



T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ
ANABİLİM DALI



İNDOLAMİN 2, 3 DİOKSİJENAZ (*IDO*) GEN
POLİMORFİZMİNİN COVID-19 VE KLİNİĞİ ÜZERİNE
ETKİSİ

Mert KARACA

0000-0001-6711-676X

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2021



T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ
ANABİLİM DALI



**İNDOLAMİN 2, 3 DİOKSİJENAZ (*IDO*) GEN
POLİMORFİZMİNİN COVID-19 VE KLİNİĞİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Mert KARACA
0000-0001-6711-676X
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

BURSA-2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum

“İNDOLAMİN 2,3 DİOKSİJENAZ (IDO) GEN POLİMORFİZMİNİN COVID-19 VE KLİNİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

25.01.2021

Adı Soyadı
Tarih ve İmza
Mert Koraca


TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

25 / 06 / 2021

Adı Soyadı: Mert Karaca

Anabilim Dalı: İmmünoloji

Tez Konusu: İndolamin 2,3 dioksijenaz (IDO) Gen Polimorfizminin
COVID-19 ve Kliniği Üzerine Etkisi

ÖZELLİKLER **UYGUNDUR** **UYGUN DEĞİLDİR** **AÇIKLAMA**

Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Doç. Dr. Haluk Barbaros Ors

Doç. Dr. Haluk Barbaros Ors



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	ii
KABUL ONAY.....	iii
TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU.....	iv
İÇİNDEKİLER	iii
TÜRKÇE ÖZET	vii
İNGİLİZCE ÖZET	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Koronavirüsler	2
2.1.1.İnsanda Hastalık Yapan Koronavirüs Türleri:.....	2
2.1.2.İnsan Coronavirus 229E (Alphacoronavirus)	2
2.1.3.İnsan Coronavirus OC43 (Betacoronavirus, soy A)	3
2.1.4.SARS-CoV (Betacoronavirüs, soy B)	3
2.1.5.İnsan Coronavirus NL63 (Alfacoronavirüs).....	3
2.1.6.İnsan Coronavirus HKU1 (Betacoronavirus, soy A)	3
2.1.7.MERS-CoV (Betacoronavirüs, soy C).....	4
2.2.İnsan Koronavirüslerinin Ekolojisi ve Filogenisi.....	4
2.3.Yeni Koronavirüs Hastalığı (COVID-19)	5
2.3.1.2019-nCoV'un Patogenezi	9
2.3.1.1.SARS-CoV-2 ve immünmodülatörler ile ilişkileri	9
2.3.2.COVID-19 ve Klinik İncelemeler:	12
2.4.İNDOLAMİN 2-3 DİOKSİJENAZ (IDO).....	14
2.4.1.TRIPTOFAN VE KİNURENİN	16
2.4.2.IDO ve İMMÜN SİSTEM İLİŞKİSİ	18
2.4.2.1.IDO Aktivitesinin İmmünmodülatör Özellikleri.....	18
2.4.2.2.IDO' nun Antiviral Etkileri	21
2.5.Indolamin 2,3- dioksijenaz 2 (IDO 2)	24
2.5.1.IDO 2'nin Fonksiyonu	24
2.6.Polimorfizm, Mutasyon ve SNP	26
2.6.1.IDO Gen Polimorfizmleri	28
2.6.2.İnsanda IDO-1 Gen Polimorfizmi.....	28
2.6.3.İnsanda IDO-2 Gen Polimorfizmi:	29
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1.Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması	30
3.2.DNA Ekstraksiyonu	31
3.3.DNA Saflık ve Konsantrasyon Değerlerinin Ölçülmesi.....	31

3.4.Genotipleme:	32
3.4.1.Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analizi (Melting Curve) Genel Bilgi:.....	32
3.4.2.Reaktiflerin Optimizasyonu	33
3.4.3.Polimeraz zincir reaksiyonu aşaması	33
3.4.3.1.Hardy-Weinberg dengesi.....	34
3.4.3.2.Epi-Info programı ile gerçekleştirilen hesaplamalar	35
3.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle serum düzeyinde <i>IDO-1</i> ve sitokin konsantrasyonlarının saptanması.....	36
3.5.1.Serum Düzeyinde ELISA yöntemiyle <i>IDO-1</i> konsantrasyon tespiti.....	36
3.5.2.Serum Düzeyinde ELISA yöntemiyle <i>IL-6</i> , <i>IL-17</i> , <i>IL-4</i> , <i>IFN-γ</i> sitokinlerinin konsantrasyon tespiti	38
3.6.Çalışılan hastaların kan değerleri	39
3.7.İstatistiksel analizlerin yapılması	39
4.BULGULAR.....	41
4.1Indolamin 2-3 Dioksijenaz I ve II genotipleme için erime eğrisi grafikleri	41
4.2.Genotipleme analiz sonuçları.....	42
4.3.Hardy-Weinberg dengesine uygunluk hesaplamaları:	44
4.4. <i>IDO-1</i> ve <i>IDO-2</i> gen polimorfizmleri.....	46
4.5.Serum düzeyinde <i>IDO-1</i> ve sitokinlerin konsantrasyon sonuçları:	47
4.5.1. <i>IDO-1</i> ELISA sonuçları	47
4.5.2.ELISA yöntemiyle serum düzeyinde ölçülen sitokin konsantrasyonları	48
4.6.Serum düzeyinde <i>IDO-1</i> ve sitokinlerin korelasyonlarının incelenmesi:	50
4.6.1. <i>IDO-1</i> ve <i>IL-6</i> arasında korelasyon katsayısının hesaplanması	50
4.6.2.Genotiplere göre <i>IDO-1</i> ve sitokin konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	51
4.7.Hasta kan değerleri ve diğer istatistik sonuçları	53
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	56
6.KAYNAKLAR	61
7.SİMGELER VE KISALTMALAR	75
8.EKLER	77
9.TEŞEKKÜR	79
10. ÖZGEÇMİŞ.....	80

TÜRKÇE ÖZET

Pandemi olarak ilan edilmiş, küresel bir sorun teşkil eden COVID-19 hastalığına, koronavirüs ailesinden SARS-CoV-2 virüsü ile enfeksiyonun neden olduğu bilinmektedir. İnsan bağışıklık sisteminin bu virüse karşı verdiği tepkiler halen anlaşılmaya çalışılmaktadır. Bu araştırmada önemli bir immünmodülatör olan *IDO* (indoleamine 2-3-dioxygenase)'nun COVID-19 üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızın tasarlanmasında, SARS-CoV virüsünün özellikleri ve COVID-19'un klinik tablosu ile *IDO*'nun özellikleri ve diğer viral enfeksiyonlar ile ilişkileri göz önünde bulundurulmuştur. *IDO* gen bölgelerinde görülen polimorfizmlerin inflamatuvar epizodlarda etkili olduğu da bilinmektedir. Bu doğrultuda, *IDO*-1 ve *IDO*-2 için belirlenen iki ayrı *IDO* SNP gen bölgesinde, 40 hasta için melting curve analizi ile tek nükleotid polimorfizm (SNP) tespiti yapılmıştır. Ek olarak serum örneklerinde ELISA yöntemiyle Th1, Th2, Th17 ilişkili bazı sitokin ve *IDO*-1 konsantrasyonları saptanarak, sitokinlerin *IDO*-1 seviyeleri ile korelasyonları incelenmiştir. Yapmış olduğumuz tek nükleotid polimorfizm çalışmamızın sonucunda; *IDO*-1 rs7820268 SNP bölgesinin COVID-19 hastalığına yakınlıkla ilişkili olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu SNP bölgesi için elde edilen sonuçlar üzerine yapmış olduğumuz analizler sonucunda, yakınlık dışında, patogenezi ile bir ilişki saptanamamıştır. *IDO*-2 için incelenen rs4503083 SNP bölgesinde ise hasta ve sağlıklı kontrol grubu ile anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. ELISA sonuçlarımız da ise; IL-6 ve TNF- α ile *IDO*-1 arasında negatif yönlü korelasyonlar saptanmıştır. Önemli olarak, SARS-CoV-2 virüsünün diğer viral enfeksiyonların aksine *IDO*-1'i baskıladığı tespit edilmiştir. Yoğun bakım hastalarında, asemptomatik hastalardan daha düşük seviyelerde *IDO*-1 konsantrasyonu görülmüştür. Tez çalışma sonuçlarımız *IDO*'yu COVID-19 prognozu için terapötik hedef olarak önermektedir.

Anahtar Kelimeler: *IDO*, COVID-19, SARS-CoV-2, SNP, immünoloji, enfeksiyon

İNGİLİZCE ÖZET

EFFECT OF INDOLEAMINE 2, 3 DIOXYGENASE (*IDO*) GENE POLYMORPHISM ON COVID-19 AND CLINIC

The virus that causes COVID-19 disease is the SARS-CoV-2 virus from the coronavirus family, and people infected with this virus have the disease. This disease is a global problem and has been reported as a pandemic. The reaction of the human immune system to the COVID-19 virus is not well understood yet. In this study, it was aimed to reveal the importance of *IDO* (indoleamine 2-3-dioxygenase), which is an important immunomodulator, on the virus. In the design of our the study, the clinical course of COVID-19 and the characteristics of the SARS-CoV virus and the connection between *IDO* and other viral infections should be considered. The effect of polymorphisms in *IDO* gene regions on inflammatory conditions is also known. Considering these important issues, single nucleotide polymorphism (SNP) was analyzed with melting curve analysis in two different *IDO* SNP gene regions determined for *IDO*-1 and *IDO*-2 for 40 patients. Relationships between Th1, Th2, Th17-related cytokines and *IDO*-1 concentrations and *IDO*-1 levels of cytokines were investigated in serum samples by ELISA. As a result of the single nucleotide polymorphism study; The *IDO*-1 rs7820268 SNP region was determined to be associated with susceptibility to COVID-19 disease. In the analysis of the results obtained on the SNP region, it was found that there was a predisposition, but that there was not a relationship with pathogenesis. The rs4503083 SNP region was examined for *IDO*-2, no significant difference was found between the patient and healthy control groups. According to the ELISA results, it was observed that there was a negative correlation between IL-6 and TNF- α , and *IDO*-1. The important issue found in the study was that the SARS-CoV-2 virus suppressed *IDO*-1 unlike other viral infections. The *IDO*-1 levels were found to be lower in intensive care patients compared to asymptomatic patients. According to the results of the study, *IDO* can be recommended as a complementary marker for the diagnosis of COVID-19. Also, it may be therapeutic target for the treatment of the disease.

Keywords: *IDO*, COVID-19, SARS-CoV-2, SNP, immunology, infection

1. GİRİŞ

Pandemi olarak ilan edilmiş küresel bir sorun teşkil eden COVID-19 hastalığına, koronavirüs ailesinden SARS-CoV-2 virüsü ile enfeksiyonun neden olduğu bilinmektedir. İnsan bağışıklık sisteminin bu virüse karşı verdiği tepkiler ve hastalık patogenezi hala anlaşılmaya çalışılmaktadır. Çalışmamız, önemli bir immünmodülatör olan indolamin 2,3-dioksijenaz (*IDO*)'ın hastalık patogenezi nasıl etkilediğini ve nasıl etkilendiğini anlamayı, ileride kurgulanacak olası tedavi yaklaşımlarına imkan sağlayacak ve hastalık prognozunu olumlu yönde etkileyebilecek katkılar elde etmeyi amaçlamaktadır. Indolamin 2,3-dioksijenaz enzimleri temel görev olarak, bağışıklık sisteminde özellikle immünsupresif etkiler gösteren kinürenin yolağının ilk adımında, esansiyel bir aminoasit olan triptofanı, triptofan dioksijenaz (*TDO*) ile birlikte oksidatif olarak katabolize ederek yolağın hız sınırlayıcısı olarak görev almaktadır (Mellor, & Munn, 1999). Bu primer göreviyle, enflamatuvar süreçlerin baskılanmasında, mikroorganizmalara karşı doğal bağışıklık sağlanmasında, özellikle triptofan eksikliğine duyarlı olan bazı virüsler de dahil olmak üzere patojenlere karşı savunmada, T hücre aktivitesinin baskılanmasında, antijen sunan hücreler tarafından da eksprese edilebilmesi ile immün regülatör olarak, immün toleransta, çeşitli terapötik tedavi yöntemlerinde ve hücre döngüsü dahil daha birçok mekanizmada rol almaktadır. HCV, HIV, hRSV gibi çeşitli viral enfeksiyonlarda etkin rol aldığı da kanıtlanmıştır (Ajamian et al., 2015; Cheung et al., 2016; Lepiller et al., 2015). Daha önce çeşitli hastalıklarda incelenmiş olan, *IDO* geninde görülen tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), genellikle diğer immünmodülatörler ile bağlantılı olarak hastalıkların patogenezi ile ilişkili olabildiği gibi, SNP'ler hastalığa yatkınlık göstergesi de olabilirler. Bu tez çalışmasında *IDO-1* için rs7820268 ve *IDO-2* için rs4503083, *IDO* gen SNP bölgelerinde polimorfizm çalışması yapılmıştır. Ayrıca, COVID-19'da görülen şiddetli proinflamatuvar yanıtlar ve sitokin fırtınası göz önünde bulundurularak; *IDO-1* ve Th1, Th2, Th17 ile ilişkili olarak belirlenmiş olan bazı sitokinlerin serum düzeyinde konsantrasyonları belirlenerek, *IDO-1* ile korelasyonları incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Koronavirüsler

Koronavirüsler (CoV), hafif seyredebilen grip benzeri solunum yolu enfeksiyonlarından; MERS ve SARS'ta görülebildiği gibi çok ciddi hastalık tablolarına neden olabilen geniş bir virüs ailesinin üyesidir. Bunlar genellikle soğuk algınlığı şeklinde seyrederler. Bunun yanında hayvan türlerinde bulunup insanları enfekte ederek ciddi klinik tablolara neden olan türlerinin de mevcut olduğu tespit edilmiştir. Tek hörgüçlü develerden insanlara MERS-CoV, misk kedilerinden ise SARS-CoV' un bulaştığı yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir ("Sağlık Bakanlığı COVID Rehberi", 2020).

İlk defa 2003'te yüzlerce insanın ölümüyle sonuçlanan SARS-CoV şeklinde ortaya çıkmış, 2012'de ise MERS-CoV vakalarına rastlanmıştır ("Sağlık Bakanlığı COVID Rehberi",2020).

2.1.1 İnsanda Hastalık Yapan Koronavirüs Türleri:

CoV virüs seyri, insanlarda hafif gelişen soğuk algınlığından ağır tablo oluşturan zatürreye kadar geniş bir yelpaze şeklindedir. HCoV olarak tabir edilen insanlardaki ilk koronavirüs 1965 yılında enfekte insanların burun akıntısından ayrıştırılmıştır. Son çalışmalara göre genetik farklılıkları bulunan 6 grup CoV'un insanlarda hastalık yaptığı belirlenmiştir. Bunlar HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 ve MERS -CoV olarak adlandırılmıştır. SARS-CoV, Çin'de 2002-2003 yılında salgına sebep olan enfeksiyöz ajan; MERSCoV ise 2012'den beri Orta Doğu'da süren salgın kaynağı patojendir (Kin et al., 2015; Tyrrell, & Bynoe, 1965).

2.1.2 İnsan Coronavirus 229E (Alphacoronavirus)

1966'da soğuk algınlığı bulunan insanlardan ayrıştırılan 5 yeni faktörün ayırıcı özellikleri ortaya konulduktan sonra tespit edilmiştir. WI-38 akciğer fibroblastlarında büyümesi sağlanarak Murine Hepatitis Virus (MHV) ve Infectious Bronchitis Virus (IBV) ile morfoloji bakımından benzedikleri ortaya çıkarılmıştır. Burun akıntısı, boğaz ağrısı, hapsirme, halsizlik ve baş ağrısı genel semptomlarıdır. Hastaların %10-20 oranındaki kısmında öksürük ve ateş de gözlenmiştir. 2-5 gün aralığında kuluçka süresi mevcuttur. Kuluçka süresi 2-18 gün aralığında seyrettiğinden influenza A ve rinovirüs

patojenlerinin neden olduğu enfeksiyonlarla karıştırılabilir. Hastalık dünya genelinde görölmektedir. (Hamre, & Procknow, 1966; McIntosh et al., 1967; Tyrrell, Cohen, & Schilarb, 1993)

2.1.3 İnsan Coronavirus OC43 (Betacoronavirus, soy A)

Virüs suşu, 1967 yılında enfekte bir hastanın nazo faringeal yıkama sırasında tespit edildi. Daha sonra fare beyni içeren organ kültüründe gelişmesi sağlandı. Alfakoronavirüs (229E) gibi MHV ve IBV'den morfoloji bakımından farklılık göstermez. Alfakoronavirüs 229E ve betakoronavirüs OC43 arasında serolojik çapraz tepki bulunmaz. Betakoronavirüs OC43 de dünya genelinde görölmektedir (McIntosh et al., 1967).

2.1.4 SARS-CoV (Betacoronavirüs, soy B)

SARSCov virüsünün enfekte ettiği insanların semptomlarının başında titreme, baş ağrısı, ateş, halsizlik ve kas ağrısı gelir. Hastalar bu şikayetlerle hastaneye başvurur. Sonrasında yaklaşık 1 haftalık süreçte nefes darlığı, solunum sıkıntısı ve öksürük başlar ve de neticesinde ölüm gerçekleşebilir. Virüsün akciğerde çoğalmasında alveollerde hasar, makrofaj artışı ve epitel hücrelerde proliferasyon gözlenir. SARS hastalarında gözlenen dalağın beyaz pulpa atrofisine ek olarak akciğerde görülen hemofagositoz ve lenfopeni ölümcül H5N1 influenza virüsü enfeksiyonlarına benzerdir (Weiss, & Navas, Martin, 2005).

2.1.5 İnsan Coronavirus NL63 (Alfakoronavirüs)

Genellikle yaşlılar, küçük çocuklar ve bağışıklığı düşük, solunum yolu rahatsızlığı bulunan hastalarda görülür. NL63 ile enfekte hastalarda görülen semptomlar arasında ateş, öksürük, burun akıntısı gibi soğuk algınlığı tipi belirtiler yer alır. Hastalık hafif seyreder, kendiliğinden iyileşme görülür. Obstrüktif larenjit yaygın olarak görülür ve soğuk algınlığı kaynaklı hastalıkların yaklaşık %5'ini NL63 oluşturur. Dünya genelinde yaygındır (Van Der Hoek, Pyrc, & Berkhout, 2006).

2.1.6 İnsan Coronavirus HKU1 (Betacoronavirus, soy A)

İlk defa Hong Kong'da 2005'te bronşiolit ve pnömoni şikayetiyle hastaneye gelen 71 yaşında bir hastada tespit edilmiştir. Görülen belirtiler diğeri solunum yolu hastalıklarının belirtileri ile aynıdır. Bugüne kadar sadece 2 ölüm bildirilmiştir.

Çocuklarda hafif seyrettiği bilinmesine rağmen menenjitli olan bir vakada görülmüştür (Woo et al., 2005, 2009).

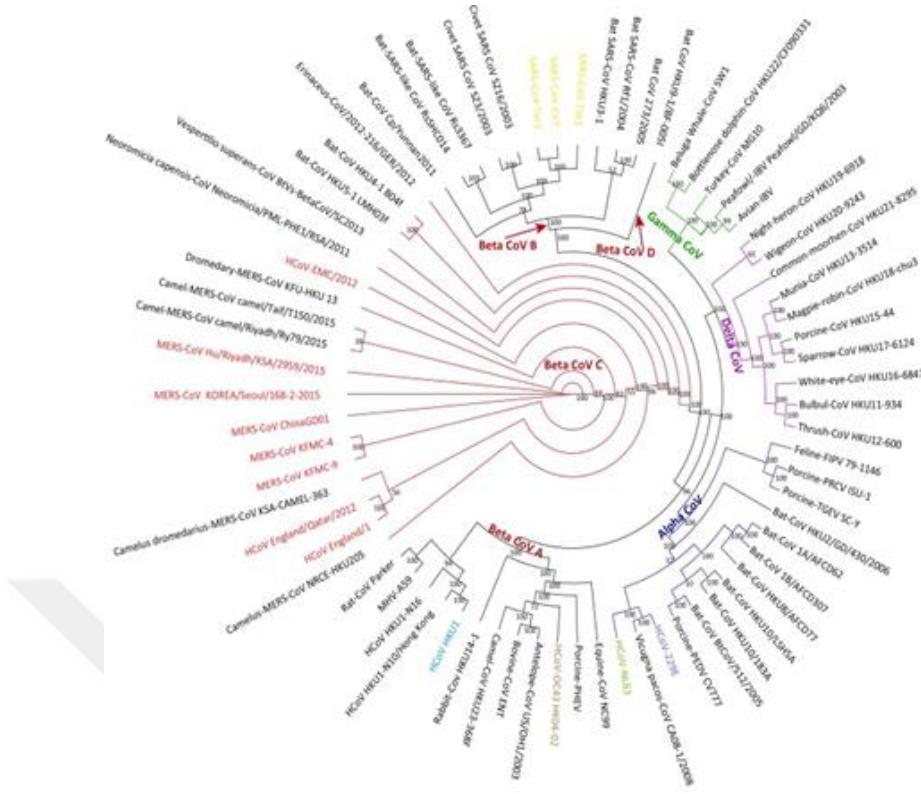
2.1.7 MERS-CoV (Betacoronavirüs, soy C)

İlk defa 2012’de Suudi Arabistan Cidde’de ağır solunum yolu hastalığından ölen 60 yaşında bir hastada tespit edilmiştir. Klinik semptomları arasında akut solunum güçlüğü, septik şok, ölümle sonlanan böbrek yetmezliği ve pnömoni yer alır. Tipik solunum yolu hastalığı gibi öksürük, boğaz ağrısı, ateş, titreme, kas ağrısı ile başlar devamında pnömoni ve dispneye hızlıca geçiş yapar. Hastalığın neden olduğu en önemli klinik özellik akut böbrek yetmezliğidir. Hastaların %75’inde farklı bir komorbidite, ölenlerin yüksek oranında ise altta yatan başka bir sağlık sorunu olma ihtimali fazladır. Virüs Arap Yarımadası çevresindeki ülkeler için endemiktir ve çoğu vaka kayıtlıdır. İlk defa tespit edildiği yıl olan 2012’den sonra yolculuk vasıtasıyla diğer ülkelere taşınmıştır ve dolayısıyla 2. salgınlar görülmüştür. MERS-CoV virüsü, insanlar için en tehlikeli virüslerden biri olarak belirtilmiştir (Drosten et al., 2013; Zaki et al., 2012; Zumla, Hui, D.S, & Perlman 2015).

2.2 İnsan Koronavirüslerinin Ekolojisi ve Filogenisi

İnsanlara adaptasyonu yüksek olan HKU1, 229E, OC43, NL63 virüsleri toplulukta yüksek oranda görülmektedir. Bağışıklık sistemi gelişmiş insanlarda hastalık hafif seyreder. Virüslerin hayvanları rezervuar olarak kullandıkları görülmemiştir fakat SARS-CoV ve MERS-CoV insan hücresinde barınma adaptasyonuna sahip olmadığından yayılmak için kendine ara konak seçer (Ge et al., 2013).

Zoonotik ve insan kaynaklı CoV’lar için filogenetik ağaç, tüm genom temel alınarak oluşturulmuştur (Şekil 2.1). Filogeninin topolojisi, RNA’ya bağımlı RNA polimeraz genine dayalı olarak inşa edilir ve bir ağaca benzer (Chan et al., 2015).



Şekil 2.1: Koronavirüslerin filogenetik olarak gösterimi. (Su et al.,2016)

Virüste yer alan rekombinasyonun esas nedeninin yaşam sarmalındaki replikasyon basamağında olduğu düşünülmektedir. Replikasyon esnasında üretilen subgenomik RNA'lar şekil değiştirerek farklı CoV veya başka virüs türlerinden benzer ilişkide olan genlerle homolog rekombinasyonu hızlandırır. Bununla birlikte birden fazla konakçıda hareketli CoV'ların rekombinasyon miktarının artmasına etkisi olasıdır. Fakat virüsün genetik rekombinasyonu tam olarak bilinmemektedir. Genomlarda bulunan, kırılma noktası denen rekombinant bölümleri birbirinden farklı rekombinant suşların aralarındaki birbirinden farklı noktalar olduğu için rastgele gözlemlenmektedir (Lai et al., 1985).

SARS-CoV alfa ve gama-CoV soylarıyla rekombinant bir geçmişe sahiptir (Stanhope, Brown, & Amrine-Madsen, 2004).

2.3 Yeni Koronavirüs Hastalığı (COVID-19)

Yeni koronavirüs, 2019-nCoV veya en son tanımı ile SARS-CoV-2; ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Hubei eyaletinin Wuhan kentinde ortaya çıkan bir insan patojenidir. Çin, 31.12.2019 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) etiyojisi

bilinmeyen ağır bir pnömoni salgını bildirmiştir. Sebep olduğu ateş, ağır solunum hastalıkları ve pnömoni gibi bileşenlerden oluşan hastalık tablosu; COVID-19 (Koronavirüs Hastalığı-2019) olarak adlandırılmıştır (Chan et al., 2020; Huang et al., 2020).

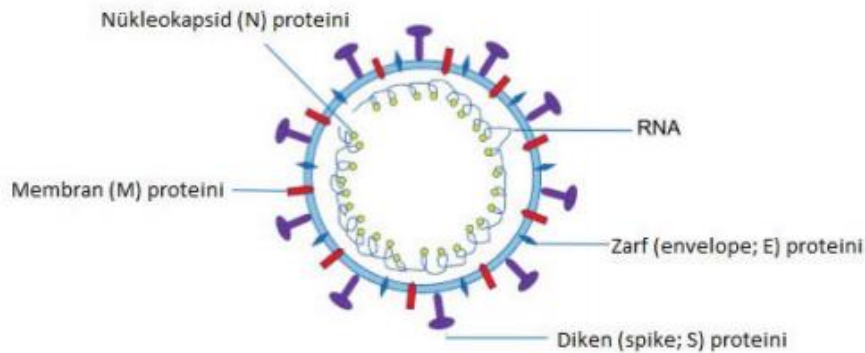
SARS-CoV-2, β -koronavirüs ailesine aittir ve genom dizilemesine göre kısmen SARS-CoV (~% 79) ve MERS-CoV (~% 50) ile benzerlik gösterir. SARS-CoV ile aynı şekilde SARS-CoV-2; ana reseptör olarak vasküler endotelyum, solunum epitelyumu, alveolar monositler ve makrofajlarda geniş şekilde ifade edilen anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (Angiotensin Converting Enzyme 2; ACE2) kullanır (Lu, 2020).

SARS-CoV-2, MERS-CoV ve SARS-CoV gibi tek zincirli RNA genomlarına sahip bir betacoronavirüstür. Viral 30 kb RNA genomuna sahip olan virüs, virüsler arasında bilinen en büyük genomik RNA'ya sahiptir. Esas olarak ORF1a/ b bölgesi olarak adlandırılan üçte ikisi, iki poliproteine (pp1a ve pp1ab) dönüşür ve yapısal olmayan proteinlerin çoğunu (nsp) kodlar. Virüs genomunun geri kalan kısımları, spike (S) glikoprotein, küçük zarf (E) proteini, matris (M) proteini ve nükleokapsid (N) proteini dahil olmak üzere Şekil:2'de görülen dört temel yapısal proteini kodlar (Brian et al., 2005; Comas-Garcia, 2019; Cui et al., 2019).

