pıhtılaşmayı artırabilmekte ve immün disregülasyona neden olarak, doku fibrozuna kadar giden süreci yönlendirebilmektedir [334]. İmmün hücrelerde TGF- $\beta$  sinyalinin düzensizliği ve mikrovasküler hasar alanlarında lokalizasyonu COVID-19 hastalığında da gösterilmiş ve hastalığın şiddetli sürecinde sıklıkla görülen ARDS ve cilt mikro trombozuna katkısı bildirilmiştir [335]. Trombositlerde ve mikrovasküler trombus içindeki diğer hücrelerde yüksek TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonunun gösterilmesi; TGF- $\beta$ 1'in pıhtılaşma kaskadını aktive etme, immün sistem yollarını düzensizleştirme ve pro-fibrotik özelliklerin ortaya çıkışına katkıda bulunduğu kanıtlar [336].

Apopitoz ile otofaji arasındaki karşılıklı iletişime katkı sağladıkları gösterilen bu moleküllerin COVID-19 hastalığında birlikte nasıl bir etki gösterdiği henüz tespit edilmemiştir. Bu bilgiler ışığında tez çalışmamıza konu olan otofaji ve apopitozun karşılıklı konuşmasında BECN-1 ve SVN'nin katkısı, bu etkileşime TGF- $\beta$ 1 ve HIF-1 $\alpha$ 'nın etkisini araştırmayı, yorumlar yapmayı amaçladık. Asemptomatik ve pnömoni gelişen COVID-19 hastaları arasında karşılaştırma yapmak amacıyla geliştirdiğimiz tezimizin hipotezi Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Çalışma hipotezi

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Tez çalışması; çalışma gruplarının belirlenmesi, örneklerin toplanması ve ELISA yöntemi ile çalışmaya dahil edilen moleküllerin belirlenmesi basamaklarından oluşmaktadır.

#### **3.1. Çalışma Grupları**

Tez çalışmasına, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından Nisan-Mayıs 2020 tarihleri arasında ayaktan poliklinik şartlarında ya da izolasyon servislerinde yatarak izlenen kesin COVID-19 tanısı alan; 45 Asemptomatik, 45 Pnömonisi olan hasta dahil edilmiştir. Çalışmada COVID-19 için kesin vaka tanımına uyan 18 yaşından büyük hastalar bulunmaktadır.

Hastaların kesin vaka tanımları T.C Sağlık Bakanlığı COVID-19 ulusal rehberi vaka ve vaka yönetimi rehberi doğrultusunda oluşturulmuştur.

Çalışmaya Sars-Cov2 PCR pozitifliği saptanan 90 hastaya ait serum örnekleri dahil edilmiştir. Çalışma için etik kurul onayı 25.12.2023 tarihli 1046 nolu karar ile alınmıştır.

Hastalar klinik ve radyolojik bulgularına göre 2 grupta toplanmıştır;

1. Asemptomatik COVID-19
2. COVID-19 pnömonisi

#### **3.2. Serum Örneklerinin Toplanması**

Çalışmaya dahil edilen hastalardan yatış anında rutin alınan kan örnekleri ile birlikte jelli biyokimya tüpüne venöz kan örneği alınmış, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Rutin Laboratuvarı'na getirilmiş, sağlık bakanlığı rehberi önerileri doğrultusunda uygun kişisel koruyucu ekipman kullanılarak, oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra, 3000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırılmıştır. Serumlar 2 ml'lik kriyovial tüplere aktarılarak çalışma gününe kadar laboratuvarında -80°C dolapta dondurularak

saklanmıştır. Çalışma günü uygun çözündürme protokollerine bağlı kalarak, serum örnekleri çözündürülmüştür.

### **3.3. ELISA Yöntemi ile Serum BECN-1, SVN, TGF- $\beta$ 1 ve HIF-1 $\alpha$ Düzeylerinin Belirlenmesi**

ELISA Test Kiti: Human BECN-1, SVN, TGF- $\beta$ 1 ve HIF-1 $\alpha$  double-antibody Sandwich ELISA, labelled with biotin and combined with Streptavidin-HRP (SunRed)

Kit içeriği,

- Alüminyum folyo içerisinde antijen olarak rekombinant insan BECN-1, SVN, TGF- $\beta$ 1 ve HIF-1 $\alpha$  molekülleriyle kaplı mikrokuyucuk dizilmiş stripler (1 plak – 12 well+8 strip, 4x12)
- 1 şişe (6 ml) Str-HRP (Horse radish peroxidaz)- konjugat
- 0,5 ml standart solüsyonu (200 ng/ml)
- 3 ml Standart dilüent
- 20 ml 30x yıkama solüsyonu
- 1 'er ml Biotin- BECN-1, Biotin- SVN, Biotin- TGF $\beta$ , Biotin- HIF-1 $\alpha$  monoklonal antikor (moAb)
- 6 ml Kromojen A solüsyonu
- 6 ml Kromojen B solüsyonu
- 6 ml Durdurma (stop) solüsyonu
- Yapışkan bant (seal foiler) (plakları kapatmak için)

BECN-1, SVN, TGF- $\beta$ 1 ve HIF-1 $\alpha$  moleküllerini serum örneklerinde belirlemek için edinilen ELISA kitlerinin çalışma protokolleri ve içerikleri aynıdır (sadece MoAb'lar ayrı).

### **3.4. Test Protokolü**

Serum örnekleri -80°C'de buldukları dolaptan çıkarılarak uygun çözünme kurallarına bağlı kalarak çözündürülmüştür; ELISA Kiti kullanılarak serum BECN-1, SVN, TGF- $\beta$ 1 ve HIF-1 $\alpha$  varlığı ve düzeyleri belirlenmiştir.

450/620 nm'de ELISA okuyucu cihazda dansite ölçülmüştür, sonrasında bilgisayar ortamında konsantrasyonu bilinen standartların OD değerleriyle grafik (standart curve) oluşturulmuştur. Grafik denklemine göre OD'si ELISA okuyucuda elde edilen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

### 3.5. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

- Derin dondurucu (-80°C) – Sanyo/Ultra low, Kanada
- Distile su cihazı
- Vortex cihazı- Heidolph/ REAX top, Almanya
- Otomatik pipet
- ELISA plak yıkayıcı – Tecan Hydro FLEX, İsviçre
- Çalkalayıcı inkübatör
- ELISA plak okuyucu – BioTek Synergy HT, ABD
- Kriyo vial (2 ml) – GREINER
- Eppendorf tüp (1.5 ml)- GREINER
- Falcon tüpü (15 ml)- GREINER
- Falcon tüpü (50 ml)- GREINER
- Steril pipet ucu (10-200 µl)- GREINER
- Steril pipet ucu (200-1000 µl)- GREINER
- Sıvı aktarım kabı- Isolab, Türkiye

### 3.6. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda İstatistik ve grafik analizleri için GraphPad Prism 9 ve IBM SPSS Statistics, version 22.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., ABD) kullanılmıştır. Tez çalışmasından elde edilen veriler değerlendirilerek Sars-Cov2 Enfeksiyonunda Otofaji ve Apoptozun karşılıklı ilişkisinin öneminin analizi, gruplara ayırdığımız COVID-19 hastalarında BECN-1, SVN, TGF-β1 ve HIF-1α moleküllerinin istatistiksel farklılığın önemlilik derecesi ile yorumlanmıştır. Hasta gruplandırması üç başlık altında yapılmıştır. Tanı grubu: asemptomatik ve pnömoni gelişen hastalardan; komorbidite grubu: komorbiditesi olan ve olmayan hastalardan; sağ kalım grubunu ise mortalite görülen ve görülmeyen hastalardan oluşturmuştur. İstatistik analizlerin öncesinde Skewness-Kurtosis'e göre normalite testleri yapıp, +1.5 ve -1.5 değerleri arasında olanların normal dağıldığı kabul edilmiştir [337].

Çalışmamızın değerlerinin normal dağılmadığı görüldüğü için ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney testi kullanılarak, ikiden fazla karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis nonparametrik ANOVA testi ile yapılmıştır. Hastaların kategorik değerleri sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Değerler, ortalama ve standart sapma (SD) veya medyan değerler ve Q1-Q3'lük çeyreklikler arası aralık (IQR) olarak sunulmuştur. Güven aralığı %95 düzeyine göre p değeri  $<0,05$  istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Tekli varyant analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan değişkenler lojistik regresyon analizi ile yeniden değerlendirilmiş; demografik, klinik ve laboratuvar parametrelerinin analizi sonrasında %95 güven aralığı için p değeri  $<0,05$  olduğunda pnömoni, mortalite ve komorbidite için bağımsız risk faktörü olarak tanımlanmıştır.

Kaplan Meier Analizi ile de çalışmamızda yer alan dört molekülün sağ kalıma etkisi test edilmiş ve sağ kalım eğrileri çizilmiştir.

İkili değişkenler arasındaki ilişkiler (korelasyon) ise Spearman's korelasyon analizi ile belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Demografik Veriler

Çalışmamızda, dahil edilme koşullarını sağlayan 45 asemptomatik, 45 COVID-19 pnömonisi görülen, toplamda 90 hasta yer almaktadır. Hasta grupları arasında BECN-1, SVN, TGF- $\beta$ 1 ve HIF-1 $\alpha$  moleküllerinin varlığı araştırılmış, hastalarda ayrıca demografik, klinik ve laboratuvar bulgularının dağılımları ile bu moleküllerin varlığının bu iki hasta grubu arasında karşılaştırması yapılmış, ağır hastalık, mortalite ve COVID-19 hastalığının kritik laboratuvar bulgularıyla olan ilişkileri analiz edilmiştir.

Dahil edilen hastaların (Çizelge 4.1) ortalama yaşı 47 (min-max; 21-86) iken; hasta gruplarına göre dağılımda ise asemptomatik hastaların ortalama yaşı 36 (min-max; 21-55), pnömoni görülen hastaların ortalama yaşı 57 (min-max; 21-86) olarak saptanmıştır. Hastalardan mortalite görülenlerde ise ortalama yaş 70 (min-max; 56-85)'dir. Komorbiditesi olan hastaların yaş ortalaması 60 (min-max; 32-86) iken; komorbiditesi olmayanların yaş ortalaması 39 (min-max; 21-76) olarak bulunmuştur. Dahil edilen hastaların yaşları dekadlara göre gruplandırıldığında; %17'si (15) 18-29 yaş, %28'i (25) 30-39 yaş, %20'si (18) 40-49 yaş, %9'u (8) 50-59 yaş, %11'i (10) 60-69 yaş, %11'i (10) 70-79 yaş ve %4'ü (4) 80-89 yaştır.

Hastaların %51'i (46) kadın, %49'u (44) erkektir. Hasta gruplarına göre ise asemptomatik hastaların %62'si (28) kadın, %38'i (17) erkek iken; pnömoni görülen hastaların %60'ı (27), komorbiditesi olan hastaların %62'si erkektir.

Hastaların %13'ünde (12) mortalite görülmüştür. Mortalite görülen vakaların yaşlarının dekadlara göre analizlerinde ise %17'sinin 50-59 yaş, %42'sinin 60-69 yaş, %24'ünün 70-79 yaş ve %17'sinin 80-89 yaş olduğu görülmüştür. Komorbiditesi olanların oranı %39 (35) iken; en az iki komorbiditesi olanların oranı %22' (20) dir. Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin oranına bakacak olursak; %12'sinde Tip 1 Diyabet, %20'sinde Hipertansiyon, %2'sinde KOAH, %6'sında Astım, %8'inde Sigara öyküsü, %9'unda Malinite ve %4'ünde Kronik Böbrek Hastalıkları bulunmaktadır

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik bilgileri

<b>Ortalama Yaş (min:max) 47 (21-86)</b>		
<b>Cinsiyet</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Kadın	<b>46</b>	<b>51</b>
Erkek	<b>44</b>	<b>49</b>
<b>Komorbidite</b>	<b>35</b>	<b>39</b>
<b>Tanı Grupları</b>		
Asemptomatik	<b>45</b>	<b>50</b>
Pnömoni	<b>45</b>	<b>50</b>
<b>Mortalite</b>	<b>12</b>	<b>13</b>

#### 4.2. Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi

Çizelge 4.2’de çalışmaya dahil edilen tüm hastaların laboratuvar bulguları verilmiştir. Değerler normal dağılım göstermediği için medyan değerleri verilmiştir. Ayrıca tanı grupları, komorbidite grupları ve sağ kalım gruplarında görülen değişen kan hücre düzeyleri ve grubun kendi içinde birbirleriyle anlamlılık ilişkileri (p değeri) Çizelge 4.3’te ortaya konmuştur.

Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen hastaların laboratuvar bulguları

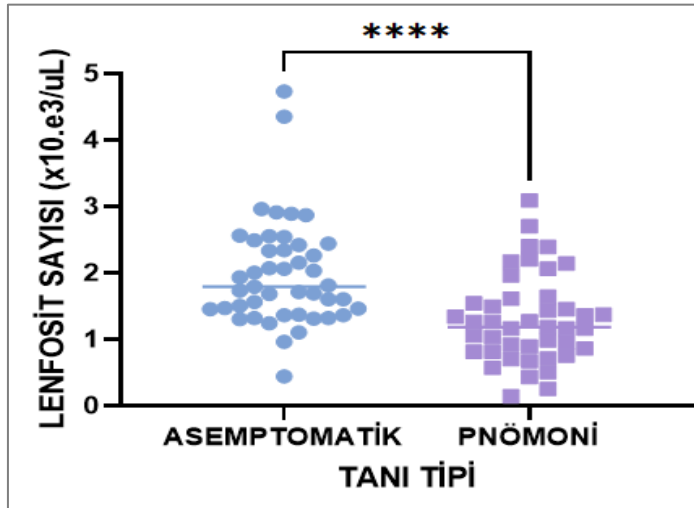
	<i>N (%)</i>	<i>MEDYAN</i>	<i>IQR</i>	<i>Q1-Q3</i>	<i>ORTALAMA</i>	<i>STD. SAPMA</i>
<b>FİBRİNOJEN</b>	74 (82)	342,5	218	284,5-502,5	413,9	169,6
<b>D-DİMER</b>	81 (90)	0,32	0,79	0,2-1,0	1,03	2,1
<b>CRP</b>	84 (93)	6,1	62,38	2,7-62,1	39,9	58,8
<b>SİSTATİN C</b>	70 (78)	0,8	0,3	0,7-1,0	0,9	0,3
<b>FERRİTİN</b>	81 (90)	58	252	15-266	339,7	779,3
<b>TOTAL C3</b>	58 (64)	108	31,6	92,4-124,0	109,9	21,2
<b>TOTAL C4</b>	58 (64)	20,8	7,9	18,2-26,1	25,0	11,7
<b>CK</b>	80 (89)	114	98	75-172,5	178,6	223,6
<b>LDH</b>	87 (97)	211	126	179-305	297,7	311,8
<b>TROPONİN</b>	84 (93)	5,0	5,10	4,9-10,0	61,4	294,1
<b>PROKLASİTONİN</b>	86 (96)	0,03	0,13	0,02-0,16	0,6	4,7
<b>KALSİYUM</b>	80 (89)	9,3	1,10	8,7-9,8	9,1	0,7

Çizelge 4.3. Gruplandırılan hastaların değişen kan hücre düzeyleri

	TANI GRUBU			KOMORBİDİTE GRUBU			SAĞ KALIM GRUBU		
	ASEMPTOMATİK HASTALAR	PNÖMONİ GELİŞEN HASTALAR	p Değeri	KOMORBİDİTESİ OLMAYAN HASTALAR	KOMORBİDİTESİ OLAN HASTALAR	p Değeri	MORTALİTE GÖRÜLMEMEYEN HASTALAR	MORTALİTE GÖRÜLEN HASTALAR	p Değeri
HASTA SAYISI (N)	45	45		55	35		78	12	
WBC (X10.E3/UL) (MEDYAN)	6,94	6,81	0,762	6,60	7,60	0,175	6,80	8,15	0,280
LENFOSİT SAYISI (X10.E3/UL) (MEDYAN)	1,79	1,18	0,000*	1,70	1,30	0,008*	1,60	1,03	0,001*
NÖTROFİL SAYISI (X10.E3/UL) (MEDYAN)	4,32	4,14	0,890	4,10	4,70	0,169	4,74	4,27	0,236
NÖTROFİL/LENFOSİT ORANI	2,0	3,5	0,001*	2,10	3,40	0,031*	3,50	2,0	0,001
MONOSİT SAYISI (X10.E3/UL) (MEDYAN)	0,50	0,51	0,593	0,50	0,60	0,008*	0,50	0,48	0,574
EOZİNOFİL SAYISI (X10.E9/L) (MEDYAN)	0,1	0,0	0,004*	0,10	0,00	0,397	0,10	0,00	0,210
BAZOFİL SAYISI (X10.E3/UL) (MEDYAN)	0,04	0,02	0,000*	0,00	0,00	0,402	0,03	0,01	0,182
TROMBOSİT SAYISI (X10.E3/UL) (MEDYAN)	265	236	0,590	265	238	0,099	264	241,5	0,194

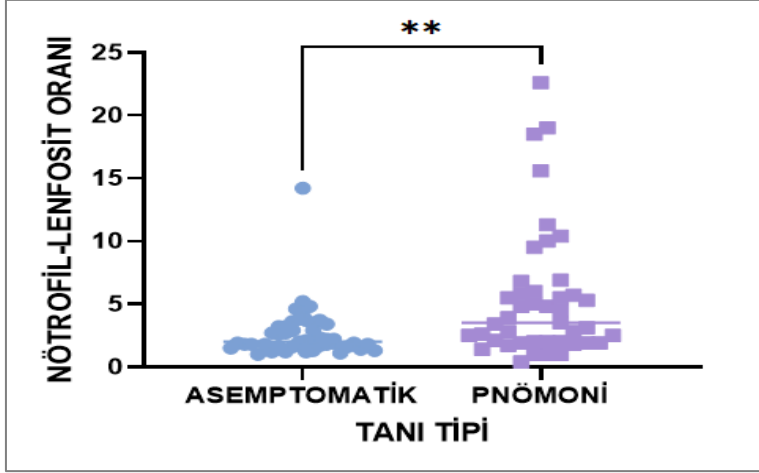
\*p&lt;0.05

Tanı gruplarına göre analizini yaptığımız kan hücrelerinden asemptomatik ve pnömoni gelişen hastalar arasında lenfosit sayısının anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur (p<0,001) (Şekil 4.1).



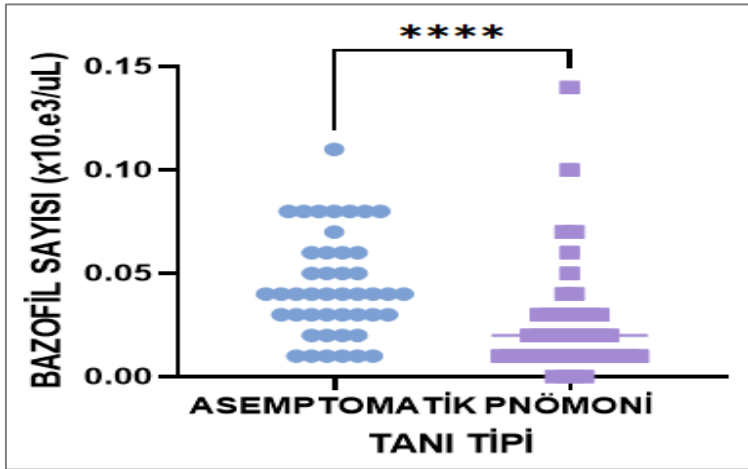
Şekil 4.1. Tanı gruplarına göre asemptomatik hastalar ve pnömoni gelişen hastalar arasında lenfosit sayısının değişimi ve anlamlılık analizi

Nötrofil/ lenfosit oranının ise asemptomatik ve pnömoni gelişen hastalar arasında anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur (p<0,001) (Şekil 4.2).



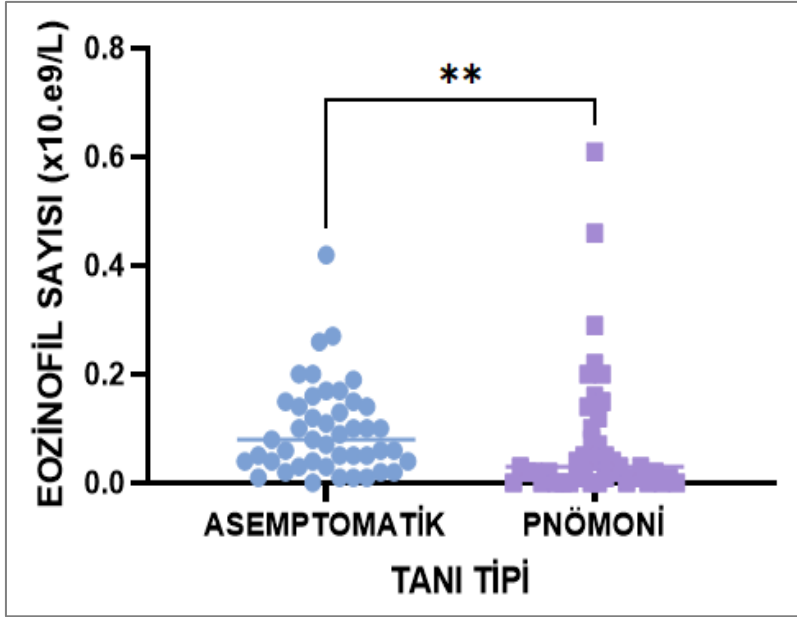
Şekil 4.2. Tanı gruplarına göre asemptomatik hastalar ve pnömoni gelişen hastalar arasında nötrofil/lenfosit oranının değişimi ve anlamlılık analizi

Tanı gruplarına göre analizini yaptığımız kan hücrelerinden asemptomatik ve pnömoni gelişen hastalar arasında bazofil sayısının anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur. ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.3).



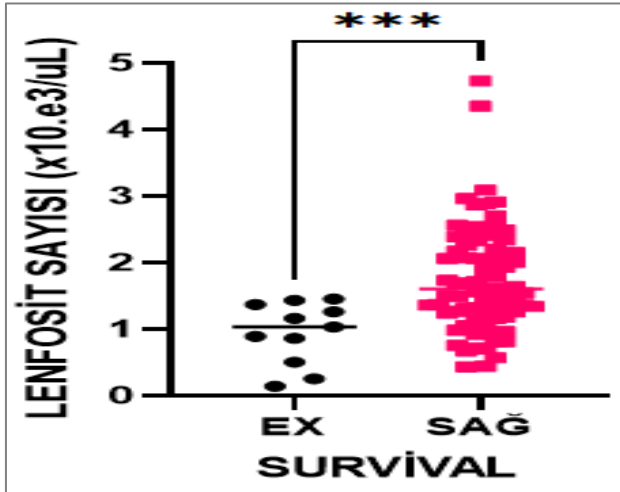
Şekil 4.3. Tanı gruplarına göre asemptomatik hastalar ve pnömoni gelişen hastalar arasında bazofil sayısının değişimi ve anlamlılık analizi

Eozinofil sayısının ise asemptomatik ve pnömoni gelişen hastalar arasında anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $p = 0,004$ ) (Şekil 4.4).



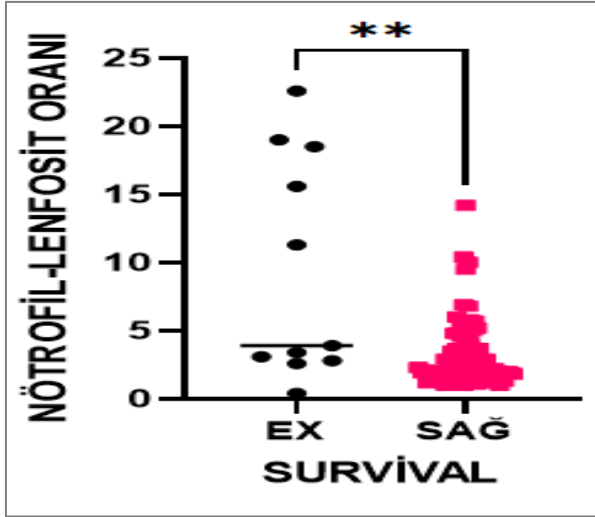
Şekil 4.4. Tanı gruplarına göre asemptomatik hastalar ve pnömoni gelişen hastalar arasında eozinofil sayısının değişimi ve anlamlılık analizi

Sağ kalım gruplarına göre analizini yaptığımız hastalardan mortalite görülen ve mortalite görülmeyenler arasında lenfosit sayısının anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur. ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.5).



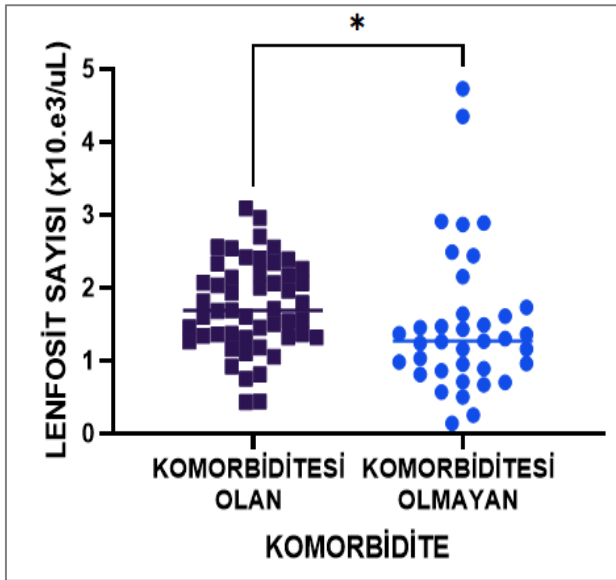
Şekil 4.5. Sağ kalım gruplarına göre analizini yapılan kan hücrelerinden mortalite görülen ve görülmeyen hastalar arasında lenfosit sayısının değişimi ve anlamlılık analizi

Sağ kalım gruplarına göre analizini yaptığımız hastalardan mortalite görülen ve mortalite görülmeyenler arasında nötrofil/lenfosit oranının anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur. ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.6).



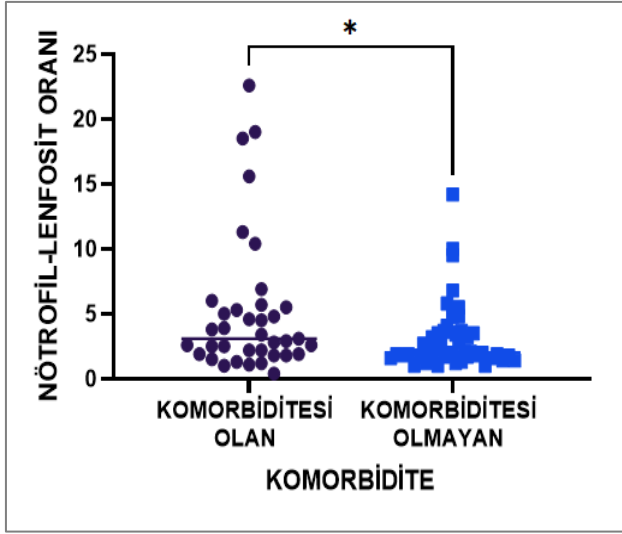
Şekil 4.6. Sağ kalım gruplarına göre analizini yapılan kan hücrelerinden mortalite görülen ve görülmeyen hastalar arasında nötrofil/lenfosit oranının değişimi ve anlamlılık analizi

Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yaptığımız analizinde ise bu iki grup arasında lenfosit sayısının anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $p=0,008$ ) (Şekil 4.7).



