MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aşılı ve Aşısız COVID-19 Hastalarının İmmünolojik Parametreler Açısından Kıyaslanması

ZEYNEP TUNCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

İSTANBUL, 2023

MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES

IN PURE AND APPLIED SCIENCES

Comparison of Vaccinated and Unvaccinated COVID-19 Patients in terms of Immunological Parameters

ZEYNEP TUNCA

MASTER THESIS
The Departman of Biology

Thesis Supervisor
Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

ISTANBUL, 2023

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans 'Aşılı ve Aşısız COVID-19 Hastalarının İmmünolojik Parametreler Açısından Kıyaslanması' başlıklı tez çalışması, 20.07.2023 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Tunç AKKOÇ (Danışman)
Marmara Üniversitesi (İMZA)

Prof. Dr. Ahmet Oğuzhan ÖZEN (Üye)
Marmara Üniversitesi (İMZA)

Prof. Dr. Esin Çetin Aktaş (Üye)
İstanbul Üniversitesi (İMZA)

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../2023 tarih ve ..... sayılı kararı ile Zeynep TUNCA'nın Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ

MARMARA UNIVERSITY

INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES IN PURE AND APPLIED SCIENCES

Zeynep TUNCA, a Master of Sciencestudent of Marmara University Institute for Graduate Studies in Pure and Applied Sciences, defended her thesis entitled "**Comparison of Vaccinated and Unvaccinated COVID-19 Patients in terms of Immunological Parameters**", on 20.07.2023 and has been found to be satisfactory by the jury members.

Jury Members

Prof.Dr. Tunç AKKOÇ (Advisor)
Marmara University (SIGN)

Prof. Dr. Ahmet Oğuzhan ÖZEN (Jury Member)
Marmara University (SIGN)

Prof. Dr. Esin Çetin Aktaş (Jury Member)
İstanbul University (SIGN)

APPROVAL

Marmara University Institute for Graduate Studies in Pure and Applied Sciences Executive Committee approves that Zeynep TUNCA be granted the degree of Master of Science in Department of Biology, Biology Program on ....., 2023. (Resolution no: .....).

Director of the Institute Prof. Dr.

Bülent EKİCİ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ/INTRODUCTION.....1
1.1 GENEL BİLGİLER.....3
1.1.1 İmmün Sistem.....3
1.1.2 Doğal İmmün Sistem.....3
1.1.2.1 Epitel Bariyer.....4
1.1.2.2 Fagosit Hücreler.....5
1.1.2.3 Dentritik Hücreler.....5
1.1.2.4 Mast Hücreleri.....6
1.1.2.5 Doğal Öldürücü Hücreler (NK).....6
1.1.2.6 Sitokinler.....7
1.1.2.7. Kompleman Sistemi.....8
1.1.3. Edinsel İmmün Sistem.....9
1.1.3.1 Hümoral İmmünite.....9
1.1.3.2 Hücresel İmmünite.....10
1.1.4 Koronavirüsler ve Genel Özellikleri.....11
1.5 COVİD-19 İmmünolojisi.....13
1.5.1 COVID-19'da Doğal Bağışıklık.....13
1.5.3 COVID-19'da Aktif ve Pasif Bağışıklık.....17
1.5.3.1 COVID-19 'da pasif konvalesan plasma.....17
1.5.3.2 COVİD-19 Aşıları.....18
2.GEREÇ ve YÖNTEM.....21
2.1 Çalışma Planının Özeti.....21
2.2 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar.....22
2.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri ve Cihazlar.....23
2.4 Kullanılan solüsyonların hazırlanması.....24
2.5 Çalışma Planı.....25
2.5.1 COVİD-19 Hastalarının Belirlenmesi ve Periferal Kan Örneklerinin Alınması.....25
2.5.2 COVİD-19 hastalarının çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri.....26
2.5.3 Periferal Kan Örneklerden Tam Kan İmmünfenotip Markerları ile Boyanması.....26
2.5.4 PKMH İzolasyonu.....27
2.5.5 Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi.....28
2.5.6 Lenfositlerin Treg Analizi için Ko-Kültürünün yapılması.....29
2.5.7 İstatiksel Analiz.....30
3. BULGULAR.....30

