

SARS-CoV-2 Enfeksiyonunda Hastalık Şiddetine Göre İndolamin 2,3-Dioksijenaz Enziminin İncelenmesi

Investigation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Enzyme in SARS-CoV-2 Infection According to Disease Severity

Mert KARACA^{1,2}(ID), Gözde ARSLAN^{1,2}(ID), Diğdem YÖYEN ERMİŞ¹(ID), Salih Haldun BAL¹(ID), Esra KUNT UZASLAN³(ID), Fahir ÖZKALEMKAŞ⁴(ID), Aslı Ceren MACUNLUOĞLU⁵(ID), Ferah BUDAK¹(ID), Emel YILMAZ⁶(ID), Arzu YILMAZTEPE ORAL⁷(ID), Halis AKALIN⁶(ID), Haluk Barbaros ORAL¹(ID)

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Bursa.

¹ Bursa Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Immunology, Bursa, Türkiye.

² Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi İmmünoloji Anabilim Dalı, Bursa.

² Bursa Uludağ University Institute of Health Sciences, Department of Medical Immunology, Bursa, Türkiye.

³ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.

³ Bursa Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Pulmonary Diseases, Bursa, Türkiye.

⁴ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Bursa.

⁴ Bursa Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Division of Hematology, Bursa, Türkiye.

⁵ Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Bursa.

⁵ Bursa Uludağ University Institute of Health Sciences, Department of Biostatistics, Bursa, Türkiye.

⁶ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

⁶ Bursa Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Bursa, Türkiye.

⁷ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.

⁷ Bursa Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Bursa, Türkiye.

Makale Atfı: Karaca M, Arslan G, Yöyen Ermiş D, Bal SH, Kunt Uzaslan E, Özkalemkaş F ve ark. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda hastalık şiddetine göre indolamin 2,3-dioksijenaz enziminin incelenmesi. Mikrobiyol Bul 2025;59(2):174-190.

ÖZ

Kinürenin yolağı, yol boyunca oluşan metabolitler ve enzimler aracılığıyla neredeyse tüm bağışıklık tepkileriyle etkileşime girmektedir. Hız sınırlayıcı enzim olan indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO), yolağın başlangıç adımında oksidoredüktaz olarak görev yapmakta olup triptofanın kinürenine dönüşümünü katalizler ve çeşitli enfeksiyöz hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada, koronavirüs hastalığı 2019 [coronavirus diseases-2019 (COVID-19)] hastalarının serum IDO-1 düzeyleri, Th1-2-17 ile ilişkili sitokinlerin düzeyleri ve hematolojik parametreler, hastalığın şiddeti (hafif, orta, şiddetli) göz önünde bulundurularak araştırılması amaçlanmıştır. Yüz otuz hasta ve 91 sağlıklı kontrol için IDO-1 serum seviyeleri enzim ilişkili immünsorban assay [enzyme linked immunosorbant assay (ELISA)] yöntemi kullanılarak ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. IDO gen lokusundaki daha önce enflamasyonla ilişkilendirilmiş olan tek nükleotid polimorfizm [single nucleotide polymorphism (SNP)] bölgesi taranmıştır. SNP analizleri, erime eğrisi (melting curve) analiziyle gerçekleştirilmiştir. Kırk COVID-19 hastasının IDO-1 intronik varyant rs7820268 ve IDO-2 inaktivitesinden sorumlu rs4503083 SNP bölgeleri, elli iki

sağlıklı kontrol ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. IDO-1 serum konsantrasyonları hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.0001$). Ayrıca, şiddetli hasta grubundaki IDO-1 serum seviyeleri, hafif hasta grubundan daha düşük olarak belirlenmiştir ($p = 0.026$). Hasta grubunda IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α serum seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunurken, IFN- γ seviyeleri düşük olarak tespit edilmiştir. IDO-1 ve IL-6 seviyeleri arasında ise negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r = -0.3503$, $p = 0.0391$). Hastalık şiddetine göre sınıflandırılan hasta gruplarında lenfosit, monosit, nötrofil ve akut faz reaktan değerleri karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. SNP analizi sonucunda, rs7820268 IDO-1 bölgesi için CC genotipi COVID-19 hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur ($p = 0.0017$). Bu veriler, IDO-1 rs7820268 SNP bölgesindeki polimorfizmin COVID-19'a duyarlılıkla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: İndolamin 2,3-dioksijenaz; COVID-19; SARS-CoV-2; kinürenin; SNP.

ABSTRACT

The kynurenine pathway interacts with almost all immune responses through metabolites and enzymes in the pathway. The rate-limiting enzyme, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), serves as a pivotal oxidoreductase in the initial step of the pathway, catalyzing the conversion of tryptophan to kynurenine and is implicated in the pathogenesis of various infectious diseases. The aim of this study was to investigate the serum concentrations of IDO-1, cytokine concentrations related to Th1-2-17 and hematological parameters of coronavirus disease-2019 (COVID-19) patients considering the severity of the disease (mild, moderate, severe). The IDO-1 serum levels were measured using the ELISA method for 130 patients and 91 healthy controls and subsequently compared. Two single nucleotide polymorphism (SNP) regions associated with inflammation in the IDO gene locus were screened. SNP analyses were performed using melting curve analysis. The IDO-1 intronic variant rs7820268 and the IDO-2 inactivating region rs4503083 SNPs of 40 coronavirus disease-2019 (COVID-19) patients were compared to 52 healthy controls. All results were statistically analyzed and compared. The IDO-1 serum concentrations were significantly lower in the patient group compared to the healthy control group ($p < 0.0001$). Additionally, the IDO-1 serum levels in the severe patient group were lower than those in the mild patient group ($p = 0.026$). IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α serum levels were significantly higher whereas IFN- γ was lower in the patient group. A negative correlation was found between IDO-1 and IL-6 levels ($r = -0.3503$, $p = 0.0391$). Significant differences were found in the values of lymphocytes, monocytes, neutrophils and acute phase reactants in the patient groups classified according to disease severity. As a result of SNP genotype analysis, the CC genotype for the rs7820268 IDO-1 region was found to be significantly higher in the COVID-19 patient group when compared with those of healthy controls ($p = 0.0017$). These data suggest that polymorphism in the IDO-1 rs7820268 SNP region may be associated with susceptibility to COVID-19.

Keywords: Indoleamine 2,3-dioxygenase; COVID-19; SARS-CoV-2; kynurenine; SNPs.

GİRİŞ

Kinürenin yolağı, yoldaki metabolitler ve enzimler aracılığıyla neredeyse tüm bağışıklık yanıtlarıyla etkileşir. Yolağın ilk adımında bir oksidoredüktaz olarak hareket eden ve hız sınırlayıcı enzim olan indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO), çeşitli enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Viral enfeksiyonlar, hücresel IDO aktivitesini artırarak triptofan (Trp)'in tükenmesine ve kinürenin (Kyn) birikmesine aracılık edip Trp'den Kyn'ye dönüşümü teşvik etmektedir^{1,2}. Memeliler L-Trp sentezini gerçekleştiremezler. Bu nedenle, bu amino asit sadece besin alımı yoluyla elde edilir. Vücuttaki serbest L-Trp'nin yaklaşık %95'i Kyn yoluyla metabolize edilirken, %1-5'i serotonin ve melatonine dönüştürülmek üzere kullanılır³. L-Trp'nin indol halkasının oksidatif olarak katalizlenmesi ile formik asit ve kararlı son ürün Kyn oluşturulur. Bu durum spontan olarak asidik koşullar altında ya da enzimatik olarak formidaz aracılı-

ğıyla gerçekleşebilir⁴. Hücre tipine ve farklı Kyn yolağı enzimlerinin ifade seviyelerine bağlı olarak, çeşitli biyolojik olarak aktif metabolitlerin etkileşimi ile bir dizi reaksiyon gerçekleşir. Bu metabolitler arasında Kyn'nin yanı sıra; kinürenik asit, antranilik asit, 3-hidroksikinürenin (3-HK), 3-hidroksiantranilik asit (3-HAA), pikolinik asit ve kinolinik asit (QA) bulunur. Daha sonra QA'dan nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) elde edilebilir. NAD⁺, birçok önemli hücresel reaksiyon ve süreç için esansiyel bir kofaktördür, adenosin trifosfat sentezinden DNA tamirine kadar değişen, yeterli hücresel NAD⁺ seviyelerinin sürdürülmesi hücresel homeostaz, işlev ve hayatta kalma için kritiktir¹. IDO-1 aktivasyonunu takiben oluşturulan metabolitlerin, IDO-1 ifade eden hücreler tarafından ekstrasellüler çevreye salınması ve çevredeki hücreler tarafından alınması veya sitoplazmada aril hidrokarbon reseptörü (AhR)'ne bağlanarak parakrin hücre sinyalleşmesine aracılık etmesi mümkündür⁵. Ayrıca, QA bir N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör agonisti iken, kinürenik asit bu reseptörün bir antagonistidir ve α7 nikotinik asetilkolin reseptörünün bir ligandıdır^{6,7}. Bu şekilde, IDO-1 ifade eden hücreler, çevredeki IDO-1 ifade etmeyen hücrelerin işlevini, fenotipini ve bağışıklık tepkilerini etkileyebilir.