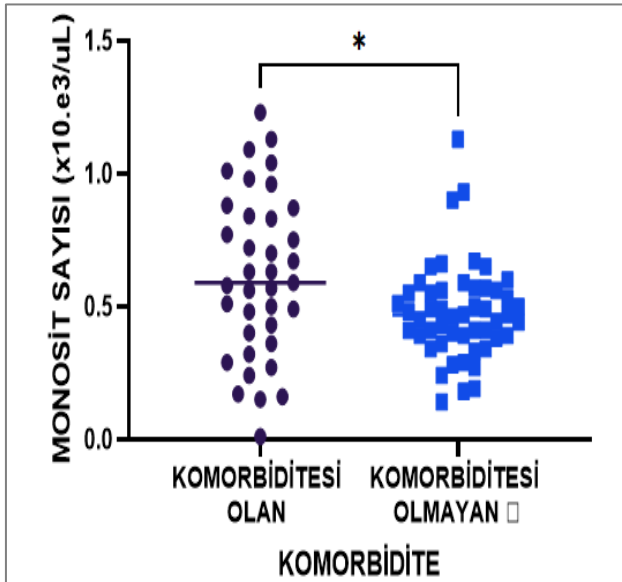
Şekil 4.7. Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yapılan analizde lenfosit sayısının değişimi ve anlamlılık analizi

Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yaptığımız analizinde ise bu iki grup arasında nötrofil/ lenfosit oranının anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yapılan analizde nötrofil/lenfosit oranının değişimi ve anlamlılık analizi

Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yaptığımız analizinde ise bu iki grup arasında monosit sayısının anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $p=0,008$ ) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Hastaların eşlik eden hastalık öykülerinin olmasına (komorbidite) ve olmamasına göre yapılan analizde monosit sayısının değişimi ve anlamlılık analizi

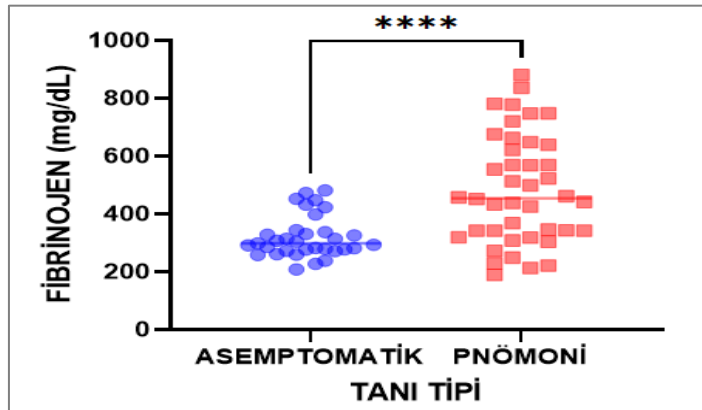
Tanı grubuna, sağ kalıma ve komorbiditeye göre gruplandığımız hastaların laboratuvar bulguları ve anlamlılık ilişkileri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Tanı Grubu, Komorbidite ve Sağ kalım hasta gruplarının laboratuvar bulguları ve anlamlılık ilişkileri

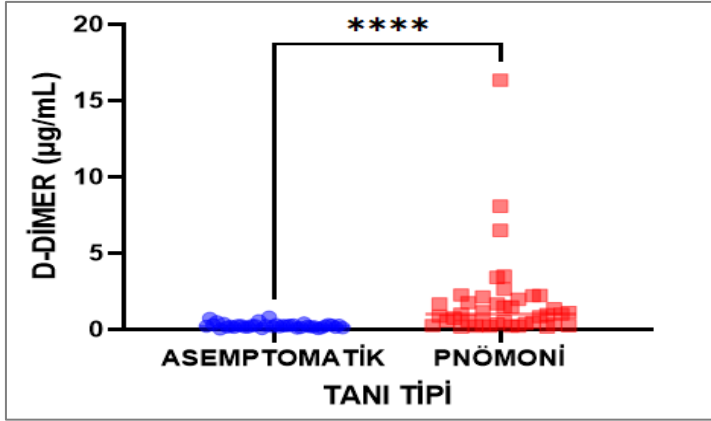
	TANI GRUBU			KOMORBİDİTE (Ek hastalık)			SAĞKALIM		
	ASEMPTOMATİK (medyan)	PNÖMONİ (medyan)	p DEĞERİ	VAR (medyan)	YOK(medyan)	p DEĞERİ	EX (medyan)	SAĞ (medyan)	p DEĞERİ
FİBRİNOJEN*	298,0	457,0	0,000	454	328	0,30	554	329	0,004
D-DİMER*	0,23	1,0	0,000	1	0,26	0,001	2,26	0,26	0,000
CRP*	3,2	56,1	0,000	38,3	3,48	0,000	75,9	4,83	0,000
SİSTATİN C*	0,77	1,06	0,000	1,06	0,78	0,000	1,4	0,8	0,012
FERRİTİN*	24,0	257,0	0,000	247	31	0,000	1350,5	34	0,000
TOTAL C3*	103,5	113,5	0,034	108	108	0,874	120	108	0,034
TOTAL C4	20,5	24,2	0,137	24,3	20,5	0,162	20,8	20,2	0,137
CK*	98,0	129,0	0,029	125,5	108	0,169	203	112	0,029
LDH*	188,0	279,0	0,000	241,5	201	0,051	314	206	0,004
TROPONİN*	4,9	10,0	0,000	14,5	4,9	0,000	7,9	5,0	0,029
PROKALSİTONİN*	0,0	0,1	0,000	0,1	0,03	0,000	0,49	0,03	0,000
KALSİYUM	9,7	8,8	0,000	9,3	9,4	0,002	8,2	9,4	0,000

\* p<0,05

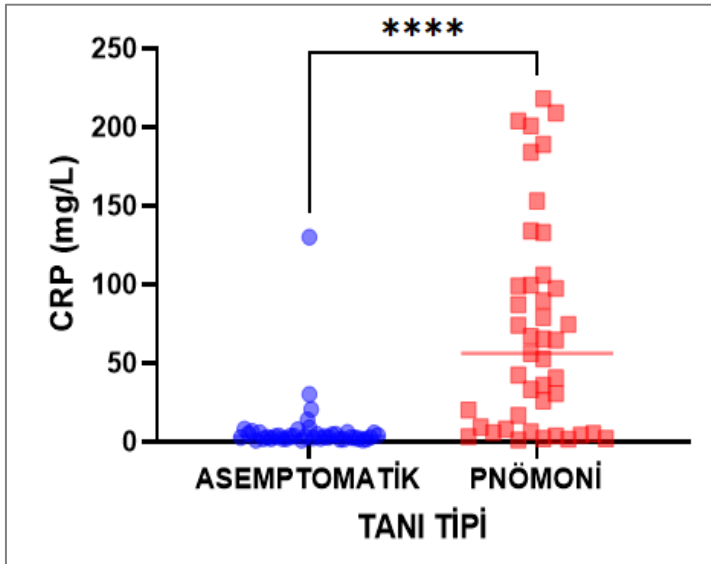
Tanı grubunda yapılan analize göre pnömoni gelişimi ile Fibrinojen yüksekliğinin (p<0,001) (Şekil 4.10), D-Dimer yüksekliğinin (p<0,001) (Şekil 4.11), CRP yüksekliğinin (p<0,001) (Şekil 4.12), Sistatin C yüksekliğinin (p<0,001) (Şekil 4.13), Ferritin yüksekliğinin (p<0,001) (Şekil 4.14), CK yüksekliğinin (p=0,028) (Şekil 4.15), Troponin yüksekliğinin (p<0,001) (Şekil 4.16) ve Prokalsitonin yüksekliğinin (p<0,001) (Şekil 4.17); Ca<sup>2+</sup> düzeyinin düşüklüğünün (hipokalsemi) (p<0,001) (Şekil 4.18) anlamlı ilişkisi tespit edilmiştir.



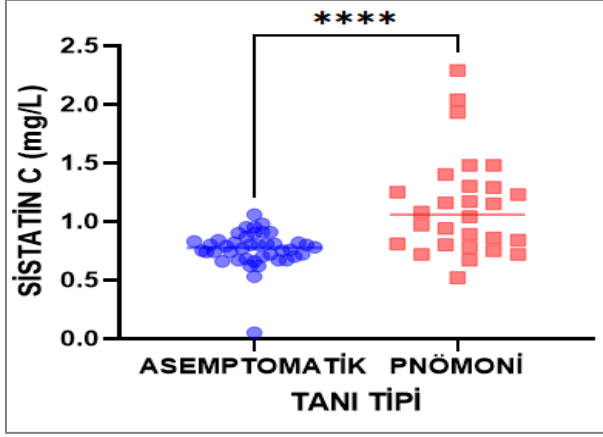
Şekil 4.10. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Fibrinojen yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



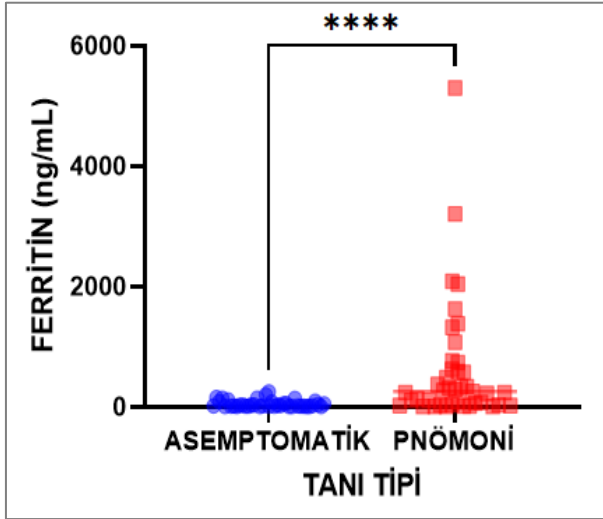
Şekil 4.11. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından D-Dimer yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



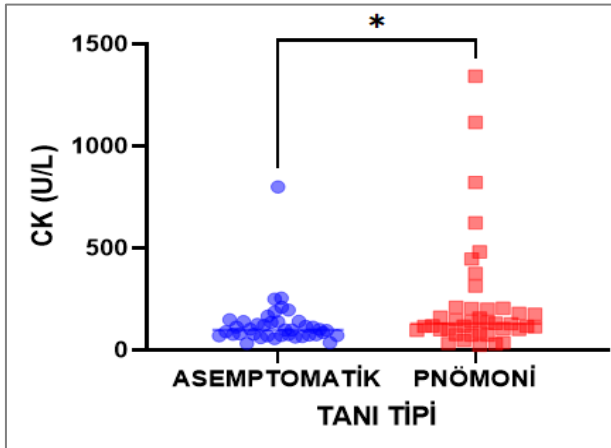
Şekil 4.12. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından CRP yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



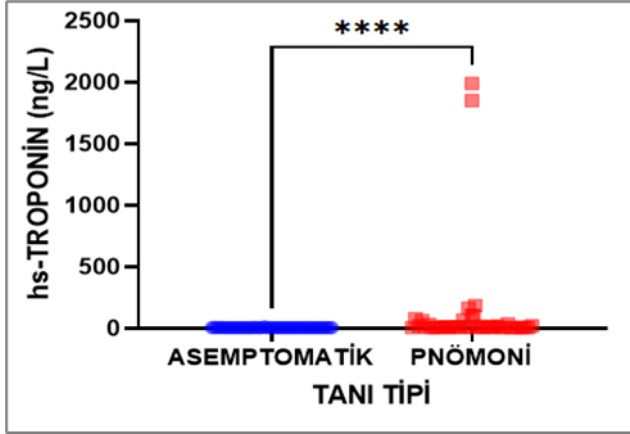
Şekil 4.13. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Sistatin C yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



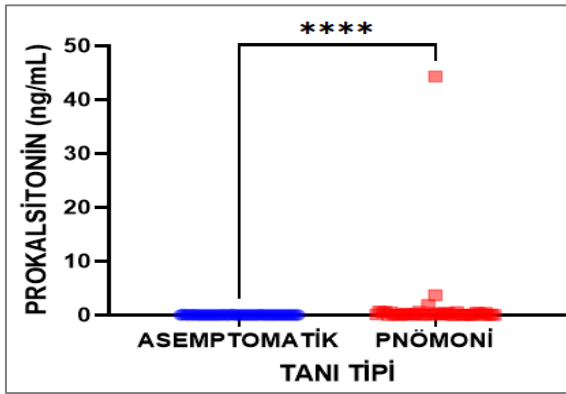
Şekil 4.14. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Ferritin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



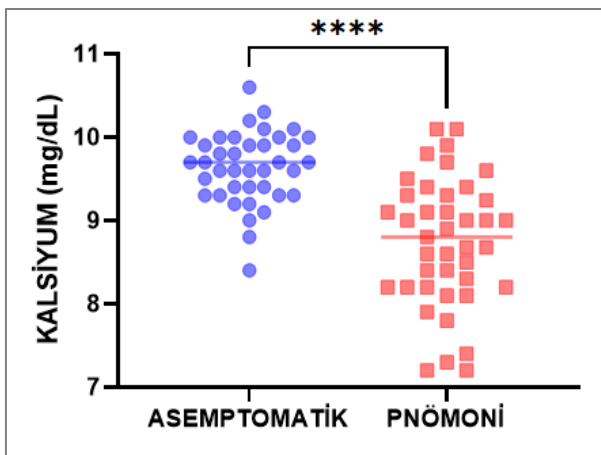
Şekil 4.15. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından CK yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



Şekil 4.16. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Troponin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi

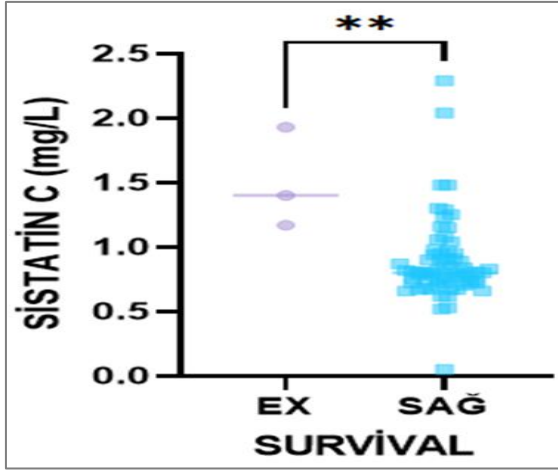


Şekil 4.17. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Prokalsitonin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi

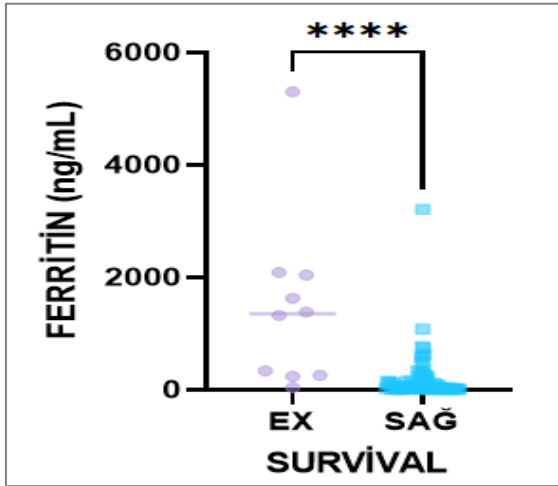


Şekil 4.18. Tanı grubuna göre laboratuvar bulgularından Kalsiyum düşüklüğünün anlamlılık ilişkisi



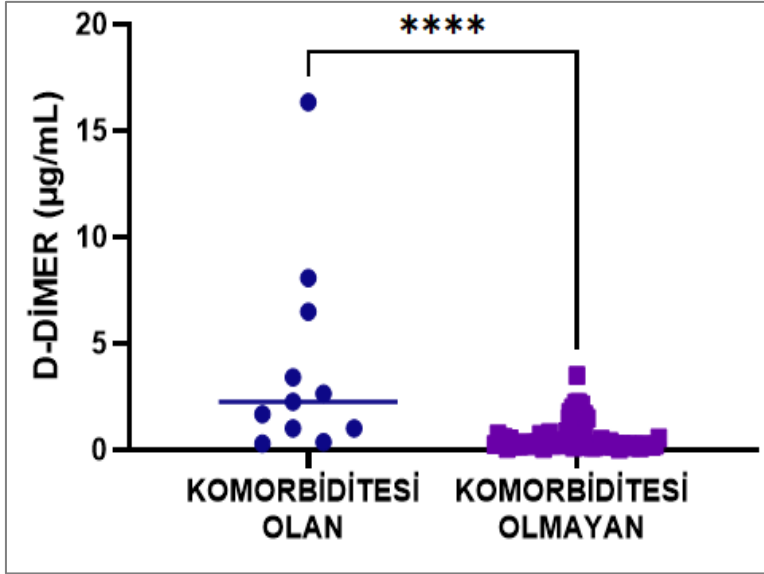


Şekil 4.21. Sağ kalıma göre laboratuvar bulgularından Sistatin C yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi

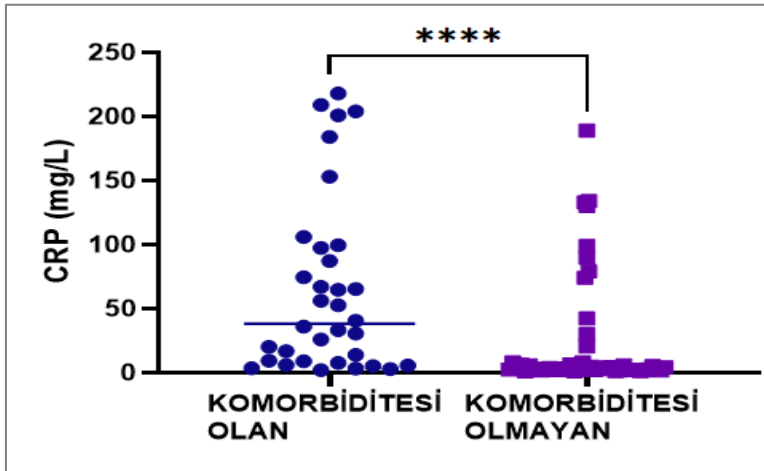


Şekil 4.22. Sağ kalıma göre laboratuvar bulgularından Ferritin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi

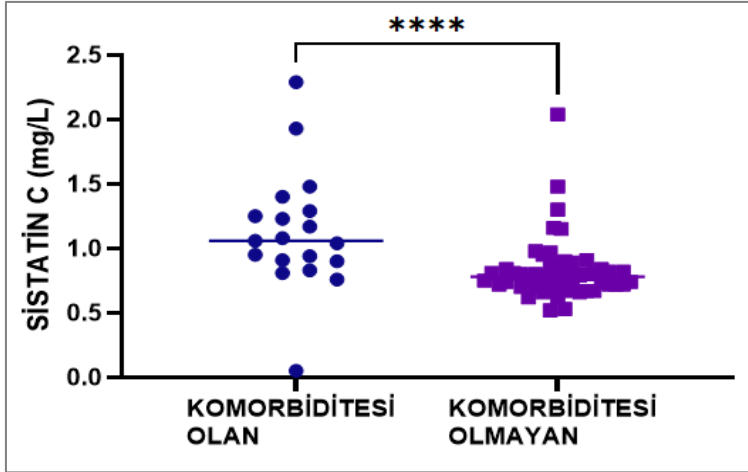




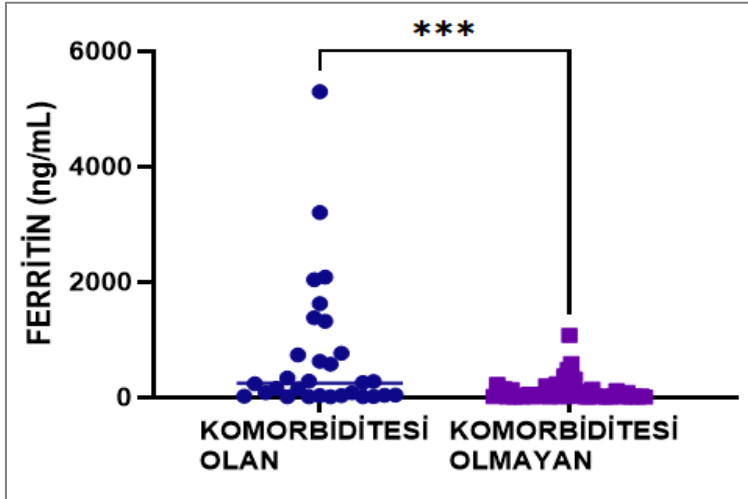
Şekil 4.22. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından D-Dimer yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



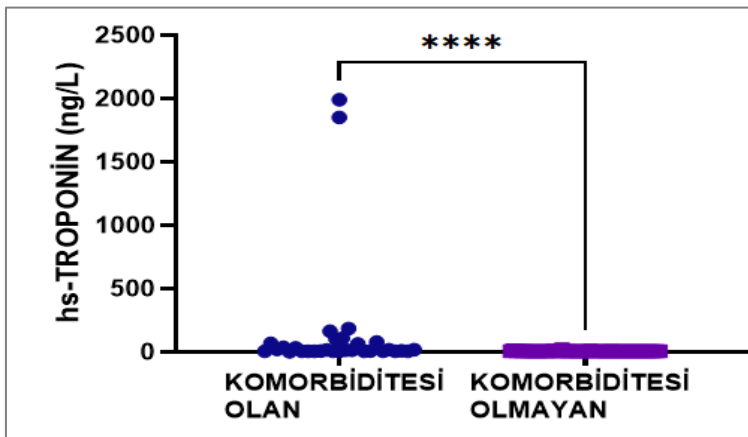
Şekil 4.23. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından CRP yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



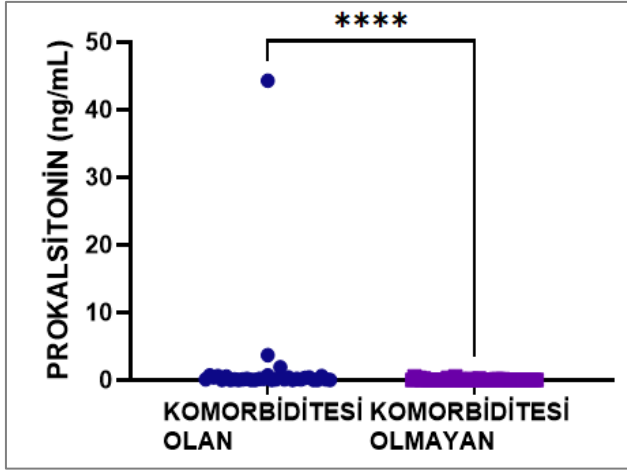
Şekil 4.24. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Systatin C yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



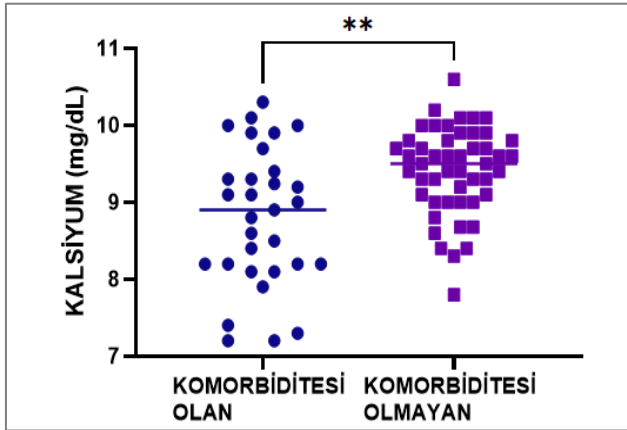
Şekil 4.25. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Ferritin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



Şekil 4.26. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Troponin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



Şekil 4.27. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Prokalsitonin yüksekliğinin anlamlılık ilişkisi



Şekil 4.28. Komorbiditeye göre laboratuvar bulgularından Kalsiyum düşüklüğünün anlamlılık ilişkisi

### 4.3. Apoptoz ve Otofaji Belirteçlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızın hipotezinde yer alan otofaji ve apoptoz belirteçlerinden Beclin-1'in (BECN-1) medyan değeri 40 ng/ml; Q1-Q3 değerleri 30-75 ng/ml, Survivin'in (SVN) medyan değeri 140 pg/L; Q1-Q3 değerleri 105-312 pg/L iken; HIF-1 $\alpha$  medyan değeri 50 pg/ml; Q1-Q3 değerleri 36-137 pg/ml, TGF- $\beta$ 1 medyan değeri 271 ng/ml; Q1-Q3 değerleri 210-617 ng/ml olarak bulunmuştur. Bu belirteçlerin tanı grubu, komorbidite ve sağ kalımla anlamlılık ilişkileri Çizelge 4. 5'te gösterilmiştir.

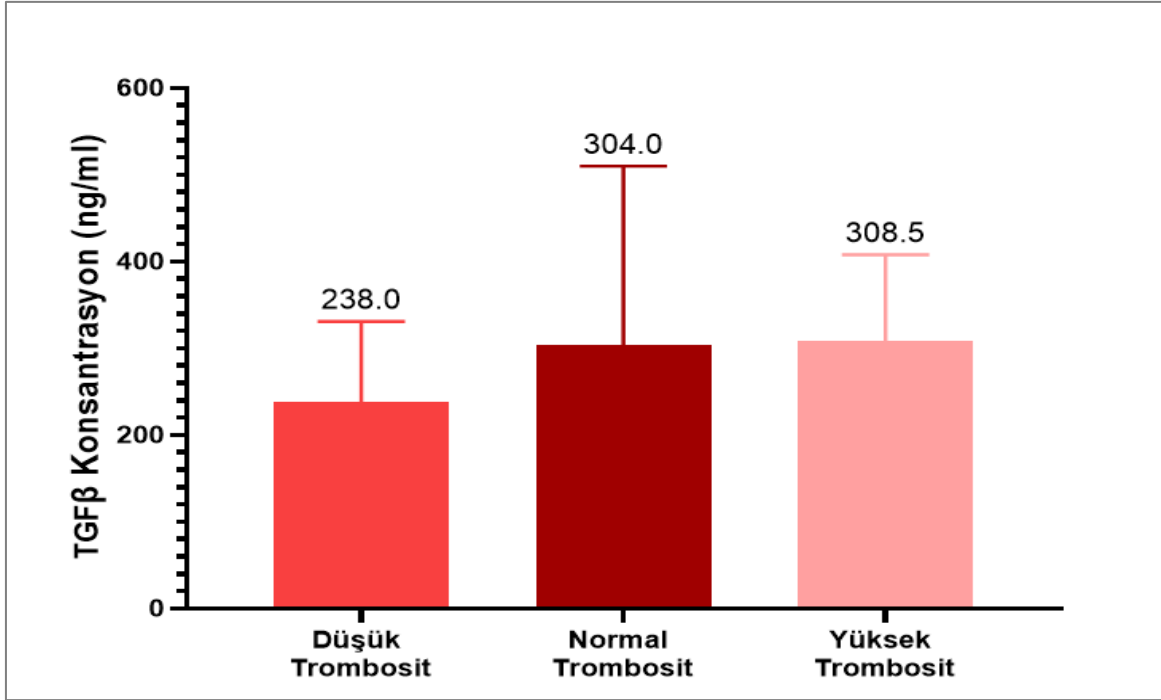
Çizelge 4.5. Tanı Grubu, Komorbidite ve sağ kalım hasta gruplarının apoptoz ve otofaji belirteçleri ile anlamlılık ilişkileri

	TANI GRUBU			KOMORBİDİTE (Ek hastalık) GRUBU			SAĞKALIM GRUBU		
	ASEMPTOMATİK (medyan)	PNÖMONİ (medyan)	p DEĞERİ	VAR (medyan)	YOK (medyan)	p DEĞERİ	EX (medyan)	SAĞ (medyan)	p DEĞERİ
Beclin-1 (BECN-1) (ng/ml)	51	34	0,014*	40	41	0,032*	34	40	0,185
Survivin (SVN) (pg/L)	173	121	0,004*	140	154	0,002*	107	140	0,069
HIF1α (pg/ml)	113	39	0,001*	50	52	0,033*	39	50	0,091
TGFβ1 (ng/ml)	408	234	0,000*	271	294	0,004*	238	271	0,221

\* p<0,05

Analiz sonuçlarına göre pnömoni gelişen hastalarda BECN-1 (p=0,014) ve SVN'nin (p=0,004) düzeylerinin asemptomatik hastalara göre düşüklüğü tespit edilmiş ve bu düşüklüğün anlamlı bir farkta olduğu görülmüştür (Şekil 4.33). Benzer düşüklükler HIF-1α ve TGF-β1 'de de bulunmuştur. Bu moleküllerin sağ kalımla anlamlı ilişkisi bulunmamışken; komorbiditesi olan hastalarda komorbiditesi olmayan hastalara göre düzeylerinde anlamlı düşüklükler görülmüştür. Komorbidite ve pnömoninin birlikte görüldüğü hastalarda BECN-1 (p=0,272), SVN (p=0,073), HIF-1α (p=0,156), TGF-β1 (p=0,126) düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Kan hücre profillerinin ve laboratuvar bulgularının, laboratuvar referans değerlerine göre gruplandığımız ve apoptotik, otofajik belirteçleri ile ilişkisini bulmaya çalıştığımız analiz sonuçlarımızdan laboratuvar bulgularıyla olan ilişki Çizelge 4.6'da sunulmuştur. Özellikle laboratuvar bulgularıyla ilişkiler saptanmıştır fakat aynı ilişki kan hücre profillerinde görülmemiştir. Ancak lenfosit düşüklüğü ile TGF-β1 arasındaki ilişki anlamlıdır. (p=0,024) Lenfosit düşüklüğünde, normal lenfosit düzeyine göre TGF-β1 yaklaşık 1,5 kat düşüktür. TGF-β1 düzeyinin hastaların trombosit sayılarıyla pozitif korelasyonu COVID-19 hastalarında gösterilse [332] de çalışmamızda trombosit sayısı ve TGF-β1 düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir (p=0,0932) (Şekil 4.32). Çalışmamızda nötrofil düzeyinin düşüklüğü ile HIF-1α arasında anlamlı ilişki bulunmaktadır (p<0,05). Nötrofil sayısı düşük hastalarda HIF-1α düzeyi de düşüktür. Eozinofil sayısı düşük hastalarda ise TGF-β1 (p=0,033) ve HIF-1α (p=0,044) düşüklüklerinin anlamlı olduğu saptanmıştır.