3.1 Klinik Bulgular 30
3.2 Tam Kan İmmünfenotipleme Bulguları 32
3.2.1 T hücre alt grupları ile ilgili bulgular 33
3.2.1.1 Aşılı COVID-19 PCR+ hastalarında Sitotoksik Bellek T hücre oranı yüksek bulundu 33
3.2.2 Doğal öldürücü (NK) ile ilgili bulgular 37
3.2.3 B lenfositleri ile ilgili bulgular 39
3.3 Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarında lenfosit proliferasyonuna ait bulgular ...41
3.4 Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarında CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücre oranını ve CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücrelerine ait bulgular ..44
4.TARTIŞMA VE SONUÇ 48
KAYNAKLAR/REFERENCES 52

ÖZET

AŞILI VE AŞISIZ COVID-19 HASTALARININ İMMÜNOLOJİK PARAMETRELER AÇISINDAN KIYASLANMASI

Öğrencinin Adı: Zeynep TUNCA
Danışmanı: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ
Anabilim Dalı: Biyoloji

Amaç: Bu çalışmada mRNA aşısı olmuş ve olmamış PCR pozitif COVID-19 hastalarından alınan periferal kandan immünfenotipleme analizi ve periferal kandan elde edilen mononükleer hücrelerin immünolojik etkinliğinin *in vitro* ortamda araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesine başvuran 29 PCR pozitif COVID-19 hastası (16 aşısız ve 13 aşılı) çalışmaya dahil edilmiştir. COVID-19 hastalarından EDTA'lı tüpler ile alınan periferik kandan immünfenotipleme analizi için; CD3 ,CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CD16+56, CD3+CD16+56 ve CD19 yüzey markerları akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir (n=29).COVID-19 hastalarından heparinli tüpler ile alınan periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir.Mononükleer hücreler uyarılmadan, CD-mix ve peptivatör ile uyarılarak kültür edilmiştir. Kültür edilen mononükleer hücrelerden proliferasyon ve regülatör T hücre analizi yapılmıştır.

Bulgular ve sonuçlar:Aşılı COVID-19 hastalarında CD8+CD45RO+, CD16+56, CD3+CD16+56 ve CD19+ hücreleri aşısız gruba göre istatiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur($p<0.05$). Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarının US, CD-mix, Peptivatör ile uyarımı sonrasında lenfosit proliferasyonunda aşılı COVID-19 hastalarında CD-mix uyarımlı hücreler istatiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarınında regülatör T hücreleri açısından gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından TYL-2022-10586 No'lu proje ile desteklenmiştir.

Anahtar Sözcükler: COVID-19, T lenfosit, proliferasyon, regülatör T hücresi

COMPARISON OF VACCINATED AND UNVACCINATED COVID-19 PATIENTS IN TERMS OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS

Student's Name: Zeynep Tunca
Advisor: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ
The Department: The Department of Biology

Objective: The aim of this study was to investigate the immunophenotyping analysis of peripheral blood obtained from PCR-positive COVID-19 patients with and without mRNA vaccination and to investigate the immunologic activity of mononuclear cells obtained from peripheral blood in vitro.

Materials and methods: A total of 29 PCR positive COVID-19 patients (16 unvaccinated and 13 vaccinated) admitted to Marmara University Pendik Training and Research Hospital were included in the study. For immunophenotyping analysis, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CD16+56, CD3+CD16+56 and CD19 surface markers were analyzed by flow cytometry in peripheral blood collected from COVID-19 patients with EDTA tubes (n=29). Mononuclear cells were isolated from peripheral blood obtained from COVID-19 patients with heparinized tubes. Mononuclear cells were cultured without stimulation or stimulated with CD-mix and peptivator. Proliferation and regulatory T cell analysis were performed from cultured mononuclear cells.

Results and conclusions:CD8+CD45RO+, CD16+56, CD3+CD16+56 and CD19+ cells were statistically significantly higher in vaccinated COVID-19 patients compared to the unvaccinated group ($p<0.05$). In lymphocyte proliferation after stimulation of vaccinated and unvaccinated COVID-19 patients with US, CD-mix and Peptivator, CD-mix stimulated cells were statistically significantly higher in vaccinated COVID-19 patients ($p<0.05$). There was no statistically significant difference between the groups in terms of regulatory T cells in vaccinated and unvaccinated COVID-19 patients.