IDO-1 ve Kyn yolu metabolizmasının viral enfeksiyona bağlı bağışıklık yanıtını kontrol etme konusunda işlevselliği iyi bilinmektedir. Fakat virüslerin IDO-1'in immünsupresif aktivitesini kendi avantajlarına kullanmasıyla bu durum karmaşık bir hal alabilmektedir. Örneğin, LP-BM5 murin lösemi virüsü ile farelerin enfekte edilmesi, farelerin dalak, akciğer, karaciğer ve beyinlerinde IDO-1 ekspresyonunu ve aktivitesini uyarmaktadır. IDO-1 geni eksik fareler, artmış tip I IFN üretimi nedeniyle azalmış LP-BM5 viral yük sergiler⁸. Ensefalomiyokardit virüsü enfeksiyonunda; mikrogliyalarda, purkinje hücrelerinde, dalak ve kalpte IDO-1 eksikliği hastalık seyrini hafifletir, artan IFNα ve IFNβ ekspresyonu ile azalmış viral yük görülür^{9,10}. İnfluenza enfeksiyonunda, IDO-1 aktivitesinin inhibisyonu makrofaj kaynaklı pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini artırarak, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre fonksiyonlarını destekler¹¹. Ayrıca Th1 yanıtlarını teşvik ederek, enfeksiyona karşı birincil bağışıklık yanıtını artırır. Sekonder bağışıklık yanıtları da etkilenir, IDO-1 gen eksikliği, CD4⁺ Th1 ve Th17 yanıtları ve bellek CD8⁺ T hücrelerinin sayısının artmasına, bellek CD8⁺ T hücre repertuarının değişmesine ve CTLA-4 ifade eden Treg'lerin sayısının azalmasına neden olur^{11,12}. IDO-1, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinomun en yaygın nedeni olan hepatit enfeksiyonuyla da ilişkilendirilmektedir. Kronik hepatit C hastalarının karaciğerinde IDO-1 mRNA seviyelerinde artış gözlenirken, serumda daha yüksek Kyn/L-Trp oranlarına sahip oldukları tespit edilmiştir^{13,14}. Birçok çalışma, insan immün yetmezlik virüsü [human immunodeficiency virus (HIV)] hastalarının IDO-1 ekspresyonunu ve aktivitesini merkezi sinir sistemi (MSS)'nde artırdığını; bunun sonucunda serum, beyin omurilik sıvısı, frontal korteks, akciğerler, lenf nodları ve kolonda azalmış L-Trp ve artmış Kyn, QA, kinürenik asit ve 3-HK seviyeleri olduğunu bildirmektedir¹⁵. Sonuç olarak viral enfeksiyonlarda görülen farklı IDO regülasyonları, koronavirüs hastalığı 2019 [coronavirus disease-2019 (COVID-19)]'da IDO etkileşimlerinin nasıl olduğu konusunda merak uyandırmaktadır.

Konak hücreler genellikle viral enfeksiyonlarda IDO-1 seviyelerini, IDO-1 geninin promotor bölgesinde olup interferonlara yanıt veren interferon-sensitive response element ve IFN-γ aracılı aktive bölgelerinin bulunması nedeniyle artırır¹⁶.

Genetik yatkınlığın temellerini anlamak, erken teşhis ve tedavi için çeşitlilik sağlamak-
tadır. COVID-19 hastalarında görülen genetik farklılıkların, virüsün yaşam döngüsünü ve
konak hücrelerin bağışıklık tepkilerini etkilemesi mümkündür. IDO'nun antiviral kaskad-
larda rol aldığı bilinmektedir^{11,17}. IDO-1, IDO-2 genlerinin transkripte edilen bölgelerin-
de birçok tek nükleotid polimorfizm [single nucleotid polymorphism (SNP)] tanımlanmış-
tır. Bu SNP'ler net olarak bir hastalık nedeni değildir.

Bu çalışmada, COVID-19 immünopatogenezinde IDO-1 ve IDO gen polimorfizmleri-
nin rolü ve hastalık şiddetiyle olan ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, tüm katılımcıların onamlarıyla birlikte, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakül-
tesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (Tarih: 29.04.2020 ve Karar No: 2020-7/24)
onaylandı ve çalışma için Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformundan izin alındı.

Çalışma Grubu

Bu çalışmaya 130 hasta ve 91 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. Sağlıklı kontrol gru-
buna, COVID-19 negatif gönüllü bireyler dahil edildi. Grupların cinsiyet ve yaş dağılım-
ları göz önünde bulunduruldu. Farklı bir enfeksiyondan dolayı COVID-19 benzeri semp-
tomlar geliştiren hastaların örnekleri çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya dahil edilen
tüm hastalar Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde tedavi gören 18 yaş ve
üzeri bireylerdi. Hastalar, 27 Mayıs 2020 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafın-
dan yayımlanan geçici kılavuz referans alınarak hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırıldı
(DSÖ referans numarası: WHO/2019nCoV/clinical/2020.5). Ayrıca, değerlendirmede
hastaların ilaç rejimleri de göz önünde tutuldu. Hastaların ilaç rejimlerinin incelenmesi
sonucunda, yaklaşık 52 (%40)'sinin favipiravir kullandığı belirlendi. Sitokin baskılayıcı ilaç
rejimlerindeki hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Örneklerin Alınması ve Saklanması

Çalışmaya dahil olan kişilerden venöz kan örnekleri alındı. Jelli tüpe alınan örnekler
3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örneklerin bir kısmı rutin bi-
yokimyasal parametrelerin analizi için kullanılırken geri kalan örnekler porsiyonlanarak
-20 °C'de saklandı. Hematolojik parametrelerin ölçümü için etilen diamin tetraasetik asit
(EDTA)'li tüplere alınan örnekler kullanılmak üzere 4 °C'ye kaldırıldı.

Hematolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

EDTA'lı tüplere alınan tam kan örneklerinde lökosit (WBC), platelet (PLT), nötrofil ve
lenfosit sayıları Cell-Dyn Ruby hematoloji analiz cihazında (Abbot, Amerika Birleşik Dev-
letleri), D-dimer düzeyleri ise sitratlı tüplere alınan örneklerde Siemens BCS XP (Siemens,
ABD) cihazında ölçüldü. Serum örneklerinde sodyum (Na), C-reaktif protein (CRP), klor
(Cl), potasyum (K), kreatinin, üre, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransfe-
raz (ALT) düzeyleri ARCHITECT c16000 (Abbot, ABD); ferritin ve troponin düzeyleri ise
immulite 2000 (Siemens, ABD) otoanalizöründe ticari kitler kullanılarak üreticinin tali-
matlarına uygun şekilde gerçekleştirildi.

