

COVID-19 Hastalarında İmmün Yanıtta Rol Alan Hücrelerin İmmün Fenotipik Özellikleri

Immune Phenotypic Properties of Cells Involved in Immune Response in COVID-19 Patients

Cemil Gülüm* Şenay Balcı* Mehmet Burak Yavuz Çimen*
Gönül Aslan** Lülüfer Tamer*

* Mersin Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya, Mersin, Türkiye

** Mersin Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Mersin, Türkiye

Başvuru Tarihi: 12 Mart 2021

Kabul Tarihi: 30 Temmuz 2021

ÖZET

Amaç: Yaklaşık 70 yıldır varlığı bilinen koronavirüsler (CoV), 1930'larda hayvan patojenleri olarak kabul ediliyordu. 1960'lı yıllara gelindiğinde insan solunum yolu patojenleri olarak da tanımlandılar. O günden bugüne CoV kaynaklı Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS), Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) ve son olarak da Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırılan salgın hastalıklar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada SARS-CoV-2'ye karşı immün yanıtta rol alan konakçı hücrelerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya, 18-71 yaş arası toplam 54 COVID-19 hastası dahil edilmiştir. T hücreleri, B hücreleri, Naturel Killer (NK) hücreleri, monositler ve monosit-trombosit agregasyonunun immünofenotip analizleri FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, ABD) cihazı kullanılarak akış sitometrisi yöntemi ile ölçülmüştür.

Bulgular: Hastaların % 25,9'unda lenfosit sayısında azalış görülürken, % 74,1'inde lenfosit sayısı normal aralıktaydı. CD3⁺ T-lenfosit oranı % 73,96 ±7,96, CD4⁺CD3⁺ T-Helper (Th) ekspresyonu % 45,06±10,22, CD8⁺CD3⁺ T-sitotoksik (Tc) ekspresyonu ise % 25,72±8,58 olarak saptandı. CD4/CD8 oranı ise 1,89±0,85 olarak hesaplandı. CD19⁺ B lenfosit oranı % 9,82±4,45, CD56⁺ ekspresyonu % 14,38±6,28 olarak tespit edildi. Lenfosit HLA-DR oranı % 16,41±7,50, monositlerdeki HLA-DR oranı ise % 92,31 (76,24-95,53) olarak bulundu. Monositlerdeki CD61 ekspresyonu %26±13,95 idi. Monositlerdeki CD61 ile HLA-DR arasında negatif bir korelasyon saptandı (r= -0,347).

Sonuç: COVID-19 hastalarının T, B, NK ve monosit hücrelerinin immün fenotip özelliklerine baktığımız

Cemil Gülüm	: 0000-0002-0535-9966
Şenay Balcı	: 0000-0002-7498-604X
Mehmet Burak Yavuz Çimen	: 0000-0002-1274-3499
Gönül Aslan	: 0000-0002-4431-362
Lülüfer Tamer	: 0000-0002-0997-0260

Yazışma adresi: Cemil Gülüm
Mersin Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya,
Mersin, Türkiye
E-mail: cemilgulum@gmail.com

ABSTRACT

Objectives: Coronaviruses (CoV), known to exist for about 70 years, were considered animal pathogens in the 1930s. By the 1960s, they were also defined as human respiratory pathogens. Since then, CoV-related epidemic diseases called Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS) and finally Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) have emerged. In this study, it was aimed to determine the phenotypic characteristics of the host cells involved in the immune response against SARS-CoV-2.

Material and Methods: A total of 54 COVID-19 patients between the ages of 18-71 were included in this study. Immunophenotype analyzes of T cells, B cells, Natural Killer (NK) cells, monocytes and monocyte-platelet aggregation were measured by flow cytometry method using the FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) device.

Results: While a decrease in the lymphocyte count was observed in 25.9% of the patients, the lymphocyte count was within the normal range in 74.1%. CD3⁺ T-lymphocyte ratio 73.96 ± 7.96%, CD4⁺ CD3⁺ T-Helper (Th) expression 45.06 ± 10.22%, CD8⁺CD3⁺ T-cytotoxic (Tc) expression 25.72 ± 8% It was found to be 58. CD4 / CD8 ratio was calculated as 1.89 ± 0.85. CD19⁺ B lymphocyte ratio was 9.82 ± 4.45% and CD56⁺ expression was 14.38 ± 6.28%. The lymphocyte HLA-DR ratio was 16.41 ± 7.50%, and the HLA-DR ratio in monocytes was 92.31% (76.24-95.53). CD61 expression in monocytes was 26 ± 13.95%. A negative correlation was found between CD61 in monocytes and HLA-DR (r = -0.347).