This study was supported by Marmara University BAP Commission with project number TYL-2022-10586.

Keywords: COVID-19, T lymphocyte, proliferation, regulatory T cell

KISALTMALAR/ABBREVIATIONS

ACE2 :Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2

ARDS :Akut solunum sıkıntısı sendromu

CFSE :Karboksifloresan süksinimidil ester

CoV :Koronavirüs

COVID-19 :Koronavirüs Hastalığı

DAMPs :Hasar ilişkili moleküler örgüler

DC :Dentritik Hücre

DSO :Dünya Sağlık Örgütü

IFN :İnterferon

IL :İnterlökin

MALT :Mukozayla ilişkili lenfoid dokular

MHC :Majör Histokompabilite Kompleksi

NK :Doğal Öldürücü hücreler

NLR :NOD-benzeri reseptör

PAMPs :Patojen ilişkili moleküler örgüler

PKMH :Periferal Kandan Mononükleer hücre

RIGI :Retinoik asitle indüklenebilir gen-I benzeri reseptörler

PRR :Pattern recognition receptors

SARS-CoV-2 :Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirüs 2

Th :T yardımcı hücre

TNF :Tümör Nekrozis Faktör

ŞEKİL

Sayfa no.

Şekil 1.1: Koronavirüslerin yapısal organizasyonunun şematik gösterimi…….12

Şekil 1.2: İnsan koronavirüslerin sınıflandırılması …….13

Şekil 3.1: Lenfosit kapılama stratejisi ve $CD3^{+}$, yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri, naive ve bellek T hücrelerinin oranları……37

Şekil 3.2. Lenfosit kapılama stratejisi ve NK, NKT hücrelerinin oranı……...40

Şekil 3.3. Lenfosit kapılama stratejisi ve B Lenfositlerinin oranı……..60

Şekil 3.4: Aşılı ve aşısız PCR+ hastalarına ait PKMH'lerin proliferasyonu…….63

Şekil 3.5. Aşılı ve aşısız PCR+ hastalarına ait CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücresi ve CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücre oranları. …….67

TABLO LİSTESİ/LIST OF TABLES

Sayfa No.

Tablo 1.1: Doğal İmmün sistemin başlıca sitokinlerinin bazı önemli özellikleri……8

Tablo 1.2: Farklı SARS-CoV-2 aşılarının etkinliği ve bağışıklık tepkisi……..19

Tablo 3.1: Aşısız PCR + hastaların klinik bulguları ..……32

Tablo 3.2: Aşılı PCR + hastaların klinik bulguları ……33

Tablo 3.3: Lenfosit alt grupları ve yüzey işaretleri ……..34

Tablo 3.4: Aşılı ve Aşısız PCR + COVID-19 hastalarının T hücresi alt gruplarının hücre yüzdeleri …….....37

Tablo 3.5: Aşılı ve Aşısız COVID-19 hastalarının NK ve NKT hücre yüzdeleri …….39

Tablo 3.6: Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarının B lenfositlerinin yüzdelerin ..……...41

Tablo 3.7: Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarının mononükleer hücrelerinin proliferasyon oranları …….45

...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde beni her zaman yüreklendiren, kendimi geliştirmemde yapıcı eleştirileri ile bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan çok gurur duyduğum kıymetli danışmanım sayın Prof. Dr. Tunç AKKOÇ'a verdiği destekler için en içten duygularımla teşekkür ederim.

Çalışmalarımız süresince desteğini ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. üyesi Mehmet Burak AKSU'ya, hasta seçimimini itinayla yapan ve çalışmamızda büyük emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Emel ERYÜKSEL'e, Doç.Dr. Derya KOCAKAYA'ya ve Dr. Caner ÇINAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımız süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Oguzhan ÖZEN'e ve akım sitometri cihazını öğrenmemde büyük desteği olan sevgili Dilek BAŞER'e ve Gamze AKGÜN'e teşekkür ederim.

Akım sitometri analizini öğrenme sürecinde desteğini ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Esin ÇETİN'e, çalışmamızın istatiksel analiz kısmında yardımcı olan sevgili hocam Prof. Dr. Esra AKDENİZ'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuyu birlikte ele aldığımız, her engeli birlikte aştığımız ve çalışmama büyük destek veren arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Senem KILIÇ'a, zamanını ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Elif SÜEL'e çok teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili annem Şerife TUNCA ve kardeşim Bekir TUNCA'ya destekleri için çok teşekkür ediyorum.

