



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



**COVID-19 POZİTİF HASTALARDA G-MDSC BENZERİ
ALT GRUPLARDAKİ FENOTİPİK VE FONKSİYONEL
FARKLILIKLARIN ARAŞTIRILMASI**

FATMA DOMBAZ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2022





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



**COVID-19 POZİTİF HASTALARDA G-MDSC BENZERİ ALT
GRUPLARDAKİ FENOTİPİK VE FONKSİYONEL
FARKLILIKLARIN ARAŞTIRILMASI**

FATMA DOMBAZ

0000-0001-7288-3250

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof.Dr. Haluk Barbaros Oral

120S653- TUBİTAK

BURSA-2022

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak sunduğum “COVID-19 POZİTİF HASTALARDA G-MDSC BENZERİ ALT GRUPLARDAKİ FENOTİPİK ve FONKSİYONEL FARKLILIKLARIN ARAŞTIRILMASI” 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.

Fatma DOMBAZ

14.01.2022

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

14/01/2022

Adı Soyadı: Fatma DOMBAZ

Anabilim Dalı: Tıp - İmmünoloji

Tez Konusu: COVID-19 POZİTİF HASTALARDA G-MDSC BENZERİ ALT

GRUPLARDAKİ FENOTİPİK VE FONKSİYONEL FARKLILIKLARIN ARAŞTIRILMASI

ÖZELLİKLER

UYGUNDUR

UYGUN DEĞİLDİR

ACIKLAMA

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: Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Hematopoez.....	2
2.2. Miyelopoez	5
2.2.1 Miyelopoezde Morfolojik Değişimler	7
2.2.2 Miyelopoezde Sitokin Düzenlenmesi	11
2.2.3 Miyelopoezin Moleküler Biyolojisi.....	12
2.3 Nötrofil Gelişimi ve Özellikleri.....	15
2.4 Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücrelerin (Myeloid-Derived Suppressor Cell, MDSC) Gelişimi ve Özellikleri	18
2.5 Anti Viral İmmün Yanıtlar	20
2.6 Koronavirüsler ve Zaman İçindeki Gelişimleri	22
2.7 SARS-CoV-2	24
2.7.1 SARS-CoV-2 Yapısı ve Mutasyonları	25
2.7.2 SARS-CoV-2 İmmunopatogenezi.....	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	34
3.1 Çalışmada Kullanılan Maddeler	34
3.2 Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler.....	35
3.3. Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması.....	36
3.4 Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) İzolasyonu	37
3.5 Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücrelerin ve İnflamatuar Miyeloid Hücrelerin İmmünofenotiplendirmesi	38
3.6 Miyeloid Hücre Alt Grupların Saflaştırılması	40
3.6.1 Manyetik Aktive Hücre Ayrımlama (MACS) Yöntemi.....	40
3.6.2 Eritrosit Patlatma Yöntemi	42
3.6.3 Floresan Aktive Hücre Saflaştırma (FACS) Yöntemi	43
3.7 T Hücre Çoğalma ve Aktivasyon Analizleri	44
3.7.1 Karboksi Floresan Süksinimidil Ester (CFSE) ile PBMC hücrelerin işaretlenmesi	44
3.7.2 Saflaştırılmış CD66b+ Hücreler ile PBMC'lerin Ko-Kültürü	45
3.7.3 T Hücre Aktivasyon Analizi	46
3.8 ROS ve NO Üretim Analizi.....	48
3.9 G-MDSC Benzeri Alt-gruplarının İmmünofenotipik Farklılıklarının Morfolojik Olarak Doğrulanması	49
3.10 Enzim İlişkili İmmün Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) Yöntemi ile İmmün Yanıt Yönünün Belirlenmesi	50
3.11 İstatistiksel Analiz.....	53
4. BULGULAR	54
4.1 Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre Alt-Gruplarının Sağlıklı ve Hasta	

Bireylerdeki Dağılımı	54
4.2 Monositik Hücre Alt-gruplarının Sağlıklı ve Hasta Bireylerdeki Dağılımı.....	61
4.3 CD66b Belirtecini Farklı Düzeylerde Taşıyan Nötrofilik Alt-grupların Fenotipik ve Fonksiyonel Farklılıkları.....	73
4.4 1.077g/mL Ficoll Fazı ve Eritrosit Fazındaki CD66b+ Hücrelerin CD80 CD86, PD-L1, PD-L2, HLA-DR, CD117, CD10, CD63, CD62L, CD114 ve LOX-1 Belirteçlerini Eksprese Etme Düzeyleri.....	75
4.5 G-MDSC ve Matür Nötrofillerin T Hücre Yanıtları Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	85
4.6 ROS ve NO Üretiminin Belirlenmesi	115
4.7 İmmünojenotipik Farklılıkların Morfolojik Sonuçlar ile Doğrulanması ...	116
4.8 Enzim İlişkili İmmün Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) Yöntemi İle G-MDSC Benzeri İmmatür Nötrofiller veya Matür Nötrofillerin İmmün Yanıt Yönünün Belirlenmesi	117
4.9 COVID-19+ ve Sağlıklı Bireylerdeki Tam Kan ve Biyokimya Klinik Parametreleri; Yaşa, Klinik Duruma, PCR Gününe, Klinik Semptom Gününe Göre Farklılıkları ve Bu Parametrelerin İmmünojenotipik Veriler ile İlişkisi	125
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	138
6. KAYNAKLAR.....	149
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	165
8. EKLER.....	168
9. TEŞEKKÜR.....	170
10. ÖZGEÇMİŞ	171

TÜRKÇE ÖZET

Miyeloid hücreler, doğuştan gelen immün sistemin hücreleri olup, virüslere karşı verilen immün yanıtların başlamasında ve sonlanmasında görev alırlar. Özellikle, enfeksiyon sonrası immün regülasyonun sağlanmasında oldukça kritik rolleri olup, hemoastazın sağlanmasında görev alırlar. Efektif immün yanıtın oluşmasıyla beraber viral replikasyon kontrol edilerek, yüksek doku hasarı ve sitokin fırtınası önlenilmektedir. Böylelikle, immünopatoloji sınırlandırılmakta ve iyi bir klinik tablo ile sonuçlanmaktadır.

İlgili tez kapsamında, miyeloid kökenli baskılayıcı hücre ve alt grupları ile nötrofillerin hastalık prognozunu hangi yönde etkilediği araştırılmıştır. Çalışma Ocak 2021-Kasım 2021 tarihleri arasında COVID-19 ön tanısı almış ve PCR testi ile pozitifliği doğrulanan hem çocuk hem de erişkin bireylerin periferik kan örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu hastaların MDSC'leri ve nötrofilleri fenotipik ve fonksiyonel açıdan değerlendirilmiş olup klinik tablo ile ilişkilendirilmiştir.

Sağlıklı çocuklarda özellikle erken yaş döneminde (0-13 yaş) hali hazırda G-MDSC ve E-MDSC hücre grubunun yüksek bulunması ve hastalığın akut döneminde G-MDSC hücrelerinin azalarak, E-MDSC hücrelerinin artış göstermesi ve M-MDSC düzeyinde artışın görülmemesi miyeloid hücrelerin inflamasyonu uyarıcı ve durdurucu iki yönlü çalıştığı görülmüştür. Özellikle akut dönem anti-viral yanıtlarda baskılayıcı hücre grubunun var olmasına karşın yüksek düzeylerde bulunmasının kontrollü yanıtta kritik olacağını düşündürmüştür.

Erişkin bireylerde literatür ile uyumlu olarak M-MDSC artışının kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve ağır klinik tabloya sahip bireylerde yükseldiği belirlenmiştir. M-MDSC/G-MDSC oranının ≥ 1 olması ve E-MDSC oranının düşük düzeylerde bulunmasının kötü prognoz için bir belirteç olabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19 immün sistem yanıtları, Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler, immün modülasyon, nötrofiller, T hücre yanıtları

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of Phenotypic and Functional Differences Of G-MDSC-Like Subgroups in COVID-19 Positive Patients

Myeloid cells represent a diverse range of innate leukocytes. They are critical players for orchestrate initiating and coordinating immune responses against viruses. These cells arise from bone marrow with inflammatory signals and circulate into the bloodstream in mature/immature form. Moreover, they play unique immuno-regulatory roles in post-infection, and are critical for restoring homeostasis. In cases where the balance of the immune system is destroyed, over or insufficient inflammation occurs in response to viruses. Effective and coordinated immune responses control viral replication and prevent the cytokine storms. As a results, this situation would limits immuno-pathology and supports fevribla clinical outcome. In this thesis, we investigated myeloid-derived suppressor cells and other myeloid cell subgroups affect on COVID-19 prognosis. Experiments were performed with peripheral blood samples from both children and adults who were prediagnosed with COVID-19 and disease was confirmed by PCR test. G-MDSC levels of these patients were evaluated phenotypically and functionally, their interactions with other myeloid cells were investigated and overall these resutls were associated with the clinical outcome. High proportion of G-MDSC and E-MDSC was observed in children diagnosed with COVID-19 (0-13 years old), and E-MDSC increased while G-MDSC decreased in acute phase of disease. There was no significant difference was observed in M-MDSC subgroup. These results indicate that MDSCs have two-sided effect on immune responses in children. Despite the presence of a suppressor cell group, especially in acute phase of anti-viral immune responses, the presence of high levels of other pro-inflammatory myeloid cell subgroups is thought to control effective immune response. Consistent with the literature, it was determined that the increasement of M-MDSC in adults diagnosed with COVID-19, is associated with a poor prognosis and these cells were increased in patients with a severe disease. It has been determined that the M-MDSC/G-MDSC ratio ≥ 1 and low E-MDSC ratio in adults diagnosed with COVID-19 could be a marker for poor prognosis.

Keywords: Immune responses of COVID-19, myeloid derived suppressor cells, immune modulation, neutrophils, T cell responses

1. GİRİŞ

Özellikle nötrofiller başta olmak üzere miyeloid seriye ait hücreler virüsle ilk karşılaşan ve anti viral immün yanıtlarda önemli rol oynayan hücrelerdir. Virüslerin eliminasyonu ve inflamasyon kaynaklı doku hasarı oluşmaması için homeostazın yeniden sağlanmasında T hücre yanıtlarını baskırlar. Aşırı inflamasyon sonucu, çeşitli kemokin ve sitokinler hematopoezi uyararak, miyeloid seriye ait immatür hücrelerin olgunlaşmadan kemik iliğinden çıkmasına sebebiyet vermektedir. Periferik kana geçen bu hücreler miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (*Myeloid-Derived Suppressor Cell*, MDSC) olarak adlandırılır. MDSC'ler miyeloid hücre gelişimin farklı olgunlaşma basamaklarını sergileyen heterojen bir gruptur. T hücre yanıtlarını baskılayarak ya da diğer miyeloid hücelere düşük miktarda uyarım yaparak anti viral immün yanıtın “fren mekanizması” olarak işlev görürler (Gabrilovich, & Nagaraj, 2009; Stegelmeier ve ark., 2019).

MDSC'ler, birçok hastalığın immünopatogenezinde tanımlanmış olsa da, özellikle viral inflamasyonlarda önemi oldukça fazladır. Viral kaynaklı hastalıklarda erken, orta veya geç dönemde bu hücrelerin yüksek oranlarda bulunmasının hastalığın iyi/kötü seyri ile birebir ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur. MDSC'lerin viral immün yanıtındaki rolünün tam olarak anlaşılması için matür nötrofil ya da aktive nötrofillerin de fonksiyonları çalışılmalıdır. Efektif bir anti-viral immün yanıt için virüsün diğer hücelerce (matür/ aktive nötrofil ya da monosit) elimine edilmesi, sonrasında MDSC'ler tarafından immün yanıtın ve homeostazın kontrol altına alınması gerekmektedir (Bruger ve ark., 2019; Wang ve ark., 2021)

Anti-viral immün yanıtlarda inflamatuvar miyeloid hücreler ile regülatör miyeloid hücrelerin bir arada ve dengede çalışması çok önemlidir. Bu tez çalışmasında çocuk ve erişkinlerdeki COVID-19 immünopatogenezindeki G-MDSC ve ilişkili miyeloid hücre alt gruplarındaki fenotipik ve fonksiyonel farklılıklar araştırılmıştır.

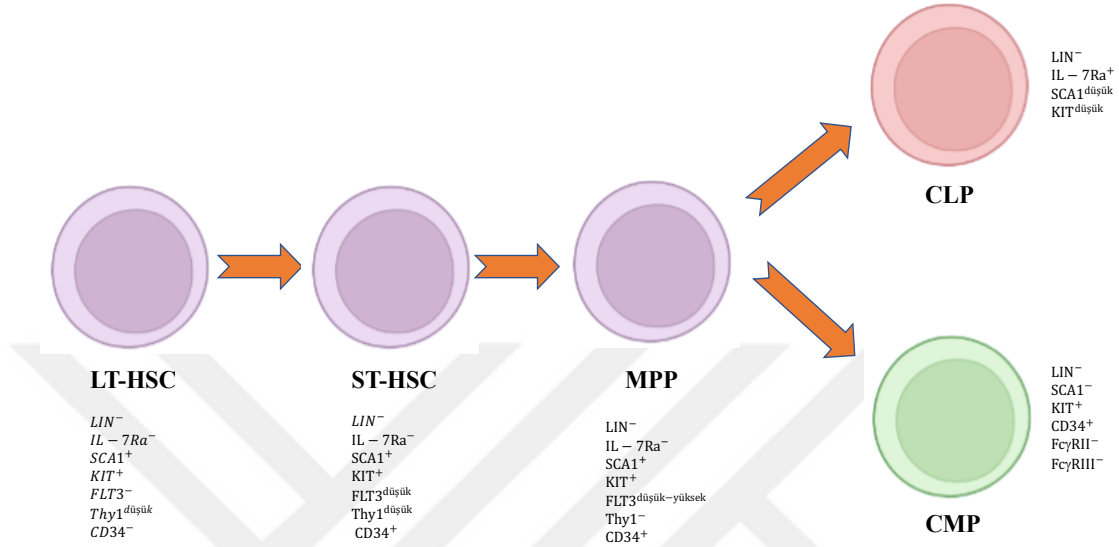
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hematopoez

Kemik iliği, eritrositler de dahil olmak üzere tüm lökositlerin üretim yeridir. Bu hücrelerin üretimi hematopoez olarak adlandırılır. Bu kan hücreleri kendini yenileyebilen ve birçok farklı hücreye dönüşebilen hematopoetik kök hücrelerden (*hematopoietic stem cell*, HSC) köken alırlar. HSC'ler CD34, kök hücre antijeni-1 (*stem cell antigen-1*, SCA-1) ve trozin-kinaz reseptörü (*tyrosine kinase receptor*, c-KIT) yüzey proteinlerinin varlığı ve diğer farklılaşma belirteçlerini taşımamaları ile ayırt edilirler. HSC'ler kemik iliğinde özel nişler içinde bulunurlar. Bu nişlerin içinde bulunan stromal hücreler, HSC'lerin farklılaşması ve öncül hücrelere dönüşmesi için gerekli sinyalleri ve büyüme faktörlerini sağlar (Abbas, Lichtman & Pillai, 2021). HSC'ler kemik iliğinde iki farklı nişte bulunur. Vasküler niş, proliferasyon, farklılaşma ve mobilizasyon olayları için önemli iken; osteoblastik nişte HSC'lerin kendini yenileyebilme özellikleri korunur. Bu nişlerin birlikte çalışması sağlıklı bir hematopoez gerçekleşmesini sağlar (Majumdar, Thiede, Mosca, Moorman, & Gerson, 1998; Notta ve ark., 2016).

Wiessman'ın klasik hematopoez modeline göre (klasik model) hematopoez sırasında ilk olarak uzun ömürlü hematopoetik kök hücreler (*long term hematopoietic stem cells*, LT-HSC) (LIN⁻ (CD3, CD14, CD15, CD19, CD56) (IL-7Ra⁻, SCA1⁺, KIT⁺, FLT3⁻, Thy1^{düşük}, CD34⁻) gelişir. LT-HSC'ler kemik iliğinde az bulunmakla birlikte bütün hücrelere farklılaşma yeteneğine ve kendini ömür boyu yenileyebilme yeteneğine sahiptir. LT-HSC'lerden farklılaşan kısa ömürlü hematopoetik kök hücrelerin (*short-term hematopoietic stem cells*, ST-HSC) (LIN⁻, IL-7Ra⁻, SCA1⁺, KIT⁺, FLT3^{düşük}, Thy1^{düşük}, CD34⁺) kendini yenileme kapasitesi LT-HSC'lere göre daha düşüktür ve multipotent öncül hücrelere (*multipotent progenitor*, MPP) (LIN⁻, IL-7Ra⁻, SCA1⁺, KIT⁺, FLT3^{düşük/yüksek}, Thy1⁻, CD34⁺) farklılaşır. Bu farklılaşmadan sonra lenfoid-miyeloid serinin ayrımı gerçekleşir. Ortak lenfoid öncül (*common lymphoid progenitor*, CLP) (LIN⁻, IL-7Ra⁺, SCA1^{düşük}, KIT^{düşük}) ve ortak miyeloid

öncül (*common myeloid progenitor*, CMP) (LIN^- , $SCA1^-$, KIT^+ , $CD34^+$, $Fc\gamma RII^-$, $Fc\gamma RIII^-$) hücreler oluşur (Şekil 2.1) (Evarson, Dykes, & Olofsson, 2006; Manz, & Boettcher, 2014; Notta ve ark., 2016; Rosenbauer, & Tenen, 2007).



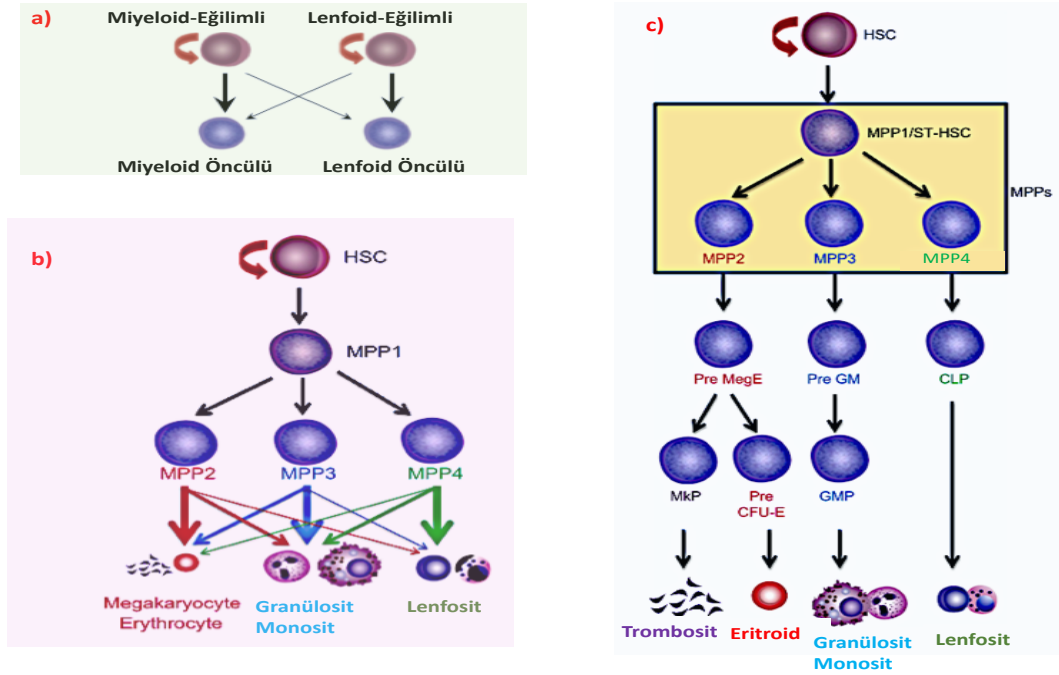
Şekil 2.1 Hematopoetik kök hücrelerden miyeloid öncül ve lenfoid öncüllerin oluşumu. LT-HSC, *long term hematopoietic stem cells*: uzun ömürlü hematopoetik kök hücreler; ST-HSC, *short term hematopoietic stem cells*: kısa ömürlü hematopoetik kök hücreler; MPP, *multipotent progenitor*: ortak miyeloid öncül; CLP, *common lymphoid progenitor*: ortak lenfoid öncül; CMP, *common myeloid progenitor*: ortak miyeloid öncül (Rosenbauer, & Tenen, 2007'den biorender.com kullanılarak uyarlanmıştır.)

Son yıllarda ise tek hücre teknolojisindeki ve fare modellemelerindeki gelişmeler ile klasik hematopoeze alternatifler sunulmuştur. Sieburg ve Eaves'in yaptığı araştırmalarda miyeloid/lenfoid hücre oranına göre miyeloid-eğilimli (*myeloid biased*, My-Bi), dengeli (*balance*, Ba) ve lenfoid-eğilimli (*lymphoid-biased*, Ly-Bi) HSC'ler tanımlamıştır. Bu hücreler sinyal veren lenfositik aktivasyon molekülleri (*signaling lymphocytic activation markers*, SLAM) ailesi belirteçlerinden CD150 ve CD229'u taşıma düzeylerine göre birbirinden ayrıldığı belirtilmiştir: i) miyeloid-eğilimli hücreler $CD150^{yüksek}$, $CD229^-$ yüzey belirteçlerini taşır ve yüksek düzeyde kendini yenileyebilme, farklılaşabilme kapasitesine sahiptir ii) lenfoid-eğilimli hücreler ise $CD10^{dim}$, $CD229^+$ yüzey belirteçlerini taşır ve düşük düzeyde kendini

yenileyebilme ve farklılaşabilme kapasitesine sahiptir (Şekil 2.2.a) (Benz ve ark., 2012; Cheng, Zheng, & Cheng, 2020).

Trumpp ve Passegue'nin yaptığı çalışmalarda ise MPP'lerin yüzey belirteçlerine, hücre döngü durumlarına, soy yatkınlıklarına, kemik iliğinde bulunma bolluğuna göre dört farklı tipi bildirilmiştir: MPP1, MPP2, MPP3, MPP4. LT-HSC ve ST-HSC'ye daha benzer olan MPP1 uzun süreli kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme yeteneğine sahipken MPP2/3/4'nin bu yetenekleri daha kısa sürelidir. MPP2 ve MPP3 düşük seviyelerde T ve B hücrelerine farklılaşırken MPP4 yüksek oranda lenfositlere farklılaşır. MPP3 ise miyeloid hücrelere farklılaşır. Ayrıca MPP3 ve MPP4 ile kıyaslandığında MPP2 daha yüksek seviyelerde trombosit ve megakaryosit-eğilimli (*megakaryocyte-biased*) MPP öncüllerine farklılaşır (Şekil 2.2.b) (Cheng ve ark., 2020; Pietras ve ark., 2015; Wilson ve ark., 2008).

Yapılan tüm çalışmalar ışığında Cheng ve arkadaşlarının önerdiği hematopoez ise, HSC'lerden ST-HSC'lere benzeyen MPP1'in farklılaşması ile başlar. MPP1, diğer multipotent öncüller olan MPP2, MPP3 ve MPP4'e farklılaşır. MPP2, pre megakaryosit ve eritroid hücrelere (pre-megakaryocyte and erythroid, pre MegE) ve koloni oluşturan birim-eritroid öncülüne (*pre colony forming unit-erythroid*, pre CFU-E) farklılaşır. Pre MegE, megakaryosit kararlı öncüllere (*megakaryocyte committed progenitor*, MkP) farklılaşırken, MkP'ler de trombositlere farklılaşır. CFU-E'den ise eritroidler gelişir. MPP3, pre granülosit-monosit hücrelere (*pre granulocyte-monocyte*, pre GM) farklılaşır ve bu hücrelerden granülosit/makrofaj öncül hücreleri (*granulocyte/macrophage progenitor*, GMP) farklılaşır. GMP'lerden de granülositler ve monositler gelişir. MPP4'lerden CLP'ler farklılaşır ve bu hücrelerden de lenfositler gelişir (Şekil 2.2.c) (Cheng ve ark., 2020; Lu, Czechowicz, Seita, Jiang, & Weissman, 2019; Rodriguez-Fraticelli ve ark., 2018)

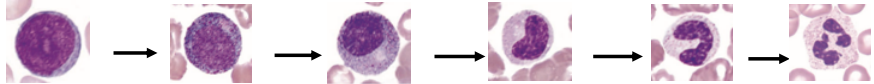


Şekil 2.2 Hematopoetik öncüllerden miyeloid öncül ve lenfoid öncüllerin oluşumuna dair yeni hipotezler. HSC, *hematopoietic stem cell*: hematopoetik kök hücre; MPP, *multipotent progenitor*: ortak miyeloid öncül; ST-HSC, *short term hematopoietic stem cell*: kısa ömürlü hematopoetik kök hücre; Pre MegE, *pre-megakaryocyte and erythroid*: pre- megakaryosit ve eritroid, Pre GM, *pre granulocyte-monocyte*: Pre granülosit-makrofaj; CLP, *common lymphoid progenitor*: ortak lenfoid öncül; MkP, *megakaryocyte committed progenitor*: megakaryosit kararlı öncül; Pre CFU-E, *pre megakaryocyte committed progenitor*: pre magakaryosit kararlı öncül; GMP, *granulocyte-macrophage progenitor*: granülosit-makrofaj öncülü (Cheng ve ark., 2020'den uyarlanmıştır.)

2.2. Miyelopoez

Kemik iliğinden gelen sinyallerle ortak miyeloid öncül hücreler, granülosit/makrofaj öncül hücreleri (*granulocyte/macrophage progenitor*, GMP) (LIN^- , $SCA1^-$, KIT^+ , $CD34^+$, $Fc\gamma RII^+$, $Fc\gamma RIII^+$) ile megakaryosit/eritroid öncül hücrelerine (*megakaryocyte/erythroid progenitor*, MEP) (LIN^- , $SCA1^-$, KIT^+ , $CD34^-$, $Fc\gamma RII^-$, $Fc\gamma RIII^-$), mast hücrelerine ve bazofil hücrelerine farklılaşır. Granülosit/monosit öncül hücreleri taşıdıkları CD34, HLA-DR ve CD64 antijenleri ile ayırt edilirler (Evarson ve ark., 2006; Manz, & Boettcher, 2014; Notta ve ark., 2016; Wood, 2007).

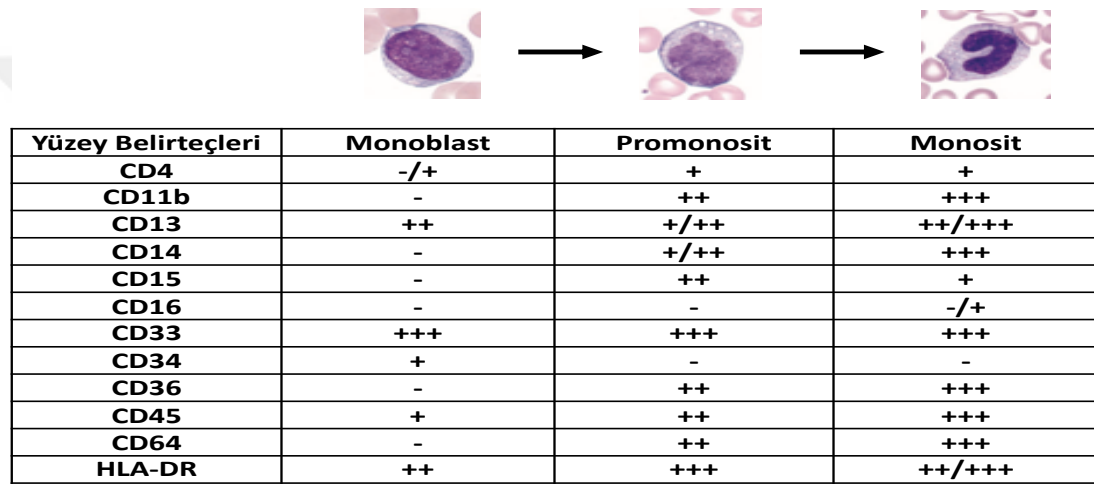
Miyeloid hücrelerin, miyelopoez sırasında ifade ettikleri farklı düzeylerdeki yüzey antijenler kullanılarak gelişim basamakları, olgunlaşma ve farklılaşma düzeyleri tespit edilebilir. Nötrofil gelişiminde CD62L^{orta}, tüm hücrelerde ortak olarak bulunurken, miyeloblast, promiyelosit ve miyelositlerde CD49^{orta}, CXCR2^{düşük} ve CXCR4^{orta} yüzey belirteçleri, miyelosit, metamiyelosit, bant ve segmentli nötrofillerde CD11c^{orta}, CD24^{orta}, CD177^{düşük} yüzey belirteçleri ortak olarak bulunur. Bu hücreleri birbirinden ayırmak için kullanılan diğer yüzey belirteçlerine bakıldığında farklı olarak; miyeloblastlar CD15^{düşük}, CD18^{orta}, CD33^{yüksek}, CD34^{düşük}, HLA-DR^{düşük} yüzey belirteçlerini, promiyelositler CD15^{yüksek}, CD18^{düşük}, CD33^{yüksek}, CD66b^{yüksek} yüzey belirteçlerini, miyelositler CD11b^{düşük/orta}, CD15^{yüksek}, CD18^{yüksek}, CD33^{orta}, CD66b^{yüksek} yüzey belirteçlerini, metamiyelositler CD11b^{orta}, CD15^{yüksek}, CD16^{düşük}, CD18^{orta}, CD33^{düşük}, CD49d^{düşük}, CD66b^{orta}, CXCR2^{düşük}, CXCR4^{orta} yüzey belirteçlerini, bant hücreleri CD11b^{orta}, CD15^{yüksek}, CD18^{orta}, CD33^{düşük}, CD35^{orta}, CD66b^{orta}, CD87^{orta}, CXCR2^{orta}, CXCR4^{düşük} yüzey belirteçlerini, segmentli nötrofiller ise CD10^{orta}, CD11b^{orta}, CD15^{orta}, CD16^{yüksek}, CD18^{orta}, CD33^{düşük}, CD35^{orta}, CD66b^{orta}, CD87^{orta}, CXCR2^{orta}, CXCR4^{düşük} yüzey belirteçlerini taşır (Şekil 2.3) (Lambert, McKenna ve ark., 2021; Manz, & Boettcher, 2014; Notta ve ark., 2016; Wood, 2007).



Yüzey Belirteçleri	Miyeloblast	Promiyelosit	Miyelosit	Metamiyelosit	Band Hücresi	Nötrofil
CD10	-	-	-	-	-	++
CD11b	-	-	+/++	++	++	++
CD11c	-	-	++	++	++	++
CD15	+	+++	+++	+++	+++	++
CD16	-	-	-	+	++	+++
CD18	++	+	+++	++	++	++
CD24	-	-	++	++	++	++
CD33	+++	+++	++	+	+	+
CD34	+	-	-	-	-	++
CD35	-	-	-	-	++	-
CD49d	++	++	-	+	-	-
CD62L	++	++	++	++	++	++
CD66b	-	+++	+++	++	++	++
CD87	-	-	-	-	++	++
CD177	-	-	+	+	+	+
CXCR2	+	+	+	+	++	++
CXCR4	++	++	++	++	+	+
HLA-DR	+	-	++	-	-	-

Şekil 2.3 Nötrofil gelişimi sırasında yüzey belirteçlerinin değişimi (McKenna ve ark., 2021 ve Rodak, & Carr, 2015’den uyarlanmıştır).

Monosit gelişimi sırasında CD33 monoblast, promonosit ve monositlerde ortak olarak bulunur. Monoblast CD4^{-/düşük}, CD13^{orta}, CD34^{düşük}, CD45^{düşük}, HLA-DR^{orta} yüzey belirteçlerini, promonosit CD4^{düşük}, CD11b^{orta}, CD13^{düşük/orta}, CD14^{düşük/orta}, CD15^{orta}, CD36^{orta}, CD45^{orta}, CD64^{orta}, HLA-DR^{yüksek} yüzey belirteçlerini, monositler ise CD4^{düşük}, CD11b^{yüksek}, CD13^{orta/yüksek}, CD14^{yüksek}, CD15^{düşük}, CD16^{-/düşük}, CD36^{yüksek}, CD45^{yüksek}, CD64^{yüksek}, HLA-DR^{orta/yüksek} yüzey belirteçlerini bulundurlar (Şekil 2.4) (Lambert, Preijers, Yanikkaya Demirel, & Sack, 2017; Manz, & Boettcher, 2014; Notta ve ark., 2016; Wood, 2007).



Şekil 2.4 Monosit gelişimi sırasında yüzey belirteçlerinin değişimi (Lambert ve ark., 2017 ve Rodak, & Carr, 2015'ten uyarlanmıştır).

2.2.1 Miyelopoezde Morfolojik Değişimler

Miyelopoez sürecinin erken safhalarında blastların morfolojik özelliklerini birbirinden ayırmak güç olup sitolojik boyamalar ve yüzey belirteçleri ile birbirinden ayırt edilebilirler (Şekil 2.3, Şekil 2.4, Şekil 2.5 ve Şekil 2.6). Miyeloblastlar 10-20 mikron çapa sahip, morfolojik olarak belirgin granülleri olmayan küçük bir bazofilik sitoplazma ve büyük oval ya da yuvarlak nükleusları ile karakterize edilir. Granüllerin görülmeye başlanması miyeloblasttan promiyelosite geçişi işaret eder (Carmona-Rivera, 2016; Mackey, Coffelt, & Carlin, 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011)

Promiyelositlerin morfolojisi genel olarak miyeloblastlara benzer şekilde olup, bu hücrelerden daha büyük olmaları ile ayırt edilirler. Sitoplazması bazofiliktir, nükleus yaygın kromatin dağılımına ve yuvarlak/oval şekile sahiptir. Endoplazmik retikulumu (ER) daha belirgin olup bu aşamada azurofilik granüller (birincil granüller) artarak birikir. (Carmona-Rivera,2016; Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

Miyelositlerin sitoplazmasında ikincil granüller belirginleşir ve 16-24 mikron çapındadırlar. Çekirdekleri yuvarlak-oval ve eksantrik yapıda olup, kromatin kaba ve nükleoller küçüktür. Birincil granüllerin oluşumu azalır, ikincil granüller ise daha küçük ve sayıca fazladır (Carmona-Rivera,2016; Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

Metamiyelositler ise, nükleol içermeyen at nalı şeklinde, yoğun kromatin içeren nükleusa sahip olup sitoplazması birincil, ikincil ve üçüncül granüller ile doludur. Endoplazmik retikulum ise ince bir yapıda görünür (Carmona-Rivera,2016; Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

Bant hücreleri, kromatinin fasulye benzeri şekilde yoğunlaşması ile karakterize edilir. Nükleusu, filamentli heterokromatin iplikleri ile birbirine bağlanan iki ya da daha fazla lobüle bölünmüş bir haldedir (Carmona-Rivera,2016; Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

Matür nötrofillerde nükleus daha parçalı (üç ila dört lobül) hale gelir ve bu morfolojiye sahip hücreler sağlıklı bireylerin periferik dolaşımında en fazla yüzdeye sahip olan immün hücrelerdir. Granülleri, golgi aygıtından vezikül tomurcuklanması yoluyla granülositik farklılaşma sürecinde sıralı ve sürekli olarak üretilirler. Birincil granüller, promiyelosit aşamasında ortaya çıkar. Peroksidaz pozitif olarak da bilinen bu granüllerin çapları yaklaşık 0,3mm'dir. Bu granüllerde defensinler, bakterisidal/geçirgenlik arttırıcı protein (bactericidal/permeability-increasing protein, BPI), nötrofil elastaz, miyeloperoksidaz (*myeloperoxidase*, MPO), proteinaz 3 (*proteinase 3*, PR3) ve katepsin G. gibi kargo molekülleri bulunur. İkincil granüller ise miyelosit aşaması sırasında sentezlenip 0,1 mm çapa sahiptir. Glikoprotein laktoferrin varlığı ile karakterize edilip, nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalin (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL), insan katyonik antimikrobiyal proteini 18 (*human cationic antimicrobial protein*, hCAP-18) ve lizozim gibi

antimikrobiyal proteinleri içermektedir. Üçüncül granüller ise bant aşamasında ortaya çıkmaya başlamış olup, olgun nötrofillerde de görülmektedir. Spesifik granüllerden daha küçük olup lökolizin gibi jelatinazlar içerirler (Carmona-Rivera,2016; Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

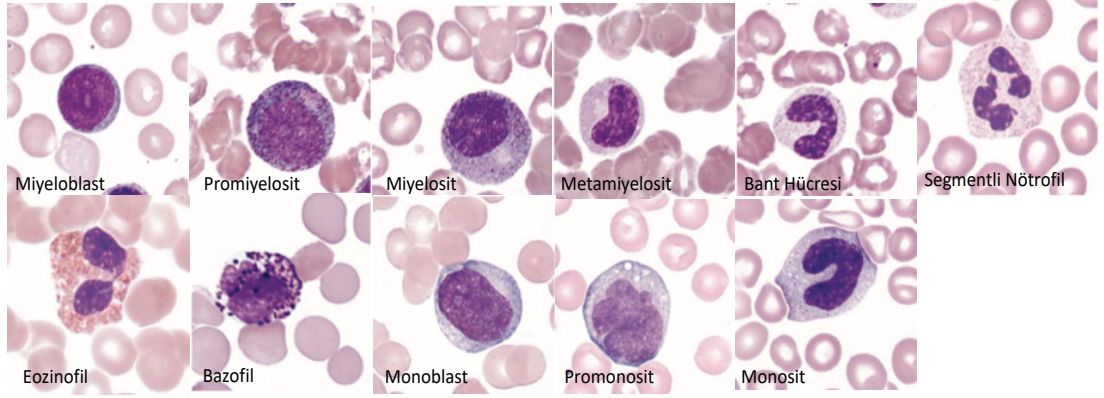
Eozinofillerin promiyelosit aşamasındaki morfolojisi eozinofilik ve bazofilik olan kaba granüller içermeleri dışında, nötrofil promiyelositlerine benzerdir. Diğer progenitörleri ise sitoplazmasında eozinofilik granülüne sahip olmaları dışında yine nötrofil progenitörleri ile paralellik gösterir. Olgun eozinofil 12-17 mikron çapında olup, iki parçalı kromatin içermeyen bir çekirdeğe sahiptir, nükleol görünmez ve sitoplazma eozinofil granülleri ile doludur (Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

Bazofillerin olgunlaşma basamakları ve progenitörleri nötrofiller ile aynıdır. Bazofiller 10-14 mikron çapında olup, genellikle görünür kromatin içermeyen ince filamentlerle birbirine bağlanan iki loblu nükleustan oluşur ve nükleolları yoktur. Birincil granülleri az olmakla birlikte ikincil granülleri oldukça fazla ve büyüktür. Çekirdek bazen ikincil granüller nedeniyle görünmeyebilir. Bazofil granülleri suda çözünür ve bu yüzden fiksasyon ve boyama sırasında ekstrakte edilebilir (Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

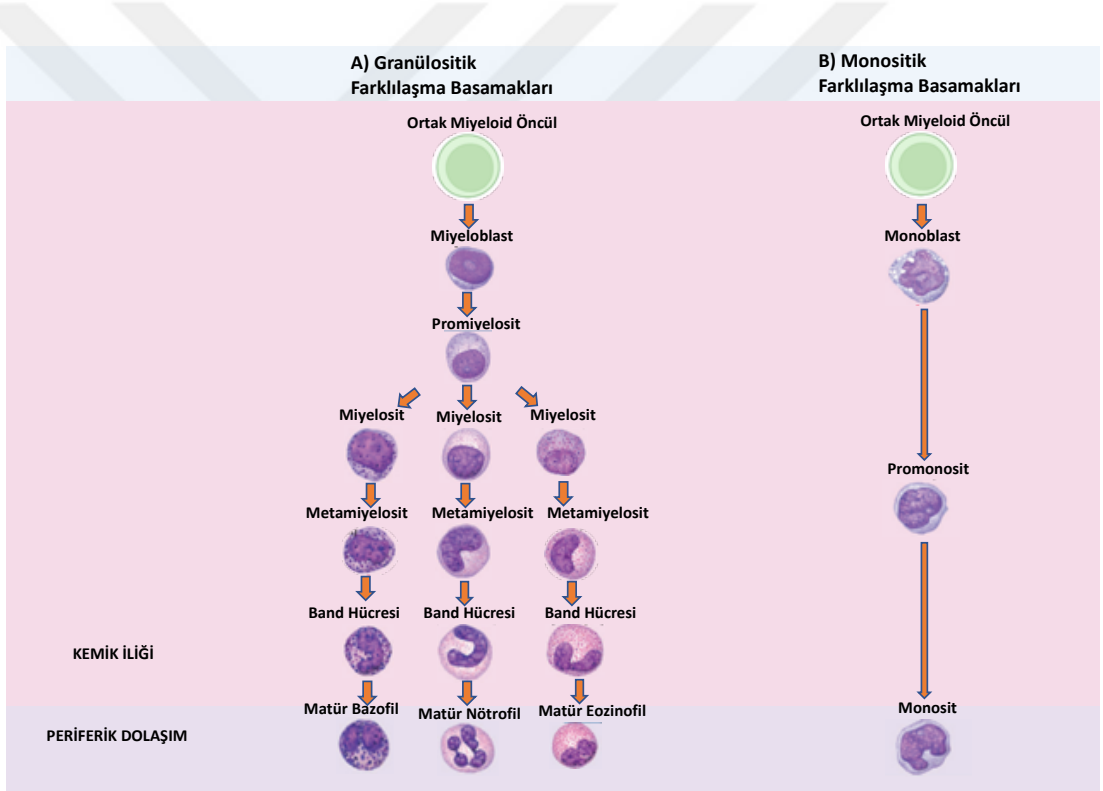
Monoblastlar 12-18 mikron çapında olup yuvarlak/oval ya da düzensiz bir şekle sahip nükleus bulundururlar. Nükleus hücrenin yaklaşık %80'ini oluşturur. Nükleol yoktur veya bir ya da iki tane bulunabilir. Bazofilik sitoplazma dışında miyeloblastlara benzerdirler. Granül içermezler (Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

Promonositler 12-20 mikron çapında olup nükleusları düzensiz şekilli ve beyine benzer şekilde kıvrımlı olabilir. Nükleol bulunabilir. İnce birincil granüllere sahiptir. Promiyelositler ile benzer morfoloji gösterirler (Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).

Monositler 12-20 mikron çapında olup nükleus yuvarlak/at nalı veya böbrek şeklinde ve kıvrımlıdır. Katlanmış yapıda kromatin içerir. Promonositlerden daha fazla birincil granüle sahiptirler. Düzensiz bir şekle sahip olan sitoplazma bazen vakuoller içerir. Nükleus, sitoplazma oranı değişkendir (Mackey ve ark., 2019; Rodak, & Carr, 2015; Wickramasinghe ve ark., 2011).



Şekil 2.5 Fizyolojik koşullarda miyelopoez olgunlaşma basamaklarındaki hücrelerin kazanmış olduğu morfolojik karakterler. Hücreler Wright-giemsma boyası ile boyanmıştır (Rodak, & Carr, 2015'ten uyarlanmıştır).

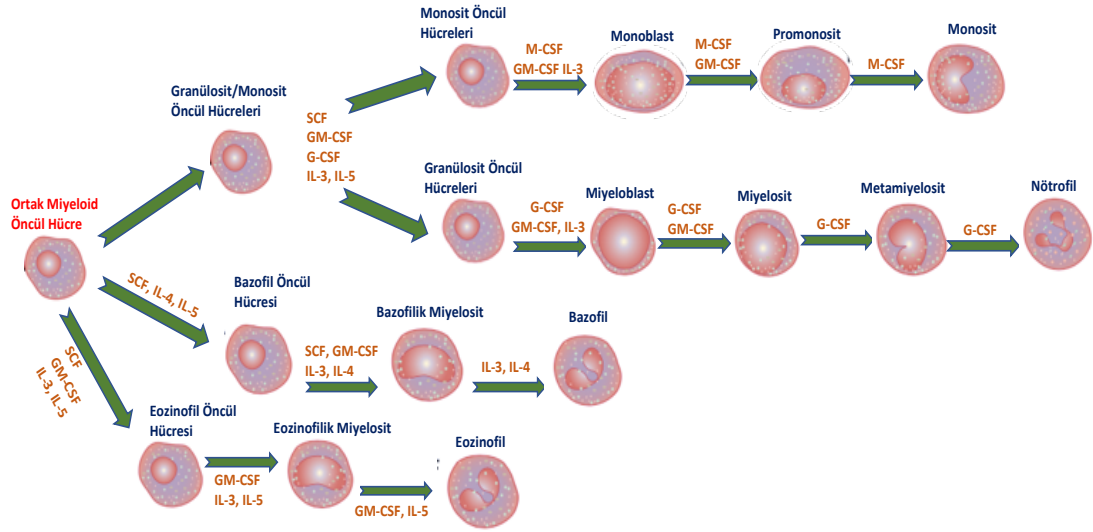


Şekil 2.6 Fizyolojik koşullarda miyelopoez olgunlaşma basamaklarındaki hücrelerin kazanmış olduğu morfolojik karakterler. Hücreler Wright-giemsma boyası ile boyanmıştır (Linden, Ward, & Cherian, 2012' den biorender.com kullanılarak uyarlanmıştır).

2.2.2 Miyelopoezde Sitokin Düzenlenmesi

Ortak miyeloid öncül hücreler yüzeylerinde çok fazla sitokin reseptörü taşıırken, farklılaşma basamakları ilerledikçe reseptörler de özelleşir. CMP'ler İnterlökin-1 (interleukin-1, IL-1), İnterlökin-6 (interleukin-6, IL-6), kök hücre faktörü (Stem cell factor, SCF), Trozin Kinaz III ligandı (tyrosine kinase III, FLT3), granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) gibi sitokinlerin reseptörlerini taşır. Örneğin, granülosit koloni uyarıcı faktör reseptörü (granulocyte colony-stimulating factor receptor, G-CSFR) ligandı G-CSF tarafından aktive olur ve temelde granülositik serinin gelişimini destekler. Ayrıca, nötrofilik granülositlerin hayatta kalması, göçü, çoğalması ve farklılaşmasında etkilidir (Evarson ve ark., 2006; Khanna-Gupta, & Berliner, 2018; Liongue, Wright, Russell, & Ward, 2009; Notta ve ark., 2016; Ranzoni ve ark., 2021).

Nötrofil olgunlaşması ve farklılaşmasına aracılık eden başlıca sitokinler, G-CSF ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) ve interlökin 3'tür (*interleukin 3*, IL-3). G-CSF nötrofillerin fonksiyonel aktivitesini artırıp, proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. Monosit farklılaşmasına aracılık eden sitokinler ise M-CSF, GM-CSF ve IL-3'tür. M-CSF monositlerin fonksiyonel aktivitesini artırıp, proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. Bazofil farklılaşmasında SCF, GM-CSF, IL-3, interlökin-4 (*interleukin-4*, IL-4) ve interlökin-5 (*interleukin-5*, IL-5) sitokinleri etkili olurken, eozinofil farklılaşmasında ise SCF, GM-CSF, IL-3 ve IL-5 sitokinleri etkilidir (Şekil 2.7) (Evarson ve ark., 2006; Khanna-Gupta, & Berliner, 2018; Liongue, Wright, Russell, & Ward, 2009; Notta ve ark., 2016; Ranzoni ve ark., 2021).



Şekil 2.7 Miyeloid hücrelerin olgunlaşma ve farklılaşmalarına aracılık eden sitokinler. SCF, *stem cell factor*: kök hücre faktörü; G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*: granülosit koloni uyarıcı faktör; M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*: makrofaj koloni uyarıcı faktör; GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*: granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör; IL-3, *interleukin-3*: interlökin 3; IL-4, *interleukin-4*: interlökin 4; IL-5, *interleukin-5*: interlökin 5 (Khanna-Gupta, & Berliner, 2018'den uyarlanmıştır).

2.2.3 Miyelopoezin Moleküler Biyolojisi

Hematopoetik kök hücrelerden öncül hücrelerin oluşumu i) kendini yenileyebilme yeteneğinde azalma ii) özelleşmiş bir fenotip kazanma olarak temelde iki süreç ile ilişkilidir. Bu süreç ilgili hücrelere özgü genlerin yapılandırılması ve epigenetik düzenlenmeleri şekillendirir. Transkripsiyon faktörleri ise bu oluşumda anahtar rol oynar (Notta ve ark., 2016; Ranzoni ve ark., 2021; Rosenbauer, & Tenen, 2007).

Hematopoetik kök hücrelerden miyeloid hücrelere doğru olan farklılaşma hiyerarşisi, transkripsiyon faktörlerinin kademeli etkileşimi ile kontrol edilir. İlk olarak hematopoetik kök hücrelerin oluşumunda etkili olan runt ilişkili transkripsiyon faktörü 1 (*runt-related transcription factor 1*, RUNX1) ve kök hücre lösemi faktörü (*stem-cell leukaemia factor*, SCL) etki gösterir. RUNX1 ekspresyonu bir yandan da miyelopoezi baskılayıcı fonksiyon gösterir. Bu transkripsiyon faktörünün ortadan kaldırılması lenfoid ve miyeloid öncüllerin oluşumunu etkilemezken, eritroid ve

megakaryositik öncüllerin oluşumunu olumsuz yönde etkiler (Evarson ve ark., 2006; Notta ve ark., 2016; Ranzoni ve ark., 2021; Rosenbauer, & Tenen, 2007).

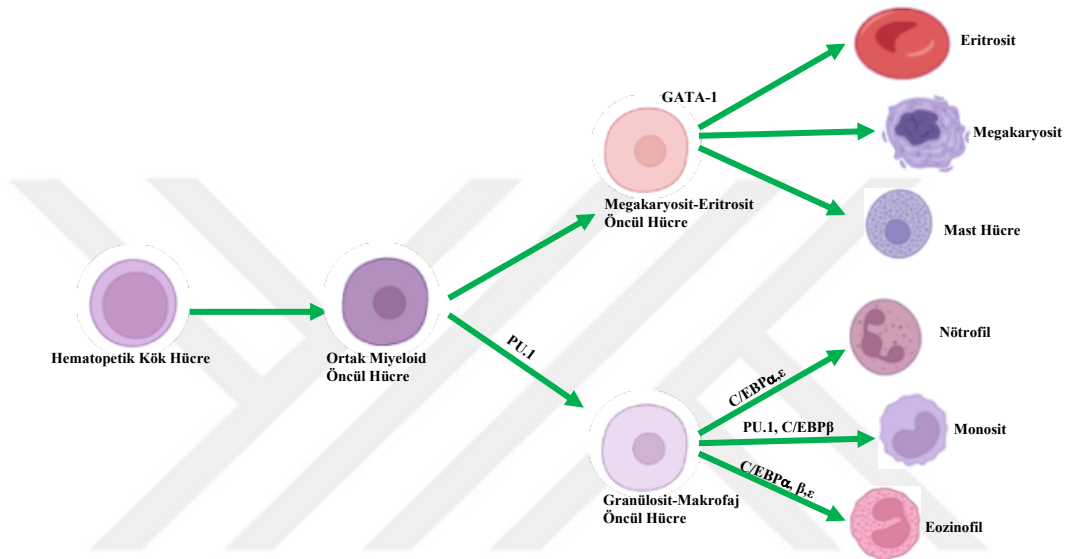
Miyeloid hücrelerin üretiminde etkili olan transkripsiyon faktörü PU.1 onkogen SPI1'in ürünüdür. PU.1, Ets ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür ve ekspresyonu kan hücreleri ile sınırlıdır. Bu transkripsiyon faktörünün ortadan kaldırılması miyeloid öncül, lenfoid öncül ve daha çok makrofajların farklılaşmasını engellemektedir. Düşük düzeylerdeki PU.1 ekspresyonu immatür granülositik hücrelerin farklılaşmasını destekler. PU.1 farklı hematopoetik soylar tarafından değişen seviyelerde ifade edilir. HSC'ler, CMP'ler ve CLP'lerde B hücrelerde aynı düzeyde ifade edilirken; olgun miyeloid hücrelerde yüksek seviyelerde bulunur. Ayrıca bu transkripsiyon faktörü CD11b, M-CSF, GM-CSF reseptör alfa (GM-CSF-R α), G-CSF reseptörü (G-CSF-R) ve immünoglobülin (Ig) hafif zincirini kodlayan genlerin transkripsiyonunu düzenler (Evarson ve ark., 2006; Notta ve ark., 2016; Ranzoni ve ark., 2021; Rosenbauer, & Tenen, 2007).

Ortak miyeloid öncüllerden granülosit/monosit öncül hücrelerin farklılaşması için C/EBP (CCAAT-enhancer bağlanma proteini) transkripsiyon faktörü ailesinden C/EBP- α gereklidir. Bu transkripsiyon faktörü hematopoetik kök hücreler, miyeloid öncül hücreler ve granülositlerde eksprese edilirken makrofajlarda eksprese edilmemektedir. C/EBP α ekspresyonu bloklanan farelerde, normal farelere göre miyeloid öncül hücrelerinde bir farklılık görülmezken; GMP'ler ve sonraki tüm granülositik aşamaların gelişimi görülmemiştir. Ayrıca bu transkripsiyon faktörü HSC'lerin kendini yenilemesini regüle eder (Rosenbauer, & Tenen, 2007). C/EBP- β ekspresyonu ise miyeloid olgunlaşması sırasında artar ve monosit/makrofaj gelişimi için önemlidir. C/EBP ϵ promotör genlerinden P α 'nın olgun nötrofillerde işlev gördüğü düşünülmektedir. C/EBP ϵ 'nin yokluğunun, olgun segmentli granülositlerin terminal farklılaşmasındaki sonraki adımları engellediği düşünülmektedir (Khanna-Gupta, & Berliner, 2018; Notta ve ark., 2016; Ranzoni ve ark., 2021).

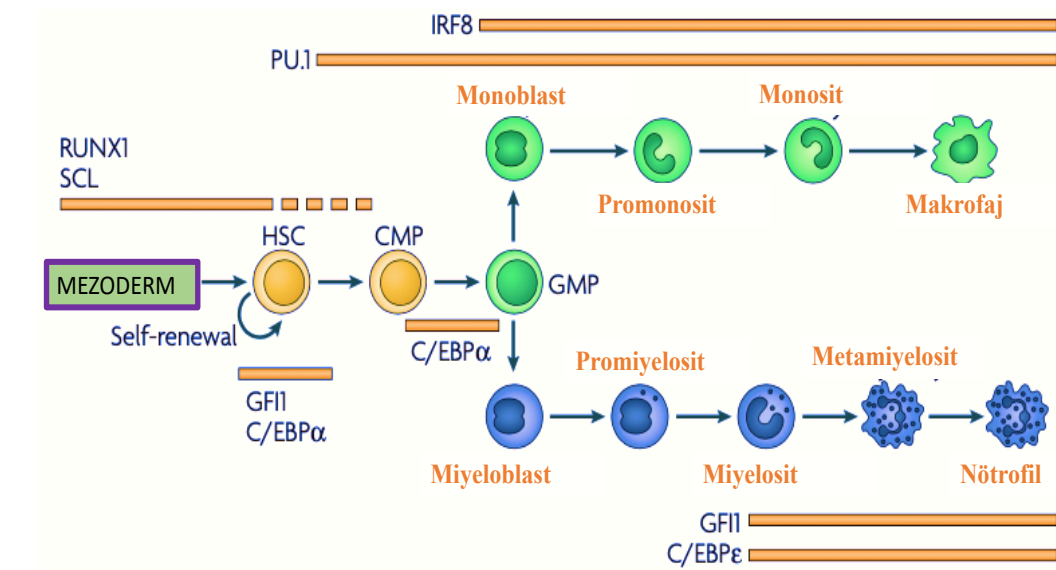
GMP'den farklılaşma iki transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilir. Bunlar PU.1 ve interferon-düzenleyici faktör 8'dir (*interferon-regulatory factor 8*, IRF8). IRF8 ekspresyonu HSC'ler, CMP'ler ve makrofajlarda görülürken; granülositlerde görülmez. IRF8 ekspresyonu IFN γ (*interferon-gamma*) tarafından güçlenir ancak IFN γ tarafından uyarılan protein 15kDa (*IFN-stimulated protein of 15*

kDa, ISG15) bu transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu negatif yönde düzenler (Notta ve ark., 2016; Ranzoni ve ark., 2021; Rosenbauer, & Tenen, 2007).

Büyüme faktöründen bağımsız 1 transkripsiyon baskılayıcısı (*growth factor independent 1 transcription repressor*, GFI1), G-CSF aracılı nötrofil olgunlaşmasında etkilidir. Bu transkripsiyon faktörü susturulan farelerin nötrofillerinin olgunlaşmadığı gözlemlenmiştir (Notta ve ark., 2016; Ranzoni ve ark., 2021; Rosenbauer, & Tenen, 2007).



Şekil 2.8 Miyelopoezde transkripsiyon faktörlerinin değişimi-1. GATA-1, *erythroid transcription factor*: eritroid transkripsiyon faktörü; C/EBP, *CCAAT/enhancer binding protein*: CCAAT/enhancer bağlanma proteini (Khanna-Gupta, & Berliner, 2018'den biorender.com kullanılarak uyarlanmıştır).



Şekil 2.9 Miyelopoezde transkripsiyon faktörlerinin değişimi-2. HSC, *hematopoietic stem cell*: hematopoetik kök hücre; CMP, *common myeloid progenitor*: ortak miyeloid öncül hücre; GMP, *granulocyte/macrophage progenitor*: granülosit/makrofaj öncül hücre; RUNX1, *runt-associated transcription factor*: runt-iliskili transkripsiyon faktörü 1; SCL, *leukemia stem cell factor*: lösemi kök hücre faktörü; IRF8, *interferon-regulatory factor 8*: interferon-düzenleyici faktör 8; GFI1, *growth factor-independent transcription repressor 1*: büyüme faktöründen bağımsız transkripsiyon baskılayıcısı 1; C/EBP, *CCAAT/enhancer binding protein*: CCAAT/enhancer bağlanma proteini (Rosenbauer, & Tenen, 2007’den uyarlanmıştır).

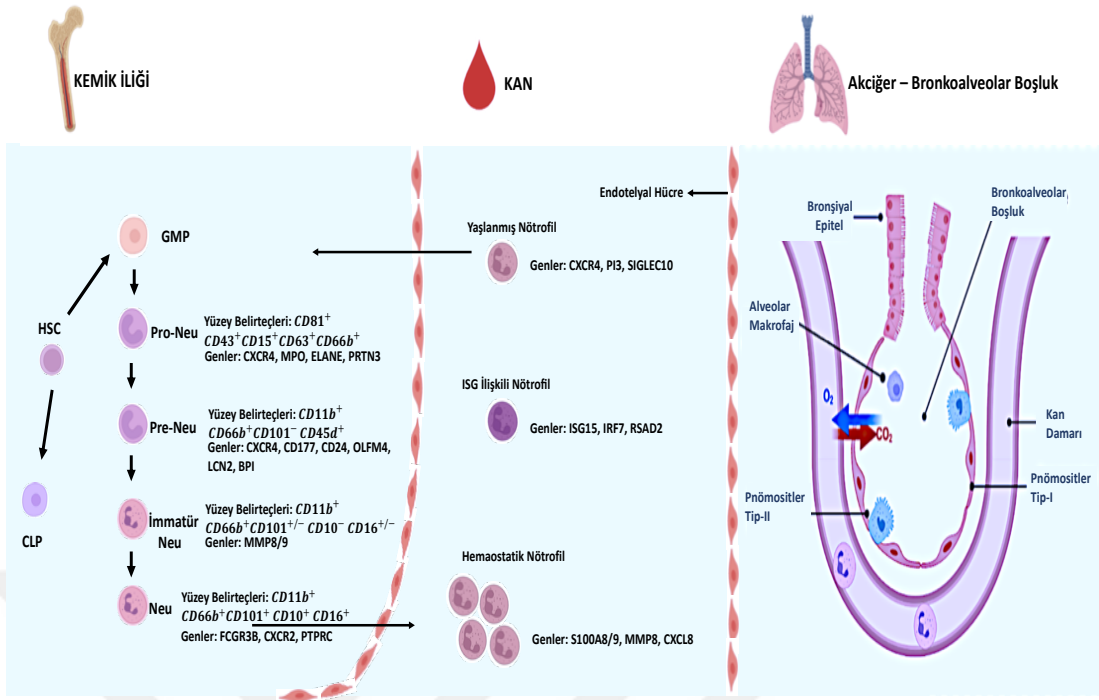
2.3 Nötrofil Gelişimi ve Özellikleri

Nötrofiller miyeloid seriden farklılaşan kısa ömürlü ve inflamasyon alanına ilk göç eden hücrelerdendir. Enfeksiyona karşı erken tepkiyi şekillendirmekte etkin olup doğal immün yanıt ve edinsel immün yanıt arasında köprü görevi görmektedir. GMP’lerden pro-nötrofiller (*pro-neutrophils*, pro-Neu) (CD15⁺, CD43⁺, CD63⁺, CD66b⁺, CD81⁺) oluştuktan sonra, nötrofil öncül hücrelerine (*pre-neutrophils*, pre-Neu) (CD11b⁺, CD45d⁺, CD66b⁺, CD101⁻), olgunlaşmamış nötrofillere (*immature neutrophils*) (CD10⁻, CD11b⁺, CD16^{-/+}, CD66b⁺, CD101^{-/+}) ve olgunlaşmış nötrofillere (*mature neutrophils*) (CD10⁺, CD11b⁺, CD16⁺, CD66b⁺, CD101⁺) dönüşerek nötrofil farklılaşma basamakları şekillenir (Şekil 2.10) (Reusch ve ark., 2021).

Nötrofillerin olgunlaşma süreci kemik iliğinde (*bone marrow*, BM) gerçekleşir ve bu aşamalar transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilir. Pro-Neu ve pre-

Neu'nun proliferasyon yeteneği olgunlaşmış ve olgunlaşmamış n6trofillere g6re y6ksektir. Alt gruplar karakteristik gran6lleri kodlayan genler ile ayırt edilir. Pro-Neu'da genellikle azurofilik gran6l genleri (6rneğin; AZU1, *azurocidin1*), pre-Neu'da laktoferrin (*lactoferrin*, LTF) gran6l genleri, olgun n6trofillerde ise jelatinaz (*gelatinase*) ve salgı gran6l genleri ifade edilir. İlginç bir şekilde n6trofillerdeki proteinlerin çoğu erken farklılaşma safhasında 6retilir ve gran6llerde depolanır. Bu da n6trofillerin yaşamları boyunca mRNA (mesajcı-ribon6kleik asid) içeriğinde azalmaya ve protein-gen ekspresyonu arasında potansiyel bir tutarsızlığa yol açar (şekil 2.10) (Reusch ve ark.,2021).

Periferik dolaşıma geçen olgunlaşmış n6trofiller i) çoğunluğu oluşturan hemeostatik (*homeostatic*) n6trofil, ii) yaşlanmış n6trofil iii) interferon ile uyarılan genler (*interferon-stimulated genes*, ISG) ile ilişkili n6trofiller (*ISG-related neutrophils*) olarak 6ç farklı alt gruba ayrılmıştır. N6trofiller periferik dolaşıma geçtiklerinde ya damarda dolaşmaya devam ederler ya da farklı organlara infiltre olurlar. N6trofillerin kemik iliğinden 6ıkışında kemokin resept6r6 tip-4 (*chemokine receptor 4*, CXCR4)'6n ekspresyonunun d6şmesi sağlarken; yaşlanmış n6trofiller 6zerindeki CXCR4'6n yeniden ekspresyonu bu n6trofillerin makrofajlar tarafından fagositoz edildiği BM, dalak ve karaciğere g6ç etmesine neden olur (şekil 2.10) (Reusch ve ark., 2021).



Şekil 2.10 Nötrofil gelişimi ve nötrofil alt-grupları. HSC, *hematopoietic stem cell*: hematopoetik kök hücre; CLP, *common lymphoid progenitor*: öncül lenfoid hücre; GMP, *granulocyte/monocyte progenitor*: granülosit-monosit öncülü; Pro-Neu, *pro-neutrophil*: pro-nötrofil; Pre-Neu, *pre-neutrophil*: pre-nötrofil; Immatur Neu, *immatur neutrophil*: olgunlaşmamış nötrofil; Neu, *neutrophil*: nötrofil; ISG, *interferon related gene*: interferon ilişkili gen (Reusch ve ark.,2021'den biorender.com kullanılarak uyarlanmıştır).

Nötrofiller, enfeksiyöz ajanlara karşı hücre-aracılı savunmanın ilk basamağında önemli rol oynar. Efektör aktivitelerini periferik dokulara göç ettikten sonra kazanırlar. Bakterileri proteazlar, defensinler, antimikrobiyal peptitler ve reaktif oksijen türleri (*reactive oxygen species*, ROS) içeren granülleri sayesinde fagosite eder. Nötrofiller ayrıca nötrofil hücre dışı tuzak yapıları (*neutrophil extracellular traps*, NET) olarak adlandırılan granül ve çekirdek içeriğini hücre dışına salmaktadır. Nötrofil olgunlaşması ile fagositoz kapasitesi, ROS üretimi artarken; NET oluşum kapasitesi azalır (Kaplan, & Radic, 2012; Mócsai, 2013; Rada, 2019; Reusch ve ark., 2021).