ELISA Testi

Serumda bulunan sitokinler ve IDO-1 konsantrasyonları, üretici firmanın önerdiği protokole göre enzim ilişkili immünsorban assay [enzyme linked immunosorbant assay (ELISA)] kitleriyle ölçüldü (IDO-1, Bioassay Technology Laboratory, Çin; IFN- γ , IL-17, IL-10, IL-4, TNF- α ve IL-6 sitokin ELISA kitleri, Biolegend, ABD). İşlem basamaklarının sonunda mikropalaklar önerilen dalga boylarında ELISA mikropalak okuyucuya okutulularak, standart eğri oluşturuldu ve konsantrasyonlar hesaplandı.

DNA Ekstraksiyonu ve DNA Saflığı-Konsantrasyonunun Ölçülmesi

SNP çalışması için 40 hastanın ve 52 sağlıklı bireyin kan örneklerinden genomik DNA'nın ekstraksiyonunda ticari olarak temin edilmiş izolasyon miniprep kiti (Zymo Research, ABD) kullanıldı. DNA izolasyonu, üreticinin önerilerine uygun olarak gerçekleştirildi. DNA saflığı ve konsantrasyon ölçümleri için nanodrop (MaestroGen, Tayvan) kullanıldı. Örnekler 260/280, 260/230 dalga boyunda, konsantrasyon ölçümleri için 1 μ l DNA kullanılarak ölçüldü ve örnekler -80 °C'de çalışma yapıncaya kadar saklandı.

SNP Genotipleme-Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi

SNP genotipleme, floresans rezonans enerji transferi (FRET) problemlerini ve yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizini birleştiren bir yöntemle gerçekleştirildi. Analiz, Roche Diagnostics tarafından üretilen LightCycler® 480 sistemi üzerinde yürütüldü ve alellerin tespitiyle diskriminasyonu aynı reaksiyon tüpü içerisinde gerçekleştirildi. FRET problemleri, incelenecek SNP bölgelerine yakın olacak şekilde tasarlandı. Donör probu, floresinle işaretlenmiş olup alıcı prob TAMRA ile işaretlendi. Reaksiyon tüpünde devam eden HRM analizi sırasında bu problemler, SNP'lerin allelik diskriminasyonu, genotiplerin belirlenmesine floresan ışımayla olanak sağladı. İlgili SNP bölgeleri için FRET problemlerinin bağlanma dizileri aşağıda sunulan dizilerdir:

rs7820268: Donör Prob: 5'-ATG TAA TGC CTA CTG AAG AAA C-3'

Alıcı Prob: 5'-TTA AAT TGG TCC ATT GCT TCA T-3'

rs4503083: Donör Prob: 5'-AAT AAA AAA GAA GAA GAA GCA G-3'

Alıcı Prob: 5'-CCT TGG AGT CAA TCC TTC ACC C-3'

Problemlerin yanı sıra, IDO-1 ve IDO-2 genlerinin hedef bölgelerini amplifiye eden primerler aşağıdaki gibidir:

Forward primer 5'-3' IDO-1 rs7820268: 5' TGT AAT GCC TAC TGA AGA AAC 3'

Forward primer 5'-3' IDO-2 rs4503083: 5' TCT TGT GCT CCC TCC AAA ACA 3'

Revers primer 5'-3' IDO-1 rs7820268: 5' CTT AAA TT ATT TTT TGG CTG AAT TCA A3'
Revers primer 5'-3' IDO-2 rs4503083: 5' TGG TTT GGC TTC CCA TGC TT 3',
IDO-1 için GenBank ID: NG_028155, IDO-2 için GenBank ID: NG_028155 (kromozom 8.39777452-39777758; BLAST NCBI Genome Browser)'ten faydalanılarak tasarlandı.

qPCR ve HRM Analizi Protokölü

hIDO-1 ile hIDO-2 gen polimorfizmlerinin PCR ve erime eğrisi analizi (sırayla, rs7820268, rs4503083) ayrı ayrı gerçekleştirildiği için, ön çalışma reaktifleri rs7820268 ve rs4503083 için spesifik olarak optimize edilerek hazırlandı. qPCR reaksiyonu 5 µl hacminde hazırlanmış olup, her reaksiyon tüpü şu bileşenleri içermiştir: 25 ng genomik DNA, 1x Light Cycler 480 Genotyping Master Mix, 2.5 pmol her primer 0.75 pmol FRET probu. Koşullar şu şekilde optimize edildi: Başlangıç denatürasyonu: 95 °C'de 10 dakika; döngüler (45 döngü): 95 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 10 saniye, 72 °C'de 15 saniye. PCR tamamlandıktan sonra, HRM analizi aynı reaksiyon tüpü içinde gerçekleştirildi. Erime eğrisi analizi sırasında: numuneler 95 °C'de beş dakika denatüre edildi. Sıcaklık hızlı bir şekilde 40 °C'ye düşürüldü ve ardından iki dakika stabilize edildi. Sıcaklık, floresans yoğunluklarının eş zamanlı olarak ölçülmesiyle 95 °C'ye kadar yavaşça yükseltildi. Elde edilen erime eğrisi profilleri (Ek Şekil 1), alellerin diskriminasyonu için analiz edildi. Çalışmanın tüm adımları, LightCycler kullanıcı kılavuzuna uygun şekilde gerçekleştirildi.

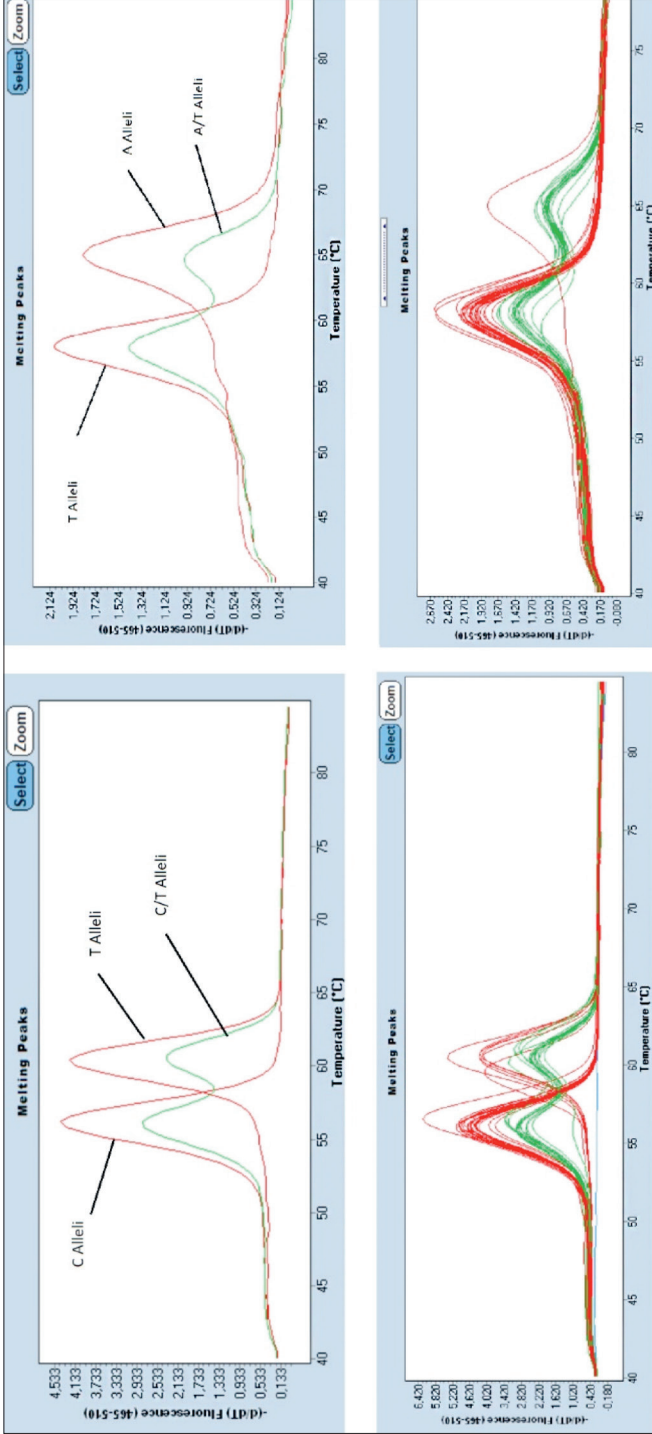
İstatistiksel Analiz

Polimorfizm istatistiksel analizleri Epi Info™ 3.2.2 (CDC, Atlanta GA, ABD) ile gerçekleştirildi. Gen polimorfizm dağılımı, hasta-sağlıklı gruplar arası karşılaştırmalar için V2 veya Fisher'in kesin testleri kullanıldı. Odds ratio (OR) ve %95 güven aralığı (GA) hesaplamaları yapıldı. Beklenen ve gözlenen genotipler arası uyumluluk, Hardy-Weinberg dengesi de göz önüne alınarak kontrol edildi. Sonuç değerlendirmelerinde uygun post hoc testleri ile ANOVA testi uygulandı. Diğer istatistiksel karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis ve Pearson ki-kare testleri kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS (IBM Corp. 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, v21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programıyla yapıldı. Tüm istatistikler için $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