1. GİRİŞ/INTRODUCTION

Tarih boyunca pek çok bulaşıcı hastalık büyük çaplı salgınlara neden olmuş dünya üzerinde milyonlarca insanın ölmesine yol açmıştır. İnsanlık mikroorganizmalarla ortak yaşamı boyunca Sıtma, Tüberküloz, Veba, Çiçek, Kolera, Lepra, Tifüs, Difteri, Sarı humma, Frengi ve çeşitli varyasyonlarla tekrarlayan Grip hastalıkları başta olmak üzere pek çok hastalıkla karşılaşmış, bu hastalıkları açıklama modelleri ve mücadele yöntemleri geliştirmeye çalışmıştır. Koronavirüs hastalığı (COVID-19) Çin'in Wuhan şehri sağlık birimleri ve Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından, nedeni bilinmeyen pnömoni bildirimlerinin yapıldığı Aralık 2019'dan günümüze hızla yayılmıştır. SARS-CoV-2 kaynaklı (Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirüs 2) Koronavirüs Hastalığı, Dünya sağlık örgütü tarafından yayılma hızı ve ölüm oranı nedeniyle 11 Mart 2020'de pandemi olarak ilan edilmiştir (Ursavaş ve Akalın, 2021).

Koronavirüsler (CoV) tek iplikli, pozitif polariteli RNA yapısında genoma sahip olup çapı 90–120 nm olan, zarflı virüslerdir (Ursavaş ve Akalın, 2021). Virüs zarı dört yapısal bileşen olan; başak (S), zarf (E), zar (M) ve nükleokapsid (N) proteinini içerir. S proteini virüsün konağa tutunup anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye bağlanarak hücre içerisine girmesinde önemli rol oynar. COVID-19 hastalarında enfeksiyon sürecinde yorgunluk, ateş, kuru ve nefes darlığı, burun tıkanıklığı veya akıntısı, baş ağrısı, boğaz ağrısı görüldüğü bildirilmiştir (Gülüm ve ark., 2021).

Doğal immün sistem patojene karşı özgüllük göstermeyen ve uyarıdan dakikalar sonra harekete geçen bir tür erken savunma sistemidir ve COVID-19'da savunmanın ilk adımında önemli rol oynamaktadır. Doğal immün sistem savunmasında: makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler (DC) ve NK hücreleri gibi hücresel elementler, sitokinler, kemokinler gibi çözünmüş moleküller, C reaktif protein gibi akut faz proteinleri ve komplemanlar önemli rol oynamaktadır (Gülüm ve ark., 2021).

Edinsel immün sistem ise patojene spesifiktir ve belirli bir hazırlık evresi gerektirmektedir (Gülüm ve ark., 2021).Viral enfeksiyon ve hastalıklardan korunmada

kilit rol alan edinsel immün sistemin yapı taşları T lenfositleri; CD4+ T-Helper (Th) ve CD8+ sitotoksik T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerdir (Merad ve ark., 2022). Edinsel immün sistemin kilit rolü göz önüne alındığında humoral antikor (Ab) ve hücre aracılı bağışıklık çalışmaları, bağışıklık temelli tedaviler geliştirmek ve aşı tasarımı ve uygulamasını optimize etmek amacıyla bilim dünyası tarafından araştırılmaya devam edilmektedir.

Biz bu çalışma ile Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesine başvuran aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarının venöz periferal kanından immünfenotip, proliferasyon, regülatör T hücre düzeyi gibi analizler ile iki hasta grubu arasında immünolojik farklılıkları araştırmayı amaçladık.

Bu amaç doğrultusunda mRNA aşısı olmuş ve olmamış Covid 19 hastalarında immun parametreler çerçevesinde farklılıklar ile ilgili bize fikir vermiş olacaktır, çalışmamızın sonuçlarının literatüre önemli katkıda bulunmasını temenni ediyoruz.