CoV N proteini, viral RNA transkripsiyonu ve replikasyonu için gerekli olan çok fonksiyonlu bir RNA bağlayıcı proteindir. Viral RNA genomunun paketlenmesi sırasında sarmal ribonükleoproteinlerin oluşturulması, çoğaltma/transkripsiyonda viral RNA sentezinin düzenlenmesi ve enfekte hücre metabolizmasının modüle edilmesinde rol oynar. N proteinin birincil fonksiyonları, viral RNA genomuna bağlanma ve ribonükleoprotein (RNP) kompleksi içine paketlenme gerçekleştirmektir. In vitro ve in vivo deneyler, N proteinin öncü RNA'ya bağlandığını ve viral genomun kopyalanması için uygun yüksek düzeyde RNA konformasyonunu koruduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan başka çalışmalar da, N proteininin aktin reorganizasyonu, konakçı hücre döngü ilerlemesi ve apoptoz gibi konakçı-patojen etkileşimlerini düzenlediğini göstermiştir. N proteini ayrıca SARS-CoV ve SARS-CoV-2'ye karşı koruyucu bağışıklık tepkilerini indükleyebilen, enfeksiyon sırasında oldukça immünojenik ve bol miktarda eksprese edilen bir proteindir (Ahmed et al., 2020; Cong

et al., 2020; Du et al., 2008; Hsieh et al., 2005; Masters, & Sturman, 1990; McBride, Van, & Fielding, 2014; Nelson, Stohlman, & Tahara, 2000; Stohlman et al., 1988; Surjit et al., 2006 Tang et al., 2005).

Virion S proteininin (Spike) C-terminal alanında bulunan reseptör bağlama alanı (Receptor Binding Domain; RBD), çoğunlukla konakçı hücre membranında bulunan ACE2'ye bağlanır. Bu nedenle akciğer, bağırsak, böbrek ve kan damarları dahil olmak üzere yüksek ACE2 ekspresyon seviyelerine sahip dokularda ciddi enfeksiyon meydana gelebilir. Bağlanmadan sonra membran füzyonu gerçekleşir. Membran füzyonu sonrasında ise virüsün genomu (RNA) sitoplazmaya salınır ve serbest RNA, iki poliprotein (pp1a ve pp1ab) sentezler. Bu proteinler çift membranlı veziküller içerisinde replikasyon-transkripsiyon kompleksini (RTK) oluştururlar. Sonrasında RTK sürekli olarak bir dizi subgenomik RNA replikasyonuna ve sentezine başlar böylece aksesuar proteinleri ve yapısal proteinler kodlanır. Konak hücrenin endoplazmik retikulumu ve golgi aygıtının kullanımı ile yeni genomik RNAlar, nükleokapsid proteinler ve virüs zarf glikoproteinleri üretilerek viral partikül vezikülleri oluşturulur. Son olarak bu veziküllerin hücre membranı ile füzyonu ile virüsler hücre dışına salınmaktadır (Hussain et al., 2005; Sawicki, & Sawicki, 2005; de Wilde et al., 2017; Wan et al., 2020).



Şekil 2.2: Koronavirüsün şematik yapısı (Zhou Y et al.,2019)

Virüsün türler arası geçişi ve insandan insana yayılımında etkili olan ACE2 reseptörü insan alt solunum yolu epitelial hücrelerinde de ifade edilmektedir. Virüs

bu reseptör aracılığı ile hücre içine girer ve hücrenin endoplazmik retikulumu ile golgi aygıtını kullanarak yeni genomik RNA'lar, nükleokapsid proteinler ve virüs zarf glikoproteinleri oluşturulup birleştirilerek yeni viral partikül vezikülleri meydana getirilir (Hussaain et al., 2005; Sawicki et al., 2005).

Anti-viral immün yanıtlarda enflamatuvar kaskadlar etkilenir, bu durum virüse karşı güçlü inflamatuvar yanıtlar doku tahribatına yol açabilir (Dai et al., 2015; Jia et al., 2005; Shi et al., 2020; Stegelmeier et al., 2019).

İmmün aracılı enflamasyon COVID-19 patogeneğinde önemli bir rol oynar. COVID-19'un ilerlemesi, lenfosit sayısında sürekli bir azalma ve nötrofil sayısında önemli bir artış ile ilişkilidir. Hastalık sürecinde çeşitli enflamatuvar belirteç değerleri [C-reaktif protein (CRP), ferritin, interlökin-6 (IL-6), IL-10, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1A) ve tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gibi] önemli ölçüde değişir. Düşük lenfosit sayısının yanı sıra yüksek ferritin, IL-6 ve D-dimer seviyeleri, COVID-19'un artmış mortalitesiyle ilişkili bulunmuştur. Şiddetli ve kritik COVID-19 hastalarında ilerleyen lenfopeninin altında yatan mekanizmalar henüz net değildir, fakat ciddi vakalarda B hücreleri, T hücreleri ve doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücrelerin sayılarında genel olarak bir azalma gösterilmiştir. Lenfopeni, SARS hastalığının önemli bir özelliğidir. SARS'taki lenfosit sayımlarının hızlı düşüşü, dolaşımdaki lenfositlerin yeniden dağıtılmasına veya apoptoz yoluyla lenfositlerin tükenmesi ile ilişkilendirilir (Gu et al., 2005; Huang et al., 2020; Qin et al., 2020; Xu et al., 2020; Zhou et al., 2020).

Yoğun bakım hastalarında diğer hastalara oranla plazmalarında daha yüksek seviyelerde IL-2, IL-7, IL-10, granülosit koloni-stimulan faktör (GCSF), 10 kD interferon gamma indüklenmiş protein (IP-10), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), makrofaj enflamatuvar protein 1- α (MIP-1 α) ve TNF- α görülür. Bazı hastalarda da konak Th17 enflamatuvar yanıtlarının ciddi akciğer patolojisi ve mortalitede önemli bir role sahip olduğu ortaya konulmuştur. Genel olarak, virüs partiküllerinin öncelikle solunum mukozasını ele geçirerek diğer hücreleri enfekte ettiği, bunun sonucunda ise bir dizi immün yanıtı neden olarak “sitokin fırtınası” adı

verilen tabloya yol açmak suretiyle hastalarda kritik tablolara neden olduğu düşünülmektedir (Guo et al., 2020).

Virüs kaynaklı akut ve kronik enflamasyonda, immün yanıtın şekillenmesi ve farklılaşacağı yön hastalık seyri için oldukça önemlidir. Virüse karşı tepkilerde ilk dönemde pro-enflamatuvar yanıtlar kontrollü bir biçimde oluşurken ileri dönemlerde immün yanıtlar sonlanabilmekte ve bağışıklanma gerçekleşebilmektedir (Braciale, & Hahn, 2013; Stagelmeier et al., 2019).

2.3.1 2019-nCoV'un Patogenezi

Akut 2019-nCoV enfeksiyonları, ateş, baş ağrısı, nefes darlığı, öksürük, kas ağrıları ve yorgunluk gibi en yaygın semptomlarla mevsimsel gribe çok benzer. Çoğu enfekte kişide hastalığın ciddiyeti hafif ile orta derecelidir ve semptomlarını evde hastaneye yatmaya gerek kalmadan yönetebilirler. Solunum güçlüğü, göğüs ağrısı veya basıncı ve konuşma veya hareket kaybı gibi ciddi semptomları olan hastalar acil tıbbi müdahaleye ihtiyaç duyarken akut koşullarda görülen diğer bozukluklar arasında hemoptizi, ishal, nefes darlığı, akut kalp hasarı ve buzlu cam opasiteleri bulunur (Yuen et al., 2020).

2.3.1.1 SARS-CoV-2 ve immünmodülatörler ile ilişkileri

SARS-CoV-2, solunum yolunu enfekte ettiğinde hafif veya şiddetli akut solunum sendromuna (SARS) neden olabilir ve bunun sonucunda IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5 dahil olmak üzere IL-6, IL-7, IL-8 (CXCL8), IL-10, IP10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-33, IL-25, IL-37, IL-38, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), hepatocyte growth factor (HGF) , Interferon-inducible protein 10 (IP-10) , MCP-1, Macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 α) , interferon gamma (IFN- γ) , interferon alpha (IFN- α), tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), macrophage colony-stimulating factor (MCSF) ve TNF- α gibi, sitokin aracılının salınmasına neden olabilir (Conti et al., 2020).

SARS-CoV-2'nin, toll-like reseptörlere (TLR) bağlanması IL-1 β üretilmesine sebep olur. IL-1 sitokin ailesi (IL-1F), metabolik enflamasyonun özellikle pro-inflamatuvar üyeler IL-1 α ve IL-1 β tarafından düzenlenmesinde kritik bir rol

oyunar. Buna karşılık IL-1F'nin bir üyesi olan IL-1 reseptör antagonisti, (aynı zamanda Anakinra, rekombinant IL-1Ra olarak da adlandırılır) IL-1 kaynaklı inflamasyonu azaltmak için endojen bir mekanizmayı temsil eder (Conti et al., 2020).

IL-37 ve IL-10, doğal ve edinilmiş bağışıklık tepkisini bastırma yeteneğine sahiptir. IL-37, IL-18Ra reseptörüne etki ederek şiddetli proenflamasyonu inhibe etme kapasitesine sahiptir. IL-37 ve IL-10, mTOR'a etki ederek ayrıca AMP kinazı artırarak immünoşüpresif etkinlik gösterirler. IL-37, MyD88'i ve ardından IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve CCL2'yi baskılayarak otoinflamatuvar ve enflamatuvar yanıtları inhibe eder (Riou, & Althaus, 2020).

IL-38; B hücreleri, makrofajlar, plasenta, beyin ve kalp gibi çeşitli doku ve bağışıklık hücrelerinde üretilir. Kronik iltihaplı romatolojik hastalıklar dahil çeşitli hastalıklarda rol oynar. IL-38, CoV'un neden olduğu viral enfeksiyonlarda proinflamasyonu inhibe ederek terapötik strateji sağlayan potansiyel bir terapötik inhibitör sitokindir (McMichael et al., 2020; Menachery et al., 2016).

Literatürde virüsün COVID-19 sepsisindeki sinoviyal sıvılara geçişiyle ilgili net veriler mevcut değildir. Literatürde şimdilik IL-6'nın reseptörünün veya kendisinin serumda doğrudan inhibisyonunun virüs replikasyonunu tetikleyip tetiklemediğine dair kesin veriler mevcut değildir (Yalcin & Yalcin, 2020).

SARS-CoV-2 dahil olmak üzere sitopatik virüsler, virüs replikatif döngünün bir parçası olarak virüsle enfekte olmuş hücrelerin ve dokuların ölümüne ve yaralanmasına neden olur. Viral enfeksiyon ve solunum yolu epitel hücrelerinde replikasyon, vasküler sızıntıyla birlikte yüksek seviyelerde virüs bağlantılı piroptoza neden olabilir. Piroptoz, sitopatik virüslerde yaygın olarak görülen programlanmış hücre ölümünün oldukça enflamatuvar bir şekli olup sonraki enflamatuvar yanıtlar için olası bir tetikleyicidir. Piroptoz sırasında salınan IL-1 β , SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında yükselir. Enfekte hastalarda kan içine pro-enflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salgılanması artar. Bu sitokinler, SARS-CoV ve MERS-CoV için Th1 hücre polarize tepkisinin göstergeleridir. İmmün sistem hücrelerinin kandan pulmoner olarak katılımının gerçekleşmesi ve lenfositlerin hava yollarına infiltrasyonu, SARS-

CoV-2 enfeksiyonu olan hastaların yaklaşık %80'inde görülen lenfopeni ve artmış nötrofil oranını açıklayabilir (Chen et al., 2019; Fink, & Cookson, 2005; Guan et al., 2020; Huang et al., 2020; Qin et al., 2020; Xu et al., 2020; Yang, 2020; Zhang et al., 2020).

Yoğun bakım gerektiren şiddetli COVID-19 hastalarının kan plazmalarında daha yüksek seviyelerde IL-2, IL-7, IL-10, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), IP-10, MCP1, makrofaj enflamatuvar protein 1 α (MIP1 α) ve tümör nekroz faktörü (TNF) görülür. Bu hastalardaki IL-6 seviyeleri zamanla artmaya devam eder (Zhou et al., 2020).

Şiddetli hastalık belirtisi olan hastalar, hafif belirtili atlatan hastalara göre periferik kanda önemli ölçüde daha yüksek bir CD14⁺ CD16⁺ enflamatuvar monosit hücre yüzdesi gösterir. Bu hücreler; MCP1, IP-10 ve MIP1 α dahil olmak üzere sitokin fırtınasına katkıda bulunan enflamatuvar sitokinleri salgılar (Zhou et al., 2020).

SARS-CoV, çoklu viral yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin interferon tepkilerini antagonize eder. Antagonizm, interferon sinyal yolunun çeşitli aşamalarında meydana gelir; buna viral RNA'nın PRR tarafından tanınmasının engellenmesi dahil olmak üzere TBK1 / NF- κ B kinaz alt biriminin inhibitörü- ϵ (IKK ϵ), TRAF3 ve IRF3, STAT1 yoluyla interferon sinyalleme sinin önlenmesi ve konakçı mRNA bozunması ile konakçı protein translasyonunun inhibasyonu aracılık eder. Bu yollardan bir kısmının SARS-CoV-2'de de korunmuş olduğu düşünülür. (Frieman et al., 2007, 2009; Siu et al., 2014; Sun et al., 2012; Narayanan et al., 2008; Versteeg et al., 2007).

Enflamatuvar hücre infiltrasyonu, virüsten kaynaklanan doğrudan hasara ek olarak proteazların ve reaktif oksijen türlerinin aşırı salgılanması yoluyla akciğerde hasara neden olabilir. Bu durumlar birlikte alveolar hücrelerin deskuamasyonu, hiyalin membran oluşumu ve pulmoner ödem dahil olmak üzere yaygın alveolar hasara neden olur. Bu, akciğerdeki gaz değişiminin etkinliğini sınırlayarak nefes almada güçlük ve

düşük kan oksijen seviyelerine neden olur. Akciğer ayrıca ikincil enfeksiyonlara karşı daha savunmasız hale gelir (Tian et al., 2020; Xu et al., 2020).

Sitokin fırtınası sebebiyle yükselen TNF seviyeleri, septik şoka ve çoklu organ yetmezliğine neden olabilir. Bunlar, bazı hastalarda gözlenen miyokard hasarı ve dolaşım yetmezliğine neden olabilir (Ruan et al., 2020).

Virüs akciğer hücrelerinin yanı sıra diğer hedefleri de enfekte edebilir. Çeşitli organlar dışında virüs; T lenfositleri, makrofajları ve monosit türevi dendritik hücreler gibi immün sistem elemanlarını etkiliyor olabilir. Monositler ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerindeki viral enfeksiyon; enfeksiyon başarılı olmasa bile anormal sitokin üretimine neden olabilir (Cheung et al., 2005; Gu et al., 2005; Law et al., 2005; Tseng et al., 2005; Yilla et al., 2005).

COVID-19 hastalarında B hücre yanıtları, semptom başlangıcından yaklaşık 1 hafta sonra T foliküler yardımcı hücre yanıtları ile eşzamanlı olarak ortaya çıkar. SARS-CoV enfeksiyonu olan hastalarda, B hücre yanıtları tipik olarak ilk önce nükleokapsid (N) proteinine karşı ortaya çıkar. Semptom başlangıcından sonraki 4-8 gün içinde, S proteinine karşı antikor yanıtları bulunur. S proteinine karşı nötralize edici antikor tepkileri 2. haftada gelişmeye başlar ve çoğu hasta 3. haftaya kadar nötralize edici antikorlar geliştirir. Viral titrelerin SARS-CoV-2 için SARS-CoV' dan daha erken zirve yaptığı göz önüne alındığında antikor tepkileri de daha erken ortaya çıkmaktadır (Kim et al., 2019; Nie et al., 2004; Pan et al., 2020; Peiris et al., 2003; Tan et al., 2004; Temperton et al., 2005; Thevarajan et al., 2020; Wu et al., 2004; Zou et al., 2020).

2.3.2 COVID-19 ve Klinik İncelemeler:

Akciğer ilişkili akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ve pnömoni enfekte vakalar için önemli klinik tanı kriteridir. Akciğerler bu sebeple 2019-nCoV

enfeksiyonunun birincil bölgesidir. Enfekte hastaların göğüs BT'sinde genellikle 2019-nCoV pnömonisinin özelliği olarak akciğerlerde bilateral buzlu cam opasite lezyonları görülür. COVID-19 hastalarından alınan akciğer, karaciğer ve kalp biyopsi örnekleri üzerinde yapılan patolojik çalışmalar; akciğerin, tip II pnömositlerin hiperplazisi ve alveolar epitel hücrelerinde hasar gibi patolojik değişikliklerle ana etkilenen organ olduğunu ortaya koymuştur. Trombotik mikroanjiyopati, küçük trombotik damarlar etrafında önemli miktarda CD4⁺ mononükleer hücre birikimi ve dikkate değer kanamalar olması önemli ölüm nedenleri olarak görülür. Akciğerde aktive olmuş yerel megakaryositler, trombosit agregasyonu, fibrin birikimi ve pıhtı oluşumu bu süreçte rol oynar. Diffüz alveolar hasar (DAD), interstisyel bölgelerde lenfosit infiltrasyonu, çekirdekli dev hücrelere bitişik pnömositler, pnömositlerin hiperplazisi, alveolar fibrin birikimi, eksüda oluşumu, lenfositik inflamasyon, alveolar kanallar ve bronşiyollerde gevşek bağ dokusu, intra- fibroblastlarla çevrili alveolar fibrin, pnömositler içindeki viral partiküller ve hiyalin membran oluşumu, önceki çalışmalarda tanımlanan en sık gözlenen histopatolojik değişikliklerdir. Ayrıca, otopsi incelemelerinde pulmoner arterlerde sitoplazmik vakuolizasyon, dallanan küçük damarlarda multinükleer görünümlü megakaryosit (eksüdatif fazda), pulmoner mikroanjiyopati, alveoller çevresinde küçük kılcal damarlar içinde fibrin pıhtılaşması, kapiller tıkanıklık, alveolar kanamalı küçük damar trombozu, ve akciğerlerdeki alveolar kılcal damarların kalınlaşması görülmüştür. SARS'ta ve MERS'te de benzer bulgular bildirilmiştir. Ölümcül SARS-CoV vakalarında baskın visseral makroskopik değişiklikler; ödemli akciğerler ve çok sayıda konjesyon, pulmoner hila ve karın boşluğunda lenf düğümlerinin genişlemesi bildirilmiştir. Ayrıca mikroskopik bulgular arasında bronşiyal epitelyal soyulma, silia kaybı ve skuamöz metaplazi mevcuttur. MERS-CoV'de hyalin membranlarla eksüdatif diffüz alveolar hasar, pulmoner ödem, tip II pnömosit hiperplazisi, interstisyel pnömoni ve multinükleat sinsitiyal hücreler dahil benzer bulgular gözlenmiştir. H1N1 influenza enfeksiyonlarında da bildirilmiş olan megakaryosit yanıtı ve trombosit üretimi, alveollerdeki nötrofillerde viral RNA bolluğu ve bazı dejenere nötrofillerin varlığı bu hücrelerdeki viral enfeksiyona işaret etmektedir (Belen-Apak, & Sarıalioglu, 2020; Copin et al., 2020; Ding et al., 2003; Hanley et al., 2020; Joob, & Wiwanitkit, 2020;

Li, & Fan, 2020; Nicholls et al., 2003; Song et al., 2020; Sonzogni et al., 2020; Tian et al., 2020; Xu et al., 2020).

2.4 İNDOLAMİN 2-3 DİOKSİJENAZ (IDO)

İnsan ve farelerin 8. kromozomu üzerinde bulunan 15kbp boyutlu bir gen tarafından eksprese edilen indolamin 2-3 dioksijenaz (IDO) enzimi, triptofan-kinürenin yolağının ilk adımında triptofanın oksidatif katabolizmasına aracılık ederek, yolağın hız kısıtlayıcısı olarak görev alan flavin bağımlı bir oksidoredüktazdır (Mellor et al., 2004).

İnsan IDO (hIDO) cDNA'sı, yaklaşık olarak 45 kd ağırlıklı ve 403 aminoasitten oluşan proteini kodlar (Sugimoto et al., 2006).

IDO enziminin aktivasyonunda HEM grubu önemli rol oynar. Sebebi, enzim aktivasyonun başlangıcında ferrik demirin (Fe^{+3}) ferröz demire (Fe^{+2}) indirgenmesiyle eş zamanlı olarak enzimin aktivasyon bölgesine triptofan ile birlikte oksijenin bağlanmasıdır (King, & Thomas 2007).

Triptofanın yıkım adımlarında son ürün olarak nikotinamid adenozin dinükleotid (NAD^{+}) sentezinin gerçekleştiği yolak genel olarak kinürenin yolağı olarak adlandırılır. Memelilerde triptofanın %95'inden fazlası kinürenin yolağı aracılığıyla metabolize edilir. 1927 yılında kinürenin ilk kez izole edilmiş ve yapısı anlaşılmıştır. Triptofandan kinürenin dönüşümü gerçekleşirken ilk enzimatik ve hız kısıtlayıcı adımı triptofanın N-formil kinürenine oksidasyonu olup bu basamağın karaciğerde bulunan triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO) aracılığıyla olduğu 1936 yılında anlaşılmıştır. Yani memelilerde ilk olarak bulunmuş indüklenabilir enzim sistemi TDO'dur. TDO, triptofan ve glukokortikoidlerin yanı sıra histidin, kinürenin ve çok az oranda da tirozin ve fenilalaninle indüklenmektedir. Bazı hastalıklarda idrarda triptofan metabolitlerinin seviyelerinde görülen farklılıklara rağmen karaciğerlerinde TDO aktivitesinin beklendiği gibi yüksek olmaması triptofan katabolizmasında farklı bir enzimin rol aldığını düşündürmüştür. İkinci bir enzim olarak karaciğer dışı dokularda triptofanı kinürenine çeviren enzim izole edilmiştir. Bu enzimin, D-triptofan, L-triptofan,

triptamin, serotonin gibi çeşitli indolamin türevlerini substrat olarak kullanmasından dolayı bu enzime indolamin 2,3 dioksijenaz (*IDO*) adı verilmiştir. *IDO*, ilk olarak 1967 senesinde Oshamu Ayaishi ve arkadaşları tarafından tavşan bağırsağından izole edilmiş ve aynı sene antimikrobiyal direnç mekanizmalarında da etkin olarak rol aldığı anlaşılmıştır (Takikawa, 2005; Taylor, & Feng, 1991).

Hem TDO hem de *IDO* ortak bir reaksiyonu katalizleseler de eksprese oldukları dokular farklıdır; biyolojik görevlerinin de farklı olduğu gösterilmiştir. Normal koşullarda kinürenin yolağı aktif, *IDO* üretimi düşüktür. Fakat enflamasyon veya immün aktivasyon gerçekleştiğinde *IDO* ekspresyonu artar ve kinürenin yolağı baskın duruma gelir. TDO ve *IDO* aracılı reaksiyon sonucu oluşan kinürenin değerinin, substrat olarak görev alan triptofan değerine oranlanması, triptofan yıkımı ve *IDO* aktivitesi için önemli bir belirteçtir (Kin/Trp). İmmün aktivasyon düzeylerindeki artış ile bu oran arasında doğru orantı olduğu bildirilmiştir. Triptofan yıkımının TDO veya *IDO* kaynaklı olup olmadığını anlamak amacıyla immün sistem aktivasyonunu da ilgili biyobelirteçlerle birlikte değerlendirmek gerekir. Örneğin Th1 immün yanıtının incelenmesinde duyarlı bir belirteç olarak neopterin konsantrasyonları ile ilişkisine bakılması gibi (Fuchs et al., 1991; Schrocksnadel et al., 2003, 2006).

TDO'nun hemen hemen tamamı karaciğerde bulunur. Kortikosteroidler tarafından düzenlenir. *IDO* ise akciğer ile plasentada yüksek oranda etkinlik göstermenin yanında ekstrahepatik memelilerde yaygın şekilde dağılım göstermektedir. (Taylor et al., 1991)

IDO hücre içinde devamlı veya indüklenerek plasenta, akciğer, kalın ve ince bağırsaklar, karaciğer, dalak, mide ve beyinde çoğunlukla da immün sistemin dendritik hücreleri, monositleri ve makrofajları gibi antijen sunabilen hücreleri tarafından ifade edilir. Myeloid kökenli hücrelerde (DH'ler, makrofajlar, monositler, ve eozinofiller), fibroblastlar, epitelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve de bazı tümör hücre gruplarında IFN- γ etkisiyle indüklenebilir. IFN- γ dışında IFN- α , IFN- β , TGF- β , TNF- α gibi sitokinler veya bazı lipopolisakkaridler gibi TLR ligandları ile de uyarılabilir. Kinürenin ve 3-HK'de T hücrelerinde triptofan gereksiniminin artmasıyla ilişkilidir. Ayrıca IL-4, IL-6, IL-10, PGE2 (Prostaglandin E2), CD40 gibi modülatör sitokinler

hücre tipine bağlı olarak *IDO* ifadesinde değişikliklere neden olur (King et al., 2007; Murakami et al., 2013; Taylor et al.,1991).

2.4.1 TRIPTOFAN VE KİNÜRENİN

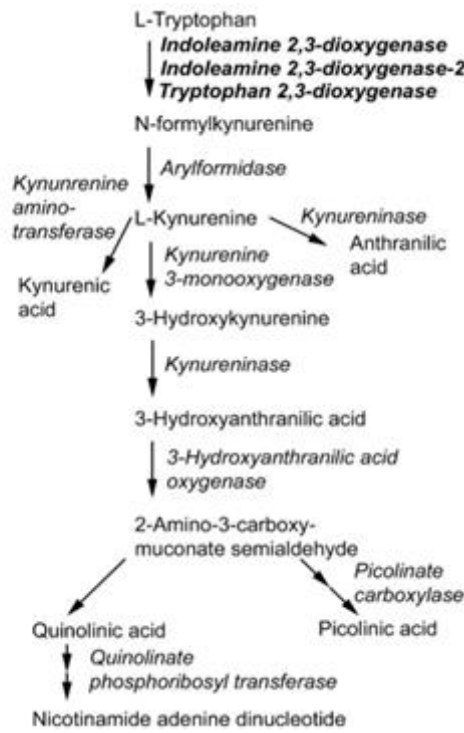
En az miktarda bulunan esansiyel amino asit olan triptofanın vücutta üç temel bilinen görevi vardır: bunlar genel protein sentezi, serotonin biyosentezi, kinürenin yolu aracılığıyla katabolizmadır. Vücuttaki triptofan metabolizmasının çoğu, biyolojik süreçleri çeşitli şekillerde etkileyen kinürenin yolağıyla gerçekleşir. Mikro ortamdaki triptofan tükenmesi, hücre proliferasyonunu baskılayabilir böylece immün modülatör veya anti-mikrobiyal etkiler yaratabilir. Yolak metabolitleri biyolojik olarak aktif olabilir; örneğin kinolinik asit, N-metild-aspartat (NMDA) tarafından aktive edilen glutamat reseptörleri için bir agonist görevi görür. Ayrıca triptofan, protein sentezi için gerekli olan temel bir amino asit olup ökaryotlarda anahtar nörotransmitterler serotonin ve triptamine dönüştürülür (MacKenzie et al., 2007; Maddison, & Giorgini, 2015; Perkins, & Stone, 1983).

Kinürenin yolağı metabolitlerinin mutlak ve göreceli seviyelerindeki dengesizlikler nörodejeneratif bozukluklarla da güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Yolak ayrıca diğer beyin bozukluklarının (örneğin şizofreni, bipolar bozukluk) yanı sıra bazı kanser türleri ve HIV gibi çeşitli patogenezlere de rol oynar (Maddison et al., 2015).