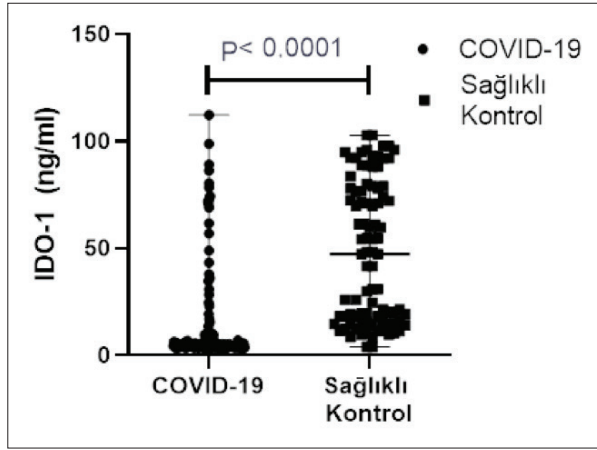
BULGULAR

Yüz otuz hasta ve 91 kontrolde IDO-1 düzeyleri ölçülmüştür. Hasta ve sağlıklı gruplar arasında istatistiksel karşılaştırmalar yapıldığında Şekil 1'de görüldüğü gibi, hastalarda IDO-1 seviyeleri kontrol grubuna kıyasla düşük olarak saptanmıştır ($p < 0.0001$, %95 GA 25.92-40.73, ortalama standart sapma ± 3.759). Hasta grubu için ortalama değer 14.77 ng/mL, sağlıklı kontrol grubu için ise 48.10 ng/mL tespit edilmiştir. Hastalık ciddiyetine göre sınıflandırılan gruplar arasında da IDO-1 değerlerinde fark olduğu görülmüştür ($p = 0.032$). Şiddetli hasta grubunda, hafif hasta grubuna kıyasla belirgin şekilde daha düşük IDO-1 konsantrasyonları ($p = 0.026$) tespit edilmiştir (Tablo I).

ELISA testleriyle belirlenen serum sitokin konsantrasyonları Şekil 2'de gösterilmiştir. Sitokin bazında ELISA testi: IL-4 için 38 hasta, 15 kontrol; IFN- γ için kırkara hasta ve kontrol; IL-10 için 23 hasta ve sekiz kontrol; IL-17 için 40 hasta ile 32 kontrol; IL-6 için 40 hasta ve 32 kontrol, TNF- α için 30 hasta ve 10 kontrol için uygulanmıştır. Serum IL-4, IL-6, IL-10 ve TNF- α değerleri, COVID-19 hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p < 0.0001$, $p = 0.0001$, $p = 0.0038$, $p = 0.0182$).



Ek 1. Erime eğrisi grafikleri. Sıcaklığa bağlı olarak belirlenen genotiplerin üstte belirlenme stratejileri, alt solda rs7820268 SNP bölgesi genotipleri, sağ altta rs4503083 için genotipler görülmektedir.



Şekil 1. COVID-19 ve sağlıklı kontrol grubu serum IDO-1 düzeylerinin karşılaştırılması.

IFN- γ düzeyleri COVID-19 grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p=0.0021$). IL-17 düzeyleri için gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilememiştir ($p=0.0729$).

GA ve OR değerlerini hesaplamak için elde edilen erime eğrilerinin sonucunda, hastalar ile sağlıklı kontrol gruplarındaki IDO-1 için rs7820268 SNP bölgesi ve IDO-2 için rs4503083 SNP bölgeleri için genotipik frekanslar belirlenmiştir. rs4503083 AA genotipi dışında tüm aleller, hastalar ve kontrol gruplarında Hardy-Weinberg dengesini göstermiştir. IDO-1 SNP bölgesi rs7820268 için, hastalarla kontrol grupları arasında CC alel taşıyıcıları (sırasıyla %52'ye karşı %26) karşılaştırıldığında, C homozigot alelinin COVID-19'a karşı duyarlılığı etkilediği görülmüştür ($OO=3$, $GA=1.25-7.1$, $p=0.017$). Diğer alel taşıyıcıları için rs7820268 SNP bölgelerinde anlamlı fark bulunmamıştır. Sağlıklı ve hasta grupları arasında rs7820268 SNP bölgesi CT ve TT genotip karşılaştırmalarına ilişkin elde edilen p değerleri sırasıyla 0.061 ve 0.54'tür. CT genotipinin insidansı, hasta grubunda %37.5 iken sağlıklı kontrol grubunda %57.69'dur. Genotip dağılımları Tablo II'de gösterilmiştir. rs4503083 SNP bölgesi için genotip dağılımı, COVID-19 hasta grubunda 16 AT, 23 TT ve 1 AA iken; sağlıklı kontrol grubunda 23 AT, 26 TT ve 3 AA idi. Hasta grubunda %22 A aleli ve %27 A aleli, kontrol grubunda %77 T aleli ve %72 T aleli ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.83$ için AT, ve $p=0.53$ için TT). Bu sonuç, incelenen IDO-2 SNP bölgesinin COVID-19'un patogenezi ve duyarlılığıyla ilişkilendirilmediğini göstermiştir.

IDO-1 SNP bölgesinde görülen farklı genotipler için IDO-1 seviyeleri ölçülmüştür. CC genotipine sahip hasta grubunun ortalama IDO-1 konsantrasyonu 18.27 ng/mL, sağlıklı kontrol grubunun ortalama IDO-1 konsantrasyonu ise 24.92 ng/mL tespit edilmiştir. CC genotipleri için hasta ve sağlıklı gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.3004$). Benzer şekilde, TT ve CT genotipleri için hasta ve sağlıklı gruplar arasında IDO-1 serum konsantrasyonları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.570$ için TT, $p=0.7330$ için CT). Sonuçlar Şekil 4'te sunulmuştur.