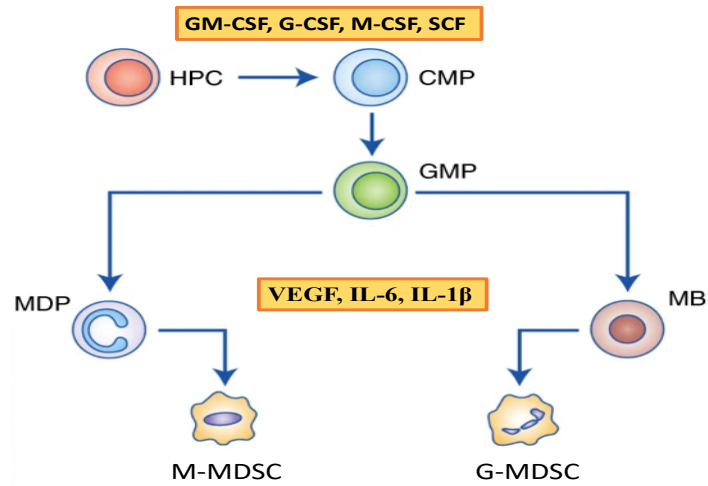
Nötrofiller fagositoz sırasında granül içeriklerini fagozom adı verilen bir vakuole bırakır ve NADPH oksidazların aktivasyonu ile ROS üretilir. Fagositozun yanı sıra, kromatin DNA, nötrofil elastaz, miyeloperoksidaz (*myeloperoxidase*, MPO) gibi granüler proteinleri ve histon proteinlerini de hücre dışına atarak NET oluşumunu

da destekler. NET'ler patojeni yakalayıp hareketsiz hale getirerek fagositozu kolaylaştırırken, antimikrobiyal histonlar tarafından da doğrudan proteolitik sindirimi destekler ve patojenin yok edilmesini sağlar (Kaplan, & Radic, 2012; Mócsai, 2013; Rada, 2019).

2.4 Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücrelerin (*Myeloid-Derived Suppressor Cell*, MDSC) Gelişimi ve Özellikleri

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler morfoloji, yoğunluk ve fenotipine bağlı olarak temelde iki alt gruba ayrılırlar; granülositik-miyeloid kökenli baskılayıcı hücre (*granulocytic myeloid-derived suppressor cell*, G-MDSC) (CD11b⁺, CD14⁻, CD15⁺, CD33^{düşük}, CD66b⁺) ve monositik-miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (*monocytic myeloid-derived suppressor cell*, M-MDSC) (CD11b⁺, CD14⁺, CD15⁻, CD33⁺, HLA-DR^{-düşük}). Yakın bir zamanda olgunlaşmamış progenitör hücreler tanımlanmış olup, bu hücreler erken dönem-miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (*early-stage myeloid-derived suppressor cell*, e-MDSC) (LIN⁻, CD11b⁺, D33⁺, CD14⁻, CD15⁻, HLA-DR⁻) olarak tanımlanmıştır (Li ve ark., 2021) Ayrıca, insanda fibroblastik miyeloid kökenli baskılayıcı hücre (*fibrocystic myeloid-derived suppressor cell*, F-MDSC) (CD33⁺, IL4Ra⁺) olarak *in vitro* koşullarda tanımlanmış bir alt-grup daha bildirilmiştir (Mazza ve ark., 2014).

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin gelişimi kemik iliğinde bulunan HSC'lerin CMP'lere, CMP'lerin de GMP'lere farklılaşması ile başlar. Bu süreç GM-CSF, G-CSF, M-CSF ve SCF büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. GMP'ler makrofaj/dendritik hücre progenitörlerine (*macrophage/dendritic cell progenitors*, MDP) ve miyeloblastlara (*myeloblasts*, MB) farklılaşır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), interlökin-6 (*interleukin-6*, IL-6) ve interlökin-1 β (*interleukin-1 β* , IL-1 β) varlığında MDP'ler M-MDSC'ye; MB'ler G-MDSC'lere farklılaşırlar (Şekil 2.11) (Groth ve ark., 2019; Mazza ve ark., 2014).



Şekil 2.11 MDSC’lerin gelişimi. HSC, *hematopoietic stem cell*: hematopoetik kök hücre; CMP, *common myeloid progenitor*: öncül miyeloid hücre; GMP, *granulocyte-macrophage progenitor*: granülosit-makrofaj öncülü; MDP, *macrophage/dendritic cell progenitor*: makrofaj/dendritik hücre öncülü; MB, *myeloblast*: miyeloblast; GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulated factor*: granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör; G-CSF, *granulocyte colony stimulated factor*: granülosit koloni uyarıcı faktör; M-CSF, *monocyte colony stimulated factor*: monosit koloni uyarıcı faktör; SCF, *stem cell factor*: kök hücre faktörü; VEGF, *vascular endothelial growth factor*: vasküler endotelyal büyüme faktörü; IL-6, *interleukin-6*: interlökin-6; IL-1β, *interleukin-1β*: interlökin-1β; M-MDSC, *monocytic myeloid-derived suppressor cell*: monositik miyeloid kökenli baskılayıcı hücre; G-MDSC, *granulocytic myeloid-derived suppressor cell*: granülositik miyeloid kökenli baskılayıcı hücre (Groth ve ark., 2019’ten uyarlanmıştır).

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler matür monositlerden ve nötrofillerden immün yanıtı baskılama kapasiteleri ile ayrışır. MDSC’ler dendritik hücrelerin antijen sunma kapasitelerini engelleyerek, T lenfositlerin de antijeni tanınmasını sınırlandırır. Ayrıca doğal öldürücü (natural killer, NK) hücrelerin aktivasyonunu engeller. MDSC’ler salgıladıkları interlökin-10 (interleukin-10, IL-10) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) gibi sitokinler ile düzenleyici Thücre (*regulatory T cell*, Treg) ve M2 makrofaj dönüşümüne katkı sağlar (Bronte ve ark., 2016; Bruger ve ark., 2019; Gabrilovich, & Nagaraj, 2009).

G-MDSC’ler ürettikleri reaktif oksijen türleri ile antijen-spesifik T hücre yanıtlarını baskılayarak; M-MDSC’ler ise ürettikleri nitrik osit (*nitric oxide*, NO) ile ortamdaki arginin/sistein amino asitlerini tüketerek immün yanıtları baskılayıcı etki

gösterir. E-MDSC'lerin de ROS ve NO'dan birini ya da ikisini de kullanarak immün düzenleme yaptığı düşünülmektedir (Bronte ve ark., 2016; Bruger ve ark., 2019; Ohl, & Tenbrock, 2018). Fenotip olarak bazofillere benzerlik gösteren bu hücreler, CD123 yüzey belirtecini bulundurmaması ile bazofillerden ayrılırlar (Khan ve ark., 2020). E-MDSC'ler ile ilgili çalışmalar hala devam etmekte olup bu hücrelerin diğer miyeloid hücrelere farklılaşma yeteneği olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2021).

2.5 Anti Viral İmmün Yanıtlar

Enfeksiyöz ajanlara karşı immün yanıt doğal ve edinsel olmak üzere ikiye ayrılır. Doğal immün yanıt enfeksiyondan sonraki ilk birkaç saat içinde şekillenirken, edinsel immün yanıt daha ileri süreçlerde etkinliğini gösterir (Abbas ve ark., 2021). Spesifik ve etkili bir immün yanıt için doğal ve edinsel immünitinin birlikte iş görmesi gereklidir (Koyama, Ishii, Coban, & Akira, 2008).

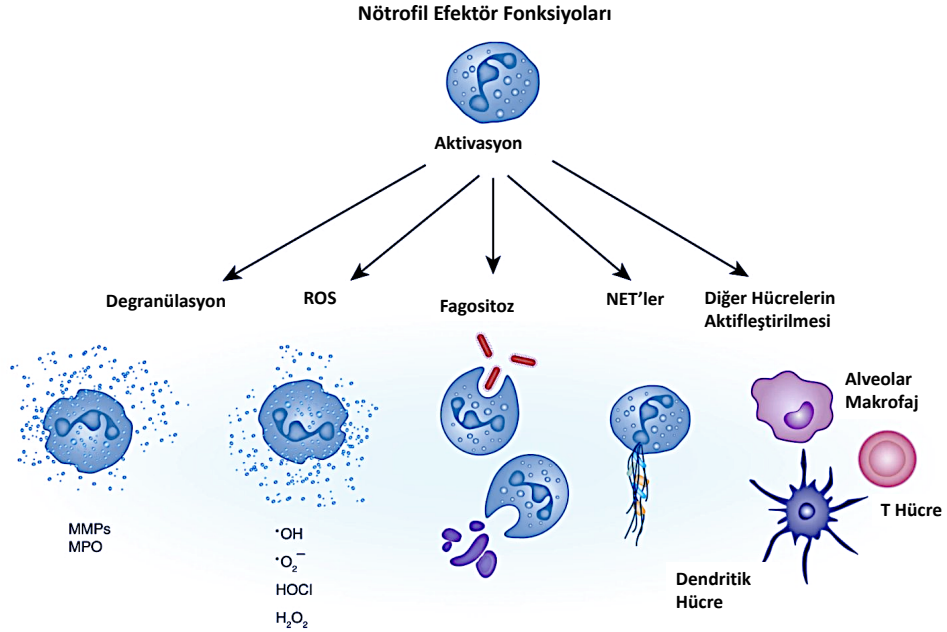
Virüs ile ilk olarak karşılaşp, immün yanıtın yönünü şekillendiren hücreler miyeloid seriye ait olan monositik/granülositik hücre (monosit, makrofaj, nötrofil, dendritik hücre, MDSC) alt gruplardır (Shi, & Pamer, 2011; Stegelmeier ve ark., 2019; Wang ve ark., 2008; Witko-Sarsat, Rieu, Descamps-Latscha, Lesavre, & Halwachs-Mecarelli 2000). Bu hücreler viral enfeksiyona neden olan patojenle ilgili moleküler kalıpları (*pathogen associate molecular patterns*, PAMP) tanıyan, patern tanıma reseptörleri (*pattern recognition receptors*, PRR) bulundurlar. PRR'ler enfekte hücreler ya da bağışıklık hücrelerindeki tip 1 interferon (*type 1 interferons*, IFNs) ve diğer sitokinleri indükleyerek edinsel immün sistemi uyarırlar (Diebold, 2009; Koyoma ve ark., 2008; Takeuchi, & Akira, 2007; Thompson, Kaminski, Kurt-Jones, & Fitzgerald, 2011).

Miyeloid hücreler lizozomal enzimleri, granülleri ve ürettikleri ROS, NO ile patojenin eliminasyonunu sağlar. Bu hücreler i) sitokin ve kemokinlerin salınması ii) lenfosit ve diğer miyeloid hücrelerin uyarılması iii) enfeksiyon sonrası immün düzenleme ve inflamasyonun modülasyonu gibi bir dizi olayın düzenlenmesinde görev alırlar (Stegelmeier ve ark., 2009).

Nötrofiller, inflamasyon alanına ilk olarak gelen ve inflamasyonun şekillenmesinde, sonlanmasında ve ortamın temizlenmesinde görev alır. Patojenleri temizlemek için yeterli nötrofil aktivasyonu gerekliken, uygun olmayan veya

kontROLSÜZ aktivasyon da enfekte dokularda ciddi patolojik sonuçlara neden olur. Nötrofillerin birincil savunma yolu fagositozdur. Fagosit edilen patojenleri ROS ve NO ile elimine ederler (Şekil 2.12) (Johansson, & Kirsebom, 2021; Naumenko, Turk, Jenne, & Kim, 2017; Rawat, Vрати, & Banerjee 2021).

Periferik kana geçen nötrofiller 1-4 günlük yaşam sürelerini tamamlayarak makrofajlar tarafından fagosit edilirler (Grieshaber-Bouyer, & Nigrovic, 2019; Lahoz-Beneytez ve ark., 2016). Solunum yolu enfeksiyonlarında nötrofillerin akciğere infiltrasyonu enfeksiyonun temizlenmesine ya da anti-viral bir bağışıklık tepkisi oluşmasına katkıda bulunabilir (Tate ve ark., 2009). Aşırı nötrofil infiltrasyonu, konak solunum yollarında tıkanıklık ve inflamasyonu destekleyebileceği için ciddi klinik sonuçlara yol açabilir (Rawat ve ark., 2021; Wang ve ark., 2019).



Şekil 2.12 Nötrofil efektör fonksiyonları. MMPs, *matrix metalloproteinase*: matriks metalloproteinazlar; MPO, *myeloperoxidase*: mieloperoksidaz; OH, *oxygen hydroxyl*: oksijen hidroksil; O₂⁻, *oxygen*: oksijen; HOCl, *hypochlorous acid*: hipokloröz asit; H₂O₂, *hydrogen peroxide*: hidrojen peroksit; ROS, *reactive oxygen species*: reaktif oksijen türleri; NET, *neutrophil extracellular traps*: nötrofil hücre dışı tuzaklar (Johansson, & Kirsebom, 2021).

MDSC'ler anti viral immün yanıtlarda inflamasyon kaynaklı kemik iliğinin çeşitli sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerince (M-CSF, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, VEGF, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 vb) uyarılması sonucu olgunlaşmalarını

tamamlayamadan dolaşıma katılırlar. MDSC'ler özellikle kanser patolojisinde önemli role sahip hücreler olarak tanımlanmış olup, tümör mikroçevresinde ve periferde bulunan T hücre, NK, antijen sunan hücreler ve diğer immün sistem hücrelerinin işlevlerini sınırlandırır. Ayrıca, bu hücrelerin anti-viral bağışıklığı da iyi ve/veya kötü yönde etkileyebildiği bildirilmiştir (Goh, Narayanan, & Hahn, 2013). MDSC'ler inflamasyon bölgesinde bulunduğu gibi dalak, periferik kan ve karaciğer gibi hematojen organlarda da birikir (Sendo, Saegusa, & Morinobu, 2018). Akciğer tutulumlu viral enfeksiyonlarda, anti-viral immün yanıtın dengede olması ve inflamasyonun kontrol altında olması için matür miyeloid hücrelerle, baskılayıcı immatür miyeloid hücrelerin hem akciğer dokusunda hem de periferik dolaşımda bir arada bulunması etkilidir (Dai, Gazzar, Li, Moorman, & Yao, 2015).

2.6 Koronavirüsler ve Zaman İçindeki Gelişimleri

Koronavirüsler (*coronaviruses*, CoV), memelileri ve kuşları enfekte edebilen ve akut solunum hastalıklarına neden olan zarflı RNA (*ribonucleic acid*: ribonükleik asit) virüsleridir. Nidovirales takımının Coronaviridae ailesindeki Coronavirinae alt grubuna aittir. Dört cinse ayrılır: Alfakoronavirüs, Betakoronavirüs, Gammakoronavirüs ve Deltakoronavirüs (Chen, Liu, & Guo, 2020). İnsanda bu virüsler hafif görülebilirken şiddetli akut solunum sendromu, mide, bağırsak, karaciğer ve nörolojik hastalıklara da sebebiyet verebilmektedir (McFee, 2020). Bu zamana kadar insanda 6 farklı koronavirüs bildirilmiştir: HCoV (*human coronaviruses*, HCoV) 229E, OC43, NL63, HKU1 SARS-CoV ve MERS-CoV (Şekil 2.13) (Hasöksüz, Kiliç, & Saraç, 2020).

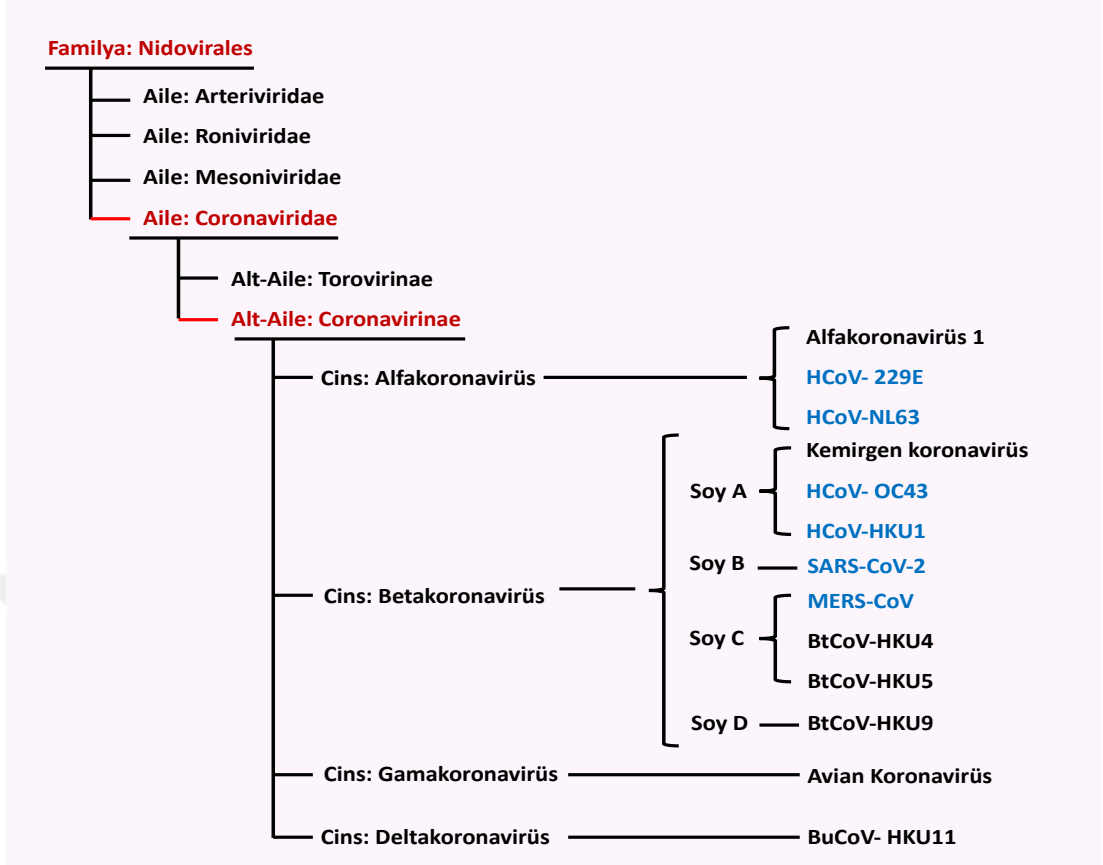
1960'larda tanımlanan HCoV-229E ve HCoV-OC43 klasik koronavirüsler olarak bilinmektedir. HCoV-229E alfakoronavirüs, HCoV-OC43 ise betakoronavirüs cinsidir. Bu iki koronavirüs için de klinik tabloya bakıldığında halsizlik, baş ağrısı, burun akıntısı, hapşurma, boğaz ağrısı ve hastaların %10-20'sinde ateş ve öksürük semptomları ile karakterize edilmiştir. HCoV-229E, üst solunum yolu enfeksiyonunun klinik semptomları olan Chicago'daki tıp öğrencilerinde bulunmuştur, HCoV-OC43 ise soğuk algınlığı olan bir hastanın nazofaringeal yıkaması sırasında bulunmuştur (Kirtipal, Bharadwaj, & Kang, 2020; Su ve ark., 2016; van der Hoek ve ark., 2004; Wevers & van der Hoek, 2009).

2002 yılında Çin'in Guangdong eyaletinde bildirilen ve pnömoniye neden olan ağır akut solunum yolu yetersizliği sendromu (*severe acute respiratory syndrome coronavirus*, SARS-CoV) betakoronavirüs cinsindendir. İlk başlarda ateş, kas ağrısı, baş ağrısı, halsizlik ve titreme ile başlayan hastalık ilerleyen günlerde öksürük, nefes darlığı, solunum sıkıntısı ve ölümle sonuçlanabilir (Peiris ve ark., 2003; Su ve ark., 2016)

2004 yılında Hollanda'da nezle, konjoktivit ve bronşiyolitli 7 aylık bir çocuktan izole edilen HCoV-NL63 alfakoronavirüs cinsindendir. Daha çok çocuklar, yaşlılar ve solunum yolu hastalıkları olan ve bağışıklığı baskılanmış kişileri enfekte etmektedir. Öksürük, burun akıntısı, ateş ve hipoksi semptomları ile karakterize edilir. Çocuklarda HCoV-NL63, akut laringotrakeobronşit ile birlikte görülmektedir (Su ve ark., 2016; Weiss, & Navas-Martin, 2005)

2005 yılında Hong Kong'da 71 yaşında pnömoni ve bronşiyolit ile hastaneye kaldırılan hastadan izole edilen HCoV-HKU1 betakoronavirüs cinsindendir. Çocuklar, yaşlılar ve altta bir hastalığı olan yetişkinlerde görülür. Ateş, burun akıntısı, öksürük ve nefes darlığı semptomları ile karakterize edilmiştir (Su ve ark., 2016; Weiss, & Navas-Martin, 2005; Wevers & van der Hoek, 2009)

2012 yılında Suudi Arabistan'ın Cidde kentinde ciddi bir solunum yolu hastalığından ölen bir hastadan izole edilen Orta Doğu solunum sendromu ile ilişkili koronavirus (*Middle East respiratory syndrome coronavirus*, MERS-CoV) betakoronavirüs cinsindendir. Oldukça patojenik olan bu virüs asemptomatik solunum sıkıntısı, septik şok ve ölümle sonuçlanan böbrek yetmezliği ile seyreden şiddetli pnömoniye kadar varan sonuçlar doğurmaktadır. Ateş, öksürük, titreme, boğaz ağrısı, miyalji, artralji, pnömoni, hastaların %33'ünde kusma ve ishal ve akut böbrek yetmezliği semptomları ile karakterize edilmiştir (Bleibtreu, Bertine, Bertin, Houhou-Fidouh, & Visseaux, 2020; Chafekar, & Fielding, 2018; de Wit, van Doremalen, Falzarano, & Munster, 2016; Su ve ark., 2016)



Şekil 2.13 Koronavirüs ailesi (Yan ve ark., 2020'den uyarlanmıştır.)

2.7 SARS-CoV-2

2019 aralık ayında Çin'in Hubei eyaletinin Wuhan kentinde ortaya çıkmış olup 31.12.2019 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü'ne (World Health Organization; WHO) nedeni bilinmeyen ağır pnömoniye yol açan bir salgın bildirilmiştir. Bu salgına sebep olan virüs yeni koronavirus, 2019-nCoV ya da diğer tanımı ile akut ağır solunum sendromu coronavirus 2 (SARS-CoV-2), dünya genelinde hızla yayılması ve sebep olduğu ateş, ağır solunum hastalıkları ve pnömoni nedeniyle pandemi olarak ilan edilmiş ve COVID-19 (Koronavirüs Hastalığı-2019; *Coronavirus Disease- 2019*) olarak adlandırılmıştır (Chan ve ark., 2020; Huang ve ark., 2020; Muralidar, Ambi, Sekaran, & Krishnan 2020; Tay, Poh, Renia, MacAry, & Ng, 2020; Umakanthan ve ark., 2020).

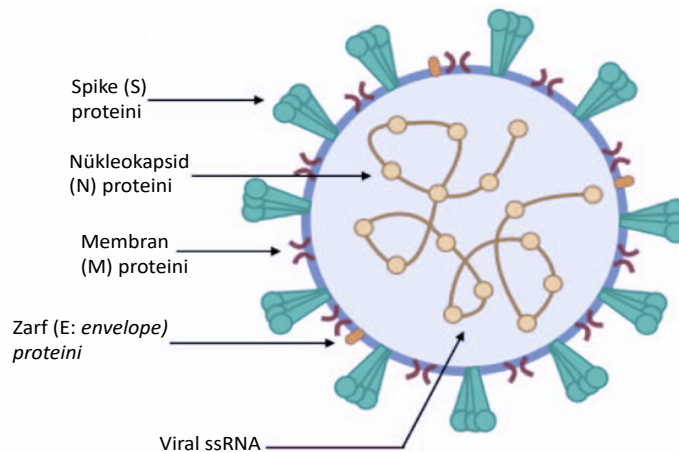
2002 yıllarında görülen SARS-CoV ile benzer genom dizilemesine sahip olan SARS-CoV-2, alt solunum yolu epitelyal hücrelerinde de bulunan anjiyotensin

dönüştürücü enzim (*anjiyotensin converting enzim*, ACE2) reseptörü aracılığı ile hücre içine girdiği belirlenmiştir. (Corman ve ark., 2020; Datta, Liu, Fischer, Rappaport, & Qin, 2020; Hui ve ark., 2020; Peiris ve ark., 2003).

COVID-19'un en yaygın klinik semptomları kuru öksürük, ateş ve nefes darlığıdır. Bazı hastalarda boğaz ağrısı, baş ağrısı, kas ağrısı, yorgunluk ve ishal gibi semptomlar da gözlenmiştir (Chen ve ark., 2020; Hui ve ark., 2020; Seyed Hosseini ve ark., 2020). Hastalığın ilk günlerinde titreme ve solunum sıkıntıları ile başvuran hastalarda ateş görülmemiştir. Çoğu vaka hafif semptomlar gösterse de akciğer grafisinde buzlu cama rastlanmıştır (Seyed Hosseini ve ark., 2020; Yang ve ark., 2020). COVID-19'un semptomları nedeni ile diğer solunum yolu hastalıklarından ayırt edilmesi oldukça güçtür.

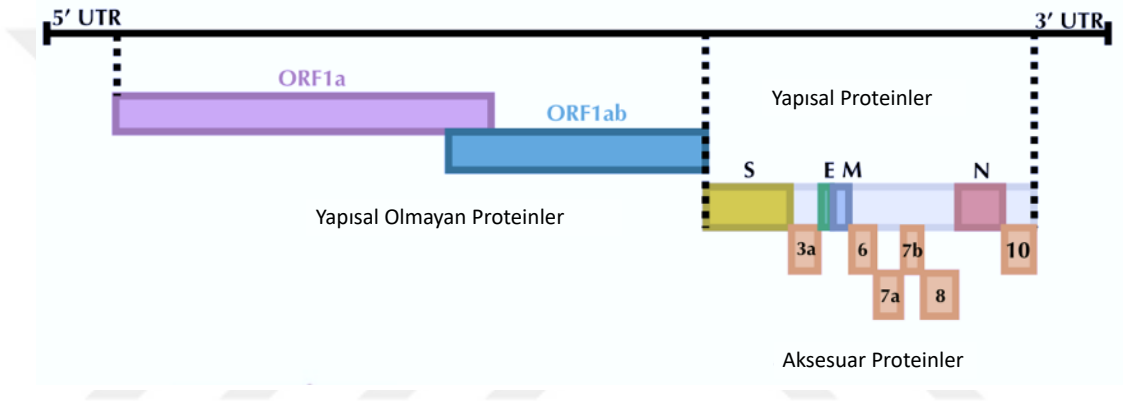
2.7.1 SARS-CoV-2 Yapısı ve Mutasyonları

SARS-CoV-2, 60-140 mikron çapında, tek zincirli RNA içeren zarflı bir virüs olup betakoronavirüs cinsindendir. Zarfı yoğun bir şekilde N-glikanlarla süslenmiş 8-12 nm uzunluğunda homotrimer spike proteinleri içerir. Diğer HCoV'lere benzer şekilde spike (S), zarf (*envelope*: E), nükleokapsid (N) ve Membran (M) olmak üzere 4 tane yapısal 16 tane yapısal olmayan protein bulundurur (Şekil 2.14) (Amor, Fernandez, & Baker, 2020; Cui, Li, & Shi, 2019; Lu ve ark., 2020; Tang ve ark., 2020; Wang ve ark., 2020).



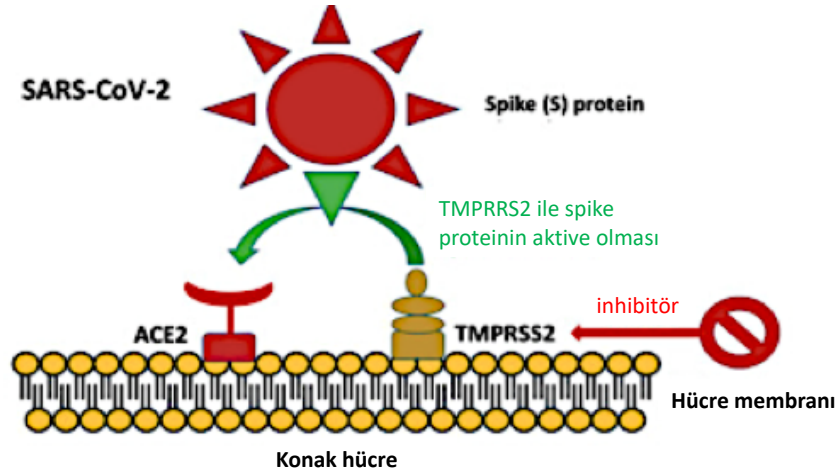
Şekil 2.14 SARS-CoV-2 yapısı. Viral ssRNA, *single-stranded ribonucleic acid*: tek zincirli ribonükleik asit. (Amor ve ark., 2020'den uyarlanmıştır.)

Virüs genomunun 5' ucu, yapısal olmayan proteinlerin kendi kendine üretilmesinde önemli rolü olan replikaz proteini de dahil iki büyük polipeptid (pp1a, pp1b) kodlayan açık okuma çerçevesinden (*open reading frame*, ORF) oluşur. Bunlar ORF1a ve ORF1b'dir. ORF 2-10'ler yapısal proteinleri kodlar. SARS-CoV-2'nin ORF8 ve ORF10'u diğer virüslerden farklıdır. Bunun da virüsün bulaşma hızının virüsler arasında farklılık göstermesi ile ilgili olduğu söylenmiştir (Şekil 2.15) (Amor, Fernandez, & Baker, 2020; Cui, Li, & Shi, 2019; Huang, Yang, Xu, Xu, & Liu, 2020; Lu ve ark., 2020, Tang ve ark., 2020; Wang ve ark., 2020).



Şekil 2.15 SARS-CoV-2 virüsünün genom yapısı. ORF1a, *open reading frame 1a*: açık okuma çerçevesi 1a; ORF1b, *open reading frame 1b*: açık okuma çerçevesi 1b; 5'UTR, 5' untranslated region: 5' çevrilmemiş bölge; 3'UTR, 3' untranslated region: 3' çevrilmemiş bölge; S, *spike protein*: spike proteini; E, *envelope protein*: zarf proteini; M, *membrane protein*: membran proteini; N, *nucleocapsid protein*: nükleokapsit proteini (Amor ve ark., 2020'den uyarlanmıştır).

Salgının başlarında SARS-Cov-2'nin, alt solunum yolu epitelyal hücrelerinde de eksprese olduğu bilinen anjiyotensin dönüştürücü enzim (*anjiyotensin converting enzim*; ACE2) reseptörü aracılığı ile hücre içine girdiği tespit edilmiştir (Hussain ve ark., 2005; Sawicki, & Sawicki, 2005; Wan, Shang, Graham, Baric, & Li, 2020). Bununla beraber, virüsün zamanla transmembran proteazı-serin 2 (Transmembrane protease-serine 2, TMPRSS2) ile indüklenen spike proteini sayesinde de konakçı hücreyi enfekte edebildiği belirlenmiştir. TMPRSS2 ekspresyon modülasyonunun, konakçı hücrelere viral girişi bloke ederek SARS-CoV-2 enfeksiyonunu tedavi etmek için alternatif bir strateji sağlayabileceğini düşündürmektedir (Şekil 2.16) (Srivastava ve ark., 2021; Triposkiadis ve ark., 2021).



Şekil 2.16 SARS-CoV-2 virüsünün konak hücreye enfekte olması. SARS-CoV-2, *Severe Acute Respiratory Syndrome causing Coronavirus*: şiddetli akut solunum yolu sendromu; Spike (S) Protein, Spike (S) proteini; ACE2, *anjiyotensin converting enzim*: anjiyotensin dönüştürücü enzim; TMPRSS2, *Transmembrane protease-serine 2*: transmembran proteazı-serin 2 (Triposkiadis ve ark., 2021’den uyarlanmıştır).

SARS-CoV-2 genomundaki mutasyonların küçük bir oranı fonksiyonel özellikleri etkileyecek ve enfektiviteyi, hastalık şiddetini ya da konak hücre ile etkileşimleri değiştirebilir. SARS-CoV-2 virüsünün spike proteini furin proteaz tarafından ikiye (S1 ve S2) bölünür. S1, büyük ölçüde amino terminal bölgeden ve reseptör bağlayıcı bölgeden (*receptor-binding domain*, RBD) oluşur ve konak hücrede bulunan ACE2’ye bağlanmadan sorumludur. S2, proteinin trimerik çekirdeğini bulundurur ve konak hücrenin membran füzyonundan sorumludur. Bu bölünme reseptör bağlanması için konformasyonel değişiklik, enfektive ve virülans için önemlidir (Harvey ve ark., 2020; Hoffmann, Kleine-Weber, & Pöhlmann, 2020; Wrobel ve ark., 2020).

Pandeminin erken dönemlerinden itibaren SARS-CoV-2 genomik sekansı ortaya konmuş ve hali hazırda birçok kişi tarafından *Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID)* veri tabanına yüklenerek tüm dünya ile paylaşılmaktadır. SARS-CoV-2’de gerçekleşen mutasyonlar pandeminin başlarında genellikle nötral veya etkisiz (*deleterious*) özellikte olup, amino asitlerde meydana gelen değişimler proteinlerin yapı ve işlevinde ciddi fonksiyon değişikliklerine sebebiyet vermemiştir (Frost, Magalis, & Kosakovsky, 2018). Fakat, Nisan 2020 ile ortaya çıkan D614G mutasyonu ile ortaya çıkan varyantın bulaşıcılık ve klinik seyre olumsuz etkileri

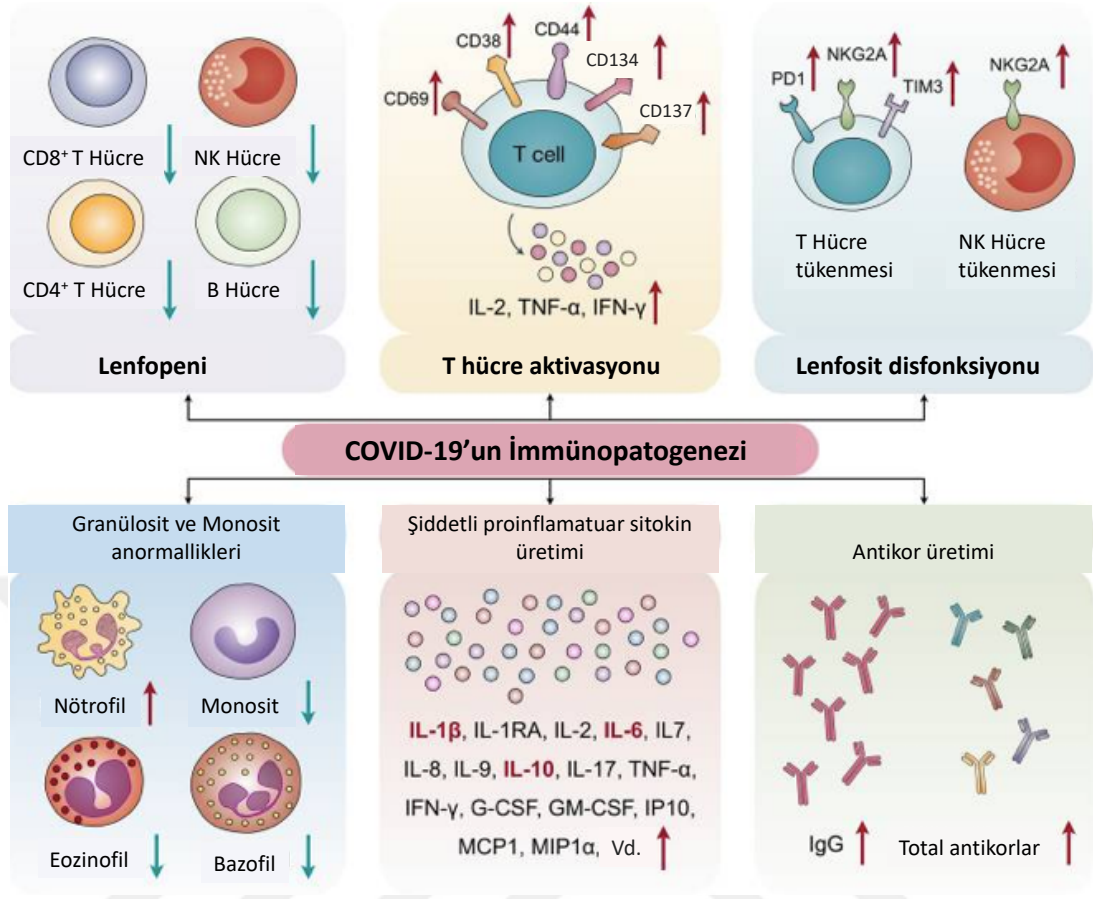
tanımlanmıştır (Harvey ve ark., 2021). İskoçya’da Mart 2020 tarihinde ise, N439K (Pango nomenklatür sistemine göre isimlendirmesi, B.1.141 ve B.1.258) hızlıca iki formda ortaya çıkmış ve diğer Avrupa ülkelerine yayılmıştır. Bu varyantın ACE2 reseptörüne afinitesinin daha yüksek olduğu ve antikorların nötralizan etkisini azalttığı raporlanmıştır (Thomson ve ark., 2021). Kasım 2020’de Danimarka’da ilk olarak “cluster 5” olarak adlandırılan ve günümüzde B.1.1.298 ismi ile bilinen varyant tanımlanmıştır. Bu varyantta reseptör bağlanma motif (*receptor-binding motif*, RBM) değişimi olup (Y453F), yine ACE2-bağlanma afinitesinde artışa sebep olmuştur (Hammer ve ark., 2020; Starr ve ark., 2020). Ayrıca, B.1.1.298 hattında birçok kez SARS-CoV-2 popülasyonunda görülen amino-terminal ucunda (*amino terminal domain*, NTD) Δ69-70 delesyonu da bulunmakta olup, bu değişimin virüs enfeksiyon kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir. COVID-19 pandemisine sebebiyet veren SARS-CoV-2 (D614G); günümüzde B.1.1.7 İngiltere, B.1.351 Güney Afrika, P.1 Brezilya olmak üzere üç varyant ile tanımlanmaktadır. İngiltere varyantında S bölgesinde N501Y; Güney Afrika varyantında N501Y, E484K, K417N; Brezilya varyantında N501Y ve E484K mutasyonları bulunmaktadır. Bu varyantlar daha güçlü bulaş, antikor bağlanmada zayıflama ve immün yanıtı kaçırmaya yönelik pozitif seçim geçirmiştir. B.1.351 ve P.1 varyantı taşıyan kişilerin aşının daha az etki gösterdiği saptanmıştır (Davies ve ark., 2021; Kupferschmidt, 2021; Luring, & Hodcroft, 2021; Sabino ve ark., 2021). COVID-19’a karşı aşı ve tedavi stratejilerinde virüsün geçirdiği olası fonksiyonel mutasyonlar etkin olabildiği için geleceğe yönelik derin mutasyon tarama (*deep mutational scanning*, DMS) yapılması bilimsel otoritelerce önerilmektedir (Harvey ve ark., 2021).

2.7.2 SARS-CoV-2 İmmunopatogenezi

SARS-CoV-2 virüsü sadece anti viral immün yanıtları aktive etmekle kalmaz aynı zamanda şiddetli proinflatuar sitokin salınımı ile karakterize, kontrolsüz inflamatuar yanıtların sonucu olarak lenfopeni, lenfosit disfonksiyonu ile granüloist ve monosit anormalliklerine neden olur. Bu virüsün neden olduğu bu bağışıklık anormallikleri septik şok ve ciddi çoklu organ işlev bozukluklarına sebebiyet vermektedir. Lenfopeni özellikle ağır COVID-19 vakalarında görülmektedir. Ayrıca hastalarda CD4⁺ T hücre, CD8⁺ T hücre, NK hücre ve B hücre sayılarında belirgin bir azalma görülür. CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler üzerinde CD38, CD44, CD69, CD134 ve CD137 yüksek seviyelerde eksprese edilir. Yüksek düzeydeki IL-2, TNF- α ve IFN- γ sitokinlerinin salınımı bu hücrelerin merkezi bellek fenotipi sergilemesini sağlar (Şekil 2.18) (Huang ve ark., 2020; Qin ve ark., 2020; Tan ve ark., 2020; Xu ve ark., 2020; Yang ve ark., 2020).

COVID-19 hastalarındaki özellikle CD8⁺ T hücreler programlanmış ölüm proteini-1 (*programmed cell death protein-1*, PD-1), T hücre immünoglobülin bölgesi ve müsin bölgesi 3'ü (*T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3*, TIM-3) ve lektin benzeri reseptör alt ailesi C üye 1 reseptörünü (*killer cell lectin-like receptor subfamily C member 1 receptor*, NKG2A) eksprese etmekte olup, tükenmiş T hücre fenotipini sergilemektedir. Ayrıca, önemli sitotoksik fonksiyona sahip NK hücrelerinde de NKG2A ekspresyon artışının da tükenmişlik fenotipi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Diao ve ark., 2020; Yang ve ark., 2020; Zheng ve ark., 2020). Ayrıca COVID-19 hastalarında nötrofiller artış gösterirken monosit, eozinofil ve bazofillerin sayısında azalma görülür (Şekil 2.18) (Diao ve ark., 2020; Qin ve ark., 2020; Zhou ve ark., 2020).

COVID-19 immünopatogenezindeki diğer bir karakteristik bulgu da sitokin fırtınasıdır. Hastalarda IL-1 β , IL-6 ve IL-10 sitokinleri başta olmak üzere IL-1RA, IL-2, IL-7, IL-8, IL-9, IL-17, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, IP10, MCP1, MCP1 α vb. gibi sitokinlerin ekspresyonu yükselir. Ayrıca Immünoglobülin G (immunoglobulin G, IgG) ve toplam antikor titresini artış gösterir (Şekil 2.18) (Huang ve ark., 2020; Mohamed Khosroshahi, 2021; Qin ve ark., 2020; Rokni, Mokhtari, & Noorbakhsh, 2021; Tan ve ark., 2020; Xu ve ark., 2020; Yang ve ark., 2020)



Şekil 2.18 COVID-19'un immünopatogenezi. IL-1 β , interleukin 1 β : interlökin 1 β ; IL-1RA, interleukin 1RA: interlökin 1RA; IL-2, interleukin 2: interlökin 2; IL-6, interleukin 6: interlökin 6; IL-7, interleukin 7: interlökin 7; IL-8, interleukin 8: interlökin 8; IL-9, interleukin 9: interlökin 9; IL-10, interleukin 10: interlökin 10; IL-17, interleukin 17: interlökin 17; TNF- α , *tumor necrosis factor- α* : *tümör nekroz faktör- α* ; G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*: granülosit koloni uyarıcı faktör; GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*: granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör; IP10, *interferon gamma-induced protein 10*: interferon gama ile indüklenen protein 10; MCP1, *monocyte chemoattractant protein-1*: monosit kemoatraktan protein-1; MIP1 α , *macrophage inflammatory protein 1 alfa*: makrofaj inflamatuvar protein 1 alfa; PD1, *programmed cell death protein-1*: programlanmış ölüm proteini-1; TIM3, *T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3*: T hücre immünoglobülin bölgesi ve müsin bölgesi 3; NKG2A, *killer cell lectin-like receptor subfamily C member 1 receptor*: öldürücü hücre lektin benzeri reseptör alt ailesi C üye 1 reseptörü (Yang ve ark., 2020'den uyarlanmıştır.)

SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu immünopatolojinin klinik etkilerine bakıldığında lenfopeni ile başvuran COVID-19'lu hastalar sekonder bakteriyal enfeksiyonlara karşı daha yatkındır. Bu da hastalığın ilerlemesine ve şiddetinin artmasına sebebiyet vermektedir (Yang ve ark., 2020). Sitokin fırtınası ise akciğer

hasarı, solunum yetmezliği ve akut solunum sıkıntısı sendromuna yol açabileceği gibi, alanin aminotransferaz (*alanine aminotransferase*, ALT), aspartat aminotransferaz (*aspartate aminotransferase*, AST) ve γ -glutamin transferaz (*γ -glutamine transferase*, γ -GT) seviyelerinin normalden yüksek olması ile karaciğer hasarı dahil olmak üzere inflamatuvar kaynaklı çoklu organ fonksiyon bozukluğuna neden olabilmektedir (Chen ve ark., 2020; Xu ve ark., 2020; Wu ve ark., 2019).

Makrofajlar ve nötrofillerin bronkoalveolar lavaj sıvısında biriktiği, periferik kanda nötrofillerin sayısı artarken CD14⁺ monositlerin sayısının da düştüğü raporlanmıştır. Tek hücreli dizileme analizleri sonucunda miyeloid hücrelerin farklılaşma yörüngesinin GMP'den miyeloblast ve monoblastlara farklılaşma ile başladığı bildirilmiştir. Kemik iliğinde devam eden süreçte miyeloblastlar pro-miyelositlere, pro-miyelositler miyelositlere ve miyelositler de pre-nötrofillere (CD10^{düşük}, CD101⁻ ve CXCR4^{-/+}) ve G-MDSC'lere dönüşürken; monoblastlar pro-monositlere, pro-monositler monositlere, monositler de dendritik hücreler, immatür makrofajlar ve M-MDSC'lere dönüştüğü raporlanmıştır (Brodin, 2021; McGonagle, Ramanan, & Bridgewood, 2021; Qin, Liu, Yang, Yu, & Zhang, 2021).

Monositler CD14 ve CD16 yüzey belirtecini taşıma düzeylerine göre; i) CD14⁺⁺CD16⁻ klasik, ii) CD14⁺⁺CD16⁺ ara düzey (*intermediate*) ve iii) CD14⁺CD16⁺⁺ klasik olmayan monositler olarak temelde üç ana grupta incelenirler. Özellikle ara düzey monositler ağır seyreden COVID-19 hastalarında daha çok bulunmakla beraber Kİ-67, PD-L1, PTXE, CD169 ve CD147 yüzey belirteçlerini yüksek oranda sergilediği bildirilmiştir (Parackova ve ark., 2020; Payen ve ark., 2020; Qin ve ark., 2021). Ağır seyreden COVID-19 hastalarında artış gösteren bir diğer grup ise pre-nötrofillerdir ve yüzeylerinde yüksek oranda CD177, ELANE, MPO, OLFM4 ve MMP8 belirteçlerini taşırlar (Qin ve ark., 2021).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonucu nötrofiller, enfeksiyon alanına sürekli infiltratör olarak ve bağışıklık tepkisini yükseltmek için NET formasyonu ile savunma yapmaktadır. Fakat, NET degranülasyonu ile tetiklenen sitokin fırtınasına bağlı olarak akut solunum sıkıntısı sendromuna yol açabilirler (Guan ve ark., 2019; Huang ve ark., 2020; Tomar, Anders, Desai, & Mulay, 2020; Zuo ve ark., 2020). COVID-19 sonucu hayatını kaybeden hastaların birinden alınan akciğer otopsisinde pulmoner kapillerlerde geniş bir nötrofil infiltrasyonu ve alveolar boşluğa ekstrasvazasyon ile

akut kapillerit ve trekeanın tüm hava yolunda inflamasyona neden olan nötrofilik mukozit görülmüştür (Barnes ve ark., 2020; Tomar ve ark., 2020).

Spike proteinin ACE2'ye bağlanması sonucu SARS-CoV-2 virüsü epitelyal hücrelerin yanı sıra endotelyal hücreleri de enfekte eder. Bunun sonucunda azalan ACE2 ekspresyonu nötrofillerin enfeksiyon bölgesine gelmesini uyarır. Nötrofiller, sitokin salgılanmasını indüklemek için ortamda bulunan diğer immün ve immün olmayan hücrelerin patern tanıma reseptörlerini aktive eden NET'ler oluşturur. NET'ler tarafından salınan hücre dışı DNA, trombositleri aktive eder. Aktive trombositler ve eritrositler bir tromboz oluşturur. NET'lerle salınan hücre dışı histonlar ise, epitelyal ve endotelyal hücrelerde nekrozu tetikler. Tüm bunlar COVID-19'da hastalık şiddetini ağırlaştıran bir nekroinflamasyonun oluşmasına neden olur (Nakazawa ve ark., 2018; Tomar ve ark., 2020). Ayrıca, COVID-19'da nötrofillerin akciğer dokusuna göç ederek aşırı ROS salgılaması ile birlikte akciğer dokusu ve kan hücresi fonksiyonlarının bozulması ve bunun sonucunda da hipoksik hastalarda solunum yetmezliği sorununa yol açabilmektedir (Laforge ve ark., 2020; Qin ve ark., 2021).

Kemik iliği kaynaklı MDSC'ler olgun dendritik hücrelere, makrofajlara ve granülositlere hızlı bir şekilde farklılaşabilmektedir. Sağlıklı bireylerde enfeksiyon veya steril inflamasyon olmadığı zaman son derece düşük seviyelerde bulunur. Kanserler, enfeksiyonlar ve kronik inflamatuvar bozukluklar gibi olgun miyeloid hücrelere farklılaşmanın kısmen bloke edildiği patolojik durumlarda sayıları önemli ölçüde artar (Gabrilovich, & Nagaraj, 2009). MDSC'ler özellikle ağır COVID-19'lu hastalarda artış göstermekle birlikte, şiddetli ve hafif COVID-19'lu hastaların semptomlarının başlangıcından iyileşme sürecine kadar periferik kanlarındaki immün hücrelerinin çoğunu oluşturmaktadır (Agrati ve ark., 2020; Falck-Jones ve ark., 2021; Koushki ve ark., 2021; Qin ve ark., 2021).

MDSC'ler anti inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (*inducible nitric oxide synthase*, İNOS) aracılı IFN- γ üretimini ve arginin ve sistein amino asitlerini tüketerek T hücre proliferasyonunu ve aktivasyonunu engeller. MDSC'ler enfeksiyonun erken evrelerinde immünosupresif özelliği ile doku homeostazını ve hiperinflamasyonu önlemeye yardımcı olur (Koushki ve ark., 2021). Ayrıca, MDSC'ler T hücre proliferasyonu ve aktivasyonunu baskılama özellikleri

dışında makrofajların sitokin üretimini zayıflatma, NK hücre fonksiyonunu bozma, T regülatör hücre proliferasyonunu indükleme ve B hücre aktivasyonunu baskılama gibi birçok rol oynar (Agrati ve ark., 2020; Koushki ve ark., 2021; O'Connor, Rastad, & Green, 2017).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

İlgili Yüksek Lisans Tez çalışması, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 06.01.21 tarihli, 2021-1/21 numaralı karar sonucunda Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Bursa İl Sağlık Müdürlüğü Sağlık Bilimleri Üniversitesi Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne rutin kontroller için başvuran sağlıklı bireylerden ve COVID-19 tanı ve takip için başvuran hasta bireylerden toplanan periferik kan örnekleri ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

3.1 Çalışmada Kullanılan Maddeler

Bu tez kapsamında kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler firmalarına göre sıralanmıştır. Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (EUROIMMUN, Almanya) ; Fötal Buzağı Serum (FBS) (Biowest, Fransa); Penisilin-Streptomisin (Biowest, Fransa); RPMI 1640 (Biowest, Fransa); Ficoll 1.077g/mL (Capricorn Scientific, Almanya); Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) (Biolegend, ABD); FACS Flow Cell Wash (BD, ABD); RBC Liziz Tamponu (Sony Biotechnology, ABD) Tripsin EDTA (Biowest, Fransa); 2'7' diklorofloresin diasetat (Sigma, ABD); Diaminofloresin-FM diasetat (DAFDA) (Sigma, ABD); Propidyum İodür Çözeltisi (Biolegend, ABD); Birefeldin A çözeltisi (Biolegend, ABD); Forbol 12-Miristat 13-Asetat (PMA) (Sigma, ABD); Tam Kan CD66b Microbeads (Miltenybiotech, Almanya); CD3 microbeads, insan (Miltenybiotech, Almanya); LS Kolon (Miltenybiotech, Almanya); L-glutamin (Lonza, Belçika); LEGENDplex insan temel bağışıklık tepkisi paneli (Biolegend, ABD); Anti insan CD33 (klon:D3HL60) monoklonal antikor (mAb) (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD11b (klon: Bear1) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD15 (klon:80H5) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan HLA-DR (klon:Immu-357) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD80 (klon:MAB104) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD86 (klon:HA5.2B7) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD66b

(klon:80H3) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD33 (klon:D3HL60) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD45 (klon:J33) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD16 (klon:3G8) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD14 (klon:RMO52) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan LOX-1 (klon:15C4) mAb (Biolegend, ABD); Anti insan CD273 (klon:MIH8) mAb (Biolegend, ABD); Anti insan CD274 (klon:MIH2) mAb (Biolegend, ABD); Anti insan CD273 (klon:MIH18) mAb (BD, ABD); Anti insan CD274 (klon:MIH1) mAb (BD, ABD); Anti insan CD114 (klon:LMM741) mAb (BD, ABD); Anti insan CD154 (klon:TRAP1) mAb (BD, ABD); Anti insan CD62L (klon:DREG-56) mAb (BD, ABD); Anti insan CD69 (klon:FN50) mAb (BD, ABD).

3.2 Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler

PBS Çözeltisi: Steril PBS tablet 1000mL başına bir adet olacak şekilde dH_2O 'ya eklenerek (1X) çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

Tam RPMI 1640 Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren RPMI 1640 üzerine son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktif), %1 v/v olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) çözeltisi: CFSE tuzu ($50\mu\text{g}$) üzerine $18\mu\text{l}$ DMSO eklenerek çözüldü ve -86°C 'de saklandı.

Tripan Mavisi Çözeltisi: Steril ortamda tartım sonrasında 1X PBS ile 0.4'lük çözelti hazırlandı ve $0.22\mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

MACS çözeltisi: Steril ortamda 49.55mL 1X PBS ile, $250\mu\text{l}$ FBS ve $200\mu\text{l}$ EDTA ile çözelti hazırlandı. $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

RBC Lysis Buffer (Eritrosit patlatma solüsyonu): 1.1mL eritrosit patlatma solüsyonu (10X) 9.9mL dH_2O 'ya eklenerek 1X çözelti hazırlandı. $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

3.3. Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması

Tez çalışmasında kullanılan örnekler, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Bursa İl Sağlık Müdürlüğü Sağlık Bilimleri Üniversitesi Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne COVID-19 şüphesiyle başvuran ya da COVID-19 tanısı konmuş hastalardan onam formu imzalatılarak, rutin numune alımı sırasında bağlı kalınan rutin prosedürlerdeki hacim miktarında periferik venöz kan EDTA içeren mor kapaklı tüpe alınmıştır. Ayrıca rutin biyokimya çalışmaları sırasında artan periferik venöz kanlar da çalışmaya dahil edilmiştir. COVID-19 negatif olan bireylerden ise onam formu imzalatılarak 5mL periferik venöz kan EDTA içeren mor kapaklı tüpe alınmıştır.

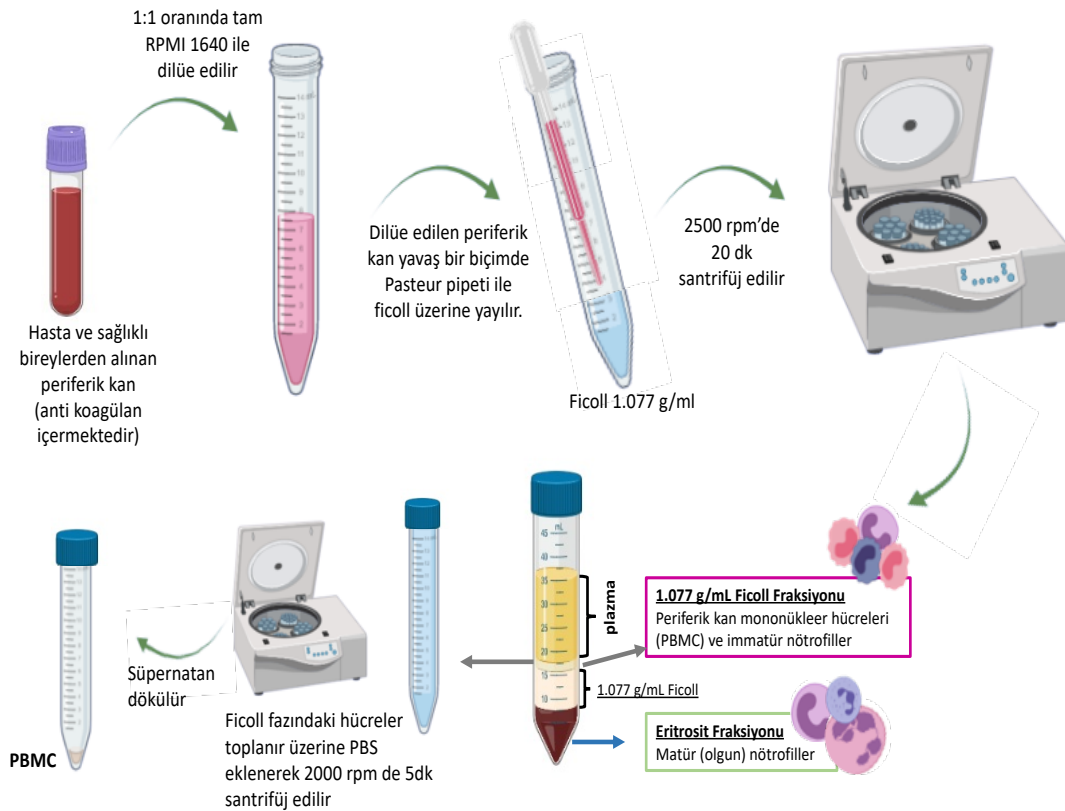
Çalışmada kullanılan G-MDSC'ler immatür miyeloid seriye ait hücrelerdir ve bu hücrelerin hem fenotipik değişimleri hem de var olan nötrofil/monosit grubunun beklemeye dayalı aktive olup hastanın o anki durumunu yansıtamaması ihtimalinden dolayı örnekler en fazla 4 saat içerisinde teslim alınıp, taze olarak çalışılmıştır. COVID-19 pozitif hastalar PCR (*Polymerase Chain Reaction*: Polimeraz zincir reaksiyonu) tarihi ve ilk klinik semptom gösterdikleri tarihe göre 0-3 gün arası (başlangıç koşulu), 4-8 gün arası ve 9-15 gün arası ve 15 günden sonraki dönemdeki bireylerin sonuçları gruplandırılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada Kullanılan Dışlama Kriterleri: Klinik takipleri sonrasında test sonuçları negatif gelen ya da farklı bir enfeksiyon nedeniyle COVID-19 benzeri semptomlar geliştirmiş olduğu belirlenen hastalara ait örnekler ve sağlıklı grupta herhangi bir enfeksiyon bulunması durumunda bu bireylere ait örnekler çalışmadan çıkarılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında 12 gün-18 yaş (ort: 8yaş) aralığında n=111 (E=64, K=47) sağlıklı çocuk kontrol; 1 ay-18yaş (ort:8 yaş) aralığında n=147 (E=68, K=79); COVID-19+ çocuk; 20 yaş-59 yaş (ort: 44yaş) aralığında n=73 (E=41, K=32) sağlıklı erişkin; n=447 (E=220, K=227) 19 yaş-92 yaş (ort:45 yaş) aralığında COVID-19+ pozitif erişkin birey çalışmaya dahil edilmiş olup çocuk hastaların hepsinin klinik durumu asemptomatik ve iyi seyrederken; erişkin bireylerin %54 ü hafif, %22 si ağır %19 u asemptomatik ve %5 i orta düzey klinik duruma sahiptiler. Orta düzey klinik duruma sahip bireyler yapılan çalışmalar sonucu ağır grubuna dahil edilmiştir.

3.4 Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin (*Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC*) İzolasyonu

Sağlıklı ve hasta bireylerden alınan periferik kanlar 1:1 oranında RPMI 1640 ile seyreltildi. 15ml'lik falconun dibine 3mL ficoll (1.077 g/ml) konulduktan sonra seyreltilmiş olan periferik kan yavaş bir biçimde ficoll üzerine yayıldı. Yayılan kan 2500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda ficoll ile plazma arasında kalan periferik kan mononükleer hücreler eritrositlerin alınmamasına dikkat edilerek pastör pipeti yardımı ile toplandı. Toplanan hücreler 15ml'lik falconda toplandı ve üzerine falcon tam dolacak şekilde 1X PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant atıldı. Eritrosit fazında kalan hücreler 1mL PBS içinde süspanse edildi (Şekil 3.1). Bu hücrelerden matür nötrofiller izole edildi.



Şekil 3.1 PBMC'lerin izolasyonu (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır). PBMC, periferik kan mononükleer hücreleri

3.5 Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücrelerin ve İnflamatuar Miyeloid Hücrelerin İmmünojenotiplendirmesi

Tam kan, 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı olmak üzere 3 farklı fraksiyon çalışılmıştır. Üç farklı kan fraksiyonu, 100' er µl akım sitometri tüplerine dağıtıldı. Üzerlerine anti-insan-CD33, -CD11b, -HLA-DR, -CD14, -CD15, -CD16, -CD45, -CD66b, -CD80, -CD86, -CD274 (PD-L1), -CD273 (PD-L2), -Lox-1, CD114, CD62L belirteçlerine karşı üretilmiş monoklonal antikorlar ile uygun konsantrasyonlarda eklendi (tablo-1). Tüpler vortekslendikten sonra +4°C'de 40 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 2mL PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant ile birlikte bağlanmayan antikorlar da uzaklaştırıldı. 150 µl PBS içinde süspanse edilerek BD FACS ARIA III ve Beckman Coulter Navios Ex akım sitometri cihazlarında değerlendirildi.

İlk olarak bu belirteçlerle işaretlenmiş pozitif hücrelerin içinden tek tek düşen hücreler kapılandı. Bunun için forward scatter (FS)-INT ve side scatter (SS)-TOF grafiğinden tek tek düşen hücreler analiz edildi (*doublet discrimination*). Sonrasında tek tek düşen hücrelerin içinden granülarite (SS-INT) ve boyutuna (FS-INT) göre yeni bir kapılama yapıldı. Bu genel kapılama stratejilerinin ardından antikorların konjuge edildiği florokromları gösteren histogram veya nokta saçılım grafikleri çizildi (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3). Analizler Kaluza ve Flow.jo programı kullanılarak değerlendirildi.

İmmünojenotiplendirme ile G-MDSC olduğu belirlenen hücrelerin, fonksiyonel analizleri de Lox-1, CD80, CD86, CD274 (PD-L1) ve CD273 (PD-L2), -CD25, -CD69, -CD154'ün bulunduğu immünojenotiplendirme panelleri ile desteklenmiştir.

Şekil 3.3 Eritrosit fraksiyonunda bulunan matür nötrofillerin CD33, CD14, CD16 ve HLA-DR düzeylerini analiz etmek için kullanılan kapılama stratejisi.