Yolakta ilk kararlı molekül olan l-kinürenin (l-KYN) sentezi, üç mekanizmadan biri aracılığıyla gerçekleşir; 1.) l-KYN'nin kinürenin aminotransferaz (KAT) ailesi enzimleri tarafından deaminasyonu, kynurenic asit (KYNA) üretimi ile sonuçlanır; 2.) l-KYN'nin kinureninaz tarafından degradasyonu, antranilik asit üretimiyle sonuçlanır; 3.) l-KYN'nin kinürenine monooksijenaz (KMO) ile hidroksilasyonu, 3-hidroksikinurenin (3-HK) üretir. 3-HK daha sonra kinureninaz (KYNU) tarafından 3-hidroksianthranilic aside (3-HANA) dönüştürülür ve daha sonra 3-hidroksianthranilate 3,4-dioxygenase (3-HAO) ile 2-amino-3-carboxymuconic 6-semialdehide oksitlenir. (ACMS). Fizyolojik koşullar altında, bu ara ürün kendiliğinden yeniden birleşerek kinolinik asit (QUIN) oluşturur. Bu daha sonra nikotinik asit ve nihayetinde NAD^+

oluşturmak için kinolinat fosforibosiltransferaz (QPRT) ile transamine edilir. Metabolit ACMS ayrıca 2-amino-3-karboksimukonik-6-semialdehit dekarboksilaz aktivitesi yoluyla pikolinik asit üretmek için metabolize edilebilir (Pucci et al.,2007). Kinürenin yolağı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.

Kinürenin, kinolinik asit ve pikonilik asit T lenfositleri için doğrudan toksik etki de gösterebilir (Soliman et al., 2014).



Şekil 2.3 Kinürenin yolağı (Ball et al.,2009)

Sağlıklı bireylerde serumda triptofan ve kinüreninin fizyolojik düzeylerde konsantrasyonları yaklaşık olarak sırasıyla $73,0 \pm 14,9 \mu\text{mol/L}$, $1,92 \pm 0,58 \mu\text{mol/L}$, Kin / Trp oranı ise $26,9 \pm 8,1 \mu\text{mol/mmol}$ 'dür. Konsantrasyon oranları erkeklerde kadınlara göre %15 daha yüksek görülmektedir. Buna sebep olarak insan 26 koriyogonadropik hormonu (hCG) düşünülmektedir (Schrocksnadel et al., 2006).

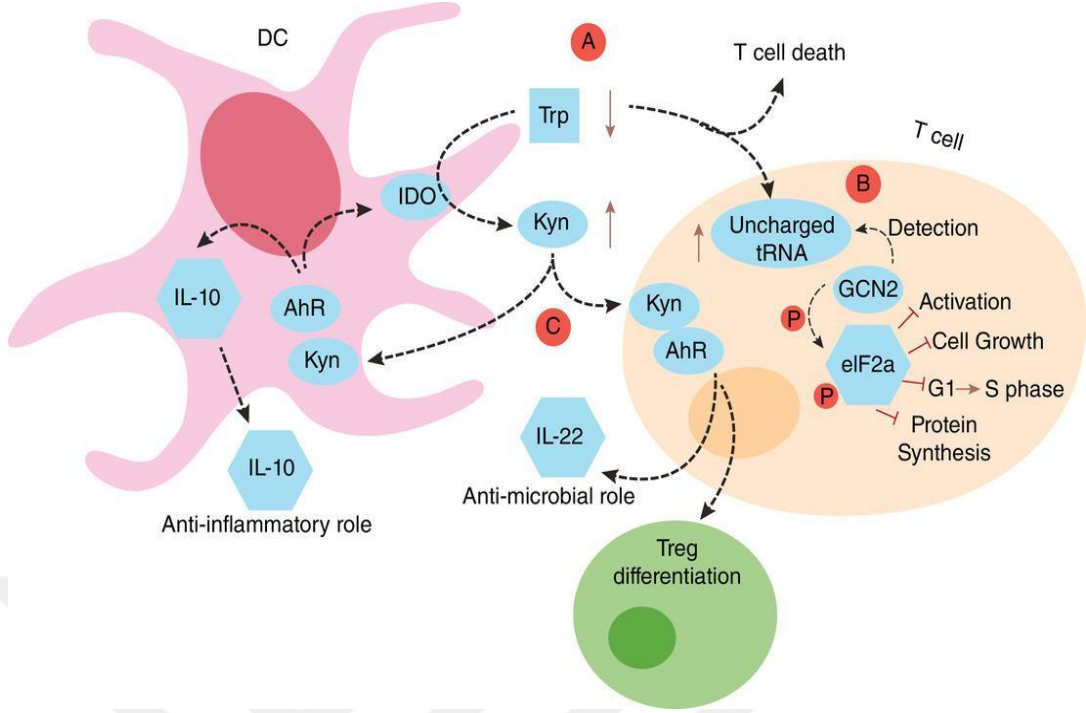
2.4.2 *IDO* ve İMMÜN SİSTEM İLİŞKİSİ

2.4.2.1 *IDO* Aktivitesinin İmmünmodulator Özellikleri

Kinürenin yolu boyunca L-triptofanın oksidatif bozunması sonucu hücre sel tükenmeye uğraması, konakta çeşitli enfeksiyöz patojenlerin büyümesini inhibe eder. Bu özelliği ile *IDO*, aynı zamanda önemli bir bağışıklık kontrol enzimi olarak görev alır. Bu durum *IDO* enziminin, bulaşıcı hastalıklar, fetal rejeksiyon, organ nakli, enflamatuvar ve otoimmün bozukluklar, kanser ve viral enfeksiyonlarda etkin rol almasına sebep olur (Munn et al., 2013).

IDO fonksiyonel olarak ilk kez maternal fetal toleransa sağladığı katkı ile tanımlanmıştır. *IDO* aracılı metabolik yolak, basit ve evrimsel süreçte korunmuş bir immün tolerans mekanizmasının parçasıdır. *IDO* geni eksik olan farelerde yapılmış çalışmalar, santral immün toleransta *IDO*'nun rolü olduğunu kanıtlar. Yapılan diğer bazı çalışmalar ile *IDO*'nun edinilmiş periferik toleransa da aktif olarak katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (Beutelspacher et al., 2006; Gurtner et al., 2003; Hayashi et al., 2004; Kwidzinski et al., 2005; Mellor et al., 2003; Munn et al., 1998).

Şekil 2.4'te görüldüğü gibi *IDO* aktivitesi, hücrede bulunan Trp miktarını azaltarak ve hem *IDO* eksprese eden APC'leri hem de T hücrelerini etkileyen Kyn miktarını arttırarak bağışıklık sistemini çift dallı bir şekilde etkiler. Bu immün regülasyon mekanizması, *IDO* aktivitesi gösteren hücrelerin etrafında immünsüpresif bir mikro ortam oluşturarak T hücre fonksiyonunun baskılanmasına yol açar (Berthon et al., 2013; Mellor, & Munn, 1999; Munn et al., 1999; Munn, & Mellor, 1999, 2004).



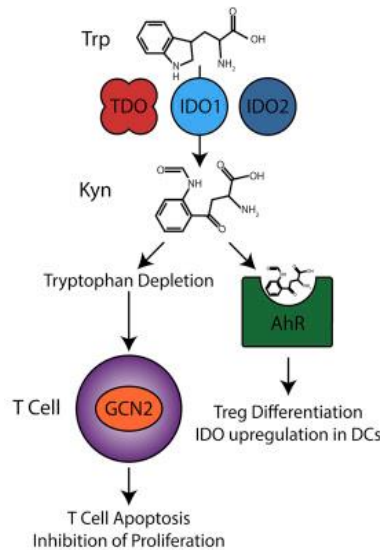
Şekil 2.4 Trp katabolizmasının T hücreleri ve DH'ler üzerindeki etkisi (Benavente et al., 2019)

IDO aktivitesinin neden olduğu Trp eksikliği, hücrede yüksüz Trp-tRNA'ların birikmesine izin verir, bu da GCN2'yi (ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alfa kinaz 4) aktive ederken, rapamisin'in mekanik hedefini (mTOR) inhibe eder. GCN2, translasyon ökaryotik başlatma faktörü 2'nin (eIF2 α), alt biriminde serin 51'i fosforile eden, 4 strese duyarlı kinazdan biridir. Bu yolak T hücresi aktivasyonunu önler. Ayrıca GCN2, *IDO* aracılı baskılanmaya duyarlılık için gereklidir. eIF2 α , GCN2 tarafından fosforile edildikten sonra, hücre büyümesi ve translasyon bloke edilir. T hücrelerinde *IDO*'nun aracılık ettiği Trp tükenmesi, G1'den S fazına geçişi engeller. In vivo modeller kullanılarak yapılan çalışmalar, değiştirilmiş GCN2'ye sahip T hücrelerinin bu etkiye duyarlı olmadığını göstermiştir. Ayrıca mTOR, hücre çoğalmasını, hücre homeostazını ve diğer birçok hücre işlevi kontrol etmek için çevresel sinyalleri entegre ederek hücrenin beslenme durumunu algılayabilen evrimsel olarak korunmuş bir kinazdır. Efektör T hücrelerinin yeterli aktivasyonu ve proliferasyonu için mTOR'un gerekli olduğu, Treg'lerin ve diğer immün fonksiyonların gelişimini sınırladığı bilinmektedir. Bu nedenle mTOR, bağışıklık tepkisinin temel bir

düzenleyicisidir (Donnelly et al., 2013; Lageix et al., 2014; Metz et al., 2012; Munn et al., 2005; Powell et al., 2012).

IDO eksprese edebilen plazmasitoid DH'ler (pDH), inaktif Treg'leri aktive ederek güçlü bir baskılayıcı aktivite başlatır (Sharma et al., 2007).

IDO'nun aktifleşmesi sonucu etkilediği kinürenin yolağında, kyn, kynurenic asit gibi yolaktaki farklı ürünler, diğer immün modülasyon mekanizmalarına katılır. Bu metabolitler, aril hidrokarbon reseptörüne (AhR) bağlanabilir ve bu molekül için ligand görevi görebilir. AhR, endojen ligandları saptadıktan sonra bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını modüle edebilen bir transkripsiyon faktörü olarak görev alır. Kyn'in AhR'ye bağlanması, Th1, Th2 veya Th17 alt kümelerini etkileyebilecek Foxp3^+ Treglerin modülasyonunu ve proliferasyonunu tetikleyerek T hücreleri için AhR'ye bağımlı farklılaşma yolunun aktivasyonuna da yol açar. Ayrıca Kyn-AhR etkileşimi, DC'ler tarafından *IDO* ve IL-10'un ekspresyonunu ve T hücre inhibisyonunu indükler. IL-10, viral enfeksiyonlarda anti-enflamatuvar özellik göstermesi yönünden önemli bir role sahiptir. AhR, antimikrobik etki gösteren IL-22 transkripsiyonunu indükler ve Treg farklılaşmasına da aracılık eder (DiNatale et al., 2010; Fallarino et al., 2006; Jones, 2006; Mezrich et al., 2010; Opitz et al., 2011).



Şekil 2.5 Kyn metabolizmasında Treg farklılaşması için AhR katılımı (Dey et al., 2017)

Bellek T hücrelerinin proliferasyonu, *IDO* aktivitesinin aracılık ettiği Trp katabolizmasıyla doğrudan ilişkilidir. Farelerde allogreft sağkalımı üzerine yapılan bir çalışmada, *IDO*'nun inhibisyonu ve indüksiyonu birlikte değerlendirilmiş, *IDO*'nun aracılık ettiği Trp katabolizmasının, bellek CD8⁺ T hücrelerinin oluşumunu kontrol ettiği tespit edilmiştir. *IDO* aktivitesi yukarı yönde düzenlendiğinde merkezi ve efektör bellek CD8⁺ T hücreleri azalır, ancak bu hücreler *IDO* baskılandığında çoğalır (Liu et al., 2007).

IDO aktivasyonu IgE ilişkili alerjik reaksiyonlarda rol alabilir. IFN aracılığıyla hem atopik hem atopik olmayan monositlerin uyarılması karşılaştırıldığında, *IDO* geninin atopik monositlerde 4 kat fazla arttığı belirtilmiştir. Bu durum detaylı olarak açıklanmamış olmasına rağmen, *IDO* gen polimorfizmleri veya sitokin düzeylerindeki değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (von Bubnoff, Koch, & Bieber, 2003).

IDO aktivitesinin bloke edilmesi ile, MSC'lerin T hücre proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin tamamen ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (Menta et al., 2014).

2.4.2.2 *IDO*' nun Antiviral Etkileri

Kinürenin yolu boyunca triptofan bozunması, HIV dahil olmak üzere çeşitli kronik viral enfeksiyonlarda tümör toleransı ve immün işlev bozukluğunun iyi bilindiği çok çeşitli patolojik süreçlerle ilişkilidir. Kinürenin yolağı metabolizma ve bağışıklığın kesişme noktasıdır. Enflamasyonda da önemli bir rol oynar. Aynı zamanda akut ve kronik enfeksiyonların kontrolünde karşıt bir rol oynar. *IDO*'nun antijen sunan hücreler tarafından artan ekspresyonu, lokal veya sistemik triptofan tükenmesine yol açarak belirli mikroorganizmalara karşı bir savunma mekanizması oluşturur. Tersine antijene özgü T hücresi tükenmesi ve Treg hücrelerin toplanmasıyla immün baskılamaya da yol açabilir. *IDO*'nun, antiretroviral terapi bağlamında da HIV immün disfonksiyonunda bir immün yanıt kontrol noktası olduğu kabul edilmiştir. HIV proteinleri Tat ve Nef tarafından kinürenin yolunun aktivasyonuna ek olarak bağırsak florasında bulunan triptofan-parçalayıcı bakteriler, bağırsak mukozal

CD4 Th17 / Th22 hücrelerinin disfonksiyonu ile ilişkilendirilerek mikrobiyal translokasyona yol açar. Sistemik bir kinureninin aktivasyon döngüsü başlatır. Kendi kendine devam eden bu geri bildirim döngüsü, HIV ile enfekte hastalarda hastalığın ilerlemesi üzerinde zararlı etkilere sahiptir (Routy et al., 2015).

İnfluenza virüsü enfeksiyonu sırasında fare fibroblast hücrelerinde *IDO*'nun indüksiyonu, murin bir hücre hattında influenza virüs suşunun replikasyonunun sınırlandırılmasına katkıda bulunur. İnfluenza enfeksiyonu, akciğer parankimindeki indolamin 2,3-dioksijenaz (*IDO*) aktivitesinde artışa neden olur. Triptofanın tükenmesi ve ilişkili metabolitlerin üretimi, enfeksiyona karşı bağışıklık tepkisini zayıflatır. *IDO*'nun influenza virüsü enfeksiyonuna karşı primer bağışıklık tepkisi, Th1 ve Th17 yanıtını da artırır. *IDO*, tümör ve viral antijenlere karşı CD8⁺ T hücre immün yanıtlarını baskılar (Fox et al.,2013; Huang et al.,2013; Rytelowski et al.,2014).

IL-6, STAT3 sinyalizasyonu inhibe edildiğinde IFN- γ 'dan bağımsız bir şekilde *IDO* ekspresyonunu indükleyebilir. Yapılan bir çalışma akciğer parankiminde IFN- γ 'nın baskılandığı durumlarda dahi *IDO*' nun akut pulmoner enflamasyonu için kritik bir düzenleyici olarak görev alabildiğini göstermiştir (Lee et al.,2017).

Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu olan hastalarda, indolamin-2,3-dioksijenaz 1 (*IDO*) artmış aktiviteye sahiptir. Hepatik *IDO*'nun HCV enfeksiyonundan önce aşırı ekspresyonu, hepatositlerde HCV replikasyonunu önemli ölçüde bozar. siRNA aracılı olarak *IDO*'nun susturulması, *IDO*' nun IFN aracılı bir anti-HCV efektörü olarak işlev gördüğünü gösterir. Ayrıca *IDO* ekspresyonu CD4⁺ T hücresi proliferasyonu üzerinde önemli bir inhibitör etkiye sahiptir. Hepatik *IDO*, güçlü şekilde IFN tarafından indüklendiğinde ve eş zamanlı devam eden HCV replikasyonu olduğunda *IDO* ekspresyonu önemli ölçüde artar. Hepatik *IDO*, viral replikasyonu yavaşlatır ve ayrıca konakçı immün tepkilerini düzenleyerek HCV enfeksiyonu sırasında ikili bir rol üstlenir. Hepatik *IDO* ekspresyonunun düzenlenmesinde IRF1 (IFN-düzenleyici faktör 1) ve STAT1 (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 1 aktivatörü) görev alır (Lepiller et al., 2015).

T hücreleri, insan solunum sinsityal virüsüne (hRSV) karşı oluşan hücresel immün tepkilere katılır ve konakçı hücrenin iyileşmesinin yanı sıra viral klirens için gereklidir. hRSV enfeksiyonu T hücre fonksiyonunu azaltmak için *IDO*'yu indükler. Ek olarak *IDO*, enfeksiyonun neden olduğu CXCL10 seviyelerini azaltabilir. Trp eksikliğini ve ardından *IDO*'nun antiviral etkilerini ortadan kaldırmaya yönelik bir çalışma da, hRSV ve parainfluenza virüsü tip 3 ile enfekte olmuş hücrelerde, Trp seviyelerinin yenilenmesi yoluyla viral büyümenin yeniden sağlanmasının mümkün olduğunu göstermiştir. hRSV, viral replikasyona bağlı olan fakat IFN- γ 'dan bağımsız olan insan monosit türevli DC'lerden *IDO* ekspresyonunu indükler. Virüsün replikasyonu ile *IDO*'nun ekspresyonu arasında doğrudan bir ilişki vardır. *IDO* aktivitesi hRSV'de, NF- κ B, p38 ve MAPK aracılığıyla RIG-I yolu üzerinden indüklenir (Ajamian et al., 2015; Rabbani et al., 2016; Rajan et al., 2017).

IDO ekspresyonundaki artış, hRSV ile enfeksiyondan 72 saat sonra mezenkimal kök hücrelerde 70 kata kadar çıkabilir ve anti-IFN kullanımı *IDO* ekspresyonunu azaltır. hRSV ile enfekte mezenkimal kök hücrelerde *IDO*'nun aşırı ekspresyonu, daha sonraki hRSV enfeksiyonlarına karşı immün koruma eksikliğiyle ilişkili olabilecek lenfosit proliferasyonunu olumsuz yönde etkiler (Cheung et al., 2016).

Herpes simpleks virüsü tip 1 (HSV-1) ile enfeksiyonda, *IDO* aktivitesinin inhibisyonu; viral replikasyonu, virülansı veya gecikme indüksiyonunu etkilemez (Divanovic et al., 2013).

IDO aktivitesi 1- Metil Triptofan (1-MT) ile inhibe edilebilmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, influenza A suşu X31 (H3N2) ile prime edilmiş, 1MT ile işleme tabi tutulmuş ve 28 gün H1N1 ile maruziyete bırakıldıktan sonra, *IDO* inhibisyonunun influenza virüsüne verilen bellek T hücresi tepkileri değerlendirilmiştir. Bellek Th1 hücrelerinin ve akciğer virüsüne özgü CD8⁺ IFN γ ⁺ T hücrelerinin, kontrol grubuna (1mT tedavisi olmaksızın) kıyasla 1mT ile tedavi edilen fare grubundan alınan bronkoalveolar sıvıda (BAL) daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Sage et al., 2014).

2.5 Indolamin 2,3- dioksijenaz 2 (IDO 2)

Triptofan yıkım yolağında; TDO ve *IDO* (*IDO-1*) dışında bir diğer indolamin 2-3 dioksijenaz alt grubu enzim *IDO-2*'de görev almaktadır. *IDO-1* ve *IDO-2* yüksek seviyede sekans özdeşliği göstermesine rağmen (insan ve fare için yaklaşık % 43), önemli kinetik ve fonksiyonel farklılıklara sahiptirler. İki enzimin ekspresyon modeli farklılık gösterir. *IDO-1*, çeşitli dokularda ifade edilirken, *IDO-2*, dendritik hücreler (DC'ler) ve B hücreleri dahil olmak üzere bağışıklık sisteminin karaciğer, böbrek ve antijen sunan hücrelerinde (ASH'ler), bunların da yalnızca belirli gruplarında ifade edilir (Merlo et al., 2014; Metz, Smith, & DuHadaway, 2014).

IDO-1 ve *IDO-2* proteinleri, insanlarda ve farelerde kromozom 8'de birbirine bitişik genler üzerinde kodlanır, bu durum gen duplikasyonu ile açıklanır (Yuasa et al., 2007).

Veri tabanı analizi, hem *IDO-1* hem *IDO-2* genlerinin, monotrem ve keseli hayvanlar da dahil olmak üzere memeli soyunda geniş çapta dağıldığını göstermektedir. *IDO-1* ve *IDO-2* genleri, korunmuş bir genomik yapıya sahiptir. Farelerde, her gende birden fazla mRNA türü kopyalanması sebebiyle *IDO-1* ve *IDO-2* genleri çok sayıda promoter bölgesine sahiptir. Fare ve insan *IDO-2* genlerinin kodlama sekansı içinde, eksonları eksik olan bir dizi alternatif olarak eklenmiş transkript bölgesi bulunur. *IDO-2* geni, NH₂ terminal kısmında fazladan 13 amino asidi kodlayan, daha sınırlı bir doku ekspresyon modeline sahip alternatif bir transkript özelliğine de sahip olabilir. Bu alternatif transkripti üreten bölge primatlarda bulunur, ancak kemirgenlerde veya omurgalı alt gruplarında bulunmaz (Metz et al., 2007).

2.5.1 *IDO 2*'nin Fonksiyonu

Memeli hücrelerinde eksprese edilen *IDO-2*'nin de *IDO-1* gibi triptofan katabolize etme aktivitesi vardır. Triptofanın *IDO-1* ve *IDO-2* aktivitesiyle tükenmesi, translasyon başlatma faktörü eIF-2'nin fosforilasyonu ve karaciğerde bulunan zenginleştirilmiş inhibitör proteini (LIP) translasyonu gibi sinyal yollarını da tetikler. Artan LIP translasyonu, *IDO-1* eksprese eden hücrelerde, *IDO-2* eksprese eden

hücrelere oranla sinyalleşmede farklılıklar olduğunu göstermektedir. Fare üzerinde yapılan çalışmalarda, *IDO-1* ve *IDO-2* fonksiyonu karşılaştırıldığında eksprese edilen fare *IDO-2* enziminin aynı substrat kullanıldığında *IDO-1*'e göre çok daha düşük verimlilikle l-triptofanı katabolize edebilme özelliği olduğu görülmüştür (Ball et al., 2007; Metz et al., 2007; Takikawa et al., 1988).

Dendritik hücreler (DH'ler), adaptif immün yanıtların ve toleransın başlatılmasında rol oynayan profesyonel ASH'lerdir. Tolerojenik mekanizmalar arasında, *IDO-1* enziminin ekspresyonu, Treg hücreleri oluşturmak için etkin görev alır. İnsanlarda, farklı DH alt kümeleri *IDO-1*'i ifade eder ancak enzim *IDO-2* hakkında bilinenler daha kısıtlıdır. Bir çalışma, insan dolaşımındaki DH'lerde *IDO-1* ve *IDO-2* arasında farklı bir ifade ve düzenleme modeli olduğunu göstermektedir. Protein düzeyinde, *IDO-1* sadece miyeloid DH'ler (mDH) tarafından sirküle bir şekilde ifade edilip PGE₂ tarafından modüle edilir. *IDO-2* ise mDH ve plazmasitoid DH ile ifade edilirken PGE tarafından modüle edilmez. Sağlıklı kişilerde, *IDO-1* ifadesi PGE₂ varlığını gerektirir ayrıca sürekli transkripsiyon ve translasyona ihtiyaç duyulur. *IDO-2* ekspresyonu ise SOCS3'ten bağımsız olarak gerçekleşebilir. Sağlıklı olmayan kişilerde ise örneğin enflamatuvar artritten muzdarip hastalarda, dolaşımdaki DH'ler hem *IDO-1* hem de *IDO-2* ifade eder. Fonksiyonel düzeyde, hem mDH'ler hem de plazmasitoid DH'ler, *IDO-1* / *IDO-2*'ye bağlı mekanizma aracılığıyla Treg oluşumuna katkı sağlarlar. İnsanlarda *IDO-1*, proinflamatuvar mediyatörler tarafından indüklenen ek bir tolerans mekanizmasına katılır, *IDO-2* ise kararlı durum koşullarında stabil bir şekilde eksprese edilir ve DH'lerin homeostatik tolerojenik kapasitesine katkıda bulunur (Trabanelli et al., 2014).

Normalde çok sınırlı bir ifade aralığına sahip olan *IDO-2* pankreas, mide, kolon ve böbrek tümörleri dahil olmak üzere birçok kanserde ifade edilir. Fakat tüm kanserler *IDO-2* ifade etmez ve bazı kanserler (örneğin rahim ağzı kanseri) aslında normal dokuya kıyasla aşağı regüle edilmiş *IDO-2* ekspresyonu gösterir (Hascitha et al., 2016; Löb et al., 2009).

Kemik iliğinden türetilmiş DH'lerde, *IDO-2* düzeyi ayrıca aril hidrokarbon reseptörü (AhR) uyarımı ile yukarı çekilebilmektedir (Vogel et al., 2013).

IDO-2 enziminin diğer biyolojik fonksiyonları henüz net olarak tanımlanmamış olsa da, öncelikle böbreklerde olmak üzere uterus, epididimis, testis ve karaciğerde ifade edildiğinin bilinmesi ve buralardaki hücre hattı ekspresyon modellerinde yapılan çalışmalar; böbrek fonksiyonu, doğurganlık ve immün modülasyonda rol aldığını kanıtlamaktadır. Ayrıca, 1-metil-d-triptofan *IDO-2*'nin inhibisyonu için seçici özellikteyken, stereoizomeri olan 1-metil-l-triptofanın ise *IDO-1* için daha etkin olduğu bulunmuştur. 1-metil-d-triptofan tarafından *IDO-2*'nin seçici inhibisyonu, enzim için önemli bir biyolojik fonksiyona işaret etmektedir. Kanser hastalarında, lenf düğümleri içindeki dendritik hücrelerde *IDO-2* ekspresyonu, T hücre yanıtlarının baskılanması ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. *IDO* inhibisyonu, diğer antikanser ajanlarla kombinasyon halinde anti-tümör bağışıklığını artırır. *IDO-2*'nin keşfi, dendritik hücrelerde olası ekspresyonu ve 1-metil-d-triptofan tarafından inhibisyonu, *IDO-2* enziminin tümörler tarafından immün evazyonda yer aldığını gösterir (Metz et al., 2007; Munn, & Mellor, 2004).

IFN- γ , *IDO-1*'in aksine, *IDO-2* üretimini indüklememektedir (Ball et al., 2009).

2.6 Polimorfizm, Mutasyon ve SNP:

İnsan genomu, vücudun her çekirdekli hücresinde bulunan 3 milyardan fazla baz çiftinden oluşur. İyi korunmuş olan genom, herhangi iki insan arasında en az %99,5 özdeşdir. Az gibi görülen özdeş olmayan kısımlardaki küçük farklılıklar ise büyük farklar yaratabilir (Venter et al., 2001).

Nükleotid sekansındaki herhangi bir nadir değişiklik, her zaman olmamakla birlikte, bir hastalığa sebebiyet veriyorsa "mutasyon" olarak adlandırılır. Nükleotid dizisindeki bu değişiklik, fenotipik değişikliklere neden olabilir veya olmayabilir. Mutasyonlar, ebeveynlerden miras alınabilir (germ hattı mutasyonları) veya bir bireyin yaşamı boyunca edinilebilir (somatik mutasyonlar), somatik mutasyonlar daha çok kanser

tiplerinde etkilidir. Gametlerde germ hattı mutasyonları meydana gelir. Yavru, başlangıçta bir yumurta ve bir spermin füzyonundan elde edildiğinden, ebeveynlerin germ hattı mutasyonları da soylarının her bir çekirdekli hücresinde bulunabilir. Mutasyonlar genellikle onarılmamış DNA hasarı, replikasyon hataları veya bazı diğer genetik unsurlardan kaynaklanır. Birkaç ana DNA mutasyonu sınıfı vardır. Tek bir nükleotid eklendiğinde, silindiğinde veya ikame edildiğinde bir nokta mutasyonu meydana gelir. Nokta mutasyonlarının yanı sıra, bir kromozomun tüm yapısında değişebilir (Condit et al., 2002).