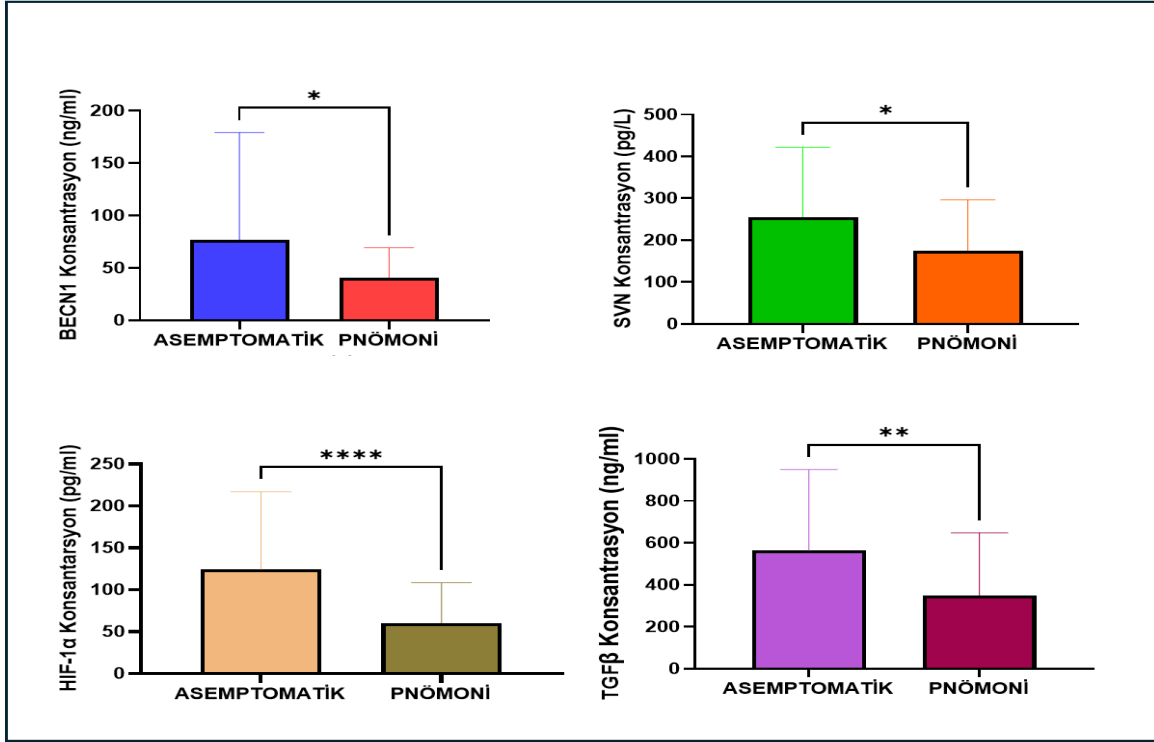
Şekil 4.29. Trombosit sayısı (medyan) ve TGF-β1 düzeyi arasındaki anlamlılık ilişkisi

Laboratuvar referans değerlerine göre gruplandırılan laboratuvar bulgularının BECN-1, SVN, HIF-1α ve TGF-β1 ile ilişkisine baktığımızda ise bu moleküllerin özellikle Fibrinojen, D-Dimer, CRP, Total Kompleman 4 (C4), CK, LDH, hs-Troponin, Prokalsitonin ve Kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) ile aralarında anlamlı ilişkiler görülmüştür (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Laboratuvar referans değerlerine göre gruplandırılan laboratuvar bulgularının BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 ile ilişkisi

		BEcn-1 (ng/ml) P değeri	Survivin (SVN) (pg/L) P değeri	HIF-1 $\alpha$ (pg/ml) P değeri	TGF $\beta$ 1(ng/ml) P değeri
FİBRİNOJEN	<200 mg/dL- DÜŞÜK	0,085	0,001*	0,000*	0,001*
	200-400 mg/dL- NORMAL				
	>400mg/dL- YÜKSEK				
D-DİMER	0-0,5 $\mu$ g/ml- NORMAL	0,041*	0,066	0,041*	0,097
	>0,5 $\mu$ g/ml- YÜKSEK				
CRP	0-5 mg/L- NORMAL	0,014*	0,000*	0,000*	0,001*
	>5 mg/L- YÜKSEK				
SİSTATİN C	<0,53 mg/L- DÜŞÜK	0,352	0,354	0,079	0,499
	0,53-1,01 mg/L- NORMAL				
	>1,01- YÜKSEK				
TOTAL C3	79-152 mg/dL- NORMAL	0,901	1,000	0,902	0,433
	<79 mg/dL- YÜKSEK				
TOTAL C4	<16 mg/dL- DÜŞÜK	0,413	0,051	0,035*	0,299
	16-38 mg/dL- NORMAL				
	>16 mg/dL- YÜKSEK				
CK	0-145 U/L- NORMAL	0,005*	0,694	0,355	0,764
	>145 U/L- YÜKSEK				
LDH	0-247 U/L- NORMAL	0,083	0,009*	0,000*	0,015*
	>247 U/L- YÜKSEK				
hs- TROPONİN	0-14 ng/L- NORMAL	0,018*	0,004*	0,003*	0,017*
	>14 ng/L- YÜKSEK				
PROKALSİTONİN	<0 ng/ml- DÜŞÜK	0,017*	0,000*	0,000*	0,006*
	0,1-0,5 ng/ml- NORMAL				
	>0,5 ng/ml- YÜKSEK				
KALSİYUM	< 8,8 mg/dL- DÜŞÜK	0,054*	0,012*	0,019*	0,018*
	8,8-10,6 mg/dL- NORMAL				
	>10,6 mg/dL- YÜKSEK				

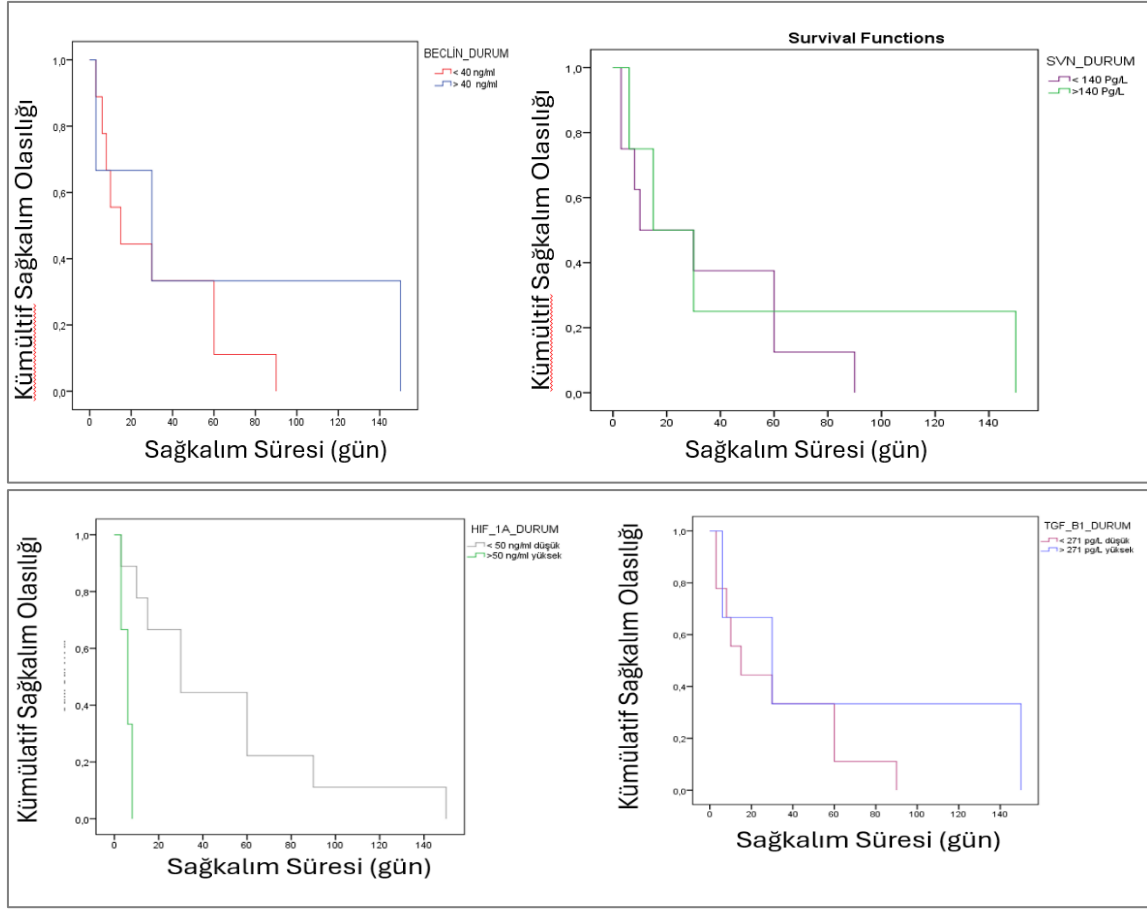
Çalışmamızın bulgularına göre, tanı gruplarında ve komorbidite gruplarında bulunan hastalarda BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 düzeylerindeki değişimlerin anlamlı olduğu fakat aynı anlamlılığın sağ kalım grubunda bulunmadığı saptanmıştır (Şekil 4.33).



Şekil 4.30. BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'in tanı grubuna göre anlamlılık ilişkisi

#### 4.4. BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$ ve TGF- $\beta$ 1'in Sağ kalıma etkisi

Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak yapılan sağ kalım analizinde çalışmamıza dahil edilen apoptoz inhibitörünün ve otofaji regülatörünün sağ kalıma etkisi %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. Değerlendirme için bu moleküllerin medyan değerleri temel alınarak istatistiksel anlamlılık aranmıştır. Çalışmaya dahil edilen moleküllerin sağ kalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.31. Kaplan-Meier Sağ kalım eğrileri

BECN-1'in medyan değerine (<40 ng/ml) göre değeri düşük olan hastaların %80'inde 90 gün sağ kalım görülürken, değeri medyan değerine göre yüksek olanların (>40 ng/ml) %93,3'ünde 150 gün sağ kalım tespit edilmiştir. Fakat aralarında istatistiksel anlamlılık bulunmamaktadır (Log Rank  $p=0,063$ ).

SVN'nin medyan değerine (<140 Pg/L) göre değeri düşük olan hastaların %13'ünde 60 gün sağ kalım görülürken, değeri medyan değerine göre yüksek olanların (>140 Pg/L) %25'inde 30 gün sağ kalım tespit edilmiştir. Fakat aralarında istatistiksel anlamlılık bulunmamaktadır (Log Rank  $p=0,557$ ).

#### 4.5. Risk Faktörleri

Tanı grubu, sağ kalım ve komorbidite temel alınarak yaptığımız gruplandırmalarda kan hücre profiline ve laboratuvar bulgularına çalışmamıza dahil ettiğimiz moleküllerin lojistik regresyon analizleri yapılarak risk faktörleri belirlenmiştir. Tüm lojistik regresyon

analizlerinde uyum iyiliği (Hosmer Lemeshow testi) 0,05'ten büyük bulunmuştur. Bu durum hipotezimizle ortaya çıkan istatistiksel sonuçların uyumunu göstermektedir. Asemptomatik ve pnömoni hastalarında, komorbiditesi olan ve olmayan hastalarda, mortalite görülen ve görülmeyen hastalarda çalışmamıza dahil edilen bu dört molekül bağımsız risk faktörü olarak saptanmamıştır. Benzer sonuç kan hücre profillerinde de görülmüş olup; CRP (OR: 0,05;  $p<0,05$ ), Troponin (OR: 0,01;  $p<0,05$ ) ve Prokalsitonin (OR: 0,29;  $p<0,05$ ) yüksekliğinde TGF- $\beta$ 1; CK yüksekliğinde ise BECN-1 (OR: 6,89;  $p<0,05$ ) bağımsız risk faktörü olarak saptanmıştır. Risk faktör analiz sonuçları Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Gruplarda ve laboratuvar bulgularında lojistik regresyon analizi ile BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'nin risk faktörleri

	BECN1						SVN						HIF-1 $\alpha$						TGF- $\beta$					
	B	WALD	p	OR (exP(B))	95%CI LOW	UP	B	WALD	p	OR (exP(B))	95%CI LOW	UP	B	WALD	p	OR (exP(B))	95%CI LOW	UP	B	WALD	p	OR (exP(B))	95%CI LOW	UP
<b>Tamı Grubu</b>	0,88	2,50	0,11	2,41	0,81	7,19	1,44	2,61	0,10	4,24	0,73	24,46	-0,68	0,61	0,26	0,50	0,15	1,69	-1,72	3,83	<b>0,05</b>	0,17	0,03	1,0
<b>Komorbidite</b>	0,27	0,25	0,61	1,32	0,44	3,94	-0,53	0,59	0,43	0,58	0,15	2,25	0,21	0,1	0,75	1,23	0,33	4,56	-1,18	0,79	0,13	0,30	0,65	1,45
<b>Sağ Kalın</b>	-0,96	1,32	0,25	0,38	0,07	1,97	-0,80	0,62	0,42	0,44	0,06	3,28	0,62	0,44	0,50	1,86	0,30	11,54	1,02	0,78	0,37	2,77	0,29	26,59
<b>Lenfopeni</b>	0,51	0,70	0,40	1,66	0,50	5,48	-0,42	0,78	0,58	0,65	0,14	3,04	-0,39	0,31	0,57	0,67	0,16	2,68	1,99	4,29	0,38	7,35	1,11	48,47
<b>Nötropeni</b>	-0,27	0,57	0,81	0,75	0,77	7,40	-0,33	1,49	0,82	0,71	0,38	13,53	1,85	1,36	0,17	6,39	0,44	91,91	-0,32	1,45	0,82	0,72	0,42	12,45
<b>Fibrinojen</b> ↑	0,17	0,54	0,81	1,18	0,28	5,0	0,45	0,23	0,62	1,58	0,24	10,14	-0,71	0,94	0,33	0,49	0,11	2,05	-2,02	4,18	0,41	0,13	0,19	0,91
<b>D-Dimer</b> ↑	1,04	2,68	0,10	2,82	0,81	9,80	1,05	1,64	0,20	2,85	0,57	14,25	-0,13	0,04	0,84	0,87	0,24	3,16	-1,12	2,13	0,14	0,29	0,05	1,52
<b>CRP</b> ↑	0,59	0,00	0,93	1,06	0,28	3,92	0,47	0,29	0,58	1,60	0,29	8,76	0,48	0,00	0,94	1,04	0,24	4,46	-2,93	8,65	<b>0,00</b>	0,05	0,00	0,37
<b>FERRİTİN</b> ↑	0,25	0,11	0,73	1,28	0,29	5,53	1,35	1,94	0,16	3,89	0,57	26,21	1,91	2,62	0,10	6,78	0,67	68,65	1,91	2,62	0,12	0,02	0,00	0,45
<b>CK</b> ↑	1,93	6,92	<b>0,00</b>	6,89	1,63	29,01	0,31	0,12	0,71	1,36	0,24	7,49	0,57	0,54	0,45	1,71	0,39	8,04	-0,27	0,90	0,76	0,76	0,12	4,53
<b>LDH</b> ↑	-0,50	0,65	0,41	0,60	0,18	2,03	0,39	0,27	0,59	1,48	0,33	6,57	-0,36	0,30	0,58	0,69	0,19	2,53	-1,56	3,33	0,68	0,20	0,03	1,12
<b>TROPONİN</b> ↑	1,05	1,96	0,16	2,88	0,65	12,68	0,79	0,69	0,40	2,21	0,34	14,42	0,51	0,00	0,94	1,05	0,22	4,59	-2,24	4,29	<b>0,03</b>	0,10	0,01	0,88
<b>PROKLASİTONİN</b> ↑	-0,70	0,71	0,39	0,49	0,09	2,54	0,83	0,55	0,45	2,31	0,25	21,05	0,00	0,00	1,00	1,00	0,18	5,56	-3,55	7,25	<b>0,00</b>	0,29	0,00	0,38
<b>HİPOKALSEMİ</b>	0,20	0,10	0,74	1,23	0,35	4,22	0,76	0,00	0,92	1,07	0,22	5,24	-0,69	0,96	0,32	0,49	0,12	2,01	-0,86	0,98	0,32	0,42	0,07	2,32

İkili ilişkiler ise Spearman's korelasyon analizi ile belirlenmiştir ve korelasyon katsayılarının anlamı Dancey ve Reidy (2004)' ye göre belirlenmiştir [403]. Yaptığımız analize göre BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'in; D-Dimer, Fibrinojen, Prokalsitonin, CRP, Total C4, CK, LDH, Troponin düşüklüğü ile negatif korelasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca bu moleküllerle negatif korelasyon, tanı tipine göre gruplandırdığımız hasta gruplarında da görülmüştür. Pozitif korelasyon ise bu moleküllerle Ca<sup>2+</sup> düşüklüğü (hipokalsemi) arasında gözlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'in laboratuvar bulgularıyla korelasyon analizi

	<b>BECN-1 (ng/ml)</b> <b>(<math>\rho</math>) P değeri</b>	<b>SVN (pg/L)</b> <b>(<math>\rho</math>) P değeri</b>	<b>HIF-1<math>\alpha</math> (pg/ml)</b> <b>(<math>\rho</math>) P değeri</b>	<b>TGF<math>\beta</math>1(ng/ml)</b> <b>(<math>\rho</math>) P değeri</b>
<b>FİBRİNOJEN</b>	-----	<b>-0,386 0,001</b>	<b>-0,379 0,001</b>	<b>-0,435 0,000</b>
<b>D-DİMER</b>	<b>-0,229 0,041</b>	-----	<b>-0,229 0,041</b>	-----
<b>CRP</b>	<b>-0,282 0,013</b>	<b>-0,446 0,000</b>	<b>- 0,343 0,000</b>	<b>0,549 0,001</b>
<b>TOTAL C4</b>	-----	-----	<b>-0,240 0,035</b>	-----
<b>CK</b>	<b>-0,361 0,005</b>	-----	-----	-----
<b>LDH</b>	-----	<b>-0,282 0,008</b>	<b>- 0,263 0,000</b>	<b>-0,394 0,000</b>
<b>hs- TROPONİN</b>	<b>-0,182 0,018</b>	<b>-0,242 0,002</b>	<b>-0,274 0,011</b>	<b>-0,277 0,012</b>
<b>PROKALSİTONİN</b>	<b>-0,282 0,017</b>	<b>-0,446 0,000</b>	<b>- 0,343 0,004</b>	<b>-0,549 0,006</b>
<b>KALSİYUM</b>	<b>0,186 0,054</b>	<b>0,255 0,012</b>	<b>0,301 0,005</b>	<b>0,368 0,018</b>

( $\rho$ ): rho



## 5. TARTIŞMA

2019 yılından bu yana acil sağlık sorunu ilan edilen COVID -19 pandemisi yaklaşık 800 milyon insanı etkilemiştir. Virüse maruz kalanların kimisi hastalığı hiç semptom göstermeden atlatırken; kimisi ateş, miyalji, tat ve koku kaybının görüldüğü orta şiddette atlatmaktadır. Ağır seyreden hastalarda ARDS'ye giden tablolarla karşılaşmıştır. Bildirilen vakaların arasında 7 milyondan fazla mortalite görülmüştür. Sars-Cov ve Mers-Cov enfeksiyonlarına göre yüksek bulaştırıcılık oranına sahip Sars-Cov2 virüsünün neden olduğu enfeksiyon global hal almıştır. Çin'in Wuhan kentinden bildirilen ilk vakalarda pnömoni öne çıkmıştır. Vaka sayılarının artmasıyla da enfeksiyonun özellikle virüsün hücreye giriş anahtarı olan ACE2 reseptörünü ekspresye etme oranının yüksek olduğu akciğer hücrelerinde önemli olduğu ortaya konmuştur. Sars-Cov2 virüsü makrofajlar, lenfositler, nötrofiller başta olmak üzere immün hücreleri dışında; beyin, böbrek, kalp, karaciğer, merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem hücrelerini de etkilemektedir. Bu nedenle de virüsün çoklu organ yetmezlik etkeni olduğu düşünülmektedir. Sars-Cov2 virüsü immün disregülasyonla giden enfeksiyona neden olmaktadır. İmmün sistem üzerinde yarattığı bu disregülasyon, özellikle sitokin fırtınası aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Sars-Cov2 tek sarmallı RNA virüsüdür. Virüse ait spike proteini sayesinde ACE2 ile interaksiyon kuran virüs, endositozla konak hücresi içine alınır. Genetik materyalini konak hücresi sitoplomasına bırakan virüs için replikasyon ve viral proteinlerin üretimi başlamaktadır. Üretilen proteinler Endoplazmik Retikulum-Golgi ara kompartmanına (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)) gönderilerek virüs partikülü birleştirilmekte ve endozomal kese içinde hücre yüzeyine taşınarak yeni oluşan virüs partikülleri hücreden uzaklaşmaktadır. Kendini çoğaltmak için çeşitli stratejiler kullanan virüs; immün sistem hücre, molekül ve yolaklarını etkilemektedir. Virüsün hem evazyon hem de kendini çoğaltma, hayatta kalma stratejilerini içeren bilgiler her geçen gün ortaya çıkmaktadır. Öyle ki DSÖ'nün 2019 yılının Mart ayında pandemi ilan etmesinden 6 ay sonra COVID-19 hastalığı ve Sars-Cov2 virüsü ile ilişkili Web of Science ve Scopus'ta 23.634 makalenin indekslendiği gösterilmiştir. Bu sayı 2021 Şubat'ında 87 000'e çıkmıştır [338]. Yayınlar arasında Sars-Cov2 ve hücre ölümleri ilgi çekmektedir. Hücre ölüm yolaklarının, COVID-19 hastalığı sürecinde iki yönlü (korunma-hasar görme) davrandığı düşünülmektedir. Bu yolaklardan özellikle apoptoz, piroptoz ve nekroptoz ve de otofajik ölüm COVID-19 hastalığında araştırma

konusu olmuşlardır. Birlikte ele alındığında, Sars-Cov2 çeşitli mekanizmalar yoluyla hücre apopitozunu ve otofajisini düzenleyebilir. Apopitoz ve otofajinin iki ucu keskin bir kılıç olduğu sonucuna varmak zor değildir. Bu iki hücre süreci mekanizmaları bir yandan, replikatif araçlardaki azalma yoluyla virüslerin yayılmasını doğrudan önleyebilirken; öte yandan doku yıkımına, virüs yayılımına, sitokin fırtınasına ve yetersiz bağışıklık tepkisine yol açabilirler. Sars-Cov2, enfeksiyonun farklı zamanlarında apopitoz ve otofajiyi kendine hizmet edecek şekilde ustaca manipüle edebilir. Bu nedenle, apopitoz ve otofajinin ne zaman inhibe edileceğine veya uyarılacağına hastaların tedavisi esnasında dikkatle karar verilmelidir. Bu yolları hedefleyen inhibitörler ve agonistlerin yardımıyla, daha ileri araştırmalarla Sars-Cov2 enfeksiyonunun bilinmeyenleri aydınlatılabilir. Buna ek olarak, tek hücre sekanslama, proteomik ve metabolomik ve uzamsal omik gibi yüksek verimli yöntemler, COVID-19'daki yeni yolların ve farklı hücre ölümü ve otofaji yolları arasındaki karşılıklı iletişiminin keşfini kolaylaştırabilir. Çünkü Sars-Cov2 varyantları nedeniyle değişen stratejiler ile hücre ölümü ve otofaji yolları arasındaki ilişkiyi anlamak için daha hassas gözlemlere ihtiyaç vardır. Hücre ölümü ve otofajinin önemli rolleri göz önüne alındığında, çeşitli terapötik stratejiler araştırılmış ve klinik çalışmalarda uygulamaya konulmuştur, ancak sonuçlar halen tartışılmaktadır.

Çalışmamızda apopitoz ve otofajinin COVID-19 hastalığında karşılıklı etkileşimi ile ilgili bilgilere katkı sağlayacağını düşündüğümüz otofajik yolağın önemli elemanı BECN-1 ve apopitoz inhibitörü SVN yer almaktadır. Ayrıca bu iki moleküle katkısı olduğunu düşündüğümüz hipoksi koşullarında sentezi artan ve COVID-19 hastalığının şiddetiyle daha önceki çalışmalarda ilişkilendirilmiş HIF-1 $\alpha$  ve yine COVID-19 hastalığında önemli bir biyobelirteç olduğu gösterilen [332] ve önemli bir immünomodülatör molekül olan TGF- $\beta$ 1 çalışmaya dahil edilmiştir. Araştırmamıza dahil edilen hasta grupları ise asemptomatik ve pnömonisi olan hastalardır. Bu hastaların demografik bilgileri, klinik bilgileri, laboratuvar bulguları hem kendi aralarında karşılaştırılmış hem de çalıştığımız bu dört molekülün bu bilgilere katkıları istatistiksel hesaplamalarla araştırılmıştır.

Aslında hastalarda ilk disregülasyon, kan hücre sayılarında ortaya çıkan değişikliklerdir. Lenfopeni çoğu hastada belirgin bir bulgu iken, bazı çalışmalarda nötrofil sayısında artış da bildirilmiştir. Özellikle, toplam lökosit sayısı, hastalar

arasında farklılık göstermekte iken; lenfopeni veya nötrofilinin baskınlığı önemlidir. Birlikte ele alındığında, hafif trombositopeniye eşlik eden azalmış lenfositler, COVID-19 hastalarının tam kan sayımında dikkat çeken en yaygın anormal bulgular arasındadır. Hastalarda lökositoz, lenfopeni yanında nötrofil/lenfosit oranının artışı da görülmektedir [65]. Bu ilk bulgular COVID-19 ile ilgili çalışmaların hem hücre hem de moleküler düzeyde yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Qin ve arkadaşlarının 452 COVID-19 hastasıyla yaptığı çalışmanın 286'sını ciddi olgular oluşturmuştur. Ciddi olgularda yüksek lökosit sayısı, düşük lenfosit sayısı ve yüksek nötrofil-lenfosit oranı görülmüştür [339]. 41 hastanın dahil edildiği bir çalışmada ise yoğun bakım ihtiyacı olan, mortalite görülen ağır seyirli COVID-19 hastalarında lenfopeninin ve nötrofilinin karakteristik olduğu bildirilmiştir [53]. 85 COVID-19 mortalitesi görülen hastaların analizinde; %77,6'sında lenfopeni, %41'inde ise trombopeni gözlenmiştir [340]. COVID-19 hastalarında eozinofilinin görülmesi hastaneye yatış ihtiyacının ortaya çıkması arasında korelasyon vardır [341,342]. Eozinofili gelişen olguların %82'sinde mortalitenin görüldüğü bildirilmiştir [342]. Lucas ve arkadaşlarının artan monosit, düşük dansiteli nötrofil (LDN) ve eozinofilinin hastalığın şiddetiyle ilişkisini göstermişlerdir [343]. Başka bir çalışma ise bazofil ve eozinofil düzeylerindeki artışın, hastalığın şiddetiyle ilişkisini ve hatta iki hücre grubunun hastalığın ağır seyri boyunca baskın hücreler olduğunu ve immünopatolojiye katkıları olabileceğini bildirmiştir [344]. Akciğerde infiltrate olmuş hücre grubu özellikle monositler ve makrofajlardır. COVID-19 hasta akciğer otopsi çalışmalarında monositlerin, makrofajların yaygın alveolar hasarla ilişkisi gösterilmiş hatta çok çekirdekli dev hücrelerin de varlığı bildirilmiştir [39]. Monosit regülasyonunda ve göçünde sorumlu TNF, İL-6 ve CCL2, COVID-19 hastalarının plazmalarında sağlıklı kontrollere göre yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir [345]. Giamarellus-Bourboulis ve arkadaşları ağır seyirli COVID-19 vakalarında immün pertürbasyonunu 2 gruba ayırmıştır. İlk grupta İL-6 tarafından ortaya çıkan immün disregülasyon; diğerinde ise İL-1 $\beta$  ile ortaya çıkan immün disregülasyondur. Yüksek İL-6 düzeyi, CD14+ monositleri azaltmakta, CD4+ T hücre lenfopenisine neden olmaktadır [346]. Çalışmamıza dahil edilen hastalar arasında tanı grubuna göre yaptığımız analizde hücre grubu olarak sadece lenfosit sayısının ( $p<0,05$ ) ve nötrofil/lenfosit oranının ( $p<0,05$ ), eozinofil ( $p<0,05$ ) ve bazofil hücre sayısının ( $p<0,05$ ) anlamlı bir şekilde öne çıktığını gördük. Lenfosit sayısı asemptomatik bireylerde yüksek iken; nötrofil/lenfosit oranının yüksekliği pnömoni gelişen hasta gruplarındaydı. Bu yükseklik yaklaşık 2 kattı. Pnömoni gelişen hastalarda eozinofil ve

bazofil hücre sayısı asemptomatik bireylere göre düşüktü. Lenfosit sayısı ve nötrofil/lenfosit oranı sağ kalım grubunda, tanı grubu sonuçlarıyla benzerdi. Sağ kalım grubunda eozinofil ve bazofil hücre sayıları arasında fark yoktu. Komorbiditesi olan ve olmayan hasta gruplandırmasında da benzer sonuçlar görülürken; eozinofil ve bazofil hücre sayılarında anlamlı fark olmadığı, sadece monosit hücre sayısında anlamlı farklılık olduğu görüldü. Komorbiditesi olan hastalarda olmayanlara göre monosit hücre sayısında yaklaşık 1,5 kat yükseklik vardı. BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TFG- $\beta$ 1'in hücre grubuyla ilişkilerine baktığımızda sadece TFG- $\beta$ 1'in lenfosit sayısının ( $p=0,024$ ) ve eozinofil sayısının düşüklüğü ( $p=0,033$ ) ile anlamlı ilişkisi görüldü.