Tablo 3.1 Akım sitometride kullanılan antikorlar ve özellikleri

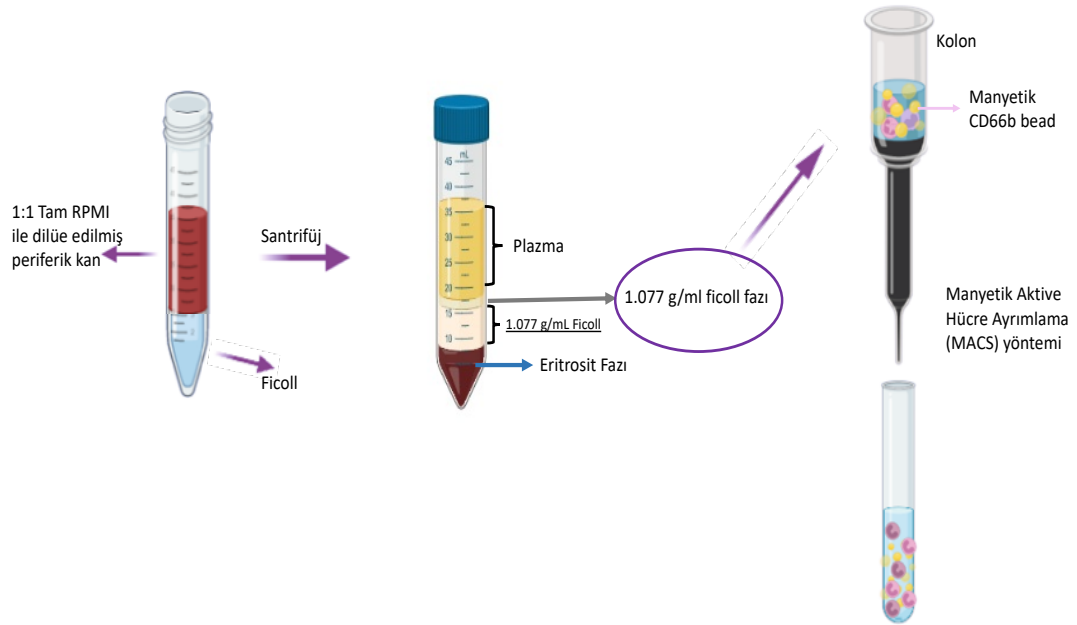
Antikor (anti-insan)	Klon	Florokrom	Eklenen miktar	Tedarikçi
CD11b	Bear1	APC Alexa Flour 750	1 µl	Beckman Coulter, ABD
CD33	D3HL60	FITC	3.5 µl	Beckman Coulter, ABD
	D3HL60	PC7	2 µl	Beckman Coulter, ABD
CD14	RMO52	APC Alexa Flour 700	1 µl	Beckman Coulter, ABD
CD15	80H5	PC5	2 µl	Beckman Coulter, ABD
CD16	3G8	PE	2.5 µl	Beckman Coulter, ABD
CD45	J33	Krom Orange	1 µl	Beckman Coulter, ABD
CD66b	80H3	APC	1 µl	Beckman Coulter, ABD
	80H3	FITC	3.5 µl	Beckman Coulter, ABD
CD62L	DREG-56	APC	9 µl	BD, ABD
CD114	LMM741	PE	5 µl	BD, ABD
CD80	MAB104	APC	1 µl	Beckman Coulter, ABD
CD86	HA5.2B7	PC5	2 µl	Beckman Coulter, ABD
HLA-DR	Immu-357	APC	1 µl	Beckman Coulter, ABD
	Immu-357	Pasific Blur	3 µl	Beckman Coulter, ABD
LOX-1	15C4	BV421	3 µl	Biolegend, ABD
CD273	MIH8	PE Dazzle 594	2.5 µl	Biolegend, ABD
	MIH18	APC	9 µl	BD, ABD
CD274	MIH2	FITC	3.5 µl	Biolegend, ABD
	MIH1	APC	5 µl	BD, ABD
CD25	2A3	APC	2.5 µl	BD, ABD
CD69	FN50	FITC	9 µl	BD, ABD
CD154	TRAP1	PE	5 µl	BD, ABD

3.6 Miyeloid Hücre Alt Grupların Saflaştırılması

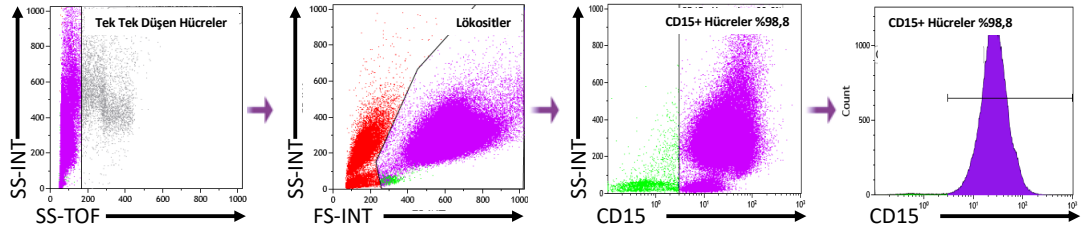
3.6.1 Manyetik Aktive Hücre Ayırılama (MACS) Yöntemi

İmmünofenotiplendirme analizleri sonucunda 1.077 g/mL ficoll fazında biriken hücreler taşıdıkları CD66b ve CD15 belirteçlerine göre manyetik aktive hücre ayırılama (*magnetic-activated cell sorting*, MACS) ile saflaştırılmıştır. İlk olarak 15ml'lik falcona alınan PBMC'lerin üzerine 10mL soğuk MACS buffer eklendi ve santrifüj (2000rpm, 5dk) edildi. Süpernatant kısmı atıldı üzerine 2 mL MACS buffer eklendi. Süspanse edildikten sonra akım sitometri tüpüne aktarıldı ve santrifüj (300g, 10dk, +4°C) edildi. Süpernatant kısmı pellete kadar pipet yardımı ile çekildi ve 100µl MACS bufferda süspanse edildi. 10µl CD66b bead eklendi ve 15 dk buz üzerinde karanlıkta inkübe edildi. Sonrasında üzerine 2mL MACS buffer eklendi ve santrifüj (300g, 10dk, +4°C) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı 500µl macs buffer eklendi ve

süspanse edildi. Ls kolonun altına falcon yerleştirildi ve Ls kolondan 3 mL MACS buffer geçirildi. Son damlanın geldiği görüldüğünde 500µl de süspanse edilen hücreler kolona eklendi. Son damla görüldüğünde 3 mL MACS buffer iki kere kolana eklendi. En son damla geldikten sonra kolon mıknatıstan hızlı bir biçimde ayrıldı ve kolonun altına başka bir falcon yerleştirildi. Kolona 5 mL MACS buffer eklendi ve kolonun enjektörü yerleştirilerek hızlı bir biçimde mıknatısa tutulan CD66b⁺ hücreler falcona boşaltıldı. Falconun üzerine 5mL tam RPMI eklendi ve santrifüj (2000rpm, 5dk) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1 mL tam RPMI da süspanse edildikten sonra sayılıp ko-kültür oranlarında 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekildi. MACS yöntemi boyunca kullanılan MACS buffer soğuk (+4°C) tutulmuştur (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).



Şekil 3.4 İmmünofenotiplendirme sonuçlarına göre fonksiyonel farklılık gösterdiği düşünülen G-MDSC benzeri hücre ve hücre alt gruplarının Manyetik Aktive Hücre Ayrılama yöntemi (MACS) ile elde edilmesi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

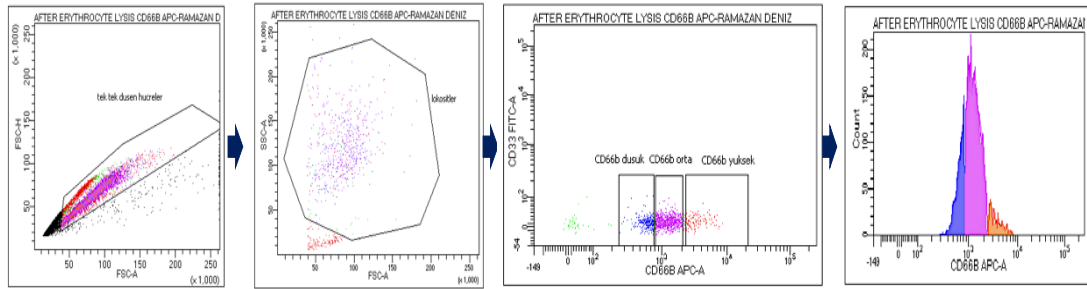


Şekil 3.5 MACS yöntemi sonrası saflaştırılan miyeloid hücrelerin nokta saçılım ve histogram grafikleri ile saflığının belirlenmesi.

3.6.2 Eritrosit Patlatma Yöntemi

PBMC'lerin izolasyonu sonucu eritrosit fazındaki matür olduğu düşünülen CD66b⁺ hücreler eritrosit patlatma solüsyonu (*RBC lysis buffer*) kullanılarak saflaştırılmıştır. 200µl serumsuz RPMI'da süspanse edilen eritrosit fazındaki hücrelerin üzerine 2mL 1X eritrosit patlatma solüsyonu eklendi. 7 dk'lık inkübasyon sırasında yaklaşık 2 dk'de bir hafifçe karıştırıldı. İnkübasyonun ardından 5 mL PBS eklenerek santrifüj (2000 rpm, 5dk) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 500µl 1X patlatma solüsyonu eklendi. 5 dk'lık inkübasyon süresince 1 dk'da bir hafifçe karıştırıldı. İnkübasyonun ardından 5 mL PBS eklenerek santrifüj (2000 rpm, 5dk) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve üzerine 400µl tam RPMI eklenip süspanse edildi. Hücreler sayılıp ko-kültür oranlarında 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekildi. İşlemlerin her bir aşaması karanlık ve 25°C ortamda gerçekleştirildi.

CD66b⁺ matür hücreler oldukça hassas hücreler olup, bu eritrosit patlatma işleminin canlılıklarına zarar verip vermediği PI Propidyum İyodür (PI) boyaması yapılarak doğrulanmıştır. 100µl de serumsuz RPMI ile süspanse edilen hücrelerin üzerine 1µl PI eklenip 10 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. 2 mL PBS ile santrifüj (2000rpm, 5dk) edildikten sonra akım sitometri cihazında canlılık oranı belirlendi.

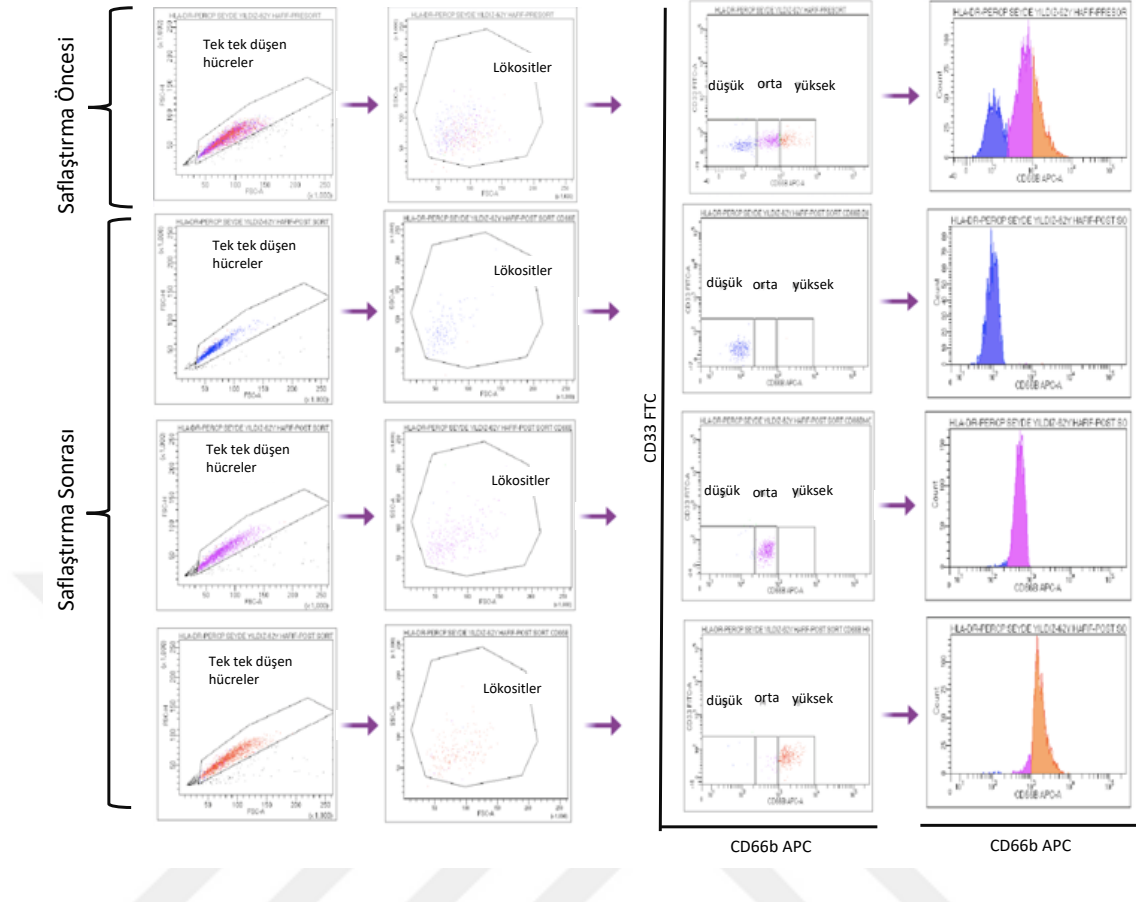


Şekil 3.6 RBC lysis buffer ile saflaştırılan miyeloid hücrelerin saflaştırma sonrası kapılama stratejisi

3.6.3 Floresan Aktive Hücre Saflaştırma (FACS) Yöntemi

MACS yöntemi ve RBC buffer ile saflaştırılan CD66b+ immatür ve matür hücreler floresan aktive hücre saflaştırma (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS) yöntemi ile CD66b'yi taşıma düzeylerine göre düşük (dim) orta (mod) ve yüksek (high) üç ayrı alt-populasyona saflaştırılarak, fenotipik ve fonksiyonel olarak karşılaştırılmıştır. Hücreler 1mL serumsuz RPMI'da süspanse edildi. CD33 (10µl), CD66b (2µl) ve HLA-DR (10µl) antikorları ile hücreler işaretlendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dk inkübe edildi. İnkubasyon sonrası 0.45µm'lik meshden geçirerek falcona alındı ve üzerine 4mL serumsuz RPMI eklenerek iyice karıştırıldı. FACS ARIA III hücre saflaştırma cihazında değerlendirildi.

İlk olarak bu belirteçlerle işaretlenmiş pozitif hücrelerin içinden tek tek düşen hücreler kapılandı. Bunun için forward scatter (FS)-INT ve side scatter (SS)-TOF veya forward scatter (FSC)-A ve FSC-H grafiğinden tek tek düşen hücreler analiz edildi (*doublet discrimination*). Sonrasında tek tek düşen hücrelerin içinden granülarite (SS-INT) ve boyutuna (FS-INT) göre yeni bir kapılama yapıldı. Bu genel kapılama stratejilerinin ardından antikorların CD33 ve CD66b'ye göre bir nokta saçılım grafiği çizildi. CD33'ü orta düzeyde CD66b'yi düşük, orta ve yüksek düzeyde taşıyan hücreler kapılandı ve bu kapılamalara göre hücreler saflaştırıldı. Analizler Flow.jo programı kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 FACS yöntemi öncesi ve sonrası CD66b⁺ hücrelerin akım sitometri yöntemi ile gösterimi.

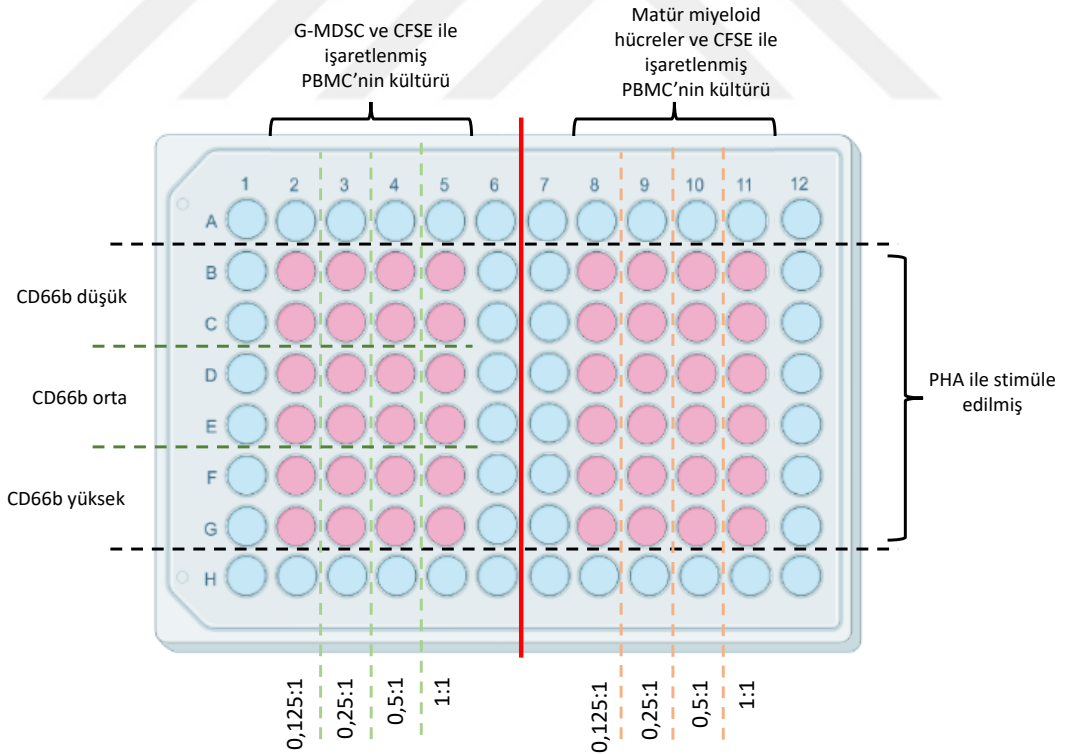
3.7 T Hücre Çoğalma ve Aktivasyon Analizleri

3.7.1 Karboksif loresan Süksinimidil Ester (CFSE) ile PBMC hücrelerin işaretlenmesi

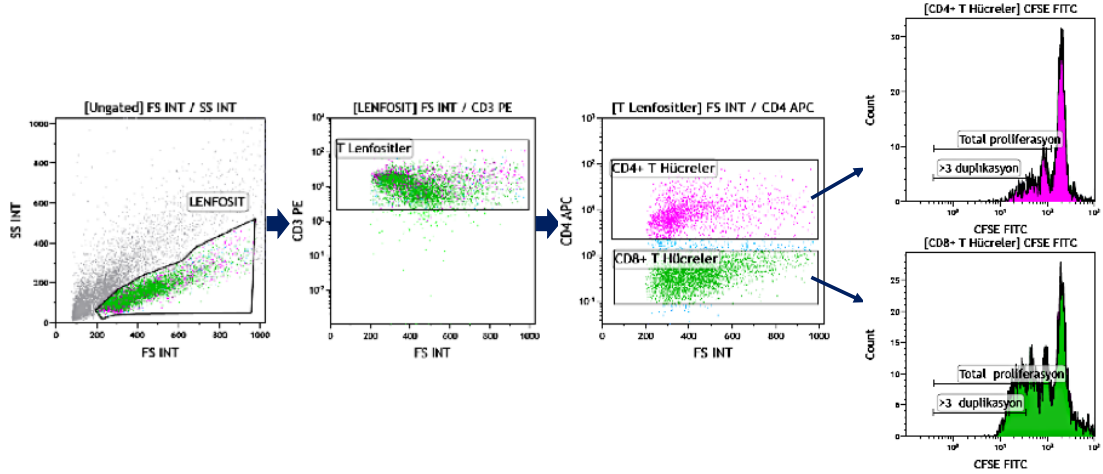
1X10⁶ PBMC hücresi, 1mL FBS'u olmayan RPMI 1640 içinde süspanse edilir. Üzerine 1ul CFSE (1µM) eklenir ve hafifçe vortekslendi. 15 dk 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Üzerine 7mL soğuk tam RPMI 1640 eklendi ve 5 dk buz içerisine gömülerek bekletildi. +4°C ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Tam RPMI 1640 kullanılması ile hücrelere bağlanan CFSE'nin inaktivasyonu gerçekleştirildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 7mL soğuk tam RPMI 1640 eklendi ve yine +4°C ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve hücreler 100µl'de 100.000 hücre olacak şekilde tam RPMI 1640 ile süspanse edildi. Tüm işlemler karanlık ortamda gerçekleştirildi.

3.7.2 Saflaştırılmış CD66b⁺ Hücreler ile PBMC'lerin Ko-Kültürü

MACS ve FACS ile ayrılmış CD66b⁺ ile eritrosit fazındaki hücreler ayrı ayrı tam RPMI içinde süspansiyon edildi. Hücreler 0,125 ($12,5 \times 10^3$), 0,25 (25×10^3), 0,5 (50×10^3) ve 1 (1×10^5) oranlarında 100 μ l içinde U-tabanlı 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi. CFSE ile işaretlenmiş PBMC'lerin içerisindeki T hücrelerin çoğalma için ilk sinyali alması gereklidir. Bunun için hücrelere 1 μ l phytohemagglutinin (PHA, 1 μ g) eklenmiştir. PHA ile uyarılmış PBMC'ler 100 μ l içinde 10^5 hücre olacak şekilde CD66b⁺ ve eritrosit fazındaki hücrelerin üzerine eklenmiştir. T hücrelerin tek başına proliferasyonlarını ölçmek için de 10^5 hücre 200 μ l de olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına 4 kuyu ekildi. 2 kuyu PHA ile uyarıldı. 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda CD4⁺ veya CD8⁺ T hücrelerin çoğalmalarını ayrı ayrı değerlendirebilmek için anti-insan-CD4 (1 μ l) ve -CD8 (4 μ l) monoklonal antikorları kullanılmıştır. Hücrelerin çoğalma durumları CFSE boyasının seyrelme düzeyine göre belirlenmiş ve ilgili analizler akım sitometri cihazında değerlendirilmiştir (Şekil 3.6).



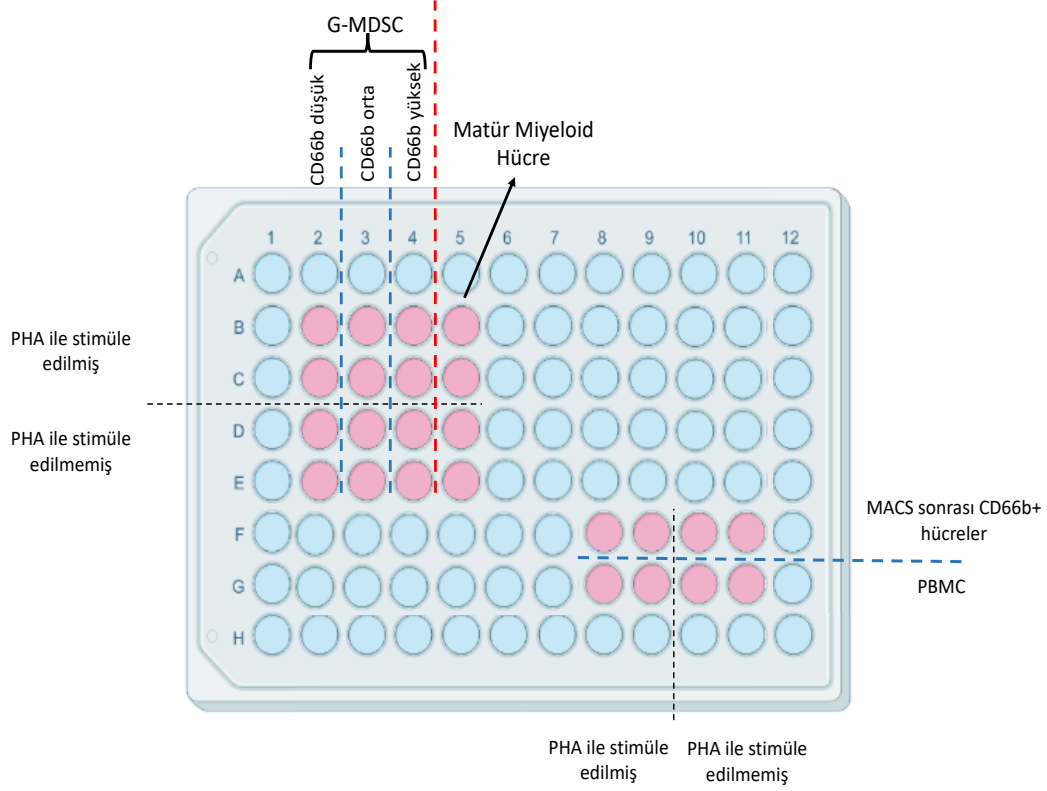
Şekil 3.8 G-MDSC ve matür miyeloid hücre alt gruplarının CFSE ile işaretlenmiş PBMC'ler ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 oranlarında ko-kültürü (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır)



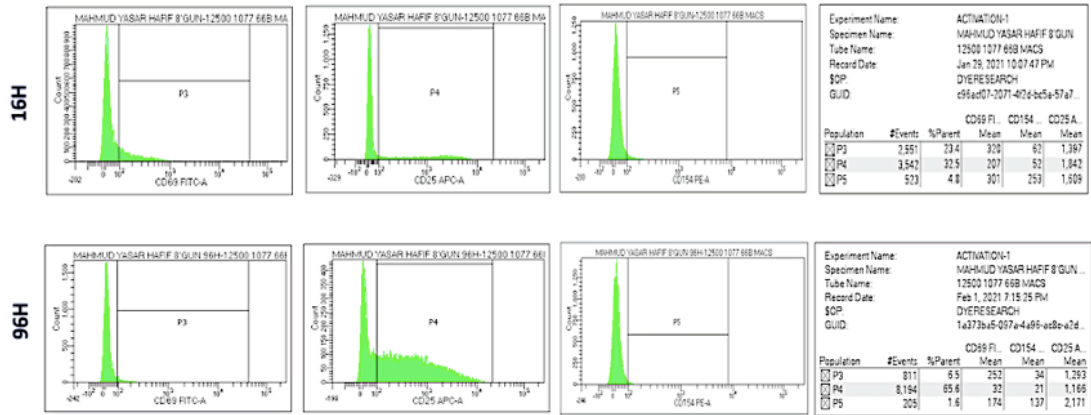
Şekil 3.9 G-MDSC benzeri hücrelerin CD4+ ve CD8+ T hücre proliferasyon yanıtları üzerine etkisini araştırmak için kullanılan kapılama stratejisi

3.7.3 T Hücre Aktivasyon Analizi

MACS, FACS ve/veya eritrosit patlatma solüsyonu ile saflaştırılan hücreler 0,25 (25×10^3) oranında 100 μ l içinde U-tabanlı 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi. Bu kuyulara 100 μ l'de dilüe edilmiş 100.000 PBMC eklendi. Tek başına total PBMC'lerin T hücre aktivasyonu değerlendirebilmek için 200 μ l'de süspanse edilen 100.000 hücre 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücrelerin her biri en az iki kuyu çalışıldı ve bir kuyu PHA eklenirken diğer kuyuya eklenmedi. 16/24 saatlerde ve 72. Saatte hücreler kuyulardan toplanarak akım sitometri tüplerine alındı. Üzerlerine 2mL PBS eklendi ve santrifüj (2000rpm, 5dk) edildi. 100 μ l PBS'de süspanse edilerek CD25 (2.5 μ l), CD69 (9 μ l) ve CD154 (5 μ l) insan monoklonal antikorları ile işaretlendi. 40 dk, +4°C ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüplere 2mL PBS eklendi ve santrifüj (2000rpm, 5dk) edildi. 250 μ l PBS'te süspanse edilerek akım sitometri cihazında değerlendirilmiştir (Şekil 3.10).



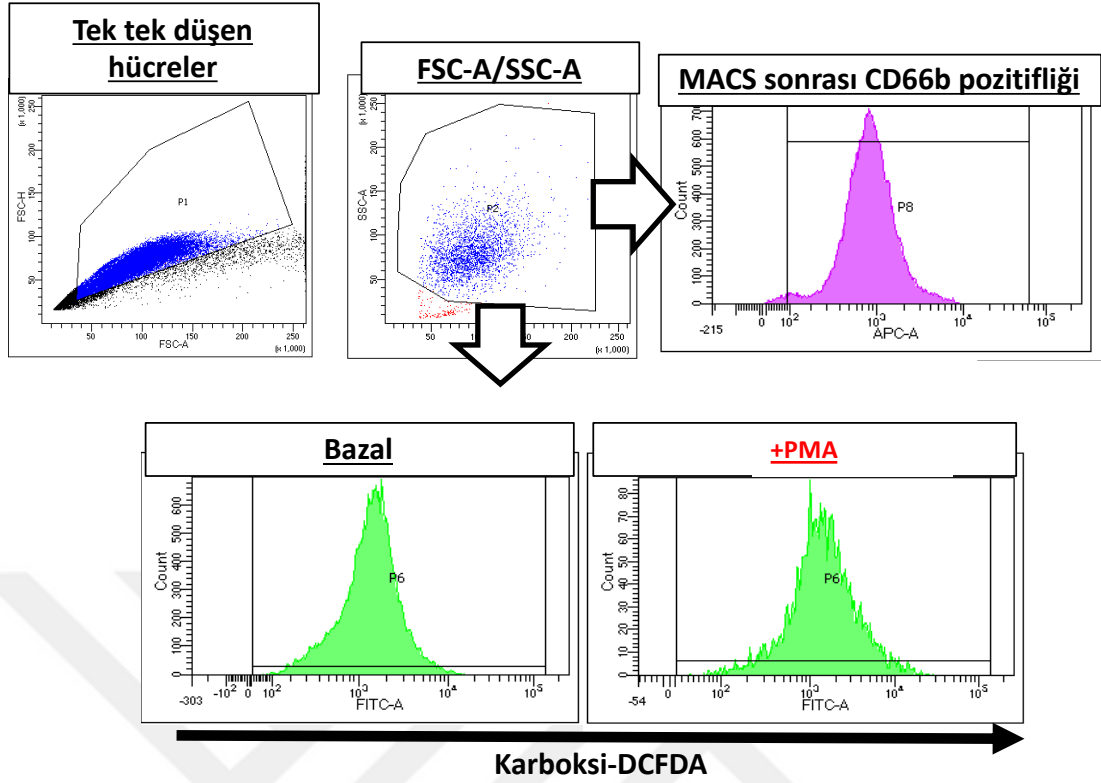
Şekil 3.10 G-MDSC alt grupları, matür miyeloid hücre, MACS sonrası CD66b⁺ hücreler ve PBMC'lerin T hücre Aktivasyon analizleri için 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına ekimi.



Şekil 3.11 PBMC hücrelerinin T hücre aktivasyonuna etkisinin CD25, CD69 ve CD154 aktivasyon belirteçleri ile analizinin temsili akım sitometri grafikleri

3.8 ROS ve NO Üretim Analizi

Tam kan, 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki hücreler CD66b⁺ alt grupları tespit etmek amacıyla kullanılan yüzey belirteçleri panelindeki FITC kanalı boş bırakılarak kombinlendi ve bu kanaldan elde edilecek veriler ROS ve NO üretme kapasitesini göstermektedir. Ayrıca MACS ve FACS yöntemi ile saflaştırılan CD66b⁺ alt gruplar da CD66b, CD33 işaretlenmiş olup FITC kanalı boş bırakıldı. Hücreler 100'er µl tüplere dağıtıldı ve 2mL PBS ile (2000 rpm, 5dk) yıkandı. 100µl olacak şekilde PBS ile süspanse edildi. İlgili antikorlar ve ROS analizi için, 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (1µM, H2-DCF-DA); NO analizi için, 4,5-diaminofluorescein-diacetate (2µM, DAF-2DA) floresan problemleri ile işaretlendi. Hücrelerin bir grubu bu işaretleme sonrasında 37°C de 20 dakika inkübasyona bırakılmış olup ardından da buz üzerine alınarak akım sitometri ile 488nm dalga boyunda analiz edildi. Diğer gruba ise 1.3 µl 12-myristate 13-acetate (PMA) (0.1 µM) eklenerek 20 dakika 37°C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında buz üzerine alınarak akım sitometri ile 488nm dalga boyunda analiz edildi. Elde edilen ortalama floresan yoğunlukları (*mean fluorescence intensity*, MFI) kullanılarak "ROS ve NO üretimi belirlendi. Analizler akım sitometri cihazında değerlendirildi.



Şekil 3.12 CD66b+ immatür nötrofillerin ROS üretim kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan kapılama stratejisi.

3.9 G-MDSC Benzeri Alt-gruplarının İmmünojenotipik Farklılıklarının Morfolojik Olarak Doğrulanması

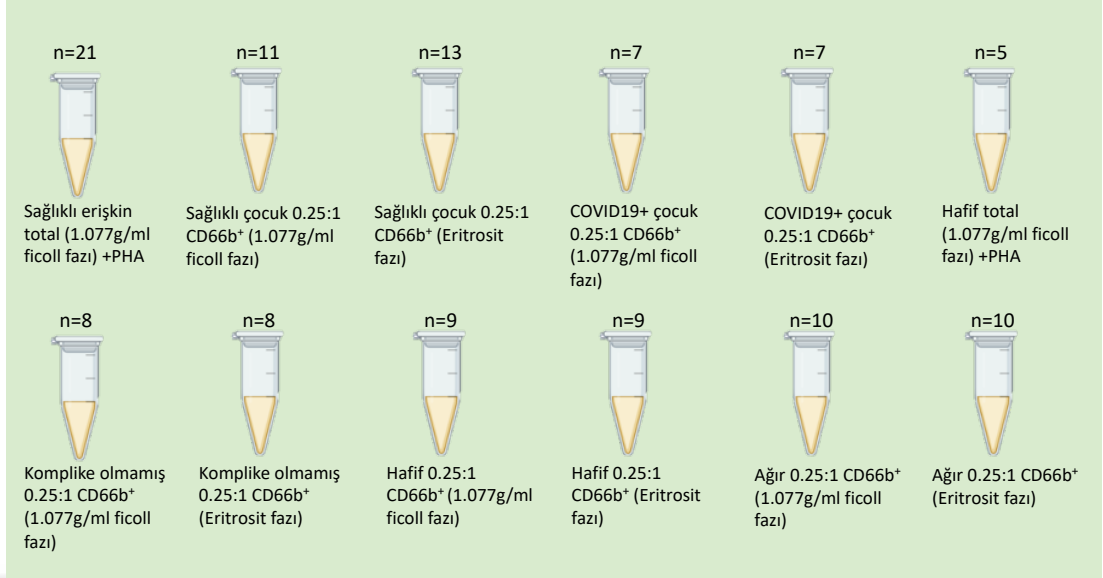
G-MDSC ve G-MDSC benzeri alt grupların morfolojik olarak doğrulanması, EDTA'lı mor tüpe alınan kanın lam üzerine periferik yayılması ile gerçekleştirilmiştir. Ardından, hematoksilen/eozin boyaması yapılarak nükleus şekilleri değerlendirildi ve hangi matürasyon düzeyinde oldukları saptandı. Lamlar distile su ile iyice süzülerek çıkartıldı ve Hematoksilin Harris; Asetik Asitli boya kabına daldırıldı ve bu boyada 4 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun bitiminde musluk suyu altında 2 dakika bekletilerek fazla boya uzaklaştırıldı. Ardından, Asit Alkol solüsyonuna daldırılıp çıkartılarak diferansiye edildi ve hemen ardından musluk suyu altında tutulup diferansiyasyon hızlıca durduruldu. Dilue edilen Amonyaklı suda bekletilerek örneklerin mavi rengini alması sağlandı. Musluk suyu altında örnek rengi berrak mavi renk kazanıncaya kadar beklenildi. Hematoksilin Harris; Asetik Asitli ile boyanan lamlar Eozin Y Boyasına (%1; Suda hazırlanmış) daldırılarak 1 dakika bekletildi.

Lamlar musluk suyu altında yıkanarak boya işlemleri tamamlandı. Boyanan lamlar düşük konsantrasyonlu %70, %95 ve %100 lük alkollerden sırasıyla geçirilerek dehidre edilmiş ve etüvde kurumaya bırakıldı. Işık mikroskobu ile sitolojik analizleri gerçekleştirildi ve böylelikle, akım sitometride matürasyon düzeyleri ile ilk fikirler edinilen hücreler morfolojik olarak da değerlendirilip doğrulandı. Periferik yaymalar hematologlar tarafından değerlendirilerek, immünofenotipik olarak görülen immatür seri morfolojik olarak da hem kalitatif hem kantitatif yöntemlerle doğrulandı.

3.10 Enzim İlişkili İmmün Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) Yöntemi ile İmmün Yanıt Yönünün Belirlenmesi

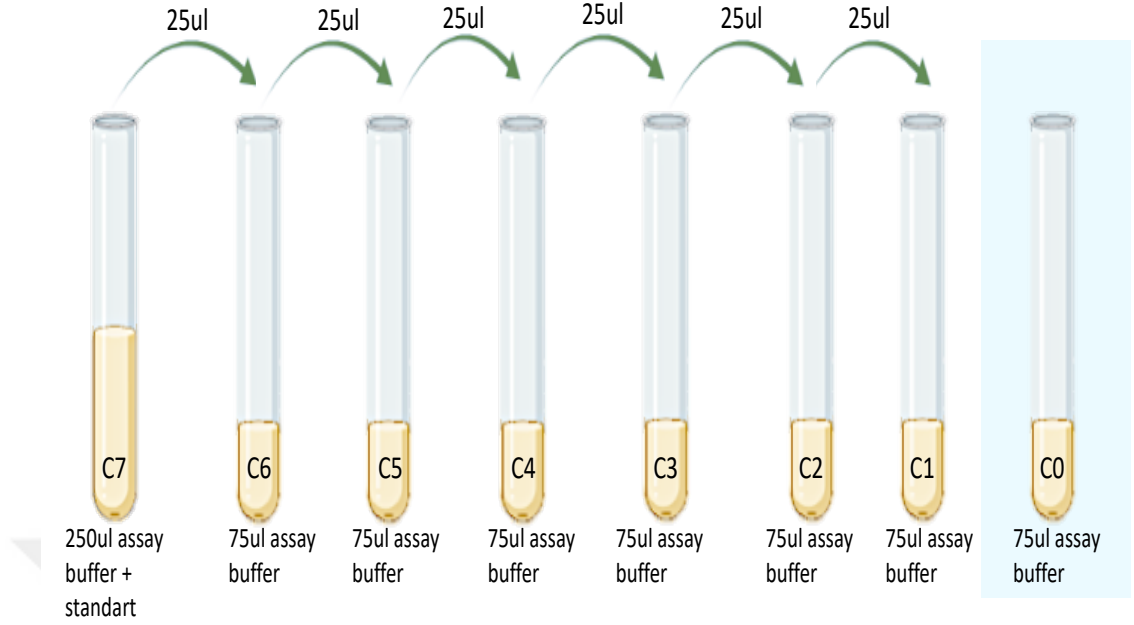
Ko-kültürlerden ve T hücre aktivasyon deneylerinden 96. Saatlerde süpernatantlar toplanıp (total 1.077, CD66b alt-grupları, immatür nötrofil, matür nötrofil), IL-4 , IL-2, CXCL10 (IP-10), IL-1 β A7, TNF- α , CCL2 (MCP-1), IL-17A, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-12p70, CXCL8 (IL-8), Free Active TGF- β 1 LEGENDPlex ile ölçülmüştür. Elde edilen veriler kitin önerdiği analiz programı ile FACS ARIA III akım sitometri cihazında değerlendirilmiştir.

Ko-kültürlerden ve T hücre aktivasyon deneylerinden 96. Saat sonrası toplanan süpernatant örneklerinden her bir grup için bir havuz oluşturularak çalışma gerçekleştirildi. 21 adet sağlıklı erişkin total 1.077g/mL ficoll PHA+ koşulu için her bir örnekten 20 μ l, 11 adet sağlıklı çocuk 0.25:1 CD66b+ (1.077 g/mL ficoll fazı) koşulu için her bir örnekten 10 μ l, 13 adet sağlıklı çocuk 0.25:1 CD66b+ (Eritrosit fazı) koşulu için her bir örnekten 10 μ l, 10 adet ağır erişkin hastanın 0.25:1 CD66b+ (1.077 g/mL ficoll fazı) koşulundan 10 μ l, 0.25:1 CD66b+ (Eritrosit fazı) koşulu için 10 μ l , 9 adet hafif erişkin hastanın 0.25:1 CD66b+ (1.077 g/mL ficoll fazı) koşulundan 10 μ l ve 0.25:1 CD66b+ (Eritrosit fazı) koşulu için 10 μ l, 8 adet komplike olmamış hastanın 0.25:1 CD66b+ (1.077 g/mL ficoll fazı) koşulundan 10 μ l ve 0.25:1 CD66b+ (Eritrosit fazı) koşulu için 10 μ l, 7 adet çocuk hastanın ko-kültür süpernatant örneklerinin her birinden 0.25:1 CD66b+ (1.077 g/mL ficoll fazı) 10 μ l, 0.25:1 CD66b+ (Eritrosit fazı) koşulundan 10 μ l, 5 adet hafif erişkin total (1.077 g/mL ficoll fazı) PHA+ koşulu için her bir örnekten 10 μ l alınarak havuz oluşturuldu (Şekil 3.13). Her bir örnek havuzu için çalışma iki defa çalışıldı.



Şekil 3.13 Elisa testi için oluşturulan örnek havuzlarının örneklem sayıları ve isimlendirilme şekilleri (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

250µl Assay buffer kit içerisinde cam şişe içerisinde liyofilize halde çıkan standart içerisine eklendi ve tamamen çözünmesi sağlanarak 10 dakika inkübeye bırakıldı. 8 tane tüp isimlendirildi (CO-C7) ve C7 hariç her tüpe 75µl assay buffer eklenirken C7'ye 250µl assay buffer içerisinde çözülen standart konuldu. İlk tüp (C7) 10000pg/mL konsantrasyonunda olmuş olup, bundan sonraki tüpler 1:4 oranında seri dilüsyonlar ile oluşturuldu. C0 olarak isimlendirilen tüp içerisine sadece 75µl Assay Buffer eklendi standart eklenmedi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Elisa deneyleri standartların hazırlanması. C7 (10000 pg/mL), C6 (2500 pg/mL), C5 (625 pg/mL), C4 (156,25 pg/mL), C3 (39,01 pg/mL), C2 (9,77 pg/mL), C1 (2,44 pg/mL), C0 (0 pg/mL=blank). C, *concentration*: konsantrasyon (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

Standartlar ve örneklerden elde edilen örneklem havuzlarının her biri için tüpler isimlendirildi ve 25'er µl Assay Buffer tüplere eklendi. (12 havuz için 2'şer tüp, her bir standart dilüsyonu için C0-C7'ye kadar 2'şer tüp toplamda 40 adet tüp ile deneye devam edildi) Her örnek havuzundan 25ul örnek ve her standart dilüsyonu tüpünden 25µl alınarak Assay Bufferın üzerine eklendi. Karanlıkta devam eden deneyde tüplerin her birine 25µl premixed bead eklendi ve 2 saat shakerda (800 rpm) inkübe edildi.

Wash buffer (20X) üzerine 475mL ddH₂O eklenerek wash buffer solüsyonu 1X konsantrasyonuna indirildi. İnkübasyonu tamamlanan örneklerin üzerine 200µl wash buffer eklendi ve 250g hızında ve oda sıcaklığında 5 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası her bir tüpten süpernatant dikkatli bir şekilde çekildi ve tekrar 200µl wash buffer ile yıkama tekrarlanarak süpernatant aynı şekilde pipet yardımı ile tüpten uzaklaştırıldı. 25µl Detection Buffer her bir tüpe eklendi ve 1 saat karanlıkta shakerda (800 rpm) örnekler inkübe edildi. 25µl SA-PE tüplere eklenerek 30 dakika karanlıkta shakerda (800 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 250g'de 5 dakika santrifuj

edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. 200µl wash buffer ile tekrar yıkama işlemi yapılarak, süpernatant uzaklaştırıldı. 150µl wash buffer ile süspansiyon edilerek FACS ARIA III akım sitometri cihazında analizler gerçekleştirildi.

3.11 İstatiksel Analiz

Tez çalışmasının verileri IBM SPSS 21.0 ve GraphPad Prism 7 programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Normal dağılım gösteren değişkenler için student's t (ikili karşılaştırma) ya da ANOVA (ikiden fazla karşılaştırma), normal dağılım göstermeyenler için Mann-Whitney U (ikili karşılaştırma) ya da Kruskal Wallis (ikiden fazla karşılaştırma), testlerinin kullanılması tercih edilmiştir. Gruplar arasındaki farklar ve anlamlılıkları two-way ANOVA testi (Bonferroni's post hoc testi ile beraber) ile çoklu test metodu kullanılmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ *** olarak grafiklerde kullanılmıştır. Korelasyon matrisi veya ikili korelasyonlar için, Gaussian dağılımı gösterip göstermemesine göre Pearson veya Spearman korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. İkili korelasyon analizlerinde lineer regresyon eğrisi çizilmiştir.

4. BULGULAR

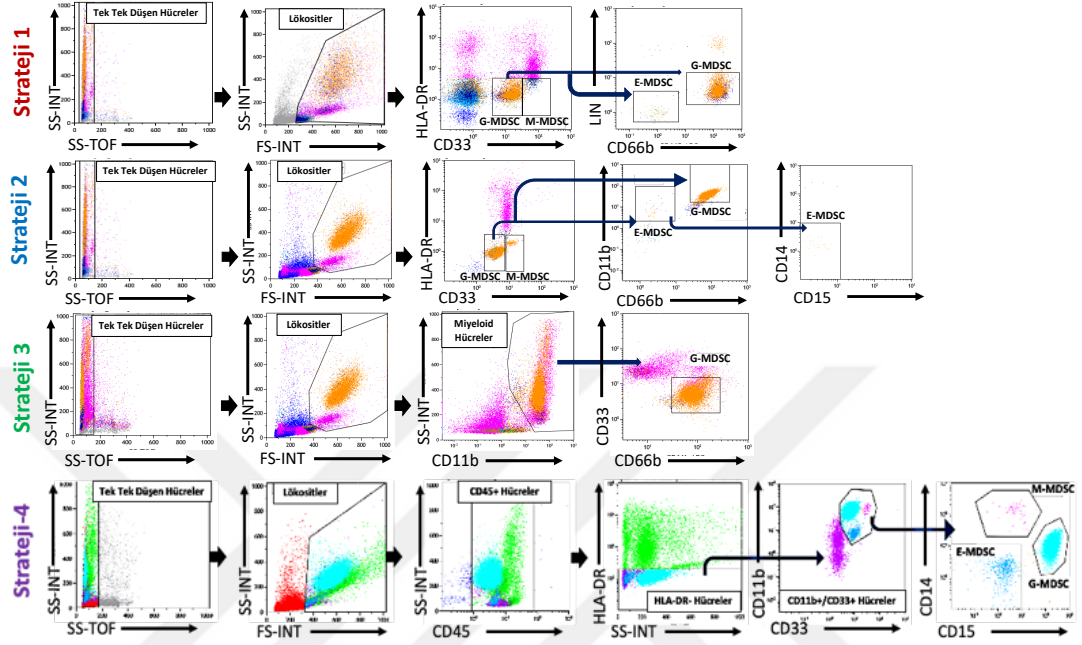
4.1 Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre Alt-Gruplarının Sağlıklı ve Hasta Bireylerdeki Dağılımı

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler temelde üç alt-gruba ayrılmakta olup, literatürde farklı kapılama stratejileri kullanılmaktadır.

Tez çalışmamızda MDSC alt-gruplarını analiz etmek için 1.077g/mL ficoll fazı kullanılmış olup özellikle G-MDSC'lerin toplandığı bilinen PBMC fraksiyonu kullanılmıştır. G-MDSC ile yapılan çalışmalarda periferik venöz kan alındıktan sonra kanın bekleme süresi, ortamın soğuk olması gibi faktörler bu hücre grubunun aktivasyonuna neden olduğu için anlık sonuçları değiştirebilmektedir. Bu yüzden tez çalışmamızda taze kan örneği (en fazla 4 saat bekleme süresi ve oda sıcaklığında) ile çalışılmıştır.

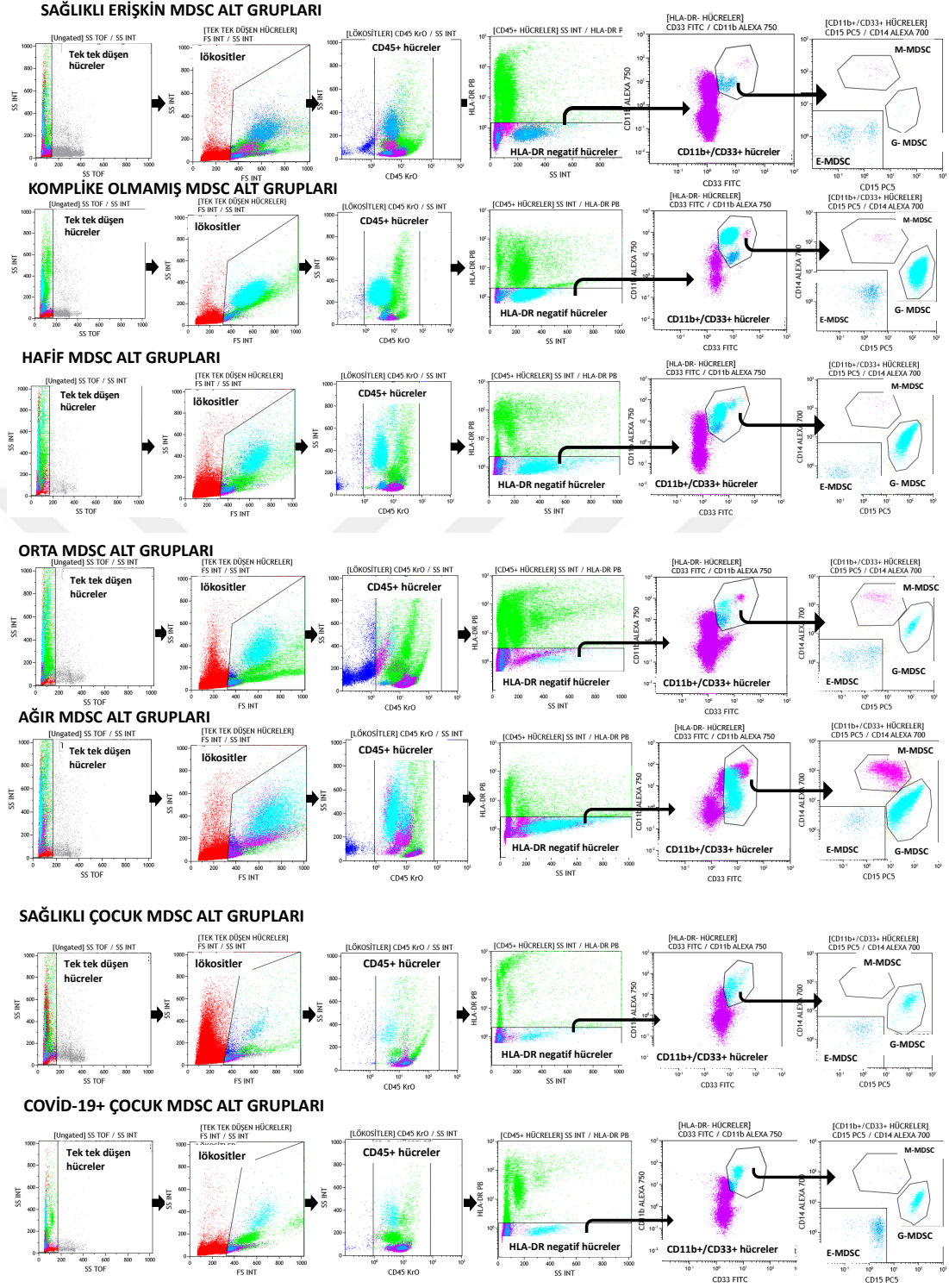
Tez çalışmamızda MDSC alt-gruplarını belirlemek için dört farklı kapılama stratejisi kullandık (Şekil 4.1). Tüm stratejilerde tek tek düşen hücreler (doublet discrimination) yapıldıktan, sonra granülite (SS-INT) ve boyuta (FS-INT) göre hücreler kapılanmıştır. Olası eritrosit ve debris kontaminasyonunu önlemek için CD45 belirteci kullanılarak tüm lökositler seçilmiştir. Strateji-1'de HLA-DR/CD33 durumuna göre HLA-DR⁻/CD33⁺ hücreler M-MDSC; HLA-DR⁻/CD33^{dim} hücreler G-MDSC olarak belirlenmiştir. Lineage boyaması yapılarak (CD56, CD16, CD3, CD19, CD20, CD22) lenfositler elimine edilmiş ve CD66b negatif hücreler E-MDSC olarak belirlenmiştir. G-MDSC hücrelerin de CD66b belirtecini taşıdığı doğrulanmıştır. Strateji-2'de lenfositler SS-INT/FS-INT ile dışlanarak, HLA-DR⁻/CD33⁺ hücreler M-MDSC; HLA-DR⁻/CD33^{dim} hücreler G-MDSC olarak belirlenmiştir. G-MDSC kapısından CD11b/CD66b kapılaması yapılarak CD66b⁻ hücreler E-MDSC olarak kabul edilmiştir. Strateji-3'de ise, CD11b pozitif hücrelerin içinden CD66b belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden hücreler kapılanarak G-MDSC hücreleri belirlenmiştir. Strateji-4'de ise HLA-DR negatif hücrelerden CD11b/CD33 taşıma durumuna göre CD11b⁺/CD33⁺ hücreler kapılanarak, CD14⁺ CD15^{dim} hücreler M-

MDSC; CD14⁺ CD15^{high} hücreler G-MDSC ve CD14⁺CD15⁻ hücreler E-MDSC olarak kabul edilmiştir. Birçok kapılama stratejisi ile MDSC alt-grupları analiz edilmiş olup, sonuçlar birbiri ile tutarlı bulunmuştur (Şekil 4.1).



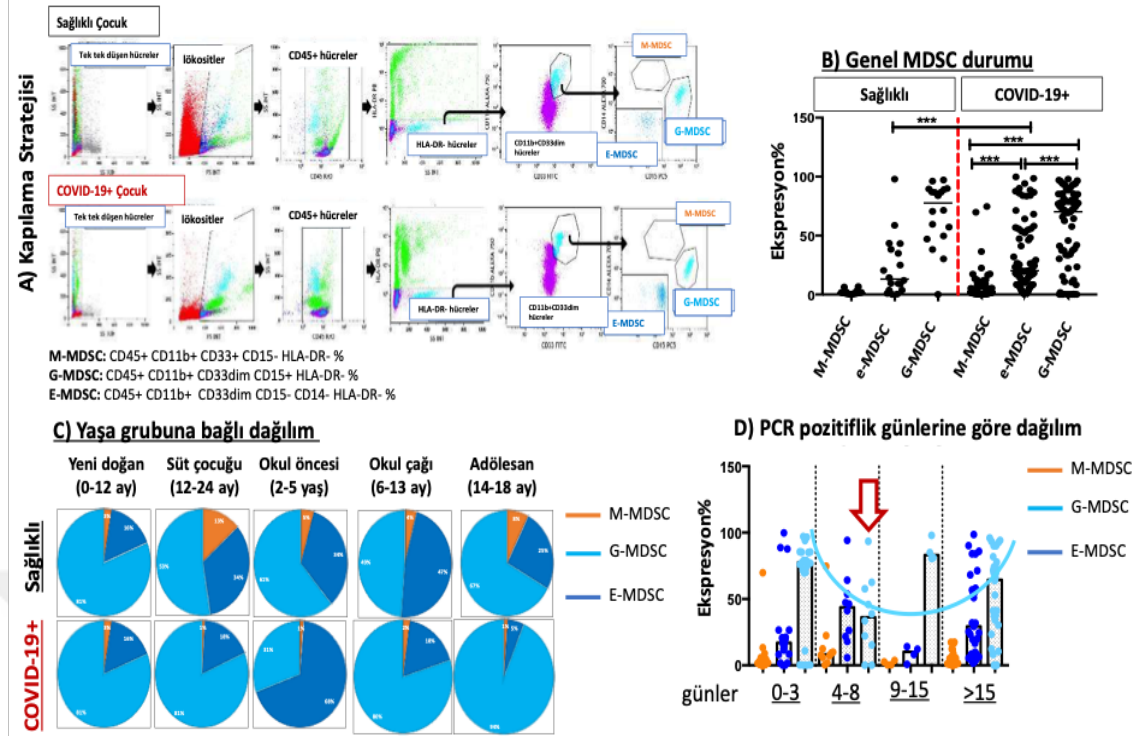
Şekil 4.1 MDSC alt-gruplarının farklı kapılama stratejileri. M-MDSC, *monocytic myeloid-derived suppressor cell*: monositik-miyeloid kökenli baskılayıcı hücre; G-MDSC, *granulocytic myeloid-derived suppressor cell*: granülositik-miyeloid kökenli baskılayıcı hücre; E-MDSC, *early stage myeloid derived suppressor cell*: erken dönem farklılaşma düzeyinde bulunan-miyeloid kökenli baskılayıcı hücre.

Tüm bu kapılama stratejileri sonucunda Strateji-4 kabul edilmiş ve sonuçlar bu kapılama stratejisine göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.2).



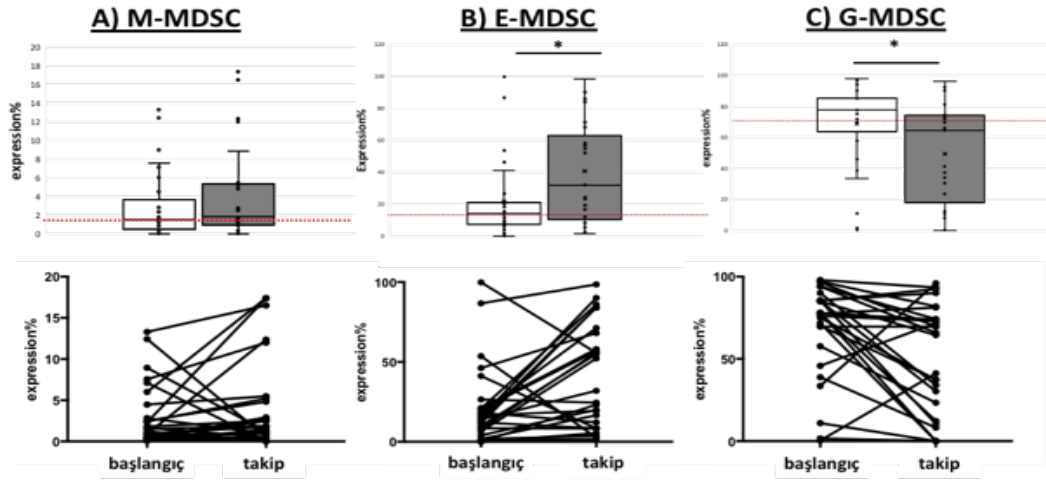
Şekil 4.2 MDSC-alt gruplarını analiz etmek için seçilen kapılama strateji. Erişkin ve çocuk bireylerde aynı strateji kullanılmış olup, şekil temsili akım sitometri sonuçlarını göstermektedir.

Finalde karar kılınan kapılama stratejisi (Şekil 4.3A) ile yapılan analizler sonucunda, sağlıklı çocuklarda yüksek olması beklenen G-MDSC oranları, beklenildiği üzere yüksek bulundu ve COVID-19 ile bu hücre grubunda minimal bir azalma görülse de yüksek düzeylerde seyrettiği belirlendi (Şekil 4.3B). Literatürde daha önce çocuklarda sağlık ya da hastalık durumundaki E-MDSC verileri bulunmamaktadır. Çalışma kapsamında elde ettiğimiz sonuçlarda sağlıklı çocuklarda E-MDSC'lerin düşük düzeylerde mevcut olduğu ve COVID-19 ile birlikte istatistiksel anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmadaki çocuk bireylerin yenidoğan-adölesan döneme kadar bir yaş dönemini kapsamaması nedeniyle, pediatrik yaş gruplandırmasına göre MDSC hücre alt gruplarındaki dağılımlar incelendi. COVID-19 pozitif okul öncesi dönemdeki çocuklarda E-MDSC; adölesan grupta ise G-MDSC baskın popülasyon olarak dikkat çekti. M-MDSC alt-grubunda COVID-19 pozitiflik veya yaş grubuna göre hem belirgin bir artış hem de fark gözlenmedi (Şekil 4.3C). COVID-19+ kişiler ile temaslı olan çocuk hastalar PCR testi pozitif gelmediği takdirde çalışmaya dahil edilmedi. COVID19+ bireylerin PCR testi sonrasında bize geldiği günler farklılık gösterdiği için, PCR gününe göre hastalar gruplandırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmesi de G-MDSC'lerdeki enfeksiyon orta döneminde azalma ve inflamasyonun silinme evresinde yeniden artış göstermeye başlaması oldukça dikkat çekici idi (Şekil 4.3D).



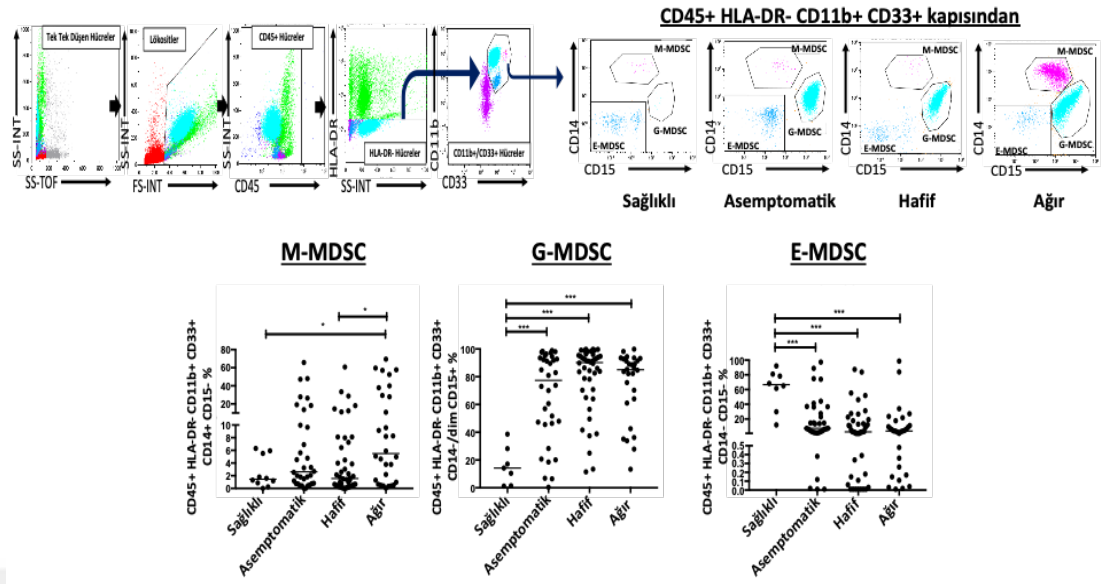
Şekil 4.3 COVID-19 pozitif veya sağlıklı çocuklardaki MDSC alt-grupları. A) kapılama, B) genel dağılım C) yaşı grubuna göre dağılım ve D) PCR pozitiflik gününe göre dağılımı göstermektedir. $p<0,05$ *; $p<0,01$ **; $p<0,001$ *** . Sağlıklı çocuklar $n=22$; COVID-19+ çocuklar $n=77$.

Bireysel olarak başlangıç ve iyileşme döneminde takip edilen çocuk bireylerde, takip döneminde E-MDSC alt-grubunda artış ve G-MDSC popülasyonunda azalış görüldü (Şekil 4.4). Takip dönemindeki çocukların büyük çoğunluğu hastalığın 10-15. günü arasında E-MDSC ve G-MDSC oranları tekrar bazal seviyeye geldiği bulundu ve bu görülen sonuçların PCR gün pozitifliği verileriyle tutarlı olduğu görüldü (Şekil 4.3D).



Şekil 4.4 COVID-19+ çocuklardaki MDSC alt-gruplarının başlangıç ve takip dönemindeki değişimleri. Kırmızı kesikli çizgi sağlıklı çocuklardaki M-MDSC, E-MDSC veya G-MDSC düzeylerini göstermektedir. $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ *** Sağlıklı çocuklar $n=22$; COVID-19+ çocuklar $n=77$. Takipli COVID-19+ çocuklar $n=27$.

Erişkin bireylerde M-MDSC ve G-MDSC alt-grupları ile ilgili literatürde bulunan çalışmalar mevcut olup M-MDSC alt grubunun özellikle ağır seyreden vakalarda yüksek olduğu söylenmektedir ve bunun yaptığımız tez çalışması ile uyumlu olduğu görülmüştür. Fakat, G-MDSC alt-grubu en yüksek yine ağır kliniğe sahip hastalar da görüldü de literatürden farklı olarak diğer hasta gruplarında da yüksek görüldü. Bunun yanı sıra, daha önce COVID-19'da herhangi bir verisi yayınlanmamış E-MDSC alt-grubunun sağlıklı erişkin bireylerde yüksek iken, hastalık ve klinik seyir ile anlamlı bir azalış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5).

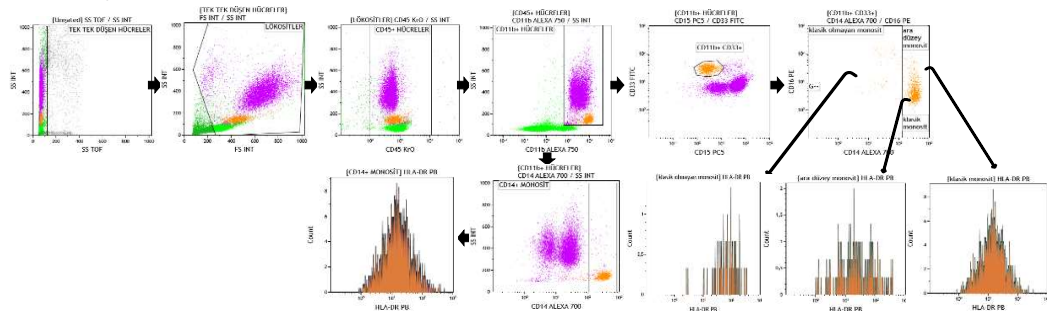


Şekil 4.5 Sağlıklı ve COVID-19 pozitif erişkinlerdeki M-MDSC, E-MDSC ve G-MDSC alt-grupları. p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***

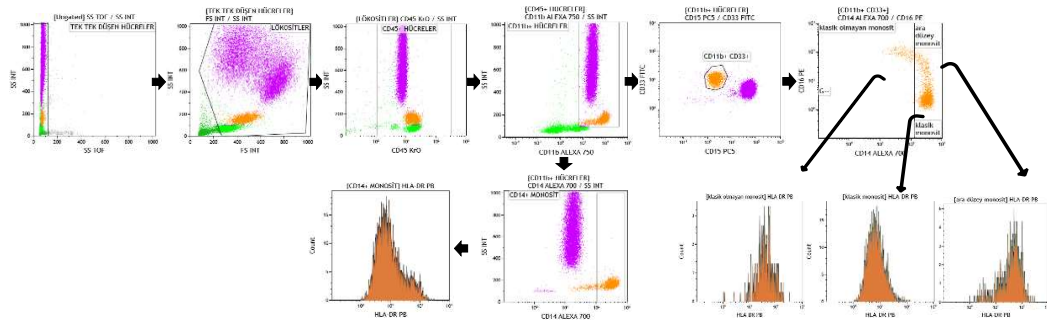
MDSC hücreleri özelinde yapılan analizlerde, M-MDSC hücrelerinin yüksek bulunmasının hastalığın kötü seyri ile ilişkili olduğu ve hastalığı ağır geçiren ancak kısa sürede toplayan hastalarda zamanla E-MDSC düzeylerinin de arttığı belirlenmiştir. E-MDSC, G-MDSC ve M-MDSC taşıyan bireylerin klinik durumu değerlendirildiğinde, ağır seyredenlerin %37'si, orta düzeye sahip kişilerin %13,6'sı, hafif kliniğe sahip kişilerin %1,8'i ve asemptomatik (komplike olmamış) bireylerin ise %20'sinin M-MDSC/G-MDSC oranının ≥ 1 olduğu görülmüştür. E-MDSC'lerin G-MDSC ve M-MDSC hücreleri ile negatif korelasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, M-MDSC/G-MDSC oranının da hastalık kötü prognozu ile pozitif korele olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).