Mutasyon, DNA'daki bir değişiklik veya patojenik bir etkiye sahip bir kromozomal anormalliktir (değişiklik). Mutasyon, popülasyonun %1'inden daha azında bulunan bir değişiklik olarak tanımlanırken, popülasyonun %1'inden fazlasında bir polimorfizm tanımlanabilir (Condit et al., 2002; Vallejos-Vidal et al., 2020). Popülasyondaki yüksek insidans, polimorfizmin etkisiyle doğal olarak meydana geldiğini gösterir. Polimorfizmler, tıpkı mutasyonlar gibi, bir veya daha fazla nükleotid değişikliği olabilir. SNP, insan genomundaki her 1000 baz çiftinde ortaya çıktığı düşünülen en yaygın polimorfizm türüdür. Tek bir nükleotid polimorfizmi, genomdaki belirli bir bölgedeki tek bir nükleotid (A, T, C veya G), bir türün üyeleri arasında farklılık gösterdiğinde ortaya çıkar. Genellikle protein kodlayan genleri çevreleyen alanlarda görüldüğü gibi, mikroRNA bağlanması ve gen-protein ekspresyonunun düzenlenmesi için kritik olarak kabul edilen bölgelerde görülebilir. SNP'ler kodlama dizilerinde, intronlarda veya genler arası bölgelerde de ortaya çıkabilir. SNP'ler, hastalıklar dahil belirli özelliklere yatkınlığı incelemek için popülasyonlarda genetik imza olarak kullanılır (Aerts, Wetzels, Cohen, & Aerssens, 2002; Brookes, 1999; Lee, & Gorospe, 2011; Chanock, 2001).

SNP'ler, fenotipik olarak kodlanmayan bölgelerin SNP'leri ve kodlama bölgelerinin SNP'leri olarak sınıflandırılabilir. Kodlanmayan bölgeler daha fazla SNP içerir ve genellikle evrimsel çalışmalarda ve popülasyon genetik çalışmalarında belirteç olarak kullanılır. SNP'ler, bağışıklık tepkisi ile ilişkili genlerde yer alabilir ve bu nedenle,

enfeksiyonlara yatkınlık fenotipi üzerinde doğrudan etkilere sahip olabilirler (Aitken, Smith, Schwarz, & Morin, 2004).

2.6.1 *IDO* Gen Polimorfizmleri:

IDO-1 ve *IDO-2* genlerinin kopyalanmış bölgeleri içindeki çok sayıda SNP açıklanmıştır. Bunların hiçbirisi kesin olarak herhangi bir hastalık sebebi değildir. Fakat farklı SNP'lerin spesifik olarak hastalıklar ile ilişkili oldukları çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. *IDO*, bağışıklık yanıtında önemli roller oynadığından, *IDO* genlerindeki genetik değişikliklerin etkileri, çoğunlukla bozulmuş bağışıklık fonksiyonu ile karakterize edilen hastalıklarla ilişkili olarak incelenmektedir (Boros, Bohar, & Vecsei, 2018).

2.6.2 İnsanda *IDO-1* Gen Polimorfizmi:

IDO-1 geni, 8p11.21 kromozom bölgesinde lokalize olan 10 ekson ve 9 introndan oluşur. 9 transkript varyantına sahiptir. Kodlanan protein 403 amino asit uzunluğundadır. rs7820268 SNP, dördüncü intronda lokalize edilir (Török et al., 2020).

IDO-1 geninin üç SNP'sini araştıran bir çalışmada; araştırılan polimorfizmlerin (rs3824259, rs10089084 ve rs35099072) hiçbirinin herhangi bir hastalıkla ilişkili ilişkisi saptanmamıştır. *IDO-1* geninin dört SNP'sini (rs9657182, rs7820268, rs3739319 ve rs6991530) araştıran başka bir çalışmada SNP'lerden birinin, IFN- α ile tedavi edilen majör depresif bozukluğu (MDD) olan Kafkasyalı hastaların depresif semptomlarının gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu SNP (rs9657182), genin promoter bölgesindeki bir C-T nükleotid değişikliğidir. Nükleotid değişikliğinin herhangi bir transkripsiyon bağlanma bölgesini değiştirdiği kanıtlanmamıştır. Fakat teorik olarak, tek başına veya ilişkili bölgede olabilecek diğer polimorfizmlerin etkileri yoluyla gen fonksiyonunun değişmesine yol açabileceği belirtilmiştir. Benzeri çok sayıda çalışma da *IDO-1* SNP'lerinin hastalıklar ile ilişkili olabileceğini veya hastalıklara yatkınlık belirteci olarak belirlenebileceğini göstermektedir (Galvao-de Almeida et al., 2012; Smith et al., 2012).

2.6.3 İnsanda IDO-2 Gen Polimorfizmi:

İnsanda IDO-2, fare IDO-2 enzimine kıyasla belirgin biçimde daha düşük aktivite gösterir. Bu durum; IDO-2, Trp katabolizması ve hastalık arasındaki ilişkinin veya bu ilişkinin eksikliğinin anlaşılması açısından önemlidir. Bazı çalışmalar, insan IDO-2'sinin farklı ayrılma izoformları biçiminde eksprese edilebildiğini göstermektedir. İnsan IDO-2'sinde; çoklu stop kodonları, farklı biçimde kesilmiş izoformların oluşumuna neden olmaktadır. İnsan popülasyonlarında, IDO-2'yi inaktive eden iki ortak polimorfizm görülmektedir: R248W, katalitik bir rezidüde bir mutasyona yol açar ve in vitro çalışmalarda, katalitik aktivitede % 90'dan daha fazla bir azalmaya neden olmaktadır. İkincisi ise bir stop kodonu oluşturarak kesilmiş ve katalitik olarak inaktif bir protein ürününün oluşumuna neden olur. Her iki polimorfizm de insan popülasyonlarında yaygındır ve buna bağlı olarak popülasyonun en az % 25'inin, işlevsel olarak inaktif bir IDO-2'ye sahip olduğu tahmin edilmektedir. HapMap ve diğer veri tabanlarında, çeşitli varyantlar tanımlanmıştır. Çeşitli izoformların ve polimorfizmlerin bağışıklık üzerinde; enfeksiyon, kanser ve otoimmün bozukluklar bağlamındaki etkileri net olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte; bazı genetik çalışmaların bulguları inaktive edici IDO-2 polimorfizmlerinin Afro-Amerikan popülasyonda daha seyrek olabileceğini göstermektedir. Bu durum, bu etnik grupta orantısız SLE başlangıcı oranları ve hastalık şiddeti gibi farklılıklar ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, Y359STOP mutasyonu, Crohn hastalığı açısından düşük risk ile ilişkilendirilmiştir (Alarcon et al., 1999; Lee et al., 2014; Metz et al., 2007; Qian et al., 2012; Witkiewicz et al., 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamız, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 29 Nisan 2020 tarihli, 2020-7/24 nolu karar sonucu ve Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Bilimsel Araştırma Platformundan alınmış izin sonrasında gerçekleştirilmiştir. Hasta grubu ve sağlıklı onamları alınarak rutin tanı ve takip testleri için kullanılan kanlardan geriye kalan kanlar materyal olarak kullanılmıştır. Bunun dışında bir kan alınmamıştır.

3.1 Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması

Çalışmamızda Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne COVID-19 şüphesiyle başvuran ve/veya takip edilen COVID-19 tanısı konmuş 18 yaş ve üstü hastaların rutin kan alımı numunelerinden artan serum ve plazmalar kullanılmıştır.

Hasta grubu 150, sağlıklı kontrol grubu 52 kişiden oluşturulmuştur. Sağlıklı kontrol grubu ise gönüllülük esasıyla COVID-19 negatif bireyler olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Gruplarda kadın ve erkek dağılımı, yaş aralığı dengesi sağlanmıştır.

Çalışmada dışlama kriteri olarak belirlemiş olduğumuz: Klinik takipleri sonrasında test sonuçları negatif gelen ve/veya farklı bir enfeksiyon nedeniyle COVID-19 benzeri semptomlar geliştirmiş olduğu belirlenen hastalara ait örnekler, çalışmadan çıkarılmıştır.

Çalışmada toplanan kan ve serum örneklerindeki proteinlerin degradasyonunu önlemek amacı ile numuneler ayırma işlemi öncesi +4° C'de saklanmıştır. Hem sarı (Kuru,Jelli) hem de mor (EDTA'lı) kapaklı tüpler 2500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra, süpernatantlar eppendorf tüplerine bölünmüş ve örnekler çalışılana kadar -20 ° C'da saklanmıştır.

Kan toplanmasında 1,5-2 ml'lik polipropilenden yapılmış, santrifüj esnasında kapakları açılmayan dayanıklı eppendorf tüpleri kullanılmıştır.

3.2 DNA Ekstraksiyonu

Polimorfizm çalışması için belirlenmiş olan 40 hasta ve 30 kişilik sağlıklı kanlardan DNA izolasyonu yapmak için ticari DNA izolasyon miniprep kiti (Zymo Research, USA) kullanılmıştır. Kitin protokolü dahilinde kısaca aşağıdaki adımlar ile DNA izolasyonları gerçekleştirildi;

100 µl kan üzerine (4:1 oranı) 400 µl genomic lysis buffer eklenmiştir. 4-6 saniye vortekslenen kan buffer karışımları oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildikten sonra collection tüpler içine, kolona aktarılmıştır. Bir dakika boyunca 10000 g'de santrifüj edilen collection tüpler atılmıştır. Kolonların yeni collection tüplerine aktarma işlemi yapılarak, 200 µl DNA-Pre wash buffer eklenmiştir. Bir dakika boyunca 10000 g'de santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Spin kolonuna 500 µl g-DNA wash buffer eklenerek bir dakika 10000 g'de santrifüj yapılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Spin kolonları temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Spin kolonlarına 50 µl DNA elution buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2-5 dakika inkübe edilen tüpler DNA'yı elüte etmek için 30 saniye boyunca en yüksek hızda santrifüjlenmiş elüe edilen DNA'lar Bölüm 3.3'te anlatıldığı şekilde saflıkları ölçülerek, çalışma için kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

3.3 DNA Saflık ve Konsantrasyon Değerlerinin Ölçülmesi

Nükleik Asit (DNA, RNA) örnekleri 260 nm, Proteinler 280 nm dalga boylarında maksimum absorbansa sahiptir. Bu iki dalga boyunda elde edilen absorbansların oranı saflık derece hesaplanmasında kullanılır. Nükleik asitlerde saflık değerini 260/230 oranı verir. 260/230 nm dalga boyları oranında elde edilen absorbans değerleri düşükse ekstraksiyon prosedüründe bir hata veya kontaminasyon ihtimali yüksektir. Beklenen saflık değeri DNA ve RNA ölçümleri için ~2,0 ve ~1,8 kabul edilir. DNA saflık ve konsantrasyon ölçümleri için nanodrop spektrofotometre (Maestro Gen) cihazı kullanılmıştır. Blank işlemi sonrası 1 µl DNA için yapılan taramalarla 260/280 , 260/230 dalga boyu oranları ve konsantrasyon ölçümleri yapılan örnekler çalışma yapılana kadar -80°C'da tutulmuştur.

3.4 Genotipleme:

SNP inceleme genotip analizimiz yüksek çözünürlüklü erime (Melting Curve Analizi) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Yöntem basamaklarımız aşağıda özetlenmiştir.

3.4.1 Yüksek çözünürlüklü erime analizi (Melting Curve) Genel bilgi:

Yüksek çözünürlüklü erime analizi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR: PCR) sonrasında genetik varyasyonların belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Temel prensibi nükleik asitlerin erime davranışına dayanır. DNA'nın çift zincirli yapısının denatürasyonu, erime sıcaklığının artışıyla oluşan floresan ışımlarının saptanmasıyla belirlenir. Bu sistemde nükleotidlerin oluşan erime grafiklerinde kolaylıkla tespit yapılır.

Yüksek çözünürlüklü erime analizi, örneklerin sekansına ve nükleotid içeriğine göre ayırım yapılmasına olanak sağlar. Popülasyonda yaygın görülen tek nükleotit değişikliklerinin (SNP) tespiti, hastalıklarla ilişkili gen mutasyon taramaları ve DNA metilasyon analizleri bu yöntem ile hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanabilmektedir.

Melting curve analizi ile alellerin saptanması LightCycler cihazı ile uyumlu olan prob çiftlerinden faydalanarak yapılmıştır. Floresans rezonans enerji transferi (fluorescence resonance energy transfer; FRET) prob çiftleri kullanılarak LightCycler® 480 sisteminde (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) saptama işlemi gerçekleştirilmiştir. FRET prob çiftleri, amplifikasyon bölgesinin iç bölgesine göre dizayn edilmiş olan ışımaya yapabilen ve LC cihazı ile uyumlu olarak tasarlanmış problemlerdir. Alıcı probun 3' ucundaki donör floresan molekül kendisinin özgül uyarılma dalga boyunda (533 nm) uyarılır ve enerji 5' uçtaki akseptör floresan moleküle (LightCycler Red 610, 640 or 670) transfer edilir. Floresan ışımaya yapan verici prob LightCycler cihazının ışık kaynağı tarafından eksite edilir. Bu enerjinin bir kısmı bitişik bölgedeki probda bulunan LC-Red-(610-640-670)'a aktarılır. Bu durumda da yine akseptör molekül tarafından yayılan spesifik floresan sinyal LightCycler® 480 sisteminin optik ünitesi tarafından saptanır. Saptanan floresan LC

cihazı aracılığıyla ölçülür. Melting basamağında sıcaklık değişimi kademeli olarak artırılarak gerçekleşir. Nükleotidlerin denatürasyon sıcaklıkları farkına göre eş zamanlı monitörde oluşan sıcaklık eğri grafiğinden nükleotid tespitleri yapılır.

3.4.2 Reaktiflerin Optimizasyonu

İnsan *IDO-1* ve *IDO-2* gen polimorfizmlerinin (sırasıyla, rs7820268 ve rs4503083) PCR ve melting-curve analizi farklı olarak gerçekleştirildiği için çalışma öncesi reaktifler rs7820268 ve rs4503083 için ayrı ayrı optimize edilmiş ve hazırlanmıştır.

- PCR reaksiyon tüpü 5 µL olup;
- 25 ng genomic DNA,
- 1 x Light Cycler 480 Genotyping Master (Roche Diagnostics),
- 2.5 pmol her bir primerden,
- 0.75 pmol FRET probu içerecek şekilde oluşturulmuştur.

Tablo 3.1: Realtime PCR için tasarlanmış primerler

Forward primer 5'-3'	
<i>IDO-1</i> rs7820268	5' TGTAATGCCTACTGAAGAAAC 3'
<i>IDO-2</i> rs4503083	5' TCTTGTGCTCCCTCCAAAACA 3'
Reverse primer 5'-3'	
<i>IDO-1</i> rs7820268	5' CTAAATTATTTTGGCTGAATTCAA 3'
<i>IDO-2</i> rs4503083	5' TGGTTTGGCTTCCCATGCTT 3'

Primerler, *IDO* geninde *IDO-1* için GenBank ID: NG_028155, *IDO-2* için GenBank ID: NG_028155 (kromozom 8,39777452-39777758; BLAST NCBI Genom Tarayıcısı) kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

3.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu aşaması

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, bir LightCycler® 480 hızlı termal döngüleyici (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ile gerçekleştirildi. PCR basamakları için

95°C’de 10 dakika başlangıç, denatürasyonu adımı ve
45 döngü 95°C’de 10 sn,
60°C’de 10 sn,
72°C’de 15 sn, uzama/uzatma adımları uygulandı.

Melting curve analizi 95°C’da 5 dakika başlangıç denatürasyonu sonrası sıcaklığı hızla 40°C’ye düşürerek 2 dakika bekledikten sonra yavaş yavaş sıcaklığı tekrar 95°C’ye kadar yükseltmek ve devamlı olarak flöresan yoğunluğunu ölçmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Bir nevi PCR sonrası eritme işlemi yapılmıştır. Kontrol amaçlı olarak gerçek zamanlı PCR ile elde edilen SNP eğrileri için uygulanan adımlar iki kez yapılmış ve iki test sonucu uygunluk gösterdiği için değerlendirmeye alınmıştır. Bu adımların optimizasyonu için LightCycler kullanım kılavuzu referans alınmıştır.

PCR işlemiyle eş zamanlı olarak elde edilmiş olan melting curve grafiklerinin yorumlanması için sıcaklık ve grafikteki pik noktaları değerlendirilerek nükleotidler saptanmıştır. Ve bu saptamalar sonrası hasta ile sağlıklı gruplar arasında analiz işlemlerine geçilmiştir.

3.4.3.1 Hardy-Weinberg dengesi

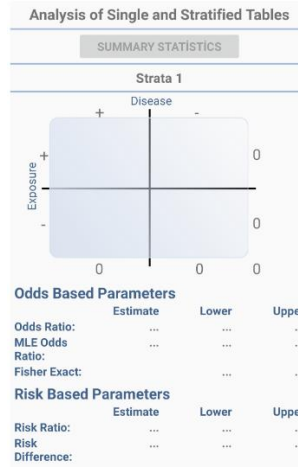
Dengenin geçerli olma şartları;

- Bir popülasyondaki allel frekansları nesilden nesile değişmeyecektir.
- Bir lokusta iki alleli olan bir popülasyondaki allel frekansları p ve q ise , beklenen genotip frekansları p^2 , $2pq$ ve q^2 ’dir . Bir popülasyon Hardy-Weinberg dengesine ulaştığında, bu frekans dağılımı nesilden nesile değişmeyecektir.
- Bir lokusta sadece iki allel varsa , matematiksel zorunluluk gereği $p + q$ bire eşittir. Hardy-Weinberg genotip frekansları, $p^2 + 2pq + q^2$, $(p + q)^2$ ’nin iki terimli genişlemesini temsil eder.
- İkiden fazla alleli olan lokuslarda da teorem uygulanabilir, bu durumda beklenen genotip frekansları, tümü için multinomial genişleme tarafından verilir. Popülasyonda ayrışan k allelleri: $(p_1 + p_2 + p_3 + .. + p_k)^2$ şeklinde düşünülür.
- Hardy-Weinberg Teoremi sonuçları, popülasyon aşağıdaki varsayımlara uyduğunda geçerlidir.

Hesaplamaların geçerli olduğu durumlar;

1. Doğal seçim olmadığı durumlar. Yani genotipler arasında hayatta kalma olasılıkları bakımından farklılık görülmemelidir.
2. Mutasyon ve göç kaynaklı popülasyona yeni aleller girmemelidir.
3. Popülasyondaki bireyler, söz konusu lokusa göre rastgele çiftleşirler. Rastgele olmayan çiftleşme, diğer varsayımlar geçerliyse, alel frekanslarını bir nesilden diğerine değiştirmese de, beklenen genotip frekanslarında sapmalara neden olabilir.

3.4.3.2 Epi-Info programı ile gerçekleştirilen hesaplamalar



Şekil 3.1 Epi-Info™ yazılımı hesaplama arayüzü

Epi Info™, salgın araştırmaları için, küçük ila orta ölçekli hastalık izleme sistemleri geliştirmek için, ayrıca daha büyük sistemlerin analiz, görselleştirme, raporlama işlemlerini gerçekleştirebilmek için epidemiyoloji biliminde ve halk sağlığı analitik analizlerinde kullanılan bir programdır.

SNP çalışma analizi yapılan arayüz Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Epi-Info programı uzun istatistiksel hesaplamaların basitçe yapılmasını sağlar. Bu çalışmada da her alel için tek tek yapılan analizler ile program, sağlıklı popülasyon ve hasta popülasyonunu karşılaştırarak; OR, güven aralığı ve istatistiksel anlamlılık sonuçlarını birlikte analiz etme imkanı sağlamıştır. Programa sağlıklı ve hasta popülasyonunda incelenecek olan alelin görülme sıklıkları ayrı ayrı girilmiş ve sonuçlar tespit

edilmiştir. Görülme sıklıkları ve alel tespitleri melting-curve analiz sonuçları yorumlanarak hesaplanmıştır.

3.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle serum düzeyinde *IDO-1* ve sitokin konsantrasyonlarının saptanması

Serum düzeyinde incelemek istenen *IDO-1* ve sitokinlerin konsantrasyonları ELISA yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem antijen-antikor ilişkisini veya antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir.

3.5.1 Serum Düzeyinde ELISA yöntemiyle *IDO-1* konsantrasyon tespiti

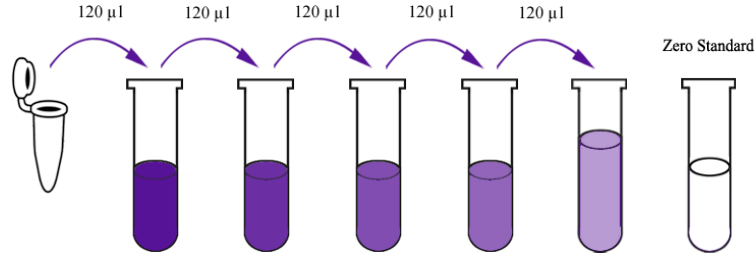
Bu işlem için ticari olarak almış olduğumuz (Bioassay Technology Laboratory) kit protokolü uygulanmıştır.

IDO-1 Standart 48 ng/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 µl standardı (96 ng/ml) 120µl standart seyreltici ile sulandırılmıştır. Seyreltme yapmadan önce standart hafifçe karıştırılmış ve 15 dakika inkübe edilmiştir. Standart stok solüsyonunu (48 ng/ml) 1: 2 standart seyreltici ile 24 ng/ml, 12 ng/ml, 6 ng/ml ve 3 ng/ml solüsyonlar üretmek için seri olarak seyrelterek çift standart noktaları hazırlanmıştır. Standart seyreltici, sıfır standart (0 ng / ml) olarak işlev görür.

Standart solüsyonların seyreltilmesi aşağıdaki gibi yapılmıştır:

Tablo 3.2: *IDO-1* ELISA için standartların hazırlanması

48 ng/ml	Standard No.5	120 µl Original Standard + 120 µl Standard Diluent			
24 ng/ml	Standard No.4	120 µl Standard No.5 + 120 µl Standard Diluent			
12 ng/ml	Standard No.3	120 µl Standard No.4 + 120 µl Standard Diluent			
6 ng/ml	Standard No.2	120 µl Standard No.3 + 120 µl Standard Diluent			
3 ng/ml	Standard No.1	120 µl Standard No.2 + 120 µl Standard Diluent			
Standard Konsantrasyonu	Standard No.5	Standard No.4	Standard No.3	Standard No.2	Standard No.1
96 ng/ml	48 ng/ml	24 ng/ml	12 ng/ml	6 ng/ml	3 ng/ml



Şekil 3.2: Standartların hazırlanması

Standart hazırlama işlemi tamamlandıktan sonra aşağıdaki adımlar uygulanmıştır.

1. Tüm reaktifleri, standart solüsyonları ve örnekleri talimatlara göre hazırlanmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. Standart kuyucuklarına dilüe edilmiş standartlar 50 µl olarak eklenmiştir.
3. Numune kuyucuklarına 40 µl numune ve yine numune kuyucuklarına 10 µl anti-*IDO* antikor eklenmiş, ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir. Plate iyice karıştırılmıştır. Plaka yapıştırıcı kağıt ile yapıştırılarak örtülmüştür. 37° C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
4. Kağıt çıkartılarak plate 5 kez yıkama tamponuyla yıkanmak üzere; kuyulara her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında en az 0,35 ml yıkama tamponu uygulanmıştır. Kurutma kağıdı üzerinde platin yıkama solüsyonundan arındığından emin olunmuştur.
5. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklenerek ardından her kuyucuğa 50 µl substrate solution B eklenmiştir. Plate yeni bir yapışkan kağıt ile kapalı olarak 37° C'de karanlıkta 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. Her kuyuya 50 µl stop solüsyonu eklenmiş, mavi rengin sarıya dönüşümü nitel olarak gözlemlenmiştir.
7. Stop solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak optik yoğunluklar (OD değerleri) okutulmuştur.
8. Hesaplanan standart OD değerlerinin grafiği çıkartılmış ve logaritmik eğim denklemleri aracılığıyla örneklerin OD değerlerinden konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.5.2 Serum Düzeyinde ELISA yöntemiyle IL-6, IL-17, IL-4, IFN- γ sitokinlerinin konsantrasyon tespiti

Bu işlem için ticari olarak almış olduğumuz (Biolegend) kit protokolü uygulanmıştır.

IDO-1 için uygulanan protokole benzer şekilde standart hazırlanması ve sonrasında bir takım kitin protokolüne bağlı adımlar uygulanmıştır. Bu işlemler aşağıda özetlenmiştir.

1. 20 x yıkama tamponu deiyonize su ile 1x oranında seyreltilmiştir.
2. 20 ng / mL standart stok solüsyonu yapmak için şişe etiketinde belirtilen tahlil tamponu A solüsyonu eklenerek liyofilize standart çözeltisi hazırlanmıştır. Sulandırılmış standart stok solüsyonu oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletilmiş, ardından tamamen karıştırmak için kısaca vortekslenmiştir.
3. Standartların hazırlanması:
487,5 μ L Test Tamponu A içinde 12,5 μ L standart stok solüsyonunu seyreltilerek, 500 pg / mL üst standardın 500 μ L'sini hazırlanmıştır. Ayrı tüplerde 500 pg / mL üst standarda iki kat seri dilüsyon gerçekleştirilmiştir. Seyreltici olarak Tampon A kullanılmıştır. Bu nedenle, tüplerdeki insan standart konsantrasyonları son durumda sırasıyla 500 pg / mL, 250 pg / mL, 125 pg / mL, 62,5 pg / mL, 31,3 pg / mL, 15,6 pg / mL ve 7,8 pg / mL olmuştur. Test Tamponu A, sıfır standart (0 pg / mL) olarak kullanılmıştır.
4. Plate kuyu başına en az 300 μ L 1x yıkama tamponu ile 4 kez yıkanmış ve emici kağıt üzerinde plate baş aşağı sıkıca vurularak kalan tampon kurulanmıştır. Sonraki tüm yıkamalar benzer şekilde yapılmıştır.
5. Standart dilüsyon ve örnek pipetlenecek her kuyucuğa 50 μ L test tamponu A eklenmiştir.
6. İlk sıra standart olmak üzere 50 μ L standart dilüsyon veya numune eklenmiştir
7. Plate kitte bulunan bir yapışkan kağıt ile kapatılmış ve oda sıcaklığında 2 saat 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir.
8. Platen içeriği bir lavaboya atılmış, ardından 4. adımda olduğu gibi 1x yıkama tamponuyla 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

9. Her kuyuya 100 µL (bakılacak olan sitokine göre) insan saptama antikoru solüsyonu eklenmiştir, plate kapatılmış ve çalkalanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Plate dökülerek, 4. adımda olduğu gibi 4 kez 1X yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
11. Her kuyuya 100 µL avidin-HRP A solüsyonu eklenmiş, plate tekrar kapatılarak ve çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir
12. Plate'in içindekiler dökülmüş, ardından 4. adımda olduğu gibi plate 1X yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Bu son yıkama için, kuyular 1X yıkama tamponunda 30 saniye ile 1 dakika arasında bekletilmiştir.
13. Her kuyuya 100 µL substrat solüsyonu F eklenmiş ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Örnek içeren kuyucularda, konsantrasyonu ile orantılı bir yoğunlukta mavi renge dönüşüm olduğu gözlemlenmiştir.
14. Her kuyuya 100 µL durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Çözelti rengi maviden sarıya değişmiştir.
15. 450 nm'de absorbans spektrofotometre cihazı ile okutulmuştur.