Yayımlanan araştırmalarda COVID-19'un klinik özelliklerini ve görüntüleme bulgularının yanında anormal laboratuvar bulgularının tanısal ve prognostik değeri de oldukça önemlidir. COVID-19 hastaları için istenen başlıca rutin testler arasında tam kan sayımı, koagülasyon ve fibrinolizis kaskadlarını (PT, aPTT ve D-Dimerler) ve inflamasyonla ilgili parametreleri (ESR, CRP, Ferritin ve Prokalsitonin) araştıran testler yer almaktadır. Virüsün kalp, karaciğer ve böbrekler gibi birçok hayati organı ciddi şekilde bozma potansiyeli nedeniyle, biyokimyasal faktörlerin analiz edilmesi, klinisyenlerin bu organların işlevsel faaliyetlerini değerlendirmeleri için uygun bir yoldur. COVID-19 hastalarında yüksek Protrombin (PT) ve D-Dimer değerleri daha kötü bir prognozun göstergesi olabilmektedir. Tang ve arkadaşları mortalite görülen COVID-19 hastaları ile sağ kalım gösterenler arasında yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC) açısından koagülopati görülme oranında anlamlı bir fark olduğunu bildirmiştir (%71,4'e karşı %0,6) [347]. Bir meta-analiz sonuçları ise PT ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) ortalamalarının ağır seyirli hastalarda daha yüksek olduğunu ortaya koysa da, ortalama değerleri ağır seyretmeyen hastalara kıyasla yüksekliklerinin anlamlı olmadığını ortaya koymuştur [348]. Bu bilgilerle benzer olarak çalışmamızda tanı gruplarına göre ( $p=0,158$ ) ve komorbidite durumuna göre ( $p=0,598$ ) gruplandırdığımız hastalarımızda aPTT düzeyinin anlamlı fark göstermediği; sadece sağ kalımda anlamlı fark ( $p=0,007$ ) gösterdiği bulunmuştur. Mortalite görülen hastalarda görülmeyenlere oranla yaklaşık 1,2 kat artmış aPTT görülmüştür.

Öte yandan, ağır seyirli COVID-19 hastalarında D-Dimerin ortalama değeri ağır olmayan hastalardan anlamlı derecede yüksektir ve bu da D-Dimerin yükselmesinin

hastalığın olumsuz bir klinik tabloya doğru ilerlemesini göstermektedir [12]. COVID-19'da kötü prognozu öngörmek için D-Dimerin cutoff değeri 0,4 µg/mL olarak önerilmektedir [347]. Çalışmamızın D-Dimer medyan değeri 0,32 µg/ml'dir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastalardan oluşturulan gruplar arasında D-Dimer düzeyinin pnömoni görülen ( $p<0,05$ ), komorbiditesi olan ( $p<0,05$ ) ve mortalite görülen ( $p<0,05$ ) hastalarda anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. HIF-1 $\alpha$  ve otofaji belirteci olan BECN-1 ile aralarında anlamlı ilişki görülmüştür. D-Dimer düzeyinin artışıyla, BECN-1 (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,229) ve HIF-1 $\alpha$  (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,229) zayıf korelasyon göstermektedir. Özetle çalışmamızda D-Dimer düzeyi arttıkça, BECN-1 ve HIF-1 $\alpha$  düzeyinin düştüğü tespit edilmiştir. Buradan D-Dimer yüksekliğinin kötü prognoz etkisine BECN-1 ve HIF-1 $\alpha$  düzeyinin düşüklüğünün eşlik ettiğini söyleyebiliriz. Hipotezimizde de belirttiğimiz gibi bu sonuçlara dayanarak otofajik ve anti-apoptotik belirteçlerin düşüklüğü COVID-19 hastalığının ağır seyrine etki edebilmektedir.

Çok sayıda çalışma COVID-19 hastalarında dolaşımdaki Fibrinojen düzeylerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir [349]. Fibrinojen düzeylerini inceleyen 35 çalışmanın meta-analizi, ağır seyirli COVID-19 hastalarında ağır seyirli olmayan hastalara göre dolaşımdaki Fibrinojenin önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur [350,351]. Ayrıca, çalışmalar dolaşımdaki Fibrinojen düzeyi ile COVID-19'dan kaynaklanan trombotik komplikasyonların genel insidansı arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif bir ilişki tespit etmiştir. Bu ilişkinin bir örneği, ekstrakorporeal membran oksijenasyonu (ECMO) gerektiren COVID-19 akciğer hastalığı olan hastalardır. Bu hastalarda ECMO kullanan COVID-19 olmayan hastalara kıyasla çok daha yüksek oranda venöz tromboembolik olaylar gelişmektedir [352,353]. COVID-19 hastalarında, dolaşımdaki yüksek Fibrinojen muhtemelen sadece tromboz riskinin bir biyobelirteci değil, aynı zamanda tromboembolik olaylara katkıda bulunan önemli bir faktördür. Çalışmamızda tüm hastaların Fibrinojen medyan değeri 342,5 mg/dL'dir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastalardan oluşturulan gruplar arasında Fibrinojen düzeyinin pnömoni görülen ( $p<0,05$ ) ve mortalite görülen ( $p<0,05$ ) hastalarda anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. HIF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 ve apoptoz inhibitör belirteci olan SVN ile aralarında anlamlı ilişki görülmüştür. Fibrinojen düzeyi arttıkça; SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 düzeyinin düştüğü tespit edilmiştir. Buradan Fibrinojen yüksekliğinin kötü prognoza etkisine; SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 düzeyinin düşüklüğünün eşlik ettiğini söyleyebiliriz.

Fakat bu moleküller lojistik regresyon analizine göre Fibrinojen yüksekliği için bağımsız risk faktörü değildirler (Çizelge 7). Fibrinojen düzeyinin artışıyla, SVN (spearman's rho (p): -0,386), HIF-1 $\alpha$  (spearman's rho (p):-0,379) orta dereceli korelasyon, TFG- $\beta$ 1 ise (spearman's rho (p): -0,435) güçlü korelasyon göstermektedir. Hipotezimizde de belirttiğimiz gibi bu sonuçlara dayanarak apopitotik inhibitör belirteçlerinin düşüklüğü, COVID-19 hastalığında, apopitozun tetiklenerek hastalığın ağır seyretmesine bunun yanısıra asemptomatik bireylerde apopitotik inhibitör belirtecinin yüksek olmasının kötü prognoz belirteçlerinin yükselmesine engel olduğu düşünülebilir.

Eritrosit sedimantasyon hızı (ESR), C-reaktif protein (CRP) ve Prokalsitonin COVID19 hastalarının serumlarında farklı değerlerde de olsa artmaktadır. 13 ağır seyirli COVID-19 hastasının sonuçlarını bildiren bir çalışmada, artmış Prokalsitonin değerleri YBÜ (yoğun bakım nitesi) hastalarında YBÜ ihtiyacı olmayan hastalara kıyasla sırasıyla %25 ve %0 olarak bulunmuştur [12]. Çalışmamıza dahil ettiğimiz tüm hastalarda medyan Prokalsitonin düzeyi 0,03 mg/dL'dir. Prokalsitonin düzeyinin çalışmamızın tüm hasta gruplarıyla anlamlı ilişkisi görülmüştür. Pnömonisi olan, mortalite görülen ve komorbiditesi olan hastalarda Prokalsitonin anlamlı artış göstermiştir. Çalışmamız moleküllerinden hepsiyle anlamlı ilişkisi olan Prokalsitoninin düzeyi arttıkça BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TFG- $\beta$ 1'in düzeyleri düşmüştür. Bu bağlamda kötü prognoz belirteci Prokalsitoninin çalışmamıza dahil ettiğimiz moleküllerle negatif korelasyonu görülmektedir. Prokalsitoninin düzeyinin artışıyla, BECN-1 zayıf korelasyon (spearman's rho (p): -0,282) gösterirken; HIF-1 $\alpha$  (spearman's rho (p):- 0,343) orta dereceli korelasyon, SVN (spearman's rho (p): -0,446) ve TFG- $\beta$ 1(spearman's rho (p): -0,549) ise güçlü korelasyon göstermektedir.

CRP'nin tanısal değeri Prokalsitoninden daha üstündür ve CRP'nin hastalığın ilerlemesini öngörmede potansiyel olarak daha değerli olabileceğini belirtmek gerekir [354]. Çalışmamıza dahil ettiğimiz tüm hastalarda medyan CRP düzeyi 6,1 mg/L'dir. CRP düzeyinin çalışmamızın tüm hasta gruplarıyla anlamlı ilişkisi görülmüştür. Pnömonisi olan, mortalite görülen ve komorbiditesi olan hastalarda CRP düzeyinin artışı anlamlıdır. Çalışmamız moleküllerinden hepsiyle anlamlı ilişkisi olan CRP düzeyi arttıkça; BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TFG- $\beta$ 1'in düzeyleri düşmüştür. Bu bağlamda COVID-19'un ağır seyri ve gelişimi açısından önemli bir işaret olabileceği

düşünülen CRP düzeyinin, çalışmamıza dahil ettiğimiz moleküllerle negatif korelasyonu görülmektedir. CRP düzeyinin artışıyla, BECN-1 zayıf korelasyon (spearman's rho ( $\rho$ ): 0,216) gösterirken; SVN (spearman's rho ( $\rho$ ): 0,302) ve HIF-1 $\alpha$  (spearman's rho ( $\rho$ ): 0,387) orta dereceli, TFG- $\beta$ 1 (spearman's rho ( $\rho$ ): 0,435) ise güçlü korelasyon göstermektedir.

Ferritin sentezi, “reaktif oksijen türleri (ROS)” tarafından düzenlenir. Bir “akut faz reaktanı” olan serum Ferritini, vücuttaki hem kronik hem de akut inflamatuvar sürecin derecesini yansıtır. Ancak hiperferritineminin inflamasyonun bir sonucu mu yoksa aracısı mı olduğu konusunda belirsizlik vardır [355,356]. Yüksek Ferritin düzeyi, aktive olmuş bir monosit-makrofaj sistemine işaret eder. Monositler ve makrofajlarda Ferritin sentezi, hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde sitokin durumundaki değişikliklere duyarlıdır [355]. Ferritinin ağır zinciri, makrofajın immün uyarılara (örneğin sitokin profili) verdiği yanıtları modüle eder ve M1-M2 polarizasyonu teşvik eder [357]. Ferritin ve lenfosit fonksiyonu arasında doğrudan etkileşim de bilinmektedir [356]. COVID-19 hastalığında ortaya çıkan sitokin fırtınasının, immün hücrelerin disregülasyonlarının Ferritin artışına neden olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda 54 COVID-19 hastasının dahil edildiği bir çalışmada, 49 hastada (%90,7) referans aralığının üst sınırının üzerinde Ferritin düzeyleri tespit edilmiş ve hs-CRP düştükçe Ferritin düzeylerinin de düştüğü, ancak hs-CRP normale döndükten sonra en az 5 gün boyunca üst referans aralığından önemli ölçüde yüksekliğin devam ettiği gösterilmiştir [348]. Ferritin ölçümünün bu nedenle COVID-19'da tanısız amaçlarla kullanılabileceği düşünülmektedir [358]. Bu doğrultuda, hemodiyaliz hastalarında Ferritin tarandığı bir başka çalışmanın sonuçları ise COVID-19 hastalarının viral enfeksiyondan sonra Ferritin düzeylerinin arttığını ortaya koymuştur [348]. Çoğu COVID-19 hastasında hastalık dönemi boyunca Ferritin düzeyinin sabit kaldığı veya yavaşça azaldığı da gösterilmiştir [348]. Çalışmamıza dahil ettiğimiz tüm hastalarda medyan Ferritin düzeyi 58 ng/ml'dir. Ferritin düzeyinin çalışmamızın tüm hasta gruplarıyla anlamlı ilişkisi görülmüştür. Pnömonisi olan, mortalite görülen ve komorbiditesi olan hastalarda Ferritin anlamlı artış göstermiştir. Fakat çalışmamızın moleküllerinin hepsi ile ferritin düzeyinin aralarında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Ferroptozun otofaji ile ilişkili olmadığı gösterilse de, ferroptotik yanıtta artan otofaji yaygın olarak gözlenmektedir [359]. Otofaji, hücreleri çevresel stresten korumada adaptif bir rol oynarken, birçok durumda ferroptozu teşvik

edebilmektedir [360]. BECN-1, rapamisin kinazın mekanik hedefi (MTOR) ve bir lizozomal proteaz olan katepsin B (CTSB) gibi otofaji düzenleyicileri, lipid peroksidasyonunu etkileyerek ferroptotik hücre ölümüne katkıda bulunur [361,362]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, apoptoz ve otofaji karşılıklı iletişimde rolü olabileceğini düşündüğümüz moleküllerle Ferritin düzeyi arasında anlamlı ilişkisi gösterilememiştir.

Sars-Cov2 virüsü, merkezi kompleman proteini olan C3'ün proteolitik bölünmesinde rol alan üç farklı kompleman aktivasyon yolağının hepsini tetikleyebilir [363]. C3 aracılı yollar, COVID-19 patolojisini şiddetlendirmektedir [364]. Ayrıca, COVID-19 ile hastaneye yatış ihtiyacı duyan hastalarda sistemik kompleman aktivasyonu görülmekte, C3 ve C5'in yüksek düzeyi her zaman daha kötü prognoz ve hastalık şiddeti ile ilişkilendirilmektedir [364]. COVID-19'da kompleman sisteminin hiperaktivasyonu, nötrofil kaynaklı immünotromboz, endotel hücre hasarı; kan-organ disfonksiyonuna yol açan anormal inflamatuvar yanıt ve ARDS'ye neden olabilmektedir [363]. Başka bir çalışmada ise ilginç olarak COVID-19'un hafif seyrettiği hastalarda daha yüksek C3 ve C4 kompleman düzeyleri görülürken; hastalığın şiddetli seyredenlerinde daha düşük düzeylerde oldukları gösterilmiştir [365]. Bu durumu araştırmacılar, immün komplekslerin oluşumuna bağlı olarak kompleman tüketiminin ortaya çıktığını söyleyerek açıklamaktadırlar. Bu bağlamda çalışmamızda medyan Total C3 ve medyan Total C4 sırasıyla 108 mg/dL ve 20,8 mg/dL'dir. Çalışmamız için kategorize edilen hasta gruplarına göre sadece Total C3 düzeyi anlamlı farklılık göstermektedir. Total C4'te böyle bir anlamlılık yoktur. Mortalite gelişen ve pnömoni görülen hastalarda total C3 düzeyi yüksek bulunmuştur. Bu durum literatür bilgilerinin bir kısmı ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamız moleküllerinden sadece HIF-1 $\alpha$  ile total C4'ün anlamlı ilişkisi görülmüştür (p=0,035). C4 düzeyi arttıkça HIF-1 $\alpha$  düzeyi düşmüştür ve C4 düzeyinin artışıyla, HIF-1 $\alpha$  (spearman's rho ( $\rho$ ):-0,240) zayıf korelasyon göstermektedir. HIF-1 $\alpha$ 'ın kompleman sisteminin aktivasyonunun modülasyonunda rol aldığı da başka bir çalışmada gösterilmiştir [366].

Glomerüler filtrasyon hızının bir belirteci olan Sistatin C, düşük molekül ağırlıklı bir proteindir [367-369]. İnflamasyon sırasında salınan farklı sitokinlerin Sistatin C'yi kodlayan geni düzenlediği [369] ve inflamatuvar hastalıkların yönetiminde prognostik olduğu bilinmektedir [370]. Benzer şekilde, COVID-19 hastalarının serum Sistatin C

düzeıı yüksek olduğu ve COVID-19 enfeksiyonu ile ilişkili inflamatuvar süreci yansıttığı gösterilmiştir [371]. Sistatin C'nin ayrıca tümör nekroz faktörü- $\alpha$ , İL-12, İL-10 ve nitrik oksit (NO) gibi çok sayıda inflamatuvar sitokinin salınımını da modüle ettiği bilinmektedir [372]. Çalışmamızda medyan sistatin C 0,8 mg/L'dir. Pnömonisi olan ( $p<0,05$ ), mortalite görülen ( $p=0,012$ ) ve komorbiditesi olan ( $p<0,05$ ) hastalarda Sistatin C'nin artışı anlamlıdır. Çalışmamız molekülleriyle Sistatin C düzeyi arasında anlamlı ilişkisi gösterilememiştir.

Kreatin Kinaz (CK), kas mebranı disfonksiyonu ve/veya doğrudan kas yıkımı sırasında kaslardan salınmaktadır [373]. COVID-19 hastalarının %11-51'i arasında kas ağrıları ve kas yorgunluğu görülmektedir [4,374]. Çalışmamıza dahil ettiğimiz ve semptom görülen hastalarımızın sadece %8 'inde (7) kas ağrısı görülmüştür. CK, COVID-19 hastalık sürecinin gidişatını tahmin etmede klinik öneme sahiptir [374]. Yapılan çalışmalarda COVID-19 hastalarının %9-33'ünde artmış CK düzeyi bildirilmiştir [375]. Çalışmamıza dahil edilen tüm hastaların medyan CK düzeyi 114 U/L olarak bulunmuştur. CK'nın pnömoni gelişen ( $p=0,012$ ) ve mortalite görülen ( $p=0,012$ ) hastalarda artışı anlamlıdır. CK düzeyi ile komorbidite arasında ilişki anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamız moleküllerinden sadece BECN-1 ile CK düzeyinin anlamlı ilişkisi görülmüştür. CK düzeyi arttıkça BECN-1 düzeyi düşmüştür. CK ile BECN-1'in negatif korelasyonu doku hasarı arttıkça otofajinin yerini apoptoza bıraktığının göstergesi olabilir. CK düzeyinin artışıyla, BECN-1 (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,361) arasında orta dereceli korelasyon görülmektedir. Bununla birlikte BECN-1'in CK ile olan bu ilişkisi çalışmamız hipotezini de desteklemektedir. CK, kardiyak hastalıklarda da artış göstermektedir. Bu bağlamda özellikle uzamış COVID-19 semptomlarında önemli yeri olan kardiyak problemlerle, BECN-1 düzeyleri arasında ilişkinin önemli olabileceği düşüncesi de ortaya çıkmaktadır.

Biyokimyasal parametrelerde özellikle, laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyinde artış COVID-19 hastalarında en sık görülen anormal laboratuvar bulguları arasındadır. LDH, enerji üretiminde rol oynayan hücre içi bir enzimdir. Bu enzimin kandaki konsantrasyonunda artış, doku hasarı ve hücre ölümü, hipoksi (solunum yetmezliği sırasında), hematopoetik ve lenfatik sistem hastalıkları veya akciğer, pankreas enfeksiyonu ile ilişkisi gösterilmiştir. Birçok ağır seyirli COVID-19 hastasında, hücre hasarının yanı sıra bozulmuş kan akışı ve oksijen yetersizliğine bağlı olabilecek LDH

aktivitesinde bir artış gözlenmiştir [376]. Sars-Cov2 atağının birincil bölgesinin alt solunum yolu olduğunun bilinmesi ve LDH'nin akciğer hasarının önemli bir belirteci olması, bu enzim düzeyinin COVID-19 hastalarının çoğunda neden yükseldiğini en azından kısmen açıklayabilmektedir [377]. Çalışmamıza dahil edilen tüm hastaların medyan LDH düzeyi 211 U/L olarak bulunmuştur. Pnömonisi olan ( $p<0,05$ ), mortalite görülen ( $p=0,05$ ) ve komorbiditesi olan ( $p<0,05$ ) hastalarda LDH düzeyi artışı anlamlıdır. HIF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 ve apoptoz inhibitör belirteci olan SVN ile aralarında anlamlı ilişki görülmüştür. LDH düzeyi arttıkça; SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 düzeyinin düştüğü tespit edilmiştir. LDH düzeyinin artışıyla, SVN (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,282), HIF-1 $\alpha$  (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,263) zayıf korelasyon, TGF- $\beta$ 1 ise (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,394) orta dereceli korelasyon göstermektedir. Buradan LDH yüksekliğinin kötü prognozuna SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 düzeyinin düşüklüğünün eşlik ettiğini söyleyebiliriz. Hipotezimizde de belirttiğimiz gibi bu sonuçlara dayanarak apoptotik inhibitör belirteçlerinin düşüklüğü, COVID-19 hastalığında, apoptozun tetiklenerek hastalığın ağır seyretmesine bunun yanısıra asemptomatik bireylerde apoptotik inhibitör belirtecinin yüksek olmasının otofajiyi desteklemek adına kötü prognoz belirteçlerinin yükselmesine engel olduğu düşünülebilir.

COVID-19 hastalığında kardiyak tutulum yaygındır. Son kanıtlar, ağır seyirli COVID-19 hastalarında artmış Troponin düzeylerinin [378] kardiyovasküler hastalık, kritik hastalık [379] ve ölüm [380] olasılığının artmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir [381,382]. Ağır seyirli miyokardiyal hasar belirtileri yaygın olan 2.700 COVID-19 hastasında, Troponin konsantrasyonunda yükselmenin görüldüğü bildirilmiştir [383]. Mevcut bilgiler göz önüne alındığında, düşük düzeyli Troponin değişikliklerinin ilerleyen dönemde kardiyovasküler hastalık riskinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir [384]. Çalışmamıza dahil edilen tüm hastaların medyan Troponin düzeyi 5,0 ng/L olarak bulunmuştur. Troponin düzeyinin çalışmamızın tüm hasta gruplarıyla anlamlı ilişkisi görülmüştür. Pnömonisi olan ( $p<0,05$ ), mortalite görülen ( $p=0,029$ ) ve komorbiditesi olan ( $p<0,05$ ) hastalarda Troponin anlamlı artış göstermiştir. Çalışmamız moleküllerinden hepsiyle anlamlı ilişkisi olan Troponin düzeyi arttıkça BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'in düzeyleri düşmüştür. Bu bağlamda COVID-19'un ağır seyri ve kardiyak hastalıkların gelişimi açısından önemli bir işaret olabileceği düşünülen Troponin düzeyinin, çalışmamıza dahil ettiğimiz moleküllerle negatif korelasyonu gösterilmiştir. Troponin düzeyinin artışıyla, BECN-1 (spearman's

rho ( $\rho$ ): -0,182), SVN (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,242), HIF-1 $\alpha$  (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,274) ve TFG- $\beta$ 1 (spearman's rho ( $\rho$ ): -0,277) zayıf korelasyon göstermektedirler.

Kalsiyum çok yönlü bir hücre içi habercisidir. Hücre farklılaşması, bölünmesi ve hücre ölümü gibi karmaşık hücrel mekanizmalarda yer alır [385]. Dinlenme ve sağlıklı koşullarda sitoplazma ve mitokondri kalsiyum düzeyi hücre dışı ortama kıyasla yaklaşık 20.000 kat daha düşük düzeyde tutulur [386-388]. Ekstrinsik stresörler veya membran depolarizasyonu veya hücre dışı sinyal molekülleri gibi hücre uyarıları sitoplazmik kalsiyumu geçici olarak artırmaya yardımcı olabilmektedirler [386-388]. Sitoplazmik kalsiyumdaki geçici bir artış sırasında, mitokondri kalsiyumu bir sinyal olarak kullanır bu sinyal sayesinde ROS düzenlenmesi için elektron taşıma zinciri uyarılır [386,389]. Bununla birlikte; hücre hasarı, oksidatif stres veya inflamasyon gibi şiddetli ekstrinsik stresörler, aşırı sitozolik kalsiyuma neden olur [390]. Mitokondride aşırı kalsiyum birikmesi, mitokondriyal bileşenlerin dolaşıma sızmasına neden olarak kontrolsüz otofaji ve ek hücre hasarlarını ortaya çıkarır [391]. Bu etki daha da fazla kalsiyum akışına neden olarak kalsiyumla aktive olan kalpainler ve kaspaz proteinleri tarafından hücre apoptozunu sağlar [390]. Hücre hasarı aracılı kalsiyum akışının yanı sıra, mitokondriyal işlev bozukluğu da hücre içi kalsiyumun düzeyinin artışına sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarını kalsiyum-ATP-az pompaları tarafından düşük tutarak neden olabilmektedir [389]. İyonize hipokalsemi YBÜ'ye kabul edilen hastalar arasında çok yaygın gibi görünse de tetani, nöbetler, QT'de uzama, kardiyak disfonksiyonlar gibi düşük kalsiyum düzeylerine bağlı klasik semptomlar için de tanımlanır [392]. Araştırmacılar düşük iyonize kalsiyum değerlerinde vasküler tonus ve sol ventrikül fonksiyonunun azaldığını göstermişlerdir [393]. Prospektif bir çalışma ise polinöropatisi/miyopatisi olan hastalarda uzun süreli hipokalseminin ortaya çıktığını bildirmiştir [393]. Bu durumda COVID-19 hastalığında hipokalsemi merak uyandırmıştır ve ilk vaka İtalya'da Sars-Cov2 ile enfekte, tiroidektomili bir hastada şiddetli akut hipokalseminin görüldüğü rapor edilmiştir [394]. İlginç bir şekilde, 2003-2016 yıllarında SARS-Cov ve Ebola salgınlarına odaklanan çalışmalar, hipokalseminin salgından etkilenen hastalarda oldukça yaygın bir biyokimyasal anormallik olduğunu bildirmiştir [395]. Booth ve arkadaşları kısa dönem hastane yatışı ihtiyacı olan 144 Sars-Cov hastasının klinik sonuçlarında hipokalseminin önemli olduğunu göstermişlerdir [396]. Hastaneye yatış ihtiyacı olanlarda tespit edilen medyan kalsiyum değeri 8.52 mg/dL olarak gösterilmiş ve hastaların %60'ında hipokalsemi saptanmıştır.

COVID-19 hastaları verilerine göre ise hipokalsemi, 8,8 mg/dL altı olarak belirlenmiş ve hipokalsemi prevalansının % 62,6 ile %74,7 arasında değiştiğini bildirmiştir [396]. Başka bir çalışma ise hipokalsemi prevalansının % 80'den fazla olduğunu bildirmiştir [397,398]. Çalışmamıza dahil edilen tüm hastaların medyan kalsiyum düzeyi 9,3 mg/dL olarak bulunmuştur. Hastalarımızdan oluşturulan gruplar arasında  $Ca^{2+}$  düzeyinin pnömoni görülen ( $p<0,05$ ), komorbiditesi olan ( $p<0,05$ ) ve mortalite görülen ( $p<0,05$ ) hastalarda anlamlı düşüş (hipokalsemi) gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamız moleküllerinden hepsiyle anlamlı ilişkisi olan  $Ca^{2+}$  düzeyi düştükçe BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TFG- $\beta$ 1'in düzeylerinin de düştüğü görülmüş ve aralarında pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir.  $Ca^{2+}$  düzeyinin düşüşüyle, BECN-1 zayıf korelasyon (spearman's rho ( $\rho$ ): 0,186) gösterirken; SVN (spearman's rho ( $\rho$ ): 0,255), HIF-1 $\alpha$  (spearman's rho ( $\rho$ ): 0,301) ve TFG- $\beta$ 1 (spearman's rho ( $\rho$ ): 0,368) ise orta dereceli korelasyon göstermektedirler. Bu bağlamda BECN-1 ve SVN düşüklüğünün görüldüğü pnömonisi olan hastalarda  $Ca^{2+}$  düzeyinin düşüklüğünün de bu duruma eşlik etmesi bu hastalarda apoptozun teşvik edildiğine bir gösterge olabilmektedir ve bu durumun ağır seyirli hastalarda oldukça önemli olduğu çıkarımını yapmak mümkün olabilmektedir. Fakat çalışmamıza dahil edilen moleküller, hipokalsemi için bağımsız risk faktörü olarak tespit edilememiştir.

Çalışmamızın bulgularına göre, çalışma hipotezimizle çelişen sonuç TGF- $\beta$ 1'dir. Hipotezimizi büyük oranda doğrulayan çalışmamızda tanı gruplarında ve komorbidite gruplarının hastalarında BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 düzeylerindeki değişimlerin anlamlı olduğu (Şekil 4.33) fakat aynı anlamlılığın sağ kalım grubunda bulunmadığı saptanmıştır. Bu bulgular ışığında BECN-1 ve SVN'nin sinerjistik etkisinin olabileceği, bu sinerjistik etkinin moleküllerin düzeylerinin yüksekliğine bağlı olarak COVID-19 hastalığının şiddetiyle negatif korelasyon gösterdiği yorumu yapılabilir.