‘‘doublet discrimination’’ ve SS-INT/FS-INT kapılanması yapıldıktan sonra, CD45+ CD11b+ CD15- CD33+ hücreler kapılanmış ve CD14+ hücreler total monositler olarak kabul edilmiştir. Alt-grupları belirlemek için CD14/CD16 kapılanması alınmış ve CD14+ CD16- hücreler klasik monositler; CD14+ CD16+ hücreler intermediate monositler; CD14+ CD16++ hücreler non-klasik monositler olarak belirlenmiştir. Ayrıca, bu belirlenen alt-grup ve total monositlerin HLA-DR düzeylerini belirlemek için de ilgili histogramlar açılmıştır (Şekil 4.7).

KONTROL ÇOCUK/MONOSİT ALT TIPLERİ

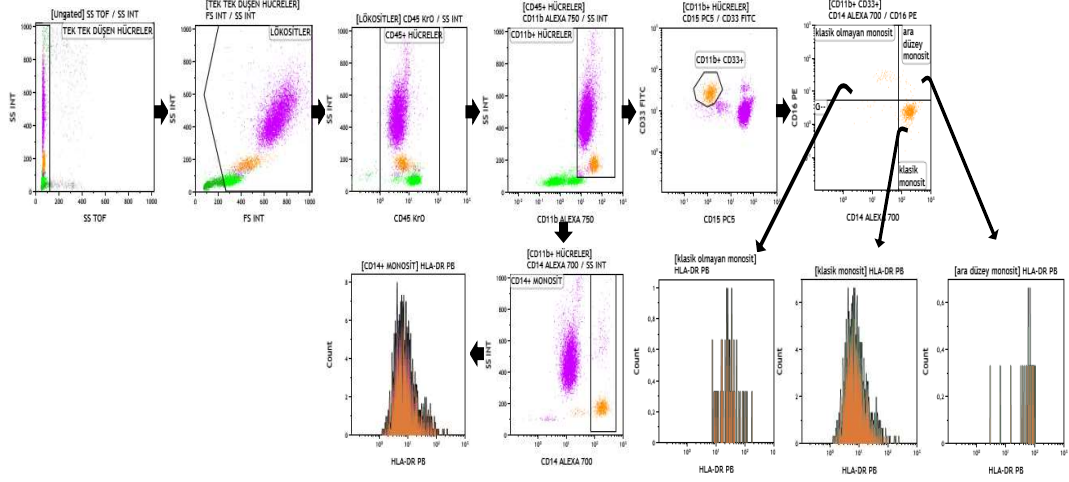


COVID19 + ÇOCUK/MONOSİT ALT TIPLERİ

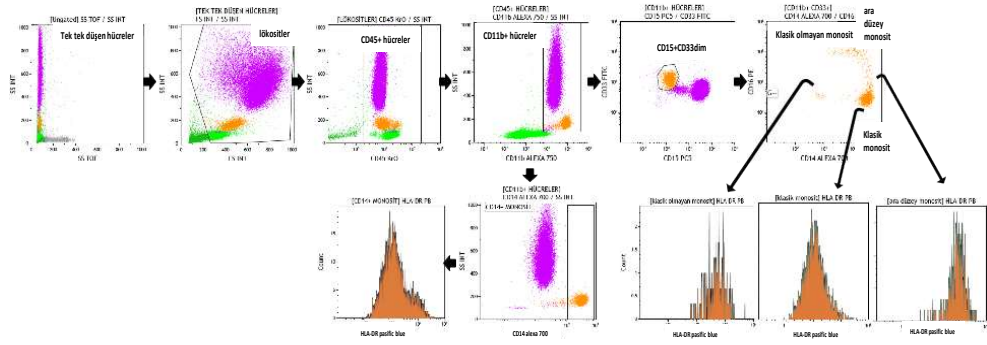


Şekil 4.7 Monosit alt-tiplerini analiz etmek için kullanılan kapılama strateji. Erişkin ve çocuk bireylerde aynı strateji kullanılmış olup, şekil temsili akım sitometri sonuçlarını göstermektedir.

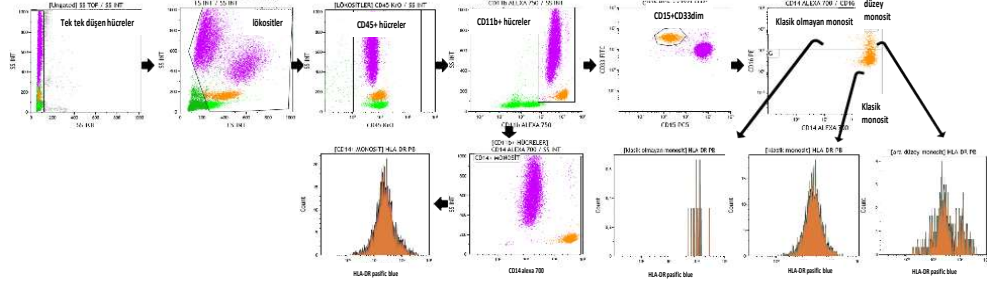
ERİŞKİN KONTROL/MONOSİT ALT TIPLERİ



KOMPLİKE OLMAMIŞ/MONOSİT ALT-TİPLERİ

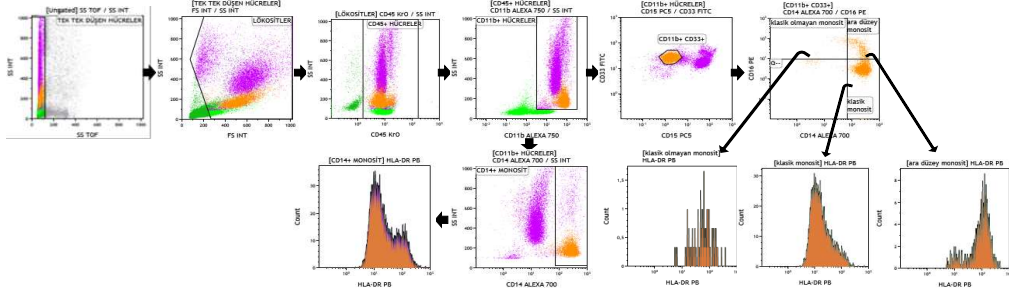


HAFİF/MONOSİT ALT-TİPLERİ

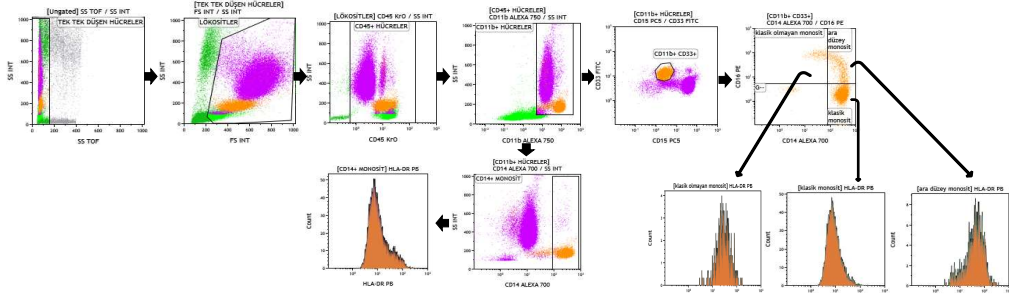


Şekil 4.7 devam

ORTA/MONOSİT ALT TİPLERİ

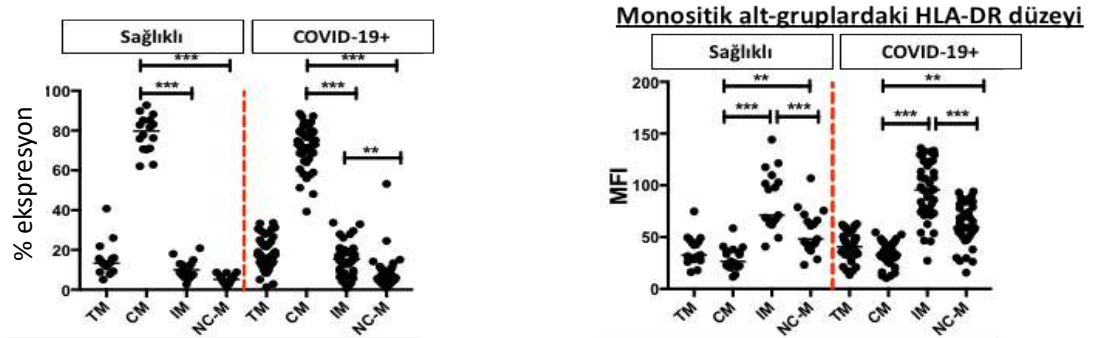


AĞIR/MONOSİT ALT TİPLERİ



Şekil 4.7 devam

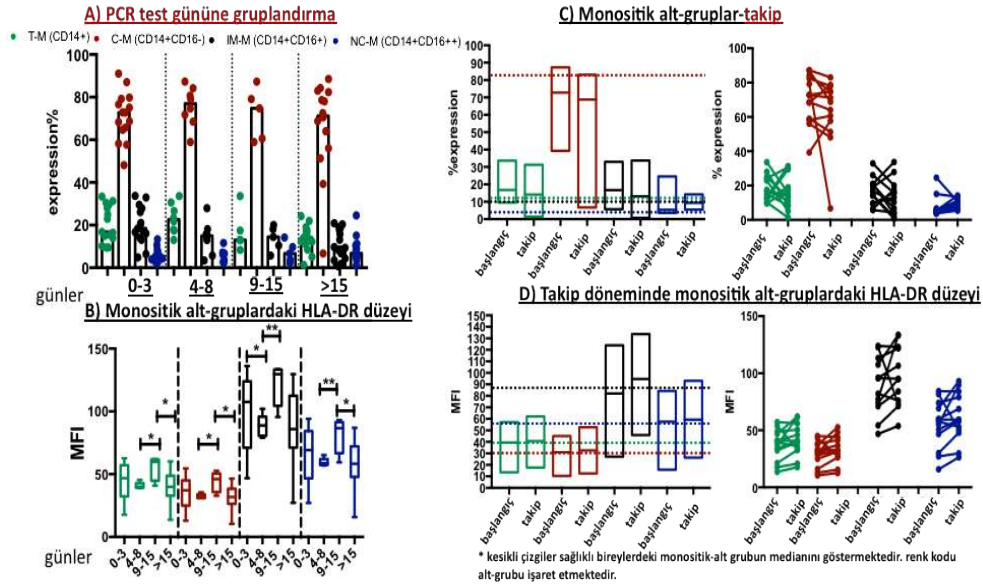
Sağlıklı çocuklar literatür ile uyumlu olarak yüksek düzeyde klasik monosite sahip olarak değerlendirilmiştir. COVID-19 ile beraber intermediate monositlerde de anlamlı artış görülmüş ve bu hücrelerin hala yüksek düzeylerde HLA-DR taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.8). Bu sonuçlar neticesinde COVID-19+ çocuklarda monositik alt-grupların fonksiyonel ve fenotipik bir bozulmaya uğramadığı düşünülmüştür.



TM: total CD14+ monosit
CM: klasik monosit
IM: ara düzey monosit
NC-M: klasik olmayan monosit

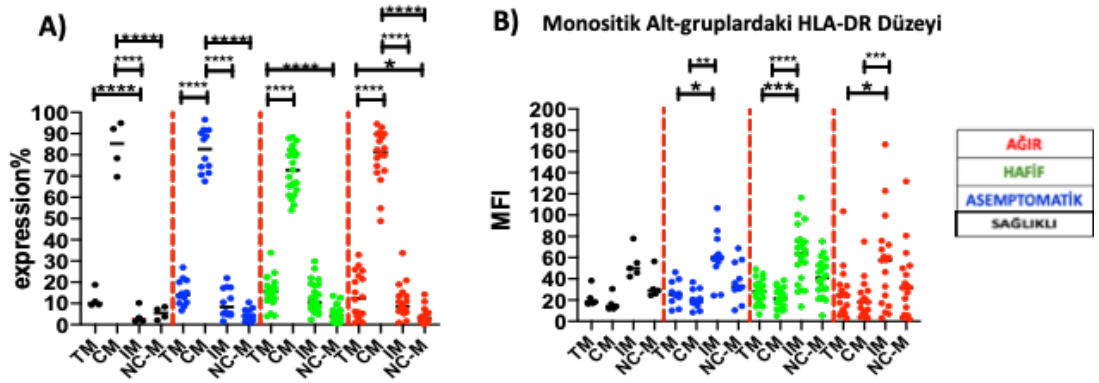
Şekil 4.8 COVID-19 pozitif veya sağlıklı çocuklardaki monositik hücre alt-grupları. p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***

Çocuklarda PCR gününe göre alt-gruplarda bir fark görülmez iken (Şekil 4.9A), tüm monositik alt-gruplarda PCR 8 ve 15. Günlerde en yüksek HLA-DR düzeyi saptanmıştır (Şekil 4.9B). Takip döneminde non-klasik ve klasik monositler azalma trendinde olup (Şekil 4.9C); Bu alt-gruplardaki HLA-DR düzeyleri takip dönemi ile artış trendine geçmiştir (Şekil 4.9D).



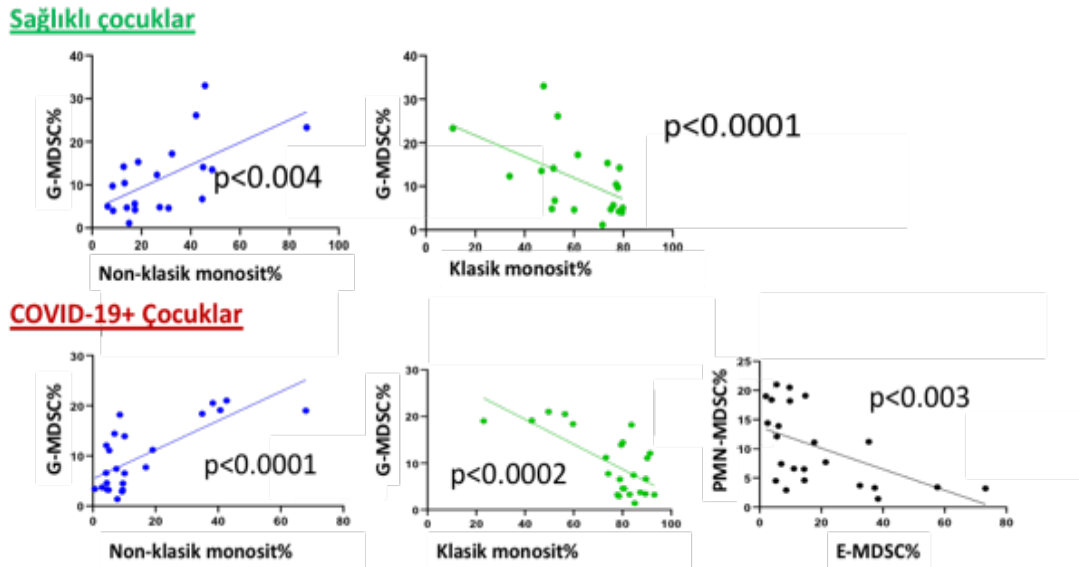
Şekil 4.9 COVID-19 pozitif çocuklardaki monositik hücre alt-gruplarının A) PCR gününe göre dağılımı B) PCR gününe göre HLA-DR taşıma düzeyleri C) takip dönemindeki değişimleri ve D) takip dönemindeki HLA-DR düzeylerinde değişim. $p<0,05$ *; $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***

Erişkin bireylerde monositik hücre alt-gruplarından ara düzey monositlerin klasik monositlere oranla HLA-DR'yi tüm gruplarda daha yüksek taşıdığı görülmüştür (Şekil 4.10B). CD16- klasik monositlerin ise, literatürle uyumlu olarak hafif hastalığa sahip bireylerde daha düşük olduğu görülsede, Asemptomatik bireylerde de ağır geçiren kişilere benzer şekilde yüksek bulunması dikkat çekmiştir (Şekil 4.10A).



Şekil 4.10 COVID-19+ ve sağlıklı erişkinlerdeki A) monositik hücre alt-gruplarının dağılımı B) monositik hücre alt-gruplarının HLA-DR taşıma düzeyleri p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***

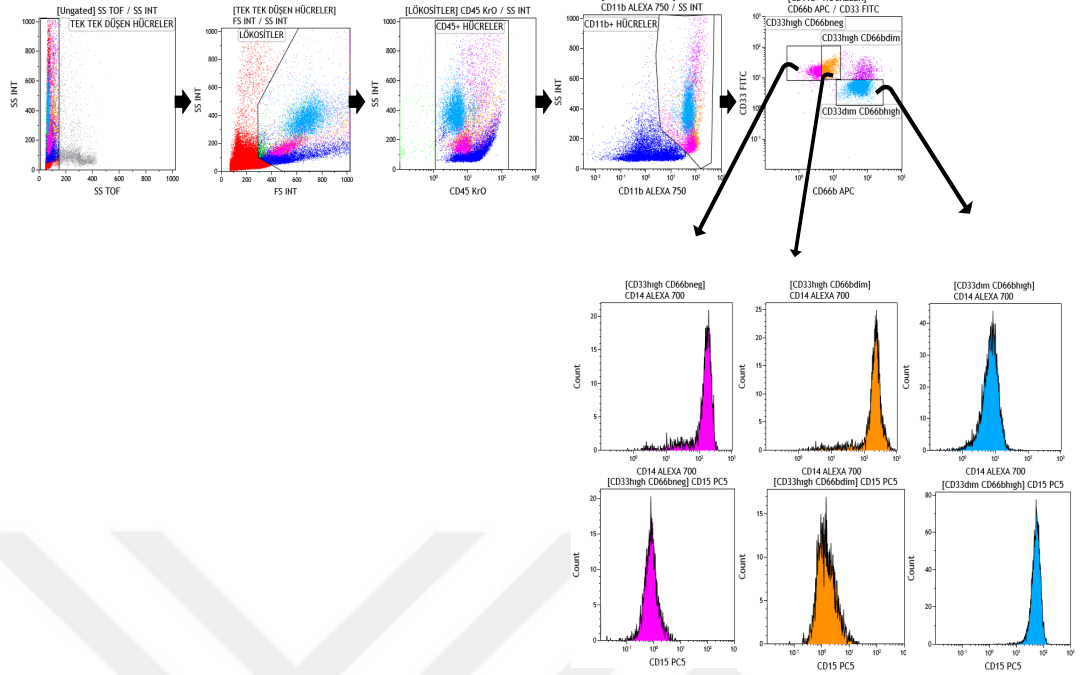
Sağlıklı çocuklardaki G-MDSC ve non-klasik monositler pozitif korelasyon gösterirken, klasik monositler negatif korelasyona sahip bulunmuştur. COVID-19 pozitif çocuklarda ise, sağlıklı ile benzer şekilde G-MDSC ve non-klasik monositler pozitif korelasyon gösterirken, klasik monositler negatif korelasyona sahip olduğu saptanmıştır. G-MDSC ve E-MDSC hücreleri ise negatif korelasyona sahip bulunmuştur (Şekil 4.11).



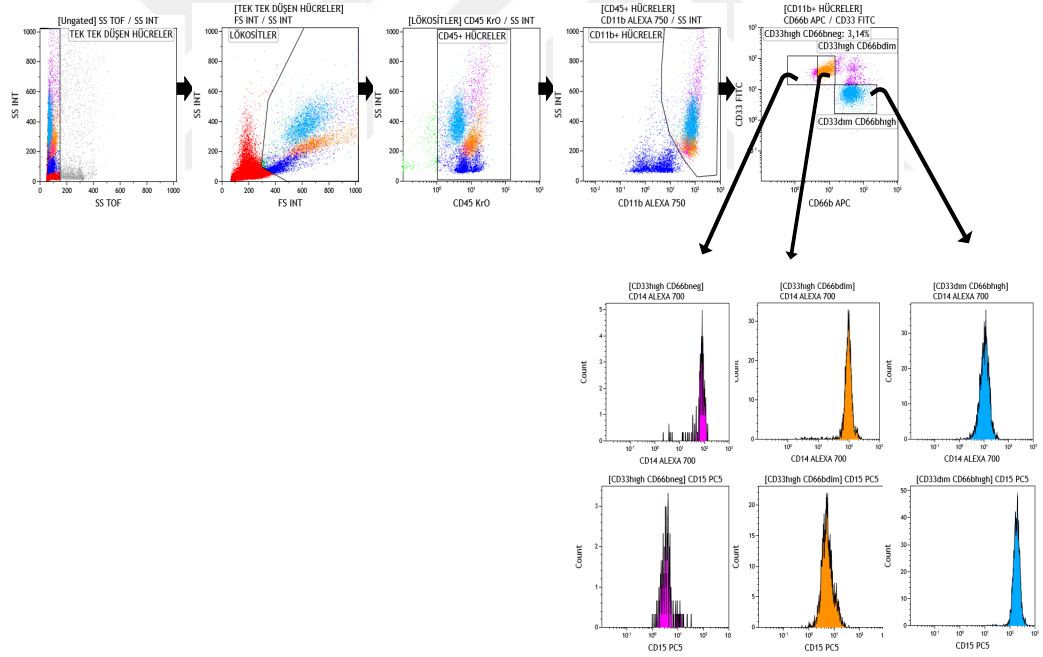
Şekil 4.11 COVID-19 pozitif ve sağlıklı çocuklardaki G-MDSC popülasyonunun monositik hücre alt-grupları ile ilişkisi

Litaratürde 2020 yılının ortalarında tanımlanan ve yeni bir monosit alt grubu olarak görülen CD66b+ monositler, yüksek pro-inflamatuar karakter göstermektedir (Horzum ve ark., 2020). COVID-19 immünopatolojisinde bu hücrelerin rolünü de araştırarak, akım sitometride değerlendirmelerini gerçekleştirdik. Bu hücreler monositlerle ortak CD33 ve G-MDSC'ler ile ortak CD66b belirtecini taşıdığı için, kapılama stratejinde total monositler, CD66b+ monositler ve G-MDSC'ler olacağı için hücre gruplarının birbirine karışmadığı doğrulandı. CD33yüksek/CD66bdim hücreler CD66b+ monositler; CD33yüksek/CD66b- hücreler monositler ve CD33dim/CD66byüksek hücreler G-MDSC'ler olarak kapılanmıştır. Ayrıca, G-MDSC'lerin CD14-/CD15+; CD66b+ monositlerin CD14+/CD15dim ve monositlerin CD14+/CD15- olduğu doğrulanmıştır. CD66b+ monositler normal monositlere göre daha yüksek düzeyde CD14 eksprese etmekte olup, ilgili analizlerde bu doğrulama da yapılmıştır (Şekil 4.12).

KONTROL ÇOCUK MONOSİT/CD66b+ MONOSİTLER

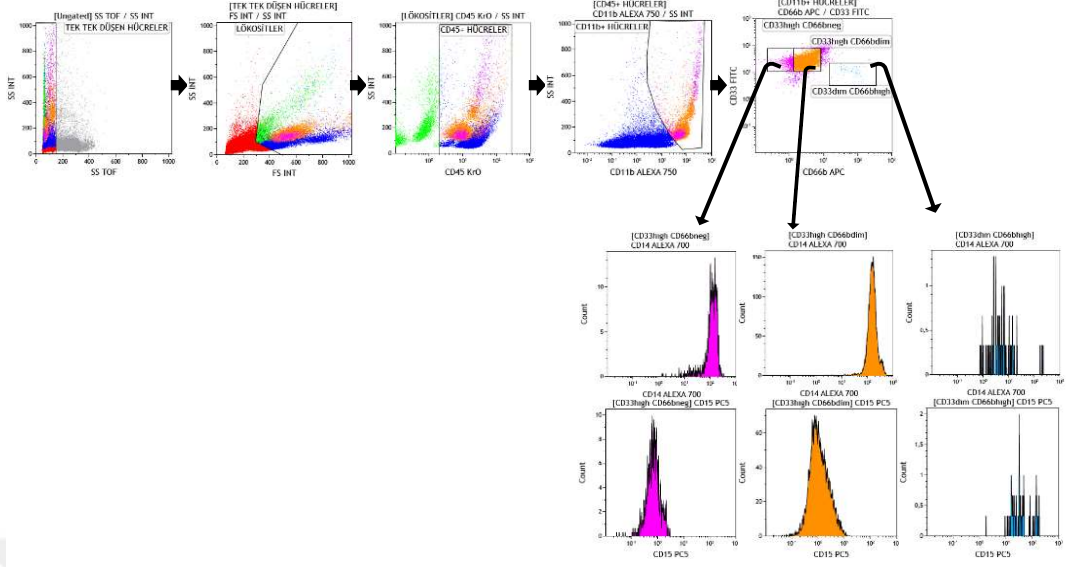


COVID19+ ÇOCUK MONOSİT/CD66b+ MONOSİTLER

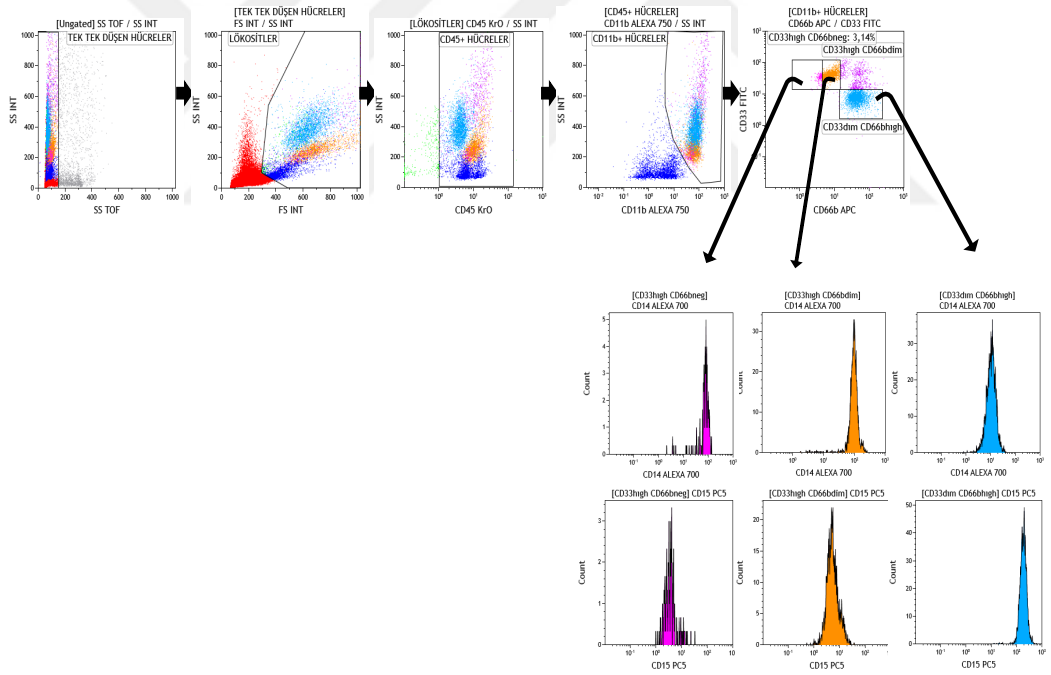


Şekil 4.12 CD66b+ monositleri analiz etmek için kullanılan kapılama strateji. Erişkin ve çocuk bireylerde aynı strateji kullanılmış olup, şekil temsili akım sitometri sonuçlarını göstermektedir.

KONTROL ERIŞKİN MONOSİT/CD66b+ MONOSİTLER

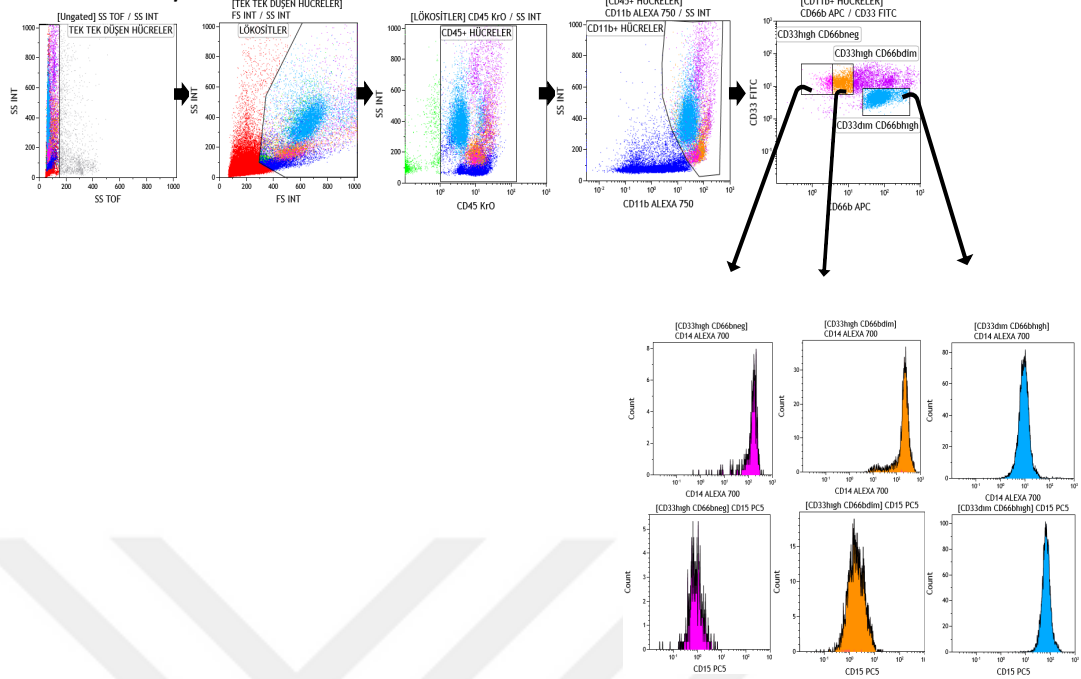


KOMPLİKE OLMAMIŞ MONOSİT/CD66b+ MONOSİTLER

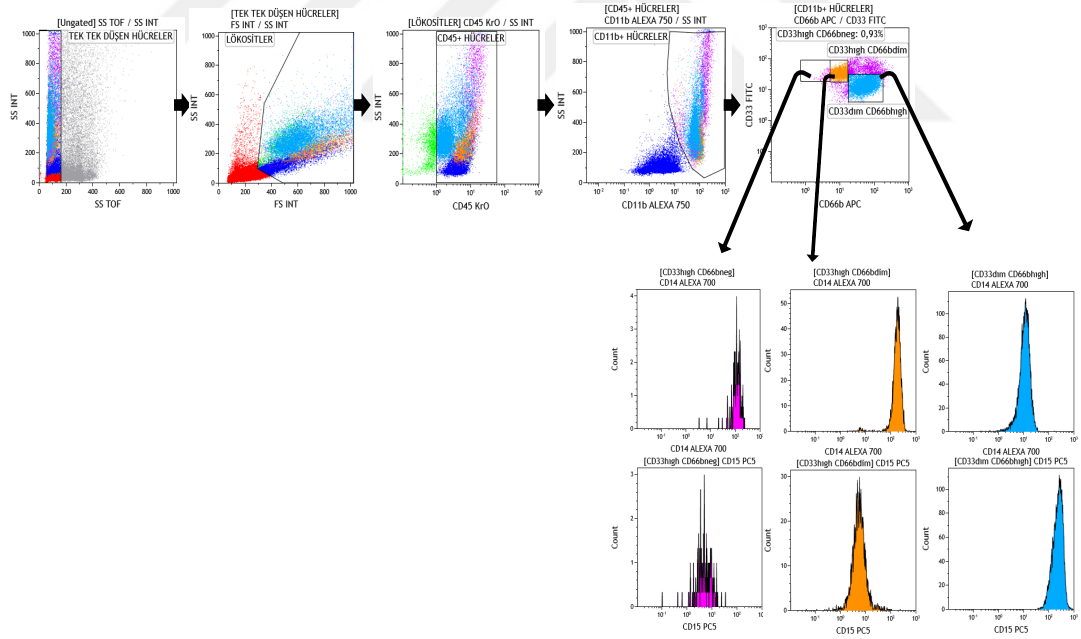


Şekil 4.12 devam

HAFİF MONOSİT/CD66b+ MONOSİTLER

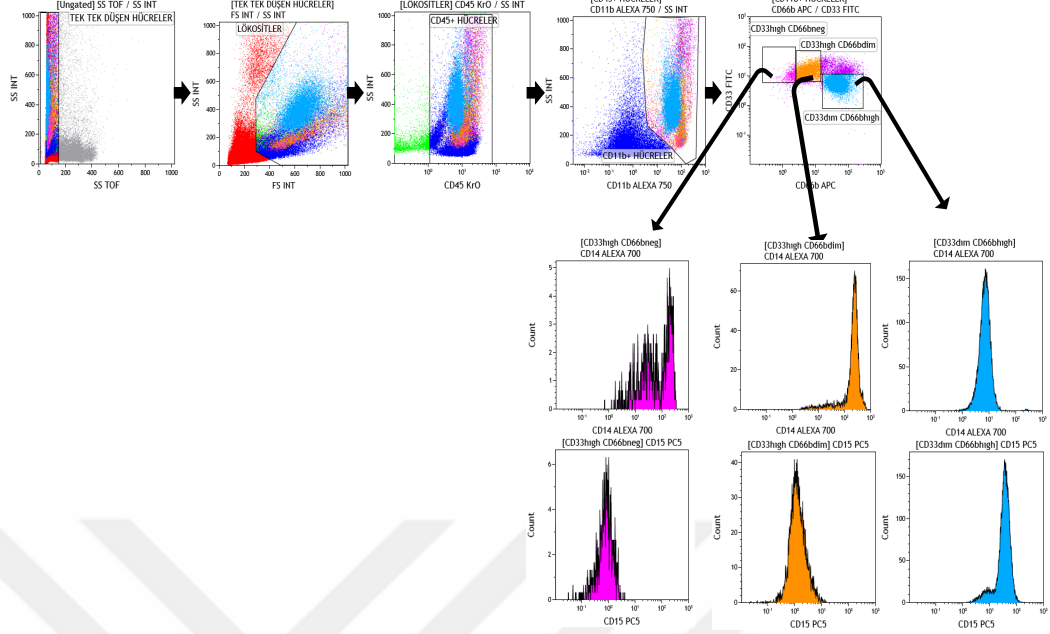


ORTA MONOSİT/CD66b+ MONOSİTLER



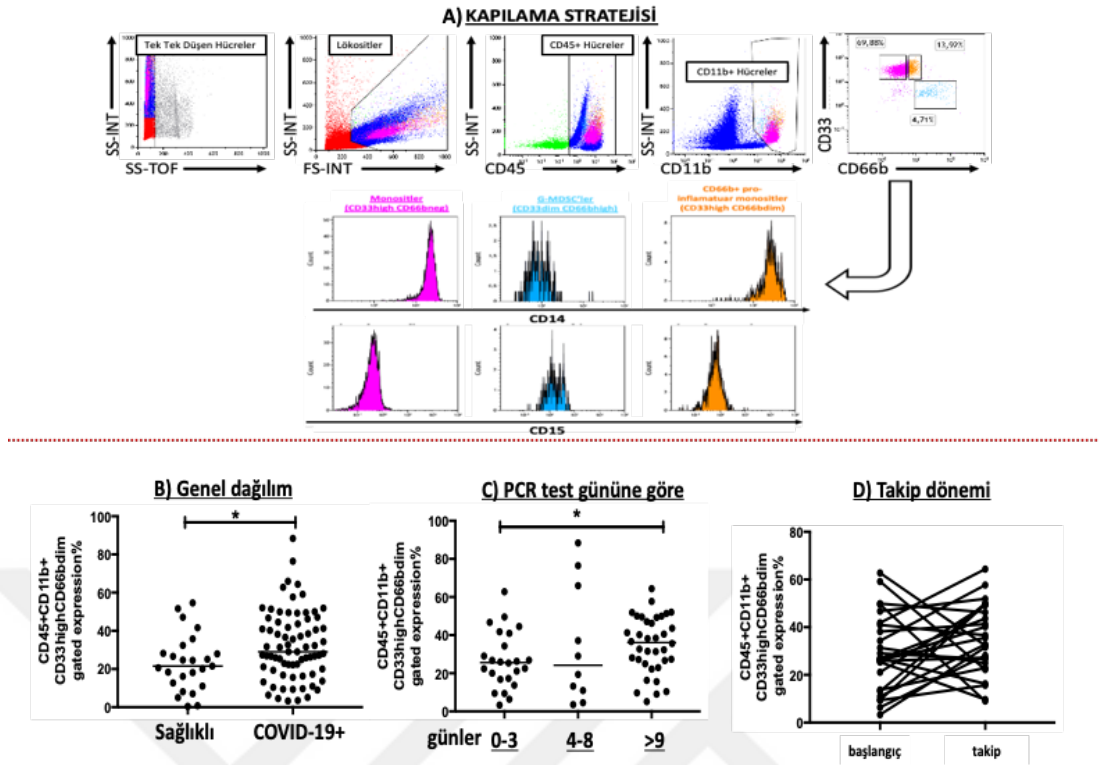
Şekil 4.12 devam

AĞIR MONOSİT/CD66b+ MONOSİTLER



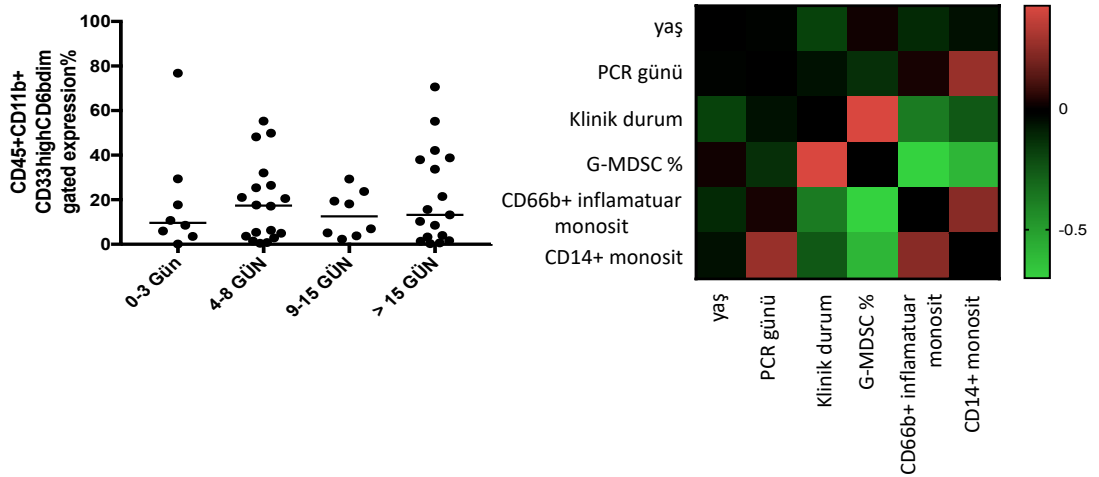
Şekil 4.12 devam

CD66b+ monositler sağlıklı çocuklarda da yüksek miktarda olup, COVID-19 pozitifliği ile oldukça yüksek düzeylere çıkmaktadır (Şekil 4.13). Özellikle, geç inflamasyon döneminde akut döneme göre daha yüksek düzeylerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.13). Erişkin sağlıklı bireylerde bu hücreler oldukça düşük düzeylerde olup, PCR gününe göre dağılımlarında bir fark görülmemiştir. Özellikle çok yüksek düzeylerde CD66b+ pozitifliğine sahip hastaların klinik durumlarının daha iyi seyrettiği görülmüştür (Şekil 4.14). Ayrıca, bu hücrelerin G-MDSC'ler ile negatif korelasyon ve CD14+ monositlerle pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.13. COVID+ ve sağlıklı çocuklardaki CD66b+ hücreler. A) kapılama (gating) stratejisi, B) genel dağılım C) PCR gününe göre dağılım ve D) takip dönemindeki durumu göstermektedir.

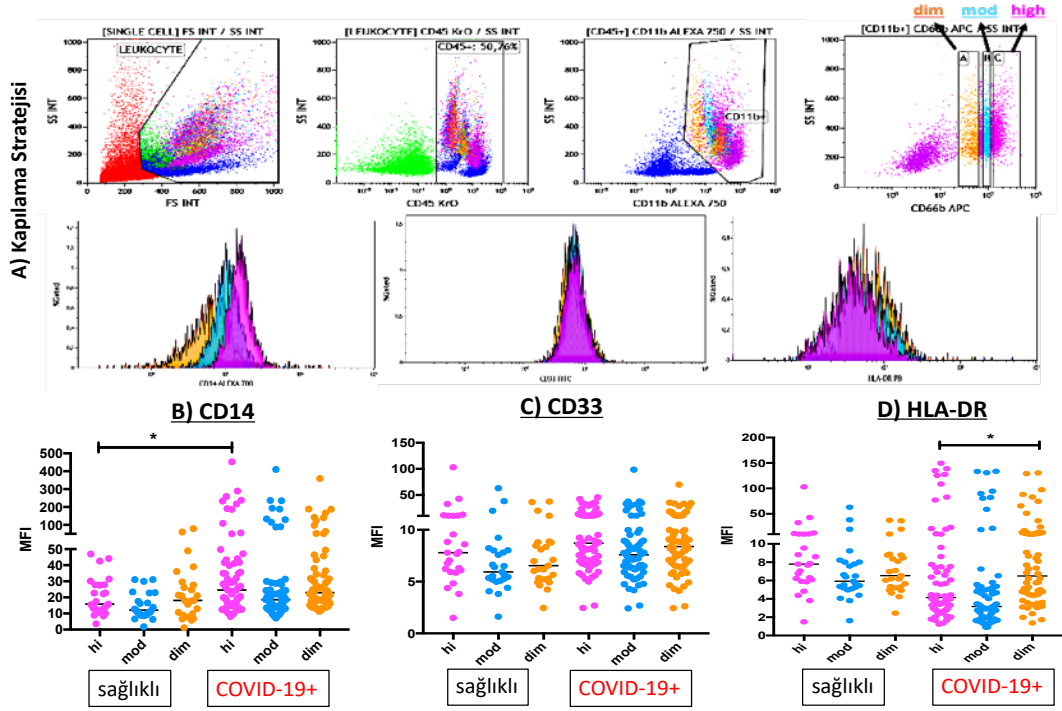
CD66b+ monositleri PCR gününe bağlı dağılımı, CD14+ monosit ve G-MDSC'ler ile ilişkisi



Şekil 4.14 Erişkinlerde CD66b+ monositlerin PCR gününe bağlı dağılımı, CD14+ monosit ve G-MDSC'ler ile olan ilişkisi

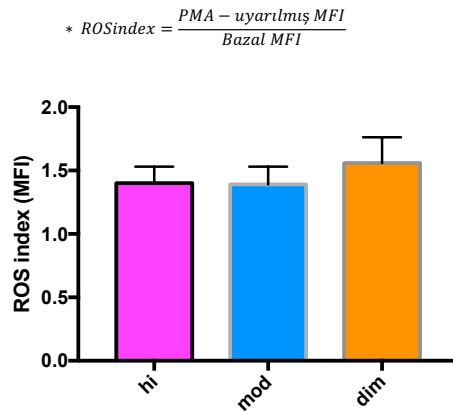
4.3 CD66b Belirtecini Farklı Düzeylerde Taşıyan Nötrofilik Alt-grupların Fenotipik ve Fonksiyonel Farklılıkları

PBMC fraksiyonunda biriken hücrelerin sadece CD66b belirteci kullanılarak (CD45+ CD11b+) bu belirteci düşük (dim), orta (mod) ve yüksek (high) olarak eksprese etme durumuna göre bir fark gözlenip gözlenmeyeceği de araştırıldı (Şekil 4.15A). COVID-19 pozitif çocuklar sağlıklı çocuklara göre kıyaslandığında CD66b high alt-populasyonda CD14 belirtecini daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.15B). COVID-19 pozitif çocuklar CD66b dim alt-grubu, CD66b high grubuna göre kıyaslandığında HLA-DR düzeyi daha yüksek bulundu (Şekil 4.15D). CD66bhigh grup CD33 dim olması durumunda G-MDSC olarak kabul edilecek bir fenotipe sahip olacakken, bu grubun hem CD33 düzeyinin diğer alt-gruplara göre fark göstermemesi hem de G-MDSC'nin CD14⁻ olması sebebi ile çocuklarda olası yeni bir alt-popülasyonun olabileceğini düşündürmüştür (Şekil 4.15B ve Şekil 4.15C). Bu gruplar arasında ROS üretim kapasitesinde fark görülmedi (Şekil 4.16A). COVID-19 pozitif hastalarda CD66b high alt-grup CD4⁺ T hücre proliferasyonunu desteklerken, CD8⁺ T hücre yanıtını CD66dim alt-gruba göre daha az uyarmıştır (Şekil 4.16B).

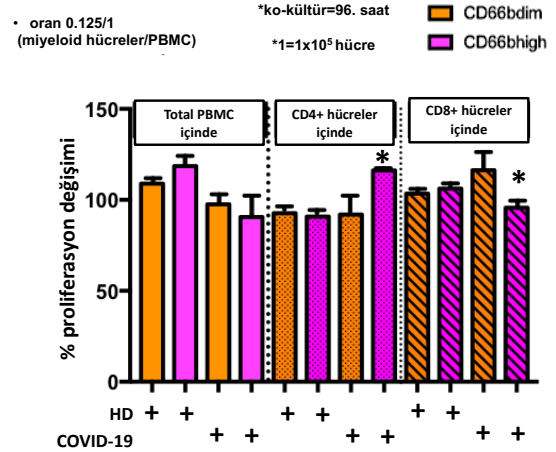


Şekil 4.15 COVID-19 pozitif veya sağlıklı çocuklardaki 1.077g/mL ficoll fazındaki hücrelerin CD66b belirtecini farklı düzeylerde taşıma durumuna göre sahip oldukları farklılıklar. A) kapılama stratejisi, B) CD14; C) CD33; D) HLA-DR belirtecini taşıma durumları gösterilmektedir $p < 0,05$

A) ROS üretim kapasitesi (C-DCF-DA)

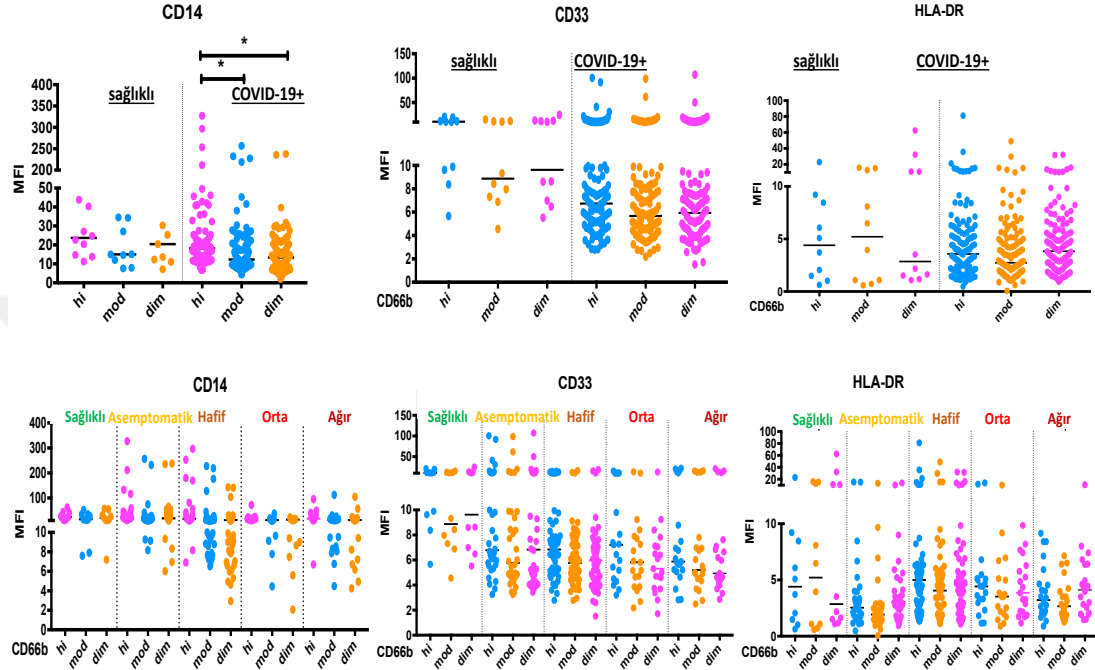


B) CD66b+ hücre/PBMC ko-kültürü (CFSE pozitif hücreler kapılanmıştır)



Şekil 4.16 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda PBMC fazındaki CD66b+ hücrelerin ROS üretim kapasiteleri ve % proliferasyon değişimleri.

Erişkinlerde, CD66b high alt-grubunda dim ve mod alt gruplarına kıyasla daha fazla CD14 ekspresyonu belirlendi. Klinik duruma göre asemptomatik ve hafif bireylerde mod'a kıyasla CD66b dim ve high alt-grupta; ağırda ise CD66b dim grupta daha fazla HLA-DR düzeyi belirlendi (Şekil 4.17).



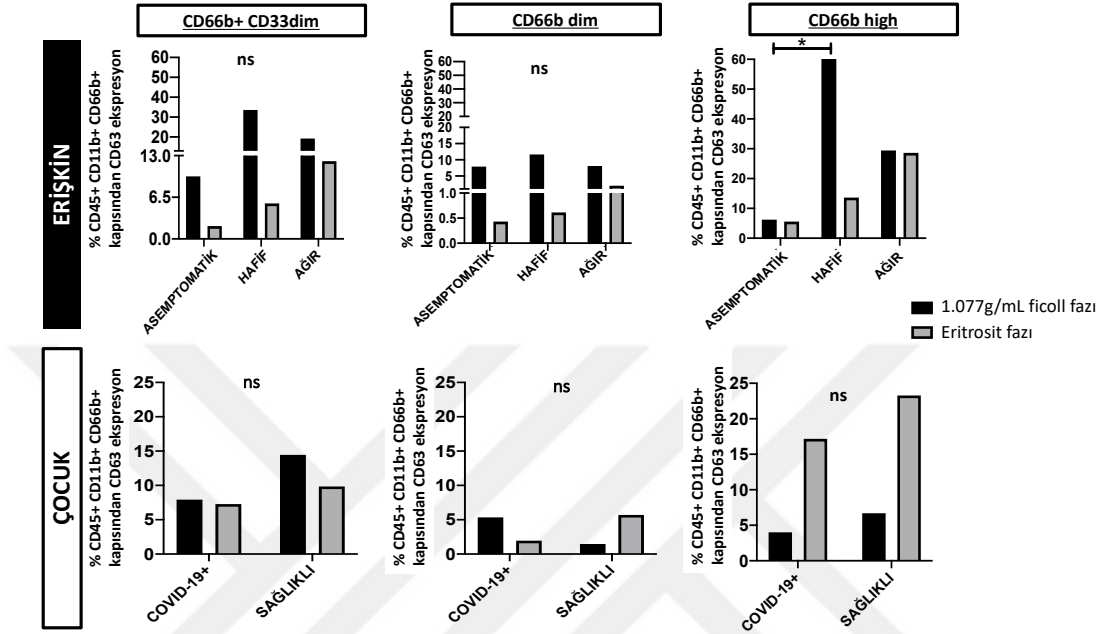
Şekil 4.17 COVID-19+ erişkinlerde 1.077g/mL ficoll fazındaki hücrelerinin CD66b belirtecini farklı düzeylerde taşımasına göre sahip oldukları farklılıklar. $p < 0,05$ *

4.4 1.077g/mL Ficoll Fazı ve Eritrosit Fazındaki CD66+ Hücrelerin CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, HLA-DR, CD117, CD10, CD63, CD62L, CD114 ve LOX-1 Belirteçlerini Eksprese Etme Düzeyleri

1.077g/mL ficoll fraksiyonu ve eritrosit fazı fraksiyonu CD66b'yi farklı düzeyde sergileyen hücrelerin CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, HLA-DR, CD117, CD10, CD63, CD62L, CD114 ve LOX-1 ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

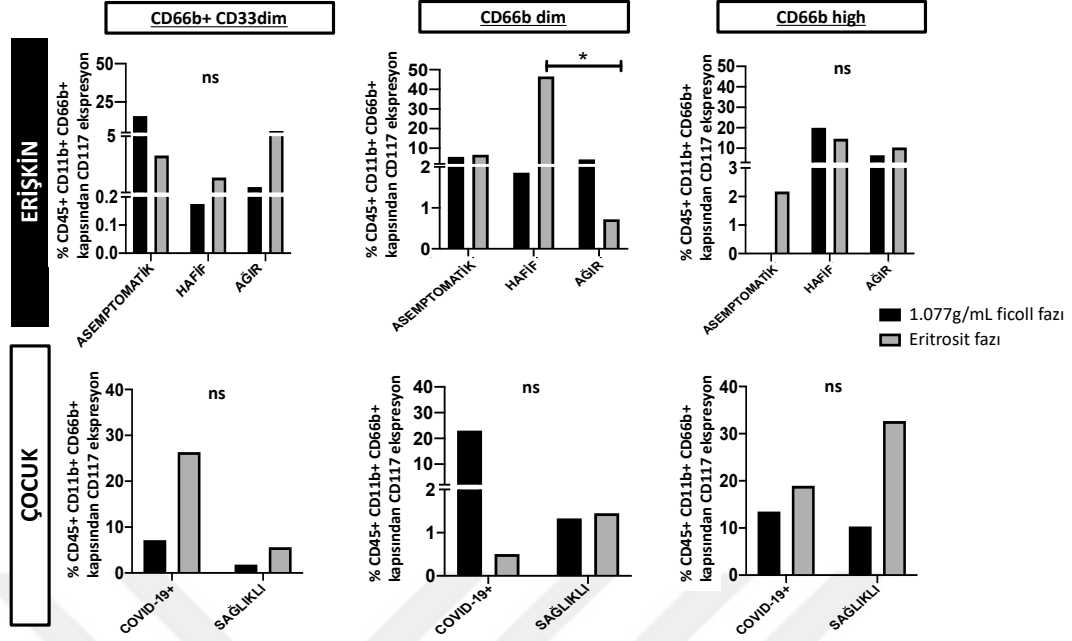
Hafif bireylerin 1.077g/ml ficoll fazındaki CD66b'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD63 ekspresyonları asemptomatik bireylerin 1.077g/mL ficoll fazındaki CD66b'yi yüksek sergileyen hücrelerin CD63 ekspresyonlarından yüksekti (Şekil 4.18). COVID-19+ ve sağlıklı erişkin bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ ve CD66b'yi düşük sergileyen hücrelerinin CD63 ekspresyonları arasında

anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.18). COVID-19+ ve sağlıklı çocuklarda 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD63 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.18).



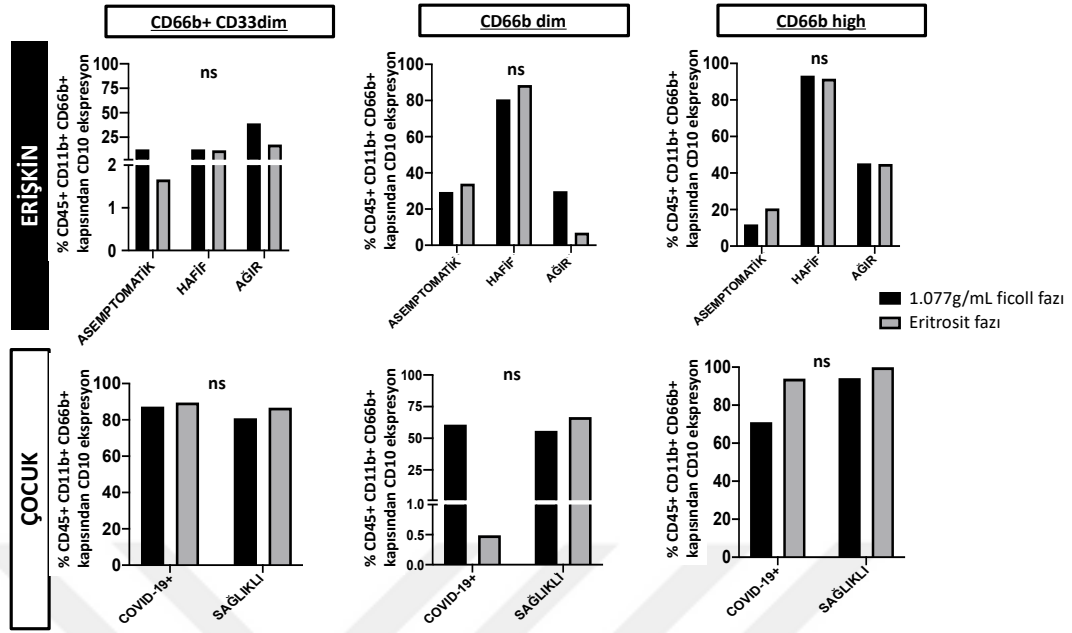
Şekil 4.18 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+’yi farklı düzeylerde sergileyen hücrelerin CD63 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. p<0,05* dim:düşük high:yüksek

Hafif semptom gösteren erişkin bireylere göre ağır bireylerin eritrosit fazı CD66b’yi düşük sergileyen hücrelerinin CD117 ekspresyon seviyeleri düşüktü (Şekil 4.19). COVID-19+ ve sağlıklı erişkin bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ ve CD66b’yi yüksek sergileyen hücrelerinin CD117 ekspresyonları arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.19). COVID-19+ ve sağlıklı çocuklarda 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b’yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD117 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD117 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. $p < 0,05^*$, dim:düşük high:yüksek

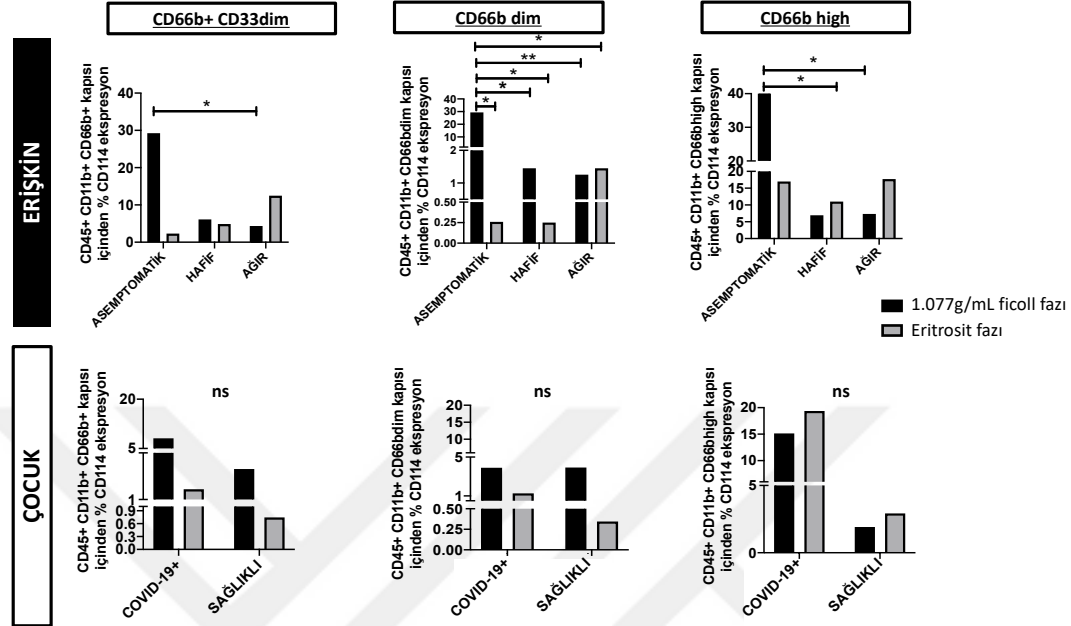
COVID-19+ ve sağlıklı çocuklarda 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD10 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.20). COVID-19+ ve sağlıklı erişkin bireylerde 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD10 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+’yi farklı düzeylerde taş sergileyen hücrelerin CD10 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. dim: düşük high: yüksek

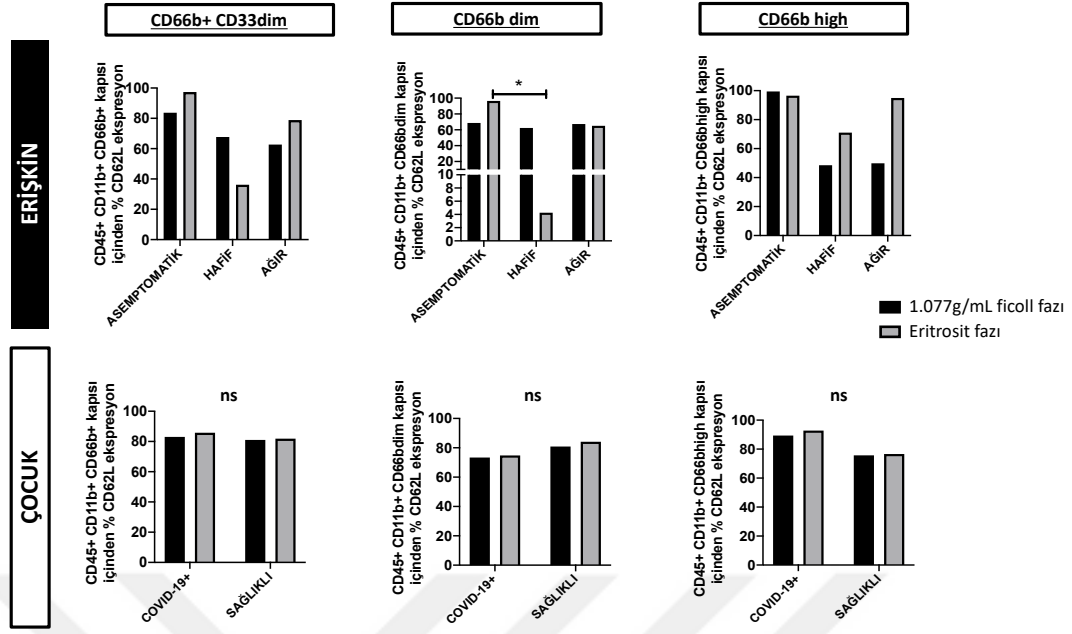
Asemptomatik bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin CD114 ekspresyon düzeyleri ağır pnömoni gösteren bireylere göre yüksekti (Şekil 4.21). Asemptomatik bireylerin 1.077 g/mL ficoll fazı CD66b’yi düşük sergileyen hücrelerinin CD114 ekspresyon düzeyleri eritrosit fazındaki CD66b’yi düşük sergileyen hücrelerinin CD114 ekspresyonlarına göre yüksekti (Şekil 4.21). Ayrıca, asemptomatik bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı CD66b’yi düşük sergileyen hücrelerinin CD114 ekspresyonu hafif pnömoni gösteren bireylerin hem 1.077g/mL ficoll fazı hem de eritrosit fazı CD66b’yi düşük sergileyen hücrelerinin CD114 ekspresyonuna göre yüksekti (Şekil 4.21). Asemptomatik bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı CD66b’yi düşük sergileyen hücrelerinin CD114 ekspresyon düzeyleri ağır pnömoni gösteren bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı ile daha anlamlı olmakla birlikte hem 1.077g/mL ficoll fazı hem de eritrosit fazı CD66b’yi düşük sergileyen hücrelerinin CD114 ekspresyon düzeylerinden yüksekti (Şekil 4.21). Asemptomatik bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı CD66b’yi yüksek sergileyen hücrelerinin CD114 ekspresyonu; hafif pnömoni gösteren bireylerdeki eritrosit fazı CD66b’yi yüksek sergileyen hücrelerinin CD114 ekspresyonundan ve ağır pnömoni gösteren bireylerdeki 1.077g/mL ficoll fazı CD66b’yi yüksek düzeyde sergileyen hücrelerin CD114 ekspresyonundan yüksekti

(Şekil 4.21). COVID-19+ ve sağlıklı çocuklarda 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b'yı farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD114 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b'yı farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD114 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$ dim:düşük high:yüksek

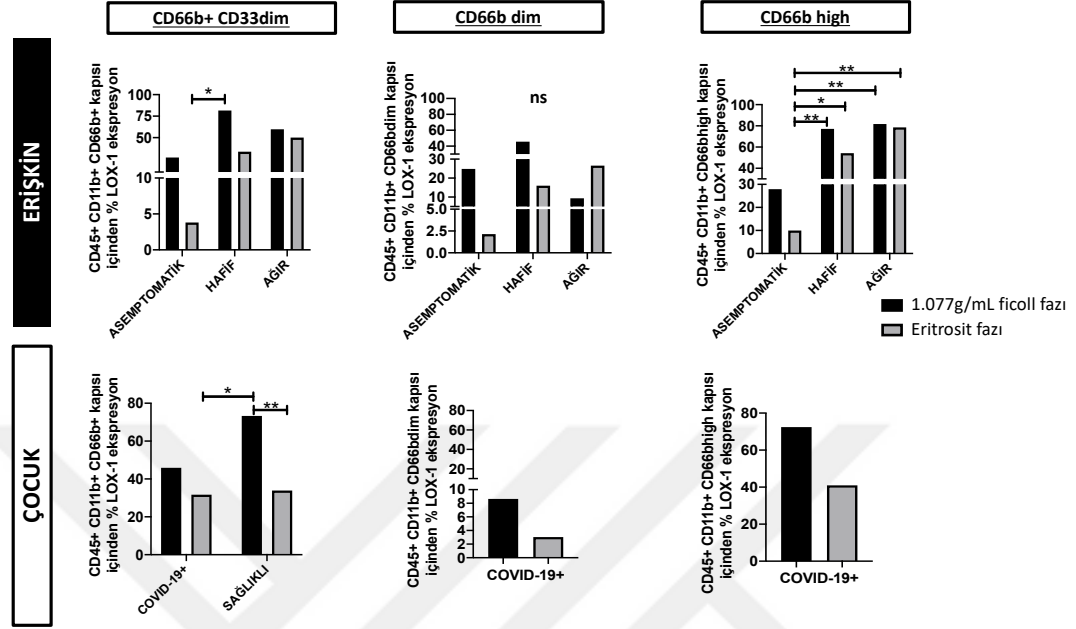
Asemptomatik bireylerin eritrosit fazı CD66b'yı düşük sergileyen hücrelerinin CD62L ekspresyonu hafif pnömoni gösteren bireylerdeki CD66b'yı düşük düzeyde sergileyen hücrelerin CD62L ekspresyonundan yüksekti (Şekil 4.22). COVID-19+ erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ ve CD66b'yı yüksek düzeyde taşıyan hücrelerin CD62L ekspresyonları arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.22). COVID-19+ ve sağlıklı çocuklarda 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b'yı farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD62L ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD1114 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. $p < 0,05$ * dim:düşük high:yüksek

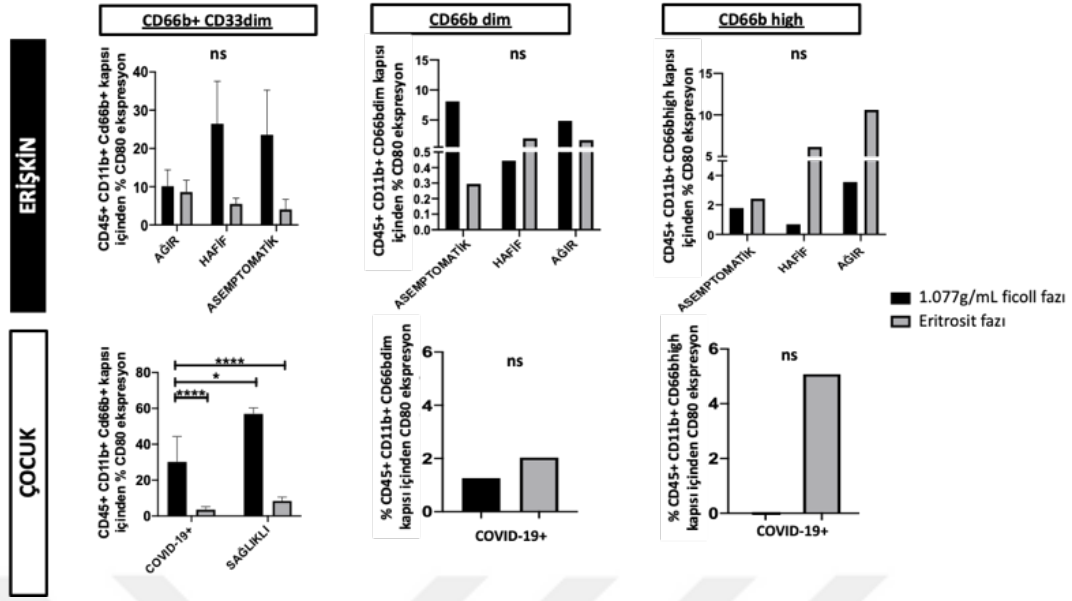
LOX-1 miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerde bulunmaktadır. Asemptomatik bireylerdeki eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin LOX-1 ekspresyonları, hafif pnömoni gösteren erişkin bireylerdeki 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin LOX-1 ekspresyonlarından düşüktü (Şekil 4.23). Asemptomatik bireylerin eritrosit fazı CD66b'yi yüksek taşıyan hücrelerinin LOX-1 ekspresyonu, hafif pnömoni gösteren bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı daha anlamlı olmak üzere hem 1.077g/mL ficoll fazı hem de eritrosit fazı CD66b'yi yüksek taşıyan hücrelerinin LOX-1 ekspresyonlarından düşüktü (Şekil 4.23). Asemptomatik bireylerin eritrosit fazı CD66b'yi yüksek taşıyan hücrelerinin LOX-1 ekspresyonu, ağır pnömoni gösteren bireylerin hem 1.077g/mL ficoll fazı hem de eritrosit fazı CD66b'yi yüksek taşıyan hücrelerinin LOX-1 ekspresyonlarından düşüktü. COVID-19+ erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b'yi düşük taşıyan hücrelerinin LOX-1 ekspresyonu arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.23). COVID-19+ ve sağlıklı çocukların eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin LOX-1 ekspresyonu sağlıklı çocukların 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin LOX-1 ekspresyonundan düşüktü (Şekil 4.23). Sağlıklı çocukların 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin LOX-1 ekspresyonu, eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin LOX-1 ekspresyonundan yüksekti (Şekil 4.23). COVID-19+ çocukların 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b'yi düşük ve yüksek sergileyen

hücrelerinin LOX-1 ekspresyonu düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.23).