Tablo 1. Hastalık Şiddeti ile Bazı Hematolojik, Biyokimyasal Parametrelerin ve IDO-1 Düzeylerinin Karşılaştırılması												
	Hafif (Poliklinik)			Orta (Klinik)			Şiddetli (Yoğun Bakım)					
	*n	Medyan (minimum:maksimum)	n	Medyan (minimum:maksimum)	n	Medyan (minimum:maksimum)	**p ₀	**p ₁	**p ₂	**p ₃		
IDO-1	26	5.74 (3.41:98.85)	92	4.75 (2.65:112.31)	12	4.43 (4.04:74.38)	0.032	0.026	>0.05	>0.05		
WBC (k/ul)	26	6.54 (3.31:11.92)	92	5.99 (0.07:44.06)	12	10.56 (2.91:27.72)	0.093	>0.05	>0.05	>0.05		
Lenfosit (k/ul)	26	1.97 (0.71:28.41)	92	1.69 (0.05:3.85)	12	0.67 (0.29:5.45)	0.003	0.002	0.027	>0.05		
Monosit (k/ul)	26	0.52 (0.26:1.24)	92	0.54 (0.01:1.25)	12	0.33 (0.09:0.76)	0.004	0.009	0.004	>0.05		
Nötrofil (k/ul)	26	3.62 (2.01:8.28)	92	3.55 (0.01:42.68)	12	7.01 (2.49:26.97)	0.002	0.016	0.001	>0.05		
Platelet/Trombosit (pIT) (k/ul)	26	238.55 (141.70:389.90)	92	214.70 (43.40:463.30)	12	176.70 (34.20:454.10)	0.266	>0.05	>0.05	>0.05		
CRP (mg/mL)	6	13 (3.70:57)	58	22.25 (2.40:211.70)	11	126.60 (11.70:229.70)	<0.001	0.004	<0.001	>0.05		
Ferritin (ug/L)	26	38.10 (2:333)	92	133.00 (0.00:4535)	12	437.00 (0.00:1535)	0.002	0.005	0.008	>0.05		
D-dimer (mg/L)	26	0.41 (0.17:1.76)	87	0.38 (0.17:34.21)	12	1.92 (0.20:47.90)	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05		
Troponin (ng/L)	26	1.25 (0:24.70)	75	2.40 (0.20:184.60)	10	12.30 (1.90:99.30)	<0.001	<0.001	0.038	0.009		
Ure (mg/dL)	26	22.50 (10:40)	92	27.00 (9.00:150)	12	38.00 (23:99)	0.002	0.049	0.02	>0.05		
Kreatin (mg/dL)	25	0.77 (0.61:1.25)	92	0.77 (0.54:8.50)	12	0.79 (0.57:4.31)	0.860	>0.05	>0.05	>0.05		
AST (U/L)	25	30.5 (7:330)	92	22 (7:330)	12	39 (15:245)	0.028	0.03	>0.05	>0.05		
ALT (U/L)	24	23 (6:74)	92	22.50 (7:358)	12	21 (7:68)	0.534	>0.05	>0.05	>0.05		
Sodyum (mmol/L)	26	138.50 (130:142)	92	138.50 (128.00:148)	12	138.50 (126:146)	0.986	>0.05	>0.05	>0.05		
Potasyum (mmol/L)	25	4.30 (3.20:5.20)	92	4.20 (3.26:7.80)	12	3.80 (3.25:4.90)	0.220	>0.05	>0.05	>0.05		
Klor (mmol/L)	25	105 (101:109)	92	105 (95:111)	12	104.50 (86:112)	0.919	>0.05	>0.05	>0.05		

-Gösterilen değerler; medyan (minimum:maksimum) (Asimetrik dağılım ve uç değerlerin etkisi ile veriler normal dağılım göstermediği için eğilim ölçüsü olarak medyan tercih edilmiştir).

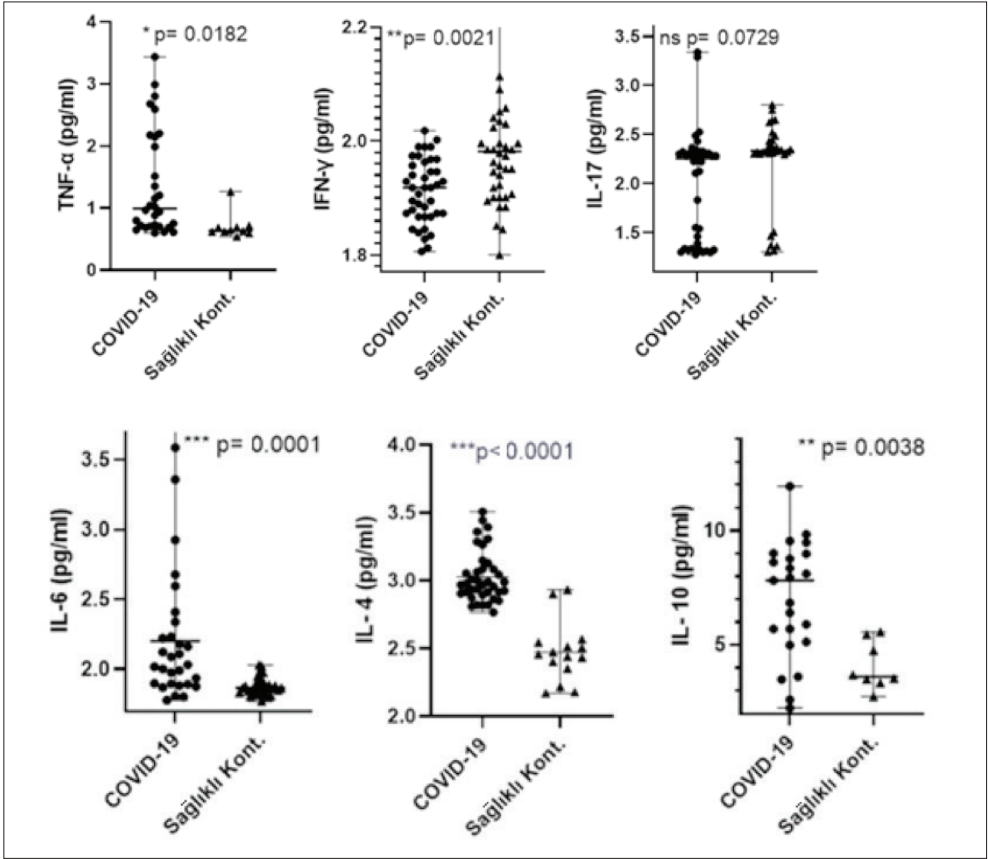
-n, değerleri değerlendirilen poliklinik, klinik ve yoğun bakım hastalarının sayısını temsil etmektedir.

-**p₀, hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık değerini (Kruskal-Wallis Testi) gösterir,

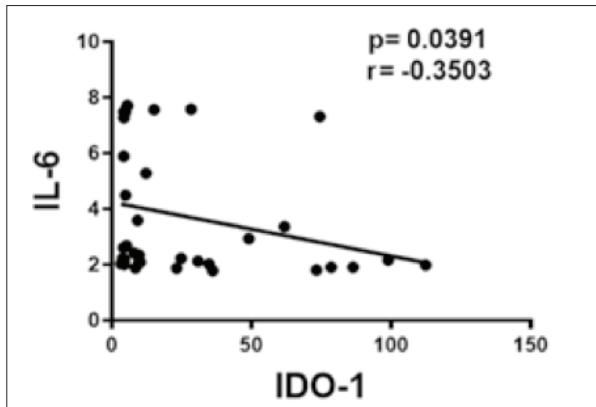
-**p₁, yoğun bakım ve poliklinik grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık değerini,

-**p₂, yoğun bakım ve klinik hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık değerini,

-**p₃ ise klinik ve poliklinik hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık değerini gösterir.



Şekil 2. Hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasındaki serum sitokin değerlerinin karşılaştırılması (Tüm karşılaştırmalar için, * $p < 0.05$ 'i gösterirken, ** $p < 0.01$ 'i, *** $p \leq 0.001$ 'i, ns anlamsız ilişkiyi ifade etmektedir).

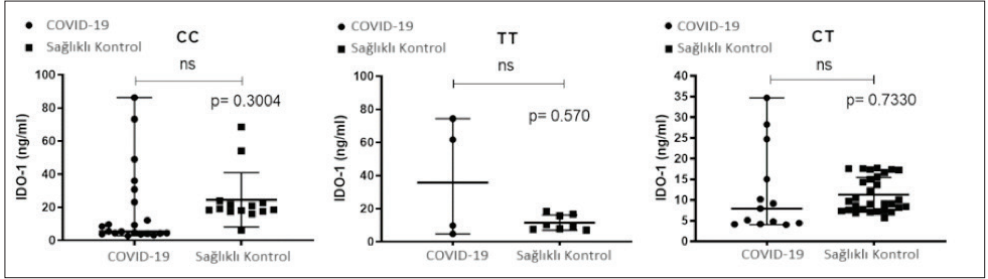


Şekil 3. IDO-1 ve IL-6 düzeyleri arası korelasyon analizi.

Tablo II. rs7820268 ve rs4503083 SNP Bölgeleri Genotip Analiz Sonuçları

Genotip	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	* χ^2 p-değeri	OR/GA
IDO-1 rs7820268				
CC	14 (%26.92)	21 (%52.5)	0.017	3 (1.25-7.1)
CT	30 (%57.69)	15 (%37.5)	0.061	0.44 (0.18-1.02)
TT	8 (%15.38)	4 (%10.0)	0.54	0.6 (0.17-2.1)
C	58	57	0.033	1.96 (1.05-3.65)
T	46	23	-	-
IDO-2 rs4503083				
AT	23 (% 44.08)	16 (%40)	0.83	0.84 (0.34-1.83)
TT	26 (%50)	23 (%57.5)	0.53	1.35 (0.59-3.1)
AA	3	1	-	-
A	29	18	-	-
T	75	62	-	-

*: Fisher'in kesin testi, OR: Göreceli olasılık oranı (odds ratio), GA: güven aralığı.