Conclusion: The findings we obtained in our study, in which we looked at the immunophenotype characteristics of T, B, NK and monocyte cells of COVID-19 patients, do not seem to be significant. However, the CD61 increase in monocytes, the inverse correlation between HLA-DR in monocytes and CD61, was thought to be significant considering the thrombotic complications reported in COVID-19 patients.

Keywords: COVID-19, Coronavirus, SARS-CoV-2, immune response, Flow Cytometry, Lymphocyte subsets

GİRİŞ

Yaklaşık 70 yıldır varlığı bilinen koronavirüsler (CoV), 1930'larda hayvan patojenleri olarak kabul ediliyordu. 1960'lı yıllara gelindiğinde insan solunum yolu patojenleri olarak da tanımlandılar. Koronavirüsler, Coronaviridae ailesindeki Coronavirinae alt ailesinin ve Nidovirales takımının üyeleridir. Bu alt aile, alfacoronavirüs, betacoronavirüs, gamacoronavirüs ve deltacoronavirüs olmak üzere 4 cinse ayrılır. Şimdiye kadar 6 koronavirüsün insan hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir (1, 2).

2002 yılında Çin'de ortaya çıkan bir CoV, Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) olarak adlandırılan salgın hastalığa neden oldu. Bu salgının etkileri 9 ay sürdü ve yaklaşık 9000 kişinin enfekte olmasına ve 774 kişinin ölmesine neden oldu. 2012'de Suudi Arabistan Krallığı'nda ortaya çıkan diğer bir CoV, Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) olarak adlandırılan yeni bir salgına neden oldu. Solunum yolu hastalıkları salgınından

sorumlu olan bu CoV'ün Mayıs 2016 itibarıyla yaklaşık 2000 vakaya ve 700 ölüme neden olduğu bildirildi. Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde tespit edilen ve tüm dünyaya hızla yayılan yeni bir CoV daha tespit edildi. Bu yeni virüs Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırıldı. SARS-CoV-2 kaynaklı hastalık ise Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Koronavirüs Hastalığı (COVID-19) olarak adlandırıldı. Diğer CoV kaynaklı hastalıklar gibi solunum yolu hastalığı olan COVID-19, WHO tarafından yayılma hızı ve ölüm oranı nedeniyle 11 Mart 2020'de pandemi olarak ilan edildi (1, 2, 3).

Koronavirüsler, küre şeklinde, çapı 80–220 nm olan, zarflı ve tek sarmallı RNA virüsleridir. Elektron mikroskobu altında bakıldığında virüsün yüzeyinde 20 nm uzunluğunda güneşin koronasına benzeyen taç benzeri sivri uçlar olduğu görülür. Bu çıkıntılar nedeniyle de CoV adı verilmektedir. Virüs zarfı dört yapısal bileşen içerir: başak (S), zarf (E),

zar (M) ve nüelokapsid (N) proteini. S proteini, virüsün konağın bağışıklık sisteminden kaçınmasında ve konağa tutunup hücre içine girmesinde kilit rol oynar. Yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2'nin S proteini vasıtasıyla anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlandığı gösterilmiştir. Bu nedenle immünolojik yanıt ve aşı tasarımı açısından büyük ilgi görmektedir (1, 4).

COVID-19 hastalarında diğer koronavirüs kaynaklı SARS, MERS hastalarında görülen septomlara benzer olarak, ortalama 3-7 günlük bir kuluçka döneminden sonra genellikle yorgunluk, ateş, kuru öksürük, miyalji ve nefes darlığı görülür. Ayrıca sık olmamakla birlikte burun tıkanıklığı veya akıntısı, baş ağrısı, boğaz ağrısı görülebilir. Bazı hastalarda kusma ve ishal olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte her geçen gün hastalıkla ilgili yeni septomlar ve bulgular bildirilmektedir (2).

Koronavirüse karşı savunmanın ilk adımında doğal bağışıklık sistemi aktif rol oynar. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, ajana özgüllük göstermeyen ve uyardan dakikalar sonra harekete geçen bir tür erken savunma sistemidir. Doğal bağışıklık hücreleri tarafından virüsün lipid, protein ve nükleik asit formundaki spesifik bölgelerinin, tanınmasıyla sinyal iletim mekanizması etkinleştirilir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi savunmasında: makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler (DC) ve NK hücreleri gibi hücresel elementler, sitokinler, kemokinler gibi çözülmüş moleküller, C reaktif protein gibi akut faz proteinleri ve komplemanlar yer alır. Doğuştan gelen bağışıklık, bir yandan ajanı ortadan kaldırmaya çalışırken diğer yandan da kazanılmış bağışıklığı başlatır. Ajana spesifik olan ve gün cinsinden ifade edilen belirli bir hazırlık süresi gerektiren kazanılmış bağışıklık, esas olarak T lenfositleri kullanılır. CD4⁺ T-Helper (Th) ve CD8⁺ sitotoksik-T (Tc) hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler, bağışıklık sistemi işlevinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. Doğal bağışıklık sistemi hücreleri tarafından, CD4⁺ Th lenfositlerine antijen sunulması ve Th tarafından da B hücreleri ve

CD8⁺ Tc hücrelerinin uyarılmasıyla spesifik yanıt aktive olur. Tc; perforin ve granzim gibi enzimlerle "ozmotik lizis" ve "apoptoz" yoluyla hedef hücre üzerinde öldürücü etki sağlarken, B hücreleri de plazma hücrelerine farklılaşır. Plazma hücreleri, antijene spesifik immünoglobulin (antikor) üretir (5, 6).