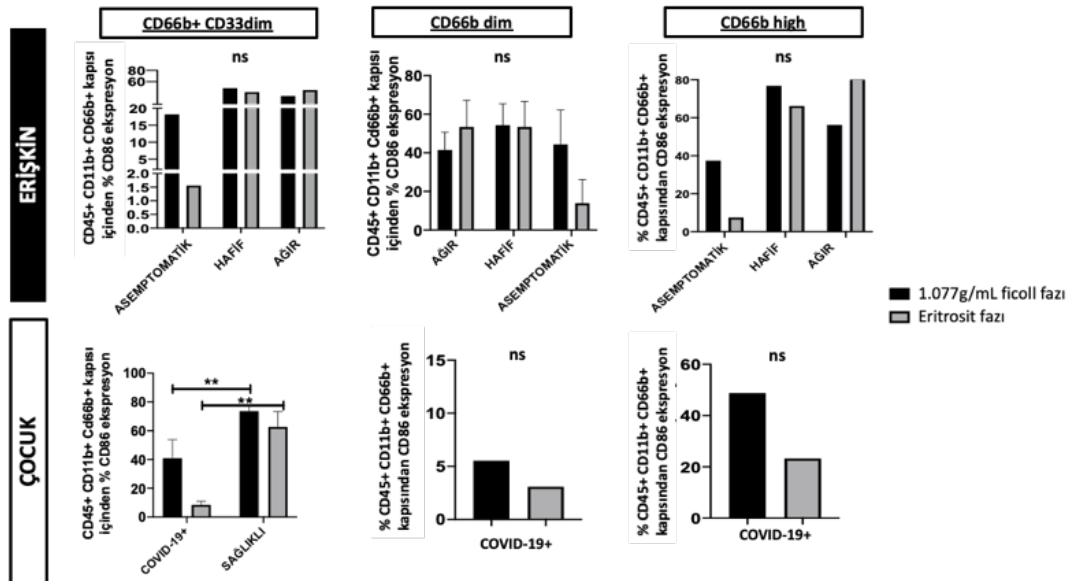
Şekil 4.23 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+’yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD114 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. $p < 0,05$ * dim:düşük high:yüksek

Sağlıklı çocuk 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin CD80 ekspresyonları eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin CD80 ekspresyonlarından yüksekti (Şekil 4.24). Ayrıca sağlıklı çocuk 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin CD80 ekspresyonları COVID-19+ çocukların hem eritrosit fazı hem de 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin CD80 ekspresyonlarından yüksekti ve anlamlılık eritrosit fazı hücrelerinde daha yüksekti (Şekil 4.24). COVID-19+ ve sağlıklı erişkin bireylerde 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b’yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD80 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.24).



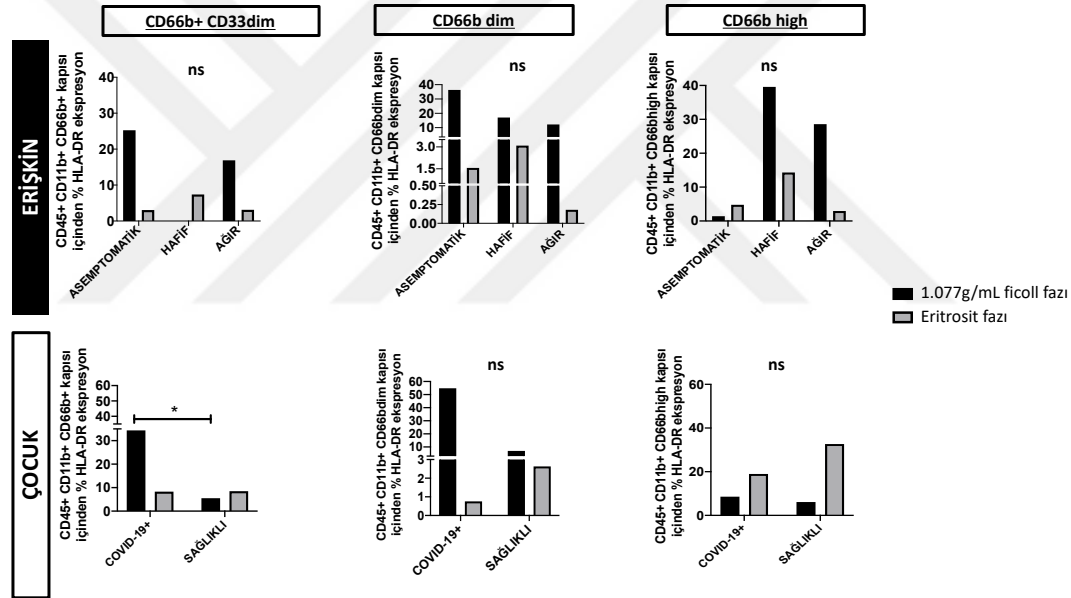
Şekil 4.24 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD80 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$ dim:düşük high:yüksek

Sağlıklı çocuk 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin CD86 ekspresyonları COVID-19+ çocuk 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin CD86 ekspresyonlarından yüksekti (Şekil 4.25). Sağlıklı çocuk eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin CD86 ekspresyonları COVID-19+ çocuk eritrosit CD66b+ hücrelerinin CD86 ekspresyonlarından yüksekti (Şekil 4.25). COVID-19+ ve sağlıklı erişkin bireylerde 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin CD86 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taş sergileyen hücrelerin CD86 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. $p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$; $p<0,001^{***}$ dim:düşük high:yüksek

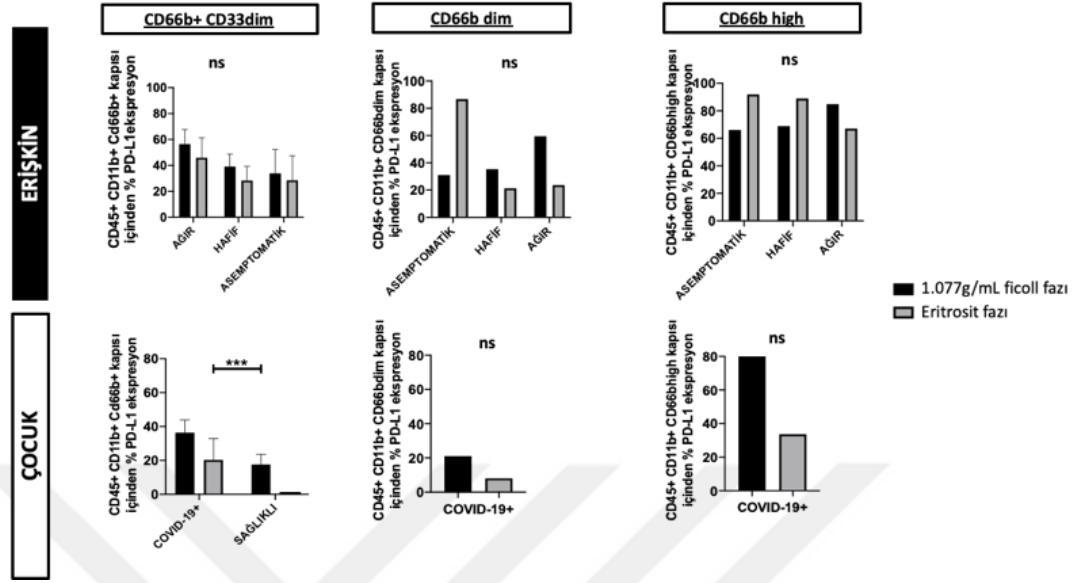
COVID-19+ çocukların 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin HLA-DR ekspresyon düzeyi sağlıklı çocuklarınkine göre yüksekti. COVID-19+ ve sağlıklı çocuklarda 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+'yi düşük ve CD66b+'yi yüksek sergileyen hücrelerin HLA-DR ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.26). COVID-19+ ve sağlıklı erişkin bireylerde 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin HLA-DR ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taş sergileyen hücrelerin HLA-DR ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. $p<0,01^{**}$ dim:düşük high:yüksek

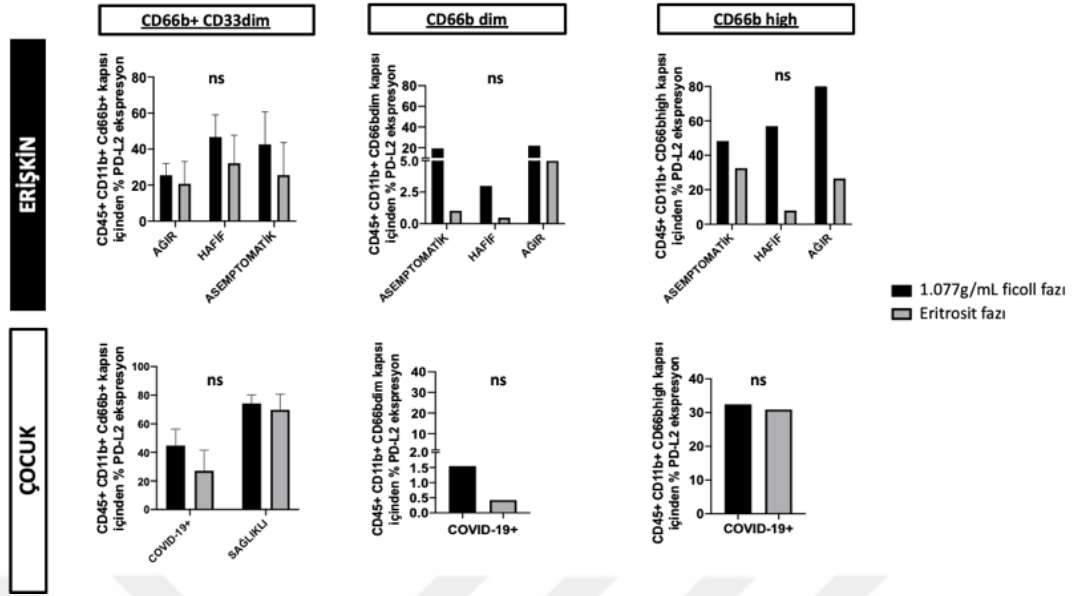
Sağlıklı çocuklarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu COVID-19+ çocukların 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerinin PD-L1 ekspresyonlarından düşüktü (Şekil 4.27). Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazında CD66b+'yi düşük ve yüksek sergileyen hücrelerinin PD-L1 ekspresyonları açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.27). COVID-19+ ve sağlıklı erişkin bireylerde 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki

CD66b'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin PD-L1 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+’yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin PD-L1 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. $p < 0,001$ *** dim:düşük high:yüksek

COVID-19+ ve sağlıklı erişkin bireylerde 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b’yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin PD-L2 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.28). COVID-19+ ve sağlıklı çocuklarda 1.077g/ml ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b’yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin PD-L2 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.28).

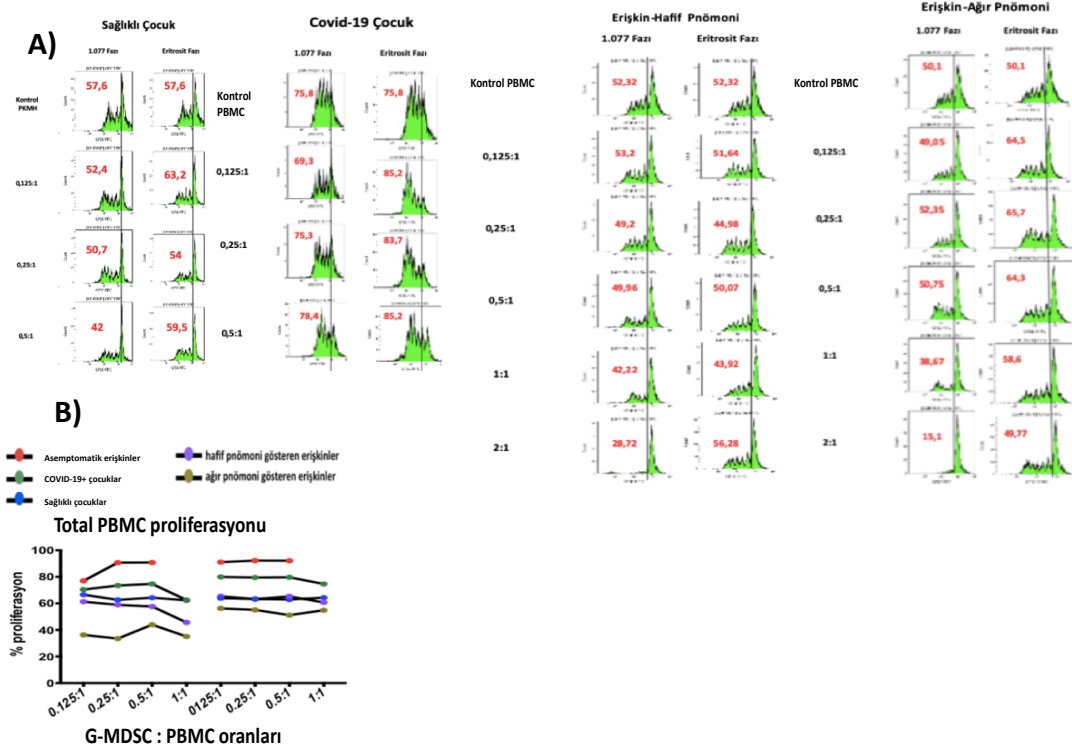


Şekil 4.28 COVID-19+ ve sağlıklı çocuk ile erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b+'yi farklı düzeylerde taşıyan hücrelerin PD-L2 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. dim:düşük high:yüksek

4.5 G-MDSC ve Matür Nötrofillerin T Hücre Yanıtları Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin tanımlanması ve literatürde artmaya devam eden bilgiler neticesinde son birkaç yıldır bu hücreleri sadece fenotipik olarak tanımlamanın yeterli olamayacağı ve mutlaka fonksiyonel olarak da T hücre yanıtları üzerine olan etkilerinin gösterilmesinin gerektiği bilim camiası tarafından kabul görmektedir. Bu nedenle tez çalışmamızda T hücre yanıtları üzerine olan etkilerini kapsamlı bir şekilde ko-kültür deneyleri ile değerlendirdik.

Son 10 gün içinde herhangi bir inflamatuvar hastalık geçirmemiş ve immün sistemini etkileyen kronik bir rahatsızlığı bulunmayan sağlıklı kişilerden periferik venöz kan alınarak, Ficoll gradiyent santrifüjleme yöntemi ile PBMC fraksiyonu ayrılmıştır ve bu hücreler CFSE ile işaretlenmiştir. MACS, FACS ve eritrosit patlatma solüsyonu ile saflaştırılan G-MDSC ve matür nötrofiller farklı oranlarda CFSE işaretli PBMC hücrelerinin üzerine eklenerek, 96 saatin sonunda hem total PBMC hücrelerinin hem de antikor işaretlemesi yapılarak, T hücrelerin proliferasyon kapasiteleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.29).

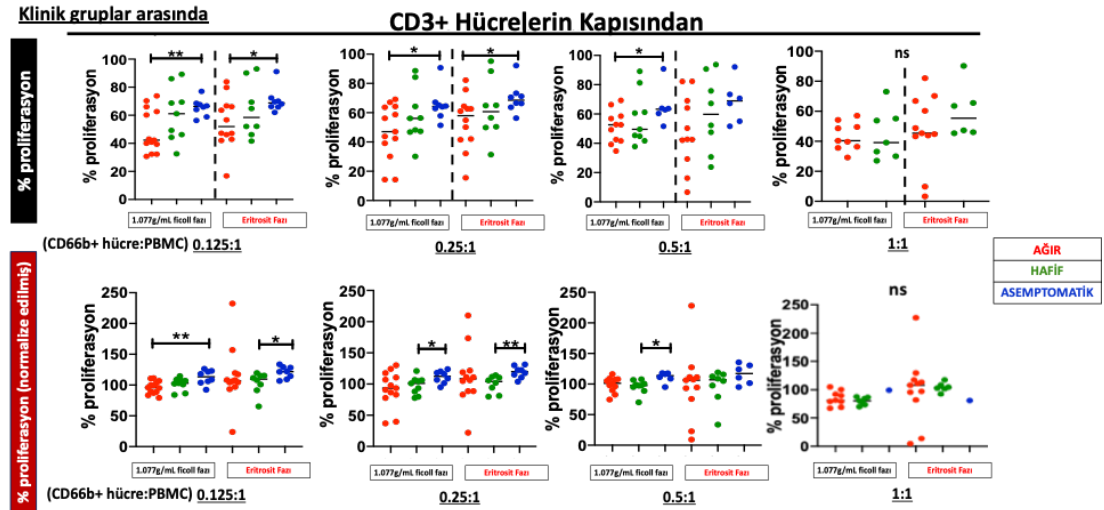


Şekil 4.29 A) akım sitometri değerlendirilen temsili histogramlar B) total PBMC T hücre proliferasyonuna olan etkilerini göstermektedir.

G-MDSC hücrelerinin T hücre proliferasyonlarını matür nötrofillere göre baskıladığı veya daha az uyardığı literatür tarafından bilinmektedir. Çalışmamızda da bununla uyumlu şekilde ağır ve hafif klinik tabloya sahip erişkin bireylerin ve COVID-19+ çocukların G-MDSC'lerinin matür nötrofil hücrelerine göre T hücre yanıtlarını daha fazla baskıladığı görülmüştür. Fakat, ilginç bir şekilde sağlıklı çocuk ve asemptomatik (komplike olmamış) erişkin bireylerin G-MDSC ve matür nötrofilleri aynı uyarıcılık kapasitesinde etki gösterdi (Şekil 4.29A, Şekil 4.29B, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30).

1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1 koşulunda 96 saat kültürü sonucu CD3+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında ağır pnömoni gösteren bireylerin T hücre çoğalma kapasitesi asemptomatik bireylere göre düşüktü (Şekil 4.30). Eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1 koşulunda 96 saat kültürü sonucu CD3+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında ağır pnömoni gösteren bireylerin T hücre çoğalma kapasitesi asemptomatik bireylere göre düşüktü (Şekil

4.30). 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,25:1 koşulunda 96 saat kültürü sonucu CD3+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında ağır pnömoni gösteren bireylerin T hücre çoğalma kapasitesi asemptomatik bireylere göre düşüktü (Şekil 4.30). Eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,25:1 koşulunda 96 saat kültürü sonucu CD3+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında ağır pnömoni gösteren bireylerin T hücre çoğalma kapasitesi asemptomatik bireylere göre düşüktü (Şekil 4.30). 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,5:1 koşulunda 96 saat kültürü sonucu CD3+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında ağır pnömoni gösteren bireylerin T hücre çoğalma kapasitesi asemptomatik bireylere göre düşüktü (Şekil 4.30). Asemptomatik ve ağır pnömoni gösteren bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 1:1 koşulunda 96 saat kültürü sonucu CD3+ kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.30). COVID-19+ erişkin bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonucu CD3+ hücre kapısından kontrole göre normalize edilerek T hücre çoğalma kapasitelerine bakıldığında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.30).

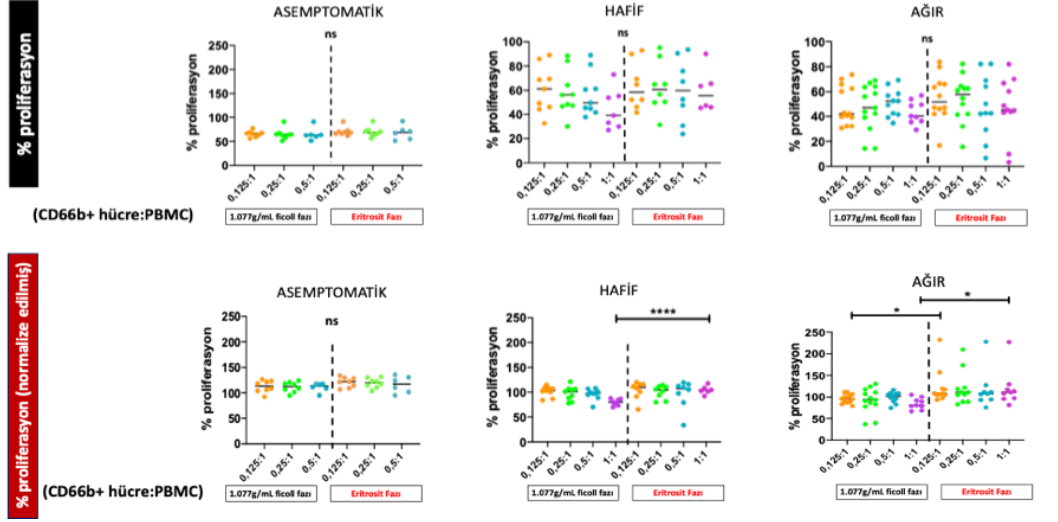


Şekil 4.30 Erişkin bireylerde klinik gruplar arasında 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD3+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

COVID-19+ erişkin bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrasında CD3+ hücre kapısından analiz edilen T hücre çoğalma kapasiteleri açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.31). Ağır pnömoni gösteren bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 1:1 koşulunda 96 saat kültür sonrası CD3+ hücre kapısından kontrole göre normalize edilen T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerine göre T hücre çoğalma kapasitesi daha yüksekti (Şekil 4.31). Ağır pnömoni gösteren bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1 koşulunda 96 saat kültür sonrası CD3+ hücre kapısından kontrole göre normalize edilen T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerine göre T hücre çoğalma kapasitesi daha yüksekti (Şekil 4.31). Hafif pnömoni gösteren bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1 koşulunda 96 saat kültür sonrası CD3+ hücre kapısından kontrole göre normalize edilen T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerine göre T hücre çoğalma kapasitesi daha yüksekti (Şekil 4.31). Asemptomatik bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1 koşulunda 96 saat kültür sonrası CD3+ hücre kapısından kontrole göre normalize edilen T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.31).

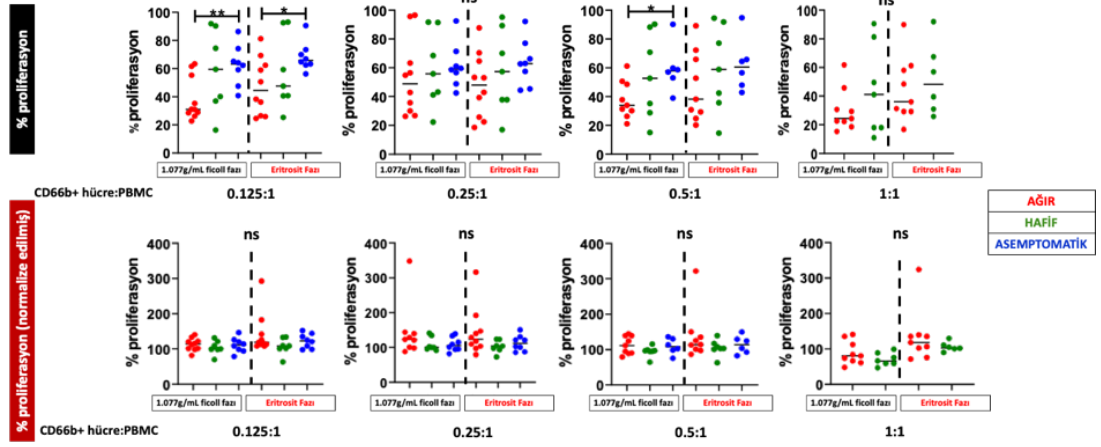
Hücre oranlarına bağlı olarak

CD3+ Hücrelerin Kapısından



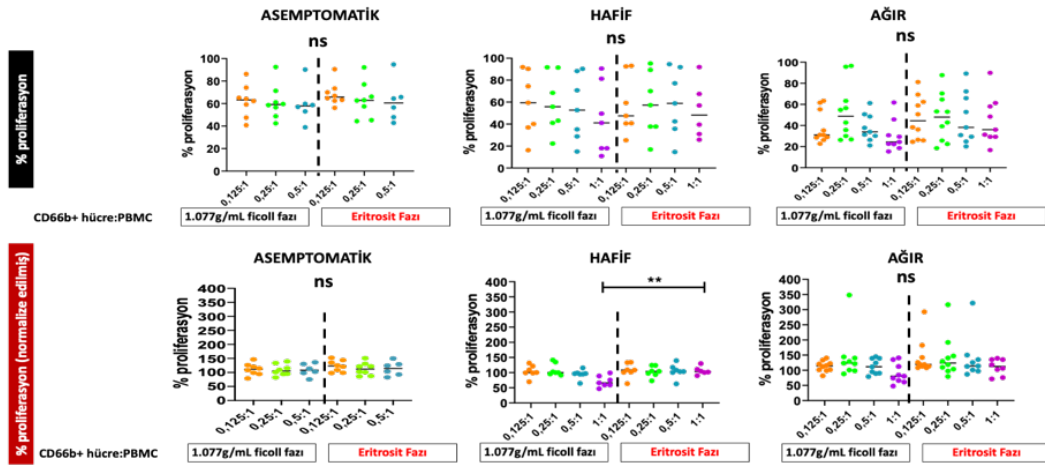
Şekil 4.31 Erişkin bireylerde hücre oranlarına bağlı olarak 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültür sonrası CD3+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

Asemptomatik bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1 koşulunda 96 saat kültür sonrası CD4+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında ağır pnömoni gösteren bireylere göre iki fazda da T hücre çoğalma kapasiteleri daha yüksekti (Şekil4.32). Asemptomatik bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,5:1 koşulunda 96 saat kültür sonrası CD4+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasitesine bakıldığında ağır pnömoni gösteren bireylere göre T hücre çoğalma kapasiteleri daha yüksekti (Şekil4.32). Erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültür sonrası CD4+ hücre kapısından sağlıklı kontrole göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.32).



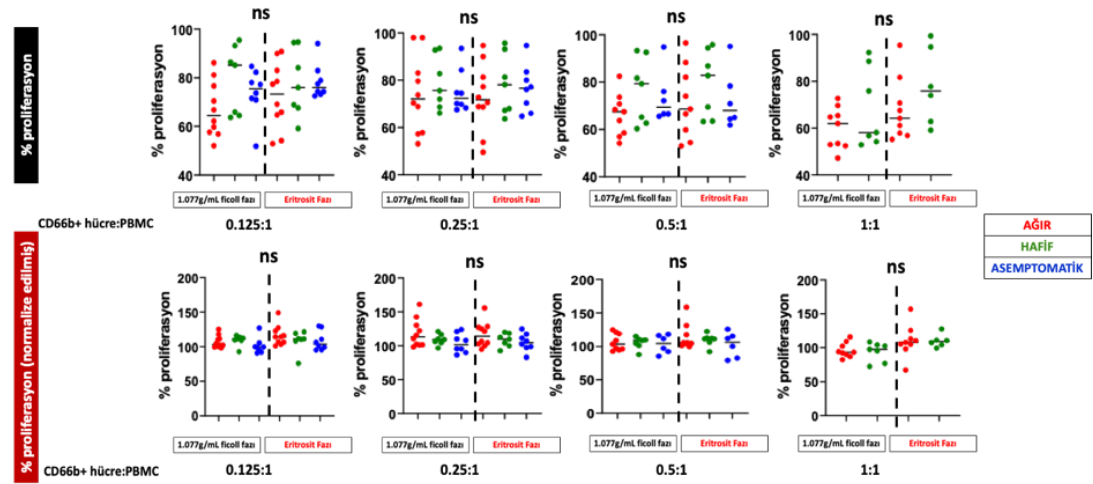
Şekil 4.32 Erişkin bireylerde klinik gruplar arasında 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD4+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

Erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD4+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.33). Hafif bireylerde CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 1:1 koşulunda 96 saat kültürü sonrası CD4+ hücre kapısından sağlıklı kontrole göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasiteleri açısından eritrosit fazı CD66b+ hücreleri 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücrelerine göre proliferasyonu daha uyarıcıydı (Şekil 4.33).



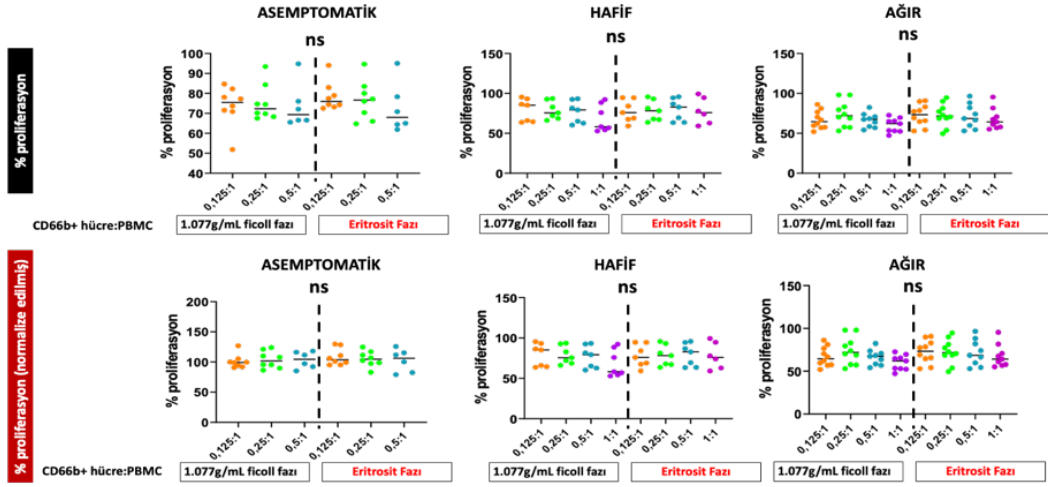
Şekil 4.33 Erişkin bireylerde hücre oranlarına bağlı olarak 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD4+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

Erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD8+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.34). Erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD8+ hücre kapısından sağlıklı kontrole göre normalize edilen T hücre çoğalma kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.34).



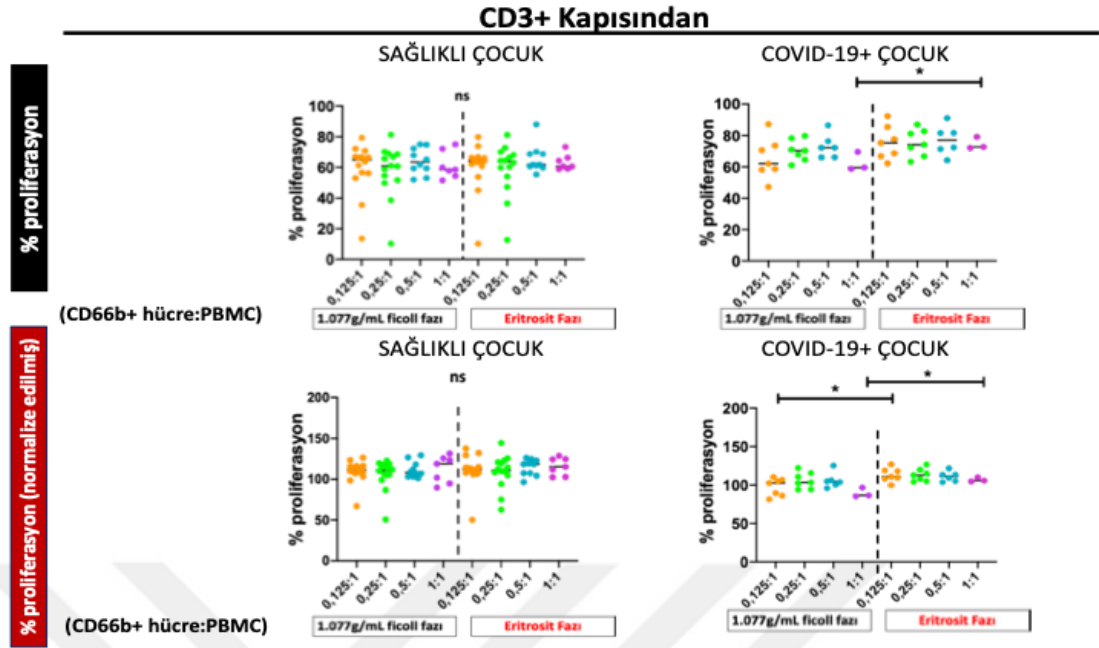
Şekil 4.34 Erişkin bireylerde klinik gruplar arasında 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

Erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD8+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.35). Erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD8+ hücre kapısından sağlıklı kontrole göre normalize edilen T hücre çoğalma kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Erişkin bireylerde hücre oranlarına bağlı olarak 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

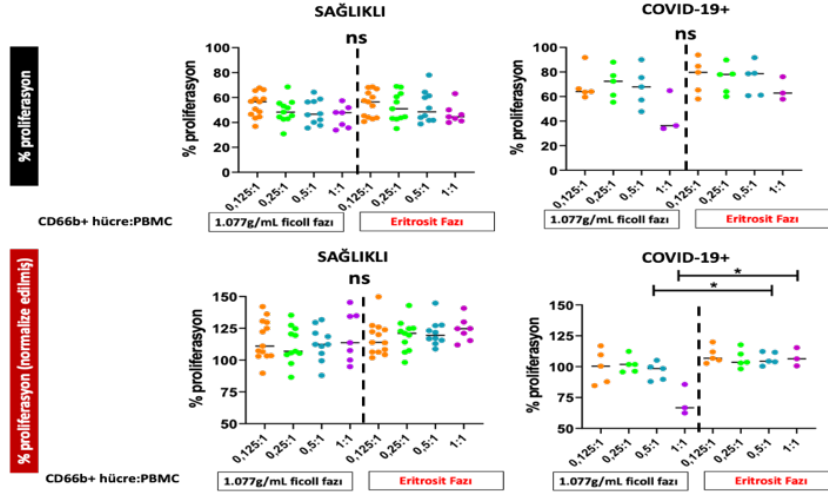
COVID-19+ çocuklarda CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 1:1 koşulunda 96 saat kültürü sonrasında CD3+ hücre kapısından eritrosit fazı hücrelerinin 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerine göre T hücre çoğalma kapasiteleri daha yüksekti (Şekil 4.36). COVID-19+ çocuklarda CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrasında CD3+ hücre kapısından eritrosit fazı hücrelerinin 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerine göre sağlıklı kontrole göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasiteleri daha yüksekti (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuk bireylerde hücre oranlarına bağlı olarak 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD3+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonucunda CD4+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri arasında fark yoktu (Şekil 4.37). COVID-19+ çocuklarda CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrasında CD4+ hücre kapısından eritrosit fazı hücrelerinin 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerine göre sağlıklı kontrole göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasiteleri daha yüksekti (Şekil 4.37).

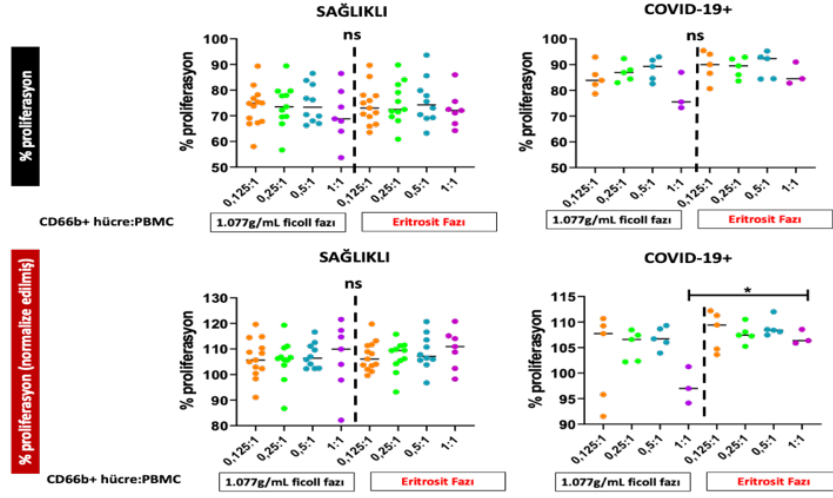
CD4+ Hücrelerin Kapısından



Şekil 4.37 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuk bireylerde hücre oranlarına bağlı olarak 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD4+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

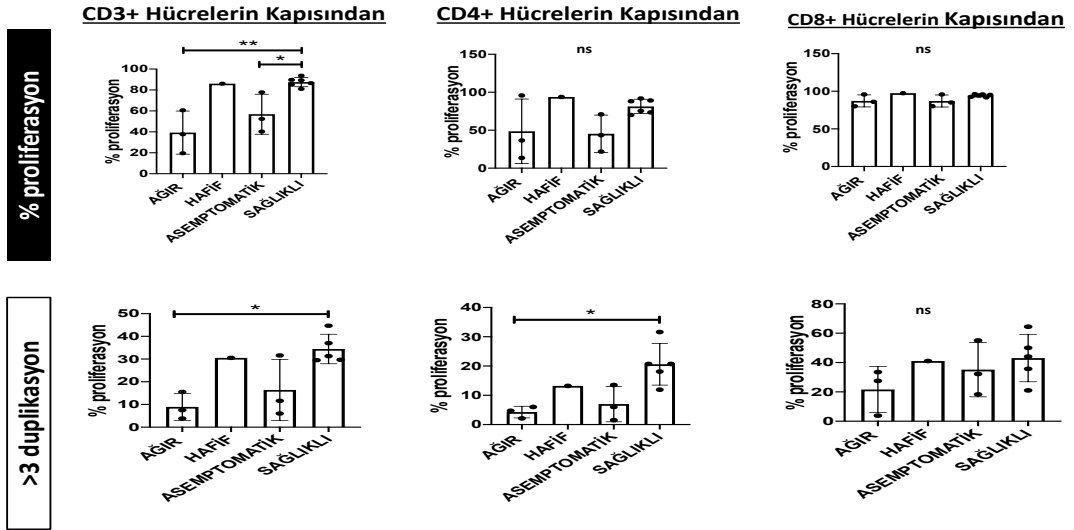
Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonucunda CD8+ hücre kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri arasında fark yoktu (Şekil 4.38). COVID-19+ çocuklarda CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC hücreleri ile 1:1 koşulundada 96 saat kültürü sonrasında CD8+ hücre kapısından eritrosit fazı hücrelerinin 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerine göre sağlıklı kontrole göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasiteleri daha yüksekti (Şekil 4.38).

CD8+ Hücrelerin Kapısından



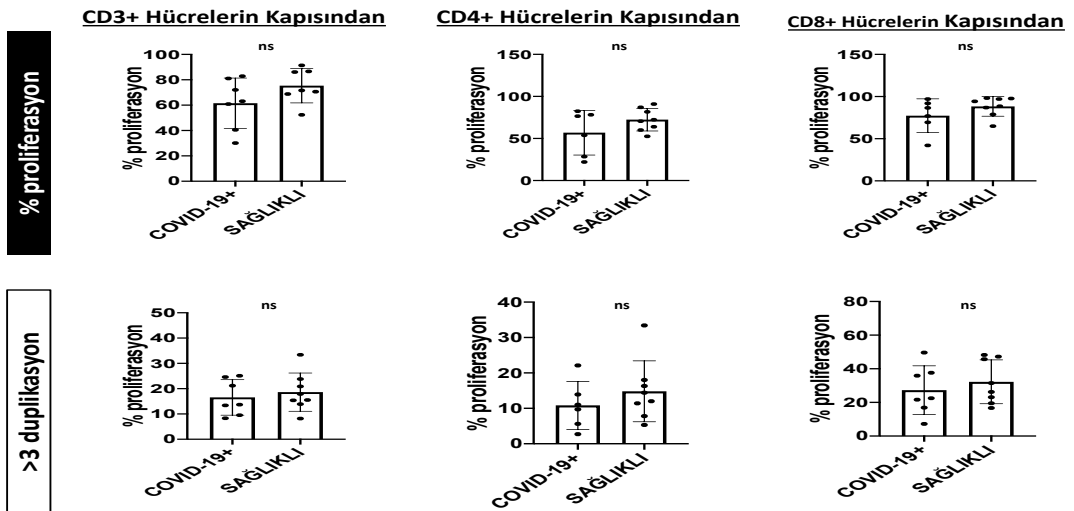
Şekil 4.38 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuk bireylerde hücre oranlarına bağlı olarak 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ hücrelerinin sağlıklı PBMC hücreleri ile 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 ve 1:1 koşullarında 96 saat kültürü sonrası CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve sağlıklı bireye göre normalize edilmiş T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

Erişkin sağlıklı ve COVID-19+ bireylerde CD3+ kapısından; asemptomatik bireylerin sağlıklı bireylere göre T hücre çoğalma kapasitesi daha düşüktür (Şekil 4.39). Ayrıca ağır pnömoniye sahip bireylerin sağlıklı bireylere göre T hücre çoğalma kapasitesi daha düşüktü ve asemptomatiklere göre bu fark daha anlamlıydı (Şekil 4.39). CD4+ ve CD8+ kapısından elde edilen verilere göre erişkin bireyler arasında T hücre çoğalma kapasitesi arasında anlamlı bir fark yoktu. Erişkin sağlıklı ve COVID-19+ bireylerde CD3+ kapısından; ağır pnömoniye sahip bireyler sağlıklı bireylere göre daha düşük çoğalma hızına sahipti (Şekil 4.39). Benzer şekilde CD4+ kapısından; ağır pnömoniye sahip bireyler sağlıklı bireylere göre daha düşük çoğalma hızına sahipti. CD8+ kapısından elde edilen verilere göre erişkin bireyler arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.39).



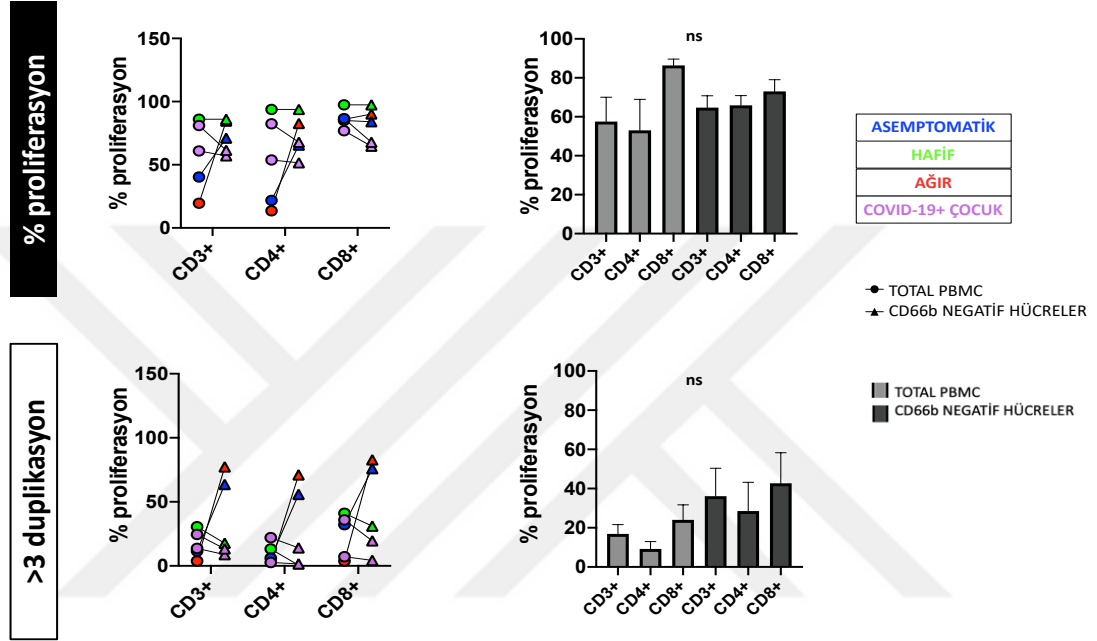
Şekil 4.39 Erişkin sağlıklı ve COVID-19+ bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin CD3+ kapısından, CD4+ kapısından ve CD8+ kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi. $p<0,05$ *; $p<0,01$ **

Çocuk sağlıklı ve COVID-19+ bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin CD3+, CD4+ ve CD8+ kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.40) Çocuk sağlıklı ve COVID-19+ bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin CD3+, CD4+ ve CD8+ kapısından T hücre çoğalma hızları açısından bir farklılık yoktu (Şekil 4.40)



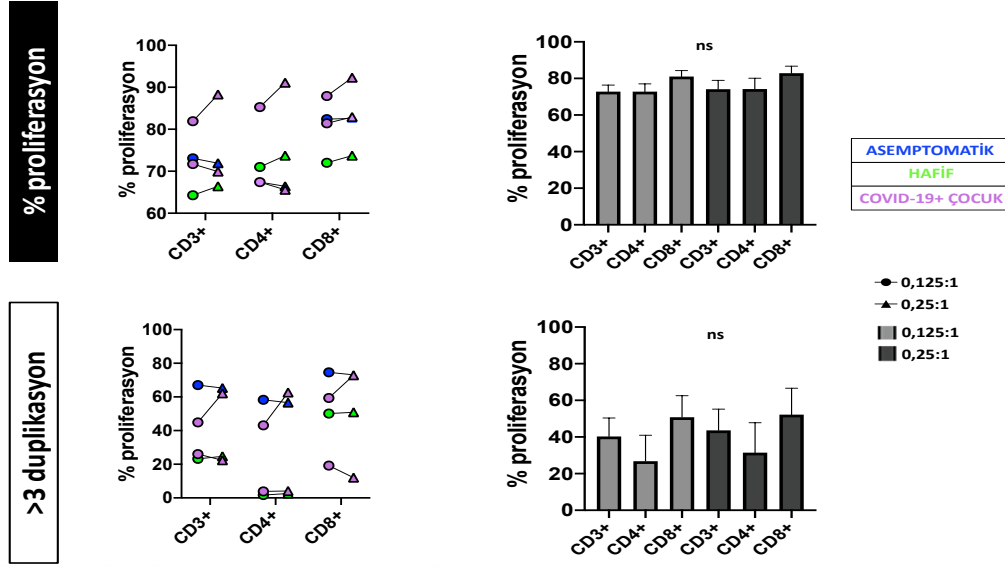
Şekil 4.40 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin CD3+ kapısından, CD4+ kapısından ve CD8+ kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi.

COVID-19+ çocuk ve erişkin bireylerde 1.077g/mL ficoll fazı PBMC'leri ile CD66b- hücreleri arasındaki T hücre çoğalma kapasiteleri ve T hücre çoğalma hızları açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.41).



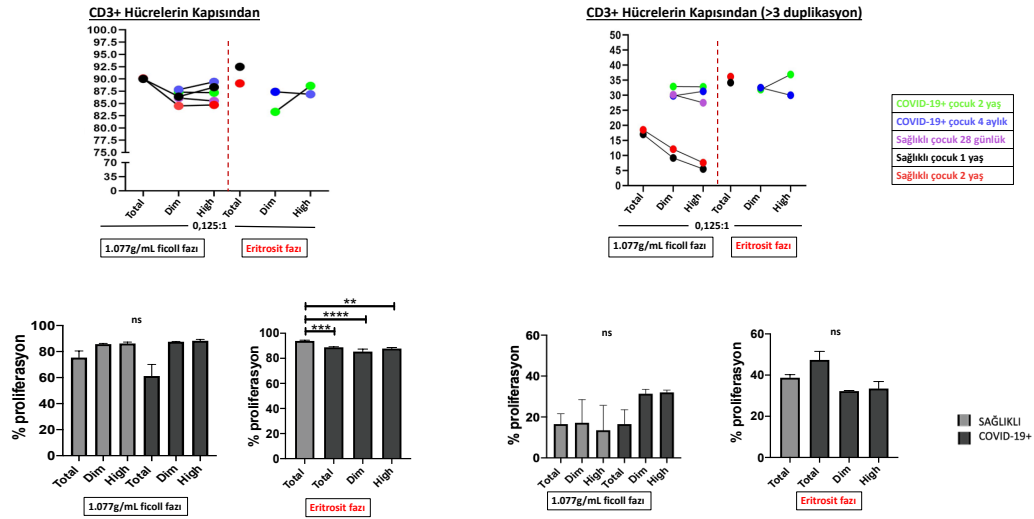
Şekil 4.41 COVID-19+ erişkin ve çocuk bireylerin 1.077g/mL ficoll fazı PBMC'leri ile CD66b- hücreleri arasındaki T hücre çoğalma kapasiteleri ve T hücre çoğalma hızlarındaki farklılıkların belirlenmesi.

Asemptomatik ve hafif pnömoni gösteren erişkinler ile COVID-19+ çocuklarda 1.077g/ml ficoll fazı CD66b- hücrelerin PBMC hücreleri ile 0,125:1 ve 0,25:1 oranlarında 96 saat kültürü sonucu T hücre çoğalma kapasitesi ve T hücre çoğalma hızları açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.42).



Şekil 4.42 Asemptomatik ve hafif pnömoni gösteren erişkinler ile COVID-19+ çocuklarda 1.077g/ml ficoll fazı CD66b- hücrelerin PBMC hücreleri ile 0,125:1 ve 0,25:1 oranlarında 96 saat kültürü sonucu T hücre çoğalma kapasitesi ve T hücre çoğalma hızlarının belirlenmesi.

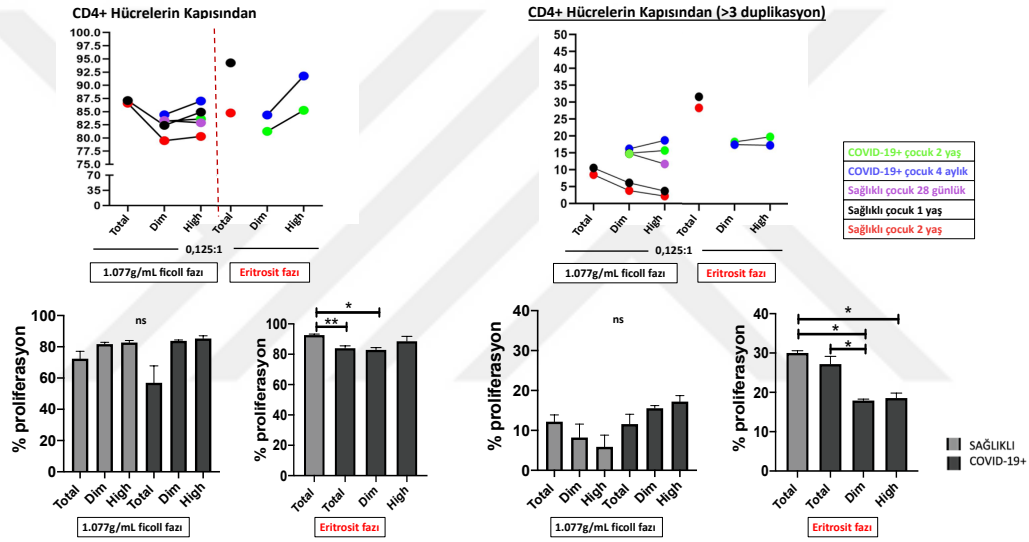
Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü yapıldı ve 96. saat sonunda yapılan CD3+ kapısından T hücre çoğalma analizleri sonucunda anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.43). CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran eritrosit fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü sonrası yapılan CD3+ kapısından T hücre çoğalma analizleri sonucunda ise sağlıklı çocukların total CD66b'lerinin COVID-19+ çocukların total CD66b ve CD66bdim'lerine göre T hücre çoğalma kapasitesine daha yüksekti (Şekil 4.43). Sağlıklı çocuk total CD66b'lerin COVID-19 çocuk CD66bhigh'lere göre daha yüksek çoğalma kapasitesine sahipken bu anlamlı fark sağlıklı çocuk CD66b total ile COVID-19+ çocukların total CD66b'ler ve CD66bdim'ler çoğalma kapasiteleri arasındaki fark kadar yüksek değildi (Şekil 4.43). Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı hücrelerinin PBMC hücreleri ile 0,125:1 oranında kültürü yapıldı ve 96. saat sonunda yapılan CD3+ kapısından T hücre çoğalma hızı analizleri sonucunda anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.43)



Şekil 4.43 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran hücrelerin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürünün ardından 96. saat sonunda CD3+ kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve çoğalma hızlarının belirlenmesi. Dim: düşük, high: yüksek. p<0,01 **; p<0,01***

Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü yapıldı ve 96. saat sonunda yapılan CD4+ kapısından T hücre çoğalma analizleri sonucunda anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.44). CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran eritrosit fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü sonrası yapılan CD4+ kapısından T hücre çoğalma analizleri sonucunda ise sağlıklı çocukların total CD66b'lerinin COVID-19+ çocukların total CD66b'lerine göre daha fazla çoğalma kapasitesine sahipti (Şekil 4.44). Sağlıklı çocuk total CD66b'lerin COVID-19 çocuk CD66bdim'lere göre T hücre çoğalma kapasitesine daha yüksekken bu anlamlı fark sağlıklı çocuk CD66b total ile COVID-19+ çocukların total CD66b'lerin T hücre çoğalma kapasiteleri arasındaki fark kadar yüksek değildi (Şekil 4.44). Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü yapıldı ve 96. saat sonunda yapılan CD4+ kapısından T hücre

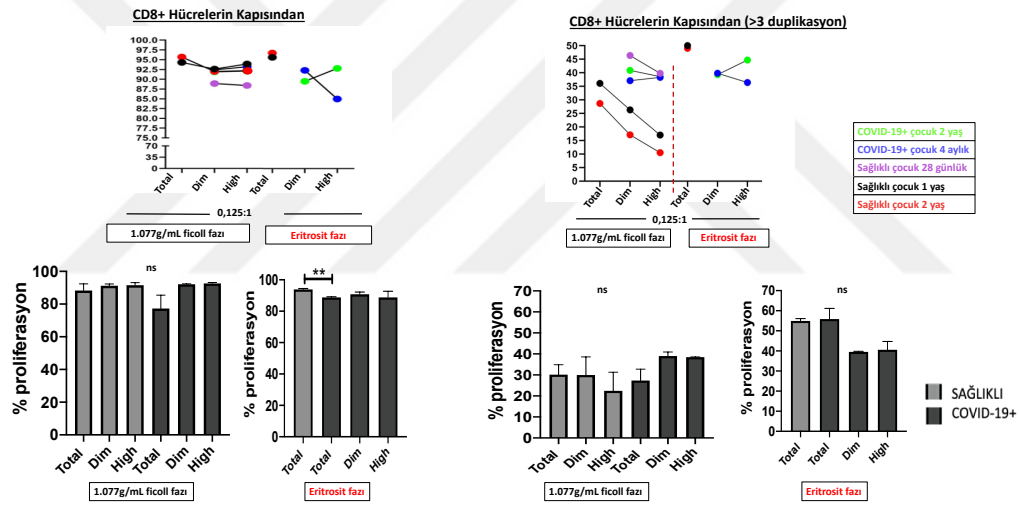
çoğalma analizleri sonucunda anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.44). CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran eritrosit fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü sonrası yapılan CD4+ kapısından T hücre çoğalma analizleri sonucunda ise sağlıklı çocukların total CD66b'lerinin COVID-19+ çocukların total CD66b'lerine göre daha fazla çoğalma kapasitesine sahipti (Şekil 4.44). Sağlıklı çocuk total CD66b'lerin COVID-19 çocuk CD66bdim'lere göre T hücre çoğalma kapasitesine daha yüksekken bu anlamlı fark sağlıklı çocuk CD66b total ile COVID-19+ çocukların total CD66b'lerin T hücre çoğalma kapasiteleri arasındaki fark kadar yüksek değildi (Şekil 4.44).



Şekil 4.44 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran hücrelerin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürünün ardından 96. saat sonunda CD4+ kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve çoğalma hızlarının belirlenmesi. Dim:düşük, high:yüksek. $p < 0,05$ *; $p < 0,1$ **.

Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü yapıldı ve 96. saat sonunda yapılan CD8+ kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.45) CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran eritrosit fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü sonrası yapılan

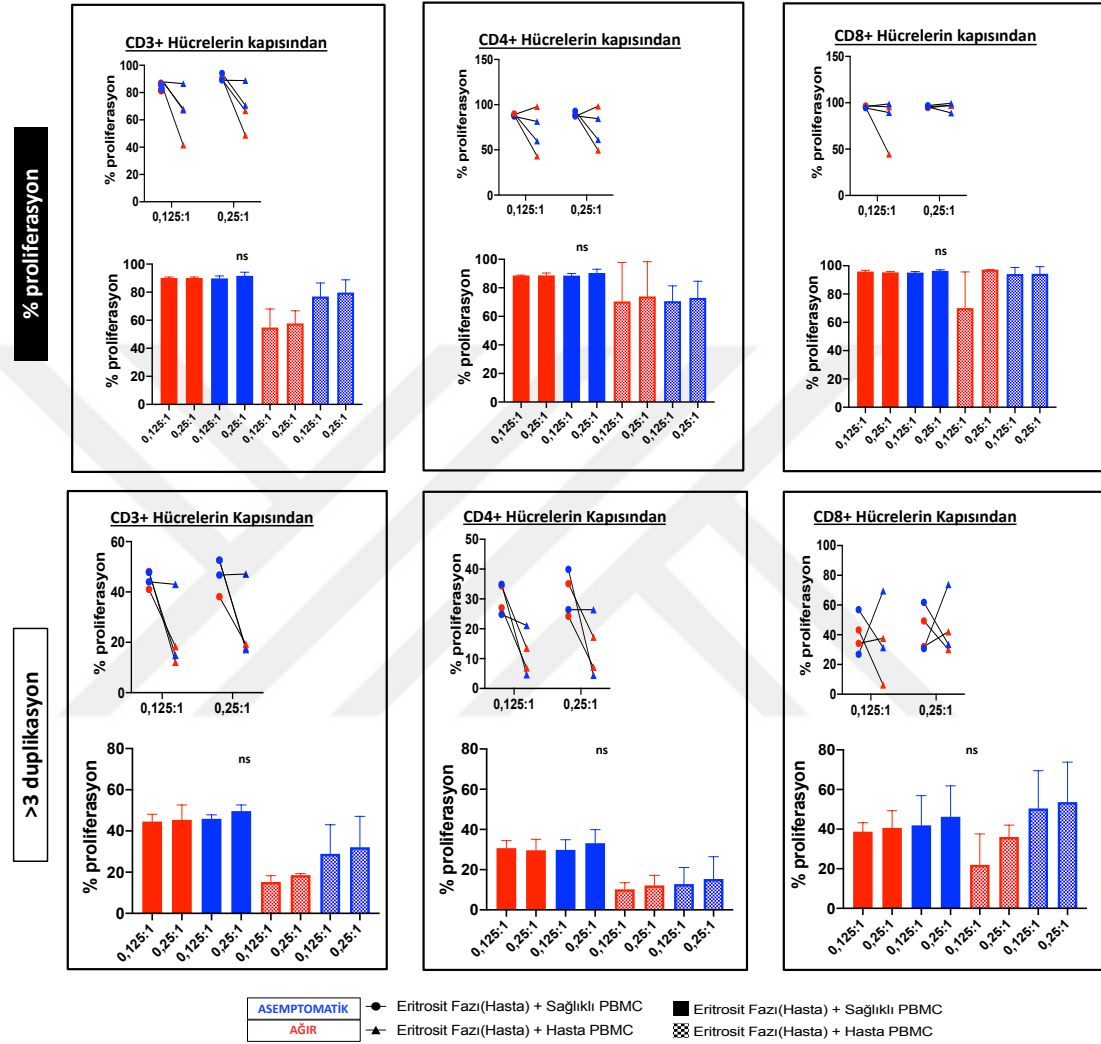
CD3+ kapısından T hücre çoğalma analizleri sonucunda ise sağlıklı çocukların total CD66b'lerinin COVID-19+ çocukların total CD66b'lerine göre T hücre çoğalma kapasitesine daha yüksekti (Şekil 4.45) Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran 1.077g/mL ficoll fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü yapıldı ve 96. saat sonunda yapılan CD8+ kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.45) CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran eritrosit fazı hücrelerinin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürü sonrası yapılan CD3+ kapısından T hücre çoğalma analizleri sonucunda ise sağlıklı çocukların total CD66b'lerinin COVID-19+ çocukların total CD66b'lerine göre T hücre çoğalma kapasitesine daha yüksekti (Şekil 4.45).