1.1 GENEL BİLGİLER

1.1.1 İmmün Sistem

İmmünite, biyolojik bağlamda tarihsel açıdan patojenlere karşı direnç olarak tanımlanır; zarar vermeyen çevresel moleküller, tümörler ve hatta değişime uğramamış konak yapı taşlarını kapsayan bazı enfeksiyon yapmayan maddelere karşı tepkilerin de bağışıklığın biçimleri olduğu düşünülmektedir. (Abbas ve ark., 2022).

İmmün sistem, mikrop kaynaklı olan veya mikrop kaynaklı olmayan maddelere karşı yanıt verebildiği ve bazı koşullar altında hastalığa neden olabildiği için, immün yanıtın daha kapsayıcı tanımı, tepkinin fizyolojik veya patolojik sonuçlarına bakmaksızın, mikroplara olduğu gibi yabancı olarak tanınan diğer moleküllere de verilen tepkidir. (Abbas ve ark., 2022).

1.1.2 Doğal İmmün Sistem

Mikroorganizmaları ve ölü hücreleri tanıyan ve yıkıma uğratan mekanizmalar, ilk kez omurgasızlarda daha sonra omurgalılarda ortaya çıkmıştır ve varlığını daima sürdürerek organizmada işlev görmektedir. Bu nedenle, bu tip konak savunması doğal bağışıklık ya da doğuştan bağışıklık veya doğal direnç olarak bilinmektedir. Doğal bağışıklıkta görev alan hücreler ve moleküllerin tümü **doğal immün sistemi** oluşturmaktadır (Abbas ve ark., 2022).

Doğal immün sistemin, başlıca iki önemli tepkimesi, inflamasyon ve antiviral savunmadır. İnflamasyon, enfeksiyon veya doku hasarının oluştuğu bölgede lökositlerin ve plazma proteinlerinin yığılması ve etkinleşmelerinden ibarettir bu hücreler ve proteinlerle, temel olarak hücre dışı mikroorganizmaların öldürülmesini ve zedelenmiş dokuların yok edilmesini sağlarlar. Hücre içi virüslere karşı doğal immün yanıt, enflamasyon olmasa dahi, virüs ile enfekte hücreleri öldüren doğal öldürücü hücreler ve konak hücrede viral çoğalmayı engelleyen tip I interferon (IFN) denilen sitokinler aracılığı ile gerçekleşir. Doğal immün sistem sağlıklı hücrelere karşı tepki göstermezken

mikrobiyal yapılar için özgül yanıt verecek şekilde evrimleşmişlerdir (Abbas ve ark., 2022).

Doğal immün sistem bir enfeksiyon etkenine ya da genel olarak vücuda yabancı moleküle daha önce hiç karşılaşmamış olsa bile hemen tanır, dakikalar veya saatler içinde ilk tepkiyi verir. Tüm bu işlevler etkene özgü değildir, hafızası da yoktur. Yani o yabancı molekül veya mikropla daha önce karşılaşılmış da olsa doğal bağışıklığın tepkimeleri değişmez (Diniz ve ark., 2022).

Doğal bağışıklığın en önemli komponentlerinden biri de vücuda yabancı olanın tanınmasıdır. Bu tanıma reseptörler aracılığı ile gerçekleşir (Diniz ve ark., 2022).

Doğal bağışıklığı uyaran mikrobiyal moleküllere, patojenler üzerinde yer aldıkları ve aynı tip mikroorganizmalar tarafından ortak paylaşıldıkları için patojen ilişkili moleküler örgüler (pathogen-associated molecular patterns/PAMPs) adı verilir. Bu ortak paylaşılan mikrobiyal yapıları tanıyan doğal bağışıklık reseptörlerine ise örgü tanıyan reseptörler (pattern recognition receptors-PRR) mikrobiyolojik patojenler veya hücresel strese bağlı oluşan molekülleri tanımak için immün sistem tarafından üretilirler (Abbas ve ark., 2022).

Doğal immün sistem, hasar görmüş ya da nekroze olmuş konak hücreleriden salgılanan molekülleri de tanırlar Bu moleküllere hasar ilişkili moleküler örgüler(damage-associated molecular patterns/DAMPs) adı verilir (Abbas ve ark., 2022).

Doğal immün sistemin yapıtaşları doğal öldürücü (natural killer) hücreler ile makrofajlar, monositler ve nötrofiller gibi fagositoz yeteneği olan hücrelerdir (Diniz ve ark., 2022).