Monositler organizmaya giren yabancı ajanlara karşı savunmanın diğer önemli bir elemanıdır. Monositler, T hücrelerine antijen sunumundan sorumlu olan insan lökosit antijen-DR (HLA-DR) moleküllerini eksprese eder, böylece antijenleri adaptif bağışıklık sistemi hücrelerine sunar. Monositlerden salınan sitokinler, diğer hücrelere verilen tepkilere aracılık eder ve kompleman ve pıhtılaşma kaskadlarını aktive eder (7, 8).

Son yıllarda trombositlerin klasik rollerinin dışında immün sistem açısından önemli görevler üstlendikleri tartışılmaktadır. Yüzeylerinde Toll-like receptors (TLRs) gibi patojeni tanıyan reseptörlerin varlığı trombositlerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkisinin kanıtı olarak kabul edilebilir. Bir çok çalışmada da, trombosit aktivasyonu ve trombosit-lökosit etkileşimlerinin, HIV ve grip dahil viral enfeksiyonların patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (9, 10, 11).

Kuşkusuz, SARS-CoV-2'ye karşı bağışıklık tepkisi ve konakçı özelliklerinin hastalığın şiddeti, antikor tepkileri ve bağışıklık patogenezi ile ilişkisi, klinik takip, tedavi ve etkili bir aşının geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Bu çalışmada, COVID-19 pozitif hastalarda patogenez, tanı ve tedavi uygulamalarına katkı sağlayabilecek belirteçler sağlamak amacıyla SARS-CoV-2'ye karşı immün yanıtta rol alan konakçı hücrelerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmaya, Mersin Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran ve PCR (COVID-19 RT-qPCR Detection Kit, Bio-Speedy Bioeks Ar-Ge Teknolojileri Ltd. Şti. İstanbul / Türkiye) analizine göre COVID-19 pozitif olan bireylerden 18-71 yaş arası toplam 54 hasta rastgele seçilerek dahil edildi.

Bu çalışma Helsinki Bildirgesi özelliklerine göre yapılmış ve Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 19/08/2020 tarih ve 2020/595 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren 2 mL'lik tüplere alınan venöz kan örnekleri 8 saat içinde çalışıldı. Demografik veriler ve tam kan sayımı dahil laboratuvar bulguları Mersin Üniversitesi Hastanesi Biyokimya laboratuvar kayıtlarından toplandı. Lökosit alt grupları, akış sitometrisi ile taze kan örneklerinden analiz edildi. T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, monositler ve monosit-trombosit agregasyonunun immünofenotip analizleri için, CD3 (BD Biosciences, ABD), CD4 (BD Biosciences, ABD), CD8 (BD Biosciences, ABD), CD19 (BD Biosciences, ABD), CD56 (BD Biosciences, ABD), CD13 (BD Biosciences, ABD), CD14 (BD Biosciences, ABD), CD61 (BD Biosciences, ABD) ve HLA-DR'nin (BD Biosciences, ABD) sıklığı ve sayısı, FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, ABD) cihazı kullanılarak akış sitometri yöntemi ile ölçüldü.

Üreticinin tavsiye ettiği miktarda antikor 5 mL'lik polietilen tüpe eklendi. 100 µl EDTA'lı tam kan tüpe eklendi ve karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Kırmızı kan hücreleri (RBC), üreticinin önerdiği protokol esas alınarak RBC Lysis Solution kit (BD Biosciences, ABD) ile lyse edildi. 1.300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant alındı. Çökelti 2 ml PBS ile yıkandı. Daha sonra çökeltiye 500 µl PBS ilave edildi. Akış sitometri cihazında, her numune için 20.000 olay sayıldı ve sonuçlar CellQuest Pro programı kullanılarak analiz edildi. T hücreleri (CD3, CD4, CD8), B hücreleri (CD19), NK hücreleri (CD56) dahil olmak üzere lenfosit alt popülasyonlarının