Şekil 4.45 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazındaki CD66b'yi taşıma durumuna göre total, düşük ve yüksek olarak bulunduran hücrelerin PBMC hücreleri 0,125:1 oranında kültürünün ardından 96. saat sonunda CD8+ kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve çoğalma hızlarının belirlenmesi. Dim: düşük, high: yüksek. $p < 0,01$ **; $p < 0,01$ ***.

Asemptomatik ve ağır pnömoniye sahip erişkinlerin eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültüre edildikten 96 saat sonra CD3+, CD4+ ve CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerine bakıldığında aralarında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.46). Asemptomatik ve ağır pnömoniye sahip erişkinlerin eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile

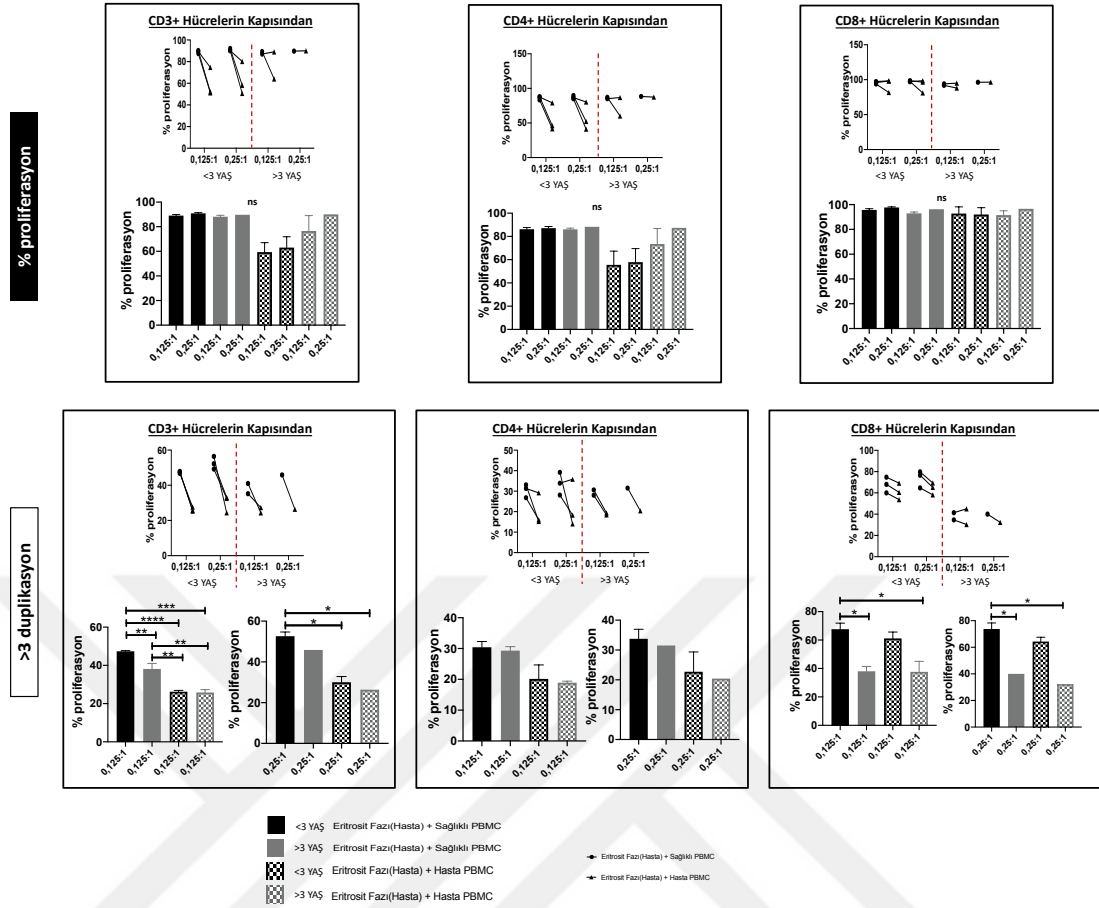
sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültüre edildikten 96 saat sonra CD3+, CD4+ ve CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma hızlarına bakıldığında aralarında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.46).



Şekil 4.46 Asemptomatik ve ağır pnömoniye sahip erişkinlerin eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültüre edildikten 96 saat sonra CD3+, CD4+ ve CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma hızlarının belirlenmesi.

Sağlıklı ve COVID-19+ çocukların eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,125:1 koşullarında kültüre edildikten 96 saat sonra CD3+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma hızlarına bakıldığında 3 yaştan küçük sağlıklı çocuklara; kıyasla 3 yaştan büyük sağlıklı çocukların T hücre çoğalma hızının, 3

yaşından küçük COVID-19+ çocukların T hücre çoğalma hızının ve 3 yaşından büyük olan COVID-19+ çocukların T hücre çoğalma hızı düşüktü (Şekil 4.47). Ayrıca 3 yaşından büyük sağlıklı çocuklara kıyasla; 3 yaşından küçük COVID-19+ çocukların ve 3 yaşından büyük COVID-19+ çocukların T hücre çoğalma hızının düştüğü görüldü. Sağlıklı ve COVID-19+ çocukların eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,25:1 koşullunda kültüre edildikten 96 saat sonra CD3+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma hızlarına bakıldığında 3 yaşından küçük sağlıklı çocuklara kıyasla; 3 yaşından küçük COVID-19+ çocuk ve 3 yaşından büyük COVID-19+ çocukların T hücre çoğalma hızı düşüktü (Şekil 4.47). Sağlıklı ve COVID-19+ çocukların eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,125:1 ve 0,25:1 koşullunda kültüre edildikten 96 saat sonra CD4+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma hızlarına bakıldığında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.47). Sağlıklı ve COVID-19+ çocukların eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,125:1 koşullunda kültüre edildikten 96 saat sonra CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma hızlarına bakıldığında 3 yaşından küçük sağlıklı çocuklara kıyasla; 3 yaşından büyük sağlıklı çocukların ve 3 yaşından büyük COVID-19+ çocukların T hücre çoğalma hızları düşüktü (Şekil 4.47). Sağlıklı ve COVID-19+ çocukların eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,25:1 koşullunda kültüre edildikten 96 saat sonra CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma hızlarına bakıldığında 3 yaşından küçük sağlıklı çocuklara kıyasla; 3 yaşından büyük sağlıklı çocukların ve 3 yaşından büyük COVID-19+ çocukların T hücre çoğalma hızları düşüktü (Şekil 4.47). Sağlıklı ve COVID-19+ çocukların eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültüre edildikten 96 saat sonra CD3+, CD4+ ve CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.47).



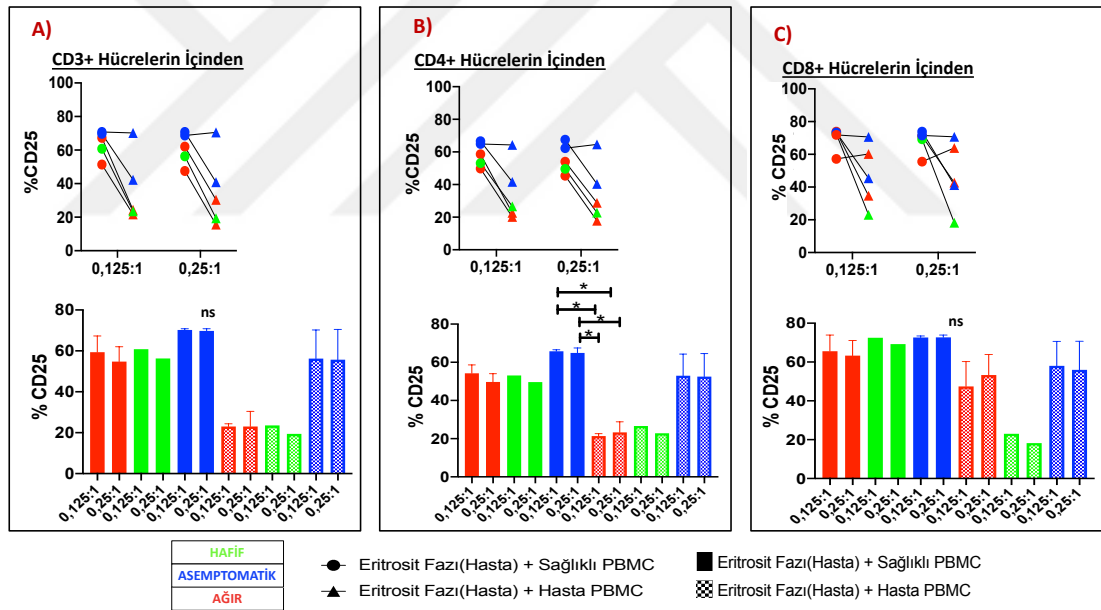
Şekil 4.47 Sağlıklı ve COVID-19+ çocukların eritrosit fazı CD66b+ hücreleri ile sağlıklı ve/veya hasta PBMC'lerin 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültüre edildikten 96 saat sonra CD3+, CD4+ ve CD8+ hücrelerin kapısından T hücre çoğalma kapasitelerinin ve çoğalma hızlarının belirlenmesi.

İmmünofenotip sonuçları da göz önüne alındığında sağlıklı çocuk ve asemptomatik erişkinlerde farklı bir nötrofilik alt-grubun olduğu ve saflaştırma yöntemlerinde bu hücre de elde etmek istediğimiz hücreler ile beraber geldiği için yanıtların bu şekilde çıkmasına sebep olduğu düşünülmektedir. İkinci görüşümüz ise, ilgili hücrelerin fenotipik olarak G-MDSC hücrelerine benzediği fakat fonksiyonlarını sınırlayan farklı bir özellikleri de olduğu için baskılayıcı kapasitelerinin baskılandığı düşünülmektedir.

Tez çalışmamızda odaklandığımız CD66b+ immatür nötrofillerin (G-MDSC) ve yukarıda belirtilen diğer immatür hücre alt-gruplarının birbirleri ile etkileşimleri sonucunda CD3+ T hücre yüzeyindeki belirteçlerin nasıl değişim gösterdiği analiz edilmiştir. Bu kapsamda sağlıklı bireylerden ve COVID-19+

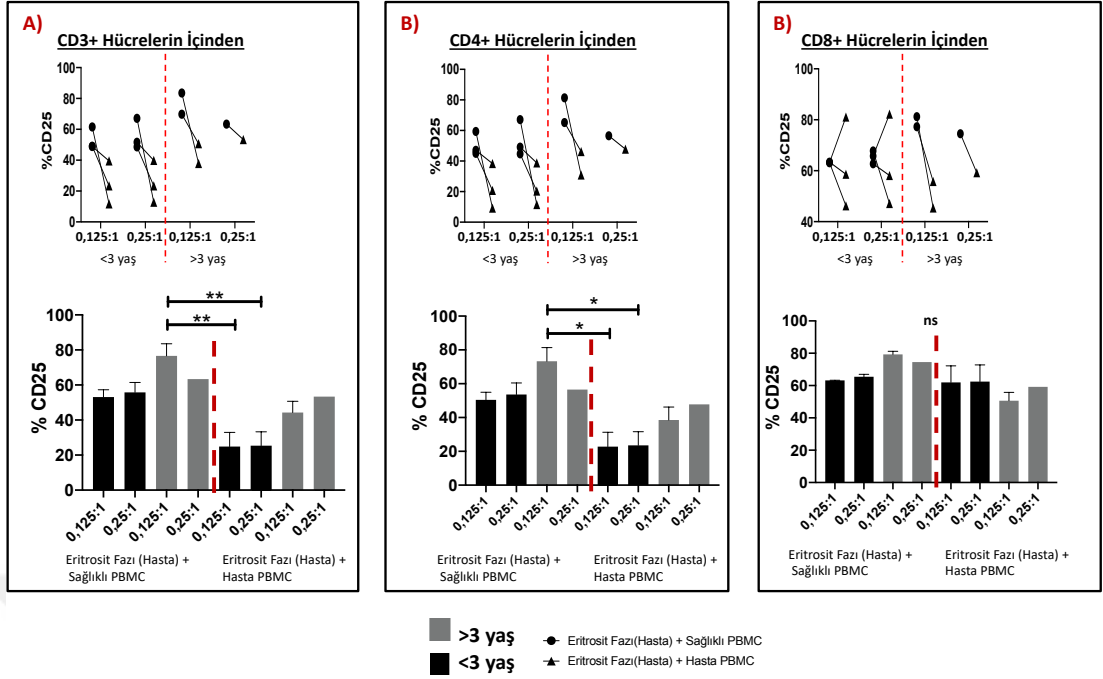
hastalardan elde edilen total PBMC fraksiyonu 16/24 saat veya 96 saat boyunca kültür ortamında bırakılmış ve inkübasyon sonunda CD25, CD69 ve CD154 düzeyleri analiz edilmiştir.

Erişkin COVID-19+ hastalarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı ve hasta PBMC hücreleri 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültürlenmiş ve 24/36. saatte CD4+ hücre kapısından CD25 ekspresyonlarına bakıldığında; asemptomatik hastaların eritrosit fazı+ sağlıklı PBMC 0,125:1 koşulu ile ağır hastaların eritrosit fazı+ hasta PBMC 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarından yüksekti (Şekil 4.48). Aynı şekilde asemptomatik hastaların eritrosit fazı+ sağlıklı PBMC 0,25:1 koşulu ile ağır hastaların eritrosit fazı+ hasta PBMC 0,125:1 ve 0,25:1 koşulları arasında anlamlı bir düşüş görüldü. CD3+ hücre kapısından ve CD8+ hücre kapısından CD25 ekspresyonlarına bakıldığında erişkin COVID-19+ hastalarda anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.48).



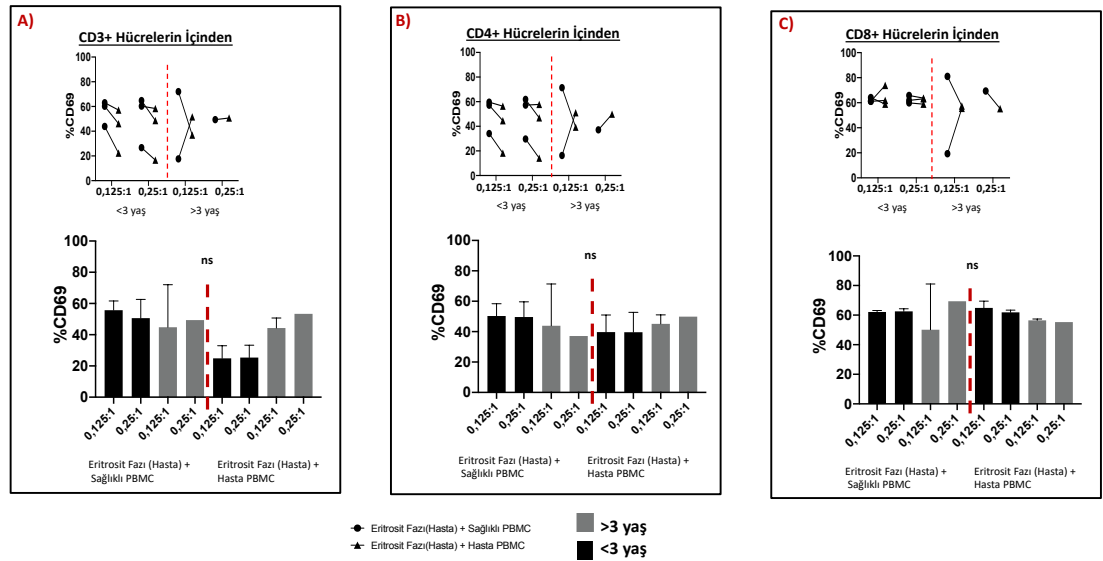
Şekil 4.48 Erişkin COVID-19+ hastalarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı ve hasta PBMC hücreleri ile 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültürü sonucu 24/36. saatte A) CD3+ kapısından B) CD4+ kapısından C) CD8+ kapısından CD25 ekspresyonlarının belirlenmesi. $p < 0,05$ *

Erişkin COVID-19+ hastalarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı ve hasta PBMC hücreleri 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültürlenmiş ve 24/36. saatte CD3+, CD4+ ve CD8+ hücre kapısından CD69 ekspresyonlarına bakıldığında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.49).



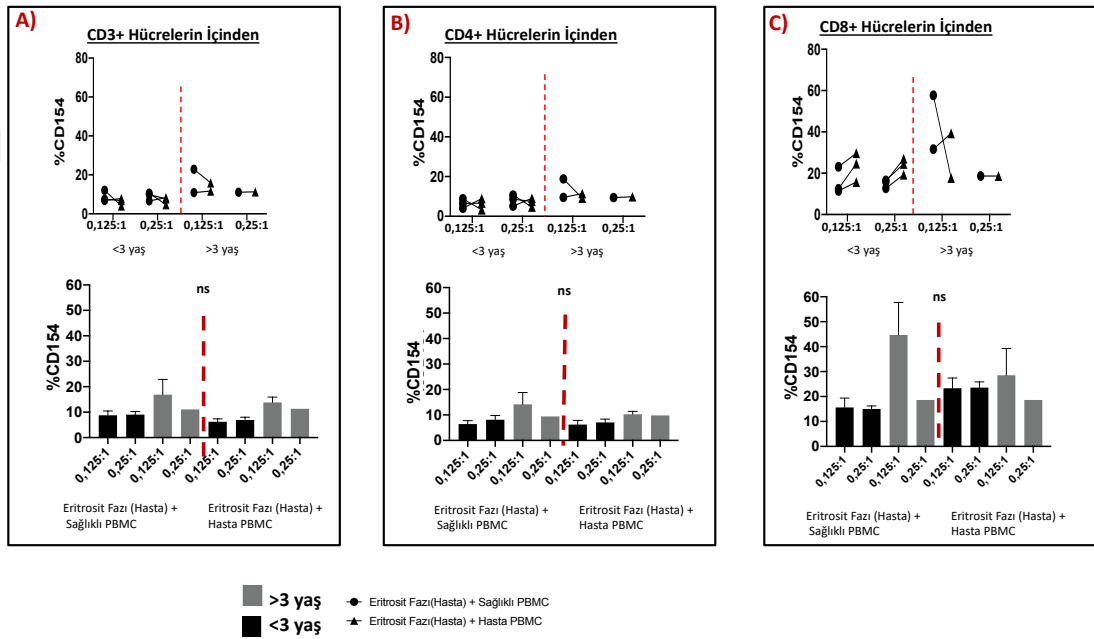
Şekil 4.51 Çocuk COVID-19+ hastalarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı ve hasta PBMC hücreleri ile 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültürü sonucu 24/36. saatte A) CD3+ kapısından B) CD4+ kapısından C) CD8+ kapısından CD25 ekspresyonlarının belirlenmesi. $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **

Çocuk COVID-19+ hastalarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı ve hasta PBMC hücreleri 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültürlendi ve 24/36. saatte CD3+, CD4+ ve CD8+ hücre kapısından CD69 ekspresyonlarına bakıldığında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.52).



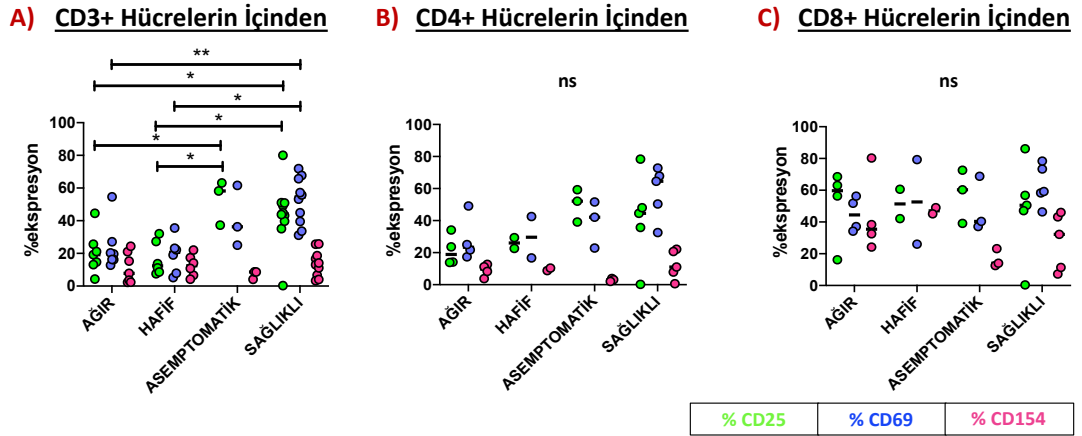
Şekil 4.52 Çocuk COVID-19+ hastalarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı ve hasta PBMC hücreleri ile 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültürü sonucu 24/36. saatte A) CD3+ kapısından B) CD4+ kapısından C) CD8+ kapısından CD25 ekspresyonlarının belirlenmesi.

Çocuk COVID-19+ hastalarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı ve hasta PBMC hücreleri 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültürlendi ve 24/36. saatte CD3+, CD4+ ve CD8+ hücre kapısından CD154 ekspresyonlarına bakıldığında anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.53).



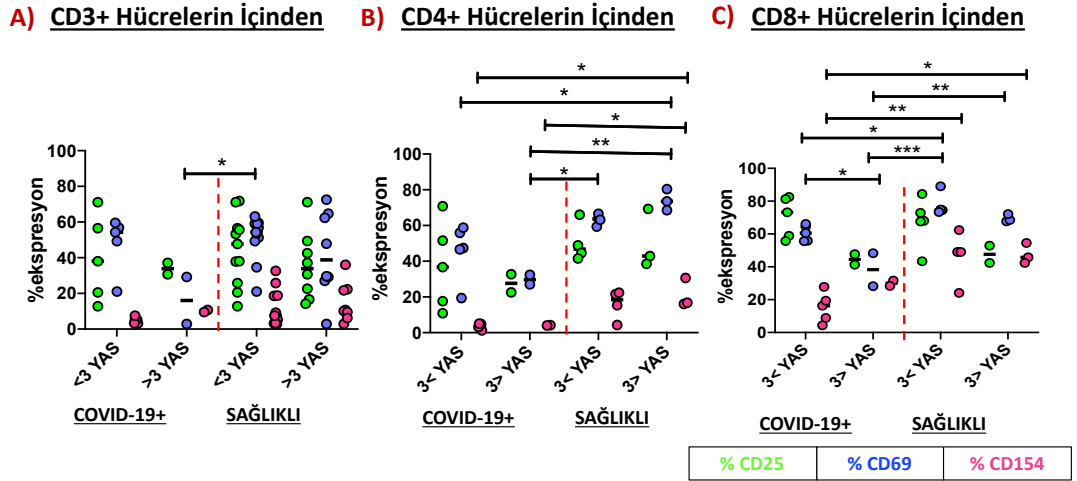
Şekil 4.53 Çocuk COVID-19+ hastalarda eritrosit fazı CD66b+ hücrelerin sağlıklı ve hasta PBMC hücreleri ile 0,125:1 ve 0,25:1 koşullarında kültürü sonucu 24/36. saatte A) CD3+ kapısından B) CD4+ kapısından C) CD8+ kapısından CD154 ekspresyonlarının belirlenmesi.

CD3+ hücrelerde ise CD25'in hastalığın şiddetinin artması ile birlikte ekspresyonunun anlamlı bir şekilde düştüğü, CD69'un da hafif ve ağır hastalarda sağlıklı bireylere göre ekspresyonunu düşüktü (Şekil 4.54). CD154 açısından ise anlamlı bir farklılık yoktu. CD4+ ve CD8+ pozitif hücrelerde CD25, CD69 ve CD154 belirteçleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.54).



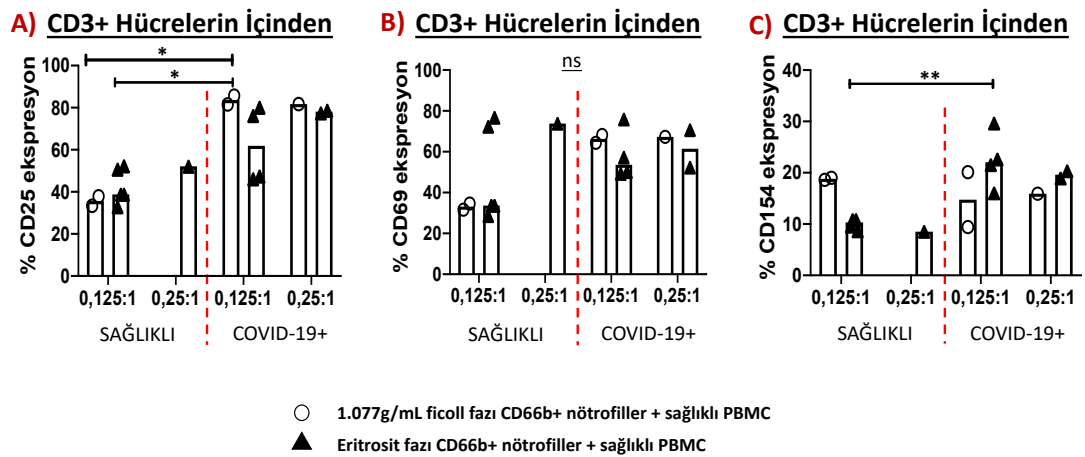
Şekil 4.54 Sağlıklı ve COVID-19+ erişkinlerdeki total PBMC hücrelerinin A) CD3+ hücre kapısından B) CD4+ hücre kapısından C) CD8+ hücre kapısından CD25, CD69 ve CD154 düzeylerinin belirlenmesi $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **.

CD3+ hücrelerde 3 yaşından küçük sağlıklı çocuklara kıyasla 3 yaşından büyük COVID-19+ çocuklarda CD69 ekspresyonu düşüktü (Şekil 4.49). CD25 ve CD154 açısından anlamlı bir fark yoktu. CD4+ hücrelerde 3 yaşından küçük sağlıklı çocuklara kıyasla 3 yaşından büyük COVID-19+ çocuklarda CD69 ekspresyonu düşüktü ayrıca 3 yaşından büyük sağlıklı çocuklara kıyasla 3 yaşından küçük ve 3 yaşından büyük COVID-19+ çocukların CD69 ve CD154 ekspresyonları düşüktü (Şekil 4.55). CD25 açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.55). CD8+ hücrelerde 3 yaşından küçük sağlıklı çocuklara kıyasla 3 yaşından büyük sağlıklı çocukların CD69 ekspresyonu azalırken; 3 yaşından büyük COVID-19+ çocuklara kıyasla 3 yaşından küçük ve 3 yaşından büyük sağlıklı çocukların CD69 ekspresyonu azalırken; 3 yaşından büyük sağlıklı çocuklara kıyasla 3 yaşından büyük COVID-19+ çocukların CD69 ekspresyonları düşüktü (Şekil 4.55). 3 yaşından küçük ve 3 yaşından büyük sağlıklı çocuklara kıyasla 3 yaşından küçük COVID-19+ çocukların CD154 ekspresyonu düşüktü ve CD25 açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 4.55).



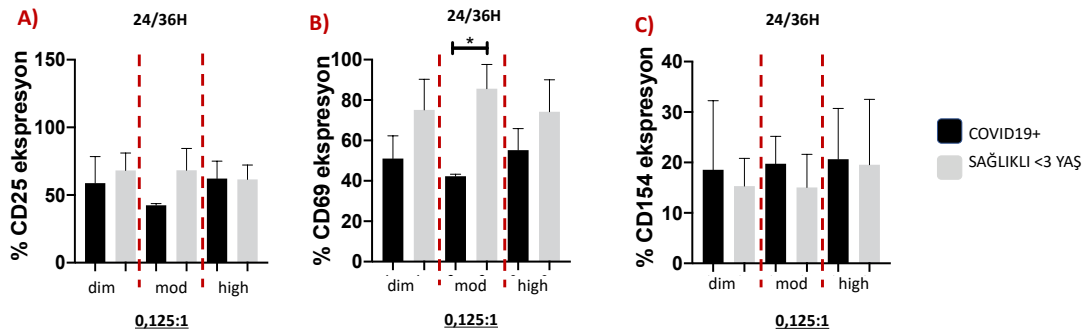
Şekil 4.55 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklardaki total PBMC hücrelerinin A) CD3+ hücre kapısından B) CD4+ hücre kapısından C) CD8+ hücre kapısından CD25, CD69 ve CD154 düzeylerinin belirlenmesi $p<0,05$ *; $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***

COVID-19+ çocuklardaki 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ nötrofiller + sağlıklı PBMC 0,125:1 hücrelerine kıyasla sağlıklı çocuklardaki 1.077g/mL ficoll fazı CD66b+ hücreleri + sağlıklı PBMC 0,125:1 ve eritrosit fazı CD66b+ nötrofiller + sağlıklı PBMC hücrelerinin CD25 ekspresyonu düşüktü (Şekil 4.56). COVID-19+ çocuklarda eritrosit fazı CD66b+ nötrofiller + sağlıklı PBMC 0,125:1 hücrelerine kıyasla sağlıklı çocuklardaki eritrosit fazı CD66b+ nötrofiller + sağlıklı PBMC 0,125:1 hücrelerinin CD154 ekspresyonunda azalış görüldü. CD69 açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.56).

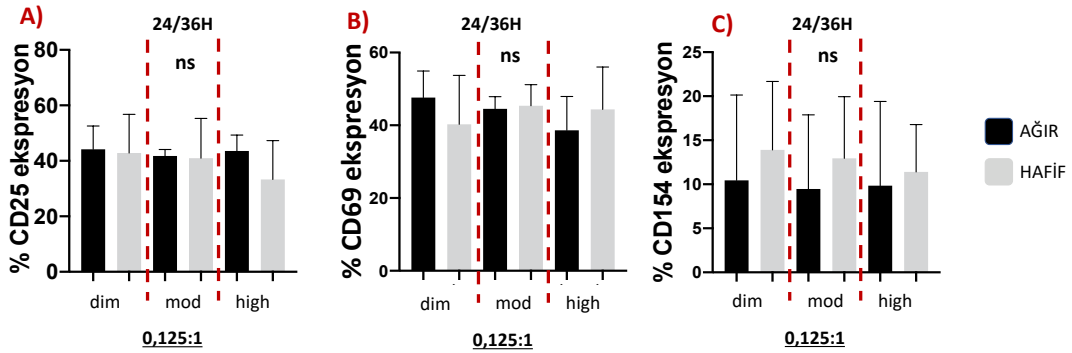


Şekil 4.56 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklardaki CD66b+ hücrelerinin CD3+ kapısından A)CD25 B)CD69 C)CD154 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi $p<0,05$ *; $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***

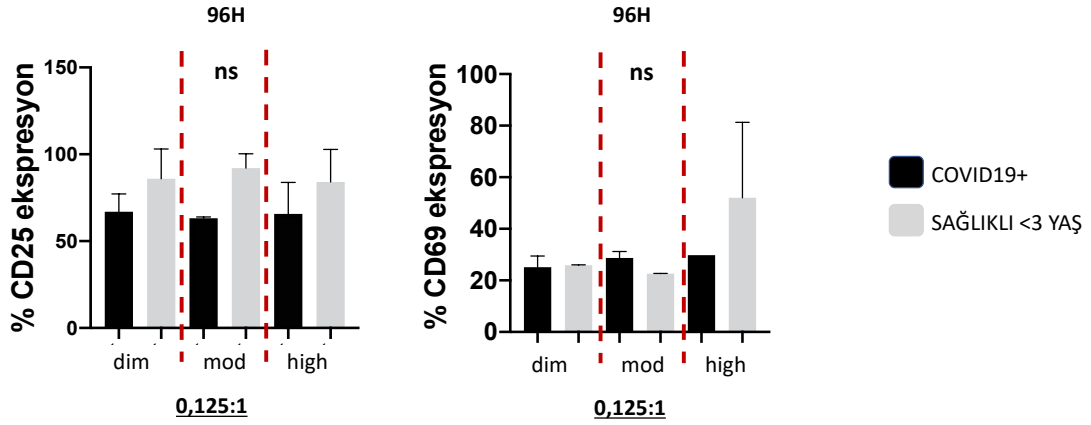
CD66b'yi orta düzeyde taşıyan hücrelerde 24/36. saatte, sağlıklı çocuklara kıyasla COVID-19+ çocukların CD69 ekspresyonu düşüktü. CD25 ve CD154 açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.57). Hafif ve ağır erişkinlerde CD66b'yi orta düzeyde taşıyan hücrelerde 24/36. saatte CD25, CD69 ve CD154 açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.58). COVID-19+ ve sağlıklı çocuklarda CD66b'yi orta düzeyde taşıyan hücrelerde 96. saatte CD25, CD69 ve CD154 açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.59). Hafif ve ağır erişkinlerde CD66b'yi orta düzeyde taşıyan hücrelerde 96. saatte CD25, CD69 ve CD154 açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.60).



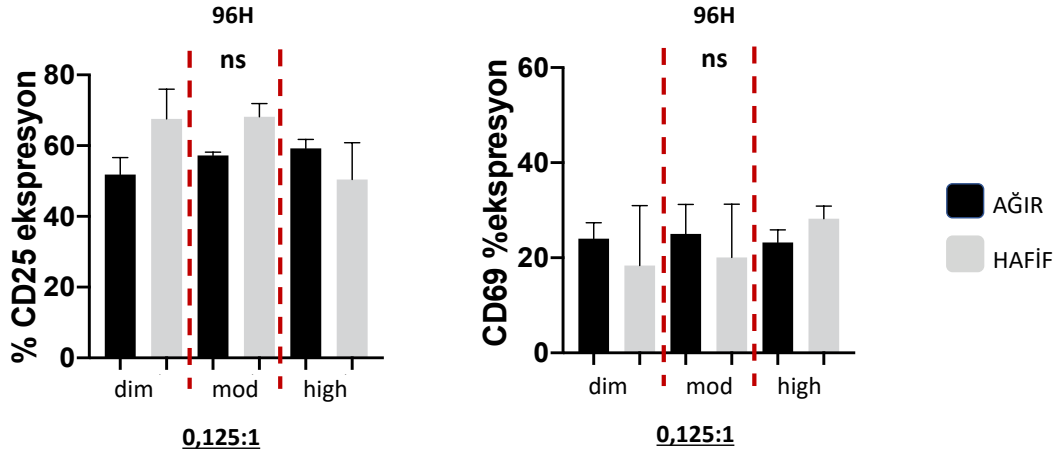
Şekil 4.57 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklardaki CD66b+ hücre alt gruplarının 24/36. saatteki A)CD25 B)CD69 C)CD154 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi $p < 0,05$ * dim: düşük; mod: orta; high: yüksek.



Şekil 4.58 Hafif ve ağır erişkinlerde CD66b+ hücre alt gruplarının 24/36. saatteki A)CD25 B)CD69 C)CD154 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi dim: düşük; mod: orta; high: yüksek.

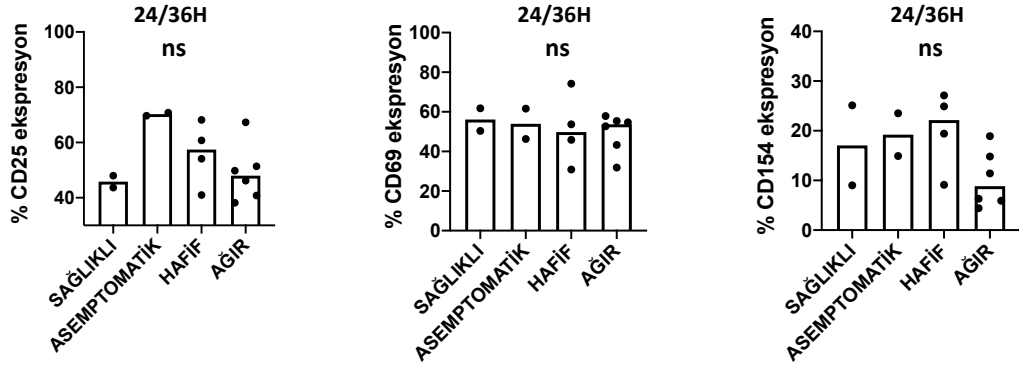


Şekil 4.59 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklardaki CD66b+ hücre alt gruplarının 96. saatteki A)CD25 B)CD69 C)CD154 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi dim: düşük; mod: orta; high: yüksek.

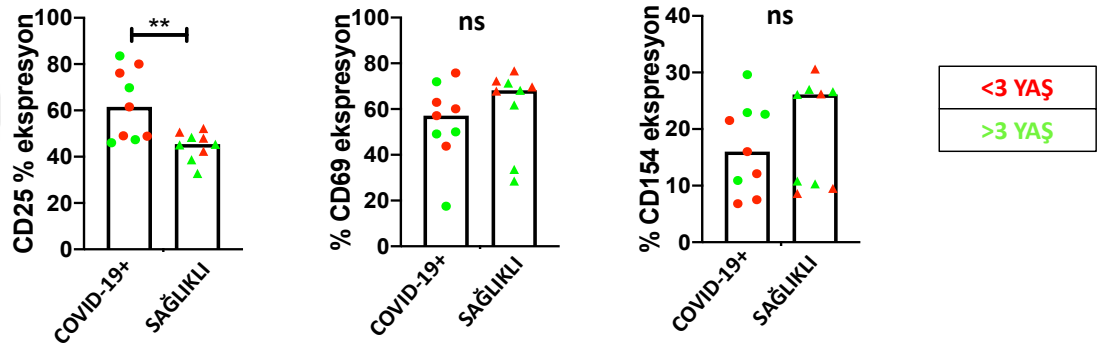


Şekil 4.60 Hafif ve ağır erişkinlerde CD66b+ hücre alt gruplarının 96. saatteki A)CD25 B)CD69 C)CD154 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi dim: düşük; mod: orta; high: yüksek.

Sağlıklı ve COVID-19+ erişkinlerde eritrosit fazı hücrelerinde 24/36. saatte CD25, CD69 ve CD154 belirteçlerini taşıma durumu açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.61). Eritrosit fazı hücrelerine bakıldığında COVID-19+ çocukların, sağlıklı çocuklara göre CD25'i daha yüksek eksprese ettiği görülmüştür. CD69 ve CD154 belirteçleri açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.62).



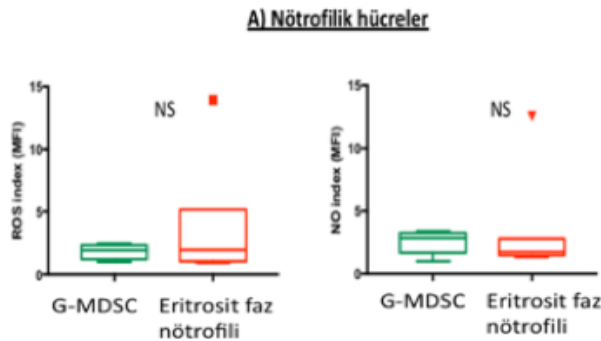
Şekil 4.61 Sağlıklı ve COVID-19+ erişkinlerde eritrosit fazı hücrelerinin 24/36. saatte CD25, CD69 ve CD114 belirteçlerini bulundurma durumları.



Şekil 4.62 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda eritrosit fazı hücrelerinin 24/36. saatte CD25, CD69 ve CD114 belirteçlerini bulundurma durumları. $p < 0,01$ **.

4.6 ROS ve NO Üretiminin Belirlenmesi

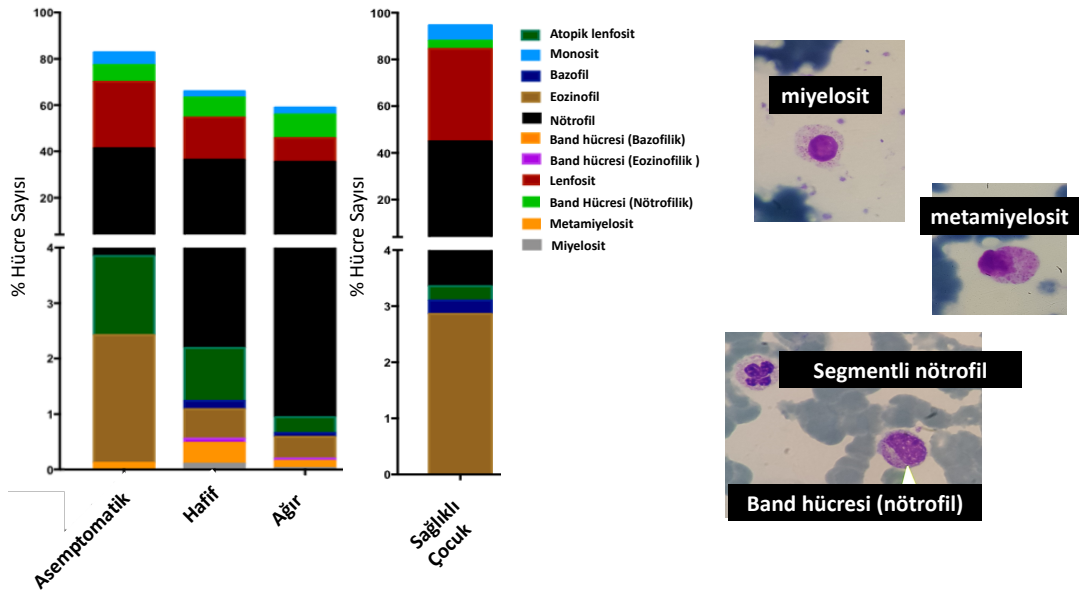
Nötrofillerin, 1.077g/mL ficoll fazından immatür ve eritrosit fazından matür formları değerlendirilmiştir. NO ve ROS üretimi bakımından immatür ve matür nötrofiller arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 4.63).



Şekil 4.63 G-MDSC ve matür nötrofillerin ROS ve NO üretme kapasiteleri NS, non-significant (istatistiksel olarak anlamlı değil).

4.7 İmmünojenotipik Farklılıkların Morfolojik Sonuçlar ile Doğrulanması

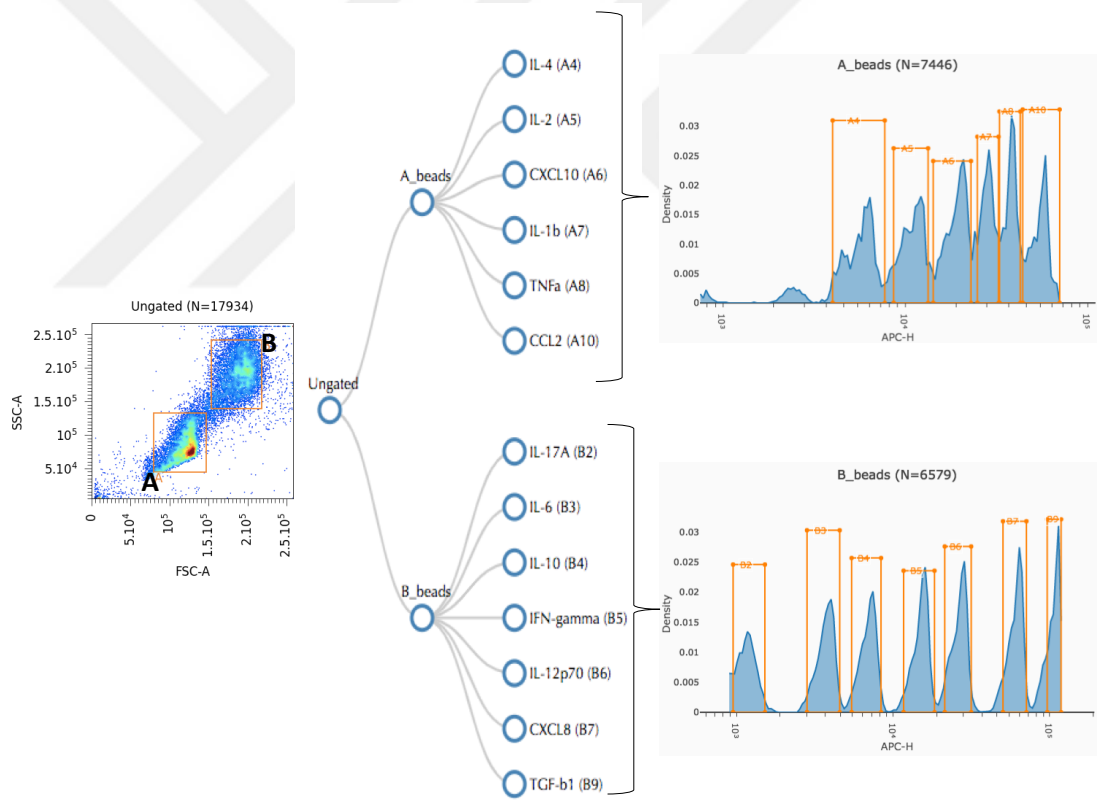
Akım sitometri ile immünojenotipik değerlendirme ve doğrulama yapılan hücre alt-gruplarının morfolojik değerlendirmeler ile de doğrulanması amacı ile periferik venöz kandan tam kan yayma preparatları hazırlanarak, hematoksilen/eozin boyaması gerçekleştirilmiştir. Hematoloji uzmanlarınca total preparat sayılarak hücreler nükleus/sitoplazma ve boyanma paternine göre sınıflandırılmıştır. Hücre alt-gruplarındaki dağılımlar yüzde dağılım olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.64). COVID-19 pozitifliğine sahip erişkin bireyler ve sağlıklı çocuklarda erken monositik/nötrofilik olgunlaşma basamağında bulunan hücreler morfolojik olarak da tespit edilmiştir. İlgili alanlardan birkaç temsili görüntü çekilerek de hangi morfolojinin nasıl isimlendirildiği tarafınıza sunulmuştur (Şekil 4.64).



Şekil 4.64 Sağlıklı ve COVID-19 pozitif çocuk ve erişkin bireylerdeki tam kan yayma örneklerindeki lökositlerin morfolojik dağılımı. Hematoksilen/Eozin boyamasını takiben ilgili değerlendirmeler yapılmıştır.

4.8 Enzim İlişkili İmmün Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) Yöntemi İle G-MDSC Benzeri İmmatür Nötrofiller veya Matür Nötrofillerin İmmün Yanıt Yönünün Belirlenmesi

Ko-kültürlerden elde edilen T hücre proliferasyon ve T aktivasyon sonuçları göz önünde bulundurularak immatür ve matür nötrofil fraksiyonunda biriken nötrofilik hücre alt-gruplarının immün yanıt yönünü belirlemek için kültürlerden toplanan süpernatant örneklerindeki sitokin düzeyleri belirlendi. Yöntem 3.9’da detayları verildiği şekilde IL-4, IL-2, CXCL10 (IP-10), IL-1 β A7, TNF- α , CCL2 (MCP-1), IL-17A, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-12p70, CXCL8 (IL-8), Free Active TGF- β 1 ko-kültürlerden LEGENDPlex kiti ile ölçülmüştür.

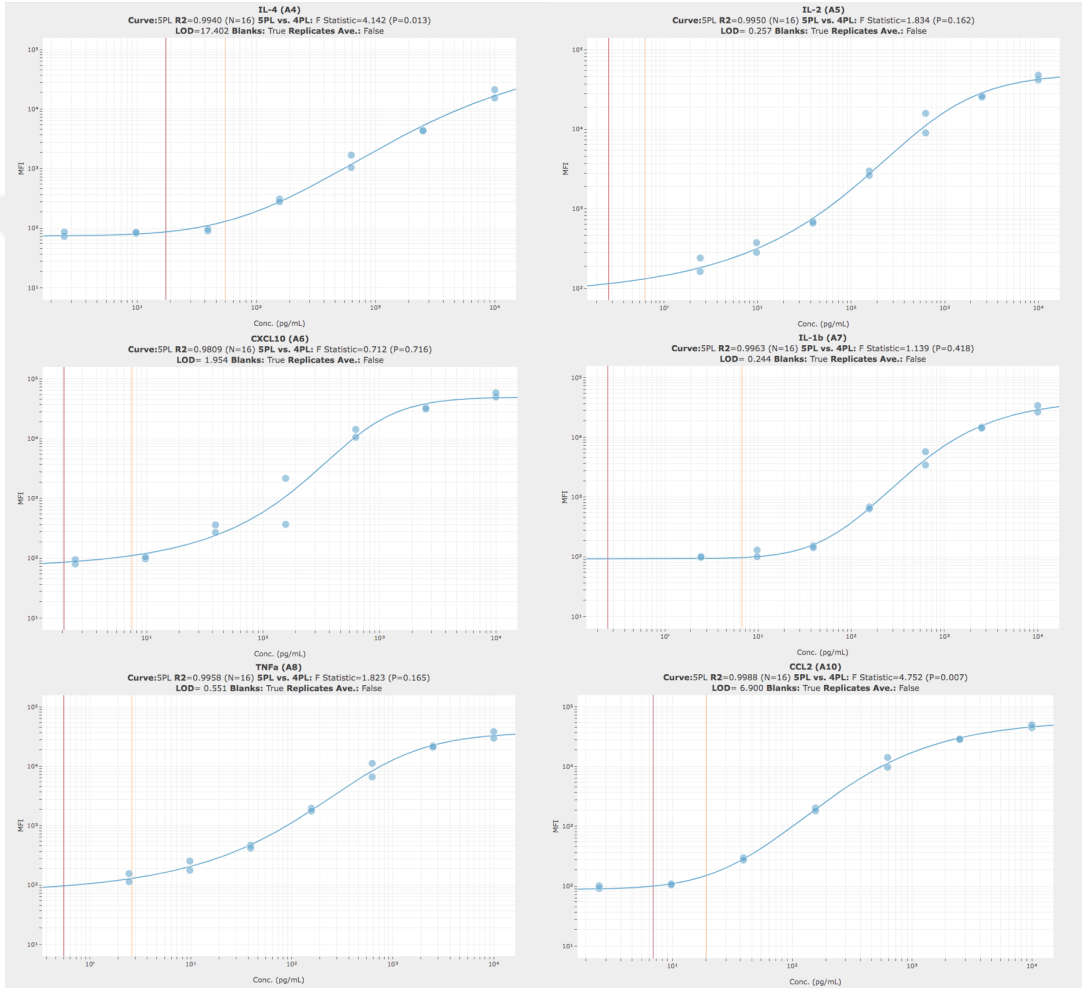


Şekil 4.65 Farklı boyut ve floresan ışıma kapasitelerine sahip bead'lerin temsili akım sitometri dot plot görüntüleri ve histogram görüntüleri.

Her bir sitokin için 1:4 oranında seri dilüsyonu yapılan standartlar kullanılarak standart curve grafikleri çizilmiştir. A tipi beadler kullanılarak IL-4, IL-2, CXCL10, IL-1 β , TNF α , CCL2 (Şekil 4.65) ve B tipi beadler kullanılarak IL-17A, IL-6, IL-10, IFN- γ ,

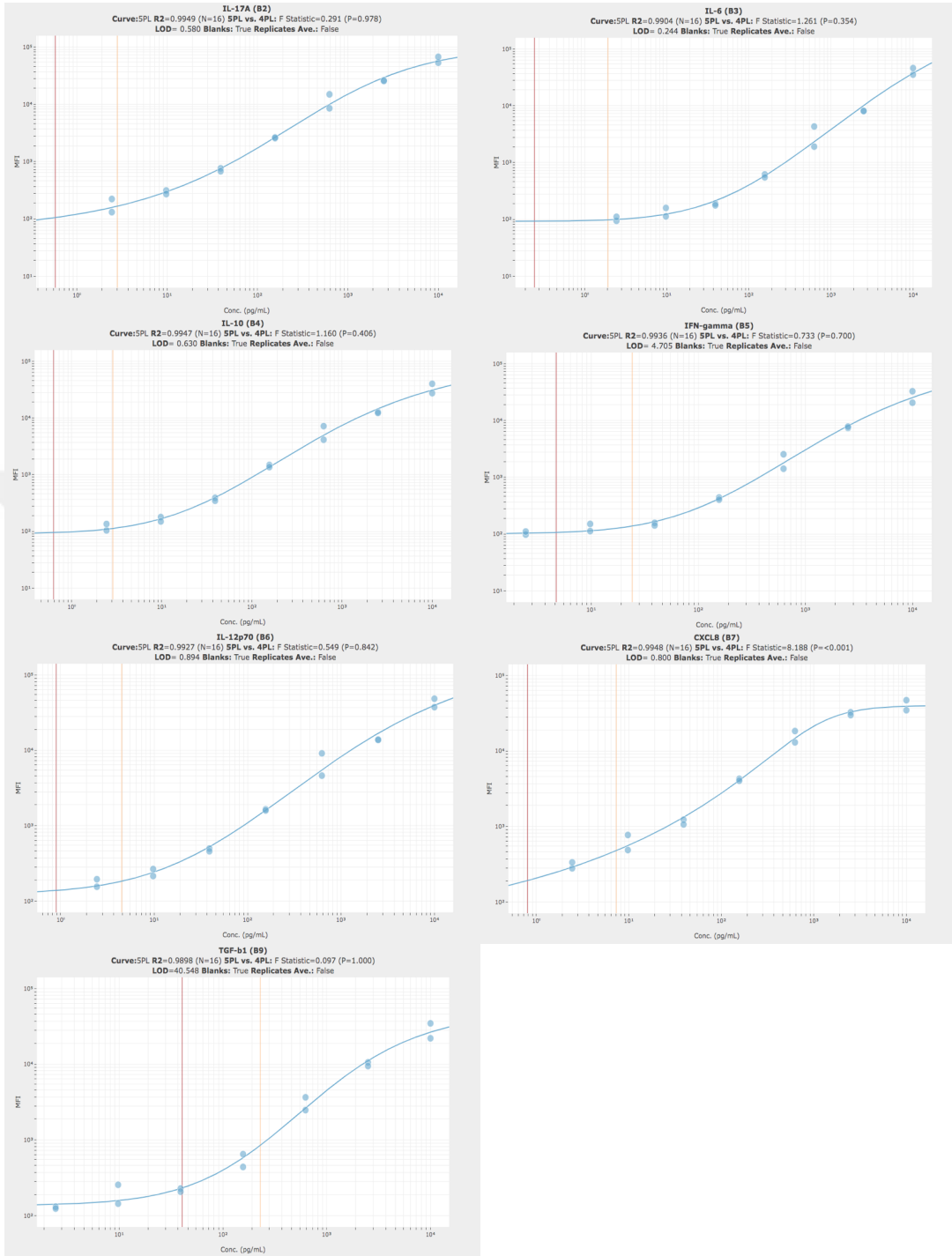
IL-12p70, CXCL8, TGF-b1 (Şekil 4.66, Şekil 4.67) sitokin/kemokinleri tespit edilmiştir. Genel olarak tüm standart curve analizlerinde R^2 değeri 1'e yakın olduğu için standartların düzgün çalıştığı teyit edilmiştir. Ayrıca çalışılan örneklerin ve standartların genel sitokin/kemokin profilini gösteren ısı haritası grafiği de çizilmiştir (Şekil 4.68).

A tipi beadler ile tespit edilebilen sitokinler



Şekil 4.66 A tipi beadler ile tespit edilebilen IL-4, IL-2, CXCL10, IL-1b, TNFa ve CCL2 sitokin/kemokinlerinin “standar curve” grafikleri

B tipi beadler ile tespit edilebilen sitokinler

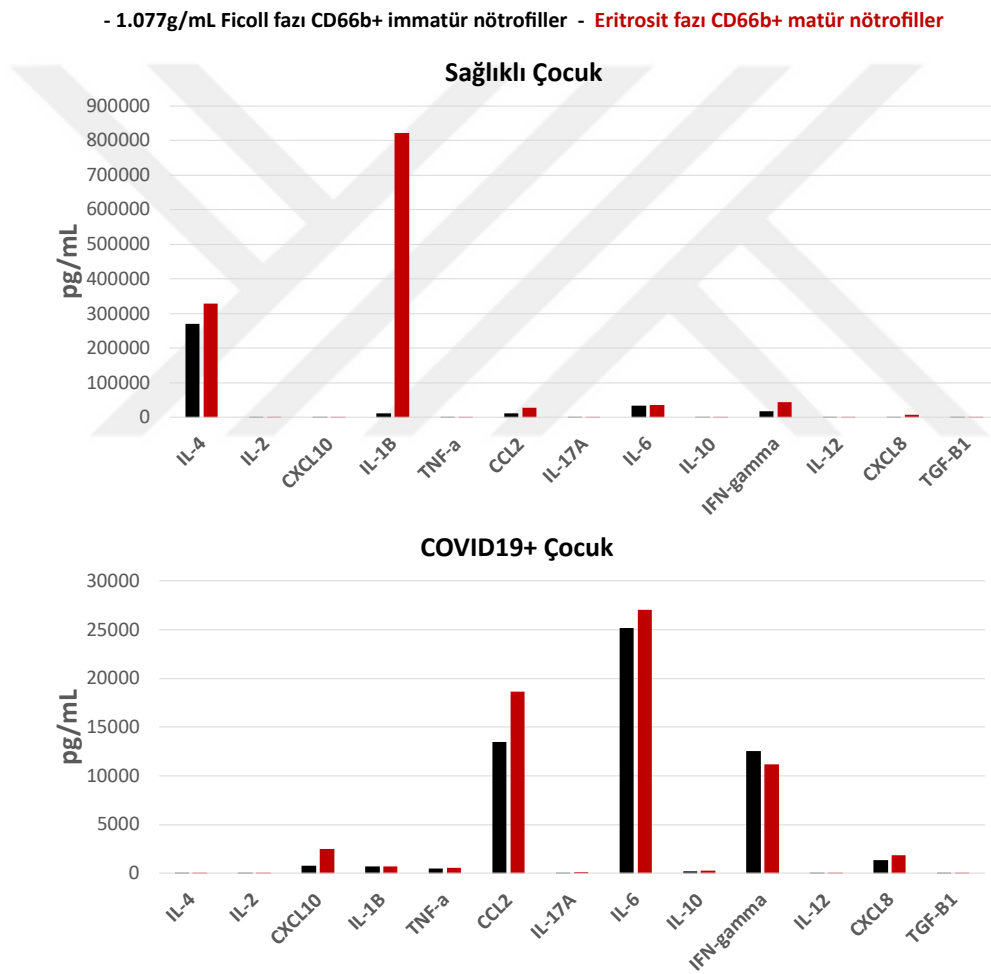


Şekil 4.67 B tipi beadler ile tespit edilebilen IL-17A, IL-6, IL-10, IFN-gamma, IL-12p70, CXCL8 ve TGF-b1 sitokin/kemokinlerinin “standar curve” grafikleri

Sample	Dilution	Replicate	Well	IL-4 (A4)	IL-2 (A5)	CXCL10 (A6)	IL-1b (A7)	TNFa (A8)	CCL2 (A10)	IL-17A (A9)	IL-6 (B3)	IL-10 (B4)	IFN-gamma	IL-12p70	CXCL8 (B7)	TGF-b1 (B6)
C0		1	CAT NC	<17.40	<0.26	<1.95	<0.24	<0.55	<6.90	<0.58	<0.24	<0.63	<4.70	<0.89	<0.80	<40.55
C0		2	CAT NC	<17.40	<0.26	<1.95	<0.24	<0.55	<6.90	<0.58	<0.24	<0.63	<4.70	<0.89	<0.80	<40.55
C1		1	CAT NC	<17.40	1.64	<1.95	7.28	1.50	<6.90	1.38	0.68	1.79	<4.70	2.14	2.24	<40.55
C1		2	CAT NC	<17.40	5.42	3.76	9.82	4.90	7.35	5.61	5.98	5.74	7.71	5.53	3.45	<40.55
C2		1	CAT NC	<17.40	13.67	4.41	26.41	15.03	9.77	10.81	21.39	11.42	31.20	12.27	17.19	49.51
C2		2	CAT NC	<17.40	7.85	6.25	9.82	6.97	8.61	8.34	6.61	7.61	9.02	7.36	7.55	<40.55
C3		1	CAT NC	28.80	34.89	63.30	36.74	38.09	40.84	39.38	31.59	38.46	35.02	36.28	35.15	<40.55
C3		2	CAT NC	20.97	32.63	45.22	32.43	32.75	37.71	33.93	27.31	32.93	26.21	32.05	28.46	<40.55
C4		1	CAT NC	176.29	169.94	64.84	161.75	167.57	160.80	151.21	166.41	170.72	165.07	162.16	164.89	113.20
C4		2	CAT NC	157.17	150.65	242.95	153.61	152.16	149.28	155.14	145.86	155.98	149.78	155.30	154.42	175.46
C5		1	CAT NC	559.82	497.54	617.25	525.19	495.59	539.06	524.52	518.59	508.13	506.81	509.60	540.67	590.98
C5		2	CAT NC	857.20	949.91	758.29	807.84	854.82	791.45	989.43	1109.68	964.48	851.40	1129.78	816.12	827.91
C6		1	CAT NC	2074.29	2100.95	1835.78	2311.40	2376.54	2291.58	2105.64	2001.23	2073.61	2291.19	1937.40	2397.95	2357.17
C6		2	CAT NC	2050.15	1952.01	1670.44	2187.83	2135.48	2203.25	2024.06	2007.36	1947.37	2423.07	1900.54	1864.65	2076.95
C7		1	CAT NC	8904.60	9025.93	>10000	7502.74	5740.98	8598.41	8253.54	9331.90	7625.06	7406.18	9006.85	3063.57	6759.75
C7		2	CAT NC	14646.8	37672.6	>10000	21187.8	>10000	16921.2	17347.1	12830.7	18918.0	15035.8	15127.5	>10000	21890.6
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	3.03	913.45	265.90	356.13	18436.4	106.01	23022.6	128.10	8145.13	13.21	2028.59	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	2.26	833.50	239.12	317.49	14492.9	85.06	19805.0	103.62	6457.56	10.70	2800.79	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	49.79	17.80	675.56	570.75	418.83	7095.80	138.58	27559.9	91.78	7651.09	22.01	638.63	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	4.89	835.22	645.13	515.81	13286.8	165.34	31398.6	114.82	17581.2	22.73	1766.15	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	4.65	930.70	611.86	407.81	10995.1	67.15	23797.7	195.24	9526.39	2.70	1109.33	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	5.47	930.32	613.53	405.12	12221.0	73.34	23245.4	214.82	9089.31	3.61	1265.75	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	17.56	17.11	2063.98	620.08	488.23	18380.8	131.38	26206.6	303.05	19771.6	5.71	1889.99	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	17.56	14.15	1600.21	579.54	448.72	13704.7	112.84	24316.6	256.15	18996.1	4.38	1357.51	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	6.21	639.45	126.84	152.47	9719.05	64.50	9256.22	70.31	3739.22	5.89	1470.98	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	5.09	661.80	130.71	160.04	14283.6	60.21	7986.96	69.95	4013.29	4.56	3016.91	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	13.12	719.59	582.56	362.85	19152.3	66.33	14485.0	64.65	30598.7	12.17	3029.54	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	29.68	26.43	813.39	804.23	485.69	22407.2	118.24	18798.5	107.87	31235.8	25.54	2661.04	48.94
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	4.44	6321.19	1297.52	807.84	23201.8	469.22	38589.1	120.33	31111.7	5.53	3014.12	51.23
CAT NC 1	1	1	CAT NC	21.45	3.67	2195.05	821.28	543.44	13817.1	277.85	28652.1	65.62	11226.7	3.36	936.62	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	34.05	7.73	1059.82	648.72	563.67	12743.1	264.05	37346.0	91.78	8650.39	5.53	1360.51	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	27.90	7.61	1135.67	700.26	614.00	14963.0	284.94	39542.5	103.80	9617.76	6.26	1314.43	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	2.89	1346.04	662.31	467.95	12771.1	259.85	36908.0	88.77	13491.8	7.18	1566.77	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	2.70	1358.24	645.61	485.48	26558.4	245.48	39263.0	81.77	13702.6	6.99	2136.20	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	<17.40	2.84	1527.09	429.82	455.35	10931.2	84.60	29971.0	193.07	12390.8	3.02	1516.40	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	397515	<0.26	32.94	8348.16	441.06	9940.31	104.96	33116.9	234.87	14645.7	3.61	1255.34	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	365052	<0.26	38.28	616698	490.21	30710.7	179.23	32072.9	262.16	36842.1	4.77	>10000	46.26
CAT NC 1	1	1	CAT NC	600750	<0.26	51.81	20098.7	529.73	18254.1	242.60	35669.5	342.49	27925.7	9.16	4684.75	66.04
CAT NC 1	1	1	CAT NC	84458.2	<0.26	50.60	5285.61	240.28	13592.7	90.10	20717.5	125.11	8571.14	5.89	1661.23	<40.55
CAT NC 1	1	1	CAT NC	494.76	<0.26	48.76	3671.53	218.82	14642.8	79.14	18200.4	111.11	7976.36	5.80	3215.21	<40.55

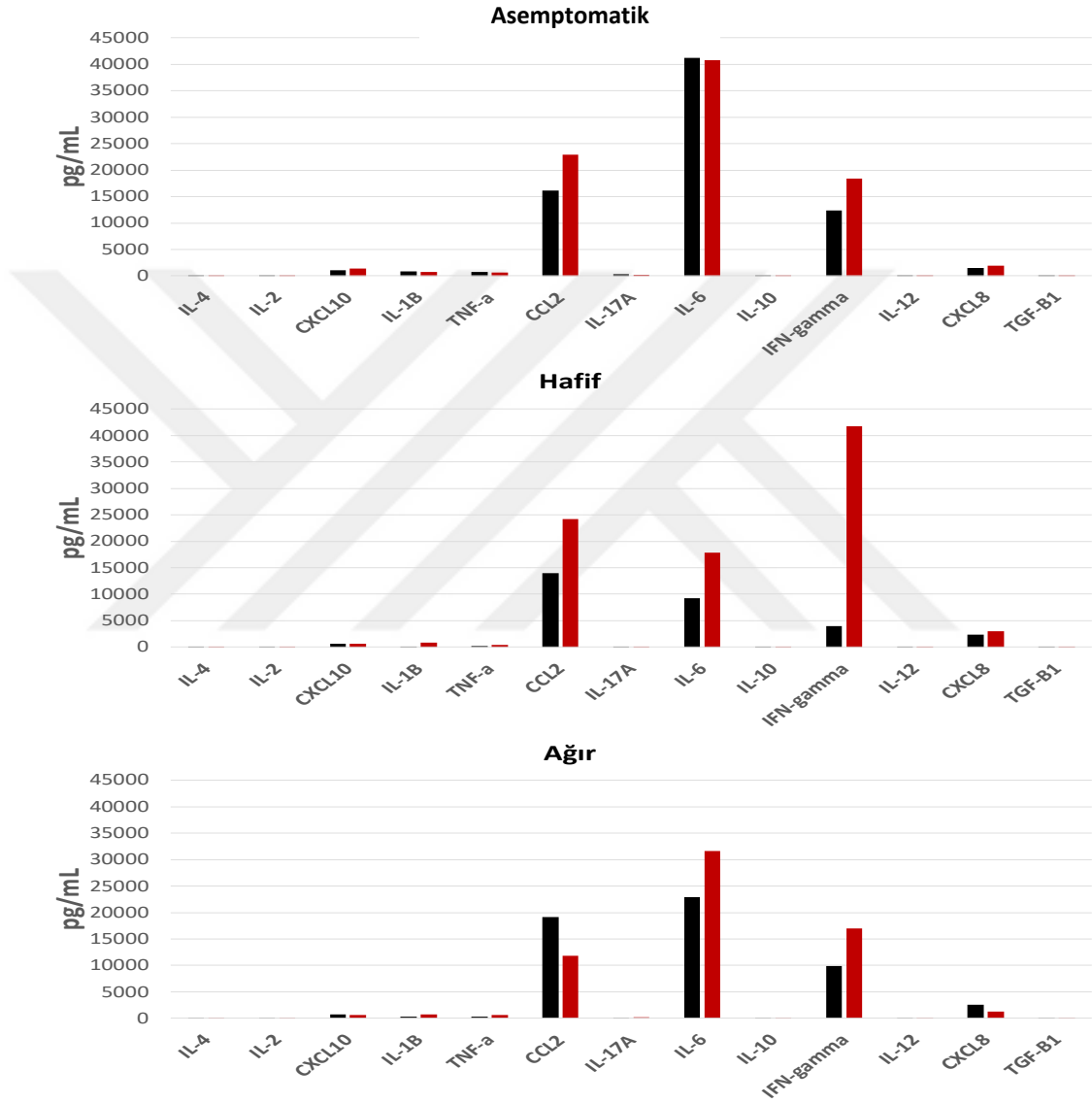
Şekil 4.68 Çalışan örneklerin ve standartların genel sitokin/kemokin profilini gösteren ısı haritası grafiği. Her örnek ve standart duplika çalışılmıştır.