**Şekil 4.** COVID-19 ve sağlıklı kontrol grubu için rs7820268 SNP bölgesinde; CC,TT,CT genotiplerine göre IDO-1 konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

ns: Anlamsız ilişki.

Hastalık şiddetine göre hastalardaki hematolojik, biyokimyasal parametreler ve IDO düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında WBC, PLT, Na, K, Cl, ALT ve kreatinin değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$, Tablo I'de gösterilmiştir). Ancak lenfosit, monosit, nötrofil, CRP, ferritin, D-dimer, troponin, üre ve AST düzeyleri ile hastalık şiddeti arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Şiddetli hasta grubundaki lenfosit değerleri, hafif ve orta şiddetteki hasta gruplarından daha düşük olarak görülmüştür (sırasıyla, $p = 0.002$ ve $p = 0.027$). Benzer bir değişim monosit düzeylerinde de izlenmiştir. Hastalığı şiddetli seyreden olguların monosit düzeyleri, hafif ve orta seyirli olanlara nazaran daha düşük saptanmıştır (sırasıyla, $p = 0.009$ ve $p = 0.004$). Nötrofil değerleri açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.002$). Şiddetli hastalık grubundaki olgularda, orta ve hafif seyirli olanlara göre daha yüksek nötrofil değerleri görülmüştür (sırasıyla, $p = 0.016$ ve $p = 0.001$). Şiddetli hasta grubunun CRP değerleri,

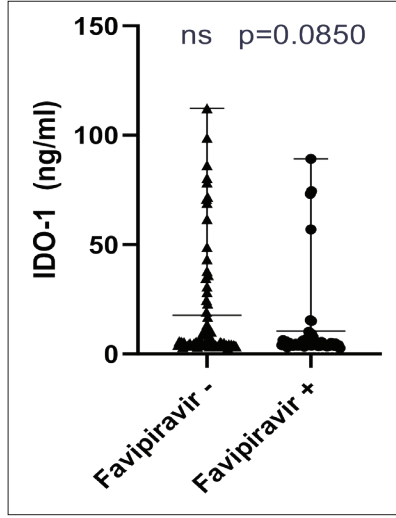
hafif ve orta şiddetli hasta gruplarından daha yüksek tespit edilmiştir (sırasıyla, $p= 0.004$ ve $p< 0.001$). Ferritin, troponin, D-dimer, üre ve AST düzeyleri değerlendirildiğinde, hafif seyirli hasta grubunda şiddetli hasta grubuna kıyasla daha düşük değerler gözlenmiştir (sırasıyla, $p= 0.008$, $p< 0.001$, $p< 0.001$, $p= 0.002$, $p= 0.030$).

TARTIŞMA

Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs 2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)] virüsü tarafından oluşturulan solunum yolu hastalığı COVID-19, küresel sağlık üzerinde derin bir etkiye sahip olmuş ve hem patogenezinin anlaşılması hem de potansiyel tedavi arayışı için önemli ölçüde bilimsel çaba ve çalışma ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Son çalışmalar, bağışıklık yanıtlarını düzenlemedeki rolüyle bilinen IDO enziminin, enfeksiyon hastalıklarında patojenik faktörlere karşı verilen tepkilerde önemli bir modülatör olabileceğini sorgulamaktadır.

Bir patojenin varlığına yanıt olarak, aktive edilmiş T hücreleri, JAK/STAT yoluyla dentritik hücrelerde ve makrofajlarda IDO'nun ekspresyonunu uyaran IFN- γ 'yı üretir. IDO aktivitesi, hücrenin kullanabileceği Trp miktarını azaltır ve ardından Kyn'de bir artış olur. Trp'nin azaltılması, konağı hem patojenden hem de kontrolsüz bağışıklık tepkilerinden korur. Diğer viral enfeksiyonlardan farklı olarak, bu çalışma, COVID-19 hastalarında beklenen aksine IDO-1 serum seviyelerinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu göstermiştir ($p< 0.001$). Enfeksiyon anında ve post-COVID-19 pnömonisinde endotelde ve kinürenin yolu üzerindeki IDO ekspresyonlarını inceleyen bir çalışma; IDO-1'in erken/hafif pnömonide ve uzun süreli pnömoni yaşayan hastaların akciğer dokularında baskın olduğunu göstermiştir, şiddetli COVID-19 olgularında ise düşük IDO-1 konsantrasyonları bildirmesi yönüyle bu çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermiştir¹⁸. Çalışmada ilaç rejimleri de göz önünde bulundurulmuş ve bazı hastalarda kullanılan favipiravir tedavisinin hastaların IDO-1 seviyelerinde farklılığa yol açmadığı gösterilmiştir (Ek Şekil 2).

Çeşitli araştırmalar, COVID-19'da Kyn/Trp oranında bir artış olduğunu göstermektedir^{19,20}. Triptofan ve kinürenin yolu metabolitlerinin seviyeleri COVID-19'un klinik seyrine göre değişkenlik göstermektedir. Önceki çalışmalar, hastalık şiddetini "orta, ciddi, kritik" olarak gruplar halinde incelemiştir. Özellikle, triptofan konsantrasyonları hastalık ciddiyetiyle önemli ölçüde azalırken, kinürenin/triptofan ve 3-hidroksi kinürenin/triptofan oranlarının COVID-19'un şiddetiyle önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir²¹⁻²⁴. Normal koşullarda, kinürenin yolağı aktivasyonu Trp'de bir azalmaya neden olurken, Kyn seviyeleri değişmez veya hafif bir artış yaşar. COVID-19 enfeksiyonunda düşük IDO-1 seviyeleri olması farklı mekanizma veya mekanizmaların kinürenin yolağı üzerinde etkisi olduğunu düşündürmektedir. Çalışma, temel olarak IDO-1'e odaklanmıştır. Dolayısıyla kinürenin yolağındaki değişimler için kapsamlı bir açıklama sağlayamamaktadır. Muhtemelen, kinürenin yolunun aktivasyonu, COVID-19'da IDO-2 veya triptofan dioksijenaz tarafından kolaylaştırılmaktadır.



Ek 2. Favipiravir kullanımına göre IDO-1 serum seviyelerinde anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (favipiravir tedavisi almamış hasta sayısı 78, almış olan hasta sayısı 52).

HIV, hepatit C virüsü ve insan respiratuvar sinsityal virüsü gibi viral enfeksiyonlara bağlı olarak IDO-1 düzeylerinin yükseldiği rapor edilmiştir^{17,25}. Fakat solunum yolu patojenlerinin neden olduğu akut enfeksiyonlar ile konakçının IDO düzeyleri ve aktivitesi arasındaki ilişkiye dair detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Bazı virüs suşlarının, enfeksiyonların kronik fazına ilerlemesine yol açan IDO-1'in immün baskılayıcı özelliğini kullanması mümkündür. Kronik enfeksiyon sırasında, azalmış antiviral bağışıklık yanıtları virüsün persiste olmasını desteklemektedir. Bu nedenle, bazı virüsler, HIV gibi, T-hücre aracılı immün yanıtları baskılayabilmek için IDO-1'in ifadesini artırmaya çalışır. Çalışmada SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastaların serum IDO-1 düzeylerinin azalması bu durumla çalışmakta gibi görünse de aslında abartılmış bir immün yanıtı sebep olarak hastalığın şiddetlenmesine yol açtığını düşündürmektedir. IDO-1-kinürenin-(AhR) etkileşimiyle oluşan sinyalizasyon viral, mikrobiyal ve paraziter patojenler aracılığıyla oluşan enfeksiyonlarda rol oynayabilir. SARS-CoV-2 virüsü hücrelere giriş yaptıktan sonra IDO-1'den bağımsız olarak da AhR'leri etkinleştirebilmektedir²⁶. Tipik olarak, IDO-1 aracılı oluşturulan kinüreninin AhR ile etkileşimi, Foxp3+ Treg hücrelerini modüle eder, prolifer olmalarını sağlar ve T hücrelerinin AhR kaynaklı olarak farklılaşmasını teşvik eder.