3.6 Çalışılan hastaların kan değerleri

Gerekli izinler alınarak çalışılan hastaların kan değerleri istatistikleri, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde tedavi görmüş olan ve izin alınmış olan hastalar dışında bir veri içermemektedir. Ayrıca çalışmaya dahil edilmiş olan bütün hastalar 18 ve üstü yaş grubundan seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalar poliklinik, yani ayakta tedavi görmüş olan hasta grubu, klinik yani yatarak tedavi olan hasta grubu, ve yoğun bakım hasta grubu olarak ayrılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

3.7 İstatistiksel analizlerin yapılması

Gen polimorfizmlerinin istatistiksel analizi için; Epi Info Software Version 3.2.2 (CDC, Atlanta GA, USA) kullanılmıştır. Gen polimorfizminin dağılımı V2 veya Fisher's exact testi ile hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır. V2 veya Fisher's exact testleri anlamlı ise Odds ratios (OR) ve %95 güvenlik aralıkları (confidence intervals;CI) hesaplanmıştır. Verilerin beklenen ve saptanan genotip değerleri arasındaki uygunluğu ve Hardy–Weinberg equilibrium'a uygunluğu kontrol edilmiştir. Ayrıca, elde edilen anlamlı olasılık değerleri Bonferroni testi ile gözden geçirilmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ANOVA ve takiben uygun post

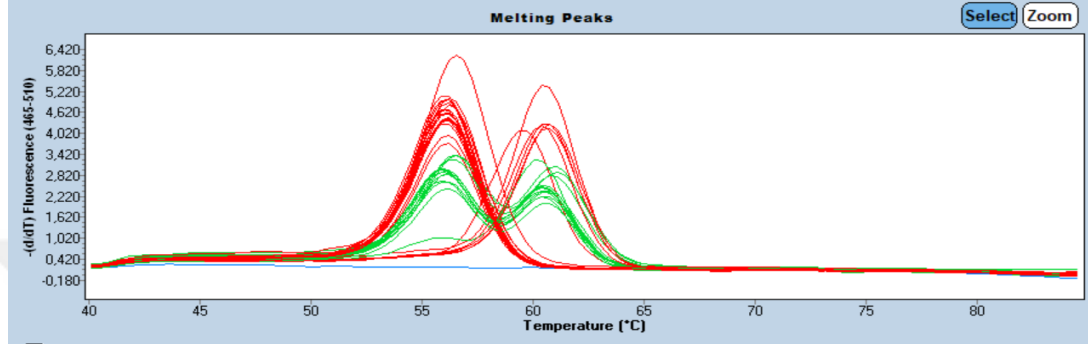
hoc testlerin kullanılması ile yapılmıştır. Diğer istatistiksel karşılaştırmalarımız kategorik değişkenler, gruplar arasında Pearson ki-kare ya da Fisher Freeman-Halton testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılmış olup tüm istatistiklerimiz için $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



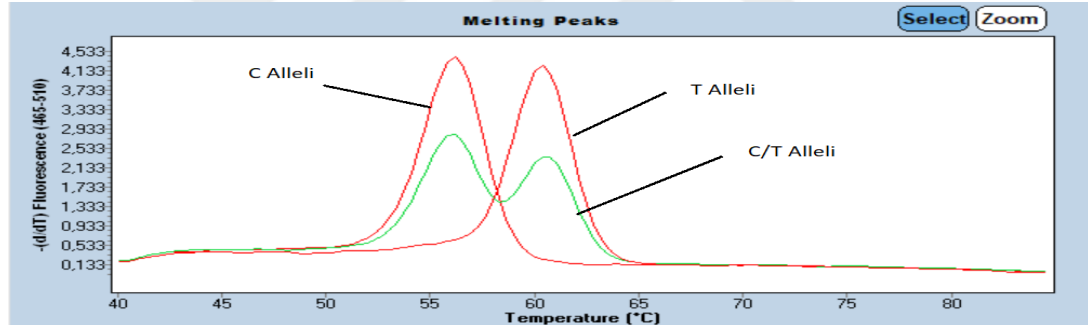
4. BULGULAR

4.1 Indolamin 2-3 Dioksijenaz I ve II genotipleme için erime eğrisi grafikleri

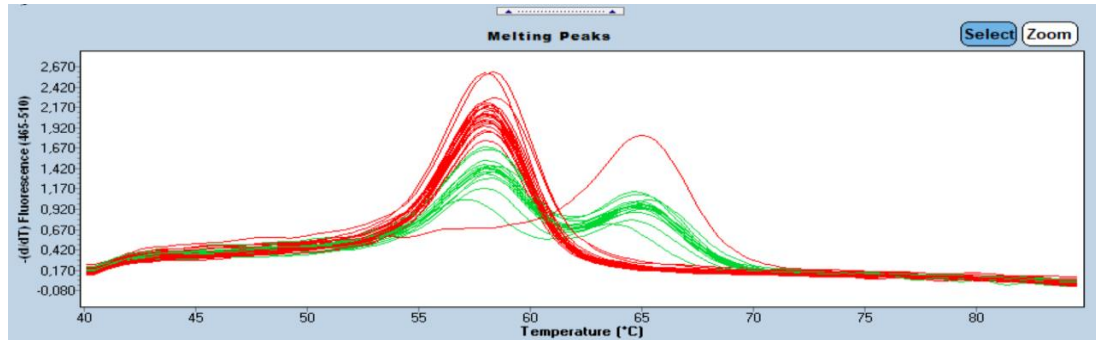
IDO-1 ve *IDO-2* için sırasıyla rs7820268, rs4503083 bölgelerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin saptanmasında kullanılan erime eğrisi (Melting curve) grafikleri şekillerde (Şekil 4.1-4.4) gösterilmiştir.



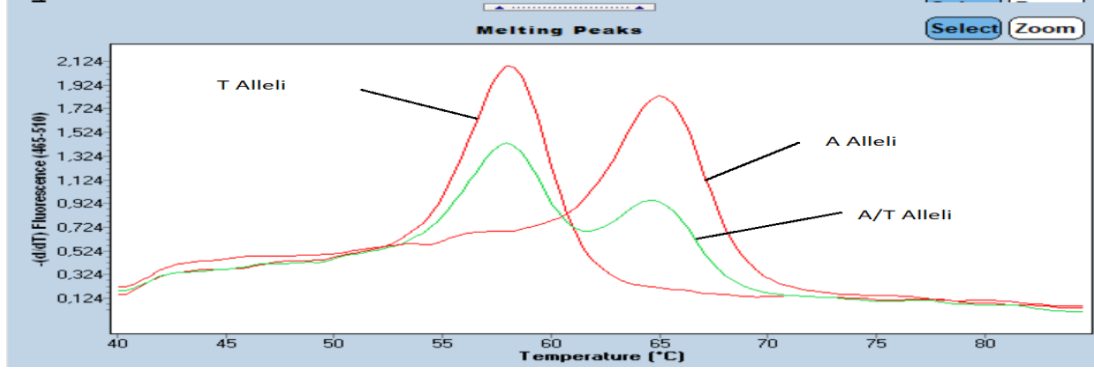
Şekil 4.1 rs7820268 referans numaralı *IDO-1* bölgesi için oluşan sıcaklık eğri grafiği



Şekil 4.2 rs7820268 referans numaralı *IDO-1* bölgesi için oluşan sıcaklık eğri grafiği yorumu



Şekil 4.3 rs4503083 referans numaralı *IDO-2* bölgesi için oluşan sıcaklık eğri grafiği



Şekil 4.4 rs4503083 referans numaralı *IDO-2* bölgesi için oluşan sıcaklık eğri grafiği yorumu

4.2 Genotipleme analiz sonuçları

Sıcaklık eğri grafiklerinin yorumlanması sonucunda tespit edilmiş olan rs7820268 ve rs4503083 referans numaralı genotiplerin dağılımı aşağıdaki tablolarda sağlıklı kontrollere ve hastalara ait numaraları ile birlikte belirtilmiştir.

Tablo 4-1 rs7820268 için hasta grubu genotip sonuçları.

1 CC	9 CC	17 CC	25 CT	33 CT
2 CC	10 CC	18 CC	26 TT	34 CT
3 CC	11 CC	19 CC	27 CT	35 CT
4 CT	12 CC	20 CC	28 TT	36 CT
5 CT	13 CT	21 CC	29 CT	37 CT
6 TT	14 CT	22 CC	30 CT	38 CT
7 CC	15 CC	23 CC	31 CT	39 CC
8 CC	16 CC	24 TT	32 CC	40 CC

Tablo 4-2 rs4503083 için hasta grubu genotip sonuçları.

1 AT	9 TT	17 AT	25 TT	33 TT
2 AT	10 AT	18 AT	26 AT	34 AT
3 AT	11 TT	19 TT	27 TT	35 TT
4 TT	12 TT	20 TT	28 TT	36 AT
5 TT	13 TT	21 AT	29 AT	37 TT
6 TT	14 AT	22 AT	30 AA	38 TT
7 AT	15 TT	23 TT	31 AT	39 TT
8 AT	16 TT	24 TT	32 TT	40 TT

Tablo 4.3: rs7820268 için sağlıklı kontrol grubu genotip sonuçları.

1 CC	12 CC	23 CT	34 TT	45 CT
2 TT	13 CT	24 CT	35 CC	46 TT
3 CT	14 CT	25 CT	36 CT	47 TT
4 TT	15 CC	26 CC	37 CT	48 CT
5 CC	16 CT	27 CT	38 TT	49 CT
6 CT	17 CC	28 CT	39 CT	50 CC
7 CT	18 TT	29 CC	40 CT	51 CT
8 CT	19 TT	30 CT	41 CT	52 CT
9 CT	20 CC	31 CC	42 CT	-
10 CT	21 CT	32 CT	43 CC	-
11 CT	22 CT	33 CC	44 CC	-

Tablo 4.4: rs4503083 için sağlıklı kontrol grubu genotip sonuçları.

1 TT	12 AT	23 AA	34 AT	45 AT
2 AT	13 TT	24 AA	35 TT	46 AT
3 TT	14 AT	25 AT	36 TT	47 AT
4 TT	15 AT	26 TT	37 TT	48 AT
5 AT	16 TT	27 AT	38 AT	49 TT
6 TT	17 AT	28 TT	39 TT	50 AT
7 AT	18 AT	29 TT	40 AT	51 TT
8 AT	19 AT	30 TT	41 TT	52 TT
9 AA	20 TT	31 AT	42 TT	-
10 TT	21 TT	32 TT	43 TT	-
11 AT	22 TT	33 AT	44 TT	-

4.3 Hardy-Weinberg dengesine uygunluk hesaplamaları:

Hardy-Weinberg dengesi için hesaplamalara geçilmeden önce, testin uygulanabilirlik koşulları değerlendirilmiştir.

rs7820268 SNP bölgesi hasta grubu için Hardy-Weinberg Dengesi:

1. Gözlenen genotip frekansları:

$$21 \text{ CC} \quad 21/40=0,525$$

$$4 \text{ TT} \quad 4/40=0,1$$

$$15 \text{ CT} \quad 15/40=0,375$$

2. Allel Frekansları:

$$C: 0,71 \quad p+q=1 \quad 0,71+0,29=1$$

$$T: 0,29$$

3. Beklenen genotipi frekansları ve sayıları:

$$CC: p^2 = (0,71)^2 = 0,5041 \text{ (frekans)} \times 40 = 20,164$$

$$CT: 2pq = 2 \cdot 0,71 \cdot 0,29 = 0,4118 \text{ (frekans)} \times 40 = 16,472$$

$$TT: q^2 = (0,29)^2 = 0,0841 \text{ (frekans)} \times 40 = 3,364$$

4. Ki-kare değeri:

Ki-kare analizi eşitliği;

$$\chi^2 = \sum \frac{(G_i - B_i)^2}{B_i}$$

Eşitlikteki,

G_i : i kategorisi için gözlenen değeri,

B_i : i kategorisi için beklenen değeri göstermektedir.

Ki-kare analiz eşitliği formülü

Ki-kare sonucu = 0,285

Ki-Kare sonucu olan 0,285'e göre hesaplanan p değeri 0,05 ten büyük olduğu için popülasyonumuzun Hardy-Weinber dengesinde olduğunu söyleyebiliriz.

rs7820268 SNP bölgesi sağlıklı kontrol grubu için Hardy-Weinberg Dengesi:

1. Gözlenen genotip frekansları:

14 CC 14/52=0,26

8 TT 8/52=0,153

30 CT 30/52=0,057

2. Allel Frekansları:

C: 0,55 p+q=1 0,55+0,45=1

T: 0,45

3. Beklenen genotipi frekansları ve sayıları:

CC: $p^2 = (0,55)^2 = 0,302$ (frekans) $\times 52 = 15,704$

CT: $2pq = 2 \cdot 0,55 \cdot 0,45 = 0,495$ (frekans) $\times 52 = 25,74$

TT: $q^2 = (0,45)^2 = 0,2025$ (frekans) $\times 52 = 10,53$

4. Ki-kare değeri:

Ki-kare test sonucu = 1,496

Ki-Kare sonucu olan 1,496'ya göre hesaplanan p değeri 0,05 ten büyük olduğu için popülasyonumuzun Hardy-Weinber dengesinde olduğunu söyleyebiliriz.

rs4503083 SNP bölgesi sağlıklı ve hasta kontrol grubu için Hardy-Weinberg Dengesi:

rs4503083 SNP bölgesi için incelemiş olduğumuz hasta ve sağlıklı grup popülasyonlarında A homozigot genotipleri $n < 5$ tespit edilmiştir. Hardy-Weinberg Dengesi hesaplanırken uygulanan Ki-Kare testi kurallarınca; en düşük frekans değerinin 5 olması gerekmektedir. Bu sebeple rs4503083 SNP bölgesi için Hardy-Weinberg dengesi hesaplanmamıştır.

4.4 IDO-1 ve IDO-2 gen polimorfizmleri

İncelemiş olduğumuz gen bölgeleri için; 40 kişilik hasta ve 52 kişilik sağlıklı kontrol gruplarında elde etmiş olduğumuz genotip, odds ratio (OR) ve güven aralık (GA) değerleri Tablo 4.5 ile gösterilmiştir.

TABLO 4.5: . IDO-1 ve IDO-2 gen polimorfizmlerinin COVID-19 hasta ve kontrol grubundaki genotip frekansları

Genotip	Kontrol	Hasta	χ^2 p değeri	OR / GA
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)	0,541	0,61 / 0,17-2,1
rs4503083				
AT	25 (% 48,08)	17 (%42,5)	0,674	0,79 / 0,34-1,84
TT	27 (%51,92)	23 (%57,5)	0,674	1,25 / 0,54-2,87
AA	3	1	-	-

*OR= Odds Ratio , GA=Güven aralıkları

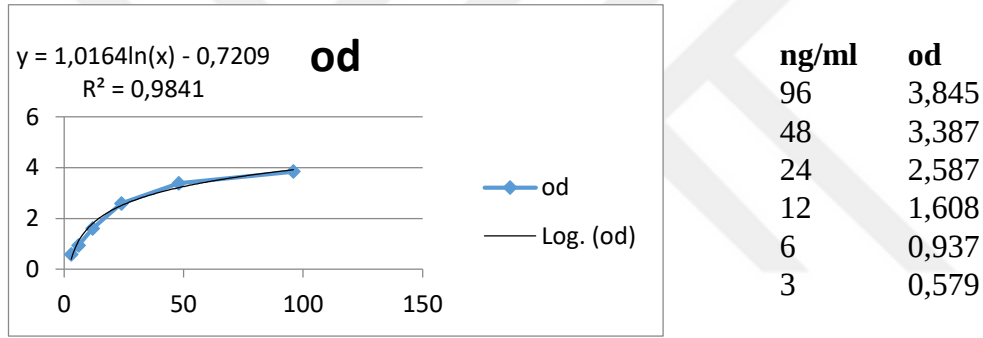
COVID-19 hastalarındaki ve kontrol grubundaki IDO-1 rs7820268, IDO-2 rs4503083, polimorfizmi genotip dağılımları Tablo 4.6’da gösterilmiştir. rs7820268 SNP’si incelendiğinde genotip dağılımı açısından C homozigot grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi. ($p=0,017$) rs7820268 ve rs4503083 SNP bölgelerinde hasta ve sağlıklı grup arasında yapılan diğer analizlerde anlamlı farklılık

bulunamadı. *IDO-2* için bakmış olduğumuz SNP bölgesinde A homozigot genotipi bulunduran kişi sayısı $n < 5$ olarak tespit edilmiştir.

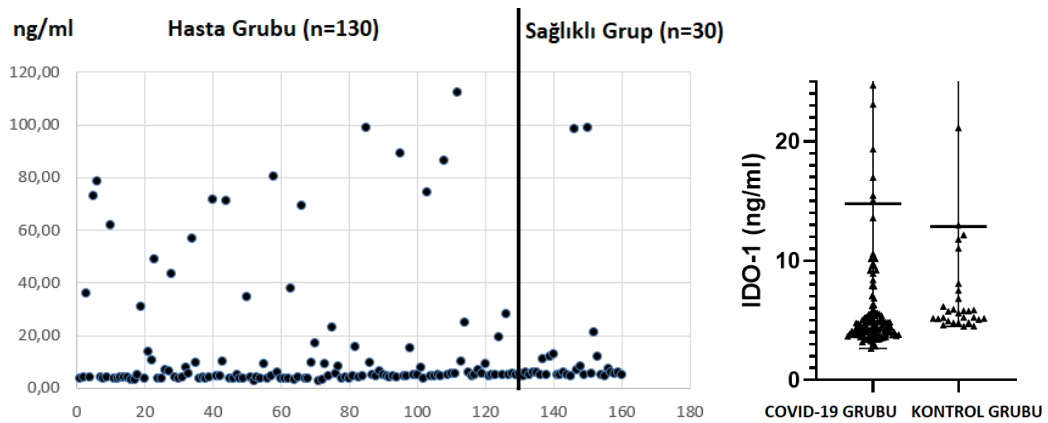
4.5 Serum düzeyinde *IDO-1* ve sitokinlerin konsantrasyon sonuçları:

4.5.1 *IDO-1* ELISA sonuçları

IDO-1 ELISA testinde standart kuyular dışında kalan 80 kuyu için; bir testte 65 hasta, 15 sağlıklı kontrol çalışılmıştır. *IDO-1* için iki kere ELISA testi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 130 hasta 30 sağlıklı kontrol çalışılmıştır. İki test için standart OD değerleri birbirine çok yakın ve beklendiği gibi bulunmuş, Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Serum düzeyinde diğer sitokin değerlerine ise sadece SNP çalışması gerçekleştirilen 40 kişi için bakılmıştır.



Şekil 4.5 Serumda yapılan *IDO-1* ELISA testlerinin eğim grafiğinin logaritmik gösterimi ve standartların OD değerleri



Şekil 4.6: Hasta ve sağlıklı grup *IDO-1* serum konsantrasyonlarının noktasal ve dot plot grafikleriyle gösterimi

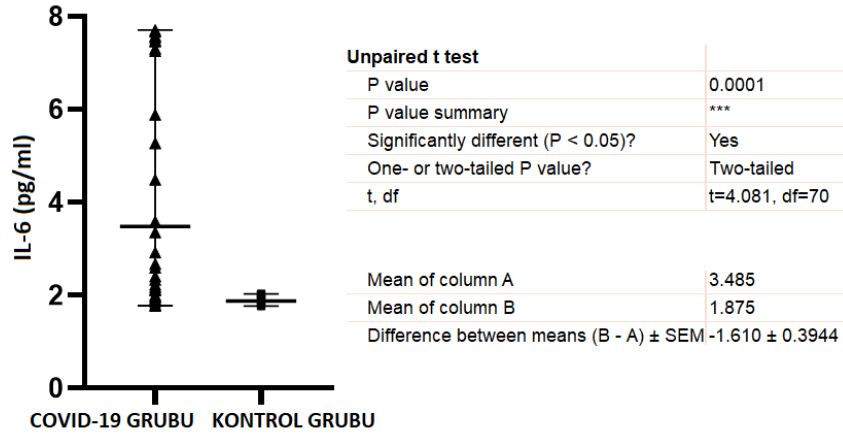
Hasta Grubu
Mean : 4,82
Median: 14,77
Standart Sapma: 23,2

Sağlıklı Kontrol Grubu
Mean :6,95
Median:12,86
Standart Sapma: 3,63

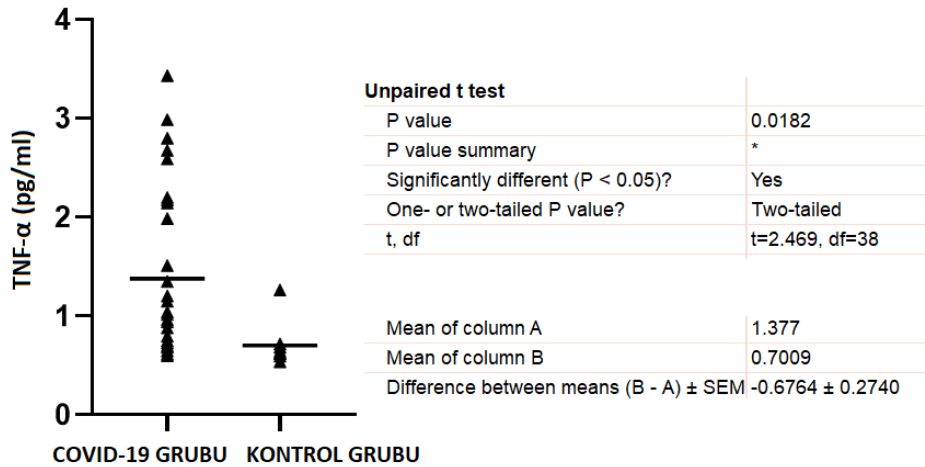
4.5.2 ELISA yöntemiyle serum düzeyinde ölçülen sitokin konsantrasyonları

IL-4 için 30 hasta 25 sağlıklı kontrol, IFN- γ için 40 hasta 40 sağlıklı kontrol, IL-10 için 23 hasta 8 sağlıklı kontrol, IL-17 için 40 hasta 32 sağlıklı kontrol, IL-6 için 40 hasta 32 sağlıklı kontrol ve TNF- α için 30 hasta 10 sağlıklı kontrol çalışılmıştır.

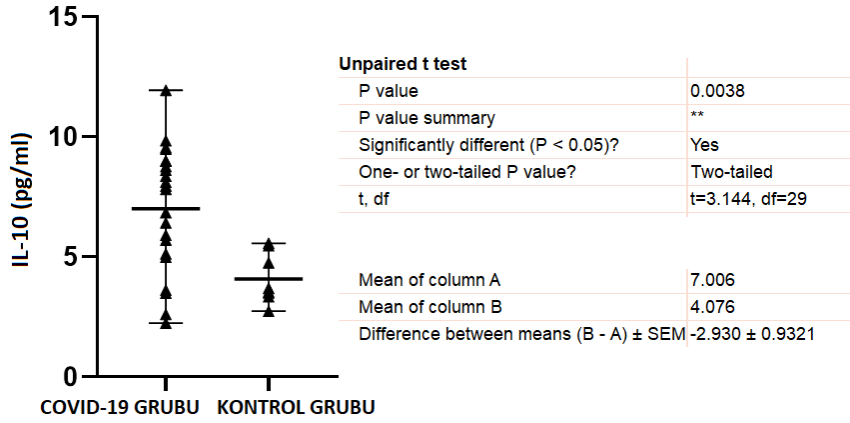
COVID-19 hasta gruplarında, sağlıklı kontrol gruplarına göre IL-6, TNF- α ve IL-10 serum konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir. Hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında yapılan IL-6, TNF- α ve IL-10 anlamlılık testi sonuçları ve saptanan konsantrasyon seviyeleri sırasıyla Şekil 4.7-4.8-4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Hasta ve kontrol gruplarında serum düzeyinde IL-6 konsantrasyonları

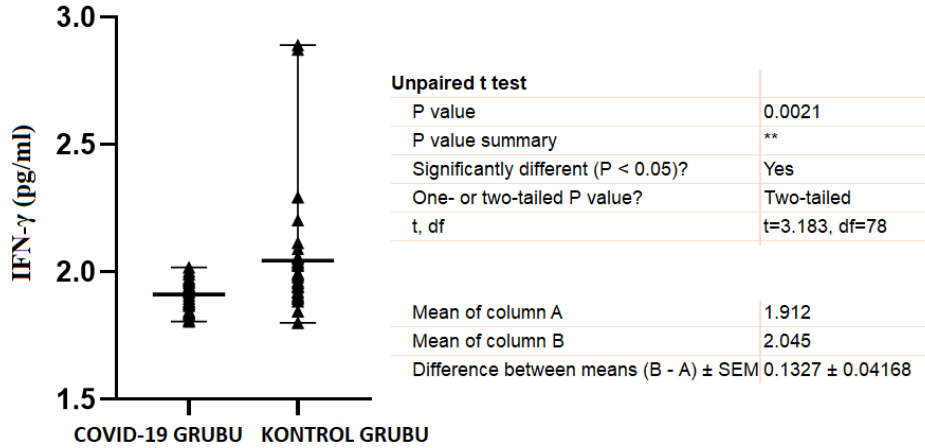


Şekil 4.8: Hasta ve kontrol gruplarında serum düzeyinde TNF- α konsantrasyonları

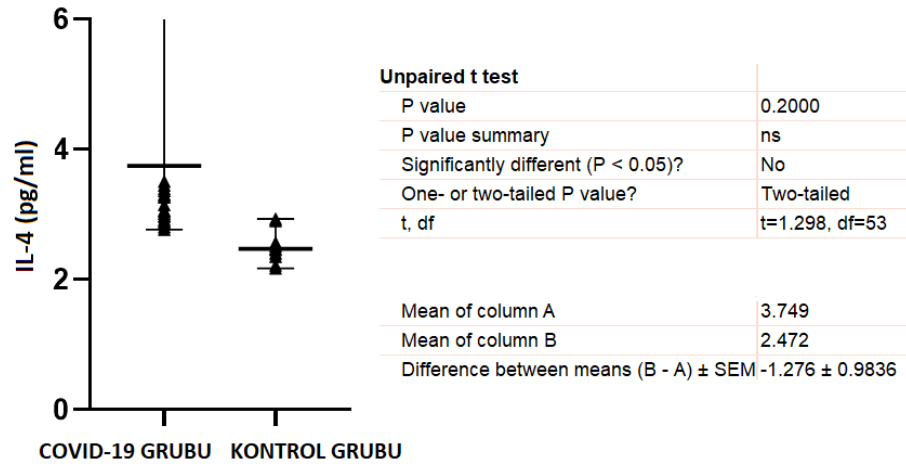


Şekil 4.9: Hasta ve kontrol gruplarında serum düzeyinde IL-10 konsantrasyonları

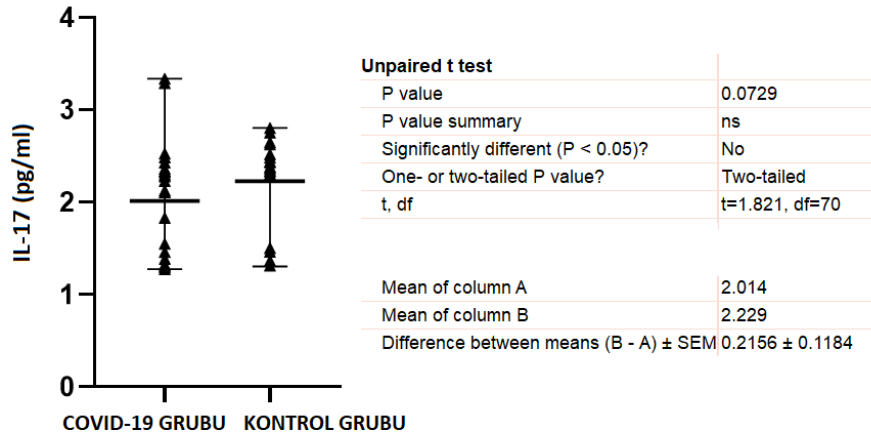
Hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha düşük IFN- γ konsantrasyonları tespit edilirken, IL-4 ve IL-17 seviyeleri açısından hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur. Fakat IL-4 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre COVID-19 hasta grubunda belirgin olarak daha yüksek gözlemlenmiştir. IFN- γ , IL-4 ve IL-17 serum düzeyi konsantrasyonları ve anlamlılık testi sonuçları sırasıyla Şekil 4.10-4.11-4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.10: Hasta ve kontrol gruplarında serum düzeyinde IFN- γ konsantrasyonları



Şekil 4.11: Hasta ve kontrol gruplarında serum düzeyinde IL-4 konsantrasyonları



Şekil 4.12: Hasta ve kontrol gruplarında serum düzeyinde IL-17 konsantrasyonları

4.6 Serum düzeyinde *IDO-1* ve sitokinlerin korelasyonlarının incelenmesi:

ELISA yöntemiyle ölçmüş olduğumuz sitokinlerden IL-4, IFN- γ , IL-10 ve IL-17 için yapmış olduğumuz korelasyon testlerinde *IDO-1* seviyeleriyle korelasyon tespit edilememiştir. IL-6 ve TNF- α ile ise negatif yönlü anlamlı korelasyon vardır.