1.1.2.1 Epitel Bariyer

İnsan vücudu ile dış çevre arasında deri, sindirim sistemi, solunum sistemi ve genitoüriner sistem enfeksiyonlara karşı fiziksel ve kimyasal engeli oluşturan epitel hücrelerinden oluşan tabaka tarafından korunmaktadır. Deri yüzeyindeki keratin ve mukozal epitel hücrelerden salınan, mukus mikroorganizmanın söz konusu bölgeler ile etkileşimini,

enfekte etmesini ve epitelden vücuda girmesini engeller. Epitel hücreleri, bakteri ve bazı virüslerin dış membranlarını parçalayarak onları öldüren defensinler ve katelisinler gibi antimikrobiyal peptidleri oluştururlar (Abbas ve ark., 2022).

1.1.2.2 Fagosit Hücreler

Dolaşımdaki fagositik hücrelerden ikisi, nötrofiller ve monositler, enfeksiyon bölgesine giderek orada mikroorganizmaları tanır ve içlerine alarak hücre içi yıkım işini gerçekleştirirler.

Nötrofil üretimi, enfeksiyona yanıt olarak birçok hücre türü tarafından üretilen, kemik iliğinde nötrofil öncüllerinin çoğalma ve olgunlaşmalarında rol oynayan ve koloni uyarıcı faktörler olarak isimlendirilen sitokinler ile uyarılır.

Nötrofiller, bakteri ve mantar enfeksiyonları başta olmak üzere, birçok enfekisyona karşı ilk yanıtı veren çok sayıdaki hücrelerdir ve akut inflamasyonda rol oynar. Nötrofiller, dolaşımdaki mikroorganizmaları yutup yok ederler ve damar dışına çıkıp süratle enfeksiyon odağının bulunduğu dokuya doğru yönelerek, oradaki mikroorganizmaları yutup ortadan kaldırırlar (Abbas ve ark., 2022).

Monositler, kanda nötrofillere oranla daha az sayıda, ul'de 500 ile 1000 arasında bulunur. Bu hücreler dolaşımdaki ve dokulardaki mikroorganizmaları yutup yıkıma uğratırlar. Nötrofillerden farklı olarak, monositler inflamasyon sırasında damar dışı dokulara girip, orada farklılaşarak makrofaj adını alırlar ve dokuda uzun süre yaşarlar (Abbas ve ark., 2022). Makrofajlar konak savunmasında bazı önemli rolleri üstlenmişlerdir: mikroorganizmaları yutup sindirirler, ölü dokuları temizler ve doku onarım sürecini başlatırlar ve inflamasyonu tetikleyen ve düzenleyen sitokinleri üretirler (Abbas ve ark., 2022).

1.1.2.3 Dentritik Hücreler

Dendritik hücreler, dokularda merkezi işlev görmektedir, mikroorganizmalara karşı, iki farklı işleve hizmet eden çeşitli sitokinler üreterek yanıt verirler, enflamasyonu başlatırlar ve edinsel immün yanıtı uyarırlar. Protein yapısındaki antijenleri yakalayarak, bu antijenleri parçalara ayırıp T hücrelerine sunarlar. Mikroorganizmaları algılayan ve başta

T hücreleri olmak üzere lenfositlerle işbirliği yapan dendritik hücreler, doğal ve edinsel yanıt arasında köprü rolü üstlenirler (Abbas ve ark., 2022).

1.1.2.4 Mast Hücreleri

Kemik iliği kökenli ve çok miktarda sitoplazmik granül taşıyan bu hücreler deride ve mukozal engellerde bol miktarda bulunur. Mast hücreleri, TLR'lere bağlanan mikroorganizma ürünleri ile ya da kompleman yapıtaşı aracılığı ile doğal bağışıklık kapsamında veya antikora bağımlı yoldan edinsel immün sistemde etkileşirler. Mast hücre granülleri, vazodilatasyona neden olan ve kapiler geçirgenliğini artıran histamin gibi vazoaktif aminler ya da bakterileri öldüren ve mikrobiyal toksinleri etkisiz bırakan proteolitik enzimler içerirler. Mast hücreleri, enflamasyonu uyaran lipid mediatörleri ve sitokinleri de üretir ve salgılarlar (Abbas ve ark., 2022).