Mevcut kanıtlar Sars-Cov2'ye karşı otofaji mekanizmalarının virüsle mücadele stratejilerinin bir parçası olabileceğini öngörmektedir [221]. Bununla birlikte, otofajinin COVID-19'daki kesin rolü belirsizliğini korumaktadır. Tez çalışmamızda otofaji belirteci olan BECN-1'in COVID-19 hastalığındaki rolünü biyokimyasal parametreler ve klinik belirtilerle ilişkisini irdeleyerek ortaya koymaya çalıştık. Çalışmamızda BECN-1'in serumdaki düzeyi ağır seyirli (pnömoni gelişen) hastalarda,

asemptomatik hastalara göre önemli ölçüde düşüktür. Bu durum hastalığın ağır seyirinde apopitozun tetiklendiğini düşündürülebilir. Önceki çalışmalar viral enfeksiyonlar esnasında otofajinin, viral enfeksiyonlara karşı koyabilmek için indüklenebileceğini ortaya koymuştur. Bu sayede otofaji bir anti-viral mekanizma gibi davranarak ve immün hücrelerinin hayatta kalmasına, viral replikasyonun önlenmesine aracılık etmektedir. Ayrıca, viral enfeksiyon ve replikasyon, ER'de hatalı katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesine yol açarak da otofajiyi indüklemektedir. Sars-Cov2 enfeksiyonu muhtemelen hastalarda otofaji mekanizmalarını bu yolla da tetikleyebilmektedir. Şimdiye kadar yapılan birkaç çalışma COVID-19'da çeşitli otofaji belirteçlerini incelemiştir. BECN-1'in serum düzeyinin sağlıklı kontrollere göre artışının gösterilmesinin yanında, kan mononükleer hücrelerinde LC3 mRNA ekspresyonu ve LC3-I/II dönüşümü COVID-19'da sağlıklı kontrollere göre azalmıştır [399]. Öte yandan, in vitro olarak 24 saat inkübe edilen kan mononükleer hücrelerinde hem LC3-II hem de p62 düzeylerinin ve dalak makrofajlarında p62 protein birikiminin COVID-19 hastalarında arttığı gösterilmiştir [400,401]. Otofajinin anti-inflamatuvar rolü ile tutarlı olarak, dalak makrofajlarının veya kan lökositlerinin baskılanması, şiddetli COVID-19'da hiperinflamasyon ile ilişkilendirilmiştir [400,401]. Ayrıca, ülkemizden Okuyan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma, BECN-1'in sağlıklı kontrollere göre hasta serum düzeylerindeki artışının COVID-19'un şiddetiyle ilişkisini göstermiştir [273]. Bu bağlamda elde ettiğimiz verilerimiz, Okuyan ve arkadaşlarının tespitlerinin aksine, artmış BECN-1 düzeylerinin BECN1-aracılı otofaji uyarımına neden olabileceği ve bu durumun COVID-19 hastalığında anti-viral etkiler gösterebileceği, hastalığın iyi kliniği ve iyi seyiri ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaya yardımcı olmaktadır fakat şüphesiz ki daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır. Dikkat edilmesi gereken ana nokta Okuyan ve arkadaşlarının COVID-19 hastalarında BECN-1 artışını, sağlıklı kontrollere göre göstermiş olmasıdır. Biz çalışmamızda ise BECN-1'i COVID-19 hastalığının asemptomatik ve pnömoni gelişen hasta grupları arasında değerlendirdik. Çalışmamıza sağlıklı grup dahil edilememiştir.

Survivin (SVN), apopitoz inhibitörü (IAP) ailesine aittir. Apopitoz yollarındaki diğer pro- veya anti-apopitotik faktörler arasında Bcl-2 ailesi, kaspazlar, X'e bağlı apopitoz inhibitörleri (XIAP) yer alır. Survivin, XIAP ve kaspazlar, lenfositlerde apopitozu aktive ederek COVID-19 patogenezinde ve özellikle lenfopenide rol oynayabilmektedir. Sars-Cov2'nin viral replikasyonunu, yayılımını veya immün

evazyonunu desteklemek için survivin düzeylerini düşürdüğü ve hatta kalp hasarına karşı koruma sağlayan ana onarıcı süreçleri ortadan kaldırdığı belirtilmiştir [155]. Ayrıca, COVID-19 hastalarında kontrol grubuna göre; kaspaz-8, kaspaz-3, sFasL ve kaspazlar tarafından kesilmiş sitokeratin 18 [154]'in kan konsantrasyonlarının artışı gösterilmiştir. Ancak, COVID-19 hastalarında bu apoptotik belirteçler ile otofajik belirteçlerin birlikte analiz edildiği veri bulunmamaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda pnömoni gelişen, komorbiditesi olan ve mortalite görülen hasta gruplarında SVN düzeyi anlamlı olarak düşüktür. Bu düşüklüğe BECN-1, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'in düşüklüğü de eşlik etmektedir. Çalışmamızda lenfopeni ile SVN düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir fakat lenfopenik hastalarda SVN düzeyinin lenfosit sayısı normal olanlara göre düşük olduğu tespit edilmiştir (1,4 kat düşük).

Sars-Cov2 N proteininin, SMAD3'ü doğrudan aktive ederek TGF- $\beta$  gen ekspresyonunu artırdığı [302] gösterilmiştir. COVID-19 hastalarında erken dönem TGF $\beta$  serum düzeyleri hastalığın şiddetini, ölüm oranını ve deksametazon gibi tedavilere yanıtı öngördüğü bildirilmiştir [329-331]. Ağır seyirli COVID-19 hastalarında TGF- $\beta$  düzeyleri, hafif seyirli veya orta şiddette seyreden COVID-19 hastalarına göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildiren çalışma bulunmaktadır [332]. Aynı çalışmaya göre ağır seyirli COVID-19 nedeniyle ölen hastaların TGF- $\beta$  düzeyleri iyileşen hastalara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca TGF- $\beta$ 'nin, deksametazon tedavisi alan ağır seyirli hastalarda tedavi almayan hastalara göre önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen tüm hastaların medyan TGF- $\beta$ 1 düzeyi 271 ng/ml olarak bulunmuştur. Hastalarımızdan oluşturulan gruplar arasında TGF- $\beta$ 1 düzeyinin sadece pnömoni görülen ( $p < 0,05$ ) hastalarda anlamlı düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Öyle ki Zivancevic-Simonovic arkadaşları yaptıkları çalışmada TGF- $\beta$ 1 düzeyinin değişiminin hastaların trombosit düzeyine göre değiştiğini vurgulamışlardır ve aralarında pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda düşük, normal ve yüksek trombosit düzeyine göre gruplandırdığımız hastalarımız arasında bu şekilde anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ( $p = 0,0932$ ) (Şekil 4.32). Trombositlerde ve mikrovasküler trombus içindeki hücrelerde yüksek TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonunun gösterilmesi; TGF- $\beta$ 1'in pıhtılaşma kaskadını aktive etme, immün sistem yolaklarını düzensizleştirme ve pro-fibrotik özelliklerin ortaya çıkışına katkıda bulunduğu kanıttır. Çalışmamızda yer alan pnömoni gelişen hastaların sadece

%2'sinde; asemptomatik hastalarımızın sadece %7'sinde trombosit sayısı yüksek bulunmuştur. Hastalarımızın çoğunda trombosit sayısı normal aralıklardadır. Bu nedenle TGF- $\beta$ 1'in düzeyinin trombosit sayısına göre değiştiğini çalışmamızda söylememiz mümkün görünmemektedir. Fakat çalışmamıza dahil edilen hastalarımızda TGF- $\beta$ 1'in otofajiyi destekler rol üstlendiği yorumunu yapmak mümkün olabilmektedir çünkü COVID-19 hastalığının asemptomatik seyrettiği hastalarda anlamlı artışı görülmüştür.

Derin hipoksinin Sars-Cov2'nin konakçı hücreleri enfekte etme yeteneğini değiştirebileceğini gösteren kanıtlar vardır. Hipoksinin, Epstein-Barr virüsünün replikasyonunu artıran ancak HIV ve influenza enfeksiyonunu baskılayan bir durum olduğu yani virüs replikasyonunu düzenlediği bildirilmiştir. Düşük oksijenin hem ACE2 ekspresyonu hem de Sars-Cov2 replikasyonu üzerindeki etkilerini konu alan Wing ve arkadaşları hipoksik durumda Sars-Cov2'nin akciğer epitelyal hücrelerine girişinin ve replikasyonunun değişimlerini göstermişlerdir [316]. Hem HIF'in oksijen yolu ile düzenlenmesi hem de HIF-1 $\alpha$  sinyal yolağının, COVID-19 hastalarının periferik kan hücrelerinde disregüle olduğu gösterilmiştir. Klinik örneklerin analizleri çalışmalarında, HIF-1 $\alpha$  ve inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarının COVID-19 hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla belirgin şekilde ortaya çıktığı bildirilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen tüm hastaların HIF-1 $\alpha$  medyan değeri 50 pg/ml'dir. HIF-1 $\alpha$ 'nın COVID-19 hastalığının patogenezi üzerindeki etkisini göstermeyi amaçladığımız çalışmamızda pnömoni gelişen, komorbiditesi olan ve mortalite görülen hastalarda düzeyinin düştüğü görülmüştür. Tanı ve komorbidite grubuna göre sınıflandırdığımız hasta gruplarımız arasında da HIF-1 $\alpha$  düzeyinin anlamlı fark gösterdiği tespit edilmiştir. Pankreas ve meme kanseri hücrelerinde HIF-1 $\alpha$ 'nın susturulduğu çalışmalarda SVN düzeyinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [159]. Daha ileri çalışmalar, HIF-1 $\alpha$ 'nın doğrudan ekspresyonunu aktive etmek için SVN promotoruna bağlandığını bildirmiştir [161]. Bununla birlikte HIF1- $\alpha$ 'nın susturulduğu hücre hatlarında BECN-1 düzeyinin de düştüğü ifade edilmiştir. Bu veriler ışığında COVID-19 hastalığındaki rollerini merak ettiğimiz bu moleküllerin pnömoni görülen hastalarda düşüklüğü bu çalışma ile ortaya konmuştur. Çalışma hipotezimizde de öngördüğümüz gibi otofajinin indüklenmesi için BECN-1, SVN yüksekliğine HIF1- $\alpha$ 'nın yüksekliği de eşlik etmiştir ve bu durum hastalığın iyi prognozuna katkı sağlamıştır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm bu bilgiler ışığında COVID-19 hastalığının seyrine ve şiddetine apoptoz ve otofajinin karşılıklı etkileşiminin bir yansımasının olabileceğini düşündüğümüz çalışmamızda, pnömoni gelişen hastalarda özellikle BECN-1 ve SVN'nin sinerjik etki gösterdiği; HIF-1 $\alpha$ 'nın ve TGF- $\beta$ 1'in ise bu sinerjik etkiye aynı yönde katkı sağladığı sonuçları ortaya çıkmıştır. Elbette otofajinin ve apoptozun karşılıklı ilişkisini ortaya koyacak daha çok çalışmaya ve özellikle de yolak çalışmasına gerek duyulmaktadır. Özellikle proteomiks, transkriptom çalışmalarıyla şekillenmesi söz konusu olabilecek bu yolak ortaklıkları veya karşılıklı etkileşim hastalıkların tek düzeyde değil birçok yönü ile ele alınmasına ve etkili tedavilerin ortaya çıkmasına imkân sunacaktır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bilgiler sadece hastaların klinik, demografik ve laboratuvar bulgularıyla bu moleküllerin literatür eşliğinde karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Bu sonuçlar diyagnostik amaçlı değil sadece öngöründe bulunabilmek içindir. Ayrıca elde edilen bilgilerin karşılaştırılması hasta grupları arasında yapılmıştır. Belki de sağlıklı gruba göre yapılacak karşılaştırmalar daha farklı sonuçlar elde etmemizi sağlayacaktır ancak bu durum -daha fazla çalışma grubu eklemek- çalışmamızın kısıtlamasıdır. Öncelikle çalışmamıza dahil ettiğimiz hastalar için bu moleküllerin cutoff değerleri sağlıklı grup olmadığı için tespit edilememiştir. Ayrıca veri setlerinin dağılımının normal olmaması, değerlerin sadece medyan olarak verilmesine neden olmuş, istatistiksel anlamlılıklar medyan değerlerine göre tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma; serum BECN-1, SVN, HIF-1 $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 düzeylerinin birlikteliğinin, pnömoni gelişen COVID-19 hastalarına göre asemptomatik COVID-19 hastalarında anlamlı artışını ilk kez ortaya koymuştur. Ayrıca bu moleküller; COVID-19 hastalarının hematolojik, pıhtılaşma, inflamatuvar ve biyokimyasal parametreleri ve klinik şiddet ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlarımız bu moleküllerin COVID-19'un hastalık şiddetini tahmin etmek için bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini ve BECN-1 aracılı otofaji ve SVN aracılı apoptoz modülasyonunun COVID-19'un klinik sonuçlarını iyileştirmek için umut verici bir değere sahip olabileceğini gösterebilmektedir. Daha da önemlisi, sonuçlarımız COVID-19'un patogeneğinde otofaji mekanizmalarının, apoptoz mekanizmalarının potansiyel önemini vurgulamaktadır, yorum yapabilmeye olanak sağlamaktadır. Ancak, bu moleküllerin apoptoz ve otofaji arasındaki karşılıklı ilişkisine katkılarını ve de bu katkının COVID-19'un patogeneğine, seyrine etkisini araştıran hem daha fazla çalışmaya hem de daha fazla örneklem grubuna ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu

Çalışma sonuçlarının yönlendirmesiyle, bu moleküllerin uzamış COVID-19 hastalığına etkisi de araştırılabilir. Özellikle uzamış COVID-19 hastalığında ortaya çıkan yorgunluk, nefes darlığı, bilişsel bozukluk / beyin sisi, efor sonrası halsizlik, hafıza sorunları, kas-iskelet ağrısı / spazmlar, öksürük, uyku bozuklukları, taşikardi / çarpıntı, koku / tat algısında değişiklik, baş ağrısı, göğüs ağrısı ve depresyon gibi semptomlara [402] etkisini araştırmak ve bu semptomların ortaya çıkmasındaki rolünü belirlemek önemli olabilir.

## KAYNAKLAR

1. Bogoch I.I, Watts A., Thomas-Bachli A., Huber C., and Moritz U.G. (2020). Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *Journal of Travel Medicine*, 1–3.
2. Guo Y.R., Cao Q.D., Hong Z.S., Tan Y.Y., Chen S., Jin H.J., Tan K.S., Wang D., and Yan Y. (2020) The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Medical Research*, 7-11
3. Liu Y.C., Kuo R.L., and Shih, S.R. (2020). COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed Journal*, 43, 328–333.9
4. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang H., Ou C.Q., He J.X., Liu L., Shan H., Lei CL., Hui D.S.C., Du B., Li L.J., Zeng G., Yuen K.Y., Chen R.C., Tang C.L., Wang T., Chen P.Y., Xiang J., Li S.Y., Wang J.L., Liang Z.J., Peng Y.X., Wei L., Liu Y, Hu Y.H., Peng P., Wang J.M., Liu J.Y., Chen Z., Li G., Zheng Z.J., Qiu S.Q., Luo J., Ye C.J., Zhu S.Y. and Zhong N.S., China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 30;382(18):1708-1720.
5. Schön M.P., Berking C., and Biedermann T. (2020). COVID-19 and immunological regulations from basic and translational aspects to clinical implications. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 18(8):795–807.
6. Mohamed Khosroshahi L., Rokni M., Mokhtari T., and Noorbakhsh F. (2021) Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; an overview. *International Journal of Immunopharmacology*, 93:107364.
7. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., Liu S., Zhao P., Liu H., and Zhu L. (2020) Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome, *Lancet Respiratory Medicine*, 8 (4) 420–422.
8. Wu C., Chen X., Cai Y., Zhou X., Xu S., Huang H., Zhang L., Du C., and Zhang Y. (2020). Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China, *JAMA Internal Medicine*, 1;180(7):934-943.
9. Zheng Y.Y., Ma Y.T., Zhang J.Y., and Xie X. (2020). COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature Reviews Cardiology*, 17(5):259-260.
10. Bonow R.O., Fonarow G.C., O'Gara P.T., and Yancy C.W. (2020). Association of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) with myocardial injury and mortality. *JAMA Cardiology*, 1;5(7):751-753.
11. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., and Shi Z.L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798):270-273.

12. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., and Cao B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 15;395(10223):497-506.
13. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu.W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., and Tan W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 22;395(10224):565-574.
14. Cui J., Li F., and Shi ZL. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3):181-192.
15. Woo P.C., Lau S.K, Lam C.S., Lau C.C., Tsang A.K., Lau J.H., Bai R., Teng J.L., Tsang C.C., Wang M., Zheng B.J., Chan K.H., and Yuen K.Y. (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86(7):3995-4008.
16. Paules C.I., Marston H.D., and Fauci A.S. (2020). Coronavirus infections more than just the common cold. *JAMA*, 25;323(8):707-708.
17. İnternet: COVID-19 Epidemiological Update. Edition 166 published 12 April 2024 [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/covid-19\\_epi\\_update\\_166.pdf?sfvrsn=e7fd0f6\\_1&download=true](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/covid-19_epi_update_166.pdf?sfvrsn=e7fd0f6_1&download=true) adresinden 21 Haziran 2024'de alınmıştır.
18. Dong Y., Mo X., Hu Y., Qi X., Jiang F., Jiang Z., and Tong S. (2020). Epidemiology of COVID-19 among children in china. *Pediatrics*,145(6):20200702.
19. Lu X., Zhang L., Du H., Zhang J., Li Y.Y., Qu J., Zhang W., Wang Y., Bao S., Li Y., Wu C., Liu H., Liu D., Shao J., Peng X., Yang Y., Liu Z., Xiang Y., Zhang F, Silva R.M., Pinkerton K.E., Shen K., Xiao H., Xu S., and Wong G.W.K. (2020). Chinese Pediatric Novel Coronavirus Study Team. SARS-CoV-2 Infection in children. *New England Journal of Medicine*, 23;382(17):1663-1665.
20. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia J., Yu T., Zhang X., and Zhang L (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 395:507–51
21. Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., Ren R., Leung K.S.M, Lau E.H.Y., Wong J.Y., Xing X., Xiang N., Wu Y., Li C., Chen Q., Li D., Liu T., Zhao J., Liu M., Tu W., Chen C., Jin L., Yang R., Wang Q., Zhou S., Wang R., Liu H., Luo Y., Liu Y., Shao G., Li H., Tao Z., Yang Y., Deng Z., Liu B., Ma Z., Zhang Y., Shi G., Lam T.T.Y., Wu J.T., Gao G.F., Cowling B.J., Yang B., Leung G.M., and Feng Z. (2020). Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel Coronavirus-infected pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 26;382(13):1199-1207.

22. Wang W., Tang J., and Wei F. (2020). Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *Journal of Medical Virology*, 92(4):441-447.
23. Ghinai I., McPherson T.D., Hunter J.C., Kirking H.L., Christiansen D., Joshi K., Rubin R., Morales-Estrada S., Black S.R., Pacilli M., Fricchione M.J., Chugh R.K., Walblay K.A., Ahmed N.S., Stoecker W.C., Hasan N.F., Burdsall D.P., Reese H.E., Wallace M., Wang C., Moeller D., Korpics J., Novosad S.A., Benowitz I., Jacobs M.W., Dasari V.S., Patel M.T., Kauerauf J., Charles E.M., Ezike N.O., Chu V., Midgley C.M., Rolfes M.A., Gerber S.I., Lu X., Lindstrom S., Verani J.R., Layden J.E., and Illinois COVID-19 Investigation Team. (2020). First known person-to-person transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in the USA. *Lancet*, 4;395(10230):1137-1144.
24. Wang W., Xu Y., Gao R., Lu R., Han K., Wu G., and Tan W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA*, 12;323(18):1843-1844.
25. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R., Azman A.S., Reich N.G., and Lessler J. (2020). The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Annals of Internal Medicine*, 5;172(9):577-582.
26. Paderno A., Schreiber A., Grammatica A., Raffetti E., Tomasoni M, Gualtieri T., Taboni S., Zorzi S., Lombardi D., Deganello A., Redaelli De Zinis L.O., Maroldi R., and Mattavelli D. (2020). Smell and taste alterations in COVID-19: a cross-sectional analysis of different cohorts. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 10(8):955-962.
27. Yan C.H., Faraji F., Prajapati D.P., Boone C.E., and DeConde A.S. (2020). Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 10(7):806-813.
28. Merad M., and Martin J.C. (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 20(6):355-362.
29. Osuchowski M.F., Winkler M.S., Skirecki T., Cajander S., Shankar-Hari M., Lachmann G., Monneret G., Venet F., Bauer M., Brunkhorst F.M., Weis S., Garcia-Salido A., Kox M., Cavaillon J.M., Uhle F., Weigand M.A., Flohé S.B., Wiersinga W.J., Almansa R., de la Fuente A., Martin-Loeches I., Meisel C., Spinetti T., Schefold J.C., Cilloniz C., Torres A., Giamarellos-Bourboulis E.J., Ferrer R., Girardis M., Cossarizza A., Netea M.G., van der Poll T., Bermejo-Martín J.F., and Rubio I. (2021). The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity. *Lancet Respiratory Medicine*, 9(6):622-642.
30. Bárcena M., Oostergetel G.T., Bartelink W., Faas F.G., Verkleij A., Rottier P.J., Koster A.J., and Bosch B.J. (2009). Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 13;106(2):582-7.

31. Paolini A., Borella R., De Biasi S., Neroni A., Mattioli M., Lo Tartaro D., Simonini C., Franceschini L., Cicco G., Piparo A.M., Cossarizza A., and Gibellini L. (2021). Cell death in coronavirus infections: uncovering its role during COVID-19. *Cells*, 23;10(7):1585.
32. Ghosh S., Dellibovi-Ragheb T.A., Kerviel A., Pak E., Qiu Q., Fisher M., Takvorian P.M., Bleck C., Hsu V.W., Fehr A.R., Perlman S., Achar S.R., Straus M.R., Whittaker G.R., de Haan C.A.M., Kehrl J., Altan-Bonnet G., and Altan-Bonnet N. (2020).  $\beta$ -Coronaviruses use lysosomes for egress instead of the biosynthetic secretory pathway. *Cell*, 10;183(6):1520-1535.e14.
33. Salamanna F., Maglio M, Landini M.P., and Fini M. (2020). Body localization of ACE-2: on the trail of the keyhole of SARS-CoV-2. *Frontiers in Medicine*, 3;7:594495.
34. Astuti I., and Ysrafil. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Review in Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 14(4):407-412.
35. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J., Sheng J., Quan L., Xia Z., Tan W., Cheng G., and Jiang T. (2020). Genome composition and divergence of the novel Coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host & Microbe*, 11;27(3):325-328.
36. van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., and Fouchier R.A. (2012). Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio*, 20;3(6):e00473-12.
37. La Torre F., Leonardi L., Giardino G., Volpi S., Federici S., Soresina A, Cancrini C., Lougaris V., Castagnoli R., Corrente S, Cardinale F., and Immunology Commission of the Italian Society of Pediatric Allergy, Immunology (SIAIP). (2020). Immunological basis of virus-host interaction in COVID-19. *Review in Pediatric Allergy and Immunology*, 26:75-78.
38. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., and Ng L.F.P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20(6):363-374.
39. Soy M., Keser G., Atagündüz P., Tabak F., Atagündüz I., and Kayhan S. (2020). Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clinical Rheumatology*, 39(7):2085-2094.
40. Souyris M., Mejía J.E., Chaumeil J., and Guéry J.C. (2019). Female predisposition to TLR7-driven autoimmunity: gene dosage and the escape from X chromosome inactivation. *Review in Seminars in Immunopathology*, 41(2):153-164.
41. Yang M. (2020). Cell pyroptosis, a potential pathogenic mechanism of 2019-nCoV infection. *SSRN Journal*.

42. Chen I.Y., Moriyama M., Chang M.F., and Ichinohe T. (2019). Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Frontiers in Microbiology*, 29;10:50.
43. Gangaev A., Ketelaars S.L.C, Isaeva O.I., Patiwaël S., Dopler A., Hoefakker K., De Biasi S., Gibellini L., Mussini C., Guaraldi G., Girardis M., Ormeno C.M.P.T., Hekking P.J.M, Lardy N.M., Toebes M., Balderas R., Schumacher T.N., Ovaas H., Cossarizza A., and Kvistborg P. (2021). Identification and characterization of a SARS-CoV-2 specific CD8+ T cell response with immunodominant features. *Nature Communications*, 10;12(1):2593.
44. Kuri-Cervantes L., Pampeña M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R, Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J, Meyer N.J., and Betts M.R. (2020). Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Science Immunology*, 15;5(49): eabd7114.
45. Laing A.G., Lorenc A., Del Molino Del Barrio I., Das A., Fish M., Monin L., Muñoz-Ruiz M., McKenzie D.R., Hayday T.S., Francos-Quijorna I., Kamdar S., Joseph M., Davies D., Davis R., Jennings A., Zlatareva I., Vantourout P., Wu Y., Sofra V., Cano F., Greco M., Theodoridis E., Freedman J.D., Gee S., Chan J.N.E., Ryan S., Bugallo-Blanco E., Peterson P., Kisand K., Haljasmägi L., Chadli L., Moingeon P., Martinez L., Merrick B., Bisnauthsing K., Brooks K., Ibrahim M.A.A., Mason J., Lopez Gomez F., Babalola K., Abdul-Jawad S., Cason J., Mant C., Seow J., Graham C., Doores K.J., Di Rosa F., Edgeworth J., Shankar-Hari M., and Hayday A.C. (2020). A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nature Medicine*, 26(10):1623-1635.
46. Wilk A.J., Rustagi A., Zhao N.Q., Roque J., Martínez-Colón G.J., McKechnie J.L., Ivison G.T., Ranganath T., Vergara R., Hollis T., Simpson L.J., Grant P., Subramanian A., Rogers A.J., and Blish C.A. (2020). A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nature Medicine*, 26(7):1070-1076.
47. Kamphuis E., Junt T., Waibler Z., Forster R., and Kalinke U. (2006). Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood*, 15;108(10):3253-61.
48. Shiow L.R., Rosen D.B., Brdicková N., Xu Y., An J, Lanier L.L., Cyster J.G., and Matloubian M. (2006). CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, 23;440(7083):540-4.
49. Zhao Q., Meng M., Kumar R., Wu Y., Huang J., Deng Y., Weng Z., and Yang L. (2020). Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 96:131-135.

50. Bellesi S., Metafuni E., Hohaus S., Maiolo E., Marchionni F., D'Innocenzo S., La Sorda M., Ferraironi M., Ramundo F., Fantoni M., Murri R., Cingolani A., Sica S., Gasbarrini A., Sanguinetti M., Chiusolo P., and De Stefano V. (2020). Increased CD95 (Fas) and PD-1 expression in peripheral blood T lymphocytes in COVID-19 patients. *British Journal of Haematology*, 191(2):207-211.
51. Li M., Guo W., Dong Y., Wang X., Dai D., Liu X., Wu Y., Li M., Zhang W., Zhou H., Zhang Z., Lin L., Kang Z., Yu T., Tian C., Qin R., Gui Y., Jiang F., Fan H., Heissmeyer V., Sarapultsev A., Wang L., Luo S., and Hu D. (2020). Elevated exhaustion levels of NK and CD8+ T cells as indicators for progression and prognosis of COVID-19 disease. *Frontiers in Immunology*, 14;11:580237.
52. Hermens J.M., and Kesmir C. (2023). Role of T cells in severe COVID-19 disease, protection, and long term immunity. *Immunogenetics*, 75(3):295-307.
53. Long Q.X., Liu B.Z., Deng H.J, Wu G.C., Deng K., Chen Y.K., Liao P., Qiu J.F., Lin Y., Cai X.F., Wang D.Q., Hu Y., Ren J.H., Tang N., Xu Y.Y., Yu L.H., Mo Z., Gong F., Zhang X.L., Tian W.G., Hu L., Zhang X.X., Xiang J.L., Du H.X., Liu H.W., Lang C.H., Luo X.H., Wu S.B., Cui X.P., Zhou Z., Zhu M.M., Wang J., Xue C.J., Li X.F., Wang L., Li Z.J., Wang K., Niu C.C., Yang Q.J., Tang X.J., Zhang Y., Liu X.M., Li J.J., Zhang D.C., Zhang F., Liu P., Yuan J., Li Q., Hu J.L., Chen J., and Huang A.L. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26(6):845-848.
54. Yu H.Q., Sun B.Q., Fang Z.F, Zhao J.C., Liu X.Y., Li Y.M., Sun X.Z., Liang H.F., Zhong B., Huang Z.F., Zheng P.Y., Tian L.F., Qu H.Q., Liu D.C., Wang E.Y., Xiao X.J., Li S.Y., Ye F., Guan L., Hu D.S., Hakonarson H., Liu Z.G., and Zhong N.S. (2020). Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *European Respiratory Journal*, 27;56(2):2001526.
55. Napoli C., Benincasa G., Criscuolo C., Faenza M., Liberato C., Rusciano M. (2021). Immune reactivity during COVID-19: Implications for treatment. *Immunology Letters*, 231:28-34.
56. Zhou Y., Fu B., Zheng X., Wang D., Zhao C., Qi Y., Sun R., Tian Z., Xu X., and Wei H. (2020). Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *National Science Review*, 7(6):998-1002.
57. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Elalamy I, Kastritis E., Sergentanis T.N., Politou M., Psaltopoulou T., Gerotziapas G., and Dimopoulos M.A. (2020). Hematological findings and complications of COVID-19. *American Journal of Hematology*, 95(7):834-847.
58. Altmann D.M., and Boyton R.J. (2020). SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Science Immunology*, 17;5(49):6160.
59. Odak I., Barros-Martins J., Bošnjak B., Stahl K., David S., Wiesner O., Busch M., Hoepfer M.M., Pink I., Welte T., Cornberg M., Stoll M., Goudeva L., Blasczyk R., Ganser A., Prinz I., Förster R., Koenecke C., and Schultze-Florey C.R. (2020). Reappearance of effector T cells is associated with recovery from COVID-19. *eBioMedicine*, 57:102885.