4.6.1 *IDO-1* ve IL-6 arasında korelasyon katsayısının hesaplanması

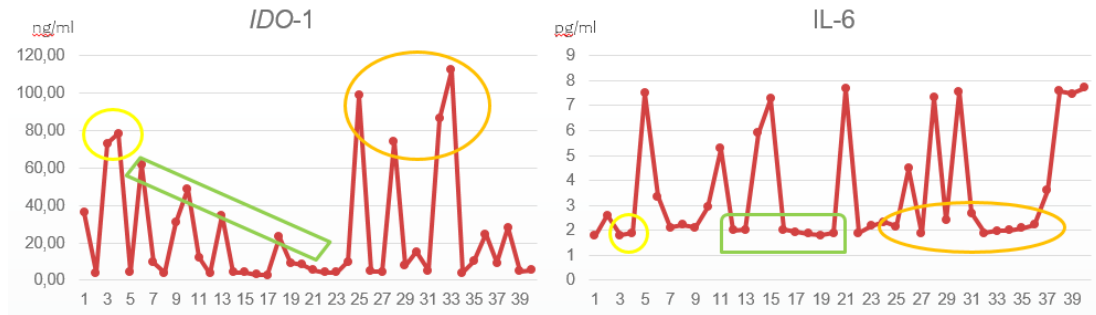
IDO-1 ve IL-6 için yapılan korelasyon testi sonucunda korelasyon katsayısı negatif yönlü olarak 0,35 olarak bulunmuştur. İki değişkenin arasında negatif korelasyon olması, değişkenler arası ters yönlü bir ilişki olduğunu gösterir. Yani hasta grubunda, IL-6 konsantrasyonu yüksek hastalarda *IDO-1* konsantrasyonlarının daha düşük

olduğu istatistiksel olarak anlamlı hesaplanmıştır. (IL-6 blokeri kullanmış olan hastalar hesaplama dışında tutulmuştur).

Tablo 4.6: *IDO-1* ve IL-6 korelasyon katsayısının hesaplanması

Correlations				
			ido - 1	il_6
Spearman's rho	ido - 1	Correlation Coefficient	1,000	-,350*
		Sig. (2-tailed)	.	,039
		N	40	35
	il_6	Correlation Coefficient	-,350*	1,000
		Sig. (2-tailed)	,039	.
		N	35	35

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



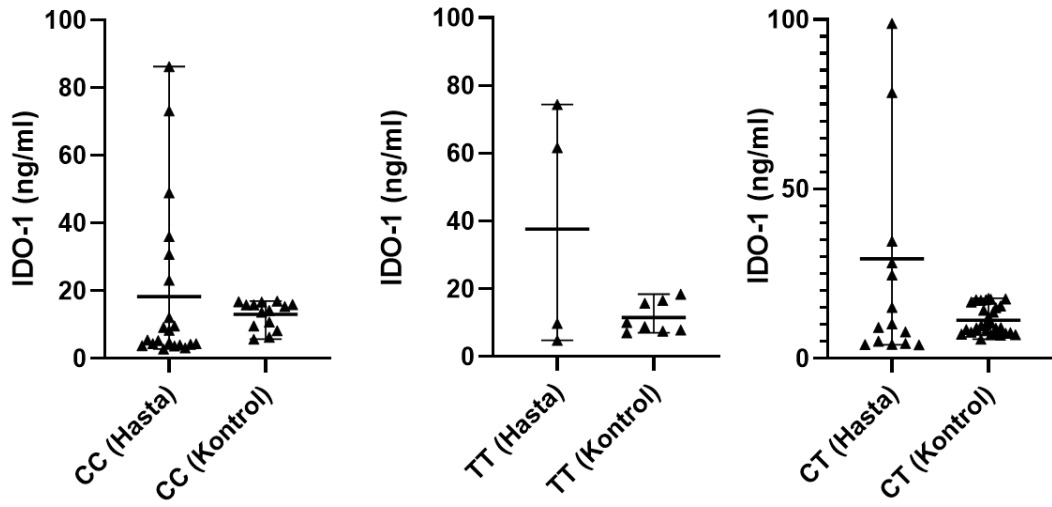
Şekil 4.13: *IDO-1* ve IL-6 arasındaki korelasyonun grafiksel gösterimi

IL-6 ile aynı şekilde yapılmış olan *IDO-1* ile TNF- α arasındaki korelasyon testi sonucunda, *IDO-1* ile TNF- α arasında korelasyon katsayısı -0,42 olarak hesaplanmıştır.

4.6.2 Genotiplere göre *IDO-1* ve sitokin konsantrasyonlarının karşılaştırılması

CC genotipi gösteren hasta grubu *IDO-1* konsantrasyon ortalaması 18,27 ng/ml iken sağlıklı kontrol grubu CC genotipi gösteren grubun *IDO-1* konsantrasyonları ortalaması 13,02 ng/ml'dir. TT genotipi gösteren 4 COVID-19 hastasının *IDO-1* konsantrasyon ortalaması 37,66 ng/ml ve TT genotipi sağlıklı grup konsantrasyon ortalaması 11,53 ng/ml'dir. CT genotipine sahip hasta ve sağlıklı grubun ortalamaları ise sırasıyla 30,62 ng/ml ve 11,28 ng/ml'dir. Sonuçlar Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

Hasta grubunda en düşük konsantrasyon CC genotipi bulunduran hastalarda görülürken, sağlıklı kontrol grubunda en düşük *IDO-1* konsantrasyonları CT genotip grubunda tespit edilmiştir. CC genotiplerinin *IDO-1* konsantrasyonları için hasta ve sağlıklı grup arasında anlamlı bir farklılık yoktur. ($p=0,4264$) TT genotiplerinin *IDO-1* konsantrasyonları için hasta ve sağlıklı grup arasında anlamlı bir farklılık yoktur. ($p=0,0570$). CT genotipi gösteren hasta ve sağlıklı gruplar arasında ise *IDO-1* konsantrasyonları için anlamlı farklılık vardır. CT genotipine sahip hasta bireylerde *IDO-1* konsantrasyonları CT genotipli sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. ($p=0,0059$)



Şekil 4.14: rs7820268 SNP bölgesi için hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki CC, TT, CT genotiplerine ait *IDO-1* konsantrasyonlarının karşılaştırılması

rs7820268 SNP bölgesinde CC genotipi ve CT, TT genotipleri bulunduran hastaların arasında yaptığımız sitokin karşılaştırmalarında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Sonuçlarımız Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: SNP rs7820268 bölgesi için, CC genotipi ile diğer genotiplerin *IDO-1* ile sitokin değerlerinin karşılaştırılması

	n	CC Genotipi	n	CT,TT Genotipleri	p-value
<i>IDO</i>	21	5,45(2,83:86,30)	19	10,16(4,02:112,31)	0,130 ^a
<i>IL-6</i>	21	2,11(1,78:7,71)	19	2,41(1,88:7,58)	0,153 ^a
<i>TNF-a</i>	18	0,99(0,60:3,43)	12	0,99(0,68:2,99)	0,391 ^a
<i>IL-17a</i>	21	1,32(1,28:1,54)	19	1,31(1,28:1,42)	0,872 ^a
<i>IL-10</i>	18	1,93(1,49:11,94)	5	2,56(2,12:2,99)	0,067 ^a
<i>IFN-a</i>	19	1,91±0,06	19	1,91±0,05	0,851 ^a
<i>IL-4</i>	21	0,74(0,69:6,61)	19	0,77(0,71:0,86)	0,347 ^a

Veriler medyan(minimum:maksimum) ve ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

^a: Mann Whitney U Testi, ^b:Bağımsız örneklem t testi

4.7 Hasta kan değerleri ve diğer istatistik sonuçları

IDO-1 değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0.003$). Alt grup analizlerinde; klinik hasta grubu'deki *IDO-1* değerleri, poliklinik hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur. ($p=0,037$) (Tablo 4.8).

Anlamlı bulunan diğer analiz sonuçlarımız (Tablo 4.9); Lenfosit değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0.008$). Yoğun bakım hasta grubu lenfosit değerleri, klinik hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur. ($p=0,049$). Yoğun bakım hasta grubu lenfosit değerleri, poliklinik hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur ($p=0,004$). Monosit değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0.001$). Alt grup analizlerinde; yoğun bakım hasta grubu monosit değerleri, Poliklinik hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur ($p=0,029$). Yoğun bakım hasta grubu monosit değerleri, klinik hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur ($p=0,016$).

NEU değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0.001$). Alt grup analizlerinde; poliklinik hasta grubu NEU değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur ($p=0,019$). Klinik hasta grubu NEU değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur ($p=0,002$). CRP değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0.001$). Alt grup analizlerinde; poliklinik hasta grubu CRP değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur ($p=0,007$). Klinik hasta grubu CRP değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur

(p=0,001). Ferritin değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0.006). Alt grup analizlerinde; poliklinik hasta grubu Ferritin değerleri, klinik hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur (p=0,011). Poliklinik hasta grubu Ferritin değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur (p=0,021). D-Dimer değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0.001). Alt grup analizlerinde; Poliklinik hasta grubu D-Dimer değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur (p<0,001). Klinik hasta grubu D-Dimer değerleri, Yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur (p<0,001). Troponin değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0.001). Alt grup analizlerinde; poliklinik hasta grubu Troponin değerleri, klinik hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur (p=0,025). Poliklinik hasta grubu Troponin değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur (p<0,001). Klinik hasta grubu Troponin değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur (p=0,042). Üre değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0.001). Alt grup analizlerinde; Poliklinik hasta grubu üre değerleri, yoğun bakım hasta grubu değerlerinden daha düşük bulunmuştur (p=0,004). Poliklinik hasta grubu'deki LDH değerleri ölçümleri yapılan hasta sayısı, gruplar arasında yapılacak karşılaştırma için yeterli olmadığı için (n<5) gruplar arası karşılaştırma yapılamamıştır. Gruplar arasında yapılan diğer karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,05).

Tablo 4.8: Hasta gruplarına göre kan ve *IDO-1* değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar								
	N	Poliklinik	n	Klinik	n	Yoğun bakım	n	p-value
IDO-1	26	5,74(3,41:98,85)	92	4,43(2,65:112,31)	12	4,75(4,04:74,38)	30	0,003
WBC (k/ul)	26	6,54(3,31:11,92)	92	5,99(0,07:44,06)	12	10,56(2,91:27,72)	30	0,003
Lenfosit(k/ul)	26	1,97(0,71:28,41)	92	1,69(0,05:3,85)	12	0,67(0,29:5,45)	30	0,008
MONOSİT (k/ul)	26	0,52(0,26:1,24)	92	0,54(0,01:1,25)	12	0,33(0,09:0,76)	30	<0,001
NEU(k/ul)	26	3,62(2,01:8,28)	92	3,55(0,01:42,68)	12	7,01(2,49:26,97)	30	<0,001
TROMBOSİT (pIT) (k/ul)	26	238,55(141,70:389,90)	92	214,70(43,40:463,30)	12	176,70(34,20:454,10)	30	0,247
CRP(mg/ml)	6	13(3,70:57)	58	22,25(2,40:211,70)	11	126,60(11,70:229,70)	26	<0,001
PCT (%)	26	0,20(0,10:0,40)	92	0,20(0,10:0,30)	12	0,15(0,10:0,30)	30	0,14
FERRİTİN(ug/L)	26	38,10(2:333)	92	133,00(0,00:4535)	12	437,00(0,00:1535)	30	0,006
D-DİMER(mg/L)	26	0,41(0,17:1,76)	87	0,38(0,17:34,21)	12	1,92(0,20:47,90)	28	<0,001

Tablo 4.8 devamı

TROPONİN (ng/L)	26	1,25(0:24,70)	75	2,40(0,20:184,60)	10	12,30(1,90:99,30)	29	<0,001
ÜRE (mg/dL)	26	22,50(10:40)	92	27,00(9,00:150)	12	38,00(23:99)	30	0,001
KREATİNİN (mg/dL)	25	0,77(0,61:1,25)	92	0,77(0,54:8,50)	12	0,79(0,57:4,31)	30	0,601
SODYUM (mmol/L)	26	138,50(130:142)	92	138,50(128,00:148)	12	138,50(126:146)	30	0,991
POTASYUM (mmol/L)	25	4,30(3,20:5,20)	92	4,20(3,26:7,80)	12	3,80(3,25:4,90)	30	0,278
AST (U/L)	25	20(12:4)	92	22(7:330)	12	39(15:245)	30	<0,001
ALT (U/L)	24	23(6:74)	92	22,50(7:358)	12	21 (7:68)	28	0,199
LDH (U/L)	3	228(186:299)	39	229(131:1023)	5	530(370:724)	17	-
KLOR (mmol/L)	25	105(101:109)	92	105(95:111)	12	104,50(86:112)	30	0,52

Serum düzeyinde *IDO-1* konsantrasyon değeri 11 ng/ml'den yüksek olan hasta grubu için kendi içerisinde yaptığımız kan değerleri karşılaştırmasında *IDO-1* ile AST ve ALT değerleri dışında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Bu incelemeye *IDO-1* seviyesi grup içinde yüksek görülen 23 hasta dahil edilmiştir. İnceleme sonuçları Tablo 4.9 da gösterilmiştir.

Tablo 4.9: *IDO-1* serum konsantrasyonları yüksek olan hastaların, *IDO-1* ile kan değerleri arasındaki korelasyon testi sonuçları

	<i>IDO-1</i>	
	r_s	p-value
WBC (k/ul)	-0,06	0,762
Lenfosit(k/ul)	0,23	0,24
MONOSİT (k/ul)	0,09	0,672
NEU(k/ul)	-0,09	0,661
TROMBOSİT (pLT) (k/ul)	0,21	0,297
CRP(mg/ml)	-0,4	0,223
PCT (%)	0,15	0,451
FERRİTİN(ug/L)	0	0,983
D-DİMER(mg/L)	-0,37	0,069
TROPONİN (mg/L)	-0,36	0,087
ÜRE (mg/dL)	-0,04	0,839
KREATİNİN (mg/dL)	-0,15	0,449
SODYUM (mmol/L)	-0,03	0,869
POTASYUM (mmol/L)	0,07	0,717
AST (U/L)	-0,433	0,024
ALT (U/L)	-0,436	0,022
LDH (U/L)	-0,37	0,236
KLOR (mmol/L)	-0,22	0,266
r_s : Spearman korelasyon katsayısı		

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

COVID-19 hastalığında, önemli bir immünmodülatör olan *IDO* enzimlerinin henüz detaylı incelenmemiş olması literatür eksiği yaratmaktadır. Tez çalışmamız bu eksiği giderme açısından önemlidir. COVID-19 hastalığında *IDO-1* ve *IDO-2* ilişkili iki SNP bölgesi polimorfizmi incelenmiştir. Ayrıca geniş bir hasta grubunda serum düzeyinde *IDO-1* konsantrasyonları tespit edilerek belirli sitokinler ile korelasyonlarına bakılmıştır. Bu çalışmalarımızın sonuçları ile SARS-CoV-2 virüsünün etki mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Tez çalışmamıza dahil edilen popülasyonda, *IDO-1* için incelenmiş olan rs7820268 referans numaralı SNP bölgesinde C homozigot genotip gösteren kişilerin COVID-19 hastalığına diğer alelleri bulunduran kişilere göre daha yatkın olduğu tespit edilmiştir (%52,5'ya karşı %26,92, p: 0.017). COVID-19'a yatkınlık tespit edilen, rs7820268 numaralı SNP bölgesinde C homozigot bulunan kişilerin, sağlıklı gruplar ve diğer hasta grupları ile yapılan sitokin ve kan değerleri karşılaştırmalarında anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Bu durum C homozigot rs7820268 SNP bölgesinin hastalığa yatkınlıkla ilişkili olduğunu fakat COVID-19 patogeneziyle ilişkisi olmadığını göstermiştir. Tek nükleotid polimorfizm çalışması az sayıda kişiyle gerçekleştirilmiş olup (n=40), daha geniş popülasyonlarda yapılacak çalışma sonuçları ile çalışma verilerinin desteklenmesi gerekmektedir. Farklı etnik bölgelerde farklı alel frekanslarının görülmesi bu durumun önemini arttırmaktadır. *IDO-2* için bakılan rs4503083 numaralı SNP bölgesinde ise genotipler bakımından sağlıklı grup ile hasta grubu arasında yapılan analizlerde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Ek olarak çalışmada, rs7820268'in SNP incelemesi için seçilme sebebi Han et al., (2020)'nin çalışmasında da görüldüğü gibi bu bölgenin *IDO-1* ekspresyonlarını düzenlemesidir. rs4503083'ün ise *IDO-2*'nin transkripsiyonu anında stop kodonu üreten bölge olmasıdır. *IDO-2* katalitik aktivite bölgesi olan rs10109853 referans numaralı bölge için SNP çalışılması da ilerleyen çalışmalarda düşünülmektedir.

COVID-19 sonrası iyileşen hastalarda, SARS-CoV-2'ye özgü güçlü bir CD8 + T hücresi aracılı bağışıklık tepkisi oluşmaktadır. Tardito et al., (2013) sistemik skleroz hastalarında yaptığı çalışmada, *IDO-1* genindeki SNP rs7820268'inde T alelik

varyantını taşıyan hastaların kontrol grubuna göre anlamlı derecede sık olduğunu ve *IDO-1*'de bu SNP'yi taşıyan hastaların bozulmuş $CD8^+$ T düzenleyici fonksiyonu olduğunu göstermişlerdir. COVID-19 için incelemiş olduğumuz rs7820268 SNP bölgesinde T homozigot genotipine sahip hasta bireyler için benzer bir ilişki olup olmadığı bu çalışma sonuçları ile ek olarak araştırılması planlanan adımlardandır. Ayrıca çalışmamızda hasta grubunda CT heterozigot genotip gösteren grubun, CT heterozigot genotipindeki sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p=0,0059$) daha yüksek seviyelerde *IDO-1* konsantrasyonu gösterdiği saptanmıştır. Fakat diğer verilerimizle karşılaştırdığımızda bir anlamlılık tespit edilemediği için COVID-19 ile ilişkilendirilememiştir.

HCV, HIV, hRSV gibi viral enfeksiyonlarda *IDO-1* konsantrasyonlarının arttığı; Lepiller et al., (2015), Huang et al., (2013), Ajamian et al., (2015) tarafından yapılan farklı çalışmalar ile gösterilmiştir. Bizim çalışmamızın ELISA testleri sonucunda COVID-19 hastaları ve sağlıklı grup arasındaki *IDO-1* konsantrasyonları karşılaştırıldığında diğer viral enfeksiyonlardan farklı olarak *IDO-1* seviyelerinin artmadığı gösterilmiştir. Diğer viral enfeksiyonlarda virüsler, T hücrelerinin aracılık ettiği bağışıklık tepkisinden kaçınmak için, *IDO-1* ekspresyonlarını indükleyerek *IDO-1*'in bağışıklık sistemini baskılayıcı etkilerinden yararlanmaya çalışmakta olabilir. Bu durum; SARS-CoV-2'nin diğer viral enfeksiyonların tam aksine *IDO-1*'i baskılıyor olması, muhtemel başka mekanizmalara işaret etmektedir; *IDO-1* aracılığıyla oluşan Kyn'in Aril Hidrokarbon Reseptörü (AhR)'ne bağlanması ile Th1, Th2 veya Th17 alt gruplarını etkileyebilecek $Foxp3^+$ Treg'lerin modülasyonu ve proliferasyonu tetiklenmekte ve T hücreleri için AhR'ye bağımlı farklılaşma yolunun aktivasyonu söz konusu olmaktadır. Aktifleşen AhR'ler ayrıca salgıladıkları IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler aracılığıyla *IDO-1* ekspresyonunu teşvik etmektedir. Çift yönlü bir etkileşim söz konusudur. Turski et al., (2020) tarafından yapılan bir çalışma SARS-CoV-2 virüsünün, inflamasyonu indüklemek için *IDO-1* veya başka bir immünmodülatöre gerek duymadan AhR'leri doğrudan aktiveleştirebildiğini göstermiştir. *IDO-1* konsantrasyonunun COVID-19'da düşük olması ve IL-6 ile TNF- α konsantrasyonları ile negatif korelasyon tespit edilmesi bu mekanizmadan

kaynaklanıyor olabilir. Vogel et al., (2013) yaptığı çalışmada, kemik iliğinden türetilmiş DH'lerde, *IDO-2*'nin de AhR uyarımı ile pozitif yönde regüle edildiğini bildirmiştir. Bu çalışma ise, *IDO-2* için sadece SNP incelemesi yapılmış olması sebebiyle yorumlama açısından yetersizdir. *IDO-2*'nin özellikle hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda proinflamatuvar etkileri olduğu güçlü kanıtlar ile gösterilmiştir . (Merlo et al., (2016) tarafından romatoid artrit fare modeli üzerinde yapılmış olan çalışmada, Metz et al., (2013) tarafından yapılan *IDO-2*'nin CHS yanıtlarında kritik bir rol oynadığını gösteren çalışmada ve Merlo et al., (2016) tarafından yapılmış olan SLE fare modellerinde yapılan çalışmada). Bu çalışmaların sonuçları ve *IDO-2* hakkında literatür eksikleri olması , *IDO-1*'in aksine *IDO-2*'nin COVID-19 hastalığında farklı bir görev üstlenip üstlenmediğinin incelenmesi gerekliliğine işaret etmektedir. Bu doğrultuda bir sonraki çalışmada *IDO-2*'nin detaylı olarak çalışılması planlanmaktadır. SARS-CoV-2 tarafından *IDO-1* baskılanması sonucunu destekleyen bir başka çalışma Schafer et al., (2020) tarafından yapılmıştır. Çalışmada, SARS-CoV-2'nin MSC'lerde indolamin 2,3-dioksijenaz 1 (*IDO-1*) üretimini etkileyip etkilemeyeceği araştırılmış ve virüsün, *IDO-1* üretiminin indüksiyonu gibi etkileri olan MSC'lerin apoptozunu indüklediğini, yani dolaylı yoldan *IDO-1* ekspresyonunun SARS-CoV-2 aracılı azaltılabileceği gösterilmiştir. Sağlıklı kontrol grubundan sırasıyla poliklinik, klinik ve yoğun bakım hasta grubuna doğru artması beklenirken azalış gösteren *IDO-1* konsantrasyonları, uygulanan ilaç tedavilerinden de etkilenmiş olabilir; Gostner et al., (2012) tarafından yapılan çalışmada, sıtma tedavisinde kullanılan klorokin interferon- γ ile indüklenen triptofan yıkımı ve neopterin üretimi ile etkileşimi, in vitro insan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) araştırılmış ve klorokin insan PBMC'sinde indolamin 2,3-dioksijenaz aktivasyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu etki, enflamatuvar durumlarda klorokinin terapötik faydası için klinik uygulamalarının spektrumunu genişletebilir. Fakat, COVID-19 hastalığı tedavisi için, içeriğinde klorokin bulunduran ilaçların kullanılması, *IDO* seviyelerini etkileyip etkilemediği açısından detaylı olarak araştırılmalıdır.

Elde edilen serum düzeyi sitokin konsantrasyon sonuçları bazı sitokinler için diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. Qin et al., (2020)'nın yaptığı çalışma dahil olmak

üzere birçok çalışma, hafif hastalığı olan bireylere kıyasla şiddetli COVID-19 geçiren birçok hastada proinflatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-1 β , IL-2, IFN- γ ve IL-6 için yüksek serum konsantrasyonları bildirmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz IL-6, TNF- α , IL-10, IL-4 konsantrasyon seviyeleri diğer çalışmalar ile uyumlu iken, IFN- γ ve IL-17 için saptanmış olan konsantrasyonlar diğer çalışmalara göre farklılık göstermektedir. Buna rağmen, IFN- γ en yüksek oranda *IDO-1* ekspresyon indüklemeye kapasitesine sahip sitokindir. Bu bağlamda çalışma sonucunda elde edilen düşük IFN- γ ve *IDO-1* seviyeleri çalışma içerisinde tutarlılık göstermektedir. Ayrıca Price et al., (2020)'nın yaptığı ve diğer bazı çalışmalar, SARS-CoV-2 virüsünün kontrolsüz viral replikasyona katkıda bulunan tip 1 interferon (IFN) tepkilerini azalttığından bahsetmektedir. Bizim sonuçlarımız da bu bilgiyi desteklemektedir. Ek olarak Kox et al., (2020) yaptıkları çalışma ile COVID-19 hastalarının serum sitokin konsantrasyonlarının sepsisli ve diğer kritik bazı hastalıklar ile benzer seviyelerde olduğunu göstermiştir bu bilgi COVID-19'un yalnızca sitokin fırtınası ve sitokin seviyeleri ile tanımlanmasının doğru olmadığını göstermektedir.

Orabona et al., (2018) juvenil diyabette indolamin 2,3-dioksijenaz 1 etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada; rs7820268 SNP bölgesinde spesifik bir *IDO-1* genotipinin *IDO* enziminde fonksiyon bozukluğuna ve bu durumun T1D hastalarında IL-6 reseptörünün (IL-6R) artan ekspresyonu ile de ilişkisine vurgu yapmışlardır. IL-6R bloke edici ilaçların kullanılması ile ise, *IDO-1* aktivitesinin normale döndüğünü saptamışlardır. Bu çalışma IL-6 ve *IDO-1* ilişkisi açısından çalışmamızla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda farklı rs7820268 SNP genotipleri arasında yaptığımız karşılaştırmada sitokinler ile anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Fakat serum düzeyinde bakmış olduğumuz *IDO-1* ve IL-6 konsantrasyonları arasında -0,35 korelasyon katsayılı negatif yönlü bir korelasyon tespit edilmiştir. Çalışma grubumuzun düşük popülasyona sahip olduğu göz önünde bulundurulduğunda, daha geniş bir popülasyonda rs7820268 SNP bölgesinde görülen genotipler ile IL-6 seviyelerinin incelenmesi sonucunda, juvenil diyabette elde edilen sonuçlara benzer anlamlı bir ilişki saptanabilir.