sıklığını ve sayısını belirlemek için lenfoid geçit uygulandı. CD14, CD13, CD4 ve CD61 sıklığını ve sayısını belirlemek için monosit kapısı uygulandı. HLA-DR'nin sıklığını ve sayısını belirlemek için hem monosit kapısı hem de lenfosit kapısı uygulandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS Statistics (IBM Corporation, Somers, NY) yazılımının 17. sürülümü ile yapıldı. Kategorik değişkenler frekans tabloları ile yorumlandı. Sürekli değişkenlerde aykırı değer olup olmadığı Box-Plot grafik yöntemi ile belirlenerek dışlandı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testi kullanılarak belirlendi. Sürekli değişkenler, dağılımların normalliğine bağlı olarak mean, SD veya median, çeyrekler arası aralık (25.-75. Persentiller) olarak ifade edildi. Parametreler arasında ilişki olup olmadığı dağılımların normalliğine bağlı olarak Pearson korelasyon veya Spearman korelasyon testleri ile incelendi. P < 0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya yaş ortalaması 41 olan 54 COVID-19 hastası dahil edildi. 32 hasta (% 59,3) erkek, 22 hasta (% 40,7) kadındı. Hastalara ait demografik bulgular Tablo 1 de verildi.

Lökosit alt gruplarında; lenfositler 14 (% 25,9) hastada normal aralığın altında, 40 (% 74,1) hastada normal aralıkta, monositler 33 (% 61,1) hastada normal aralıkta ve 21 (% 38,9) hastada normal aralığın üzerindeydi, nötrofiller 3 (% 5,6) hastada normal aralığın altında, 45 (% 83,3) hastada normal aralıkta ve 6 (% 11,1) hastada normal aralığın üzerindeydi (Tablo 2).

Tablo 1. Hastalara ait Demografik bulgular
Table 1. Demographic findings of the patients

	N / %	Yaş Mean	SD	Min.	Max.
Erkek	32 / % 59,3	39	14	18	70
Kadın	22 / % 40,7	44	14	21	71
Toplam	54 / % 100	41	14	18	71

n: Örnek sayısı

Tablo 2. COVID-19 hastalarına ait immün fenotipleme bulguları
Table 2. Immune phenotyping findings of COVID-19 patients

	n	Mean/Median	SD	Percentiles		Referans %	Düşük %	Normal %	Yüksek %
				25	75				
Lenfosit	54	26,8	10,75	---	---	20,5-51,1	25,9	74,1	---
Monosit	54	8,6	3,5	---	---	1,7-9,3	---	61,1	38,9
Granülosit	54	59,16	11,7	---	---	42,2-75,2	5,6	83,3	11,1
CD3 (Lenfosit)	54	73,96	7,96	---	---	52,30-84,64	---	90,7	9,3
CD4 (Lenfosit)	54	45,06	10,22	---	---	30,00-60,34	5,6	87	7,4
CD8 (Lenfosit)	53	25,72	8,58	---	---	17,76-39,94	18,9	77,3	3,8
CD4/CD8 Oranı	50	1,89	0,85	---	---	1,06-2,76	16	68	16
CD19 (Lenfosit)	54	9,82	4,45	---	---	3,90-20,79	5,6	94,4	---
CD56 (Lenfosit)	52	14,38	6,28	---	---	0,10-13,20	---	36,5	63,5
HLA-DR (Lenfosit)	52	16,41	7,5	---	---	---	---	---	---
CD61 (Monosit)	54	26	13,95	---	---	---	---	---	---
CD14 (Monosit)	51	93,81	25,89	---	---	---	---	---	---
CD13 (Monosit)	49	97,95	---	96,42	99,18	---	---	---	---
HLA-DR (Monosit)	47	92,31	---	76,24	95,53	---	---	---	---

n: Örnek sayısı

Lenfositlerdeki CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ ve CD56⁺ ekspresyonları incelendi. Hasta popülasyonumuzdaki lenfosit yüzdesi % 26,80 idi. CD3⁺ % 73,96±7,96, CD19⁺ % 9,82±4,45, CD56⁺ % 14,22±6,28, CD4⁺ % 45,06±10,22, CD8⁺ % 25,72±8,58 olarak bulundu. CD4/CD8 oranı 1,89±0,85 olarak saptandı (Tablo 2).

HLA-DR'nin hem lenfositlerdeki hem de monositlerdeki ekspresyonu incelendi. Hasta popülasyonumuzdaki monosit yüzdesi % 8,60±3,5 idi. Lenfositlerde HLADR ekspresyonu % 16,41±7,5 ve monositlerde HLADR ekspresyonu % 92,31 bulundu (Tablo 2).

Trombosit aktivasyonu ve trombosit-monosit etkileşimleri açısından monositlerdeki CD61⁺ hücre popülasyonu incelendi. Monositlerde CD61 ekspresyonu % 26±13,95 bulundu (Tablo 2).

Parametreler arasında ilişki olup olmadığı korelasyon testleri ile incelendi. Birbirine ilişkili parametreler, ilişkinin yönü ve kuvveti Tablo 3'te verildi.