Sağlıklı çocuklarda özellikle IL-4 sitokini hem 1.077g/mL hem de eritrosit fazı nötrofillerinin bulunduğu ko-kültürlerde oldukça yüksek bulunmuştur. Bunun yanı sıra eritrosit fazı nötrofillerinin 1.077g/mL fazındaki nötrofillere kıyasla sekiz kat daha fazla IL-1b salgılanmasına sebep olduğu dikkat çekmiştir. COVID-19 patogenezi ile eritrosit fazı nötrofillerinin CCL2 ve IL-6 salgılanmasını daha fazla uyardığı, IFN-gamma salgılanmasını ise daha az indüklediği görülmüştür. Bunun yanı sıra CXCL10 ve CXCL8 kemokinleri de bu nötrofillerden 1.077g/mL'dekilere göre daha fazla etkilenmiştir (Şekil 4.69).



Şekil 4.69 Sağlıklı çocuk ve COVID-19+ çocuklardaki 1.077g/mL ve eritrosit fazında bulunan CD66b+ nötrofillerin immün yanıt yönü. Ko-kültürlerden süpernatantlar 96 saat sonunda toplanmıştır. 0.25:1 (nötrofil: PBMC) ko-kültür sonuçlarını göstermektedir.

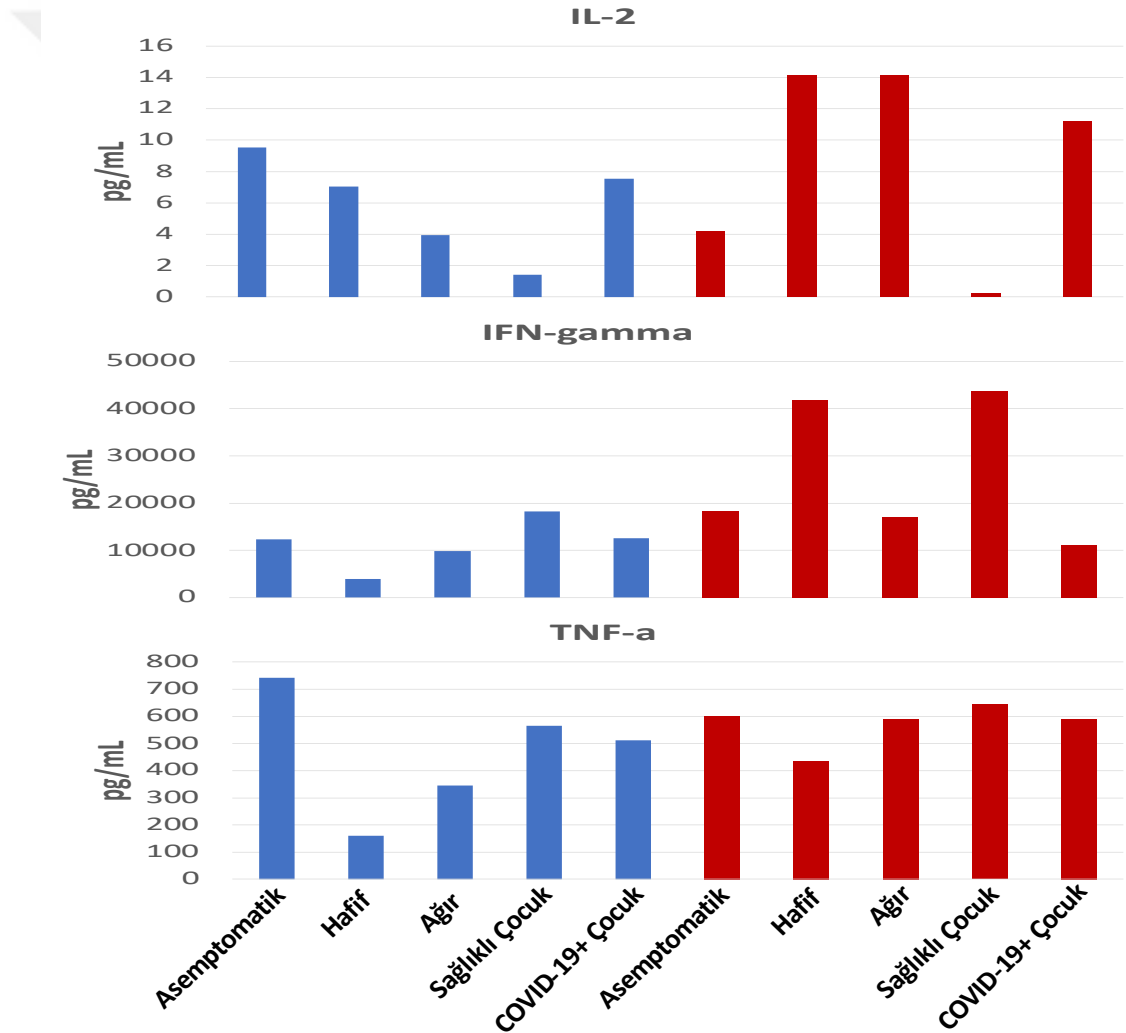
Asemptomatik ve hafif kliniğe sahip bireylerin COVID-19 pozitif çocuklardaki gibi eritrosit faz nötrofillerinde CCL2 üretimi desteklenirken, sadece ağır kliniğe sahip bireylerin 1.077g/mL nötrofil fazındaki hücrelerinin bu üretimi desteklediği dikkat çekmektedir (Şekil 4.70).



Şekil 4.70 COVID-19 pozitif erişkin hastalardaki 1.077g/mL ve eritrosit fazında bulunan CD66b+ nötrofillerin immün yanıt yönü. Ko-kültürlerden süpernatantlar 96 saat sonunda toplanmıştır. 0.25:1 (nötrofil: PBMC) ko-kültür sonuçlarını göstermektedir.

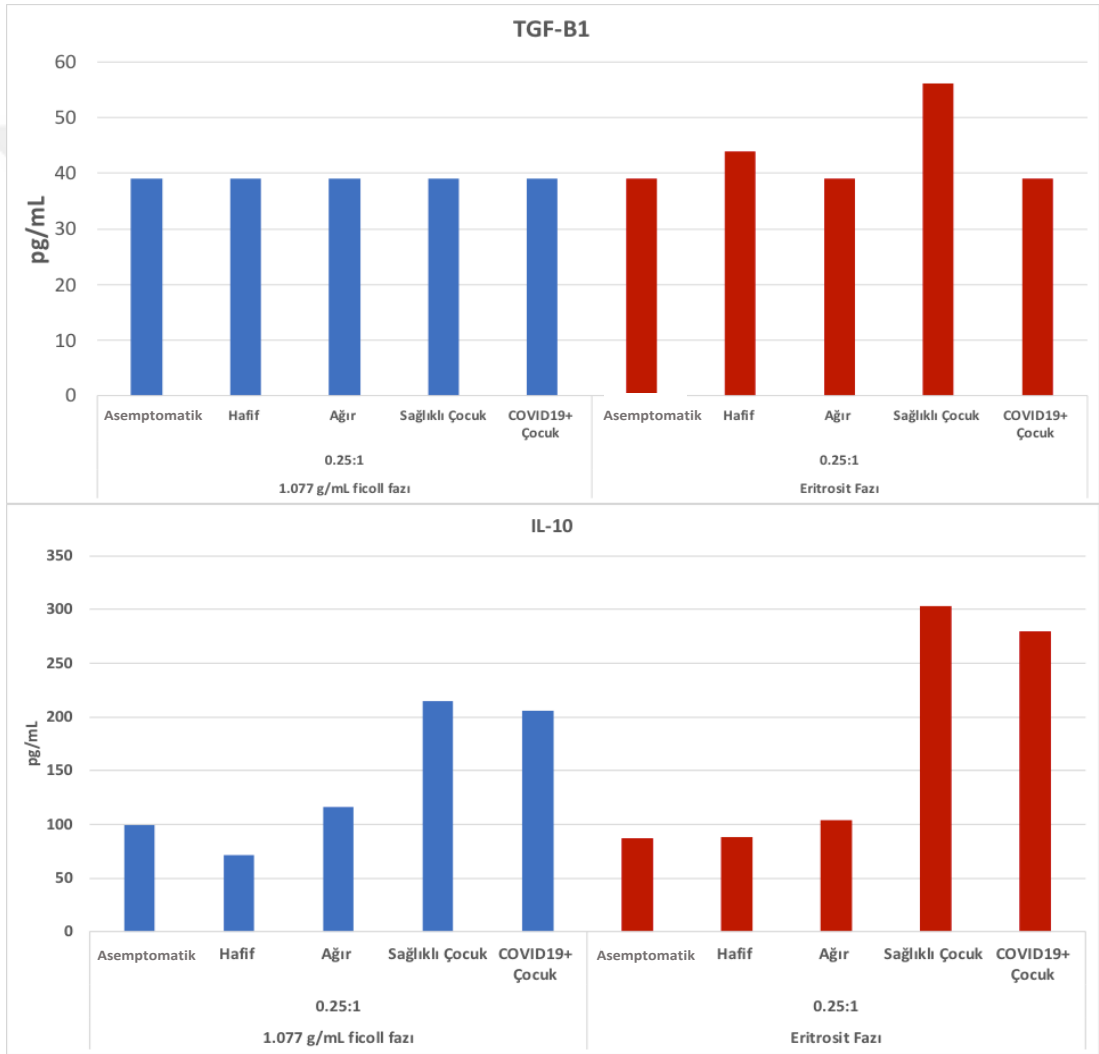
Hafif kliniğe sahip bireylerin eritrosit faz nötrofilleri IL-2, IFN-γ ve TNF-α sitokinlerini daha çok stimüle edebildiği görülmüştür. Bu patern Th1 yanıtın

desteklendiğini göstermektedir. Komplike olmamış bireylerin 1.077 g/mL ficoll fraksiyon immatür nötrofillerinin G-MDSC fenotipinde olduğu fakat fonksiyonel olarak T hücre yanıtlarını baskılandığı görülmüştü ve bu hücre grubunun ayrıca yüksek miktarda TNF- α üretimini desteklemesi de pro-inflamatuar karakterde olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.71). COVID-19+ çocuklar ve komplike olmamış bireylerin immatür nötrofillerinin diğer gruplara kıyasla en fazla IL-2 üretimini destekleyen grup olduğu belirlendi. COVID-19+ hasta gruplarında ise hafif kliniğe sahip bireylerin matür nötrofillerinin en fazla IFN- γ üretimini destekleyen alt-grup olduğu belirlendi (Şekil 4.71).



Şekil 4.71 Pro-inflamatuar sitokinlerin tüm hasta gruplarında ve sağlıklı çocuklarındaki düzeyleri

Güçlü anti-inflamatuar sitokinlerden TGF-B ve IL-10'un ilginç bir şekilde sağlıklı çocukların matür nötrofilleri ile yüksek düzeylerde desteklendiği görüldü (Şekil 4.72). Diğer gruplara göre IL-10, 1.077g/mL fraksiyonundaki immatür nötrofillerde en fazla sekresyonu artan sitokin olarak dikkat çekti. Bu sonuçlar sağlıklı çocuklarda immatür ve matür nötrofil fraksiyonunun içinde hem baskılayıcı hem de aktivatör alt-nötrofil gruplarını barındırdığını düşündürmüştür (Şekil 4.70, Şekil 4.71 ve Şekil 4.72).

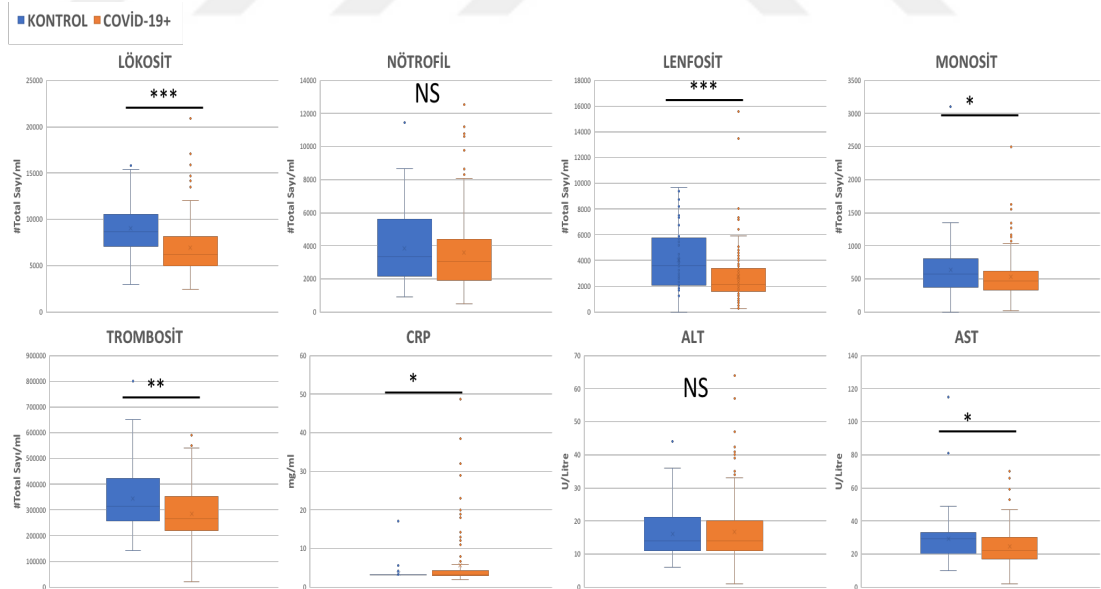


Şekil 4.72 Anti-inflamatuar sitokinlerin tüm hasta gruplarında ve sağlıklı çocuklardaki düzeyleri

4.9 COVID-19+ ve Sağlıklı Bireylerdeki Tam Kan ve Biyokimya Klinik Parametreleri; Yaşa, Klinik Duruma, PCR Gününe, Klinik Semptom Gününe Göre Farklılıkları ve Bu Parametrelerin İmmünojenotipik Veriler ile İlişkisi

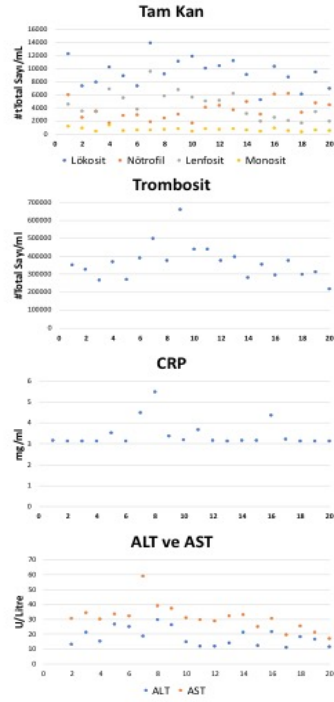
Tüm viral veya bakteriyel hastalıklarda ihtiyaç ve zaman zaman ayırıcı tanı olarak kullanılan tam kan sayımı (CBC) ve biyokimya sonuçları, COVID-19 kliniğinde de kullanılmaktadır. Bu parametrelerin şu ana kadar COVID-19 spesifik bir ilişkilendirilmesi bulunmasa da semptom gösteren bireylerin ilk olarak bakteriyel veya viral enfeksiyon tanısı koyulması için ilk başvuru yöntemi.

Çalışmamıza dahil etmiş olduğumuz sağlıklı ve COVID-19+ çocukların bu parametrelerine baktığımız zaman lökosit ve lenfositlerde ciddi anlamlı düşüş görülmüştür. Monositlerde ise azalış anlamlı olup, bu parametrelere göre daha az anlamlılık göstermiştir. Trombosit ve AST değerlerinde de azalış saptanmıştır. C-reaktif protein de beklenildiği üzere artış göstermiştir. Nötrofilik hücrelerde tam kan sayımı sonuçlarına göre istatistiksel anlamlı artış görülmemiştir (Şekil 4.73).

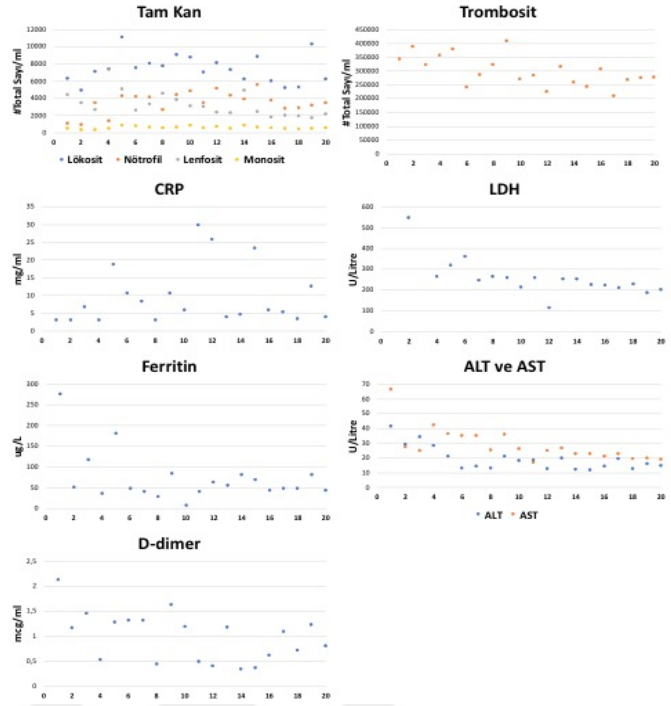


Şekil 4.73 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda tam kan ve biyokimya parametrelerindeki hastalığa bağlı değişimler

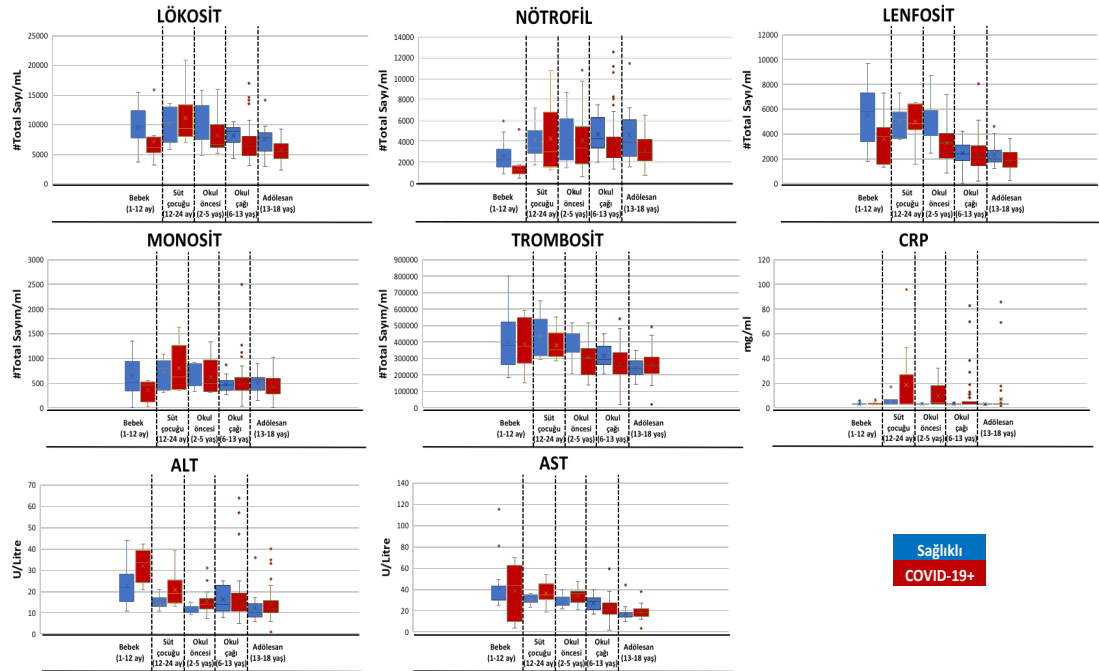
Sağlıklı çocuk



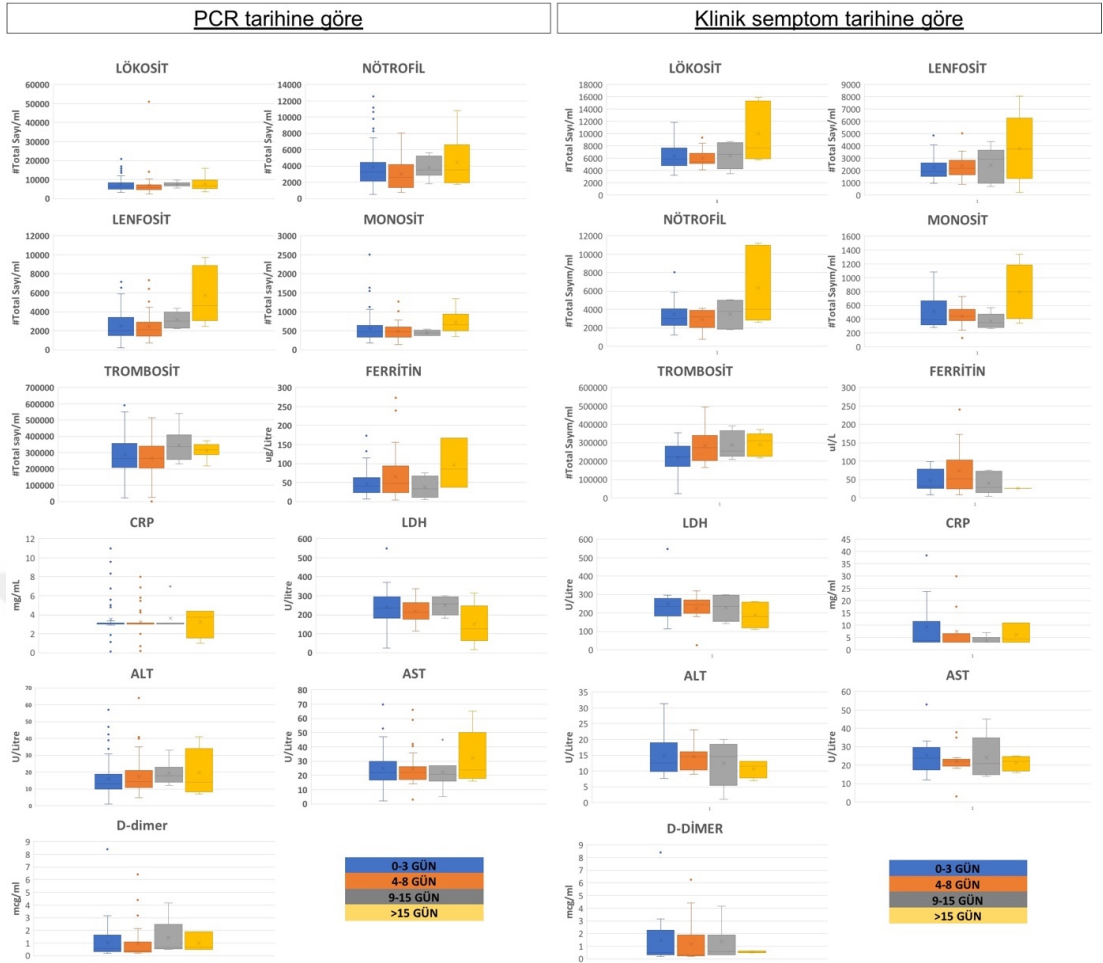
COVID-19+ çocuk



Şekil 4.74 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda yaşa bağlı tam kan ve biyokimya parametrelerindeki yaşa bağlı değişimler

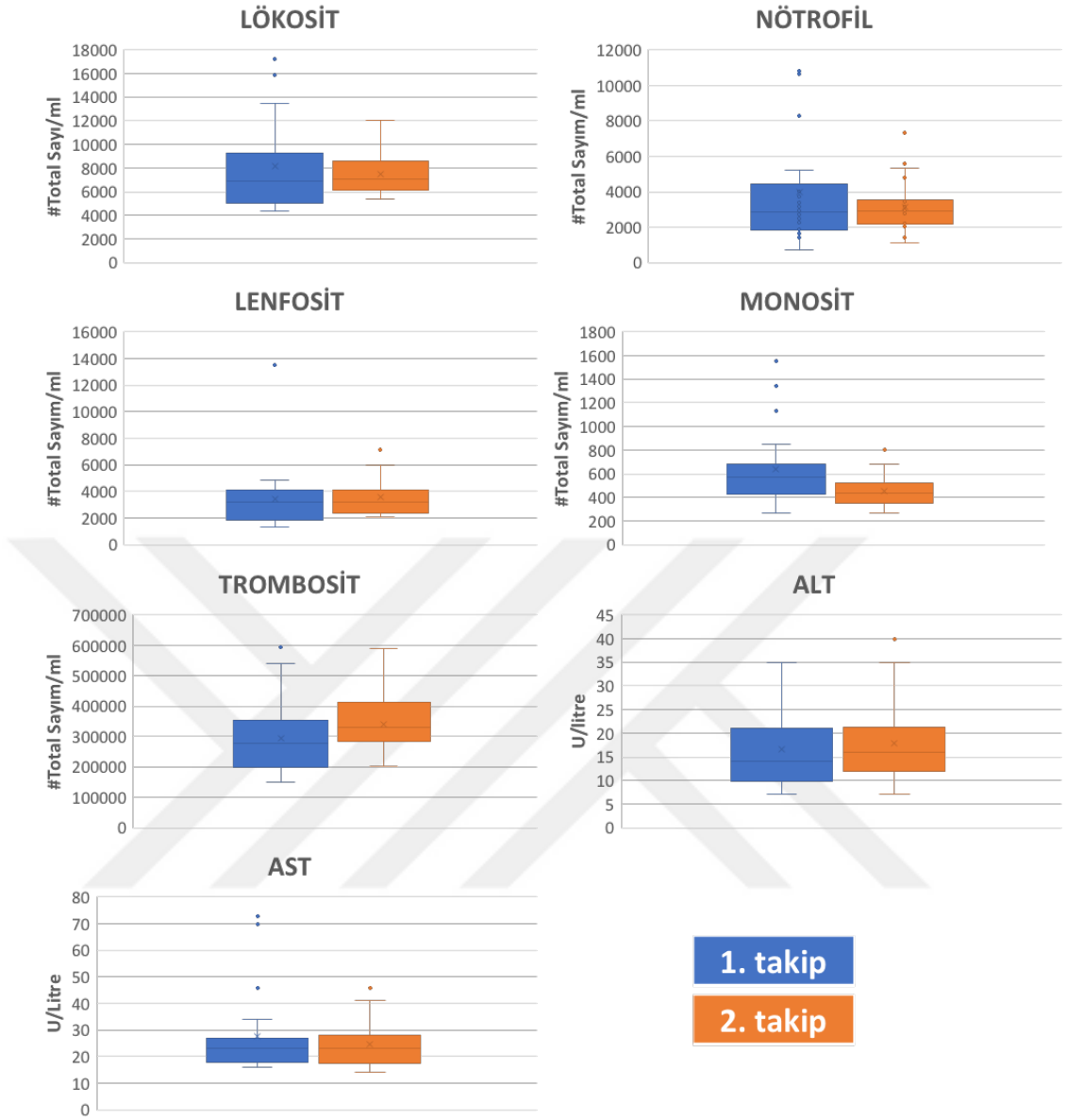


Şekil 4.75 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda tam kan ve biyokimya parametrelerindeki değişimlerin yaş gruplarındaki farklılıkları

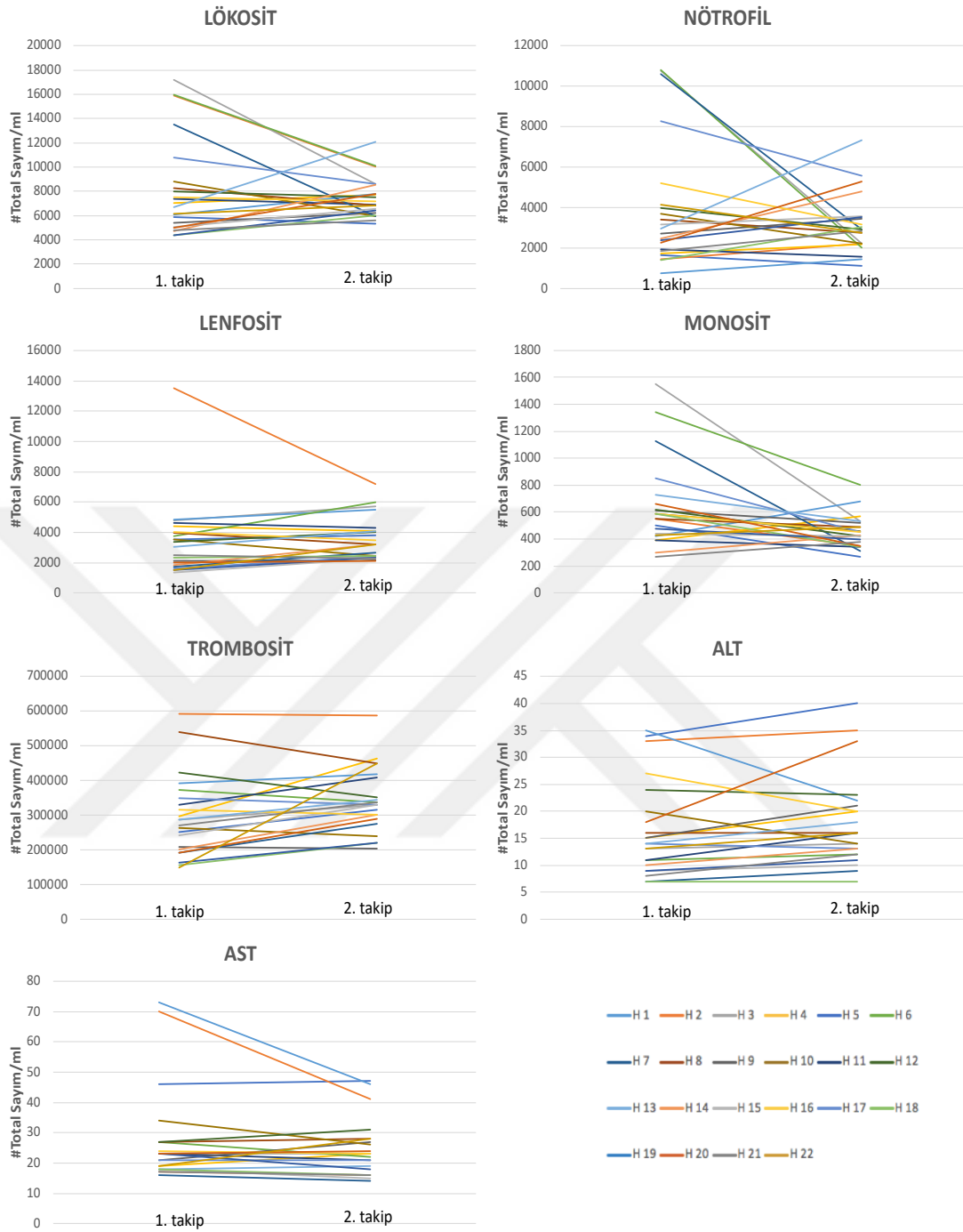


Şekil 4.76 Sağlıklı ve COVID-19+ çocuklarda tam kan ve biyokimya parametrelerindeki değişimlerin PCR tarihi ve klinik semptom tarihine göre değişimleri

Çocuklarda COVID-19 pozitifliğinde görülen lökosit, lenfosit ve trombositlerdeki düşüş, iyileşme döneminde tekrar bazal seviyeye yakın değerlere gelmiştir. Fakat, monositler halen bazal seviyeye dönememiştir (Şekil 4.70).



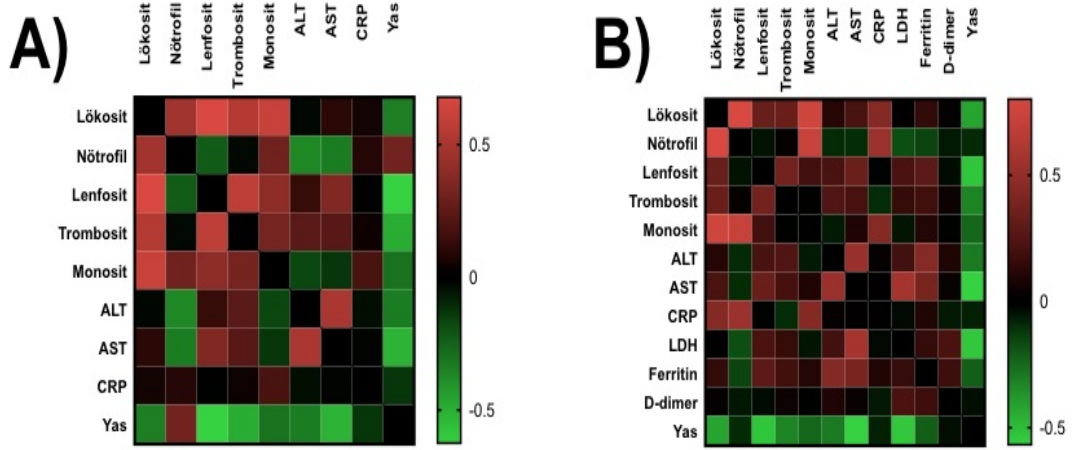
Şekil 4.77 COVID-19+ çocuklarda tam kan ve biyokimya parametrelerinin takip hastalarındaki değişimleri



Şekil 4.77 devam

Sağlıklı çocuklarda klinik kan parametrelerinden nötrofil hariç diğer hepsi yaş ile negatif korelasyona sahip iken, COVID-19+ çocuklarda CRP ve D-dimer yaş ile bir korelasyon göstermemiştir (Şekil 4.78). Sağlıklı çocuklarda monosit sayısı lökosit, nötrofil, lenfosit ve trombosit ile pozitif korelasyona sahip iken, COVID-19+

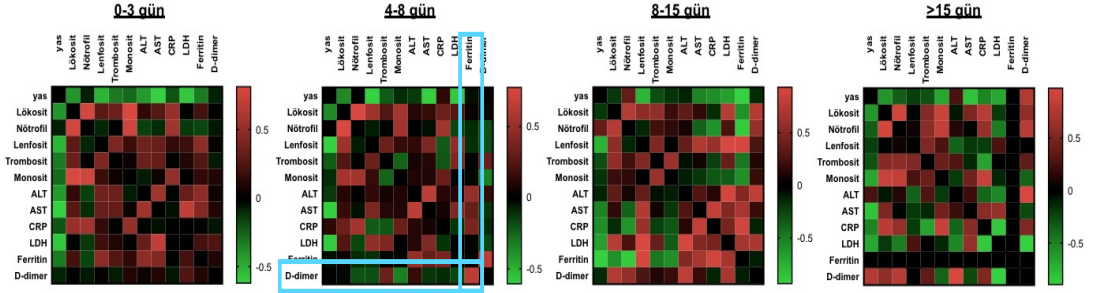
bireylerde lenfosit ve trombositlerde bir korelasyon bulunmamıştır (Şekil 4.78). COVID-19 da güçlü pozitif korelasyon gösteren klinik değerler, nötrofil-lökosit sayısı; nötrofil-lökosit; monosit-lökosit; monosit-nötrofil; LDH-AST; ferritin-ALT arasında bulunmuştur. Güçlü negatif korelasyon gösteren parametreler ise, yaş ve -LDH, -AST, -lenfosit arasında saptanmıştır (Şekil 4.78).



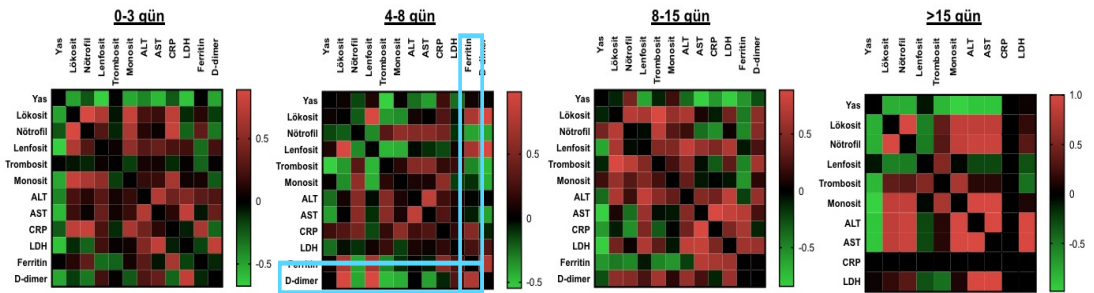
Şekil 4.78 A) Sağlıklı ve B) COVID-19+ çocuklarda klinik parametrelerin birbiri ile olan ilişkileri

Klinik parametrelerden D-dimer ve ferritin yüksekliği COVID-19 için bir belirteç olarak düşünülmektedir. Fakat, bu iki parametre farklı solunum yolu viral enfeksiyonlarla da tetiklenebildiği için ayırt edicilik ve spesifilik konusunda çok yetersizdir. Tez çalışmamızda COVID-19 pozitif çocukları hem PCR tarihi hem de klinik semptom tarihine göre grupladığımızda bu iki parametrenin sadece 4-8 gün aralığında birbirine korele olarak artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.79). Bu tespit ile erken dönem COVID-19+ çocuk bireyler için ayırt edici bir biyobelirteç olarak görülse de kliniğe bu verinin yansması oldukça sınırlıdır. Bu nedenle D-dimer ve ferritin parametrelerinin COVID-19 için çocuklarda ayırt edici parametreler olduğu düşünülmemektedir.

A) PCR tarihine göre



B) Klinik semptom tarihine göre

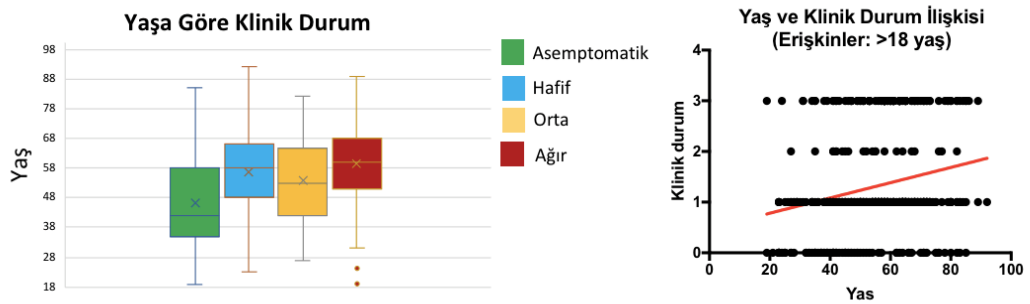


Şekil 4.79 COVID-19+ çocuklarda A) PCR tarihine ve B) Klinik semptom tarihine göre gruplama yapıldığında klinik parametreler arasındaki ilişki

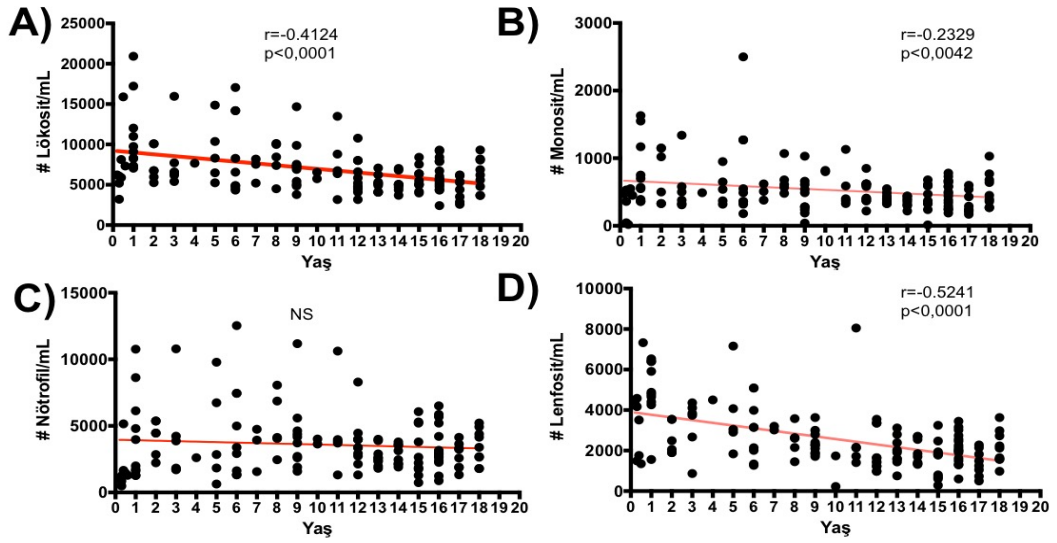
COVID-19 patogeneğinde yaşı klinik kötü gidişatı ile pozitif korelasyona sahip olduğu önceki çalışmalar ile uyumlu olarak tez çalışmamızda da tespit edilmiştir (Şekil 4.80 ve Şekil 4.81). Ayrıca monosit, lenfosit ve lökositlerin yaş ile negatif olarak korele olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.82).



Şekil 4.80 Sağlıklı ve COVID-19+ erişkinlerde yaşa bağlı tam kan ve biyokimya parametrelerindeki yaşa bağlı değişimler

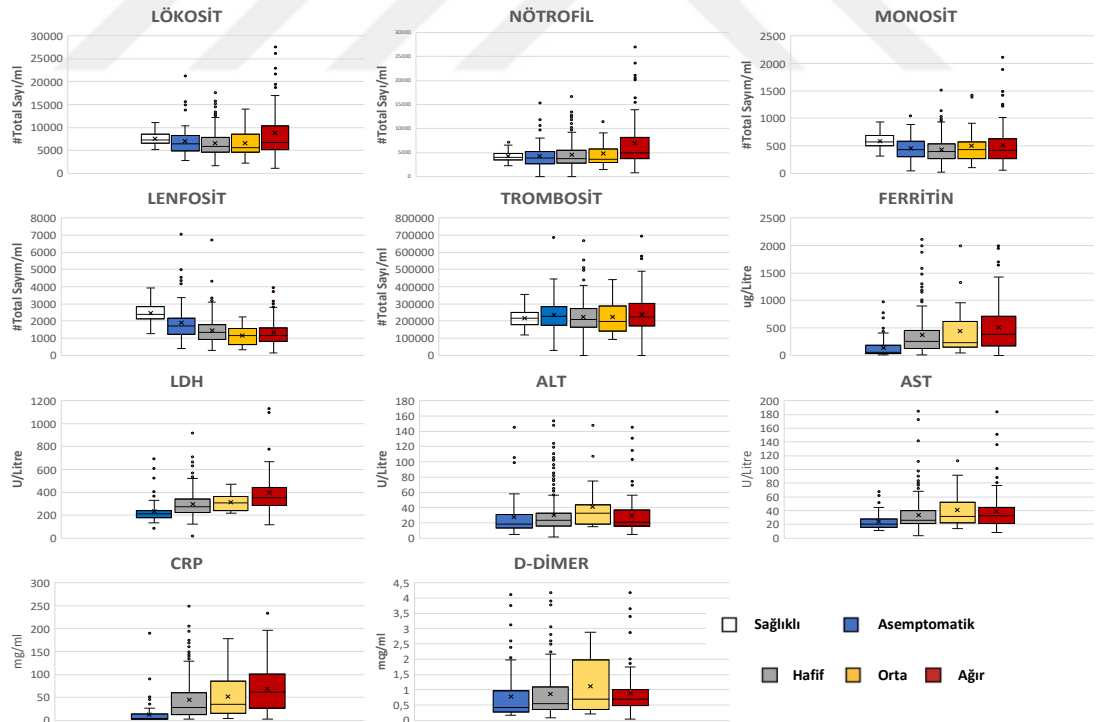


Şekil 4.81 Erişkin COVID-19+ bireylerde yaş ve klinik durum ilişkisi



Şekil 4.82 COVID-19+ çocuk ve erişkin bireylerin yaşa bağlı tam kan sayımındaki A) Lökosit B) Monosit C) Nötrofil ve D) Lenfosit sayılarının değişimi.

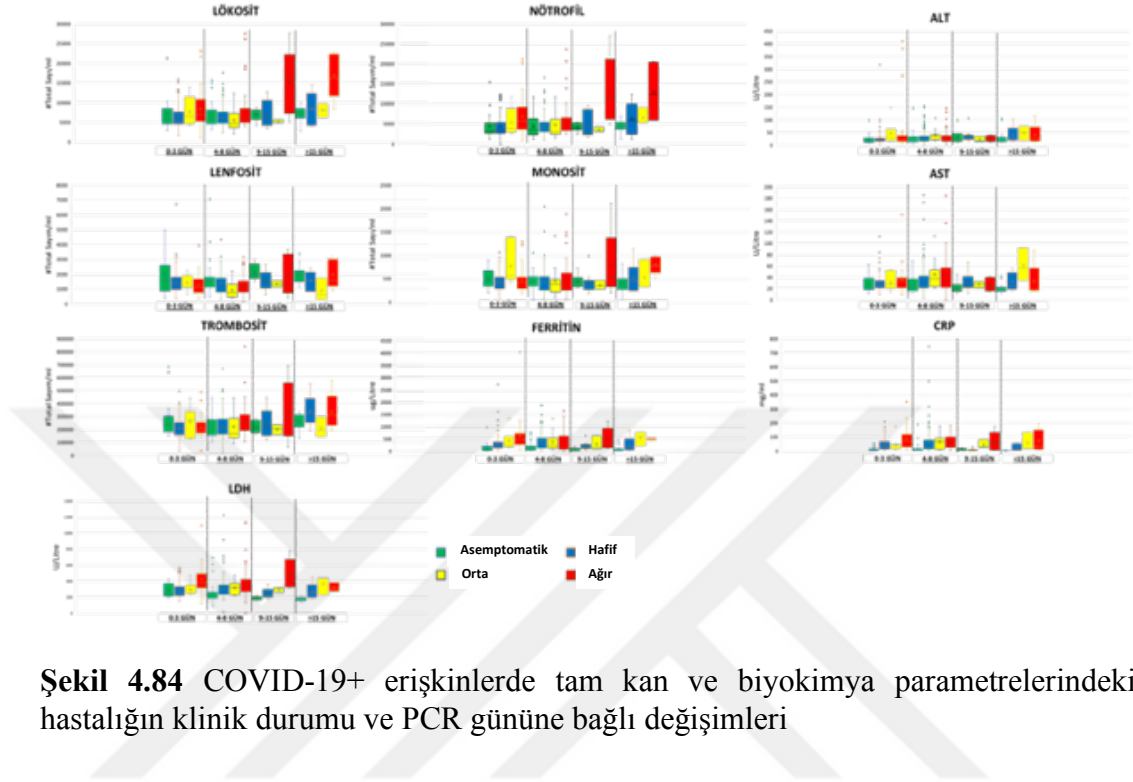
Ferritin, LDH, AST ve CRP klinik kötü gidiş pozitif artış gösterirken; monosit ve lenfositlerdeki düşüş uyumlu olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.83).



ü

Şekil 4.83 Sağlıklı ve COVID-19+ erişkinlerde tam kan ve biyokimya parametrelerindeki hastalığın klinik durumuna bağlı değişimleri

Lökosit ve nötrofiller ağır seyreden klinikte özellikle 15. günden itibaren yüksek sayılara ulaşmıştır (Şekil 4.84 ve Şekil 4.85).

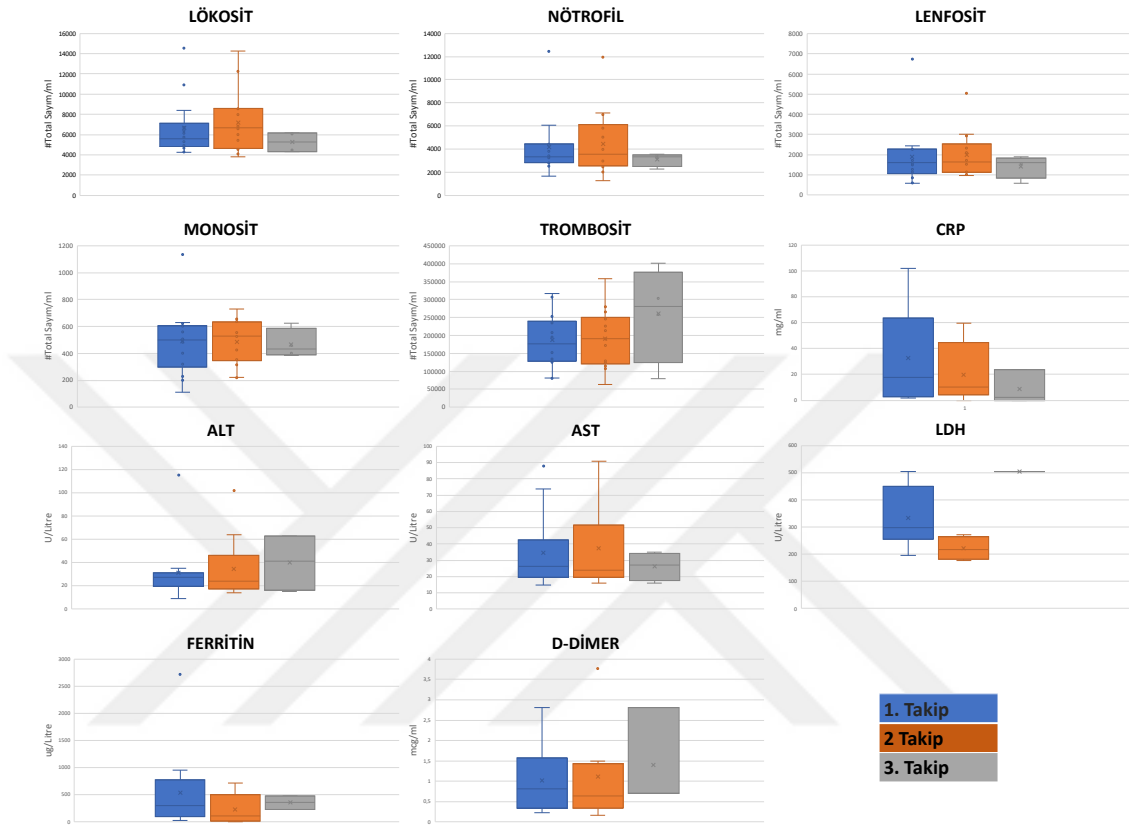


Şekil 4.84 COVID-19+ erişkinlerde tam kan ve biyokimya parametrelerindeki hastalığın klinik durumu ve PCR gününe bağlı değişimleri

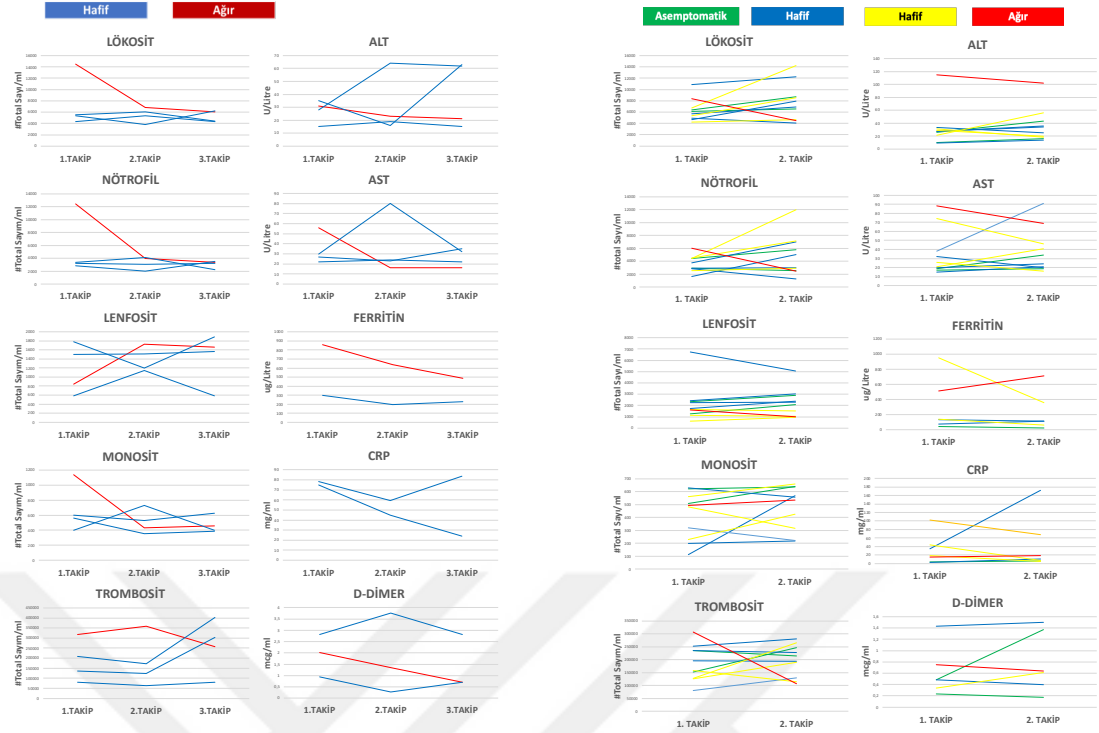


Şekil 4.85 COVID-19+ erişkinlerde tam kan ve biyokimya parametrelerindeki değişikliklerin hastalığın klinik durumu ve yaş ile olan bağlantısının A) PCR günü ve B) Klinik semptom gününe göre farkları

Takip hastalarına bakıldığı zaman klinik durumlarından bağımsız olarak ileri takip döneminde sadece CRP'nin düşüş gösterdiği fakat diğer kan parametrelerinin heterojen değişimlere sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.86 ve Şekil 4.87).



Şekil 4.86 COVID-19+ erişkinlerde tam kan ve biyokimya parametrelerinin takip hastalarındaki değişimleri



Şekil 4.87 COVID-19+ erişkinlerde tam kan ve biyokimya parametrelerinin takip hastalarındaki değişimlerinin klinik duruma göre değerlendirilmesi

Tam kan sayımı klinisyenler için olmaz ise olmaz ve hastalık ile ilgili ön fikir edinmelerini sağlayan elzem bir teknik olsa da COVID-19 patogenezinin farklı ve heterojen klinik seyrini açıklamada oldukça yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple ileri analiz teknikleri ile immünofenotiplendirme ve fonksiyon testleri kullanılarak hastalık immünoopatogenezinin bir bölümü tez çalışmamız ile açıklığa kavuşturulabilmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Anti-viral immün yanıtlarda miyeloid seriye ait hücrelerin kilit rol üstelendiği bilinmektedir. Virüsün eliminasyonu ve ciddi doku hasarı meydana gelmeden homeostazın sağlanması bu hücrelerin matürite ve aktivasyon düzeyleri ile ilişkili olup, finalde T hücre yanıtlarını düzenler. Akut ve kronik inflamasyon ile beraber, salgılanan çeşitli sitokin, kemokin veya büyüme faktörleri hematopoezi uyarak miyeloid hücre üretiminin artmasına neden olur. Olgunlaşmalarını tamamlayan monosit ve nötrofiller kemik iliğinden çıkarak, periferik kan dolaşımına geçer ve buradan da inflamasyon alanına infiltre edilirler. Fakat, virüs eliminasyonunun gerçekleşmediği ve immün yanıtların uzadığı kronik inflamasyon durumunda, hematopoezi uyarak faktörler kemik iliğinin daha fazla çalışmasına neden olarak, miyeloid seriye ait “immatür” hücrelerin periferik dolaşıma geçmesine sebep olur. Miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler (*Myeloid-Derived Suppressor Cell*, MDSC) olarak isimlendirilen bu hücreler, miyeloid hücre gelişiminin farklı olgunlaşma basamaklarını yansıtan heterojen bir gruptur. Bu hücreler yetersiz immün uyarım ve/veya immün baskılama yaparak, aktive olmuş diğer miyeloid hücreleri ve özellikle T hücre yanıtlarını sekteye uğratırlar. Böylelikle, aşırı aktive olmuş ve doku hasarına sebebiyet verebilecek immün sistem üzerinde adeta bir “fren mekanizması” olarak çalışırlar.

MDSC hücreleri, bir çok patolojide tanımlanmış olup, özellikle viral inflamasyonlarda önemi oldukça fazladır. Bu hücrelerin viral kaynaklı hastalıklarda erken, orta veya geç dönemde yüksek oranlarda bulunmasının hastalığın iyi/kötü prognozu ile birebir ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. MDSC hücreleri immün baskılama yapan hücreler olduğu için eş zamanlı olarak diğer matür ve/veya aktive monosit ve nötrofillerin yüzde ve fonksiyonları da bu paradoksun anlaşılmasında büyük öneme sahiptir. Virüsün eliminasyonunda istenen efektif immün yanıtlarda, hem matür ve/veya aktive monosit ve nötrofillerin fonksiyonlarının gerçekleştirilmesi, hem de aşırı aktive olması durumunda MDSC hücrelerinin de artış

göstererek immün yanıtı kontrol altına alması gerekmektedir. Ayrıca, viral enfeksiyona sekonder bakteri enfeksiyonların da sıklıkla eşlik ettiği bildirilmekte olup, G- MDSC'lerin bu tip bazı durumlarda baskılama kapasitesinin yanı sıra bakteri eliminasyonu kapasitesine de sahip olduğu gösterilmiştir (Hassani ve ark., 2020; Ost ve ark., 2016).

Litaratürde hastalık kötü seyri ile yüksek ilişkiye sahip olan MDSC alt-grubunun M- MDSC olduğu gösterilmiştir (Falck-Jones ve ark., 2021). Çalışmamızda özellikle G-MDSC, e- MDSC ve M-MDSC alt-gruplarının birbirine olan oranlarının kontrollü immün yanıtları yönettiği ve bu oranların hastalık seyri ile ilişkisi tanımlanmıştır. M-MDSC hücrelerinin oranının diğer alt-gruplara göre daha fazla olması ağır seyir ile ilişkilendirilirken, tek başına e-MDSC veya G-MDSC bulunması durumunda klinik seyrin iyi gittiği görülmüştür. Fakat, gerçek monositler (CD14+) antijen sunma kapasiteleri yitirmesinin eşlik etmesi ağır pnömoni ile seyretmekte ve ölüm ile sonuçlanan tablolara neden olabilmektedir. Ayrıca, elde ettiğimiz sonuçlarda G-MDSC immünofenotipine sahip hücrelerin erişkinlerdeki tüm klinik alt-gruplarda arttığı ve en fazla artış ağır seyreden grupta görülmüştür. Litaratürde bu hücre gruplarının diğer klinik gruplarda artış göstermediği raporlansa da Takano ve arkadaşlarının yaptığı yayında popülasyona bağlı olarak bu alt-grupta farklılıklar görülebileceği raporlanmıştır (Takano ve ark., 2021).

Hastalığı asemptomatik olarak geçiren bireylerin 1.077g/mL ficoll fazına biriken ve fenotipik olarak G-MDSC olarak nitelendirilebilecek hücrelerinin T hücre yanıtlarını baskılamadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda fenotipik olarak asemptomatik bireylerde de G- MDSC benzeri hücrelerin COVID-19 ile artış gösterdiği belirlenmiş olup, literatürden farklı bir sonuç elde edilmiştir. Ayrıca, COVID-19+ çocuk bireyler de çalışmamızda değerlendirilmiş olup, bu bireylerin karşılaştırılması için alınan sağlıklı çocuk bireylerin periferik kanlarında fenotipik olarak G-MDSC benzeri hücreler oldukça yüksek düzeylerde (median:77.7) tespit edildi. Fakat, hem asemptomatik COVID-19+ bireylerde hem de sağlıklı çocuklarda bu hücrelerin PBMC ko-kültürlerinde T hücre yanıtlarını baskılamadığı, en az eritrosit fazındaki CD66b+ hücreler kadar uyardığı tespit edilmiştir. Çalışmanın ilk aşamalarında FACS

cihazı birimde bulunmadığı için G-MDSC hücreleri CD66b+ MACS yöntemi ile elde edilmişti. Bu yöntem ile sadece tek bir belirtece göre hücre saflaştırılmakta olup, belirteçlerin farklı düzeylerde eksprese olduğu alt-hücre gruplarının elde edilmesi mümkün değildir. G-MDSC hücreleri CD66b belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden ve CD33 belirtecini de düşük veya orta düzeylerde taşıyan immatür nötrofil hücre alt-grubudur. Çalışmamızda MACS yöntemi ile elde ettiğimiz G-MDSC hücrelerinin saflaştırılmasında bir problem olup olmadığını tespit etmek amacı ile, hastaların total PBMC hücrelerinin çoğalma kapasitesi ve CD66b hücrelerinin uzaklaştırıldığı PBMC hücreleri de kıyaslanmış ve CD66b+ hücreler uzaklaştırıldığı zaman proliferasyonun arttığı görülmüştür. Ayrıca, 1.077g/mL ve eritrosit fazındaki hücreler artan oranlarda sağlıklı bireylerin PBMC hücrelerinin üzerine eklendiğinde 1.077g/mL fazından elde edilen CD66b+ hücrelerin sağlıklı çocuk ve asemptomatik bireyler dışındaki tüm koşullarda konsantrasyona bağlı olarak T hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda G-MDSC fenotipine sahip fakat fonksiyonel olarak T hücre yanıtlarını baskılamadığı için G-MDSC olarak nitelendirilemeyen farklı bir immatür alt-hücre grubunun olabileceği düşünülmüştür. Litaratürde COVID-19 ve MDSC alt-grupları ile ilgili yayınlar mevcut olup, çocuk bireylerdeki durumu araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız litaratürde ilk kez COVID-19+ çocuk bireylerdeki MDSC düzey ve fonksiyonlarını belirleyen bir çalışmadır. Ayrıca, litaratürde genel olarak sadece bu hücre alt- grupları değerlendirilmiş olup, diğer pro- veya anti-inflamatuar hücre grupları ile beraber bulunmasındaki etkinin final klinik seyre yansıması gösterilmemiştir.