IDO-1 ekspresyonunun indüklenmesinde en büyük kapasiteye sahip sitokinin IFN-γ olması nedeniyle çalışmada gözlenen serumdaki düşük IDO-1 ile IFN-γ düzeyleri birbiriyle tutarlı görülmüştür. Fakat IDO ekspresyonunun indüklenmesinin monosit türevli DC'lerde viral replikasyon aracılı olarak IFN-γ'den bağımsız olarak da gerçekleşebildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, Kox ve arkadaşları²⁷, COVID-19 hastalarındaki serum sitokin düzeylerinin, diğer bazı kritik hastalıklardakine benzer şekilde değiştiğini göstermiştir.

Bu çalışmadaki bulgulara göre, IL-4, TNF- α , IL-10 ve IL-6'nın serum düzeyleri sağlıklı gruba kıyasla önemli ölçüde yüksek görülmüştür. Bu sonuçlar, diğer çalışmalardan elde edilen bulgularla uyumlu olsa da IFN- γ ve IL-17 seviyeleri üzerindeki gözlemlerimiz mevcut literatürden farklılık göstermektedir. Özellikle, hastaların serum IL-17 seviyeleri ile sağlıklı kontrollerin arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. IDO enfeksiyon anında Th1/Th2 yanıtlarında dengeleri değiştirebilmektedir. Burada IDO-1'in düşük seviyelerde görülmesi virüsün lehine olabilir. Ayrıca artan IL-4 seviyelerinin IDO üzerinde indükleyici etki oluşturması beklenirken, hastalarda IL-4 seviyeleri ile IDO korelasyonu gözlenememiştir. Ek olarak, etkinleştirilmiş AhR'ler tarafından salgılanan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler, IDO-1 ifadesi ile ilişkilendirilmiştir²⁶. Tespit edilen IL-6 ile IDO-1 arasındaki negatif korelasyon, bu ilişkiyle açıklanabilir. Bu bilgiler ışığında SARS-CoV-2 enfeksiyonunda AhR ve IDO-1 arasındaki etkileşimlerin daha detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

IDO'nun yanı sıra, ACE2 ile ilişkilendirilen SNP'ler genellikle ACE2'nin SARS-CoV-2 spike proteiniyle etkileşimini anlamlı şekilde etkilemezken; rs73635825 (S19P) gibi nadir polimorfizmler, bu etkileşimi azaltarak potansiyel olarak etkileyebilir. Ayrıca, IDO-1 ve IDO-2'nin promotor ve kodlayıcı bölgelerindeki SNP'ler, enzim aktiviteleri, katalitik aktivitenin azalması, belirli hastalıkların potansiyel tanısı ve hastalığa yakınlıkla ilişkilendirilir^{28,29}. Bu çalışmada, IDO gen lokusu exon 4 ve 5 arasındaki intronda bulunan rs7820268 SNP bölgesi, COVID-19'a yakınlıkla ilişkili bulunmuştur. Fakat sitokinler ve hematolojik parametreler, farklı genotiplere (TT, CC, CT) sahip hasta grupları için karşılaştırıldığında farklılık tespit edilememiştir. Ayrıca, IDO-2 rs4503083 SNP bölgesinde anlamlılık saptanmamıştır.

Orabona ve arkadaşları³⁰, rs7820268 SNP bölgesindeki belirli bir IDO-1 genotipinin, juvenil diyabetlerde IDO enziminin işlev bozukluğuna yol açtığını göstermiştir. Bu işlev bozukluğunun, tip-1 diyabet hastalarında IL-6 reseptörü (IL-6R) ifadesinde artışla ilişkilendirildiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışma, IL-6R bloke edici ilaçlar uygulandığında IDO-1 aktivitesinin normalleştiğini bildirmiştir. Bu bulgu, IL-6 ve IDO-1 arasındaki ilişkiyle ilgili bulgularımızla uyumludur. Bu çalışmada, IDO-1 rs7820268 SNP bölgesi için genotip grupları, sitokin konsantrasyonları açısından karşılaştırılmış ve anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. Ancak IDO-1 ve IL-6 konsantrasyonları arasında -0.35 korelasyon katsayısıyla negatif bir ilişki tespit edilmiştir.

COVID-19 hastalarında lenfopeni ve nötropeninin şiddet ve mortalite için birer belirteç olabileceği görülmektedir. Çalışmanın sonuçlarında da hastalığın şiddetine bağlı olarak nötropeni ve lenfopeninin, enflamatuvar yanıt göstergesi olacak şekilde değişkenlikler gösterdiği saptanmıştır. Ancak lenfositlerin enfeksiyon anında IDO tarafından regüle edilebildiği bilinmesine rağmen serum IDO seviyeleriyle lenfosit seviyeleri arasında bir ilişki saptanamamıştır. Çalışmada, COVID-19 için trombosit değerleri, hastalığın şiddeti ve IDO-1 seviyeleriyle ilişkili bulunmamıştır. Yapılan analizlerde, düşük seviyelerde saptanılan IDO-1 seviyelerinin hastaların hematolojik değerleri ile anlamlı bir ilişkisi olmadığı gösterilmiştir.

Çalışmanın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Bunlar arasında nispeten küçük bir örneklem grubundan kan örneklerinin toplanarak çalışılması yer almaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmanın kapsamı, COVID-19'a yatkınlığı değerlendirmek için daha geniş popülasyonlu bir örneklem grubu ile rs7820268 SNP bölgesinin analiz edilmesiyle desteklenebilir. Yetersiz serum örnekleri nedeniyle sitokin ELISA çalışmaları sınırlı sayıda hastayla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, IDO enzimlerinin aktiviteleri ölçülmemiştir.

IDO-1 ve IDO-2 enzimleri fonksiyonel olarak farklılık göstermektedir. IDO-2'nin enzimatik olmayan IDO-1'den farklı katalitik olmayan etkinlikleri olduğu henüz anlaşılmaya başlanmıştır. Dolayısıyla IDO-1'in aksine, IDO-2'nin enfeksiyon durumunda rolü ve immün sistem hücreleriyle ilişkileri net değildir. Bu sebeple, IDO-2 için çalışmada literatür üzerinden yorumlanarak ilişkilendirilebilecek tek veri IDO-2'nin inaktivasyonu ile ilişkili incelenen rs4503083 SNP bölgesi olmuştur. Bu bölgede de hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Dolayısıyla IDO-2 serum konsantrasyonlarının incelenmesi yerine, az sayıda bulunan hasta serumları sitokin seviyelerinin ölçümü için kullanılmış, IDO-2 serum seviyeleri ölçülmemiştir. Hedef SNP bölgelerine yakın bulunan diğer SNP bölgelerinin amplifikasyon sonuçlarını etkileyip etkilemediğine dair kontrol amaçlı dizileme de yapılmamıştır. Ancak pandemi dönemi öncesi aynı SNP bölgesinde genotiplenme yapılmış, bilinen kontroller ile iç doğrulama sağlanmış, bu adımlar iki kez tekrarlanmıştır.

COVID-19'un patogenezi yönlendiren ve etkileyen moleküler mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu sebeple, hastalığın etkili tedavi yöntemlerini geliştirmek veya önleme stratejileri oluşturmak oldukça zordur. Patogenezin anlaşılması açısından çalışmaların bütünü değerlendirilmelidir. IDO-1 gen lokusu rs7820268 SNP bölgesinde C homozigot genotipinin COVID-19'a yatkınlıkla ilişkilendirilmesi, SARS-CoV-2'nin IDO-1 ekspresyonlarını baskılıyor olması önemli sonuçlardır. Bu bağlamda, güçlü bir anti-enflamatuvar olan IDO-1'in, COVID-19 patogenezi yüksek pro-enflamatuvar yanıtları dengelemede etkili olup olmayacağı sorusu ön plana çıkmaktadır. Enflamasyonu azaltmayı hedefleyen herhangi bir müdahalenin viral klirensi olumsuz etkileyebileceği unutulmamalıdır. Dolayısıyla, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve enflamatuvar yanıtın inhibe edilmesi arasındaki hassas ve doğru dengeyi belirleyebilmek için daha fazla klinik çalışma gereklidir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, tüm katılımcıların onamları ile birlikte, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (Tarih: 29.04.2020 ve Karar No: 2020-7/24) onaylanmış ve çalışma için Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformundan izin alınmıştır.