TARTIŞMA

COVID-19 hastalarında, immün yanıtta yer alan hücrelerin immün fenotipik özelliklerini araştırdığımız çalışmamızda, hastaların % 25,9'unda lenfosit sayısında azalma görüldüğüken, hastaların % 74,1'inde lenfosit sayısı normal aralıktaydı. Cui ve arkadaşlarının (12) SARS üzerine yaptığı çalışmada hastaların % 84'ünde lenfopeni olduğu rapor edilmiştir. SARS-CoV-2 üzerine yapılan diğer araştırmalarda ise COVID-19 hastalarında, hastalığın şiddetine bağlı olarak, lenfosit sayısında azalış olduğu raporlanmıştır. Wang ve arkadaşları (6) hastaların % 72'inde lenfopeni raporlarken, Kazancıoğlu ve arkadaşları (13) lenfosit yüzdesinin klinik şiddeti fazla olan hastalarda sağlıklı, asemptomatik ve düşük şiddetli hastalara göre anlamlı derecede düşük olduğunu raporlamıştır (sırasıyla p <0.001, p <0.001, p <0.001). Ganji ve arkadaşları (14) da yaptıkları çalışmada, lenfosit sayısını, COVID-19 hastalarında önemli ölçüde azalmış olarak saptamışlardır (p <0.05).

Tablo 3. Değerlendirilen parametreler arasındaki korelasyon ilişkisi
Table 3. Correlation relationship between evaluated parameters

Parametre		r	p
CD3 (Lenfosit)	CD19 (Lenfosit)	-,323*	0,017
CD8 (Lenfosit)	CD19 (Lenfosit)	-,278*	0,044
L-HLADR	CD19 (Lenfosit)	,290*	0,037
CD3 (Lenfosit)	CD8 (Lenfosit)	,339*	0,013
CD4(Lenfosit)	Lenfosit	,278*	0,042
CD4 (Lenfosit)	Granülosit	-,340*	0,012
CD13 (Monosit)	CD56 (Lenfosit)	,311*	0,031
CD13 (Monosit)	HLA DR (Monosit)	0,304	0,050
HLA DR (Monosit)	CD61 (Monosit)	-,347*	0,017
HLA DR (Monosit)	CD14 (Monosit)	,381*	0,011
CD4 (Lenfosit)	HLA-DR (Lenfosit)	-,289*	0,038
CD61 (Monosit)	Cinsiyet	-,283*	0,038
Granülosit	HLA-DR (Lenfosit)	,352*	0,011
Lenfosit	HLA-DR (Lenfosit)	-,313*	0,024
CD3 (Lenfosit)	CD4 (Lenfosit)	,411**	0,002
CD3 (Lenfosit)	CD56 (Lenfosit)	-,517**	0,000
CD3 (Lenfosit)	HLA-DR (Lenfosit)	-,411**	0,002
CD4 (Lenfosit)	CD56 (Lenfosit)	-,494**	0,000
HLA-DR (Monosit)	HLA-DR (Lenfosit)	,651**	0,000
CD4 (Lenfosit)	CD8 (Lenfosit)	-,623**	0,000
CD4 (Lenfosit)	CD4/CD8 Oranı	,792**	0,000
CD4/CD8 Oranı	CD8 (Lenfosit)	-,878**	0,000
Granülosit	Lenfosit	-,935**	0,000

r: Korelasyon katsayısı; p: Gruplararası anlamlılık derecesi

Hastalarımızdaki T-lenfosit oranına baktığımızda, hasta lenfositlerindeki CD3⁺ T-lenfosit oranı % 73,96 ±7,96 idi. Yaman ve arkadaşlarının (15) sağlıklı yetişkin bireyler üzerinde yaptıkları çalışmada lenfositlerdeki T-lenfosit oranınının %95 güven aralığında (52,30-84,64) olduğu rapor edilmiştir. Hastalarımızın %90,7'inde CD3⁺ T-lenfosit oranları bu aralıkta, % 9,3'ü daha yüksek idi. Cui ve arkadaşları (12) SARS hastalarında T-lenfosit oranınının 61,15±13,22 olduğunu ve kontrol grubuna (73,22±6,0) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğunu (p<0,01) tespit etmişlerdir. Kazancıoğlu ve arkadaşları (13) T-lenfosit yüzdesinin klinik şiddeti fazla olan hastalarda sağlıklı, asemptomatik ve düşük şiddetli hastalara göre anlamlı derecede düşük olduğunu raporlamıştır (sırasıyla p <0.001, p <0.001, p <0.001). Ayrıca T-lenfositlerin yaş ile anlamlı bir korelasyona sahip olduğunu (r=-0.406, p < 0.001) tespit etmişlerdir. Diao ve arkadaşları (16) yaptıkları retrospektif çalışmada vakaların % 75,75'inde T-lenfositlerde düşüş olduğunu, yoğun bakım hastalarında bu düşüşün önemli ölçüde fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Diao ve arkadaşları ayrıca şiddetli ve kritik hastaların yanı sıra vefat eden hasta-

larda da hafif ve orta gruptaki hastalara nazaran T-lenfositlerde önemli ölçüde azalış olduğunu rapor etmişlerdir.