60. Napoli C., Tritto I., Benincasa G., Mansueto G., and Ambrosio G. (2020). Cardiovascular involvement during COVID-19 and clinical implications in elderly patients. *A review in Annals of Medicine and Surgery*, 5;57:236-243.
61. Zhou J.S., Yadan W., and Xiancang M. (2020). Utility of ferritin, procalcitonin, and creactive protein in severe patients with 2019 novel coronavirus disease, Preprint from *Research Square*.
62. Luo X., Zhou W., Yan X., Guo T., Wang B., Xia H., Ye L., Xiong J., Jiang Z., Liu Y., Zhang B., and Yang W. (2020). Prognostic value of C-Reactive Protein in patients with Coronavirus 2019. *Clinical Infectious Diseases*, 19;71(16):2174-2179.
63. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., and Cao B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 28;395(10229):1054-1062.
64. Feng Z., Diao B., Wang R., Wang G., Wang C., and Tan Y. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2(SARS-CoV-2) directly decimates human spleens and lymph nodes. Preprint from *medRxiv*.
65. Sejópoles M.D., Souza-Silva J.P., Silva-Santos C., Paula-Duarte M.M., Fontes C.J., and Gomes L.T. (2023). Prognostic value of neutrophil and lymphocyte counts and neutrophil/lymphocyte ratio for predicting death in patients hospitalized for COVID-19. *Heliyon*, 9(6):16964.
66. Malik P., Patel K., Akrmah M., Donthi D., Patel U., Khader S.N., and Asiry S. (2021). COVID-19: a disease with a potpourri of histopathologic findings-a literature review and comparison to the closely related SARS and MERS. *SN Comprehensive Clinical Medicine*, 3(12):2407-2434.
67. Narayanan S.A., Jamison D.A. Jr, Guarnieri J.W., Zaksas V., Topper M., Koutnik A.P., Park J., Clark K.B., Enguita F.J., Leitão A.L., Das S., Moraes-Vieira P.M., Galeano D., Mason C.E., Trovão N.S., Schwartz R.E., Schisler J.C., Coelho-Dos-Reis J.G.A., Wurtele E.S., Beheshti A. (2024). A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 2: host extracellular to systemic effects of SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Human Genetics*, 32(1):10-20.
68. Mohanty S.K., Satapathy A., Naidu M.M., Mukhopadhyay S., Sharma S., Barton L.M., Stroberg E., Duval E.J., Pradhan D., Tzankov A., and Parwani A.V. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19)- anatomic pathology perspective on current knowledge. *Diagnostic Pathology*, 14;15(1):103.
69. Tan M., Liu Y., Zhou R., Deng X., Li F., Liang K., and Shi Y. (2020). Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology*.160(3):261-268.
70. Sun L., Xing Y., Chen X., Zheng Y., Yang Y, Nichols D.B., Clementz M.A., Banach B.S., Li K., Baker S.C., and Chen Z. (2012). Coronavirus papain-like proteases negatively regulate antiviral innate immune response through disruption of STING-mediated signaling. *PLoS One*, 7(2):e30802.

71. Siu K.L., Chan C.P, Kok K.H., Chiu-Yat Woo P., and Jin D.Y. (2014). Suppression of innate antiviral response by severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein is mediated through the first transmembrane domain. *Cellular & Molecular Immunology*,11(2):141-9.
72. Chang Y., and Wei W. (2015). Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis, *Clinical & Experimental Immunology*, 179 (2)137–145.
73. Benigni A., Cassis P., and Remuzzi G. (2010). Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Molecular Medicine*, 2(7):247-57.
74. Kuba K., Imai Y., Rao S., Gao H., Guo F., Guan B., Huan Y., Yang P., Zhang Y., Deng W., Bao L., Zhang B., Liu G., Wang Z., Chappell M., Liu Y., Zheng D., Leibbrandt A., Wada T., Slutsky A.S., Liu D., Qin C., Jiang C., Penninger J.M. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nature Medicine*, 11(8):875-9.
75. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P, Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K., and Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. (2015). Viruses, apoptosis, and neuroinflammation—A double-edged sword. *Journal of NeuroVirology*, 21, 1–7.
76. Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 12;407(6805):770-6.
77. Ashkenazi A., and Dixit V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 28;281(5381):1305-8.
78. Singh R., Letai A., and Sarosiek K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(3):175-193. Carneiro B.A., and El-Deiry W.S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7):395-417.
79. Pereira W.O., and Amarante-Mendes G.P. (2011) Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scandinavian Journal of Immunology*, 73(5):401-7.
80. Troiano L., Ferraresi R., Lugli E., Nemes E., Roat E., Nasi M., Pinti M., and Cossarizza A. (2007). Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(11):2719-27.
81. Zhou X., Jiang W., Liu Z., Liu S., and Liang X. (2017). Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. *Viruses*, 27;9(11):316.
82. Hocke A.C., Becher A., Knepper J., Peter A., Holland G., Tönnies M., Bauer T.T., Schneider P., Neudecker J., Muth D, Wendtner C.M., Rückert J.C., Drosten C., Gruber A.D., Laue M., Suttorp N., Hippenstiel S., and Wolff T. (2013). Emerging human middle East respiratory syndrome coronavirus causes widespread infection and alveolar damage in human lungs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1;188(7):882-6.

83. Shokri S., Mahmoudvand S., Taherkhani R., Farshadpour F. (2019). Modulation of the immune response by Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Cellular Physiology*, 234(3):2143-2151.
84. Li F., Li J., Wang P.H., Yang N., Huang J., Ou J., Xu T, Zhao X., Liu T., Huang X., Wang Q., Li M., Yang L., Lin Y., Cai Y., Chen H., and Zhang Q. (2021). SARS-CoV-2 spike promotes inflammation and apoptosis through autophagy by ROS-suppressed PI3K/AKT/mTOR signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1;1867(12):166260.
85. Nelli R.K., Phadke K.S., Castillo G., Yen L., Saunders A., Rauh R., Nelson W., Bellaire B.H., and Giménez-Lirola L.G. (2021). Enhanced apoptosis as a possible mechanism to self-limit SARS-CoV-2 replication in porcine primary respiratory epithelial cells in contrast to human cells. *Cell Death Discovery*,10;7(1):383.
86. Zhu N., Wang W., Liu Z., Liang C., Wang W., Ye F., Huang B., Zhao L., Wang H., Zhou W., Deng Y., Mao L., Su C., Qiang G., Jiang T., Zhao J., Wu G., Song J., and Tan W. (2020). Morphogenesis and cytopathic effect of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelial cells. *Nature Communications*, 6;11(1):3910.
87. Bridges J.P., Vladar E.K., Huang H., and Mason R.J. (2022). Respiratory epithelial cell responses to SARS-CoV-2 in COVID-19. *Thorax*.77(2):203-209.
88. Krishnamachary B., Cook C., Kumar A., Spikes L, Chalise P., Dhillon N.K. (2021). Extracellular vesicle-mediated endothelial apoptosis and EV-associated proteins correlate with COVID-19 disease severity. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(9):e12117
89. Wang W., Chen J., Hu D., Pan P., Liang L., Wu W., Tang Y., Huang X.R., Yu X., Wu J., and Lan H.Y. (2022). SARS-CoV-2 N protein induces acute kidney injury via Smad3-Dependent G1 cell cycle arrest mechanism. *Advanced Science*, 9(3):e2103248.
90. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Møller R., Jordan T.X., Oishi K., Panis M., Sachs D., Wang T.T., Schwartz R.E., Lim J.K., Albrecht R.A. and tenOever B.R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 28;181(5):1036-1045.e9.
91. Huang L., Shi Y., Gong B., Jiang L., Zhang Z., Liu X., Yang J., He Y., Jiang Z., Zhong L., Tang J., You C., Jiang Q., Long B., Zeng T., Luo M., Zeng F., Wang S., Yang X., and Yang Z. (2021). Dynamic blood single-cell immune responses in patients with COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6;6(1):110.
92. André S., Picard M., Cezar R., Roux-Dalvai F., Alleaume-Butaux A., Soundaramourty C., Cruz A.S., Mendes-Frias A., Gotti C., Leclercq M., Nicolas A., Tauzin A., Carvalho A., Capela C., Pedrosa J., Castro A.G., Kundura L., Loubet P., Sotto A., Muller L., Lefrant J.Y., Roger C., Claret P.G., Duvnjak S, Tran T.A., Racine G., Zghidi-Abouzid O., Nioche P., Silvestre R., Droit A., Mammano F., Corbeau P., and Estaquier J. (2022). T cell apoptosis characterizes severe Covid-19 disease. *Cell death and Differentiation*, 29(8):1486-1499.

93. Thompson E.A., Cascino K., Ordonez A.A., Zhou W., Vaghasia A., Hamacher-Brady A., Brady N.R., Sun I.H., Wang R., Rosenberg A.Z., Delannoy M., Rothman R., Fenstermacher K., Sauer L., Shaw-Saliba K., Bloch E.M., Redd A.D., Tobian A.A.R., Horton M., Smith K., Pekosz A., D'Alessio F.R., Yegnasubramanian S., Ji H., Cox A.L., and Powell J.D. (2021). Metabolic programs define dysfunctional immune responses in severe COVID-19 patients. *Cell Reports*, 16;34(11):108863.
94. Xiang Q., Feng Z., Diao B., Tu C., Qiao Q., Yang H., Zhang Y., Wang G., Wang H., Wang C., Liu L., Wang C., Liu L., Chen R., Wu Y., and Chen Y. (2021). SARS-CoV-2 induces lymphocytopenia by promoting inflammation and decimates secondary lymphoid organs. *Frontiers in immunology*, 28;12:661052.
95. Zheng J., Wang Y., Li K., Meyerholz D.K., Allamargot C., and Perlman S. (2021). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-induced immune activation and death of monocyte-derived human Macrophages and Dendritic Cells. *Journal of the Infectious Diseases*, 3;223(5):785-795.
96. Simpson D.S., Pang J., Weir A., Kong I.Y., Fritsch M., Rashidi M., Cooney J.P., Davidson K.C., Speir M., Djajawi T.M., Hughes S., Mackiewicz L., Dayton M., Anderton H., Doerflinger M., Deng Y., Huang A.S., Conos S.A., Tye H., Chow S.H., Rahman A., Norton R.S., Naderer T., Nicholson S.E., Burgio G., Man S.M., Groom J.R., Herold M.J., Hawkins E.D., Lawlor K.E., Strasser A., Silke J., Pellegrini M., Kashkar H., Feltham R., and Vince J.E. (2022). Interferon- $\gamma$  primes macrophages for pathogen ligand-induced killing via a caspase-8 and mitochondrial cell death pathway. *Immunity*, 8;55(3):423-441.e9
97. Fitzgerald-Bocarsly P., Dai J., and Singh S. (2008). Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(1):3-19.
98. Lavrik I.N., and Krammer P.H. (2012). Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell death and Differentiation*, 19(1):36-41.
99. Wyler E., Mösbauer K., Franke V., Diag A., Gottula L.T., Arsiè R., Klironomos F., Koppstein D., Hönzke K., Ayoub S., Buccitelli C., Hoffmann K., Richter A., Legnini I., Ivanov A., Mari T., Del Giudice S., Papiès J., Praktiknjo S., Meyer T.F., Müller M.A., Niemeyer D., Hocke A., Selbach M., Akalin A., Rajewsky N., Drosten C., Landthaler M. (2021). Transcriptomic profiling of SARS-CoV-2 infected human cell lines identifies HSP90 as target for COVID-19 therapy. *iScience*, 19;24(3):102151.
100. Sun J., Ye F., Wu A., Yang R., Pan M., Sheng J., Zhu W., Mao L., Wang M., Xia Z., Huang B., Tan W., and Jiang T (2020). Comparative transcriptome analysis reveals the intensive early stage responses of host cells to SARS-CoV-2 infection. *Front Microbiology*, 25;11:593857.
101. Gordon D.E., Jang G.M., Bouhaddou M., Xu J., Obernier K., White K.M., O'Meara M.J., Rezelj V.V., Guo J.Z., Swaney D.L., Tummino T.A., Hüttenhain R., Kaake R.M., Richards A.L., Tutuncuoglu B., Foussard H., Batra J., Haas K., Modak M., Kim M., Haas P., Polacco B.J., Braberg H., Fabius J.M., Eckhardt M., Soucheray M., Bennett M.J., Cakir M., McGregor M.J., Li Q., Meyer B., Roesch F., Vallet T., Mac Kain A., Miorin L., Moreno E., Naing Z.Z.C., Zhou Y., Peng S., Shi Y., Zhang Z., Shen W., Kirby I.T., Melnyk J.E., and Krogan N.J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 583(7816):459-468.

102. Lu W., Zheng B.J., Xu K., Schwarz W., Du L., Wong C.K., Chen J., Duan S., Deubel V., and Sun B. (2006). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 15;103(33):12540-5.
103. Chan C.M., Tsoi H., Chan W.M., Zhai S., Wong C.O., Yao X., Chan W.Y., Tsui S.K., and Chan H.Y. (2009). The ion channel activity of the SARS-coronavirus 3a protein is linked to its pro-apoptotic function. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(11):2232-9.
104. Issa E., Merhi G., Panossian B., Salloum T., and Tokajian S. (2020). SARS-CoV-2 and ORF3a: Nonsynonymous mutations, functional domains, and viral pathogenesis. *mSystems*, 5;5(3):e00266-20.
105. Bianchi M., Borsetti A., Ciccozzi M., and Pascarella S. (2021). SARS-Cov-2 ORF3a: Mutability and function. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15;170:820-826.
106. Ren Y., Shu T., Wu D., Mu J., Wang C., Huang M., Han Y., Zhang X.Y., Zhou W., Qiu Y., and Zhou X. (2020). The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(8):881-883.
107. Yang R., Zhao Q., Rao J., Zeng F., Yuan S., Ji M., Sun X., Li J., Yang J., Cui J., Jin Z., Liu L., and Liu Z. (2021). SARS-CoV-2 accessory protein ORF7b mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in cells. *Frontiers in Microbiology*, 13;12:654709.
108. Xia B., Shen X., He Y., Pan X., Liu F.L., Wang Y., Yang F., Fang S., Wu Y., Duan Z., Zuo X., Xie Z., Jiang X., Xu L., Chi H., Li S., Meng Q., Zhou H., Zhou Y., Cheng X., Xin X., Jin L., Zhang H.L., Yu D.D., Li M.H., Feng X.L., Chen J., Jiang H., Xiao G., Zheng Y.T., Zhang L.K., Shen J., Li J., and Gao Z. (2021). SARS-CoV-2 envelope protein causes acute respiratory distress syndrome (ARDS)-like pathological damages and constitutes an antiviral target. *Cell Research*, 31(8):847-860
109. Llambi F., Wang Y.M., Victor B., Yang M., Schneider D.M., Gingras S., Parsons M.J., Zheng J.H., Brown S.A., Pelletier S., Moldoveanu T., Chen T., Green D.R. (2016). BOK is a non-canonical BCL-2 family effector of apoptosis regulated by ER-associated degradation. *Cell*, 7;165(2):421-33.
110. Ren Y., Wang A., Fang Y., Shu T., Wu D., Wang C., Huang M., Min J., Jin L., Zhou W., Qiu Y., and Zhou X. (2021). SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M triggers apoptosis with the assistance of nucleocapsid protein n in cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 25;11:706252.
111. Khan S., Aspe J.R., Asumen M.G., Almaguel F., Odumosu O., Acevedo-Martinez S., De Leon M, Langridge W.H., and Wall N.R. (2009). Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *British Journal of Cancer*, 100(7):1073-86.

112. Fukuda S., and Pelus L.M. (2001). Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood*, 1;98(7):2091-100.
113. Leung C.G., Xu Y., Mularski B., Liu H., Gurbuxani S., and Crispino J.D. (2007). Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine*, 9;204(7):1603-11
114. Andersson S.E., Svensson M.N., Erlandsson M.C., Dehlin M., Andersson K.M., and Bokarewa M.I. (2012). Activation of Fms-like tyrosine kinase 3 signaling enhances survivin expression in a mouse model of rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 7(10):e47668.
115. Singh P., Hoggatt J., Hu P., Speth J.M., Fukuda S., Breyer R.M., Pelus L.M. (2012). Blockade of prostaglandin E2 signaling through EP1 and EP3 receptors attenuates Flt3L-dependent dendritic cell development from hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 16;119(7):1671-82
116. Chen X., Duan N., Zhang C., and Zhang W. (2016). Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Journal in cancer*,10;7(3):314-23.
117. Ambrosini G., Adida C., and Altieri D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, 3(8):917-21.
118. Altieri D.C. (2015). Survivin-The inconvenient IAP. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 39:91-6.
119. Nogueira-Ferreira R., Vitorino R., Ferreira-Pinto M.J., Ferreira R., and Henriques-Coelho T. (2013). Exploring the role of post-translational modifications on protein-protein interactions with survivin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,15;538(2):64-70.
120. Vong Q.P., Cao K., Li H.Y., Iglesias P.A., Zheng Y. (2005). Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science*, 2;310(5753):1499-504.
121. Li Y., Lu W., Yang J., Edwards M., and Jiang S. (2021). Survivin as a biological biomarker for diagnosis and therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 21(11):1429-1441.
122. Güllülü Ö., Hehlhans S., Mayer B.E., Gößner I., Petraki C., Hoffmann M., Dombrowsky M.J., Kunzmann P., Hamacher K., Strebhardt K., Fokas E., Rödel C, Münch C., and Rödel F. (2021). A spatial and functional interaction of a heterotetramer Survivin-DNA-PKcs complex in DNA damage response. *Cancer Research*,1;81(9):2304-2317.
123. Hu S., Qu Y., Xu X., Xu Q., Geng J., and Xu J. (2013). Nuclear survivin and its relationship to DNA damage repair genes in non-small cell lung cancer investigated using tissue array. *PLoS One*,16;8(9):e74161.

124. Ju L., Zhang X., Deng Y., Han J., Yang J., Chen S., Fang Q., Yang Y., and Jia W. (2017). Enhanced expression of Survivin has distinct roles in adipocyte homeostasis. *Cell Death and Disease*, 5;8(1):e2533.
125. Conde M., Michen S., Wiedemuth R., Klink B., Schröck E., Schackert G., and Temme A. (2017). Chromosomal instability induced by increased BIRC5/Survivin levels affects tumorigenicity of glioma cells. *BMC Cancer*, 28;17(1):889.
126. Fukuda S., and Pelus L.M. (2006). Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(5):1087-98.
127. Paul A., Krelin Y., Arif T., Jeger R., and Shoshan-Barmatz V. (2018). A new role for the mitochondrial pro-apoptotic protein SMAC/Diablo in phospholipid synthesis associated with tumorigenesis. *Molecular Therapy*, 26(3):680-694.
128. Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 7;102(1):33-42.
129. Hu F., Pan D., Zheng W., Yan T., He X., Ren F., Lu Y., and Ma X. (2017). Elucidating respective functions of two domains BIR and C-helix of human IAP survivin for precise targeted regulating mitotic cycle, apoptosis and autophagy of cancer cells. *Oncotarget*, 1;8(69):113687-113700.
130. Kelly R.J., Lopez-Chavez A., Citrin D., Janik J.E, Morris J.C. (2011). Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Molecular Cancer*, 6;10:35.
131. Venkatesan N., Kanwar J.R., Deepa P.R., Navaneethakrishnan S., Joseph C., and Krishnakumar S. (2016). Targeting HSP90/Survivin using a cell permeable structure based peptido-mimetic shepherdin in retinoblastoma. *Chemico-Biological Interactions*, 25;252:141-9
132. Zhang T., Otevrel T., Gao Z., Ehrlich S.M., Fields J.Z., and Boman B.M. (2001). Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Research*, 15;61(24):8664-7.
133. Jiang Y, Saavedra H.I., Holloway M.P., Leone G., and Altura R.A. (2004). Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 24;279(39):40511-20.
134. Martini E., Schneider E., Neufert C., Neurath M.F., and Becker C. (2016). Survivin is a guardian of the intestinal stem cell niche and its expression is regulated by TGF- $\beta$ . *Cell Cycle*, 15(21):2875-2881.
135. Hagenbuchner J, Kuznetsov A.V., Obexer P., and Ausserlechner M.J. (2013). BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. *Oncogene*, 32(40):4748-57.
136. Boidot R., Végran F., and Lizard-Nacol S. (2014). Transcriptional regulation of the survivin gene. *Molecular Biology Reports*, 41(1):233-40.

137. Knauer S.K., Krämer O.H., Knösel T., Engels K., Rödel F., Kovács A.F., Dietmaier W., Klein-Hitpass L., Habtemichael N., Schweitzer A., Brieger J., Rödel C., Mann W., Petersen I., Heinzl T., and Stauber R.H. (2007). Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *FASEB Journal*, 21(1):207-16.
138. Dohi T., Beltrami E, Wall N.R., Plescia J., Altieri D.C (2004). Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *European Journal of Clinical Investigation*, 114(8):1117-27.
139. Pavlyukov M.S., Antipova N.V., Balashova M.V., Vinogradova T.V., Kopantzev E.P. and Shakhparonov M.I. (2011). Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26):23296-307.
140. Song Z., Liu S., He H., Hoti N., Wang Y., Feng S., and Wu M. (2004). A single amino acid change (Asp 53 --> Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3):1287-96.
141. Roca H., Varsos Z., Pienta K.J. (2008). CCL2 protects prostate cancer PC3 cells from autophagic death via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent survivin up-regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 5;283(36):25057-73.
142. Wang Q., Chen Z., Diao X., and Huang S. (2011). Induction of autophagy-dependent apoptosis by the survivin suppressant YM155 in prostate cancer cells. *Cancer Letter*, 1;302(1):29-36.
143. Ahn J.K, Oh J.M., Lee J., Bae E.K., Ahn K.S., Cha H.S., and Koh E.M. (2010). Increased extracellular survivin in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients: fibroblast-like synoviocytes as a potential source of extracellular survivin. *Inflammation*, 33(6):381-8.
144. Smith M.D., Weedon H., Papangelis V., Walker J., Roberts-Thomson P.J., and Ahern M.J. (2010). Apoptosis in the rheumatoid arthritis synovial membrane: modulation by disease-modifying anti-rheumatic drug treatment. *Rheumatology*, 49(5):862-75.
145. Kusner L.L., Ciesielski M.J., Marx A., Kaminski H.J., and Fenstermaker R.A (2014). Survivin as a potential mediator to support autoreactive cell survival in myasthenia gravis: a human and animal model study. *PLoS One*, 22;9(7):e102231.
146. Sharief M.K., and Semra Y.K. (2001). Heightened expression of survivin in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 1;119(2):358-64.
147. Legorreta-Haquet M.V, Flores-Fernández R., Blanco-Favela F., Fuentes-Pananá E.M., Chávez-Sánchez L., Hernández-González R., Tesoro-Cruz E., Arriaga-Pizano L., and Chávez-Rueda A.K. (2013). Prolactin levels correlate with abnormal B cell maturation in MRL and MRL/lpr mouse models of systemic lupus erythematosus-like disease. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013:287469.
148. Ebrahimiyan H., Aslani S., Rezaei N., Jamshidi A., and Mahmoudi M. (2018). Survivin and autoimmunity; the ins and outs. *Immunol Letter*, 193:14-24.

149. Koike Y., Muroi E., Yoshizaki A., Ogawa F., Yanaba K., Takenaka M., Shimizu K., and Sato S. (2010). Autoantibody against survivin in patients with systemic sclerosis. *Journal of Rheumatology*, 37(9):1864-70.
150. Ai M.D., Li L.L., Zhao X.R., Wu Y., Gong J.P., and Cao Y. (2005). Regulation of survivin and CDK4 by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Cell Research*, 15(10):777-84.
151. Borbely AA, Murvai M, Szarka K et al. (2007) Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *Journal of Clinical Pathology*, 60:303–6.
152. Zhu Y., Roshal M., Li F., Blackett J., and Planelles V. (2003). Upregulation of survivin by HIV-1 Vpr. *Apoptosis*, 8(1):71-9.
153. D'Agostino D.M., Bernardi P., Chieco-Bianchi L., and Ciminale V. (2005) Mitochondria as functional targets of proteins coded by human tumor viruses. *Advances in Cancer Research*, 94:87-142.
154. Kahrizi M.S., Nasiri K., Ebrahimzadeh F., Yaseri A.F., Ghodrati Zadeh S., Gholamrezaei M., Rahat Dahmardeh A., Adili A., Amjidifar R., Hemmatzadeh M., Arabi M., Maghsoudi M.R., and Mohammadi H. (2024). Lymphopenia associated with survivin and its downstream pathway in COVID-19 serving as a potential route in COVID-19 pathogenesis. *Advances in Medical Sciences*, 69(1):190-197.
155. Mormile R. (2021). COVID-19 myocarditis and lasting heart damage: is deregulation of the Beclin1-Survivin axis the critical step of pathogenesis? *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 19(8):681-683
156. Wilson W.R., and Hay M.P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11(6):393-410.
157. Penn J.S., Madan A., Caldwell R.B., Bartoli M., Caldwell R.W., and Hartnett M.E. (2008). Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(4):331-71.
158. Ziello J.E., Jovin I.S., and Huang Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 80(2):51-60.
159. Li Y., Xia Z.L., and Chen L.B. (2011). HIF-1- $\alpha$  and survivin involved in the anti-apoptotic effect of 2ME2 after global ischemia in rats. *Neurological Research*, 33(6):583-92.
160. Wang Y.F., Ma S.R., Wang W.M., Huang C.F., Zhao Z.L., Liu B., Zhang W.F., Zhao Y.F., Zhang L., and Sun Z.J. (2014). Inhibition of survivin reduces HIF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and TFE3 in salivary adenoid cystic carcinoma. *PLoS One*, 8;9(12):114051.
161. Chen Y.Q., Zhao C.L., and Li W. (2009). Effect of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  on transcription of survivin in non-small cell lung cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 26;28(1):29.

162. Qiao Q., Nozaki Y., Sakoe K., Komatsu N., and Kirito K. (2010). NF- $\kappa$ B mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma. *Experimental Hematology*, 38(12):1199-208.
163. Sporn M.B., and Roberts A.B. (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *Journal of Cell Biology*.119(5):1017-21.
164. Blobel G.C., Schiemann W.P., and Lodish H.F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *New England Journal of Medicine*, 4;342(18):1350-8
165. Gao J., Zhu Y., Nilsson M., and Sundfeldt K. (2014). TGF- $\beta$  isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. *Cancer Cell International*, 9;14(1):72.
166. Liu R.Y., Zeng Y., Lei Z., Wang L., Yang H., Liu Z., Zhao J., Zhang H.T. (2014). JAK/STAT3 signaling is required for TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *International Journal of Oncology*,44(5):1643-51.
167. Takai E., Tsukimoto M., and Kojima S. (2013). TGF- $\beta$ 1 downregulates COX-2 expression leading to decrease of PGE2 production in human lung cancer A549 cells, which is involved in fibrotic response to TGF- $\beta$ 1. *PLoS One*, 2;8(10):e76346.
168. Cho K.H., Jeong K.J, Shin S.C., Kang J., Park C.G., and Lee H.Y. (2013). STAT3 mediates TGF- $\beta$ 1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion. *Cancer Letter*, 9;336(1):167-73.
169. Derynck R., Akhurst R.J., and Balmain A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, 29(2):117-29.
170. Wahdan-Alaswad R.S., Song K., Krebs T.L., Shola D.T., Gomez J.A., Matsuyama S., and Danielpour D. (2010). Insulin-like growth factor I suppresses bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cells by activating mTOR signaling. *Cancer Research*, 15;70(22):9106-17.
171. Song K., Shankar E., Yang J, Bane K.L., Wahdan-Alaswad R., and Danielpour D. (2013). Critical role of a survivin/TGF- $\beta$ /mTORC1 axis in IGF-I-mediated growth of prostate epithelial cells. *PLoS One*, 1;8(5):e61896.
172. Yang J., Song K., Krebs T.L., Jackson M.W., Danielpour D. (2008). Rb/E2F4 and Smad2/3 link survivin to TGF-beta-induced apoptosis and tumor progression. *Oncogene*, 11;27(40):5326-38.
173. Cuervo A.M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biology*, 14(2):70-7.
174. He L., Zhang J., Zhao J., Ma N., Kim S.W., Qiao S., Ma X. (2018). Autophagy: The last defense against cellular nutritional stress. *Advances in Nutrition*, 1;9(4):493-504.
175. Guo F., Liu X., Cai H., and Le W. (2018). Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain Pathology*, 28(1):3-13.