1.1.2.5 Doğal Öldürücü Hücreler (NK)

1970'lerin başında keşfedilen doğal öldürücü hücreler, kemik iliği kökenli, lenfoid öncü hücrelerinden (progenitörlerden) farklılaşan büyük granüler lenfositlerdir (Kiessling ve ark., 1975). Doğal immün sistem ve edinsel immün sistem arasında köprü görevi görme kapasitelerine sahiptirler (Alter ve Altfeld, 2006) NK hücreleri , virüsle enfekte ve kanserli hücreleri tanıma ve bu hücrelere karşı sitotoksisiteleri ve makrofajları etkin kılan sitokin, IFN-γ salgılama yetenekleri ile bilinirler(Sivori, ve ark., 2019). NK hücreleri, kanda ve periferik lenfoid organlarda lenfositlerin %10'unu oluşturur. Yoğun sitoplazmik granüllere sahip olan NK'lar kendilerine özgü yüzey antijenlerine sahiptirler, ancak immünoglobülin veya T hücre reseptörü gibi B ve T hücrelerine özgü antijen reseptörlerini taşımazlar (Abbas ve ark., 2022). Çalışmalar dolaşımdaki NK hücrelerinin farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönüşebileceğini ve farklı enflamatuvar özellikler kazanabileceğini desteklemektedir. CD3 antijenini eksprese etmeyen NK hücrelerine karşılık, CD3 antijenini ve NK hücrelerinde bulunan reseptörlerin çoğunu eksprese eden hücreler 'NKT hücreleri' olarak adlandırılmaktadır (Deniz, 2007)

NK hücrelerini etkileyen sitokinlerden üçü: interlökin-15, tip I IFN'lar ve interlökin-12'dir. NK hücrelerinin gelişiminde ve olgunlaşmalarında IL-15 rol oynar, tip I IFN'lar ve IL-12 ise NK hücrelerinin sitotoksisite yeteneğini güçlendirir. NK hücrelerinin aktivasyonu, aktive ve inhibe eden reseptörlerin etkileşimi arasındaki dengeye bağlıdır. NK hücrelerini etkinleştiren reseptörler, virüsler ve hücre içi bakteriler ile enfekte olan hücreleri, DNA hasarı ile stres oluşan hücrelerin yüzeyinde bulunan tipik yüzey moleküllerini tanırlar.

Etkinleştiren reseptörler, hücre içi mikroorganizmalar ile enfekte hücreleri, onarılamayacak biçimde hasara uğramış hücreleri ve tümör hücrelerini yıkıma uğratmaları için NK hücrelerini aktive ederler. En iyi tanımlanmış NK hücre etkinleştiren reseptörlerden biri NK2D'dir; birçok hücresel stres mekanizmalarına yanıt olarak hücre yüzeyinde bulunan MHC I benzeri molekülleri tanırlar. Bir diğer reseptör CD16, hücrelere bağlı immunoglobulin G-IgG antikorlarına özgüldür. NK hücrelerinin rol aldığı antikora bağımlı hücresel sitotoksisite, antikor ile kaplanmış hücrelerin tanınması sonucunda bu hücrelerin ölümü ile gerçekleşir.

NK hücrelerinin inhibitör reseptörleri, aktivatör reseptörlerin sinyal iletimini durdurur ve sağlıklı hücrelerin yüzeyinde sergilenen öz sınıf I MHC molekülleri için özgündür bu mekanizma sağlıklı hücreleri NK hücrelerinin saldırısından korur (Abbas ve ark., 2022).

1.1.2.6 Sitokinler

Doğal immün sistemin hücresel tepkilerini yönlendiren sitokinleri, mikroorganizmalara yanıt olarak dendritik hücreler, makrofajlar, mast hücreleri ve diğer hücreler salgılarlar. Sitokinler bağışıklık yanıtı ile enflamasyonu düzenleyen ve lökositlerin birbiriyle ve diğer hücreler ile iletişiminde rol alan çözünmüş proteinlerdir.