TEŞEKKÜR

Pandemi sırasında hayatını kaybeden tüm sağlık çalışanlarını derin saygı ve minnetle anıyoruz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Boros FA, Bohár Z, Vécsei L. Genetic alterations affecting the genes encoding the enzymes of the kynurenine pathway and their association with human diseases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2018; 776: 32-45. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.03.001>
2. Lin YT, Lin CF, Yeh TH. Influenza A virus infection induces indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) expression and modulates subsequent inflammatory mediators in nasal epithelial cells. *Acta Oto-Laryngologica* 2020; 140(2): 149-56.
3. Oxenkrug GF. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1199(1): 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05356.x>
4. Thomas SR, Stocker R. Redox reactions related to indoleamine 2, 3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Report* 1999; 4(5): 199-220. <https://doi.org/10.1179/135100099101534927>
5. DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, Flaveny CA, Lahoti TS, Laurenzana EM, et al. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol Sci* 2010; 115(1): 89-97. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq024>
6. Kaszaki J, Érces D, Varga G, Szabó A, Vécsei L, Boros M. Kynurenines and intestinal neurotransmission: The role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neural Transm* 2012; 119: 211-23. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0658-x>
7. Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: Physiopathological implications. *J Neurosci* 2001; 21(19): 7463-73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07463.2001>
8. Hoshi M, Saito K, Hara A, Taguchi A, Ohtaki H, Tanaka R, et al. The absence of IDO upregulates type I IFN production, resulting in suppression of viral replication in the retrovirus-infected mouse. *J Immunol* 2010; 185(6): 3305-12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901150>
9. Taguchi A, Niwa M, Hoshi M, Saito K, Masutani T, Hisamatsu K, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 is upregulated in activated microglia in mice cerebellum during acute viral encephalitis. *Neurosci Letters* 2014; 564: 120-5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.051>
10. Hoshi M, Matsumoto K, Ito H, Ohtaki H, Arioka Y, Osawa Y, et al. I-tryptophan-kynurenine pathway metabolites regulate type I IFNs of acute viral myocarditis in mice. *J Immunol* 2012; 188(8): 3980-7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100997>
11. Fox JM, Sage LK, Huang L, Barber J, Klonowski KD, Mellor AL, et al. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase enhances the T-cell response to influenza virus infection. *J General Virol* 2013; 94(7): 1451-61. <https://doi.org/10.1099/vir.0.053124-0>
12. Sage LK, Fox JM, Mellor AL, Tompkins SM, Tripp RA. Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) activity during the primary immune response to influenza infection modifies the memory T cell response to influenza challenge. *Viral Immunol* 2014; 27(3): 112-23. <https://doi.org/10.1089/vim.2013.0105>
13. Larrea E, Riezu-Boj JI, Gil-Guerrero L, Casares N, Aldabe R, Sarobe P, et al. Upregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007; 81(7): 3662-6. <https://doi.org/10.1128/jvi.02248-06>
14. Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, et al. Association of enhanced activity of indoleamine 2, 3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol* 2013; 48: 660-70. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0667-z>
15. Yeung AW, Terentis AC, King NJ, Thomas SR. Role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in health and disease. *Clin Sci* 2015; 129(7): 601-72. <https://doi.org/10.1042/CS20140392>

16. Raniga K, Liang C. Interferons: Reprogramming the metabolic network against viral infection. *Viruses* 2018; 10(1): 36. <https://doi.org/10.3390/v10010036>
17. Routy JP, Mehraj V, Vyboh K, Cao W, Kema I, Jenabian MA. Clinical relevance of kynurenine pathway in HIV/AIDS: an immune checkpoint at the crossroads of metabolism and inflammation. *AIDS Rev* 2015; 17(2): 96-106.
18. Chilosi M, Doglioni C, Ravaglia C, Martignoni G, Salvagno GL, Pizzolo G, et al. Unbalanced IDO1/IDO2 endothelial expression and skewed kynurenine pathway in the pathogenesis of COVID-19 and Post-COVID-19 pneumonia. *Biomedicines* 2022; 10(6): 1332. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061332>
19. Xiao N, Nie M, Pang H, Wang B, Hu J, Meng X, et al. Integrated cytokine and metabolite analysis reveals immunometabolic reprogramming in COVID-19 patients with therapeutic implications. *Nat Commun* 2021; 12(1): 1618. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21907-9>
20. Reizine F, Lesouhaitier M, Gregoire M, Pinceaux K, Gacouin A, Maamar A, et al. SARS-CoV-2-induced ARDS associates with MDSC expansion, lymphocyte dysfunction, and arginine shortage. *J Clin Immunol* 2021; 41: 515-25. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00920-5>
21. Gasmı A, Peana M, Pivina L, Srinath S, Benahmed AG, Semenova Y, et al. Interrelations between COVID-19 and other disorders. *Clin Immunol* 2021; 224: 108651. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108651>
22. O'Hearn M, Liu J, Cudhea F, Micha R, Mozaffarian D. Coronavirus disease 2019 hospitalizations attributable to cardiometabolic conditions in the United States: A comparative risk assessment analysis. *J Am Heart Assoc* 2021; 10(5): e019259. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.019259>
23. Oxenkrug G. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Mol Neurobiol* 2013; 48: 294-301. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8497-4>
24. Vyavahare S, Kumar S, Cantu N, Kolhe R, Bollag WB, McGee-Lawrence ME, et al. Tryptophan-kynurenine pathway in COVID-19-dependent musculoskeletal pathology: A minireview. *Mediators Inflamm* 2021; 2021(1): 2911578. <https://doi.org/10.1155/2021/2911578>
25. Ajamian F, Wu Y, Ebeling C, Ilarraza R, Odemuyiwa SO, Moqbel R, et al. Respiratory syncytial virus induces indoleamine 2, 3-dioxygenase activity: A potential novel role in the development of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2015; 45(3): 644-59. <https://doi.org/10.1111/cea.12498>
26. Turski WA, Wnorowski A, Turski GN, Turski CA, Turski L. AhR and IDO1 in pathogenesis of COVID-19 and the "Systemic AhR Activation Syndrome" translational review and therapeutic perspectives. *Restor Neurol Neurosci* 2020; 38(4): 343-54. <https://doi.org/10.3233/RNN-201042>
27. Kox M, Waalders NJ, Kooistra EJ, Gerretsen J, Pickkers P. Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. *JAMA* 2020; 324(15): 1565-7. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.17052>
28. Napolioni V, Pariano M, Borghi M, Oikonomou V, Galosi C, De Luca A, et al. Genetic polymorphisms affecting IDO1 or IDO2 activity differently associate with aspergillosis in humans. *Front Immunol* 2019; 10: 890.
29. Cao T, Dai G, Chu H, Kong C, Duan H, Tian N, et al. Single-nucleotide polymorphisms and activities of indoleamine 2, 3-dioxygenase isoforms, IDO1 and IDO2, in tuberculosis patients. *Hereditas* 2022; 159(1): 1-8.
30. Orabona C, Mondanelli G, Pallotta MT, Carvalho A, Albini E, Fallarino F, et al. Deficiency of immunoregulatory indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 in juvenile diabetes. *JCI Insight* 2018; 3(6): e96244.



Bu eser CC BY-NC Atır-GayrıTicari Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.

Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.

©Telif Hakkı 2025 Mikrobiyoloji Bülteni'ne aittir. Makale metnine www.mikrobiyolbul.org web sayfasından ulaşılabilir.