Viral hastalıkların yanında, ülseratif kolit, crohn hastalığı veya çölyak hastalığı gibi bazı gastrointestinal sistem ile ilişkili hastalıklarda da *IDO-1* ekspresyonunun arttığı Torres et al., (2007), Wolf et al., (2004) tarafından yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Dokularda triptofan katabolizması daha çok TDO tarafından gerçekleştirilmekte olsa da serum düzeyinde baktığımız *IDO-1* konsantrasyonlarına ek olarak, dokularda da *IDO-1* seviyelerinin incelenmesi, SARS-CoV-2'nin giriş bölümünde de bahsedilen birçok sistemde gösterdiği klinik tablo düşünüldüğünde önemlidir.

COVID-19'un patogenezi ve etkilediği moleküler mekanizmalar henüz net değildir. Bu nedenle, hastalıkla etkili tedavi yöntemlerini veya önleme stratejilerini tasarlamak kolay olmamaktadır. Yapılan çalışmaların bir bütün olarak değerlendirilmesi patogenezin anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada elde edilmiş olan *IDO-1*' in SARS-CoV-2 tarafından baskılanması, rs7820268 SNP bölgesinde tespit edilen C homozigot genotipinin COVID-19'a yatkınlığına sebep olması ve diğer sonuçlar; basamak görevi görerek yeni soru işaretleri oluşturmuştur. Bu doğrultuda COVID-19 patogenezinde *IDO-1*'in hangi mekanizmalar ile baskılandığının ve *IDO-2*'nin rollerinin daha detaylı araştırıldığı çalışmalara gereksinim vardır. Güçlü proinflatuar yanıtların görüldüğü COVID-19 patogenezinde önemli bir antienflatuvar olan *IDO-1*'in bu proinflatuar yanıtları dengelemede etkisi olup olmayacağı önemli bir soru işaretidir. Enflamasyonu azaltmaya yönelik herhangi bir müdahale, viral klirensi olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve enflamasyonun inhibisyonu arasında doğru dengeyi belirlemek için daha fazla klinik çalışmanın yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aerts, J., Wetzels, Y., Cohen, N., & Aerssens, J. (2002). Data mining of public SNP databases for the selection of intragenic SNPs. *Human Mutation*, 20(3), 162-173. doi.org/10.1002/humu.10107
- Ahmed, S. F., Quadeer, A. A., & McKay, M. R. 2020. "Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID- 19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies." *Viruses*, 12(3), 254. doi.org/10.3390/v12030254
- Aitken, N., Smith, S., Schwarz, C., & Morin, P. A. (2004). Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. *Molecular ecology*, 13(6), 1423-1431. doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02159.x
- Ajamian, F., Wu, Y., Ebeling, C., Ilaraza, R., Odemuyiwa, S. O., Moqbel, R., & Adamko, D. J. (2015). Respiratory syncytial virus induces indoleamine 2, 3-dioxygenase activity: a potential novel role in the development of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(3), 644-659. doi.org/10.1111/cea.12498
- Alarcon, G. S., Friedman, A. W., Straaton, K. V., Moulds, J. M., Lisse, J., Bastian, H. M., ... & Reveille, J. D. (1999). Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. *Lupus*, 8(3), 197-209. doi.org/10.1191/096120399678847704
- Ball, H. J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C. J., Astelbauer, F., Miu, J., ... & Hunt, N. H. (2007). Characterization of an indoleamine 2, 3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*, 396(1), 203-213. doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.010
- Ball, H. J., Yuasa, H. J., Austin, C. J., Weiser, S., & Hunt, N. H. (2009). Indoleamine 2, 3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(3), 467-471. doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.005
- Belen-Apak, F. B., & Sarıalioğlu, F. (2020). Pulmonary intravascular coagulation in COVID-19: possible pathogenesis and recommendations on anticoagulant/thrombolytic therapy. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 1-3. doi.org/10.1007/s11239-020-02129-0
- Benavente, F. M., Soto, J. A., Pizarro-Ortega, M. S., Bohmwald, K., González, P. A., Bueno, S. M., & Kalergis, A. M. (2019). Contribution of *IDO* to human respiratory syncytial virus infection *Journal of leukocyte biology*, 106(4),933-942. doi.org/10.1002/JLB.4RU0219-051RR
- Berthon, C., Fontenay, M., Corm, S., Briche, I., Allorge, D., Hennart, B., ... & Quesnel, B. (2013). Metabolites of tryptophan catabolism are elevated in sera of patients with myelodysplastic syndromes and inhibit hematopoietic progenitor amplification. *Leukemia research*, 37(5), 573-579. doi.org/10.1016/j.leukres.2013.02.001
- Boros, F. A., Bohár, Z., & Vécsei, L. (2018). Genetic alterations affecting the genes encoding the enzymes of the kynurenine pathway and their association with human diseases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 776, 32-45. doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.03.001
- Braciale, T. J., & Hahn, Y. S. (2013). Immunity to viruses. *Immunol Rev*, 255(1), 5-12. doi: 10.1111/imr.12109
- Brian, D. A., & Baric, R. S.. 1-30, 2005. Coronavirus replication and reverse genetics. Editör: Enjuanes,L. Berlin,Heidelberg: Springer.
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177-186.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X doi:10.1016/s0378-1119(99)00219-x

- Chan, J. F., Lau, S. K., To, K. K., Cheng, V. C., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clinical microbiology reviews*, 28(2), 465-522. doi.org/ 10.1128/CMR.00102-14
- Chan, J. F., Yuan, S., Kok, K. H., To, K. K., Chu, H., Yang, J., . . . Yuen, K. Y. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*, 395(10223), 514-523. doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9
- Chanock, S. (2001). Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Disease markers*, 17(2), 89-98. doi:10.1155/2001/858760
- Chen, I. Y., Moriyama, M., Chang, M. F., & Ichinohe, T. (2019). Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Frontiers in microbiology*, 10, 50. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00050
- Cheung, C. Y., Poon, L. L., Ng, I. H., Luk, W., Sia, S. F., Wu, M. H., ... & Peiris, J. S. (2005). Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *Journal of virology*, 79(12), 7819-7826. doi:10.1128/JVI.79.12.7819-7826.2005
- Cheung, M. B., Sampayo-Escobar, V., Green, R., Moore, M. L., Mohapatra, S., & Mohapatra, S. S. (2016). Respiratory syncytial virus-infected mesenchymal stem cells regulate immunity via interferon beta and indoleamine-2, 3-dioxygenase. *PLoS One*, 11(10), e0163709. doi.org/10.1371/journal.pone.0163709
- Comas-Garcia, M. (2019). Packaging of genomic RNA in positive-sense single-stranded RNA viruses: A complex story. *Viruses*, 11(3), 253. https://doi.org/10.3390/v11030253
- Condit, C. M., Achter, P. J., Lauer, I., & Sefcovic, E. (2002). The changing meanings of "mutation:" A contextualized study of public discourse. *Human Mutation*, 19(1), 69-75. doi: 10.1002/humu.10023
- Cong, Y., Ulasli, M., Schepers, H., Mauthe, M., V'kovski, P., Kriegenburg, F., ... & Reggiori, F. 2020. "Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle." *Journal of virology*, 94(4). doi: 10.1016/j.bbdis.2020.165878
- Conti, P., Ronconi, G., Caraffa, A. L., Gallenga, C. E., Ross, R., Frydas, I., & Kritas, S. K. (2020). Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *J Biol Regul Homeost Agents*, 34(2), 1. doi:10.23812/CONTI-E
- Copin, M. C., Parmentier, E., Duburcq, T., Poissy, J., & Mathieu, D. (2020). Time to consider histologic pattern of lung injury to treat critically ill patients with COVID-19 infection. *Intensive Care Medicine*, 1-3. doi: 10.1007/s00134-020-06057-8
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. 2019. "Origin and evolution of pathogenic coronaviruses." *Nature reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9
- Dai, J., El Gazzar, M., Li, G. Y., Moorman, J. P., & Yao, Z. Q. (2015). Myeloid-derived suppressor cells: paradoxical roles in infection and immunity. *J Innate Immun*, 7(2), 116-126. doi:10.1159/000368233
- de Wilde, A. H., Snijder, E. J., Kikkert, M., & van Hemert, M. J. (2017). Host factors in coronavirus replication. In *Roles of Host Gene and Non-coding RNA Expression in Virus Infection* (pp. 1-42). Springer, Cham. doi: 10.1007/82_2017_25
- Dey, M., Chang, A. L., Miska, J., Qiao, J., & Lesniak, M. S. (2017). The Role of Regulatory T Cells and Indoleamine-2, 3-dioxygenase in Brain Tumor Immunosuppression. In

Translational Immunotherapy of Brain Tumors (pp. 33-61). *Academic Press*. doi: 10.1007/s11060-014-1687-8

DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flaveny, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., ... & Perdew, G. H. (2010). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicological Sciences*, 115(1), 89-97. doi: 10.1093/toxsci/kfq024.

Ding, Y., Wang, H., Shen, H., Li, Z., Geng, J., Han, H., ... & Lu, Y. (2003). The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(3), 282-289. doi: 10.1002/path.1440

Divanovic, S., Sawtell, N. M., Trompette, A., Warning, J. I., Dias, A., Cooper, A. M., ... & Prendergast, G. C. (2012). Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection. *Journal of Infectious Diseases*, 205(1), 152-161. doi.org/10.1093/infdis/jir621

Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S., & Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cellular and molecular life sciences*, 70(19), 3493-3511. doi.org/10.1007/s00018-012-1252-6

Drosten, C., Seilmaier, M., Corman, V. M., Hartmann, W., Scheible, G., Sack, S., ... & Müller, M. A. (2013). Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *The Lancet infectious diseases*, 13(9), 745-751. doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70154-3

Du, L., Zhao, G., Lin, Y., Chan, C., He, Y., Jiang, S., ... & Zheng, B. J. 2008. "Priming with rAAV encoding RBD of SARS-CoV S protein and boosting with RBD-specific peptides for T cell epitopes elevated humoral and cellular immune responses against SARS-CoV infection." *Vaccine*, 26(13), 1644-1651. doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.025

Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., ... & Santamaria, P. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *The Journal of Immunology*, 176(11), 6752-6761. https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6752

Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4), 1907-1916. doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005

Fox, J. M., Sage, L. K., Huang, L., Barber, J., Klonowski, K. D., Mellor, A. L., ... & Tripp, R. A. (2013). Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase enhances the T-cell response to influenza virus infection. *The Journal of general virology*, 94(Pt 7), 1451. doi: 10.1099/vir.0.053124-0

Frieman, M., Ratia, K., Johnston, R. E., Mesecar, A. D., & Baric, R. S. (2009). Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF- κ B signaling. *Journal of virology*, 83(13), 6689-6705. doi: 10.1128/JVI.02220-08

Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S. A., Palese, P., & Baric, R. S. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *Journal of virology*, 81(18), 9812-9824. doi: 10.1128/JVI.01012-07

Fuchs, D., Möller, A.A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Dierich, M.P. and Wachter, H. (1991). Increased endogenous interferon-gamma and neopterin correlate with

increased degradation of tryptophan in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Immunology Letters*, 28, 207-12. doi.org/10.1016/0165-2478(91)90005-U

Galván Casas, C., Catala, A. C. H. G., Carretero Hernández, G., Rodríguez-Jiménez, P., Fernández-Nieto, D., Rodríguez-Villa Lario, A., ... & García-Gavín, J. (2020). Classification of the cutaneous manifestations of COVID-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases. *British Journal of Dermatology*, 183(1), 71-77. doi.org/10.1111/bjd.19163

Galvao-de Almeida, A., Quarantini, L. C., Sampaio, A. S., Lyra, A. C., Parise, C. L., Paraná, R., ... & Guindalini, C. (2011). Lack of association of indoleamine 2, 3-dioxygenase polymorphisms with interferon-alpha-related depression in hepatitis C. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(7), 1491-1497. doi.org/10.1016/j.bbi.2011.06.001

Ge, X. Y., Li, J. L., Yang, X. L., Chmura, A. A., Zhu, G., Epstein, J. H., ... & Zhang, Y. J. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 503(7477), 535-538. doi.org/10.1038/nature12711

Gostner, J. M., Schröcksnadel, S., Becker, K., Jenny, M., Schennach, H., Überall, F., & Fuchs, D. (2012). Antimalarial drug chloroquine counteracts activation of indoleamine (2, 3)-dioxygenase activity in human PBMC. *FEBS open bio*, 2, 241-245. doi.org/10.1016/j.fob.2012.08.004

Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., ... & Du, B. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine*, 382(18), 1708-1720. doi.org/10.1111/bjh.16856

Gu, J., Gong, E., Zhang, B., Zheng, J., Gao, Z., Zhong, Y., ... & Zhuang, H. (2005). Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *Journal of Experimental Medicine*, 202(3), 415-424. doi.org/10.1084/jem.20050828

Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., ... & 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(1), 1-10. doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0

Gurtner, G.J., Newberry, R.D., Schloemann, S.R., McDonald, K.G., Stenson, W.F. 2003. Inhibition Of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Augments Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis In Mice. *Gastroenterology*, (125): 1762-1773. doi:10.1053/j.gastro.2003.08.031

Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 121(1), 190-193. doi: 10.3181/00379727-121-30734

Han, Z., He, D., & Zhang, Y. (2020). Genetic variant rs7820258 regulates the expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 in brain regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(39), 24035-24036. doi.org/10.1073/pnas.2007022117

Hanley, B., Lucas, S. B., Youd, E., Swift, B., & Osborn, M. (2020). Autopsy in suspected COVID-19 cases. *Journal of clinical pathology*, 73(5), 239-242. Doi: 10.1136/jclinpath-2020-206522

Hascitha, J., Priya, R., Jayavelu, S., Dhandapani, H., Selvaluxmy, G., Singh, S. S., & Rajkumar, T. (2016). Analysis of kynurenine/tryptophan ratio and expression of *IDO-1* and 2 mRNA in tumour tissue of cervical cancer patients. *Clinical biochemistry*, 49(12), 919-924. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.04.008

Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D.H., Carson, D.A. Raz, E. 2004. Inhibition Of Experimental Asthma By Indoleamine 2,3-

Dioxygenase. *The Journal of Clinical Investigation*, (114): 270-279. doi:10.1016/j.bbr.2019.112394

Hsieh, P. K., Chang, S. C., Huang, C. C., Lee, T. T., Hsiao, C. W., Kou, Y. H., ... & Chang, M. F. 2005. "Assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA packaging signal into virus-like particles is nucleocapsid dependent." *Journal of virology*, 79(22), 13848-13855.

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., . . . Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497-506. doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5

Huang, L., Li, L., Klonowski, K. D., Tompkins, S. M., Tripp, R. A., & Mellor, A. L. (2013). Induction and role of indoleamine 2, 3 dioxygenase in mouse models of influenza a virus infection. *PLoS one*, 8(6), e66546. doi.org/10.1371/journal.pone.0066546

Hussain, S., Pan, J., Chen, Y., Yang, Y., Xu, J., Peng, Y., . . . Guo, D. (2005). Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 79(9), 5288-5295. doi:10.1128/JVI.79.9.5288-5295.2005

Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., . . . McCray, P. B., Jr. (2005). ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol*, 79(23), 14614-14621. doi: 10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005

Jones, S. (2006). Viral persistence: IL-10 is the key. *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 879-879. doi.org/10.1038/nri1989

Joob, B., & Wiwanitkit, V. (2020). Pulmonary Pathology of Early Phase 2019 Novel Coronavirus Pneumonia. *Journal of Thoracic Oncology*, 15(5), e67. doi.org/10.1016/j.jtho.2020.03.015

Kim, J. Y., Ko, J. H., Kim, Y., Kim, Y. J., Kim, J. M., Chung, Y. S., ... & Chin, B. S. (2019). Viral load kinetics of SARS-CoV-2 infection in first two patients in Korea. *Journal of Korean medical science*, 35(7). doi: 10.3346/jkms.2020.35.e86

Kin, N., Miszczak, F., Lin, W., Gouilh, M. A., & Vabret, A. (2015). Genomic analysis of 15 human coronaviruses OC43 (HCoV-OC43s) circulating in France from 2001 to 2013 reveals a high intra-specific diversity with new recombinant genotypes. *Viruses*, 7(5), 2358-2377. doi: 10.3390/v7052358

King, N.J., Thomas, S.R. (2007) Molecules in focus: indoleamine 2,3- dioxygenase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (12), 2167-2172. Doi: 10.1016/j.biocel.2007.01.004

Kox, M., Waalders, N. J., Kooistra, E. J., Gerretsen, J., & Pickkers, P. (2020). Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. *Jama*, 324(15), 1565-1567. doi: 10.1001/jama.2020.17052

Kwidzinski, E., Bunse, J., Aktas, O., Richter, D., Mutlu, L., Zipp, F., Nitsch, R. Bechmann, I. 2005. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Expressed in the CNS and Down-Regulates Autoimmune Inflammation. *The FASEB Journal*, (19): 1347-1349.

Lai, C. C., Liu, Y. H., Wang, C. Y., Wang, Y. H., Hsueh, S. C., Yen, M. Y., ... & Hsueh, P. R. (2020). Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARSCoV-2): facts and myths. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. doi: 10.1016/j.jmii.2020.02.012.

- Lai, M. M., Baric, R. S., Makino, S., Keck, J. G., Egbert, J., Leibowitz, J. L., & Stohlman, S. A. (1985). Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. *Journal of virology*, 56(2), 449-456. doi: 10.1128/JVI.56.2.449-456.1985
- Lageix, S., Rothenburg, S., Dever, T. E., & Hinnebusch, A. G. (2014). Enhanced interaction between pseudokinase and kinase domains in Gcn2 stimulates eIF2 α phosphorylation in starved cells. *PLoS Genet*, 10(5), e1004326. . doi: 10.1371/journal.pgen.1004326.
- Law, H. K., Cheung, C. Y., Ng, H. Y., Sia, S. F., Chan, Y. O., Luk, W., ... & Lau, Y. L. (2005). Chemokine up-regulation in sars-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood*, 106(7), 2366-2374. doi: 10.1182/blood-2004-10-4166
- Lee, E. K., & Gorospe, M. (2011). Coding region: the neglected post-transcriptional code. *RNA biology*, 8(1), 44-48. doi: 10.4161/rna.8.1.13863
- Lee, A., Kanuri, N., Zhang, Y., Sayuk, G. S., Li, E., & Ciorba, M. A. (2014). *IDO-1* and *IDO-2* non-synonymous gene variants: correlation with crohn's disease risk and clinical phenotype. *PLoS One*, 9(12), e115848. doi.org/10.1371/journal.pone.0133098
- Lee, S. M., Park, H. Y., Suh, Y. S., Yoon, E. H., Kim, J., Jang, W. H., ... & Kang, S. W. (2017). Inhibition of acute lethal pulmonary inflammation by the *IDO*-AhR pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), E5881-E5890. doi: 10.1073/pnas.1615280114
- Lepiller, Q., Soulier, E., Li, Q., Lambotin, M., Barths, J., Fuchs, D., ... & Barth, H. (2015). Antiviral and immunoregulatory effects of indoleamine-2, 3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *Journal of innate immunity*, 7(5), 530-544. doi.org/10.1159/000375161
- Li, F., Wei, L., Li, S., & Liu, J. (2017). Indoleamine-2, 3-dioxygenase and Interleukin-6 associated with tumor response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Oncotarget*, 8(64), 107844. . doi: 10.18632/oncotarget.22253
- Li, J., & Fan, J. G. (2020). Characteristics and mechanism of liver injury in 2019 coronavirus disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 8(1), 13. doi: 10.14218/JCTH.2020.00019
- Li J, Wang X, Chen J, Zhang H, Deng A. Association of Renin-Angiotensin System Inhibitors With Severity or Risk of Death in Patients With Hypertension Hospitalized for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection in Wuhan, China. *JAMA cardiology*. 2020 doi:10.1001/jamacardio.2020.1624 doi:10.1001/jamacardio.2020.1624
- Liu, Z., Dai, H., Wan, N., Wang, T., Bertera, S., Trucco, M., & Dai, Z. (2007). Suppression of memory CD8 T cell generation and function by tryptophan catabolism. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4260-4266. doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4260
- Löb, S., Königsrainer, A., Zieker, D., Brücher, B. L., Rammensee, H. G., Opelz, G., & Terness, P. (2009). *IDO-1* and *IDO-2* are expressed in human tumors: levo-but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer immunology, immunotherapy*, 58(1), 153-157. doi: 10.1007/s00262-008-0513-6
- Lu H. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). *Biosci Trends*. 2020;14(1):69–71. doi: 10.5582/bst.2020.01020
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Bi, Y. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565-574. doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- MacKenzie, C. R., et al. "Role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines." *Current drug metabolism* 8.3 (2007): 237-244.

- Maddison, D. C., & Giorgini, F. (2015, April). The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 40, pp. 134-141). Academic Press. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.03.002
- Masters, P. S., & Sturman, L. S., 1990. "Background Paper Functions of the Coronavirus Nucleocapsid Protein. In *Coronaviruses and their Diseases*" *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 276, 235-238. doi: 10.1007/978-1-4684-5823-7_32
- McBride, R., Van Zyl, M., & Fielding, B. C. 2014. "The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein." *Viruses*, 6(8),2991-3018. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.05.012
- McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., & Chanock, R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(4), 933. doi: 10.1073/pnas.57.4.933
- McMichael, T. M., Currie, D. W., Clark, S., Pogosjans, S., Kay, M., Schwartz, N. G., ... & Ferro, J. (2020). Epidemiology of Covid-19 in a long-term care facility in King County, Washington. *New England Journal of Medicine*, 382(21), 2005-2011. doi: 10.1056/NEJMoa2005412.
- Mellor, A. L., & Munn, D. H. (1999). Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?. *Immunology today*, 20(10), 469-473. doi: 10.1016/s0167-5699(99)01520-0
- Mellor, A.L., Munn, D.H. 2004. *IDO* expression by dendritic cells:Tolerance and tryptophan catabolism. *Nature*, 4(10): 762-774. doi: 10.1038/nri1457
- Menachery, V. D., Yount Jr, B. L., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L. E., Plante, J. A., ... & Randell, S. H. (2016). Correction: Corrigendum: A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine*, 22(4), 446.doi.org/10.1038/nm.3985 doi.org/10.1038/nm.3985
- Menta, R., Mancheño-Corvo, P., Del Río, B., Ramírez, C., DelaRosa, O., Dalemans, W., & Lombardo, E. (2014). Tryptophan concentration is the main mediator of the capacity of adipose mesenchymal stromal cells to inhibit T-lymphocyte proliferation in vitro. *Cytotherapy*, 16(12), 1679-1691. doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.07.004
- Merlo, L.M. , Pigott, E. , DuHadaway, J.B. *IDO-2* is a critical mediator of autoantibody production and inflammatory pathogenesis in a mouse model of autoimmune arthritis. *J Immunol.* 2014; 192(5): 2082–90. doi: 10.4049/jimmunol.1303012
- Merlo, L. M., & Mandik-Nayak, L. (2016). *IDO2*: a pathogenic mediator of inflammatory autoimmunity. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 9, CPath-S39930. doi.org/10.4137/CPath.S39930
- Metz, R., DuHadaway, J. B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A. J., & Prendergast, G. C. (2007). Novel tryptophan catabolic enzyme *IDO-2* is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer research*, 67(15), 7082-7087. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1872
- Metz, R., Smith, C., DuHadaway, J. B., Chandler, P., Baban, B., Merlo, L. M., ... & Mandik-Nayak, L. (2014). *IDO-2* is critical for *IDO-1*-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation. *International immunology*, 26(7), 357-367. doi: 10.1093/intimm/dxt073
- Metz, R. , Smith, C. , DuHadaway, J.B. *IDO-2* is critical for *IDO1*-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation. *Int Immunol.* 2014; 26(7): 357–67. doi.org/10.4137/CPath.S39930

- Metz, R., Rust, S., DuHadaway, J. B., Mautino, M. R., Munn, D. H., Vahanian, N. N., ... & Prendergast, G. C. (2012). *IDO* inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: a novel *IDO* effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology*, 1(9), 1460-1468. doi: 10.4161/onci.21716
- Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J., & Bradfield, C. A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 185(6), 3190-3198. doi: 10.4049/jimmunol.0903670
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2004). *IDO* and tolerance to tumors. *Trends in molecular medicine*, 10(1), 15-18. doi: 10.1016/j.molmed.2003.11.003
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2013). Indoleamine 2, 3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in immunology*, 34(3), 137-143. doi: 10.1016/j.it.2012.10.001
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D., & Mellor, A. L. (2005). GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Immunity*, 22(5), 633-642. doi: 10.1016/j.immuni.2005.03.013
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., & Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *Journal of Experimental Medicine*, 189(9), 1363-1372. doi: 10.1084/jem.189.9.1363
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C. Mellor, A.L. 1998. Prevention Of Allogeneic Fetal Rejection By Tryptophan Catabolism. *Science*, (281): 1191-1193. doi: 10.1126/science.281.5380.1191
- Murakami, Y., Hoshi, M., Imamura, Y., Arioka, Y., Yamamoto, Y., Saito, K. (2013) Remarkable role of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolites in infectious diseases: potential role in macrophage-mediated inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation*, 2013, 391984. doi.org/10.1155/2013/391984
- Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Kamitani, W., Ikegami, T., Tseng, C. T. K., & Makino, S. (2008). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *Journal of virology*, 82(9), 4471-4479. doi: 10.1128/JVI.02472-07
- Nelson, G. W., Stohlman, S. A., & Tahara, S. M. 2000. "High affinity interaction between nucleocapsid protein and leader/intergenic sequence of mouse hepatitis virus RNA." *Journal of General Virology*, 81(1), 181-188. DOI: 10.1099/0022-1317-81-1-181
- Nicholls, J. M., Poon, L. L., Lee, K. C., Ng, W. F., Lai, S. T., Leung, C. Y., ... & Yan, K. W. (2003). Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, 361(9371), 1773-1778. doi: 10.1016/s0140-6736(03)13413-7
- Nie, Y., Wang, G., Shi, X., Zhang, H., Qiu, Y., He, Z., ... & Ren, L. (2004). MAJOR ARTICLES AND BRIEF REPORTS-VIRUSES-Neutralizing Antibodies in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection. *Journal of Infectious Diseases*, 190(6), 1119-1126. doi: 10.1086/423286
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritzschler, I., Trump, S., ... & Jugold, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368), 197-203. doi: 10.1038/nature10491
- Orabona, C., Mondanelli, G., Pallotta, M. T., Carvalho, A., Albini, E., Fallarino, F., ... & Grohmann, U. (2018). Deficiency of immunoregulatory indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 in juvenile diabetes. *JCI insight*, 3(6). Doi: 10.1172 / jci.insight.96244

- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L., & Wang, Q. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(4), 411-412. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30113-4
- Peiris, J. S. M., Chu, C. M., Cheng, V. C. C., Chan, K. S., Hung, I. F. N., Poon, L. L., ... & Chan, K. H. (2003). Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *The Lancet*, 361(9371), 1767-1772. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13412-5
- Perkins, M. N., & Stone, T. W. (1983). Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 226(2), 551-557.
- Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B., & Horton, M. R. (2012). Regulation of immune responses by mTOR. *Annual review of immunology*, 30, 39-68. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075024
- Price, K. N., Frew, J. W., Hsiao, J. L., & Shi, V. Y. (2020). COVID-19 and immunomodulator/immunosuppressant use in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 82(5), e173-e175. doi: 10.1016/j.jaad.2020.03.046
- Pucci, L., Perozzi, S., Cimadamore, F., Orsomando, G., & Raffaelli, N. (2007). Tissue expression and biochemical characterization of human 2-amino 3-carboxymuconate 6-semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in tryptophan catabolism. *The FEBS journal*, 274(3), 827-840. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05635.x
- Qian, F., Liao, J., Vilella, J., Edwards, R., Kalinski, P., Lele, S., ... & Odunsi, K. (2012). Effects of 1-methyltryptophan stereoisomers on IDO-2 enzyme activity and IDO-2-mediated arrest of human T cell proliferation. *Cancer immunology, immunotherapy*, 61(11), 2013-2020. doi.org/10.1007/s00726-013-1602-1
- Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., ... & Tian, D. S. (2020). Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases*. doi: 10.1093/cid/ciaa248
- Rabbani, M. A. G., Ribaud, M., Guo, J. T., & Barik, S. (2016). Identification of interferon-stimulated gene proteins that inhibit human parainfluenza virus type 3. *Journal of virology*, 90(24), 11145-11156. doi: 10.1128/JVI.01551-16
- Rajan, D., Chinnadurai, R., O'Keefe, E. L., Boyoglu-Barnum, S., Todd, S. O., Hartert, T. V., ... & Anderson, L. J. (2017). Protective role of Indoleamine 2, 3 dioxygenase in Respiratory Syncytial Virus associated immune response in airway epithelial cells. *Virology*, 512, 144-150. doi: 10.1016/j.virol.2017.09.007
- Riou, J., & Althaus, C. L. (2020). Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Eurosurveillance*, 25(4), 2000058.
- Routy, J. P., Mehraj, V., Vyboh, K., Cao, W., Kema, I., & Jenabian, M. A. (2015). Clinical relevance of kynurenine pathway in HIV/AIDS: an immune checkpoint at the crossroads of metabolism and inflammation. *AIDS reviews*, 17(2), 96.
- Ruan, Q., Yang, K., Wang, W., Jiang, L., & Song, J. (2020). Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive care medicine*, 46(5), 846-848. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x
- Rytelewski, M., Meilleur, C. E., Yekta, M. A., Szabo, P. A., Garg, N., Schell, T. D., ... & Haeryfar, S. M. (2014). Suppression of immunodominant antitumor and antiviral CD8+ T cell

responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *PloS one*, 9(2), e90439. doi.org/10.1371/journal.pone.0090439

Sage, L. K., Fox, J. M., Mellor, A. L., Tompkins, S. M., & Tripp, R. A. (2014). Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) activity during the primary immune response to influenza infection modifies the memory T cell response to influenza challenge. *Viral immunology*, 27(3), 112-123. doi: 10.1089/vim.2013.0105

Sağlık Bakanlığı COVID Rehberi (2020) Erişim Adresi: https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/depo/rehberler/covid-19-rehberi/COVID-19_REHBERI_GENEL_BILGILER_EPIDEMIOLOJI_VE_TANI.pdf

Sawicki, S. G., & Sawicki, D. L. (2005). Coronavirus transcription: a perspective. *Curr Top Microbiol Immunol*, 287, 31-55. DOI: 10.1007/3-540-26765-4_2

Schafer, R., Spohn, G., Bechtel, M., Bojkova, D., Baer, P. C., Kuçi, S., ... & Cinatl, J. (2020). Human mesenchymal stromal cells are resistant to SARS-CoV-2 infection under steady-state, inflammatory conditions and in the presence of SARS-CoV-2-infected cells. *Stem Cell Reports*. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.09.003

Schroecksnadel, K., Kaser, S., Ledochowski, M., Neurauter, G., Mur, E., Herold, M. and Fuchs, D. (2003). Increased degradation of tryptophan in blood of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 30, 1935-39doi: 10.1007/s10067-005-0056-6

Schroecksnadel, K., Wirleitner, B., Winkler, C. and Fuchs, D. (2006). Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clinica Chimica Acta*, 364, 8290. doi: 10.1016/j.cca.2005.06.013

Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D. Y., Singh, N., Yagita, H., ... & Munn, D. H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2, 3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation*, 117(9), 2570-2582. doi: 10.1172/JCI31911

Shi, Y., Wang, Y., Shao, C., Huang, J., Gan, J., Huang, X., . . . Melino, G. (2020). COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ*. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0530-3>

Siu, K. L., Chan, C. P., Kok, K. H., Woo, P. C. Y., & 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), 141-149. doi.org/10.1038/cmi.2013.61

Smith, A. K., Simon, J. S., Gustafson, E. L., Noviello, S., Cubells, J. F., Epstein, M. P., ... & Sulkowski, M. S. (2012). Association of a polymorphism in the indoleamine-2, 3-dioxygenase gene and interferon- α -induced depression in patients with chronic hepatitis C. *Molecular psychiatry*, 17(8), 781-789. doi.org/10.1038/mp.2011.67

Song C, Wang Y, Li W, Hu B, Chen G, Xia P, et al. Absence of 2019 Novel Coronavirus in Semen and Testes of COVID-19 Patients. *Biol Reprod*. 2020:ioaa050. DOI: 10.1093/biolre/ioaa050

Song, F., Shi, N., Shan, F., Zhang, Z., Shen, J., Lu, H., ... & Shi, Y. (2020). Emerging 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) pneumonia. *Radiology*, 295(1), 210-217. doi.org/10.1148/radiol.202000274

Sonzogni, A., Previtali, G., Seghezzi, M., Alessio, M. G., Gianatti, A., Licini, L., ... & Pellegrinelli, A. (2020). Liver and COVID 19 Infection: A Very Preliminary Lesson Learnt from Histological Post-mortem Findings in 48 patients. doi: 10.20944/preprints202004.0438.v1

- Stanhope, M. J., Brown, J. R., & Amrine-Madsen, H. (2004). Evidence from the evolutionary analysis of nucleotide sequences for a recombinant history of SARS-CoV. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(1), 15-19. doi: 10.1016/j.meegid.2003.10.001
- Sugimoto, H., Oda, S., Otsuki, T., Yoshida, T., Shiro, Y. 2006. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 103(8): 2611-2616 doi.org/10.1073/pnas.0508996103
- Sun, L., Xing, Y., Chen, X., Zheng, Y., Yang, Y., Nichols, D. B., ... & Chen, Z. (2012). Coronavirus papain-like proteases negatively regulate antiviral innate immune response through disruption of STING-mediated signaling. *PloS one*, 7(2), e30802. doi: 10.1371/journal.pone.0030802
- Surjit, M., Liu, B., Chow, V. T., & Lal, S. K. 2006. "The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome- coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells." *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 10669-10681. doi: 10.1074/jbc.M509233200
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C., Zhou, J., ... & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in microbiology*, 24(6), 490-502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003
- Stegelmeier, A. A., van Vloten, J. P., Mould, R. C., Klafuric, E. M., Minott, J. A., Wootton, S. K., ... Karimi, K. (2019). Myeloid Cells during Viral Infections and Inflammation. *Viruses*, 11(2).
- Stohlman, S. A., Baric, R. S., Nelson, G. N., Soe, L. H., Welter, L. M., & Deans, R. J., 1988. "Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein." *Journal of virology*, 62(11), 4288-4295. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.025
- Takikawa, O. (2005). Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2, 3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 12-19. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.032
- Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F., & KIDO, R. (1988). Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2, 3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *Journal of Biological Chemistry*, 263(4), 2041-2048.
- Tang, T. K., Wu, M. P. J., Chen, S. T., Hou, M. H., Hong, M. H., Pan, F. M., ... & Wang, A. H. J. 2005. "Biochemical and immunological studies of nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome and 229E human coronaviruses." *Proteomics*, 5(4), 925-937. doi: 10.1016/j.bios.2006.04.031
- Tan, Y. J., Goh, P. Y., Fielding, B. C., Shen, S., Chou, C. F., Fu, J. L., ... & Lim, S. G. (2004). Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(2), 362-371. doi: 10.1128/cdli.11.2.362-371.2004
- Tardito, S., Negrini, S., Conteduca, G., Ferrera, F., Parodi, A., Battaglia, F., ... & Filaci, G. (2013). Indoleamine 2, 3 dioxygenase gene polymorphisms correlate with CD8⁺ Treg impairment in systemic sclerosis. *Human Immunology*, 74(2), 166-169.
- Taylor, M.W. and Feng, G.S. (1991). Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB Journal*, 5, 2516-22.
- Temperton, N. J., Chan, P. K., Simmons, G., Zambon, M. C., Tedder, R. S., Takeuchi, Y., & Weiss, R. A. (2005). Longitudinally profiling neutralizing antibody response to SARS

- coronavirus with pseudotypes. *Emerging infectious diseases*, 11(3), 411. doi: 10.3201/eid1103.040906
- Thevarajan, I., Nguyen, T. H., Koutsakos, M., Druce, J., Caly, L., van de Sandt, C. E., ... & Tong, S. Y. (2020). Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nature medicine*, 26(4), 453-455. doi: 10.1038/s41591-020-0819-2
- Tian, S., Hu, W., Niu, L., Liu, H., Xu, H., & Xiao, S. Y. (2020). Pulmonary pathology of early phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. doi.org/10.1016/j.jtho.2020.02.010
- Torres MI, Lopez-Casado MA, Lorite P, Lorite P, Rios A. Tryptophan metabolism and indoleamine 2,3-dioxygenase in celiac disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 419-24. doi : 10.1111/j.1365-2249.2007.03365.x
- Török, N., Maszlag-Török, R., Molnár, K., Szolnoki, Z., Somogyvári, F., Boda, K., ... & Vécsei, L. (2020). Single Nucleotide Polymorphisms of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase 1 Influenced the Age Onset of Parkinson's Disease. doi: 10.20944/preprints202009.0470.v1
- Trabanelli, S., Očadlíková, D., Ciciarello, M., Salvestrini, V., Lecciso, M., Jandus, C., ... & Prendergast, G. C. (2014). The SOCS3-independent expression of *IDO-2* supports the homeostatic generation of T regulatory cells by human dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 192(3), 1231-1240. doi.org/10.4049/jimmunol.1300720
- Tseng, C. T. K., Perrone, L. A., Zhu, H., Makino, S., & Peters, C. J. (2005). Severe acute respiratory syndrome and the innate immune responses: modulation of effector cell function without productive infection. *The Journal of Immunology*, 174(12), 7977-7985.
- Turski, W. A., Wnorowski, A., Turski, G. N., Turski, C. A., & Turski, L. (2020). AhR and IDO1 in pathogenesis of Covid-19 and the "Systemic AhR Activation Syndrome" Translational review and therapeutic perspectives. *Restorative Neurology and Neuroscience*, (Preprint), 1-12. doi: 10.3233/RNN-201042
- Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1965). Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *British medical journal*, 1(5448), 1467. doi: 10.1136/bmj.1.5448.1467
- Tyrrell, D. A. J., Cohen, S., & Schilarb, J. E. (1993). Signs and symptoms in common colds. *Epidemiology & Infection*, 111(1), 143-156. doi: 10.1017/s0950268800056764
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-Cerpa, S., Rivas-Pardo, J. A., Maisey, K., Yáñez, J. M., Valenzuela, H., ... & Imarai, M. (2020). Single-Nucleotide Polymorphisms (SNP) Mining and Their Effect on the Tridimensional Protein Structure Prediction in a Set of Immunity-Related Expressed Sequence Tags (EST) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Genetics*, 10, 1406. doi: 10.3389/fgene.2019.01406
- Van Der Hoek, L., Pyrc, K., & Berkhout, B. (2006). Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS microbiology reviews*, 30(5), 760-773. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00032.x
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... & Gocayne, J. D. (2001). The sequence of the human genome. *science*, 291(5507), 1304-1351. doi: 10.1126/science.1058040
- Versteeg, G. A., Bredenbeek, P. J., van den Worm, S. H., & Spaan, W. J. (2007). Group 2 coronaviruses prevent immediate early interferon induction by protection of viral RNA from host cell recognition. *Virology*, 361(1), 18-26. doi: 10.1016/j.virol.2007.01.020

- Vogel, C. F., Wu, D., Goth, S. R., Baek, J., Lollies, A., Domhardt, R., ... & Pessah, I. N. (2013). Aryl hydrocarbon receptor signaling regulates NF- κ B RelB activation during dendritic-cell differentiation. *Immunology and cell biology*, 91(9), 568-575. doi: 10.1038/icb.2013.43
- von Bubnoff, D., Koch, S., & Bieber, T. (2003). New jobs for an old enzyme: the revival of IDO. *Trends in immunology*, 24(6), 295-296. doi: 10.1053/apmr.2001.26074
- Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of virology*, 94(7). doi.org/10.1128/JVI.00127-20
- Wang, J., Matafonov, A., Madkhali, H., Mahdi, F., Watson, D., Schmaier, A. H., ... & Shariat-Madar, Z. (2014). Prolylcarboxypeptidase independently activates plasma prekallikrein (fletcher factor). *Current molecular medicine*, 14(9), 1173-1185.
- Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T. et al. Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS Infect Dis*. 2016;2:361-76 doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00006
- Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and molecular biology reviews*, 69(4), 635-664. doi: 10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005
- Witkiewicz, A. K., Costantino, C. L., Metz, R., Muller, A. J., Prendergast, G. C., Yeo, C. J., & Brody, J. R. (2009). Genotyping and expression analysis of IDO-2 in human pancreatic cancer: a novel, active target. *Journal of the American College of Surgeons*, 208(5), 781-787. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2008.12.018
- Wolf MA, Wolf D, Rumpold H, Alexander R, Kaser A, Obrist P, et al. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2004; 113: 45-55. doi: 10.1016/j.clim.2004.05.004
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., ... & Poon, L. L. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of virology*, 79(2), 884-895. doi: 10.1128/JVI.79.2.884-895.2005
- Woo, P. C., Lau, S. K., Yip, C. C., Huang, Y., & Yuen, K. Y. (2009). More and more coronaviruses: human coronavirus HKU1. *Viruses*, 1(1), 57-71. doi: 10.3390/v1010057
- Wu, H. S., Hsieh, Y. C., Su, I. J., Lin, T. H., Chiu, S. C., Hsu, Y. F., ... & Chang, G. D. (2004). Early detection of antibodies against various structural proteins of the SARS-associated coronavirus in SARS patients. *Journal of biomedical science*, 11(1), 117-126. doi: 10.1007/bf02256554
- Wu R, Wang L, Kuo H-CD, Shannar A, Peter R, Chou PJ, et al. An update on current therapeutic drugs treating COVID-19. *Curr Pharmacol Rep*. 2020;1:1-15. doi: 10.1007/s40495-020-00216-7
- Xia S, Liu M, Wang C, Xu W, Lan Q, Feng S. et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res*. 2020;30:343-55 doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x
- Xiao, H. L., Zhao, L. X., Yang, J., Tong, N., An, L., Liu, Q. T., ... & Li, C. S. (2018). Association between ACE2/ACE balance and pneumocyte apoptosis in a porcine model of acute pulmonary thromboembolism with cardiac arrest. *Molecular Medicine Reports*, 17(3), 4221-4228.

- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., ... & Tai, Y. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet respiratory medicine*, 8(4), 420-422.
- Yalcin, A. D., & Yalcin, A. N. (2020). Future Perspective: Biologic agents in patients with Severe Covid-19. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, (just-accepted), 1-20. doi.org/10.1080/08923973.2020.1818770
- Yang, M. (2020). Cell pyroptosis, a potential pathogenic mechanism of 2019-nCoV infection. Available at SSRN 3527420. <http://doi.org/10.2139/ssrn.3527420>
- Yilla, M., Harcourt, B. H., Hickman, C. J., McGrew, M., Tamin, A., Goldsmith, C. S., ... & Anderson, L. J. (2005). SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. *Virus research*, 107(1), 93-101. doi: 10.1016/j.virusres.2004.09.004
- Yuasa, H. J., Takubo, M., Takahashi, A., Hasegawa, T., Noma, H., & Suzuki, T. (2007). Evolution of vertebrate indoleamine 2, 3-dioxygenases. *Journal of molecular evolution*, 65(6), 705. doi: 10.1007/s00239-007-9049-1
- Yuen, K. S., Ye, Z. W., Fung, S. Y., Chan, C. P., & Jin, D. Y. (2020). SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. *Cell & bioscience*, 10(1), 1-5. doi.org/10.1186/s13578-020-00404-4
- Zaki, A. M., Van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D., & Fouchier, R. A. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814-1820. doi: 10.1126/science.abc6284
- Zhang H, Wada J, Hida K, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Shikata K. et al. Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:17132-9 doi: 10.1074/jbc.M006723200
- Zhang, H., Zhou, P., Wei, Y., Yue, H., Wang, Y., Hu, M., ... & Guo, G. (2020). Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Annals of internal medicine*, 172(9), 629-632. doi: 10.7326/M20-0533
- Zhou, Y., Fu, B., Zheng, X., Wang, D., Zhao, C., Qi, Y., ... & Wei, H. (2020). Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *National Science Review*. doi: 10.1093/nsr/nwaa041
- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., ... & Guan, L. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The lancet*. doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3
- Zhou L, Zhang M, Wang J, Gao J. Sars-Cov-2: Underestimated damage to nervous system. *Travel Med Infect Dis*. 2020: 101642. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101642
- Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., ... & Guo, Q. (2020). SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *New England Journal of Medicine*, 382(12), 1177-1179. doi: 10.1056/NEJMc2001737
- Zumla, A., Hui, D. S., & Perlman, S. (2015). Middle East respiratory syndrome. *The Lancet*, 386(9997), 995-1007. doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60454

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

2019-nCoV: 2019- Yeni koronavirüs
ACE2: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
APC: Antijen sunan hücre
ARDS: Akut solunum sıkıntısı sendromu
BT: Bilgisayarlı tomografi
°C: Santigrat derece
cDNA: Komplementer DNA
CoV: Koronavirüs
COVID-19: Koronavirüs hastalığı - 2019
DAD: Diffüz alveolar hasar
DNA: Deoksiribonükleik asit
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G-CSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör
HCV: Hepatit C virüsü
IDO: İndolamin 2-3 dioksijenaz
IFN- γ : İnterferon gamma
IL: İnterlökin
MERS: Middle East Respiratory Syndrome
MIP1 α : Makrofaj enflamatuvar protein 1 α
ml: Mililitre
NAD⁺: Nikotinamid adenin dinükleotid
ng: Nanogram
NP: Nükleokapsid protein
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
pg: Pikogram
SARS: Severe acute respiratory syndrome
SNP: Tekli nükleotit değişiklikleri
TDO: Triptofan 2,3-dioksijenaz

TGF- β : Transforme edici büyüme faktör – beta

TLR: Toll-like reseptörler

TNF- α : Tümör nekrosis faktörü-alfa

μ g: Mikrogram



8. EKLER

EK 1: Etik kurul karar formu

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU									
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		İndolamin 2, 3 Dioksijenaz (IDO) Gen Polimorfizminin COVID-19 ve Kliniği Üzerine Etkisi							
Karar No: 2020-7/24		Tarih: 29 Nisan 2020							
KARAR BİLGİLERİ		Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak ve COVID-19 pandemisi ile ilişkili Sağlık Bakanlığı ve Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu genelgesi ve kuralları çerçevesinde incelendi. 1-Araştırmanın yapılmasının uygun olduğuna, 2-Sağlık Bakanlığı Türkiye Tıbbi İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun "COVID-19 Hastalarında Tedavi Yaklaşımları ve Bilimsel Araştırmalar" konulu Genelgesi (2020/2) uyarınca; "Retrospektif araştırmalar da dahil olmak üzere tüm araştırmalarda kullanılması planlanan verinin elde edildiği ve ilgili hastaların takip edildiği bölüm/birimden hekim ya da hekimlerin araştırma ekibinde bulunması gerekmektedir." Bu çerçevede verinin elde edildiği hastaları izleyen ve değerlendiren hekimlerin araştırmaya bilimsel araştırma etik kriterleri çerçevesinde dahil edilmesine ve bu araştırmacıların pandemi grubu olarak tarafımıza daha sonra iletilmesine, 3- Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kağıdı bulunan "Onam" formlarının kullanılması ve bu formun çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına, 4-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurumumuza iletilmesine, 5-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırmacılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.							
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI		Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU							
ÜYELER									
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza	
Prof.Dr. Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Prof.Dr.İdris BASAĞIAN MOĞUL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	U.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Prof.Dr. M. Serçe YILMAZ Üye	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji AD	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Doç.Dr. Alperin TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	U.Ü.T.F. Halk Sağlığı AD	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Doç.Dr. Pinar VURAL Üye	Pediyatri	U.Ü.T.F. Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Doç.Dr. Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Doç.Dr. İhsan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Doç.Dr. Kağan HÜYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Doç.Dr. Öğretim Üyesi Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk	U.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İznilidir	
Doç.Dr. Öğretim Üyesi Engin SAÇDİLEK Üye	Biyofizik	U.Ü.T.F. Biyofizik AD	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Doç.Dr. Öğretim Üyesi Sencer ERER KAFKAL Üye	Tıp Tarihi ve Etik	U.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik AD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		
Selma AKUĞAL Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐		

* Toplantıda Bulunma

Ek 2: Nanodrop ile ölçülmüş olan DNA'ların saflık ve konsantrasyonları

Tek nükleotid polimorfizm çalışmasına dahil edilecek hasta grubunun nanodrop ölçüm sonuçları Tablo 8.1'de verilmiştir.

Tablo 8.1 Polimorfizm çalışılan hastaların DNA'larının nanodrop ölçüm sonuçları

Hasta No:	260/280 (nm)	260/230 (nm)	Konsantrasyon (ng/μl)	Hasta No:	260/280 (nm)	260/230 (nm)	Konsantrasyon (ng/μl)
1	3,596	1,821	9,41	21	1,510	1,214	88,91
2	2,106	2,396	7,25	22	2,098	1,924	10,41
3	2,613	2,341	9,26	23	1,969	1,183	14,35
4	1,876	1,288	7,60	24	2,254	0,765	16,51
5	1,664	1,524	9,40	25	3,325	2,165	16,07
6	2,885	0,829	15,84	26	1,421	1,653	53,87
7	2,581	1,272	7,94	27	2,585	2,123	16,63
8	2,871	1,748	6,78	28	1,677	1,513	16,81
9	1,554	1,359	8,42	29	1,574	1,323	22,42
10	1,793	1,579	41,93	30	2,562	1,316	12,78
11	2,576	1,721	11,15	31	1,342	1,928	18,25
12	3,306	1,089	11,54	32	1,208	1,530	26,80
13	2,657	1,582	12,92	33	1,160	1,271	26,74
14	2,839	2,043	24,46	34	1,135	1,090	171,02
15	4,287	1,545	13,07	35	1,690	1,923	14,17
16	2,990	1,063	13,85	36	1,724	1,967	14,86
17	2,242	1,325	19	37	1,911	1,921	28,51
18	2,326	0,936	18,04	38	1,405	1,415	78,32
19	2,592	0,682	10,84	39	1,903	1,915	21,36
20	3,348	0,838	9,35	40	1,557	1,463	14,05

9. TEŞEKKÜR

İmmünoloji yolculuğuma başlarken esinlenme kaynağım olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum bilgi, birikim ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tezimin hazırlanması aşamasında da desteği, sabrı ve özverisi ile her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. H. Barbaros Oral**'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bizleri kendi danışmanlığını yaptığı öğrencilerinden ayırmayan, akademik ilerlememize katkı sağlamak için tüm benliği ile çalışan değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Ferah Budak**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam dahil olmak üzere, akademik yolculuğumda her zaman destek olan, fikirleri ve tecrübesiyle her zaman yönlendirici olan, çalışmalarımın gizli kahramanı **Figen Aymak**'a çok teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığımız, ürettiğimiz ve öğrendiğimiz **Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı**'nda bulunan tüm öğrenci, personel arkadaşlarıma ve bölüm hocalarıma, ayrıca tez çalışmama önemli yardımlarıyla katkı veren sevgili **Gözde Arslan** ve **A. Ceren Macunluoğlu**'na çok teşekkürler.

Bursadaki ailem gibi olan ve motivasyonumu her zaman üst düzeyde tutmamı sağlayan pozitif enerjilerini her zaman hissettiren değerli arkadaşlarım **Cansu Ercan** ve **Cansın Ercan** çiftine teşekkür ederim.

Lisans hayatımda kazandığım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocalarım **Ast. Prof. Dr. Sahra Kırmusaoğlu**, **Anıl Cebeci**, **Deniz Kanca** ve **Nur Ekimci**'ye minnettarım.

Son olarak tüm hayatım boyunca olduğu gibi aldığım her kararda arkamda duran, bu günlere gelmemde en büyük destekçilerim olan, akademik anlamda da her zaman danışabildiğim için kendimi şanslı hissettiğim canım ailem, annem **Sevim Karaca** babam **Mustafa Karaca**, ablam **Ebru Karaca**, ağabeyim **Ömer Karaca**'ya ve bize tükenmeyen bir enerji sağlayan yeğenim, miniğim **Kağan Karaca**'ya sonsuz teşekkürler.

COVID-19 ile mücadele ederken hayatını kaybeden tüm sağlık çalışanlarını saygıyla anıyorum.

Mert KARACA
23 / 12 / 2020

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mert KARACA
Doğum Yeri ve Tarihi : İZMİR- BORNOVA 28.12.1989
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lisans : Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Tarihi : 11.07.2017
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü,Tıp- İmmünoloji Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi : Tez aşamasında
İletişim (e-posta) : mertkaraca89@gmail.com
mertkaraca@uludag.edu.tr

Yayınları:

- 1- KARACA, M., ARSLAN, G., YÖYEN ERMİŞ, D., BAL, S. H. , KUNT ÖZASLAN, E., ÖZKALEMKAŞ, F., ... MACUNLUOĞLU, A. C. (2020). *COVID-19'DA IDO POLİMORFİZMİ IDO'NUN HASTALIK PATOGENEZİNDEKİ MUHTEMEL ROLÜ* . 25. ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ, Turkey (BİLDİRİ)
- 2- Acet Öztürk, N. A. , Ursavaş, A., Görek Dilektaşlı, A., Demirdöğen, E., Coşkun, N. F. , Ediger, D., ... Uzaslan, A. E. (2020). IL-21, COVID-19 Pnömonisi ile hospitalize edilen olgularda tanısal ve prognostik özellik gösteren bir biyobelirteç midir ? . Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği (TÜSAD) SOLUNUM 2020 Dijital Kongresi (BİLDİRİ)
- 3- YÖYEN ERMİŞ, D., ETGÜ, O., DOMBAZ, F., KARAÇAY, M., PINAR, İ. E. , KIZMAZ, M. A. , ... ŞİMŞEK, A.(2020). SARS-COV2 İLİŞKİLİ İMMÜN YANITTA PERİFERİK KAN MİYELOİD SERİ HÜCRELERİNİN OLGUNLAŞMA DÜZEYLERİ, REAKTİF OKSİJEN TÜRLEİ (ROS) VE NİTRİK OKSİT (NO) ÜRETME KAPASİTESİ . 25. ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ, Turkey (BİLDİRİ)
- 4-YÖYEN ERMİŞ, D., DOMBAZ, F., KIZMAZ, M. A. , ŞİMŞEK, A., ÇAĞAN, E., ASAN, A., ... KARAÇAY, M.(2020). *COVID-19 POZİTİF HASTALARDA MATÜR MONOSİT VE/VEYA NÖTROFİL ALT-TİPLERİ VE İMMATÜR PMN-MDSC, M-MDSC VE/VEYA E-MDSC-BENZERİ ALT-GRUPLARININ İNCELENMESİ VE HASTALIK DÜZEYİ İLE DEĞİŞİMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ* . 25. ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ, Turkey (BİLDİRİ)
- 5-D. YÖYEN ERMİŞ *Et Al.* , "COVID-19 POZİTİF HASTALARDAKİ GRANÜLOSİTİK- BENZERİ MİYELOİD KÖKENLİ BASKILAYICI HÜCRELERİN (PMN-MKBH) BASKILAMA KAPASİTE FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI," 25. ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ , Turkey, 2020 (BİLDİRİ)
- 6-YÖYEN ERMİŞ, D., ARSLAN, G., KARAÇAY, M., KARACA, M., DOMBAZ, F., ETGÜ, O., ... KIZMAZ, M. A. (2020). COVID-19 POZİTİF HASTALARIN FARKLIYAŞ GRUBU DAĞILIMDAKİ HÜCRE PROLİFERASYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ . 25. ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ, Turkey (BİLDİRİ)