Hastalarımızda, lenfositlerdeki CD4⁺CD3⁺ ekspresyonu % 45,06±10,22, CD8⁺CD3⁺ ekspresyonu ise % 25,72±8,58 idi. CD4/CD8 oranı ise 1,89±0,85 olarak hesaplandı. Yaman ve arkadaşlarının (15) sağlıklı yetişkin bireyler üzerinde yaptıkları çalışmada, %95 güven aralığında, lenfositlerdeki CD4⁺CD3⁺ oranınının 30,00-60,34 aralığında, CD8⁺CD3⁺ oranınının 17,76-39,94 aralığında, CD4/CD8 oranınının ise 1,06-2,76 aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. Hastalarımızın %5,6'sı düşük, %83,3'ü normal, %11,1'i ise yüksek CD4⁺ T-lenfositte sahip iken, %18,9 düşük, %77,3 normal, %3,8 yüksek CD8⁺ T-lenfositte sahip idi. CD4/CD8 oranı hastaların % 68'inde normal aralıktaydı. Cui ve arkadaşları (12) SARS hastalarında CD4⁺ hücre oranınının 27,90±7,49, olduğunu ve kontrol grubuna (38,52±4,49) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğunu (p<0,01), yine benzer olarak CD8⁺ hücre oranınının 28,27±9,01, olduğunu ve kontrol grubuna (33,81±7,13) kıyasla CD8⁺ Tc hücre oranınınında da istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş oldu-

ğunu ($p < 0,01$) raporlamışlardır. Kazancıoğlu ve arkadaşları (13) şiddetli gruptaki hastalarda $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinde sağlıklı bireyler, asemptomatik ve şiddetli olmayan gruplara göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$), $CD4/CD8$ oranının gruplar arasında istatistiksel olarak farklı olmadığını ($p > 0,05$) raporlamışlardır. Ayrıca $CD4^+$ T-lenfositlerin yaş ile anlamlı bir korelasyona sahip olduğunu ($r = -0,372$, $p < 0,001$) tespit etmişlerdir.

B lenfositleri belirlemek için $CD19$ ekspresyonuna bakıldı ve $CD19^+$ B lenfosit oranının $9,82 \pm 4,45$ olduğu tespit edildi. Yaman ve arkadaşlarının (15) sağlıklı yetişkin bireyler üzerinde yaptıkları çalışmada, %95 güven aralığında, lenfositlerdeki $CD19$ ekspresyon oranının 3,90-20,79 aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. Hastalarımızın %94,4'ü bu aralıkta idi. Cui ve arkadaşları (12) SARS hastalarında $CD19^+$ B hücre oranının $16,56 \pm 4,55$, olduğunu ve kontrol grubuna ($12,25 \pm 3,65$) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğunu ($p < 0,01$) raporlamışlardır. Kazancıoğlu ve arkadaşları (13) şiddetli gruptaki hastalarda $CD19^+$ B hücrelerinde sağlıklı bireyler, asemptomatik ve şiddetli olmayan gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını ancak şiddetli grupta anlamlı olarak daha düşük bulunduğunu ($p < 0,001$) raporlamışlardır. Ayrıca B-Lenfositlerin yaş ile anlamlı bir korelasyona sahip olduğunu ($r = -0,278$, $p < 0,008$) tespit etmişlerdir. Liu ve arkadaşları (17) hafif, şiddetli ve kritik COVID-19 hastaları ile yaptıkları çalışmada hastaların % 25,32'inde, referans değere göre, B hücre düşüklüğü tespit etmişler ancak bu düşüklüğün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir.

Hastalarımızda $CD56^+$ ekspresyonu % $14,38 \pm 6,28$ olarak tespit edildi. Yaman ve arkadaşlarının (15) sağlıklı yetişkin bireyler üzerinde yaptıkları çalışmada, $CD56$ ekspresyonunun % 7,15 olduğu %95 güven aralığında, lenfositlerdeki $CD56$ oranının (0,10-13,20) aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. Hastalarımızın %36,5'i normal aralıkta iken,

%63,5'i ise yüksek idi. Cui ve arkadaşları (12) SARS hastalarında NK hücre oranının $17,33 \pm 4,52$ olduğunu ve kontrol grubu ($17,90 \pm 7,51$) ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ($p > 0,05$) raporlamışlardır. Kazancıoğlu ve arkadaşları (13) şiddetli gruptaki hastaların NK hücrelerinde sağlıklı bireyler, asemptomatik ve şiddetli olmayan gruplara göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$), asemptomatik grupta sağlıklı bireylere göre daha yüksek oranda NK hücresi olduğunu ($p < 0,003$) rapor etmişlerdir. Liu ve arkadaşları (17) hafif, şiddetli ve kritik COVID-19 hastaları ile yaptıkları çalışmada hastaların % 40,26'inde, referans değere göre, NK hücrelerinde azalış tespit etmişler ancak bu düşüklüğün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir.