176. Zhao J., Zhai B., Gygi S.P., Goldberg A.L. (2015). mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proc National Academy of Sciences*, 29;112(52):15790-7.
177. Bento C.F., Renna M., Ghislat G., Puri C., Ashkenazi A., Vicinanza M., Menzies F.M., Rubinsztein D. C. (2016). Mammalian autophagy: How does it work? *Annual Review of Biochemistry*, 2;85:685-713.
178. Chun Y., and Kim J. (2018). Autophagy: An essential degradation program for cellular homeostasis and life. *Cells*,19;7(12):278.
179. Jewell J.L., Russell R.C., and Guan K.L. (2013). Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(3):133-9.
180. Hardie D.G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*, 15;25(18):1895-908.
181. Liu Y., Shoji-Kawata S., Sumpter RM Jr., Wei Y., Ginet V., Zhang L., Posner B., Tran K.A., Green D.R., Xavier R.J., Shaw S.Y., Clarke P.G., Puyal J., Levine B. (2013). Autosis is a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 17;110(51):20364-71.
182. Kondo Y., Kanzawa T., Sawaya R., and Kondo S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer*, 5(9):726-34.
183. Baehrecke E.H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6):505-10
184. Edinger, A., and Thompson, C. (2004). Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 663–669.
185. Puri C., Renna M., Bento C.F., Moreau K., Rubinsztein D.C. (2013). Diverse autophagosomal membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*, 12;154(6):1285-99.
186. Perrone L., Squillaro T., Napolitano F., Terracciano C., Sampaolo S., and Melone M.A.B. (2019). The autophagy signaling pathway: A potential multifunctional therapeutic target of curcumin in neurological and neuromuscular diseases. *Nutrients*, 13;11(8):1881.
187. Ohsumi Y., and Mizushima N. (2004). Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15(2):231-6.
188. Jung C.H., Jun C.B., Ro S.H., Kim Y.M., Otto N.M., Cao J., Kundu M., and Kim D.H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7):1992-2003.
189. Fan W., Nassiri A., and Zhong Q. (2011). Autophagosomal targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10;108(19):7769-74.

190. He C., and Levine B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2):140-9.
191. Soleimani V., Sahebkar A., Hosseinzadeh H. (2018). Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review in *Phytotherapy Research*, 32(6):985-995.
192. Shao Y., Gao Z., Feldman T., Jiang X. (2007). Stimulation of ATG12-ATG5 conjugation by ribonucleic acid. *Autophagy*, 3(1):10-6.
193. Fujita, N.; Hayashi-Nishino, M.; Fukumoto, H.; Omori, H.; Yamamoto, A.; Noda, T.; Yoshimori, T. (2008). An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 4651–4659.
194. Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., and Yoshimori T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO Journal*, 1;19(21):5720-8.
195. Ravikumar B., Acevedo-Arozena A., Imarisio S., Berger Z., Vacher C., O'Kane C.J., Brown S.D., and Rubinsztein D.C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nature Genetics*, 37(7):771-6.
196. Itakura E., Kishi-Itakura C., and Mizushima N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 7;151(6):1256-69.
197. Prerna K., Dubey V.K. (2022). Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15;204:258-273.
198. Hong C.J., Park H., Yu S.W. (2016). Autophagy for the quality control of adult hippocampal neural stem cells. *Brain Research*, 1649, 166–172.
199. Scherz-Shouval R., and Elazar Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biology*, 17(9):422-7.
200. Codogno P., and Meijer A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell death and Differentiation*, 12 Suppl 2:1509-18.
201. Sardiello M., Palmieri M., di Ronza A., Medina D.L., Valenza M., Gennarino V.A., Di Malta C., Donaudy F., Embrione V., Polishchuk R.S., Banfi S., Parenti G., Cattaneo E., and Ballabio A. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, 24;325(5939):473-7.
202. Polager S., Ofir M., and Ginsberg D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*.14;27(35):4860-4.
203. Lee I.H., Cao L., Mostoslavsky R., Lombard D.B., Liu J., Bruns NE., Tsokos M., and Alt FW, Finkel T. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4;105(9):3374-9.

204. Scherz-Shouval R., Shvets E., Fass E., Shorer H., Gil L., and Elazar Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO Journal*, 4;26(7):1749-60.
205. Yan Y., and Finkel T. (2017). Autophagy as a regulator of cardiovascular redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 109:108-113.
206. Klionsky D.J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11):931-7.
207. Glick D., Barth S., and Macleod K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, 221(1):3-12.
208. Debnath J. and Leidal A.M. (2022). Secretory autophagy during lysosome inhibition (SALI). *Autophagy*, 18(10):2498-2499.
209. Takeshita F., Kobiyama K., Miyawaki A., Jounai N., and Okuda K. (2008). The non-canonical role of Atg family members as suppressors of innate antiviral immune signaling. *Autophagy*, 4(1):67-9.
210. Dahmane S., Shankar K., and Carlson LA. A(2023). 3D view of how enteroviruses hijack autophagy. *Autophagy*, 19(7):2156-2158
211. Morita K., Hama Y., Izume T., Tamura N., Ueno T., Yamashita Y., Sakamaki Y., Mimura K., Morishita H., Shihoya W., Nureki O., Mano H., and Mizushima N. (2018). Genome-wide CRISPR screen identifies TMEM41B as a gene required for autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, 5;217(11):3817-3828.
212. Wang J., Gu B.J., Masters C.L., and Wang Y.J. (2017). A systemic view of Alzheimer disease- insights from amyloid- $\beta$  metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology*, 13(11):703.
213. Li W.W., Li J., and Bao J.K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(7):1125-36.
214. Lee M.S., and Kim Y.J. (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual Review of Biochemistry*, 76:447-80.
215. Zhou D., Kang K.H., and Spector S.A. (2012). Production of interferon  $\alpha$  by human immunodeficiency virus type 1 in human plasmacytoid dendritic cells is dependent on induction of autophagy. *Journal of the Infectious Diseases*, 15;205(8):1258-67.
216. Prentice E., Jerome W.G., Yoshimori T., Mizushima N., and Denison M.R. (2004). Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 12;279(11):10136-41.
217. Miller K., McGrath M.E., Hu Z., Ariannejad S., Weston S., Frieman M., Jackson W.T. (2020). Coronavirus interactions with the cellular autophagy machinery. *Autophagy*, 16(12):2131-2139.

218. Prentice E., McAuliffe J., Lu X., Subbarao K., Denison M.R. (2004). Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *Journal of Virology*, 78(18):9977-86.
219. Cottam E.M., Maier H.J., Manifava M., Vaux L.C., Chandra-Schoenfelder P., Gerner W., Britton P., Ktistakis N.T., and Wileman T. (2011). Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy*, 7(11):1335-47.
220. Snijder E.J., van der Meer Y., Zevenhoven-Dobbe J., Onderwater J.J., van der Meulen J., Koerten H.K., and Mommaas A.M. (2006). Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *Journal of Virology*, 80(12):5927-40.
221. Benvenuto D., Angeletti S., Giovanetti M., Bianchi M., Pascarella S., Cauda R., Ciccozzi M., and Cassone A. (2020). Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy. *Journal of Infection*, 81(1):e24-e27.
222. Fung T.S., Huang M., Liu D.X. (2014). Coronavirus-induced ER stress response and its involvement in regulation of coronavirus-host interactions. *Virus Research*, 19;194:110-23.
223. Fung T.S., Liu D.X. (2014). Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Frontiers in Microbiology*, 17;5:296.
224. Nabirovichkin S., Peluffo A.E., and Bouaziz J. (2020). Focusing on the unfolded protein response and autophagy related pathways to reposition common approved drugs against COVID-19. Preprint from *MDPI*
225. Wang C.W., Klionsky D.J (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Molecular Medicine*, 9(3-4):65-76.
226. Liang X.H., Kleeman L.K., Jiang H.H., Gordon G., Goldman J.E., Berry G., Herman B., and Levine B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of Virology*, 72(11):8586-96.
227. Lee E.F., Perugini M.A., Pettikiriachchi A., Evangelista M., Keizer D.W., Yao S., and Fairlie W.D. (2016). The BECN1 N-terminal domain is intrinsically disordered. *Autophagy*, 12(3):460-71.
228. Yao S., Lee E.F., Pettikiriachchi A., Evangelista M., Keizer D.W., Fairlie W.D. (2016). Characterisation of the conformational preference and dynamics of the intrinsically disordered N-terminal region of Beclin 1 by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864(9):1128-1137.
229. Itakura E., Kishi C., Inoue K., and Mizushima N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12):5360-72.
230. Matsunaga K., Saitoh T., Tabata K., Omori H., Satoh T., Kurotori N., Maejima I., Shirahama-Noda K., Ichimura T., Isobe T., Akira S., Noda T., and Yoshimori T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature Cell Biology*, 11(4):385-96.

231. Sun Q., Fan W., Chen K., Ding X., Chen S., Zhong Q. (2008). Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49):19211-6.
232. Zhong Y., Wang Q.J., Li X., Yan Y., Backer J.M., Chait B.T., Heintz N., and Yue Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature Cell Biology*, 11(4):468-76.
233. Diao J., Liu R., Rong Y., Zhao M., Zhang J., Lai Y., Zhou Q., Wilz L.M., Li J., Vivona S., Pfuetzner R.A., Brunger A.T., and Zhong Q. (2015). ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 23;520(7548):563-6.
234. Hamasaki M., Furuta N., Matsuda A., Nezu A., Yamamoto A., Fujita N., Oomori H., Noda T., Haraguchi T., Hiraoka Y., Amano A., and Yoshimori T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 21;495(7441):389-93.
235. Kim H.J., Zhong Q., Sheng Z.H., Yoshimori T., Liang C., Jung J.U. (2012). Beclin-1-interacting autophagy protein Atg14L targets the SNARE-associated protein Snapin to coordinate endocytic trafficking. *Journal of Cell Science*, 15;125:4740-50.
236. Liang C., Feng P., Ku B., Dotan I., Canaani D., Oh B.H., and Jung J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature Cell Biology*, 8(7):688-99.
237. Munson M.J., Allen G.F., Toth R., Campbell D.G., Lucocq J.M., and Ganley I.G. (2015). mTOR activates the VPS34-UVRAG complex to regulate autolysosomal tubulation and cell survival. *EMBO Journal*, 2;34(17):2272-90.
238. Robinson J.S., Klionsky D.J., Banta L.M., and Emr S.D. (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Journal of Molecular Cell Biology*, 8(11):4936-48.
239. Tsukada M. and Ohsumi Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 25;333(1-2):169-74.
240. Nishimura T., and Tooze S.A. (2020). Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discovery*, 26;6(1):32.
241. Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D. and Levine B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 23;122(6):927-39.
242. Ciechomska I.A., Goemans G.C., Skepper J.N., and Tolkovsky A.M. (2009). Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene*, 28;28(21):2128-41.

243. Pimkina J., Humbey O., Zilfou J.T., Jarnik M., Murphy M.E (2009). ARF induces autophagy by virtue of interaction with Bcl-xl. *Journal of Biological Chemistry*, 30;284(5):2803-2810.
244. Di Bartolomeo S., Corazzari M., Nazio F., Oliverio S., Lisi G., Antonioli M., Pagliarini V., Matteoni S., Fuoco C., Giunta L., D'Amelio M., Nardacci R., Romagnoli A., Piacentini M., Cecconi F., and Fimia GM. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *Journal of Cell Biology*, 4;191(1):155-68
245. Wei Y., Pattingre S., Sinha S., Bassik M., and Levine B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell*, 20;30(6):678-88.
246. Tang D., Kang R., Livesey K.M., Cheh C.W., Farkas A., Loughran P., Hoppe G., Bianchi M.E., Tracey K.J., Zeh H.J., and Lotze M.T. (2010). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *Journal of Cell Biology*, 6;190(5):881-92.
247. Rocchi A., Yamamoto S., Ting T., Fan Y., Sadleir K., Wang Y., Zhang W., Huang S., Levine B., Vassar R., and He C. (2017). A Becn1 mutation mediates hyperactive autophagic sequestration of amyloid oligomers and improved cognition in Alzheimer's disease. *PLoS Genetic*, 14;13(8):e1006962.
248. Fernández Á.F., Sebti S., Wei Y., Zou Z., Shi M., McMillan K.L., He C., Ting T., Liu Y., Chiang W.C., Marciano D.K., Schiattarella G.G., Bhagat G., Moe O.W., Hu M.C., and Levine B. (2018). Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature*. 558(7708):136-140.
249. Maejima Y., Kyoj S., Zhai P., Liu T., Li H., Ivessa A., Sciarretta S., Del Re D.P., Zablocki D.K., Hsu C.P., Lim D.S., Isobe M., and Sadoshima J. (2013). Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *Nature Medicine*, (11):1478-88.
250. Amaravadi R.K., Kimmelman A.C., and Debnath J. (2019). Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions. *Cancer Discovery*, 9(9):1167-1181.
251. Mulcahy Levy J.M., and Thorburn A. (2020). Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell death and Differentiation*, 27(3):843-857.
252. Yun C.W., and Lee S.H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 5;19(11):3466.
253. Niu T.K., Cheng Y., Ren X., Yang J.M. (2010). Interaction of Beclin 1 with survivin regulates sensitivity of human glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Letter*, 20;584(16):3519-24.
254. Münz C. (2011). Beclin-1 targeting for viral immune escape. *Viruses*, 3(7):1166-78.
255. Gannagé M., Dormann D., Albrecht R., Dengjel J., Torossi T., Rämer P.C., Lee M., Strowig T., Arrey F., Conenello G., Pypaert M., Andersen J., García-Sastre A., and Münz C. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*, 22;6(4):367-80.

256. Zhou D., and Spector S.A. (2008). Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. *AIDS*, 30;22(6):695-9.
257. Rubio R.M., and Mohr I. (2019). Inhibition of ULK1 and Beclin1 by an  $\alpha$ herpesvirus Akt-like Ser/Thr kinase limits autophagy to stimulate virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116:26941–26950.
258. Liang Q., Seo G.J., Choi Y.J., Kwak M.J., Ge J., Rodgers M.A., Shi M., Leslie B.J., Hopfner K.P., Ha T., Oh B.H., and Jung J.U. (2014). Crosstalk between the cGAS DNA sensor and Beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses. *Cell Host & Microbe*, 12;15(2):228-38.
259. Chen X., Wang K., Xing Y., Tu J., Yang X., Zhao Q., Li K., and Chen Z. (2014). Coronavirus membrane-associated papain-like proteases induce autophagy through interacting with Beclin1 to negatively regulate antiviral innate immunity. *Protein Cell*, 5(12):912-27.
260. Devaraj S.G., Wang N., Chen Z., Chen Z., Tseng M., Barretto N., Lin R., Peters C.J., Tseng C.T., Baker S.C., and Li K. (2007). Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44):32208-21.
261. Xing Y., Chen J., Tu J., Zhang B., Chen X., Shi H., Baker S.C., Feng L., Chen Z. (2013). The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *Journal of General Virology*, 94(Pt 7):1554-1567.
262. Kindrachuk J., Ork B., Hart B.J., Mazur S., Holbrook M.R., Frieman M.B., Traynor D., Johnson R.F., Dyal J., Kuhn J.H., Olinger G.G., Hensley L.E., Jahrling P.B. (2015). Antiviral potential of ERK/MAPK and PI3K/AKT/mTOR signaling modulation for Middle East respiratory syndrome coronavirus infection as identified by temporal kinome analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2):1088-99.
263. Gassen N.C., Niemeyer D., Muth D., Corman V.M., Martinelli S., Gassen A., Hafner K., Papies J., Mösbauer K., Zellner A., Zannas A.S., Herrmann A., Holsboer F., Brack-Werner R., Boshart M., Müller-Myhsok B., Drosten C., Müller M.A., and Rein T. (2019). SKP2 attenuates autophagy through Beclin1-ubiquitination and its inhibition reduces MERS-Coronavirus infection. *Nature Communications*, 18;10(1):5770.
264. Oudshoorn D., Rijs K., Limpens R.W.A.L., Groen K., Koster A.J., Snijder E.J., Kikkert M., and Bárcena M. (2017). Expression and Cleavage of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp3-4 Polyprotein Induce the Formation of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated with Coronaviral RNA Replication. *mBio*, 21;8(6):e01658-17.
265. Snijder E.J., Limpens R.W.A.L., de Wilde A.H., de Jong A.W.M., Zevenhoven-Dobbe J.C., Maier H.J., Faas F.F.G.A., Koster A.J, and Bárcena M. (2020). A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLOS Biology*, 8;18(6):e3000715.

266. Carmona-Gutierrez D., Bauer M.A., Zimmermann A., Kainz K., Hofer S.J., Kroemer G., and Madeo F. (2020). Digesting the crisis: autophagy and coronaviruses. *Microbial Cell*, 4;7(5):119-128.
267. Zhao Z., Lu K., Mao B., Liu S., Trilling M., Huang A., Lu M., and Lin Y. (2021). The interplay between emerging human coronavirus infections and autophagy. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1):196-205.
268. Shojaei S., Suresh M., Klionsky D.J., Labouta H.I., and Ghavami S. (2020). Autophagy and SARS-CoV-2 infection: A possible smart targeting of the autophagy pathway. *Virulence*, 11(1):805-810.
269. Hooper K.M., Barlow P.G., Henderson P., and Stevens C. (2019). Interactions between autophagy and the unfolded protein response: implications for inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel disease*, 14;25(4):661-671.
270. Salminen A., Kaarniranta K., Kauppinen A., Ojala J., Haapasalo A., Soininen H., and Hiltunen M. (2013). Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Progress in Neurobiology*, 106-107:33-54.
271. Naguib M., and Rashed L.A. (2018). Serum level of the autophagy biomarker Beclin-1 in patients with diabetic kidney disease. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 143:56-61.
272. Fu L.L., Cheng Y., and Liu B. (2013). Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(5):921-4..
273. Okuyan H.M., Dogan S., Bal T., and Çabalak M. (2021). Beclin-1, an autophagy-related protein, is associated with the disease severity of COVID-19. *Life Science*, 1;278:119596.
274. Zhang H., Bosch-Marce M., Shimoda L.A., Tan Y.S., Baek J.H., Wesley J.B., Gonzalez F.J., and Semenza G.L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 18;283(16):10892-903.
275. Dong M., Wan X.B., Yuan Z.Y., Wei L., Fan X.J., Wang T.T., Lv Y.C., Li X., Chen Z.H., Chen J., Lin Q., Wen J.Y., Ma X.K., Liu Q., and Wu X.Y. (2013). Low expression of Beclin 1 and elevated expression of HIF-1 $\alpha$  refine distant metastasis risk and predict poor prognosis of ER-positive, HER2-negative breast cancer. *Medical Oncology*, 30(1):355.
276. Yang Z.J., Chee C.E., Huang S., and Sinicrope F.A. (2011). The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(9):1533-41.
277. Cui J., Gong Z., and Shen H.M. (2013). The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta*, 1836(1):15-26.
278. Gozuacik D., and Kimchi (2004). A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 12;23(16):2891-906.

279. Wei J., Zhu K., Yang Z., Zhou Y., Xia Z., Ren J., Zhao Y., Wu G., and Liu C. (2023). Hypoxia-Induced Autophagy Is Involved in Radioresistance via HIF1A-Associated Beclin-1 in Glioblastoma Multiforme. *Heliyon*, 7;9(1):e12820.
280. Fabregat I., Fernando J., Mainez J., and Sancho P. (2014). TGF-beta signaling in cancer treatment. *Current Pharmaceutical Design*, 20(17):2934-47.
281. Ikushima H., and Miyazono K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 10(6):415-24.
282. Taniguchi H., Kato N., Otsuka M., Goto T., Yoshida H., Shiratori Y., and Omata M. (2004). Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription. *Journal of Medical Virology*, 72(1):52-9.
283. Lin W., Tsai W.L., Shao R.X., Wu G., Peng L.F., Barlow L.L., Chung W.J., Zhang L., Zhao H., Jang J.Y., Chung R.T. (2010). Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. *Gastroenterology*, 138(7):2509-18, 2518.e1.
284. Lee M.N., Jung E.Y., Kwun H.J., Jun H.K., Yu D.Y., Choi Y.H., Jang K.L. (2002). Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF-beta pathway. *Journal of General Virology*, 83(Pt 9):2145-2151.
285. Lee D.K., Park S.H., Yi Y., Choi S.G., Lee C., Parks W.T., Cho H., de Caestecker M.P., Shaul Y., Roberts A.B., Kim S.J. (2001). The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis. *Genes & Development*, 15;15(4):455-66.
286. Zhu H., Luo H., Shen Z., Hu X., Sun L., and Zhu X. (2016). Transforming growth factor- $\beta$ 1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer. *Tumor Biology*, 37(6):7075-83.
287. Rendón-Ramírez E.J., Ortiz-Stern A., Martínez-Mejía C., Salinas-Carmona M.C., Rendon A., Mata-Tijerina V.L., Rosas-Taraco A.G. (2015). TGF- $\beta$  blood levels distinguish between Influenza A (H1N1) pdm09 virus sepsis and sepsis due to other forms of community-acquired pneumonia. *Viral immunology*, 28(5):248-54.
288. Carlson C.M., Turpin E.A., Moser L.A., O'Brien K.B., Cline T.D., Jones J.C., Tumpey T.M., Katz J.M., Kelley L.A., Gaudie J., and Schultz-Cherry S. (2010). Transforming growth factor- $\beta$ : activation by neuraminidase and role in highly pathogenic H5N1 influenza pathogenesis. *PLOS Pathogens*, 7;6(10):e1001136.
289. Furuya Y., Furuya A.K., Roberts S., Sanfilippo A.M., Salmon S.L., and Metzger D.W. (2015). Prevention of Influenza Virus-Induced Immunopathology by TGF- $\beta$  Produced during Allergic Asthma. *PLOS Pathogens*, 25;11(9):e1005180.
290. Li S.W., Wang C.Y., Jou Y.J., Yang T.C., Huang S.H., Wan L., Lin Y.J., and Lin C.W. (2016). SARS coronavirus papain-like protease induces Egr-1-dependent up-regulation of TGF- $\beta$ 1 via ROS/p38 MAPK/STAT3 pathway. *Scientific Reports*, 13;6:25754.

291. Zhao X., Nicholls J.M., and Chen Y.G. (2008). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus nucleocapsid protein interacts with Smad3 and modulates transforming growth factor-beta signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 8;283(6):3272-3280.
292. Wang C.Y., Lu C.Y., Li S.W., Lai C.C., Hua C.H., Huang S.H., Lin Y.J., Hour M.J., and Lin C.W. (2017). SARS coronavirus papain-like protease up-regulates the collagen expression through non-Samd TGF- $\beta$ 1 signaling. *Virus Research*, 2;235:58-66.
293. Kiyono K., Suzuki H.I., Matsuyama H., Morishita Y., Komuro A., Kano M.R., Sugimoto K., and Miyazono K. (2009). Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, 1;69(23):8844-52.
294. Fitzwalter B.E., Towers C.G., Sullivan K.D., Andrysik Z., Hoh M., Ludwig M., O'Prey J., Ryan K.M., Espinosa J.M., Morgan M.J., and Thorburn A. (2018). Autophagy Inhibition Mediates Apoptosis Sensitization in Cancer Therapy by Relieving FOXO3a Turnover. *Developmental Cell*, 12;44(5):555-565.e3.
295. Brunelli F., Torosantucci L., Gelmetti V., Franzone D., Grünewald A., Krüger R., Arena G., and Valente E.M. (2022). PINK1 Protects against Staurosporine-Induced Apoptosis by Interacting with Beclin1 and Impairing Its Pro-Apoptotic Cleavage. *Cells*, 15;11(4):678.
296. Sukumaran P., Nascimento Da Conceicao V., Sun Y., Ahamad N., Saraiva L.R., Selvaraj S., Singh B.B. (2021). Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cells*, 18;10(8):2125.
297. Sezgin E., Levental I., Mayor S., and Eggeling C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (6):361-374.
298. Garofalo T., Manganelli V., Grasso M., Mattei V., Ferri A., Misasi R., and Sorice M. (2015). Role of mitochondrial raft-like microdomains in the regulation of cell apoptosis. *Apoptosis*, 20(5):621-34.
299. Manganelli V., Matarrese P., Antonioli M., Gambardella L., Vescovo T., Gretzmeier C., Longo A., Capozzi A., Recalchi S., Riitano G., Misasi R., Dengjel J., Malorni W., Fimia G.M., Sorice M., and Garofalo T. (2021). Raft-like lipid microdomains drive autophagy initiation via AMBRA1-ERLIN1 molecular association within MAMs. *Autophagy*, 17(9):2528-2548.
300. Celia A.I., Colafrancesco S., Barbati C., Alessandri C., and Conti F. (2022). Autophagy in Rheumatic Diseases: Role in the Pathogenesis and Therapeutic Approaches. *Cells*. 15;11(8):1359.
301. Ghafouri E., Bigdeli M., Khalafiyani A., Amirkhani Z., Ghanbari R., Hasan A., Khanahmad H., Boshtam M., and Makvandi P. (2023). Unmasking the complex roles of hypocalcemia in cancer, COVID-19, and sepsis: Engineered nanodelivery and diagnosis. *Environmental Research*, 1;238(Pt 1):116979.

302. Alemzadeh E., Alemzadeh E., Ziaee M., Abedi A., and Salehiniya H. (2021). The effect of low serum calcium level on the severity and mortality of Covid patients: A systematic review and meta-analysis. *Immunity, Inflammation and Disease*, 9(4):1219-1228.
303. Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., and Kroemer G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9):741-52.
304. Kaminsky V.O., Piskunova T., Zborovskaya I.B., Tchevkina E.M., and Zhivotovsky B. (2012). Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy*, 1;8(7):1032-44.
305. Jiang J.H., Wang N., Li A., Liao W.T., Pan Z.G., Mai S.J., Li D.J., Zeng M.S., Wen J.M., and Zeng Y.X. (2006). Hypoxia can contribute to the induction of the Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle. *Journal of Clinical Virology*, 37(2):98-103
306. Kraus R.J., Yu X., Cordes B.A., Sathiamoorthi S., Iempridee T., Nawandar D.M., Ma S., Romero-Masters J.C., McChesney K.G., Lin Z., Makielski K.R., Lee D.L., Lambert P.F., Johannsen E.C., Kenney S.C., and Mertz J.E. (2017). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  plays roles in Epstein-Barr virus's natural life cycle and tumorigenesis by inducing lytic infection through direct binding to the immediate-early BZLF1 gene promoter. *PLOS Pathogens*, 15;13(6):e1006404.
307. Zhao C., Chen J., Cheng L., Xu K., Yang Y., and Su X. (2020). Deficiency of HIF-1 $\alpha$  enhances influenza A virus replication by promoting autophagy in alveolar type II epithelial cells. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1):691-706
308. Zhuang X., Pedroza-Pacheco I., Nawroth I., Kliszczak A.E., Magri A., Paes W., Rubio C.O., Yang H., Ashcroft M., Mole D., Balfe P., Borrow P., and McKeating J.A. (2020). Hypoxic microenvironment shapes HIV-1 replication and latency. *Communications Biology*, 14;3(1):376.
309. Zhang R., Wu Y., Zhao M., Liu C., Zhou L., Shen S., Liao S., Yang K., Li Q., and Wan H. (2009). Role of HIF-1 $\alpha$  in the regulation ACE and ACE2 expression in hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(4): L631-40.
310. Jahani M., Dokaneheifard S., and Mansouri K. (2020). Hypoxia: A key feature of COVID-19 launching activation of HIF-1 and cytokine storm. *Journal of Inflammation-London*, 29;17:33.
311. Codo A.C., Davanzo G.G., Monteiro L.B., de Souza G.F., Muraro S.P., Virgilio-da-Silva J.V., Prodonoff J.S., Carregari V.C., de Biagi Junior C.A.O., Crunfli F., Jimenez Restrepo J.L., Vendramini P.H., Reis-de-Oliveira G., Bispo Dos Santos K., Toledo-Teixeira D.A., Parise P.L., and Moraes-Vieira P.M. (2020). Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 $\alpha$ /Glycolysis-dependent axis. *Cell Metabolism*, 1;32(3):498-499.
312. Kaelin W.G., and Ratcliffe P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*, 23;30(4):393-402.

313. Urrutia A.A., and Aragonés J. (2018). HIF oxygen sensing pathways in lung biology. *Biomedicines*, 6;6(2):68.
314. Chen N., Hao C., Liu B.C., Lin H., Wang C., Xing C., Liang X., Jiang G., Liu Z., Li X., Zuo L., Luo L., Wang J., Zhao M.H., Liu Z., Cai G.Y., Hao L., Leong R., Wang C., Liu C., Neff T., Szczech L., and Yu KP. (2019). Roxadustat treatment for anemia in patients undergoing long-term dialysis. *New England Journal of Medicine*, 12;381(11):1011-1022
315. Akizawa T., Iwasaki M., Yamaguchi Y., Majikawa Y., and Reusch M. (2020). Phase 3, randomized, double-blind, active-comparator (darbepoetin alfa) study of oral roxadustat in CKD patients with anemia on hemodialysis in Japan. *Journal of the American Society of Nephrology*, 31(7):1628-1639.
316. Wing P.A.C., Keeley T.P., Zhuang X., Lee J.Y., Prange-Barczynska M., Tsukuda S., Morgan S.B., Harding A.C., Argles I.L.A., Kurlekar S., Noerenberg M., Thompson C.P., Huang K.A., Balfe P., Watashi K., Castello A., Hinks T.S.C., James W., Ratcliffe P.J., Davis I., Hodson E.J., Bishop T., and McKeating J.A. (2021). Hypoxic and pharmacological activation of HIF inhibits SARS-CoV-2 infection of lung epithelial cells. *Cell Reports*, 20;35(3):109020.
317. Wang Z., Gerstein M., and Snyder M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1):57-63.
318. Tian M., Liu W., Li X., Zhao P., Shereen M.A., Zhu C., Huang S., Liu S., Yu X., Yue M., Pan P., Wang W., Li Y., Chen X., Wu K., Luo Z., Zhang Q., and Wu J. (2021). HIF-1 $\alpha$  promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 18;6(1):308.
319. Blagosklonny M.V. (2020). From causes of aging to death from COVID-19. *Aging (Albany NY)*, 12;12(11):10004-10021.
320. Appelberg S., Gupta S., Svensson Akusjärvi S., Ambikan A.T., Mikaeloff F., Saccon E., Végvári Á., Benfeitas R., Sperk M., Ståhlberg M., Krishnan S., Singh K., Penninger J.M., Mirazimi A., and Neogi U. (2020). Dysregulation in Akt/mTOR/HIF-1 signaling identified by proteo-transcriptomics of SARS-CoV-2 infected cells. *Emerging Microbes & Infections*. 9(1):1748-1760.
321. Walmsley S.R., Print C., Farahi N., Peyssonnaud C., Johnson R.S., Cramer T., Sobolewski A., Condliffe A.M., Cowburn A.S., Johnson N., and Chilvers E.R. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 $\alpha$ -dependent NF-kappaB activity. *Journal of Experimental Medicine*, 3;201(1):105-15.
322. Nolte M., and Margadant C. (2019). Controlling Immunity and Inflammation through Integrin-Dependent Regulation of TGF- $\beta$ . *Trends in Cell Biology*, 30(1):49-59.
323. Mantel P.Y., and Schmidt-Weber C.B. (2011). Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Methods in Molecular Biology*, 677:303-38.
324. Coker R.K., Laurent G.J., Shahzeidi S., Hernández-Rodríguez N.A., Pantelidis P., du Bois R.M., Jeffery P.K., and McAnulty R.J. (1996). Diverse cellular TGF-beta 1 and TGF-beta 3 gene expression in normal human and murine lung. *European Respiratory Journal*, 9(12):2501-7.