Çocuk bireylerde hali hazırda var olan immatür miyeloid hücre elemanlarının hastalık seyrinin iyi seyretmesini kontrol ettiği düşünülmektedir. COVID-19 klinik iyi seyir ile artış gösteren hücreler, hali hazırda çocuk bireylerde var olduğu için bu grubun hastalıktan ağır etkilenmediği düşünülmektedir. Elde edilen veriler neticesinde sağlıklı çocuklarda var olan E- MDSC hücrelerinin COVID-19 ile artışı ve G-MDSC yüzdelerindeki azalma saptanmıştır. Ayrıca, CD66b+ pro-inflamatuar monositlerin artışı da görülmüştür. Bu sonuca göre başlangıçtaki CD66b eksprese eden öncül hücrelerin bu belirteç ekspresyonunu azaltarak (CD66bdim) hastalığın akut fazında CD66b pozitif proinflamatuvar monositlere farklılaşması ile virus replikasyonunu

engelleyerek, inflamasyonu pozitif desteklediği düşünülmektedir. İlerleyen inflamasyon döneminde (resolving phase; 15 günden sonra) ise hem bu aktivatör hücrelerin hem de fonksiyonel olarak T hücre baskılama kapasitesine sahip G-MDSC'lerin artışı, olası aşırı inflamasyonu sınırlamaktadır. CD66b+ monositler normal monositlere kıyasla daha fazla T hücre proliferasyonunu ve inflamasyonu uyaran hücrelerdir (Horzum ve ark., 2021). M-MDSC'lerin ise kötü prognoz ile ilişkisi tanımlanmıştır (Falck-Jones ve ark., 2021). Bu nedenle, çocuklarda M-MDSC'nin yüksek düzeylerde artış göstermemesi inflamasyonun etkinliğini koruyabilmektedir. Çünkü, erişkinlerde, hem M-MDSC, hem G-MDSC hem de CD66b+ monositleri yüksek olduğu görülmüş ve inflamasyonu baskılayıcı yöne şekillendirdiği düşünülmüştür.

CD66b+ hücrelerin immün uyarıcılık kapasitesindeki farklılığın bu belirteci farklı düzeylerde taşıma ile ilişkili olduğu düşünülmekte olup, CD66b+ CD33- hücrelerin içerisinde bu belirteci farklı düzeylerde taşıyan alt-gruplarının olabileceği de düşünülmüştür. Bu sebeple, G-MDSC'nin ayırt edilmesinde de kullanılan CD66b belirtecini sergileyen diğer hücre alt- grupları matürasyon, aktivatör ve inhibitor molekül ekspresyonu açısından da hem fenotipik hem fonksiyonel olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Son yıllarda nötrofiller ile ilgili çalışmalar oldukça hız kazanmış olup, literatüre birçok yeni bilgi kazandırılmıştır. Tipik olarak nötrofiller, segmentli nükleus ve yoğun granüllere sahip olarak tanımlansa da bu çalışmalar ile düşük yoğunluğa sahip erken nötrofilik olgunlaşma basamağında bulunan nötrofiller belirlenmiştir. Düşük yoğunluklu nötrofiller (*low density neutrophils, LDN*) olarak isimlendirilen bu hücreler periferik kan mononükleer hücre fraksiyonunda (*peripheral blood mononuclear cell, PBMC*) bulunmakta olup, baskılayıcılık özelliği göstermesi durumunda granülositik miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler (*granulocytic myeloid-derived suppressor cells, G-MDSCs*) olarak da isimlendirilmektedir (Marini ve ark., 2017). Bu baskılayıcı hücreler büyük çoğunlukta PBMC fraksiyonun da bulunsalar da normal yoğunluğa sahip nötrofillerin bulunduğu ayırlama fazında da tespit edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Bowers ve ark., 2014; Choi ve ark 2012; Tsuda ve ark.,

2012). G-MDSC; kanser, HIV-1, sepsis, hamilelik, Graft-Versus-Host Hastalığı (GVHD) gibi birçok inflamasyon ilişkili koşullarda bireylerin periferik kan örneklerinde saptanmıştır (Marini ve ark., 2017). Düşük yoğunluklu nötrofiller (LDN) hücreleri genel olarak immün baskılayıcı kabul edilse de sistemik lupus eritematozus (*systemic lupus erythematosus*, SLE) ve psoriasis gibi koşullarda bu hücrelerin proinflamatuvar karakter sergilediği gösterilmiştir (Scapini, Marini, Tecchio, & Cassatella, 2016). Nötrofil matürasyonunu belirlemek için yoğunluğun yanı sıra yüzey belirteçlerinin ekspresyonu da oldukça kritiktir. Matür nötrofiller genellikle CD11b+ CD16+ olarak değerlendirilse de (Carissimo ve ark., 2020), bu belirteçlere eşlik eden CD10 pozitifliğinin de matür nötrofilleri tespit etmek kullanılabileceği belirtilmiştir (Marini ve ark., 2017). Fakat, periferik kan mononükleer hücre fazında bulunan düşük yoğunluklu nötrofillerin de (LDN) CD10 eksprese edebildiği ve bu hücrelerin proinflamatuvar bir karakter sergilediği raporlanmıştır (Scapini ve ark., 2016)). Asemptomatik ve ağır gruplarında CD10 belirtecinin ekspresyonu 1.077g/mL ficoll fazında eritrosit fazına göre daha yüksek görülse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. COVID-19+ çocuklarda ise, CD66bhigh grup CD66bdim gruba göre daha yüksek CD10 belirteci taşıırken, özellikle eritrosit fazındaki CD66bhigh hücrelerde bu belirtecin daha yüksek bulunduğu saptandı. Kemik iliğinde gerçekleşen nötrofil matürasyonunda CD117 belirtecinin erken dönem progeniör hücrelerde yüksek düzeylerde bulunduğu ve matürasyon ile azaldığı bildirilmiştir (Dinh ve ark., 2020). Ayrıca, bu molekülün T hücreler üzerinde immün baskılayıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir (Jaillon ve ark., 2020). Hafif kliniğe sahip hastalarda CD117 belirtecinin eritrosit fazındaki CD66bdim hücrelerde daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. CD62L nötrofillerin adhezyon ve aktivasyon düzeyleri ile ilişkilidir (Dinh ve ark., 2020). Matür ve immatür nötrofillerin her ikisinin de CD62L belirtecini yüksek düzeylerde taşıdığı fakat yaşlanmış nötrofillerde bu belirtecin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Jaillon ve ark., 2020). Hafif ve asemptomatik bireylerin eritrosit fazındaki hücreler kıyaslandığında CD66bdim hücrelerin asemptomatik bireylerde daha yüksek olduğu görülmüştür. CD63 belirteci nötrofillerin yaşlanması ve apoptotik sürecin başlaması ile artış gösteren bir belirteçtir. Ayrıca, bu belirtecin nötrofillerin aktive olması ile yüzeylerinde yüksek düzeylerde eksprese edildiği raporlanmıştır (Beinert, Münzing, Possinger, & Krombach, 2000). Bunun yanı sıra,

CD63 belirtecini yanında CD81, CD43, CD15 ve CD66b pozitifliği taşıyan hücrelerin progenitör nötrofil olgunlaşma düzeyinde olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Reusch ve ark., 2021). Ayrıca, COVID-19 pozitif olup, hastalığı ağır geçiren bireylerde CD63 yüzey belirtecini yükseldiği raporlanmıştır (Reusch ve ark., 2021). Literatüre uyumlu olarak çalışmamızda da ağır bireylerde CD63 ekspresyonu yüksek bulunmuşken, bu belirtecin hafif kliniğe sahip bireylerin CD66b high hücrelerinde de yüksek olduğu belirlenmiştir. Nötrofil gelişimi ve hayatta kalımı için G-CSF-R (CD114) önemli bir role sahiptir. Çalışmamızda çocuklarda bu reseptör bakımından bir fark yok iken, erişkin asemptomatik bireylerin 1.077g/mL fazında bulunan hücrelerin yüksek düzeylerde CD114 eksprese ettiği görülmüştür. LOX-1 hafif ve ağır kliniğe sahip bireylerin 1.077 fazında eksprese edilirken, özellikle CD66bhigh alt-grubunda daha fazla görülmüştür.

İmmün sistemde doğuştan ve adaptif immün sistem arasındaki bağlantı antijen sunumu ile gerçekleşir. Miyeloid hücreler MHC sınıf I ve MHC sınıf II (HLA-DR) molekülleri üzerinde antijeni T hücrelerin T hücre reseptörüne (*T cell receptor*, TCR) iletir ve böylelikle T hücreler ilk sinyali almış olur. Miyeloid hücreler eksprese ettikleri CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 gibi ko-stimülatör moleküller ile de T hücre yanıtlarını düzenlerler. CD80 ve CD86 belirteçleri T hücrenin üzerinde bulunan CD28 reseptörü ile bağlanmakta olup, T hücrenin aktivasyonunu pozitif yönde destekler. Aktive olan T hücrelerin üzerinde CD80 ve CD86'ya afinitesi CD28'e göre daha fazla olan baskılayıcı CTLA-4 molekülünün çıkması ile de immün yanıt sonlanır (Chen, & Flies, 2013; Roche, % Furuta, 2015). İmmün yanıtın sonlanmasındaki diğer iki önemli ligand ise PD-L1 ve PD-L2 molekülleridir. Bu moleküller T hücre yüzeyinde bulunan PD-1 reseptörü ile eşleşerek aktive olmuş T hücre yanıtlarını sonlandırırlar. Genel olarak immün baskılayıcı ligandlar olarak isimlendirilen bu proteinler, özellikle aşırı immün yanıtın kontrol edilebilmesi ve doku hasarının önlenmesinde de pozitif role sahiptir (Karunarathne ve ark., 2016). PD-L1'in yaptığı immün baskılama birçok çalışma ile doğrulanmış olsa da baskılayıcı olarak kabul gören PD-L2 molekülü için son yıllarda aktivatör karakter de sergileyebileceği tartışılmaktadır. PD-L2/PD-1 eşleşmesi ile önlenen PD-L1/PD-1 bağlanmasının T hücrelerde CD3 ve ICOS ekspresyonunu arttırdığı raporlanmıştır (Karunarathne ve ark., 2016). Bu kompleks davranış göz

önünde bulundurulduğunda PD-L1'in PD-L2'ye göre daha immün baskılayıcı bir molekül olduğu kabul görmektedir.

Dendritik hücreler, monositler veya makrofajlar ile T hücreler arasında gerçekleşen antijen sunumu sonrasında, aktive olan T hücrelerin ürettiği oldukları sitokinler nötrofillerin antijen sunumu yapmasını desteklemektedir. Üzerlerinde CD80, CD86 ve HLA-DR molekülü sergileyen bu nötrofiller, T hücre yanıtını şekillendirmektedirler (Lin, & Loré, 2017).

Sağlıklı çocukların 1077g/mL ficoll fazındaki hücreleri CD80, CD86 ve PD-L2 belirtecini anlamlı olarak yüksek düzeylerde taşıırken, COVID-19 pozitif çocuklarda CD86 düzeyi daha düşük ve PD-L1 belirteci daha yüksek eksprese edilmektedir.

T hücre yanıtları proliferasyon, aktivasyon ve sitokin salgılanması olarak 3 farklı şekilde değerlendirilebilir. Aktive olan T hücreler aktivasyonun erken dönemlerinden başlamak üzere üzerinde CD154, CD69 ve CD25 gibi belirteçleri taşımaya başlar. CD40L olarak da bilinen CD154 belirteci özellikle erken dönemlerde CD4+ T hücrelerin yüzeyinde eksprese olur. Bu belirtecin ekspresyonu kısa süreli ve geçicidir. CD40/CD40L etkileşimi sonrasında miyeloid hücrelerin yüzeyinde CD80, CD86 ve MHC-II ekspresyonunun arttığı da bildirilmiştir (Grewal, & Flavell, 1998; Shipkova, & Wieland, 2012 Xu, & Song, 2004). CD25, erken dönemlerde T hücre yüzeyinde eksprese olmaya başlayan ve uzun süre kalan bir belirteçtir. T hücrelerin çoğalması için gerekli en elzem sitokin olan IL-2 reseptörü olduğu için bu kararlı ekspresyona sahip olan protein, ayrıca T düzenleyici hücreler (*regulatory T cell*, Treg) üzerinde de bulunur. Treg hücrelerinde bu belirtece ek olarak FOXP3 ekspresyonu da gözlenir (Létourneau, Krieg, Pantaleo, & Boyman, 2009) CD69, transmembran C-tipi lektin protein olup, Treg farklılaşması, IL-22 sekresyonu, Th17 dönüşümünün engellenmesi gibi fonksiyonlara sahiptir. T hücrenin aktive olması ile yüzeyde eksprese olmaya başlayan bu protein efektör T hücre dönüşümü sonrasında yüksek düzeylerde hücre yüzeyinde bulunur (Majhi ve ark., 2015). Aktive olan T hücrelerde proliferasyon ve sitokin salgılama kapasitesi artış gösterir. Ayrıca, bu hücrelerin ne

kadar aktive olabildiği çoğalma hızı ile de takip edilebilir. İmmün hücre yanıtlarındaki proliferasyon kapasitesindeki ve hızındaki artış genel olarak immün sistemi pozitif yönde desteklerken, her zaman immün aktivasyona sebep olmaz. CD4+ T hücre yanıtlarındaki görülen artış Treg hücrelerinin çoğalması ile ilgili ön veriler sağlamakta olup, FOXP3 ekspresyon düzeylerinin kontrol edilmesi ile bu çıkarım doğrulanmalıdır (Abbas, 2021). COVID-19+ çocuklarda özellikle, PD-L1 ligandının hem 1.077g/mL hem de eritrosit fazında yüksek bulunması; ko-kültürlerde TGF-beta ve IL-10 düzeylerinin artış göstermesi ve 96. saatte CD4+ T hücrelerin üzerindeki CD25 belirtecinin yüksek bulunması Treg dönüşümünün desteklendiği ile ilgili görüşü desteklemiştir. İleri çalışmalar ile bu doğrulamanın yapılması da gerekmektedir.

Çalışmamızda T hücre yanıtları değerlendirilirken farklı ko-kültür/kültür stratejileri kullanılmış olup, CD66b+ hücre alt- gruplarının fonksiyonel etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda kullanılan ko- kültür yöntemlerinde i) hastaların PBMC fazının var olan hücre kompozisyonu ile proliferasyonu ii) 1.077 g/mL veya eritrosit fazından saflaştırılan CD66b+ hücrelerin sağlıklı PBMC ile ko-kültüre edilerek PBMC proliferasyonu iii) eritrosit fazından saflaştırılan CD66b+ hücrelerin hem sağlıklı hem de aynı hastanın PBMC fazı ile ko-kültürü iv) hastaların PBMC fazından CD66b+ hücrelerin çıkarılması ile proliferasyonun karşılaştırılması v) CD66b^{dim} ve CD66b^{high} popülasyonların saflaştırılarak sağlıklı PBMC ile ko-kültürü sonucunda CD3+, CD4+ ve CD8+ T hücrelerin proliferasyonu ve aktivasyonu değerlendirilmiştir. Erişkin hastaların sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında beklenildiği şekilde PBMC faz hücrelerinin çoğalma kapasitesinin daha düşük olduğu görüldü. Bu koşulda var olan tüm miyeloid hücre grubu olması var olan kompozisyonu ile değerlendirildiği için, hastanın T hücre yanıtları değerlendirildi. Fenotiplendirme sonuçlarından da elde edilen sonuçlara göre özellikle erişkin bireylerdeki ağır seyreden hastaların G-MDSC ve M-MDSC seviyelerinin yüksek olması sebebi ile bu farklılığın olduğu düşünülmektedir. Çocuklarda ise, COVID-19+ ve sağlıklı çocuklar kıyaslandığında var olan PBMC proliferasyonu açısından bir fark görülmedi. Bunun sebebinin ise, fenotip sonuçlarına dayanarak PBMC fazındaki aktivatör/immün yanıtı destekleyici hücreler olarak düşünülmektedir. Hastaların sahip olduğu PBMC hücrelerine kendi eritrosit fazlarındaki CD66b+ hücreler eklenerek proliferasyon

kapasiteleri değerlendirilmiştir. Özellikle, sağlıklı çocuklardaki eritrosit fazında bulunan CD66b+ hücrelerin baskılama kapasitesini farklı bir şekilde değerlendirilen bu yöntemde, sağlıklı erişkinlerde PBMC proliferasyonu desteklenirken, kendi PBMC fazı ile ko-kültür gerçekleştirildiğinde bu proliferasyonun düştüğü görülmüştür. Sağlıklı çocuklarda, PBMC hücrelerinin tek başına proliferasyonun yüksek düzeylerde olup, kendi eritrosit fazı CD66b+ hücreler eklenince kendi PBMC hücrelerinin proliferasyonun düşmesi ama sağlıklı erişkin bireylerde bu sonucun görülmemesi, PBMC fazlarında hali hazırda var olan baskılayıcı kapasiteye sahip hücrelerin bulunduğu ve bu hücrelerin eritrosit fazı CD66b+ hücrelerde de var olduğu için, baskılamanın gerçekleştirdiğini düşündürmüştür. Hem sağlıklı hem de COVID-19+ çocuklarda CD66b^{high} hücrelerin CD66b total ve CD66b dim e kıyasla T hücre yanıtlarını daha az uyardığı/baskıladığı görülmüştür. Çalışmanın merkezinde tuttuğumuz hücre alt-grubu G-MDSC benzeri hücreler olduğu için, bu hücrelerin kültürlerden çıkarıldığında proliferasyon değerlendirilerek, immün yanıt şekillendirmedeki önemi araştırılmıştır. Bu hücrelerin çıkarılması T hücrelerin proliferasyonunu geri kazanmasına sebep olsa da bazı durumlarda fark görülmemiştir. Hastanın sahip olduğu diğer aktivatör ve baskılayıcı hücre dağılımının bu sonuca sebep olduğu düşünülmektedir.

İmmün sistem hücrelerinin inflamasyon bölgesine ulaşması için gerekli reseptör kompozisyonunun oluşması, kan damarlarının akış ve geçirgenliğinin artması ve lökositlerin periferik kandan endotele tutunması gibi süreçlerin gerçekleşmesi etkin bir immün yanıt için oldukça kritiktir. Bu sırada salgılanan sitokin ve kemokinler immün yanıt yönünün şekillenmesini sağlar ve bu nedenle oldukça kritiktir (Abbas, 2021). TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL- 6 immün yanıtı aktive edici (pro-inflamatuar); IL-10 ve TGF- β immün baskılayıcı (anti- inflamatuvar); IL-4 ise Th2-ilişkili bağışıklık yanıtlarında etkindir (Abbas, 2021; Altan-Bonnet, & Mukherjee, 2019). İnflamasyon alanına ulaşan hücrelerin burada pro-inflamatuar karakter sergilemeleri patogenezi eliminasyonunda oldukça elzem olsa da ayrıca doku tamiri ve inflamasyonun sınırlandırılması da etkin immün yanıt için gereklidir (Abbas, 2021; Altan- Bonnet, & Mukherjee, 2019). Nötrofiller, periferik kanda en fazla bulunan immün sistem hücreleri olup, inflamasyon durumunda farklı olgunlaşma düzeylerinde dolaşımda,

inflamasyon alanında ve hematopoetik organlarda bulunurlar (Galani, & Andreacos, 2015; Reusch ve ark., 2021). İnflamasyon ile beraber salgılanan TNF- α ve IL-1 β , CXCL1 ve CCL2 gibi kemokinlerin artışı destekleyerek, nötrofil infiltrasyonu ve gelişimini uyarır. Ayrıca, Th17 hücrelerinden salgılanan IL-17'nin de lökositlerden TNF- α , IL-1 β ve IL-6 salgılanması ile de nötrofiller uyarılmaktadır (Abbas, 2021; Altan-Bonnet, & Mukherjee, 2019; Selders, Fetz, Radic, & Bowlin, 2017). İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere temelde iki fazda incelenmektedir. Akut inflamasyon, enfeksiyonlara karşı yanıtta ilk basamağı kapsamakta olup, hızla verilen ilk yanıtları içerir. Kronik inflamasyon ise, enfeksiyonun elimine edilemediği veya sınırlandırılmadığı koşullarda meydana gelen yanıtları içerir. Kronik inflamasyon daha baskılayıcı bir immün yanıt profilini, anjiyogenezi ve doku yeniden şekillendirilme süreçlerini içerir (Abbas, 2021). İmmün yanıtın başlaması ve sonlandırılması hem doğuştan hem de adaptif immün sistemin iç içe geçen karmaşık süreçleri ile şekillenir. IL-1, IL-12, TNF- α ve IFN- γ gibi güçlü pro-inflamatuar sitokinler anti-inflamatuar süreçleri başlatmakta ve negatif geri bildirme yapmaktadırlar. Bu sitokinler, IL-10 salınımını uyararak, IL-12 salınımının engellenmesi, ko-aktivatör molekül ve HLA-DR ekspresyonunun azalması, ko-inhibitör molekül ekspresyonunun arttırılması, TGF- β sentezinin desteklenmesi gibi immün baskılayıcı süreçleri şekillendirirler (Medzhitov, 2008).

Çalışmamızda kullandığımız akım sitometri temelli sitokin tarama kiti ile genel bir immün yanıt profili incelenmek istenmiştir. Gerçekleştirilen ko-kültürlerler saflaştırılan granülositik hücrelerin PBMC hücreleri ile etkileşimi sonucunda ortaya çıkan genel profil değerlendirilerek, immün yanıtın yönün proliferasyon ve aktivasyon belirteçleri de göz önünde bulundurularak değerlendirilmeye çalışılmıştır. Sağlıklı çocukların 1.077 ve eritrosit fazında bulunan CD66b⁺ hücrelerin IL-4 üretimini sağlıklı erişkinlere göre yaklaşık 5.5 kat daha fazla uyardığı görülmüştür. Bu sonuç, özellikle eritrosit fazında bulunan hücrelerin 1.077 fazındaki CD66b⁺ hücrelere göre Th2 yanıtı daha iyi şekillendirdiğini düşündürmektedir. IL-2 seviyelerine bakıldığında tüm gruplara göre en az sağlıklı çocukların bu sitokin üretimini desteklediği görülmüştür. Sağlıklı çocukların eritrosit fazında bulunan CD66b⁺ hücrelerin IL-4 sitokin sekresyonunu güçlü bir şekilde uyarmalarının yanı sıra, IL-1 β , CCL2 ve TNF-

α üretimini de desteklemektedir. IL-1 β ve TNF- α artışına paralel olarak CCL2 kemokinin artışı ve beklenildiği şekilde CXCL8'in de bu hücre grubu ile indüklenmesi, sağlıklı çocukların eritrosit fazındaki CD66b+ hücrelerin de immün baskılama yapabileceğini düşündürmüştür. Sağlıklı çocuklardaki 1.077g/mL ficoll fazı ve eritrosit fazı CD66b+ pozitif hücrelerin benzer derecede T hücre yanıtlarını uyarmasının da bu hücrelerin aynı derecede T hücre yanıtlarını sınırlayabileceğinden kaynaklanabilmektedir.

Çalışmamızda, elde edilen veriler neticesinde, hipotezde öne sürülen dengeli immün yanıt iyi klinik seyir ile ilişkilidir yaklaşımı doğrulanmıştır. T hücre yanıtlarının aktivatör hücre grupları ile desteklenirken, kontrollü olarak baskılayıcı/az uyarıcı veya erken olgunlaşma basamağında olup, inflamasyon ile hızlıca hem pro-inflamatuar hem anti- inflamatuvar hücreleri verecek öncül hücrelerin de ortaya çıkışı, kontrollü immün yanıtı sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında özellikle CD66b+ hücre alt-gruplarının fenotipik ve fonksiyonel farklılıkları COVID-19 patolojisinde incelenmiş olup, yeni bilgi ve mekanizmlar önerilmeye çalışılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2021). Cellular and Molecular Immunology, 10th Edition. Hollanda: Elsevier (pp.30-31)
- Agrati, C., Sacchi, A., Bordoni, V., Cimini, E., Notari, S., Grassi, G., ... Ippolito, G. (2020). Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19). *Cell Death and Differentiation*, 27(11), 3196–3207. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0572-6>
- Altan-Bonnet, G., & Mukherjee, R. (2019). Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. *Nature reviews. Immunology*, 19(4), 205–217. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0131-x>
- Amor, S., Fernández Blanco, L., & Baker, D. (2020). Innate immunity during SARS-CoV-2: evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. *Clinical and Experimental Immunology*, 202(2), 193-209. <https://doi.org/10.1111/cei.13523>
- Barnes, B. J., Adrover, J. M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A., Cools-Lartigue, J., Crawford, J. M., ... Egeblad, M. (2020). Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(6), e20200652. <https://doi.org/10.1084/jem.20200652>
- Beinert, T., Münzing, S., Possinger, K., & Krombach, F. (2000). Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 67(3), 369–373. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.3.369>
- Benz, C., Copley, M. R., Kent, D. G., Wohrer, S., Cortes, A., Aghaeepour, N., ... Eaves, C. J. (2012). Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell*, 10(3), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.007>
- Bleibtreu, A., Bertine, M., Bertin, C., Houhou-Fidouh, N., & Visseaux, B. (2020). Focus on Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). *Medecine et Maladies Infectieuses*, 50(3), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.10.004>
- Bowers, N. L., Helton, E. S., Huijbregts, R. P., Goepfert, P. A., Heath, S. L., & Hel, Z. (2014). Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS pathogens*, 10(3), e1003993. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003993>

- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., ... Brodin P. (2021). Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nature Medicine*, 27(1), 28–33. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01202-8>
- Gabrilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7, 12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>
- Bruger, A. M., Dorhoi, A., Esendagli, G., Barczyk-Kahlert, K., van der Bruggen, P., Lipoldova, M., ... Brandau, S. (2019). How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunology, Immunotherapy* : CII, 68(4), 631–644. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2170-8>
- Carmona-Rivera, a., Kaplan, M.J., (2016). Encyclopedia of Cell Biology Volume 3: Neutrophil Biology. Hollanda: Elsevier (pp.750-758)
- Carissimo, G., Xu, W., Kwok, I., Abdad, M. Y., Chan, Y. H., Fong, S. W., ...Ng, L. F. (2020). Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nature communications*, 11(1), 5243. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19080-6>
- Chafekar, A., & Fielding, B. C. (2018). MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses*, 10(2), 93. <https://doi.org/10.3390/v10020093>
- 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* (London, England), 395(10223), 514–523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology*, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., ... Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* (London, England), 395(10223), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>

- Cheng, H., Zheng, Z., & Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein & Cell*, 11(1), 34–44. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0633-0>
- Choi, J., Suh, B., Ahn, Y. O., Kim, T. M., Lee, J. O., Lee, S. H., & Heo, D. S. (2012). CD15+/CD16low human granulocytes from terminal cancer patients: granulocytic myeloid-derived suppressor cells that have suppressive function. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 33(1), 121–129. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0254-6>
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 25(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, 17(3), 181–192. <https://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. *Journal of Innate Immunity*, 7(2), 116–126. <https://doi.org/10.1159/000368233>
- Datta, P. K., Liu, F., Fischer, T., Rappaport, J., & Qin, X. (2020). SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy. *Theranostics*, 10(16), 7448–7464. <https://doi.org/10.7150/thno.48076>
- Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., Jarvis, C. I., Kucharski, A. J., Munday, J. D., ... Silverman, J. D., CMMID COVID-19 Working Group, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Diaz-Ordaz, K., Keogh, R., ... Edmunds, W. J. (2021). Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science (New York, N.Y.)*, 372(6538), eabg3055. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
- de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., & Munster, V. J. (2016). SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, 14(8), 523–534. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
- Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., Ning, L., ... Chen, Y. (2020). Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, 11, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
- Diebold S. (2010). Innate recognition of viruses. *Immunology Letters*, 128(1), 17–20. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.09.010>

- Dinh, H. Q., Eggert, T., Meyer, M. A., Zhu, Y. P., Olingy, C. E., Llewellyn, R., ... Hedrick, C. C. (2020). Coexpression of CD71 and CD117 Identifies an Early Unipotent Neutrophil Progenitor Population in Human Bone Marrow. *Immunity*, 53(2), 319–334.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.017>
- Edvardsson, L., Dykes, J., & Olofsson, T. (2006). Isolation and characterization of human myeloid progenitor populations-TpoR as discriminator between common myeloid and megakaryocyte/erythroid progenitors. *Experimental Hematology*, 34(5), 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.01.017>
- Falck-Jones, S., Vangeti, S., Yu, M., Falck-Jones, R., Cagigi, A., Badolati, I., ... Smed-Sörensen, A. (2021). Functional monocytic myeloid-derived suppressor cells increase in blood but not airways and predict COVID-19 severity. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(6), e144734. <https://doi.org/10.1172/JCI144734>
- Frost, S., Magalis, B. R., & Kosakovsky Pond, S. L. (2018). Neutral Theory and Rapidly Evolving Viral Pathogens. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1348–1354. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy088>
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 9(3), 162–174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>
- Galani, I. E., & Andreakos, E. (2015). Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *Journal of leukocyte biology*, 98(4), 557–564. <https://doi.org/10.1189/jlb.4VMR1114-555R>
- Goh, C., Narayanan, S., & Hahn, Y. S. (2013). Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? *Immunological Reviews*, 255(1), 210–221. <https://doi.org/10.1111/imr.12084>
- Grewal, I. S., & Flavell, R. A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annual review of immunology*, 16, 111–135. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.111>
- Grieshaber-Bouyer, R., & Nigrovic, P. A. (2019). Neutrophil Heterogeneity as Therapeutic Opportunity in Immune-Mediated Disease. *Frontiers in Immunology*, 10, 346. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00346>
- Groth, C., Hu, X., Weber, R., Fleming, V., Altevogt, P., Utikal, J., & Umansky, V. (2019). Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *British Journal of Cancer*, 120(1), 16–25. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0333-1>

- Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., ... Li, S. Y. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19 (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
- Hammer, A. S., Quaade, M. L., Rasmussen, T. B., Fonager, J., Rasmussen, M., Mundbjerg, K., ...Bøtner, A. (2021). SARS-CoV-2 Transmission between Mink (Neovison vison) and Humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 27(2), 547–551. <https://doi.org/10.3201/eid2702.203794>
- Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M., ... Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(7), 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>
- Hassani, M., Hellebrekers, P., Chen, N., van Aalst, C., Bongers, S., Hietbrink, F., ... Vrisekoop, N. (2020). On the origin of low-density neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 107(5), 809–818. <https://doi.org/10.1002/JLB.5HR0120-459R>
- Hasöksüz, M., Kiliç, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(SI-1), 549–556. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., & Pöhlmann, S. (2020). A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell*, 78(4), 779–784.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
- Horzum, U., Yoyen-Ermis, D., Taskiran, E. Z., Yilmaz, K. B., Hamaloglu, E., Karakoc, D., & Esendagli, G. (2021). CD66b⁺ monocytes represent a proinflammatory myeloid subpopulation in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 70(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02656-y>
- 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 (London, England)*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., Xu, W., & Liu, S. W. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Hui, D. S., I Azhar, E., Madani, T. A., Ntoumi, F., Kock, R., Dar, O., ... Petersen, E. (2020). The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan,

- 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. *Journal of Virology*, 79(9), 5288–5295. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5288-5295.2005>
- Jaillon, S., Ponzetta, A., Di Mitri, D., Santoni, A., Bonecchi, R., & Mantovani, A. (2020). Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 20(9), 485–503. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0281-y>
- Johansson, C., & Kirsebom, F. (2021). Neutrophils in respiratory viral infections. *Mucosal Immunology*, 14(4), 815–827. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00397-4>
- Kaplan, M. J., & Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 189(6), 2689–2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
- Karunarathne, D. S., Horne-Debets, J. M., Huang, J. X., Faleiro, R., Leow, C. Y., Amante, F., ... Wykes, M. N. (2016). Programmed Death-1 Ligand 2-Mediated Regulation of the PD-L1 to PD-1 Axis Is Essential for Establishing CD4(+) T Cell Immunity. *Immunity*, 45(2), 333–345. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.017>
- Khan, A., Emmons, T. R., Wong, J. T., Alqassim, E., Singel, K. L., Mark, J., ... Segal, B. H. (2020). Quantification of Early-Stage Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer Requires Excluding Basophils. *Cancer Immunology Research*, 8(6), 819–828. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0556>
- Khanna-Gupta, A., Berliner, N., (2018). Hematology Chapter 27: Granulocytopoiesis and Monocytopoiesis. Hollanda: Elsevier (pp.321-333)
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 85, 104502. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>
- Koushki, K., Salemi, M., Miri, S. M., Arjeini, Y., Keshavarz, M., & Ghaemi, A. (2021). Role of myeloid-derived suppressor cells in viral respiratory infections; Hints for discovering therapeutic targets for COVID-19. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 144, 112346. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112346>

- Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., & Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43(3), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.009>
- Kupferschmidt, K. (2021). New coronavirus variants could cause more reinfections, require updated vaccines. *Science*, <https://doi.org/10.1126/science.abg6028>
- Laforge, M., Elbim, C., Frère, C., Hémadi, M., Massaad, C., Nuss, P., ... Becker, C. (2020). Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nature Reviews. Immunology*, 20(9), 515–516. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1>
- Lahoz-Beneytez, J., Elemans, M., Zhang, Y., Ahmed, R., Salam, A., Block, M., ... Macallan, D. (2016). Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood*, 127(26), 3431–3438. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-700336>
- Lambert, C., Preijers, F., Yanikkaya Demirel, G., & Sack, U. (2017). Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 92(3), 180–188. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21280>
- Lauring, A. S., & Hodcroft, E. B. (2021). Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *JAMA*, 325(6), 529–531. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.27124>
- Létourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G., & Boyman, O. (2009). IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 123(4), 758–762. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.011>
- Li, K., Shi, H., Zhang, B., Ou, X., Ma, Q., Chen, Y., ... Wang, Y. (2021). Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 362. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00670-9>
- Lin, A., & Loré, K. (2017). Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. *Frontiers in immunology*, 8, 1781. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01781>
- Linden, M., Ward J.M., Cherian, S. (2012). Comparative Anatomy and Histology Chapter 19: *Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. USA: Seattle (pp.326-327)
- Liongue, C., Wright, C., Russell, A. P., & Ward, A. C. (2009). Granulocyte colony-stimulating factor receptor: stimulating granulopoiesis and much more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(12), 2372–2375. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.08.011>

- Lu, R., Czechowicz, A., Seita, J., Jiang, D., & Weissman, I. L. (2019). Clonal-level lineage commitment pathways of hematopoietic stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(4), 1447–1456. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801480116>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ...Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Mackey, J., Coffelt, S. B., & Carlin, L. M. (2019). Neutrophil Maturity in Cancer. *Frontiers in Immunology*, 10, 1912. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01912>
- Majhi, R. K., Sahoo, S. S., Yadav, M., Pratheek, B. M., Chattopadhyay, S., & Goswami, C. (2015). Functional expression of TRPV channels in T cells and their implications in immune regulation. *The FEBS journal*, 282(14), 2661–2681. <https://doi.org/10.1111/febs.13306>
- Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Mosca, J. D., Moorman, M., & Gerson, S. L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 176(1), 57–66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199807\)176:1<57::AID-JCP7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<57::AID-JCP7>3.0.CO;2-7)
- Manz, M. G., & Boettcher, S. (2014). Emergency granulopoiesis. *Nature Reviews. Immunology*, 14(5), 302–314. <https://doi.org/10.1038/nri3660>
- Marini, O., Costa, S., Bevilacqua, D., Calzetti, F., Tamassia, N., Spina, C., ...Scapini, P. (2017). Mature CD10⁺ and immature CD10⁻ neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood*, 129(10), 1343–1356. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-713206>
- Mazza, E. M., Zoso, A., Mandruzzato, S., Bronte, V., Serafini, P., Inverardi, L., & Bricciato, S. (2014). Gene expression profiling of human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells (f-MDSCs). *Genomics Data*, 2, 389–392. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2014.10.018>
- McFee R. B. (2020). Human pathogen coronaviruses - An overview. *Disease-a-month : DM*, 66(9), 101066. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.101066>
- McGonagle, D., Ramanan, A. V., & Bridgewood, C. (2021). Immune cartography of macrophage activation syndrome in the COVID-19 era. *Nature Reviews. Rheumatology*, 17(3), 145–157. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00571-1>
- McKenna, E., Mhaonaigh, A. U., Wubben, R., Dwivedi, A., Hurley, T., Kelly, L. A., ... Molloy, E. J. (2021). Neutrophils: Need for Standardized

- Nomenclature. *Frontiers in Immunology*, 12, 602963.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.602963>
- Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435.
<https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Mocsai A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(7), 1283–1299.
<https://doi.org/10.1084/jem.20122220>
- Mohamed Khosroshahi, L., Rokni, M., Mokhtari, T., & Noorbakhsh, F. (2021). Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; an overview. *International Immunopharmacology*, 93, 107364.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107364>
- Mousavizadeh, L., & Ghasemi, S. (2021). Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 54(2), 159–163.
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022>
- Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S., & Krishnan, U. M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, 179, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.018>
- Nakazawa, D., Desai, J., Steiger, S., Müller, S., Devarapu, S. K., Mulay, S. R., ... Anders, H. J. (2018). Activated platelets induce MLKL-driven neutrophil necroptosis and release of neutrophil extracellular traps in venous thrombosis. *Cell Death Discovery*, 4, 6. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0073-2>
- Naumenko, V., Turk, M., Jenne, C. N., & Kim, S. J. (2018). Neutrophils in viral infection. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 505–516.
<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2763-0>
- Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O. I., Wilson, G., ... Dick, J. E. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* (New York, N.Y.), 351(6269), aab2116.
<https://doi.org/10.1126/science.aab2116>
- O'Connor, M. A., Rastad, J. L., & Green, W. R. (2017). The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Viral Infection. *Viral Immunology*, 30(2), 82–97.
<https://doi.org/10.1089/vim.2016.0125>
- Ohl, K., & Tenbrock, K. (2018). Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression. *Frontiers in Immunology*, 9, 2499.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02499>

- Ost, M., Singh, A., Peschel, A., Mehling, R., Rieber, N., & Hartl, D. (2016). Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Frontiers in Cellular and Infection microbiology*, 6, 37. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00037>
- Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., ... Tian, D. S. (2020). Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 762–768. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
- Qin, G., Liu, S., Yang, L., Yu, W., & Zhang, Y. (2021). Myeloid cells in COVID-19 microenvironment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 372. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00792-0>
- Parackova, Z., Zentsova, I., Bloomfield, M., Vrabцова, P., Smetanova, J., Klocperk, A., ... Sediva, A. (2020). Disharmonic Inflammatory Signatures in COVID-19: Augmented Neutrophils' but Impaired Monocytes' and Dendritic Cells' Responsiveness. *Cells*, 9(10), 2206. <https://doi.org/10.3390/cells9102206>
- Payen, D., Cravat, M., Maadadi, H., Didelot, C., Prosic, L., Dupuis, C., ... De Carvalho Bittencourt, M. (2020). A Longitudinal Study of Immune Cells in Severe COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*, 11, 580250. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.580250>
- Peiris, J. S., Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, ... SARS study group (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* (London, England), 361(9366), 1319–1325. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13077-2)
- Pietras, E. M., Reynaud, D., Kang, Y. A., Carlin, D., Calero-Nieto, F. J., Leavitt, A., ... Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*, 17(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Rada B. (2019). Neutrophil Extracellular Traps. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1982, 517–528. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_31
- Ranzoni, A. M., Tangherloni, A., Berest, I., Riva, S. G., Myers, B., Strzelecka, P. M., ... Cvejic, A. (2021). Integrative Single-Cell RNA-Seq and ATAC-Seq Analysis of Human Developmental Hematopoiesis. *Cell Stem Cell*, 28(3), 472–487.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.015>
- Rawat, S., Vrati, S., & Banerjee, A. (2021). Neutrophils at the crossroads of acute viral infections and severity. *Molecular Aspects of Medicine*, 81, 100996. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100996>

- Reusch, N., De Domenico, E., Bonaguro, L., Schulte-Schrepping, J., Baßler, K., Schultze, J. L., & Aschenbrenner, A. C. (2021). Neutrophils in COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 12, 652470. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.652470>
- Roche, P. A., & Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology*, 15(4), 203–216. <https://doi.org/10.1038/nri3818>
- Rodak, B.F., & Carr, J.H. (2015). Clinical Hematology Atlas 5th Edition. Hollanda: Elsevier.
- Rodriguez-Fraticelli, A. E., Wolock, S. L., Weinreb, C. S., Panero, R., Patel, S. H., Jankovic, M., ... Camargo, F. D. (2018). Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature*, 553(7687), 212–216. <https://doi.org/10.1038/nature25168>
- Rosenbauer, F., & Tenen, D. G. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nature Reviews. Immunology*, 7(2), 105–117. <https://doi.org/10.1038/nri2024>
- Sabino, E. C., Buss, L. F., Carvalho, M., Prete, C. A., Jr, Crispim, M., Fraiji, N. A., ... Faria, N. R. (2021). Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet (London, England)*, 397(10273), 452–455. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00183-5)
- Sawicki, S. G., & Sawicki, D. L. (2005). Coronavirus transcription: a perspective. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 287, 31–55. https://doi.org/10.1007/3-540-26765-4_2
- Scapini, P., Marini, O., Tecchio, C., & Cassatella, M. A. (2016). Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunological reviews*, 273(1), 48–60. <https://doi.org/10.1111/imr.12448>
- Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z., & Bowlin, G. L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative biomaterials*, 4(1), 55–68. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw041>
- Sendo, S., Saegusa, J., & Morinobu, A. (2018). Myeloid-derived suppressor cells in non-neoplastic inflamed organs. *Inflammation and Regeneration*, 38, 19. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0076-7>
- Seyed Hosseini, E., Riahi Kashani, N., Nikzad, H., Azadbakht, J., Hassani Bafrani, H., & Haddad Kashani, H. (2020). The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*, 551, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.08.011>

- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 11(11), 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>
- Shipkova, M., & Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413(17-18), 1338–1349. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.006>
- Srivastava, M., Hall, D., Omoru, O. B., Gill, H. M., Smith, S., & Janga, S. C. (2021). Mutational Landscape and Interaction of SARS-CoV-2 with Host Cellular Components. *Microorganisms*, 9(9), 1794. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091794>
- 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), 168. <https://doi.org/10.3390/v11020168>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A., Zhou, J., ... Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Takano, T., Matsumura, T., Adachi, Y., Terahara, K., Moriyama, S., Onodera, T., ... Takahashi, Y. (2021). Myeloid cell dynamics correlating with clinical outcomes of severe COVID-19 in Japan. *International immunology*, 33(4), 241–247. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab005>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2007). Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Reviews*, 220, 214–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00562.x>
- Tan, M., Liu, Y., Zhou, R., Deng, X., Li, F., Liang, K., & Shi, Y. (2020). Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology*, 160(3), 261–268. <https://doi.org/10.1111/imm.13223>
- Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., ... Lu, J. (2020). On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*, 7(6), 1012–1023. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>
- Tate, M. D., Deng, Y. M., Jones, J. E., Anderson, G. P., Brooks, A. G., & Reading, P. C. (2009). Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 183(11), 7441–7450. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902497>

- Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews. Immunology*, 20(6), 363–374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., & Fitzgerald, K. A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*, 3(6), 920–940. <https://doi.org/10.3390/v3060920>
- Thomson, E. C., Rosen, L. E., Shepherd, J. G., Spreafico, R., da Silva Filipe, A., Wojcechowskyj, J. A., ... Snell, G. (2021). Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity. *Cell*, 184(5), 1171–1187.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.037>
- Tomar, B., Anders, H. J., Desai, J., & Mulay, S. R. (2020). Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells*, 9(6), 1383. <https://doi.org/10.3390/cells9061383>
- Triposkiadis, F., Xanthopoulos, A., Giamouzis, G., Boudoulas, K. D., Starling, R. C., Skoularigis, J., Boudoulas, H., & Iliodromitis, E. (2021). ACE2, the Counter-Regulatory Renin-Angiotensin System Axis and COVID-19 Severity. *Journal of Clinical Medicine*, 10(17), 3885. <https://doi.org/10.3390/jcm10173885>
- Tsuda, Y., Fukui, H., Asai, A., Fukunishi, S., Miyaji, K., Fujiwara, S., Teramura, K., Fukuda, A., & Higuchi, K. (2012). An immunosuppressive subtype of neutrophils identified in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 51(3), 204–212. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.12-32>
- Starr, T. N., Greaney, A. J., Hilton, S. K., Ellis, D., Crawford, K., Dingens, A. S., ... Bloom, J. D. (2020). Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell*, 182(5), 1295–1310.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012>
- Umakanthan, S., Sahu, P., Ranade, A. V., Bukelo, M. M., Rao, J. S., Abrahao-Machado, L. F., ... Kv, D. (2020). Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate Medical Journal*, 96(1142), 753–758. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138234>
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., ... Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, 10(4), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>

- 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), e00127-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
- Wang, J. P., Bowen, G. N., Padden, C., Cerny, A., Finberg, R. W., Newburger, P. E., & Kurt-Jones, E. A. (2008). Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood*, 112(5), 2028–2034. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132860>
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 587269. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- Wang, N., Yang, X., Sun, J., Sun, Z., Ma, Q., Wang, Z., ... Xu, J. (2019). Neutrophil extracellular traps induced by VP1 contribute to pulmonary edema during EV71 infection. *Cell Death Discovery*, 5, 111. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0193-3>
- Wang, Y., Zhang, T., Sun, M., Ji, X., Xie, M., Huang, W., & Xia, L. (2021). Therapeutic Values of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hepatocellular Carcinoma: Facts and Hopes. *Cancers*, 13(20), 5127. <https://doi.org/10.3390/cancers13205127>
- Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 69(4), 635–664. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005>
- Wevers, B. A., & van der Hoek, L. (2009). Recently discovered human coronaviruses. *Clinics in Laboratory Medicine*, 29(4), 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.07.007>
- Wickramasinghe, S.N., Porwit, a., Erber, W.N. (2011). Blood and Bone Marrow Pathology. Chapter 2: Normal bone marrow cells. Hollanda: *Elsevier* (pp.19-44)
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., ... Trumpp, A. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135(6), 1118–1129. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.048>
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., & Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 80(5), 617–653. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780067>

- Wood B. L. (2007). Myeloid malignancies: myelodysplastic syndromes, myeloproliferative disorders, and acute myeloid leukemia. *Clinics in Laboratory Medicine*, 27(3), 551–vii. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2007.05.006>
- Wrobel, A. G., Benton, D. J., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., Skehel, J. J., & Gamblin, S. J. (2020). SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nature Structural & Molecular biology*, 27(8), 763–767. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0468-7>
- Wu, J., Liu, J., Zhao, X., Liu, C., Wang, W., Wang, D., ... Li, L. (2020). Clinical Characteristics of Imported Cases of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Jiangsu Province: A Multicenter Descriptive Study. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 706–712. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa199>
- Xu Y, Song G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci*. 2004;11(4):426-38.
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., ... Wang, F. S. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 8(4), 420–422. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)
- Yan, Y., Shin, W. I., Pang, Y. X., Meng, Y., Lai, J., You, C., ... Pang, C. H. (2020). The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7), 2323. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072323>
- Yang, L., Gou, J., Gao, J., Huang, L., Zhu, Z., Ji, S., ... Zhang, Y. (2020). Immune characteristics of severe and critical COVID-19 patients. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 179. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00296-3>
- Yang, L., Liu, S., Liu, J., Zhang, Z., Wan, X., Huang, B., ... Zhang, Y. (2020). COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 128. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00243-2>
- Yang, X., Yu, Y., Xu, J., Shu, H., Xia, J., Liu, H., ... Shang, Y. (2020). Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 8(5), 475–481. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)

- Zheng, M., Gao, Y., Wang, G., Song, G., Liu, S., Sun, D., ...Tian, Z. (2020). Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(5), 533–535. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., ...Knight, J. S. (2020). Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*, 5(11), e138999. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>



7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
AZU1	Azurodin1
Ba	Dengeli
BM	Kemik iliği
BPI	Geçirgenlik artırıcı protein
C/EBP	CCAAT/enhancer bağlanma proteini
CFU-E	Koloni oluşturan birim-eritroid öncülü
c-KIT	Trozin kinaz reseptörü
CLP	Ortak lenfoid öncülü
CMP	Ortak miyeloid öncülü
CoV	Koronavirüs
COVID-19	Koronavirüs hastalığı, 2019
CXCR2	Kemokin reseptör 2
CXCR4	Kemokin reseptör 4
E-MDSC	Erken evre- miyeloid kökenli baskılayıcı hücre
E	Zarf proteini
ER	Endoplazmik retikulum
FcγRII	Fc reseptör II
FcγRIII	Fc reseptör III
F-MDSC	Fibroblastik miyeloid kökenli baskılayıcı hücre
GATA1	GATA-bağlayıcı protein 1
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
G-CSFR	Granülosit koloni uyarıcı faktör reseptörü
GFI1	Büyüme faktöründen bağımsız 1 transkripsiyon baskılayıcısı
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
GM-CSF-Rα	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptör α
G-MDSC	Granülositik- miyeloid kökenli baskılayıcı hücre

GMP	Granülosit-makrofaj öncülü
hCAP-18	İnsan katyonik antimikrobiyal protein 18
HCoV	İnsan koronavirüsü
HSC	Hematopoetik kök hücre
IFN γ	İnterferon gamma
Ig	İmmünoglobülin G
IL	İnterlökin
İNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IRF8	İnterferon düzenleyici faktör 8
ISF	İnterferon ile uyarılan gen
LTF	Laktoferrin
LT-HSC	Uzun ömürlü hematopoetik kök hücre
Ly-Bi	Lenfoid eğilimli
M	Membran proteini
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MDP	Makrofaj dendritik hücre öncülü
MDSC	Miyeloid kökenli baskılayıcı hücre
MEP	Megakaryosit-eritroid öncül hücre
MERS-CoV	Orta Doğu solunum sendromu ile ilişkili koronavirüs
MkP	Megakaryosit kararlı öncül
M- MDSC	Monositik- miyeloid kökenli baskılayıcı hücre
MPO	Miyeloperoksidaz
MPP	Multipotent öncül hücre
MPP1	Multipotent öncül hücre
MPP2	Multipotent öncül hücre
MPP3	Multipotent öncül hücre
MPP4	Multipotent öncül hücre
My-Bi	Miyeloid eğilimli
N	Nükleokapsid proteini
NET	Nötrofil hücre dışı tuzakları
NGAL	Nötrofil jelatinaz ile ilişkili likopalin
NK	Doğal öldürücü hücre
NKG2A	Öldürücü hücre lektin benzeri reseptör alt ailesi C üye 1 reseptörü

NO	Nitrik oksit
ORF	Açık okuma çerçevesi
PAMP	Patojen ile ilişkili moleküler kalıplar
PD1	Programlanmış ölüm proteini 1
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PR3	Proteinaz 3
Pre GM	pre granülosit monosit hücre
Pre-MegE	pre megakaryosit ve eritroid hücre
pre-Neu	pre-nötrofil
pro-Neu	pro-nötrofil
PRR	Pattern tanıma reseptörleri
pp	Polipeptid
RBD	Reseptör bağlayıcı bölge
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RUNX1	Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 1
S	Spike proteini
SARS-CoV	Ağır akut solunum yolu yetersizliği sendromu
SCA1	Kök hücre antijeni 1
SCF	Kök hücre faktörü
SLAM	Sinyal veren lenfosit aktivasyon molekülleri
ST-HSC	Kısa ömürlü hematopoetik kök hücre
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü β
TIM3	T hücre immünoglobülin bölgesi ve müsin bölgesi 3
TMPRSS2	Transmembran proteazı serin 2
Treg	Düzenleyici T hücre
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
WHO	Dünya sağlık örgütü
γ -GT	γ glutamin transferaz

8. EKLER

EK1

Şekil 8.1 Etik kurul karar formu (Sayfa 1)

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU				
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		COVID-19 Pozitif Hastalarda G-MDSC Benzeri Alt Gruplardaki Fenotipik ve Fonksiyonel Farklılıkların Araştırılması		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26		
	AÇIK ADRESİ			
	TELEFON	0.224. 295 00 20		
	FAKS	0.224. 295 00 29		
	E-POSTA	uukaek@uludag.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	-Prof.Dr.H.Barbaros Oral (tez danışmanı) -Öğr.Gör.Dr.Digdem Yöyen Ermiş		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı		
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Prof.Dr.Ferah Budak -Prof.Dr.E.Halis Akalın -Dr.S.Haldun Bal -Prof.Dr.Fahir Özkalemkas, Doç.Dr.Vildan Özkocaman -Doç.Dr.Ali Asan, Doç.Dr.Eren Çağan -Uzm.Dr.İbrahim Ethem Pınar -Yüksek Lisans Öğr.Fatma Dombaz, Yüksek Lisans Öğr.Önur Eitgü, Doktora Öğr.Mehmet Karacay		
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	-Bursa Uludağ Univ. Tıp Fak. İmmünoloji AD -Bursa Uludağ Univ. Tıp Fak. Enfeksiyon Hast. ve Klinik Mikr. AD -Bursa Uludağ Univ. SUAM Dr.Raif Durusoy Kan Merkezi -Bursa Uludağ Univ. Tıp Fak. İç Hast. AD Hematoloji BD -SBÜ Bursa Yüksek İhtisas EAH Enfeksiyon Hastalıkları -Bursa Uludağ Univ. Tıp Fak. İç Hast. AD Hematoloji BD -Bursa Uludağ Univ. Tıp Fak. İmmünoloji AD		
	DESTEKLEYİCİ	TÜBİTAK 1001		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif araştırma		
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez çalışması		
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	10.01.2021 / 1 yıl		
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	150		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı		Tarihi	Dili
	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU		31.12.2020	Türkçe
	Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu- Hasta grubu		31.12.2020	Türkçe
	Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu-Sağlıklı kontrol grubu		31.12.2020	Türkçe
	Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu-Hasta grubu (0-18 yaş çocuk ebeveyn için)		31.12.2020	Türkçe
	Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu-Hasta grubu (9-15 yaş çocuk için)		31.12.2020	Türkçe
	Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu-Hasta grubu (16-18 yaş çocuk için)		31.12.2020	Türkçe
	Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu-Hasta kontrol grubu (0-18 yaş çocuk ebeveyn için)		31.12.2020	Türkçe
	Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu-Hasta kontrol grubu (9-15 yaş çocuk için)		31.12.2020	Türkçe
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU		☒	Tarih: 31.12.2020
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU		☒	Tarih: 29.12.2020
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLI GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ		☒	Tarih: 29.12.2020
	İKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname		☒	Tarih: 29.12.2020
	SONUÇ ÖZET RAPORU		☐	
	DİĞER:		☒	Araştırma ilk başvuru ön yazısı (Tarih: 31.12.2020), sorumlu araştırmacı özgeçmişi, araştırmacı tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür

Şekil 8.2 Etik kurul karar formu (Sayfa 2)

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU									
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		COVID-19 Pozitif Hastalarda G-MDSC Benzeri Alt Gruplardaki Fenotipik ve Fonksiyonel Farklılıkların Araştırılması							
KARAR BİLGİLERİ		Karar No: 2021-1/21		Tarih: 06 Ocak 2021					
		Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelendi. 1-Araştırmanın başvurusu dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna, 2-Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kaşesi bulunan "Onam" formlarının kullanılması ve bu formun çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına, 3-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine, 4-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 ilişki		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 ☐	
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	U.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.M.Sertaç YILMAZ Üye	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	U.Ü.T.F. Halk Sağlığı AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doktor Öğretim Üyesi Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk	U.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	U.Ü.T.F. Biyofizik AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER Kafa Üye	Tıp Tarihi ve Etik	U.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Selen MİĞAL Üye	Sağlık merkezi mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* Toplantıda Bulunma

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini her zaman üzerimde hissettiğim, gerek bilimsel bilgi birikimi gerekse hayat tecrübesi ile her zaman bana yol gösterici olan, immünoloji hayatımın bu ilk aşamasında kendimi şanslı hissettiren, öğrencisi olmaktan büyük onur ve kıvanç duyduğum danışmanım Sayın Prof. Dr. H. Barbaros ORAL’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İmmünoloji serüvenimde beni nötrofillerle tanıştıran, tez konumun belirlenmesinde, hayata geçmesinde bilgi birikimi ile yol gösteren, maddi ve manevi tüm desteğini esirgemeyen, akademik yaşamım boyunca her zaman örnek alacağım ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Sayın Dr. Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerimizden Sayın Prof. Dr. Ferah BUDAK’a akademik hayatımdaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca gece gündüz demeden benimle çalışan, desteklerini hiçbir zaman unutmayacağım sevgili arkadaşlarım Onur ETGÜ ile Mehmet KARAÇAY’a ve tüm İmmünoloji Anabilim Dalı’ndaki arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Bana her zaman güvendiğini bildiğim, sol yanımdan hiç ayırmadığım, bu tezi en çok görmesini istediğim ve bu tezi büyük bir gururla ona ithaf ettiğim canım babam Yahya DOMBAZ’a sonsuz teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde sevgisini, emeğini, güvenini eksik etmeyen, tek başına tüm zorlukları göğüsleyen, başarımın en büyük destekçisi canım annem Sultan DOMBAZ’a sonsuz teşekkür ederim.

Her koşulda desteklerini, sevgilerini, güvenlerini esirgemeyen canım ablam Duygu ÇAKMAK ve canım abim Yahya DOMBAZ ile ailemizin neşe kaynakları Ekim ve Toprak’a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında yanımda olduğu gibi bu akademik yolculuğumda da sevgisini, güvenini, desteğini hep yanımda hissettiğim canım sevgilim Bilal ÖZBEY’e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda maddi katkıda bulunan TÜBİTAK’a (Proje No:120S653 Proje Adı: “COVID-19 Pozitif Hastalarda Miyeloid Hücre Alt-gruplarındaki Değişimlerin Efektif Anti-viral İmmün Yanıt Üzerine Etkileri ve Biyobelirteç Olarak Kullanımı”) sonsuz teşekkür ederim.

Fatma DOMBAZ
01/01/2022

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma DOMBAZ
Doğum Yeri ve Tarihi :
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2014-2018)
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıp-İmmünoloji Anabilim Dalı (2019-Halen)
İletişim (e-posta) :
Adres :

Burslar ve Ödüller

En iyi poster ödülü (2020) COVID19 Enfeksiyonlarında Regülatör B (Breg) Hücrelerinin Ve B Hücre Bitkinliğinin (Exhaustion) Rolünün Değerlendirilmesi. Budak F., Cagan E., Kızmaz M.A., Simsek A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Demir H.I., Ediger D., Yılmaz E., Oral H.B., Akalın E.H., XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye

Projeler

Diğdem Yöyen-Ermiş, Haluk Barbaros Oral, Ferah Budak, Emin Halis Akalın, Salih Haldun Bal, Ali Asan, Eren Çağan. “COVID-19 Pozitif Hastalarda Miyeloid Hücre Alt-Gruplarındaki Değişimlerin Efektif Anti-Viral İmmün Yanıt Üzerine Etkileri Ve Biyobelirteç Olarak Kullanımı” TUBİTAK 1001 (01.09.2020-01.06.2021 Tarihleri arasında proje bursiyeri olarak görev aldım)

Yayınlar

Simsek, A., Kızmaz, M.A., Cagan, E., Dombaz, F., Tezcan, G., Asan, A., ve ark., Budak, F. (2022), Assessment of CD39 expression in regulatory T cell subsets by disease severity in adult and juvenile COVID -19 cases. J Med Virol. Accepted Author Manuscript. <https://doi.org/10.1002/jmv.27593>

Ulusal Kongre-Sözlü Sunum

Yoyen-Ermis D., Dombaz F., Karacay M., Ertü O., Cagan E., Asan A., Kızmaz M.A., Simsek A., Karaca M., Arslan G., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., Çocuk ve Erişkin COVID-19 Pozitif Hastalarda Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre (MDSC) Kompozisyonunun Fenotipik ve Fonksiyonel Farklılıklarının Hastalık Seyri ile İlişkisi. XII. Aziz Sancar DETAE Günleri 10-11 Aralık 2020, Türkiye.

Yoyen-Ermis D., Dombaz F., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Karacay M., Ertü O., Karaca M., Arslan G., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., Covid-19 Pozitif Hastalarda Matür Monosit ve/veya Nötrofil Alt-Tipleri Ve İmmatür PMN-MDSC, M-MDSC ve/veya E-MDSC-Benzeri Alt-Gruplarının İncelenmesi ve Hastalık Düzeyi İle Değişimlerin Değerlendirilmesi. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım 2020, Türkiye.

Uluslararası Kongre-Sözlü Sunum

Yoyen-Ermis D., Dombaz F., Karacay M., Ertü O., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Yılmaz E., Kazak E., Pınar İ.E., Bal S.H., Arslan G., Karaca M., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., The distribution of mature and/or immature myeloid cells and their role in effective anti-viral immune responses in COVID-19 positive patients. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Cagan E., Simsek A., Kızmaz M.A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Gorek-Dilektaslı A., Kazak E., Akalın E.H., Oral H.B., Budak F., Peripheral CD39-expressing regulatory T cell subsets play an age-dependent role in the severity of COVID-19. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Ulusal Kongre-Poster Sunum

Kızmaz M.A., Cagan E., Simsek A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Coskun N.F., Akalın E.H., Oral H.B., Budak F., Sitotoksik T Lenfosit Alt Gruplarının COVID19 Hastalık Şiddeti İle İlişkisi XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Simsek A., Cagan E., Kızmaz M.A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Demirdögen E., Heper Y., Akalın E.H., Oral H.B., Budak F., COVID-19 İmmünopatogenezinde Th22, Tc22 Ve Tc17 Hücrelerinin Önemi. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Cagan E., Simsek A., Kızmaz M.A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Gorek-Dilektaslı A., Kazak E., Akalın E.H., Oral H.B., Budak F., CD39 Ekspresyon Eden T Regülatör (TREG) Hücrelerinin, COVID-19 İmmünopatogenezindeki Rolü. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Budak F., Cagan E., Kızmaz M.A., Simsek A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Demir H.I., Ediger D., Yılmaz E., Oral H.B., Akalın E.H., COVID19 Enfeksiyonlarında Regülatör B (Breg) Hücrelerinin Ve B Hücre Bitkinliğinin (Exhaustion) Rolünün Değerlendirilmesi. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Karaca M., Simsek A., Ertü O., Dombaz F., Macuncuoğlu A.C., Dirican M., Budak F., Oral H.B., Ortalama Floresan Yoğunluğu Yüksek Olan Negatif PRA Testi

Sonuçlarının Karaciğer İle İlişkisinin Değerlendirilmesi XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Yoyen-Ermis D., Karacay M., Eteü O., Karaca M., Arslan G., Dombaz F., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., COVID-19 Pozitif Hastalardaki Granülositik-Benzeri Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücrelerin (PMN-MKBH) Baskılama Kapasite Farklılıklarının Araştırılması XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Yoyen-Ermis D., Arslan G., Karacay M., Karaca M., Dombaz F., Eteü O., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., COVID-19 Pozitif Hastaların Farklı Yaş Grubu Dağılımındaki Hücre Proliferasyonlarının Değerlendirilmesi. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Yoyen-Ermis D., Eteü O., Dombaz F., Karacay M., Pınar İ.E., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Karaca M., Arslan G., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., SARS-COV2 İlişkili İmmün Yanıtta Periferik Kan Miyeloid Seri Hücrelerinin Olgunlaşma Düzeyleri, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Nitrik Oksit (NO) Üretme Kapasitesi. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Uluslararası Kongre-Poster Sunum

Dombaz F., Karacay M., Eteü O., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Budak F., Oral H.B., Yoyen-Ermis D., Phenotypes and Functions of Low(er)-Density Neutrophils (LDNs) in Early Childhood and Children. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Eteü O., Karacay M., Dombaz F., Kızmaz M.A., Simsek A., Asan A., Yılmaz E., Kazak E., Pınar İ.E., Bal S.H., V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., Yoyen-Ermis D., Macrophage Polarization Capacity of Peripheral Blood Monocytes and Monocytic Cell Line THP-1 in Response to Secreted Factors From COVID-19 Patients. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Simsek A., Cagan E., Kızmaz M.A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Demirdogen E., Heper Y., Akalın E.H., Oral H.B., Budak F., The age-dependent role of Th22, Tc22, and Tc17 cells in the severity of pneumonia in COVID-19 immunopathogenesis. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Kızmaz M.A., Cagan E., Simsek A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Coskun N.M., Akalın E.H., Oral H.B., Budak F., Association of cytotoxic T lymphocyte subsets with disease severity in COVID-19. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Budak F., Cagan E., Kızmaz M.A., Simsek A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Bal S.H., Yoyen-Ermis D., Demir H.I., Ediger D., Yılmaz E., Oral H.B., Akalın E.H., Evaluation of the roles of regulatory B (Breg) cells and B cell exhaustion in COVID-19. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Arslan G., Karacay M., Guvenc-Bayram G., Ozoglu E., Dombaz F., Etgu O., Yumusak E., Yoyen-Ermis D., Akkoc A., Yalcın M., Oral H.B., Evaluation of Some Blood Parameters and Percentage of CD4+ or CD8+ T Cells from Spleen and Liver from The Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Karacay M., Arslan G., Guvenc-Bayram G., Dombaz F., Etgu O., Yumusak E., Yoyen-Ermis D., Akkoc A., Yalcın M., Oral H.B., Evaluation of Monocytic/Granulocytic Cells from Spleen and Liver in The Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. 6th European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.