Monosit ve Lenfositlerdeki HLA-DR ekspresyonuna baktığımızda lenfosit HLA-DR oranı % $16,41 \pm 7,50$, monositlerdeki HLA-DR oranı % 92,31 (76,24-95,53) olarak bulundu. Spinetti ve arkadaşları (18) serviste yatan hastalarla yoğun bakım da yatan hastaların monosit HLA-DR ekspresyonunu karşılaştırmışlar ve yoğun bakımda yatan hastalarda monosit HLA-DR ekspresyonunun anlamlı düşük olduğunu ($p < 0,002$) tespit etmişlerdir. Carissimo ve arkadaşları (19) ise monosit aktivasyonunu incelemişler, monositlerdeki HLA-DR ekspresyonunu hasta bireylerde sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır ($p < 0,001$). Song ve arkadaşları (20) T-lenfosit alt gruplarındaki HLA-DR ekspresyonunu incelemişler, septomları şiddetli olan COVID-19 hastalarının $CD8^+$ T-lenfoilerindeki HLA-DR ekspresyonunun septomları hafif olan hastalara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu ($p < 0,0372$), $CD4^+$ T-lenfoilerindeki HLA-DR ekspresyonunun ise istatistiksel olarak hiçbir fark göstermediğini tespit etmişlerdir. Song ve arkadaşları ayrıca $CD8^+$ T-lenfoilerindeki HLA-DR ekspresyonunun hastalık başlangıcından sonraki süre ile pozitif korelasyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada ise lenfositlerdeki HLA-DR ile $CD8$ arasında anlamlı bir ilişki gözlenmezken (p

<0.914) HLA-DR ile CD4 arasında negatif bir korelasyon gözlemlendi ($r = -0,289$). Monosit belirteçleri olan CD13 ve CD14 ile HLA-DR arasında ise pozitif bir korelasyon tespit edildi (sırasıyla $r = 0,304$, $r = 0,381$).

Trombosit-monosit etkileşimine baktığımızda hastalarımızda monositler üzerinde $26 \pm 13,95$ oranında CD61 ekspresyonunun olduğu tespit edildi. Ayrıca monositlerdeki CD61 ile HLA-DR arasında negatif bir korelasyon söz konusu idi ($r = -0,347$). Yaptığımız literatür taramasında COVID-19 hastalarında monosit CD61 ekspresyonu ile ilgili flow sitometrik immün fenotipleme çalışmasına rastlanmadı. Manne ve arkadaşları (21) ile Hotz ve arkadaşlarının (10) trombositlerin COVID-19 hastalarında görülen trombotik komplikasyonlar ile ilgili yapmış oldukları çalışmalar trombosit hiperaktivitesinin COVID-19'da görülen koagülopatiye katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Manne ve arkadaşları sağlıklı bireylerle COVID-19 hastalarındaki monosit-platelet agregasyonunu $CD14^+CD41^+$ ile göstermişler ve hastalarda monosit-platelet agregasyonunun anlamlı derecede yüksek ($p < 0,001$) olduğunu tespit etmişlerdir. Hotz ve arkadaşları ise orta ve şiddetli gruptaki bireylerle kontrol grubundaki bireylerin $CD14^+CD41^+$ pozitifliğini kıyaslamışlar kontrol grubuyla orta şid-

detli gruptaki bireyler arasında fark olmadığını şiddetli gruptaki bireylerle kontrol ve ılımlı gruptaki bireyler arasında anlamlı bir yükseklik olduğunu ($p < 0,05$) tespit etmişlerdir.