325. Li M.O., Sanjabi S., and Flavell R.A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*, 25(3):455-71.
326. Gutcher I., Donkor M.K., Ma Q., Rudensky A.Y., Flavell R.A., and Li M.O. Autocrine transforming growth factor- $\beta$ 1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity*, 25;34(3):396-408.
327. Tsai H., Velichko S., Hung L., and Wu R. (2013). IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL17R signaling in host defense against infection. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013:267971.
328. Lu Y., Sun K., Guo S., Wang J., Li A., Rong X., Wang T., Shang Y., Chang W., and Wang S. (2020). Early warning indicators of severe COVID-19: a single-center study of cases from Shanghai, China. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, 7:432.
329. Frank J.A., and Matthay M.A. (2014). TGF- $\beta$  and lung fluid balance in ARDS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 21;111(3):885-6.
330. Chen W. (2020). A potential treatment of COVID-19 with TGF- $\beta$  blockade. *International Journal of Biology Sciences*, 21;16(11):1954-1955.
331. Hamidi S.H., and Kadamboor Veethil S. (2021). Role of pirfenidone in TGF- $\beta$  pathways and other inflammatory pathways in acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-Cov-2) infection: a theoretical perspective. *Pharmacological Reports*, 73(3):712-727.
332. Zivancevic-Simonovic S., Minic R., Cupurdija V., Stanojevic-Pirkovic M., Milosevic-Djordjevic O., Jakovljevic V., and Mihaljevic O. (2023). Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in COVID-19 patients: relation to platelets and association with the disease outcome. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 478(11):2461-2471.
333. Susak F., Vrsaljko N., Vince A., and Papic N. (2023). TGF Beta as a prognostic biomarker of COVID-19 severity in patients with NAFLD-A prospective case-control study. *Microorganisms*, 13;11(6):1571.
334. Assoian R., Komoriya A., Meyers C., Miller D., and Sporn M. (1983). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 258:7155-60.
335. Peiris J.S., Yuen K.Y., Osterhaus A.D., Stöhr K. (2023). The severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 18;349(25):2431-41.
336. Carsana L., Sonzogni A., Nasr A., Rossi R.S., Pellegrinelli A., Zerbi P., Rech R., Colombo R., Antinori S., Corbellino M., Galli M., Catena E., Tosoni A., Gianatti A., and Nebuloni M. (2020). Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*, 20(10):1135-1140.

337. Tabachnick, B. G., and Fidell, L. S. (2013). Using multivariate statistics (6th ed.). *Psychology*, (6):10.
338. İnternet:<https://www.drugtargetreview.com/news/84273/over-87000-papers-published-on-coronavirus-since-start-of-pandemic> 21 Haziran 2024'te alınmıştır.
339. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., and Tian D.S. (2020). Dysregulation of immune response in patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases*, 28;71(15):762-768.
340. Zhang G., Nie S., Zhang Z., and Zhang Z. (2020). Longitudinal Change of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibodies in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Journal of Infectious Diseases*, 29;222(2):183-188.
341. Li Y.X., Wu W., Yang T., Zhou W., Fu Y.M., Feng Q.M., and Ye J.M. (2020). Characteristics of peripheral blood leukocyte differential counts in patients with COVID-19. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 1;59(0):003.
342. Lindsley A.W., Schwartz J.T., and Rothenberg M.E. (2020). Eosinophil responses during COVID-19 infections and coronavirus vaccination. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(1):1-7.
343. Lucas C., Wong P., Klein J., Castro T.B.R., Silva J., Sundaram M., Ellingson M.K., Mao T., Oh J.E., Israelow B., Takahashi T., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman A., Park A., Mohanty S., Casanovas-Massana A. and Yale IMPACT Team; (2020). Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, (7821):463-469.
344. Tabachnikova A., and Chen S.T. (2020). Roles for eosinophils and basophils in COVID-19? *Nature Reviews Immunology*, 20(8):461.
345. Gibellini L., De Biasi S., Paolini A., Borella R., Boraldi F., Mattioli M., Lo Tartaro D., Fidanza L., Caro-Maldonado A., Meschiari M., Iadisernia V., Bacca E., Riva G., Cicchetti L., Quaglino D., Guaraldi G., Busani S., Girardis M., Mussini C., and Cossarizza A. (2020). Altered bioenergetics and mitochondrial dysfunction of monocytes in patients with COVID-19 pneumonia. *EMBO Molecular Medicine*, 7;12(12):e13001.
346. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., Damoraki G., Gkavogianni T., Adami M.E., Katsaounou P., Ntaganou M., and Koutsoukou A. (2020). Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe*, 10;27(6):992-1000.e3.
347. Tang N., Li D., Wang X., and Sun Z. (2020). Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 18(4):844-847.
348. Pourbagheri-Sigaroodi A., Bashash D., Fateh F., and Abolghasemi H. (2020). Laboratory findings in COVID-19 diagnosis and prognosis. *Clinica Chimica Acta*, 510:475-482.

349. Bouck E.G., Denorme F., Holle L.A., Middelton E.A., Blair A.M., de Laat B., Schiffman J.D., Yost C.C., Rondina M.T., Wolberg A.S., and Campbell R.A. (2021). COVID-19 and sepsis are associated with different abnormalities in plasma procoagulant and fibrinolytic activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(1):401-414.
350. Neethling C., Calligaro G., Miller M., and Opie J.J.S. (2021). The evolution of clot strength in critically-ill COVID-19 patients: a prospective observational thromboelastography study. *Thrombosis Journal*, 6;19(1):83.
351. Rostami M., Khoshnegah Z., and Mansouritorghabeh H. (2021). Hemostatic System (Fibrinogen Level, D-Dimer, and FDP) in Severe and Non-Severe Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 27:10760296211010973.
352. Guo Z., Sun L., Li B., Tian R., Zhang X., Zhang Z., Clifford S.P., Liu Y., and Huang J, L. X. (2021). Anticoagulation management in severe coronavirus disease 2019 patients on extracorporeal membrane oxygenation. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 35(2):389-397.
353. Doyle A.J., Hunt B.J., Sanderson B., Zhang J., Mak S.M., Benedetti G., Breen K.A., Camporota L., Barrett N.A., and Retter A. (2021). A comparison of thrombosis and hemorrhage rates in patients with severe respiratory failure due to coronavirus disease 2019 and influenza requiring extracorporeal membrane oxygenation. *Critical Care Medicine*. 1;49(7):663-e672.
354. Zhang J.J., Dong X., Cao Y.Y., Yuan Y.D., Yang Y.B., Yan Y.Q., Akdis C.A., and Gao Y.D. (2020). Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, 75(7):1730-1741.
355. Kernan K.F., and Carcillo J.A. (2017). Hyperferritinemia and inflammation. *International Immunology*, 1;29(9):401-409.
356. Edeas M., Saleh J., and Peyssonnaud C. (2020). Iron: Innocent bystander or vicious culprit in COVID-19 pathogenesis? *International Journal of Infectious Diseases*, 97:303-305.
357. Plays M., Müller S., and Rodriguez R. (2021). Chemistry and biology of ferritin. *Metallomics*, 12;13(5):mfab021.
358. Kaushal K., Kaur H., Sarma P., Bhattacharyya A., Sharma D.J., Prajapat M., Pathak M., Kothari A., Kumar S., Rana S., Kaur M., Prakash A., Mirza A.A., Panda P.K., Vivekanandan S., Omar B.J., Medhi B., and Naithani M. (2022). Serum ferritin as a predictive biomarker in COVID-19. A systematic review, meta-analysis and meta-regression analysis. *Journal of Critical Care*, 67:172-181.
359. Zhou B., Liu J., Kang R., Klionsky D. J., Kroemer G., and Tang D. (2019) Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death. *Seminars in Cancer Biology*, 66:89-100.
360. Liu J., Kuang F., Kroemer G., Klionsky D.J., Kang R., and Tang D. (2020). Autophagy-dependent ferroptosis: machinery and regulation. *Cell Chemical Biology*, 16;27(4):420-435.

361. Liu, Y., Wang, Y., Liu, J., Kang, R., and Tang, D. (2020). Interplay between mTOR and GPX4 signaling modulates autophagy-dependent ferroptotic cancer cell death. *Cancer Gene Therapy*, 28(1-2):55-63.
362. Song X., Zhu S., Chen P., Hou W., Wen Q., Liu J., Xie Y., Liu J., Klionsky D.J., Kroemer G., Lotze M.T., Zeh H.J., Kang R., and Tang D. (2018). AMPK-Mediated BECN1 phosphorylation promotes ferroptosis by directly blocking system Xc- activity. *Current Biology*, 28(15):2388-2399.
363. Lim E.H.T., van Amstel R.B.E., de Boer V.V., van Vught L.A., de Bruin S., Brouwer M.C., Vlaar A.P.J., and van de Beek D. (2023). Complement activation in COVID-19 and targeted therapeutic options: A scoping review. *Blood Reviews*, 57:100995.
364. Skendros P., Germanidis G., Mastellos D.C., Antoniadou C., Gavriilidis E., Kalopitas G., Samakidou A., Liontos A., Chrysanthopoulou A., Ntinopoulou M., Kogias D., Karanika I., Smyrlis A., Cepaityte D., Fotiadou I., Zioga N., Mitroulis I., Gatselis N.K., Papagoras C., Metallidis S., Millionis H., Dalekos G.N., Willems L., Persson B., Manivel V.A., Nilsson B., Connolly E.S., Iacobelli S., Papadopoulos V., Calado R.T., Huber-Lang M., Risitano A.M., Yancopoulou D., Ritis K., and Lambris J.D. (2022). Complement C3 inhibition in severe COVID-19 using compstatin AMY-101. *Science Advances*, 19;8(33):eabo2341.
365. Zinellu A., Mangoni A.A. (2021). Serum complement C3 and C4 and COVID-19 severity and mortality: A systematic review and meta-analysis with meta-regression. *Frontiers in immunology*, 7;12:696085.
366. Xu X., Yang M., Zhang B., Dong J., Zhuang Y., Ge Q., Niu F., and Liu B. (2023). HIF-1 $\alpha$  participates in secondary brain injury through regulating neuroinflammation. *Translational Neuroscience*, 9;14(1):20220272.
367. Kar S., Paglialunga S., and Islam R. (2018). Cystatin C is a more reliable biomarker for determining eGFR to support drug development studies. *Journal of Clinical Pharmacology*, 58(10):1239-1247.
368. Filler G., Bökenkamp A., Hofmann W., Le Bricon T., Martínez-Brú C., and Grubb A. (2005). Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clinical Biochemistry*, 38(1):1-8.
369. Herget-Rosenthal S., Bökenkamp A., and Hofmann W. (2007). How to estimate GFR--serum creatinine, serum cystatin C or equations? *Clinical Biochemistry*, 40(3-4):153-61.
370. Zi M., and Xu Y. (2018). Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis. *Immunol Letter*, 196:80-90.
371. Mottaghi A., Alipour F., Alibeik N., Kabir A., Savaj S., Bozorgmehr R., Nikkhah M., and Rahimian N. (2023). Serum cystatin C and inflammatory factors related to COVID-19 consequences. *BMC Infectious Diseases*, 22;23(1):339.
372. Anavi S., and Tirosh O. (2020). iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, 146:16-35.

373. Foreback C.C., and Chu J.W. (1981). Creatine kinase isoenzymes: electrophoretic and quantitative measurements. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 15(3):187-230.
374. Li L.Q., Huang T., Wang Y.Q., Wang Z.P., Liang Y., Huang T.B., Zhang H.Y., Sun W., and Wang Y. (2020). COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *Journal of Medical Virology*, 92(6):577-583.
375. Friedman S.A., Charmchi Z., Silver M., Jacoby N., Perk J., and Anziska Y. (2022). Skeletal muscle manifestations and creatine kinase in COVID-19. *Neurohospitalist*, 12(4):597-606.
376. Yuan J., Zou R., Zeng L., Kou S., Lan J., Li X., Liang Y., Ding X., Tan G., Tang S., Liu L., Liu Y., Pan Y., and Wang Z. (2020). The correlation between viral clearance and biochemical outcomes of 94 COVID-19 infected discharged patients. *Inflammation Research*, 69(6):599-606.
377. Jurisic V., Radenkovic S., and Konjevic G. (2015). The actual role of ldh as tumor marker, biochemical and clinical aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 867:115-24.
378. Sandoval Y., Januzzi J.L., and Jaffe A.S. (2020). Cardiac Troponin for Assessment of Myocardial Injury in COVID-19: JACC Review Topic of the Week. *Journal of the American College of Cardiology*, 8;76(10):1244-1258.
379. Petrilli C.M., Jones S.A., Yang J., Rajagopalan H., O'Donnell L., Chernyak Y., Tobin K.A., Cerfolio R.J., Francois F., and Horwitz L.I. (2020). Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *British Medical Journal*, 22;369:m1966.
380. Shah P., Doshi R., Chenna A., Owens R., Cobb A., Ivey H., Newton S., and Mccarley K. (2020). Prognostic value of elevated cardiac troponin 1 in hospitalized Covid-19 patients. *American Journal of Cardiology*, 15;135:150-153.
381. Guo T., Fan Y., Chen M., Wu X., Zhang L., He T., Wang H., Wan J., Wang X., and Lu Z. (2020). Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiology*, 1;5(7):811-818.
382. Du R.H., Liang L.R., Yang C.Q., Wang W., Cao T.Z., Li M., Guo G.Y., Du J., Zheng C.L., Zhu Q., Hu M., Li X.Y., Peng P., Shi H.Z. (2020). Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *European Respiratory Journal*, 55(5):2000524.
383. Lala A., Johnson K.W., Januzzi J.L., Russak A.J., Paranjpe I., Richter F., Zhao S., Somani S., Van Vleck T., Vaid A., Chaudhry F., De Freitas J.K., Fayad Z.A., Pinney S.P., Levin M., Charney A., Bagiella E., Narula J., Glicksberg B.S., Nadkarni G., Mancini D.M., Fuster V., and Mount Sinai COVID Informatics Center. (2020). Prevalence and Impact of Myocardial Injury in Patients Hospitalized With COVID-19 Infection. *Journal of the American College of Cardiology*, 4;76(5):533-546.

384. Çakmak Karaaslan Ö., Özilhan M.O., Maden O., ve Tüfekçioğlu O. (2022). Prevalence of cardiac involvement in home-based recovered coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: a retrospective observational study. *Irish Journal of Medical Sciences*, 191(5):2057-2062.
385. Bagur R., and Hajnóczky G. (2017). Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its role in calcium homeostasis and signaling. *Molecular Cell*, 15;66(6):780-788.
386. Duchen M.R., Verkhatsky A., and Muallem S. (2008). Mitochondria and calcium in health and disease. *Cell Calcium*, 44(1):1-5.
387. Collage R.D., Howell G.M., Zhang X., Stripay J.L., Lee J.S., Angus D.C., and Rosengart M.R. (2013). Calcium supplementation during sepsis exacerbates organ failure and mortality via calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase signaling. *Critical Care Medicine*, 41(11):e352-60.
388. Cerella C., Diederich M., and Ghibelli L. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *International Journal of Cell Biology*, 2010;2010:546163.
389. Glancy B., Willis W.T., Chess D.J., Balaban R.S. (2013). Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry*, 23;52(16):2793-809.
390. Pinton P., Giorgi C., Siviero R., Zecchini E., and Rizzuto R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27;27(50):6407-18.
391. Moonen HPFX., Van Zanten A.R.H. (2020). Mitochondrial dysfunction in critical illness during acute metabolic stress and convalescence: consequences for nutrition therapy. *Current Opinion in Critical Care*, 26(4):346-354.
392. Di Filippo L, Doga M, Frara S, and Giustina A. (2021). Hypocalcemia in COVID-19: Prevalence, clinical significance and therapeutic implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 23(2):299-308.
393. Di Filippo L., Formenti A.M., Rovere-Querini P., Carlucci M., Conte C., Ciceri F., Zangrillo A., and Giustina A. (2020). Hypocalcemia is highly prevalent and predicts hospitalization in patients with COVID-19. *Endocrine*, 68(3):475-478.
394. Bossoni S., Chiesa L., and Giustina A. (2020). Severe hypocalcemia in a thyroidectomized woman with Covid-19 infection. *Endocrine*, 68(2):253-254.
395. Uyeki T.M., Mehta A.K., Davey R.T., Liddell A.M., Wolf T., Vetter P., Schmiedel S., Grünewald T., Jacobs M., Arribas J.R., Evans L., Hewlett A.L., Brantsaeter A.B, Ippolito G., Rapp C., Hoepelman A.I., Gutman J., and Working Group of the U.S.–European Clinical Network on Clinical Management of Ebola Virus Disease Patients in the U.S. and Europe. (2016). Clinical Management of Ebola Virus Disease in the United States and Europe. *New England Journal of Medicine*, 18;374(7):636-46.

396. Booth C.M., Matukas L.M., and Tomlinson G.A. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *Journal of the American Medical Association*, 16;290(3):334.
397. Cappellini F., Brivio R., Casati M., Cavallero A., Contro E., and Brambilla P. (2020). Low levels of total and ionized calcium in blood of COVID-19 patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 27;58(9):e171-e173.
398. Elezagic D., Johannis W., and Burst V. (2020). Venous blood gas analysis in patients with COVID-19 symptoms in the early assessment of virus positivity. *Journal of Laboratory Medicine*, 45;27-30.
399. Tomić S., Đokić J., Stevanović D., Ilić N., Gruden-Movsesijan A., Dinić M., Radojević D., Bekić M., Mitrović N., Tomašević R., Mikić D., Stojanović D., Čolić M. (2021). Reduced expression of autophagy markers and expansion of myeloid-derived suppressor cells correlate with poor t cell response in severe COVID-19 patients. *Frontiers in immunology*, 22;12:614599.
400. Ping H., Zhang K., Wang Y., Tong X., Chen Z., Cai C., Lu Z., Gui X., Liu L., Wang X., and Ke H. (2021). Cell death and pathological findings of the spleen in COVID-19 patients. *Journal of Pathology Research and Practice*, 227:153610
401. Barbati C., Celia A.I., Colasanti T., Vomero M., Speziali M., Putro E., Buoncuore G., Savino F., Colafrancesco S., Ucci F.M., Ciancarella C., Balbinot E., Scarpa S., Natalucci F., Pellegrino G., Ceccarelli F., Spinelli F.R., Mastroianni C.M., Conti F., and Alessandri C. (2022). Autophagy Hijacking in PBMC From COVID-19 Patients Results in Lymphopenia. *Frontiers in immunology*, 30;13:903498.
402. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Henry BM. (2023). COVID-19 and its long-term sequelae: what do we know in 2023? *Polish Archives of Internal Medicine*. 19;133(4):16402.
403. Dancey, C. P., & Reidy, J. (2011). Statistics without maths for psychology. *Open Journal of Leadership*, 5th ed., pp. 461-472.
404. Tran S, Fairlie WD, Lee EF. (2021). BECLIN1: Protein structure, function and regulation. *Cells*, 10(6):1522.



**EKLER**

## EK-1. Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU

ETİK KURUL İLETİŞİM BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi (GÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık (GÜTF) Binası 06500 Beşevler/Ankara
	TELEFON	0312 202 69 58
	FAKS	0312 202 46 73
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sars Cov-2 Enfeksiyonunda Otofaji ve Apoptoz İlişkisinin Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Resul KARAKUŞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	İmmünoloji Anabilim Dalı / GÜTF			
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)				
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene, tetkik, tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar –Hücre ve doku kültürleriyle yapılacak in-vitro çalışmalar- Bireysel araştırma projesi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver. No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	19.12.2023	2	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	19.12.2023	2	Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>
	DİĞER	<input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 1046	Toplantı tarihi: 25.12.2023
	Sars Cov-2 Enfeksiyonunda Otofaji ve Apoptoz İlişkisinin Araştırılması başlıklı başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile incelenerek uygun bulunduğuna GÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr Ebru ARHAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırmayla İlişkisi		Katılım	
Prof. Dr. Ebru ARHAN BAŞKAN	Çocuk Sağ.ve Hast. AD. Nöroloji BD.	GÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN BAŞKAN YARD.	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL BİLDİRİMLERDEN SORUMLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	GÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	GÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN ÜYE	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	GÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>

## EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Prof. Dr. Ö. Sezai LEVENTOĞLU ÜYE	Genel Cerrahi Anabilim Dalı	GÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Çiğdem ÖZER ÜYE	Fizyoloji AD.	GÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Çiğdem ATAMAN HATİPOĞLU ÜYE	Enfeksiyon Hast ve Klinik Mikro Kliniği AD.	Sağ. Bil Univ Ankara Eğr Araşt. Ha st.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Müge AYDOĞDU ÜYE	Göğüs Hastalıkları AD.	GÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Hamit KÜÇÜK ÜYE	İç Hastalıkları AD Romatoloji BD	GÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Halit Nahit ŞENDUR ÜYE	Radyoloji AD.	GÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. İrem EKMEKÇİ ERTEK ÜYE	Psikiyatri AD.	GÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Öğr. Gör. Dr. Cansu ÖZBAŞ ÜYE	Halk Sağlığı	GÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Av. İknur YILDIZ ÜYE	Hukukçu	Ankara I. Barosu	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Nejla CAN GÖLER ÜYE	Sivil Temsilci	Sağ. Bak. Avrupa Birl. ve Dış İliş. Gn. M d.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>

## EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**“GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR”**  
**İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Araştırma Projesinin Adı: SARS COV-2 ENFEKSİYONUNDA OTOFAJİ VE APOPİTOZ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sorumlu Araştırmacının Adı: Dr. Resul Karakuş

Diğer Araştırmacıların Adı: Senem Koçak, Dr. Melek Yaman Dr. Nihan Özüklü, Dr. Çiğdem Erol, Dr. Emin Ümit Bağrıaçık, Dr. Nazlı Elif Kuşcu, Dr. Hasan Selçuk Özger, Dr. Yeşim Yıldız, Dr. Esin Şenol

Destekleyici (varsa): -----

“SARS CoV-2 Enfeksiyonunda Otofaji ve Apoptoz İlişkisinin Araştırılması” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde COVID-19 hastalığının gözlemlendiği dönemde başurmuş olduğunuz Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nda tanı, tedavi, inceleme ve araştırma için alınmış ve saklanmış olan serum örnekleriniz ile “Covid19 Seyrinde Interferon-Alfa Otoantikorlarının Rolü” başlıklı araştırmada (Etik kurul, 17.02.2021, Sayı: 114) serum örneğinizin incelenmesi ve araştırılması için onam vermiş olmanız nedeniyledir. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, İmmünoloji Anabilim Dalında, Dr. Resul Karakuş sorumluluğu altındadır.

**Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?**

Bu çalışmanın amacı Covid-19 vakalarında gözlenen vücuttaki bağışıklık hücreleri tarafından üretilen ve hastalığın seyrinde rol oynayan bazı maddelerin hastalığın şiddeti üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Bu araştırma sonunda hastalığın seyri konusunda sahip olunan bilgi artacak ve hastalığın tanı ve tedavisi konusunda ilerleme sağlanabilecektir. Bu çalışmada sizin dışınızda 89 kişi daha olacaktır.

**Bu çalışmaya katılmam mıyım?**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çalışmaya devam etmenizin sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

**Bu çalışmaya katılırsam beni ne bekliyor?**

Bu başlık altında aşağıdaki bilgiler yer almalıdır:

## EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sizden kan veya başka bir biyolojik örnek alınmayacaktır. Daha önceki araştırmada vermiş olduğunuz kan örneğinin serumu kullanılacaktır ve Covid sırasında bazı maddelerin düzeyinin nasıl değiştiği araştırılacaktır.

**Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?**

1. Çalışmanın herhangi bir riski bulunmamaktadır.
2. Araştırmadan dolayı göreceğiniz olası bir zararda gerekli her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacaktır; bu konudaki tüm harcamalar da tarafımızdan karşılanacaktır.

**Çalışmada yer almamanın yararları nelerdir?**

Araştırma sonucunda araştırılan belirteçler ile bu hastalıklara karşı bağışıklık sisteminin verdiği tepkiler ve vücutta oluşturduğu etkiler, hastalığın ilerlemesinin önlenmesi, hastaya gerekli tedavilerin yeterli ve zamanında uygulanabilmesi, hastalığın seyrinin bilinmesi gibi çok yönlü faydalı bilgiler edinilecek ve bu hastalığın birey ve toplum üzerindeki olumsuz etkileri azaltılabilecektir.

**Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?**

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

**Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?**

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

**Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?**

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Resul KARAKUŞ  
GÖREVİ : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi  
TELEFON :

**(Katılımcının/Hastanın Beyanı)**

GÜTF İmmünoloji Anabilim dalında, Dr. Resul KARAKUŞ tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmem uygun olacağına bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

## EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeveceğim).

Araştırmaya dair her türlü sorum karşısında, herhangi bir saatte, Dr. Resul KARAKUŞ, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji ve  no'lu telefondan arayabileceğimi biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, unvanı: Prof. Dr. Resul Karakuş

Adres: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara.

Tel:

İmza:

Tarih:

AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN DEVAMI ŞEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER ALMAYACAKTIR

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KOÇAK, Senem

Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi / İmmünoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi / Diyagnostik İmmünoloji Anabilim Dalı	2011
Lisans	Ankara Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Ankara Lisesi	1998

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2022-devam ediyor	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü	Biyolog
2013-2022	Ankara Üniversitesi, Cebeci Tıp Fakültesi, Pedyatrik İmmünoloji&Allerji Araştırma Laboratuvarı	Biyolog
2006-2013	Ankara Üniversitesi, İbn'i Sina Hastanesi, Nefroloji Araştırma Laboratuvarı	Biyolog

### Yabancı Dili

İngilizce

### Yayınlar

1. K. Fidan, S. Koçak, O. Söylemezoglu & A. A. Yücel, A Well-Intentioned Enemy in Autoimmune and Autoinflammatory Diseases: NETosis, Turkish Archives of Pediatrics, 2023, 2757-6256, 58(1), 58, 10-19.
2. H. Selvi Özturun, Z. Kendi Çelebi, S. Koçak, S. Kutlay, G. Nergizoğlu, N. Duman & Ş. Ertürk, Kronik hemodiyaliz hastalarında sıvı volüm durumunun değerlendirilmesinde biyoelektriksel impedans analizinin yeri, Journal of Contemporary Medicine, 2019, 2667-7180, 9, 4, 403-409.
3. Z. Kendi Çelebi, A. Peker, S. Kutlay, S. Koçak, A. Tüzüner, Ş. Ertürk, K. Keven & Ş. Şengül, Effect of unilateral nephrectomy on urinary angiotensinogen levels in living kidney donors: 1 year follow-up study, Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 2017, 1470-3203, 18, 4, 1-6.

4. İ. Kurultak, Ş. Şengül, S. Koçak, Ş. Erdoğan, R. Calayoglu Şalcıav, P. Mescigil, K. Keven, Ş. Ertürk, B. Erbay & N. Duman, Urinary angiotensinogen, related factors and clinical implications in normotensive autosomal dominant polycystic kidney disease patients, *Renal Failure*, 2014, 0886-022X, 36, 5, 717-721.
5. Ş. Erdoğan, Ş. Şengül, S. Koçak, İ. Kurultak, Z. Kendi Çelebi, S. Kutlay, K. Keven, B. Erbay & Ş. Ertürk, Urinary Angiotensinogen Level Is Correlated with Proteinuria in Renal Transplant Recipients, *Transplantation Proceedings*, 2013, 0041-1345, 45, 3, 935-939.



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..*