SONUÇ

COVID-19 hastalarının T, B, NK ve monositlerin immün fenotip özelliklerine baktığımızda, hasta popülasyonunun klinik bulgulara göre gruplandırılmamış olması çalışmamızın sınırlamalarını oluşturmaktadır. Sonuçların referans değerler ile kıyaslanması nedeniyle bu sınırlılık eksiklik olarak düşünülmemiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz T, B lenfosit ve NK hücrelerine ait immün fenotipik bulgular anlamlı görünmemektedir. $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositlerin, NK hücrelerinin, aktif monosit artışının konak organizmanın viral enfeksiyona vermiş olduğu metabolik yanıt dolayısıyla patogenez ile ilişkili olduğu değerlendirilmektedir. Ayrıca hastaların klinik şiddetinin belirlenmemiş olmasına rağmen literatür bulgularına dayanarak hastalarımızın %74'ünün aseptomatik yada klinik şiddeti az vakalardan oluştuğu da söylenebilir. Bununla birlikte monositlerdeki CD61 artışının, monositlerdeki HLA-DR ile CD61 arasındaki ters korelasyonun, COVID-19 hastalarında bildirilen trombotik komplikasyonlar dikkate alındığında anlamlı olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Poutanen SM. Human Coronaviruses. Long SS, Prober CG, Fischer M. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 5 st ed. Elsevier;2018. P.1148-1152. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00222-X>
2. Park SE. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome - coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). Clinical and Experimental Pediatrics. April 2020;63(4):119-124. DOI: <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00493>
3. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. Journal of Pharmaceutical Analysis. April 2020; 10(2):102-108. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jpaha.2020.03.001>
4. Monto AS, Cowling BJ, Peiris JSM. Coronaviruses. In: Kaslow R, Stanberry L, Le Duc J, eds. Viral Infections of Humans. 1 st ed. Boston: Springer; 2014. p. 199-223. DOI:https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8_10
5. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. June 2001;357(9270):1777-89. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
6. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. The Journal of Infectious Diseases. June 2020;221(11):1762-1769. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa150>
7. Kanakoudi-Tsakalidou F, Debonera F, Drossou-Agakidou V, Sarafidis K, Tzimouli V, Taparkou A, et al. Flow cytometric measurement of HLA-DR expression on circulating monocytes in healthy and sick neonates using monocyte negative selection. Clin Exp Immunol. March 2001;123(3):402-7. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01471.x>
8. Palojarvi A, Petajä J, Siitonen S, Janer C, Andersson S. Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. Pediatr Research. December 2013; 73: 469-475. DOI:<https://doi.org/10.1038/pr.2012.199>

9. Bongiovanni D, Klug M, Lazareva O, Weidlich S, Biasi M, Ursu M, et al. SARS-CoV-2 infection is associated with a pro-thrombotic platelet phenotype. *Cell Death & Disease*. January 2021;12, 50. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03333-9>
10. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, Teixeira L, Barreto EA, Pão CRR, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood*. September 2020; 136(11):1330-1341. DOI:<https://doi.org/10.1182/blood.2020007252> .
11. Li C, Li J, Li Y, Lang S, Yougbare I, Zhu G, et al. Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Advances Hematol*. 2012;2012. DOI:<https://doi.org/10.1155/2012/384685>
12. Cui W, Fan Y, Wu W, Zhang F, Wang J, Ni A. Expression of Lymphocytes and Lymphocyte Subsets in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. September 2003;37(6):857-859. DOI: <https://doi.org/10.1086/378587>
13. Kazancıoğlu S, Yılmaz FM, Bastuğ A, Sakallı A, Ozbay BO, Buyuktarakci C, et al. Lymphocyte Subset Alteration and Monocyte CD4 Expression Reduction in Patients with Severe COVID-19. *Viral Immunol*. November 2020. <https://doi.org/10.1089/vim.2020.0166>
14. Ganji A, Farahani I, Khansarinejad B, Ghazavi A, Mosayebi G. Increased expression of CD8 marker on T-cells in COVID-19 patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. July 2020;83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2020.102437>
15. Yaman A, Çetiner S, Kibar F, Taşova Y, Şeydaoğlu G, Dündar İH. Reference Ranges of Lymphocyte Subsets of Healthy Adults in Turkey. *Med Princ Pract*. 2005;14:189-193. DOI:<https://doi.org/10.1159/000084638>
16. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in Immunology*. May 2020; 11:827. DOI:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
17. Liu R, Wang Y, Li J, Han H, Xia Z, Liu F, et al. Decreased T cell populations contribute to the increased severity of COVID-19. *Clinica Chimica Acta*. September 2020;508:110-114. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.019>
18. Spinetti T, Hirzel C, Fux M, Walti L, Schober P, Stueber F, et al. Reduced Monocytic Human Leukocyte Antigen-DR Expression Indicates Immunosuppression in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesthesia & Analgesia*. October 2020:131(4):993-999. DOI:<https://doi.org/10.1213/ane.0000000000005044>
19. Carissimo G, Xu W, Kwok I, Abdad MY, Chan Y, Fong S, et al. Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nature Communications*. October 2020:11,5243. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19080-6>
20. Song JW, Zhang C, Fan X, Meng F, Xu Z, Xia P, et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nature Communications*. July 2020:11,3410. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17240-2>
21. Manne BK, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood*. September 2020:136(11): 1317-1329. DOI:<https://doi.org/10.1182/blood.2020007214>