Doğal bağışıklıkta, sitokinlerin başlıca üretim kaynakları mikroorganizmalar tarafından uyarılan dendritik hücreler, makrofajlar ve mast hücreleridir ayrıca epitel hücreleri ve diğer farklı hücre tipleri de sitokinler üretebilir. Edinsel bağışıklıkta ise sitokinlerin

başlıca üretim kaynağı yardımcı T lenfositleridir. Dışarıdan gelen uyarılar sonucunda küçük miktarlarda üretilen sitokinler hedef hücrelerin yüzeyindeki yüksek afiniteye sahip reseptörlere bağlanırlar. Sitokinlerin bazıları komşu hücreleri etkileyerek; parakrin etki özelliğini sergiler bazıları üretildiği hücre üzerine etki göstererek; otokrin etkiye sahiptir. Enfeksiyona karşı tepki veren doğal bağışıklık sürecinde bol miktarda sitokin üretimi sağlayacak yeterli sayıda dendritik hücre ve makrofaj uyarısı gerçekleşebilir ve böylece salgılandıkları yerden uzak bölgelerde etkileri görülebilir bu da endokrin etkiye örnek gösterilebilir (Abbas ve ark., 2022).

Tablo 1.1: Doğal İmmün sistemin başlıca sitokinlerinin bazı önemli özellikleri

Sitokin	Temel hücre kaynağı/kaynakları	Temel hücresel hedefler ve biyolojik etkiler
Tümör nekrozis faktör (TNF)	Makrofajlar, T hücreleri, Mast hücreleri	Endoteliyal hücreler: aktivasyon (enflamasyon, koagülasyon) Nötrofil: aktivasyon Bir çok hücre tipi:apoptoz Karaciğer: akut faz proteinleri sentezi
İnterlökin 1 (IL-1)	Makrofajlar, dendritik hücreler, endoteliyal hücreler, bazı epiteliyal hücreler	Endoteliyal hücreler: aktivasyon (enflamasyon, koagülasyon) T hücresi: Th17 farklılaşması Karaciğer: akut faz proteinleri sentezi
Kemokinler	Makrofajlar, dendritik hücreler, endoteliyal hücreler, T lenfositler, fibroblastlar, plateletler	Lökositler: integrin affinitesini artırır, kemotaksis, aktivasyon
İnterlökin-12 (IL-12)	Dendritik hücreler, makrofajlar	Doğal öldürücü (NK) hücreler ve T hücreler: IFN-γ üretimi, artmış sitotoksik aktivite T hücreleri: Th1 farklılaşması
İnterferon-γ (IFN-γ)	NK hücreleri, T lenfositler	Makrofaj aktivasyonu,Bazı antikor yanıtlarının uyarılması
Tip 1 IFNler (IFN-α, IFN-β)	IFN-α:Dendritik hücreler, makrofajlar IFN-β: Fibroblastlar, epiteliyal hücreler	Tüm hücreler: antiviral durum, artan MHC I ekspresyonu NK hücreleri: aktivasyon
İnterlökin-10 (IL-10)	Makrofajlar, endoteliyal hücreler, T hücreleri	Makrofajlar, dendritik hücreler: sitokin ve kemokin üretiminin inhibisyonu, kostimülatör ve sınıf II MHC molekül ekspresyonunda azalma
İnterlökin-6 (IL-6)	Makrofajlar, endoteliyal hücreler, T hücreleri	Karaciğer: akut faz proteinleri sentezi B hücresi: antikor üreten hücre proliferasyon
İnterlökin-15 (IL-15)	Makrofajlar ve diğerleri	NK hücreleri: Proliferasyon T hücreleri: Proliferasyon
İnterlökin-18 (IL-18)	Makrofajlar	NK hücreleri ve T hücreleri: IFN-γ sentezi
TGF-β	Birçok hücre tipi	Enflamasyonun inhibisyonu T hücreleri: Th17'ye farklılaşma, düzenleyici T hücreler

(Abbas ve ark., 2022).

1.1.2.7. Kompleman Sistemi

Mikroorganizmalara karşı savunmada önemli bir düzeneği oluşturan kompleman sistemi dolaşımda ve membranda yer alan proteinlerden oluşur. Kompleman proteinlerinin bir çoğu proteolitik enzimlerdir ve sistemin harekete geçmesi bu enzimlerin birbiri ardı sıra etkinleşmesi sonucu gerçekleşir. Sistem üç farklı yoldan harekete geçebilir; Alternatif yolak, klasik yolak, lektin yolağıdır. Her üç kompleman yolağının merkezi yapıtaşı, erken evrede enzimlerce parçalanarak oluşturulan C3 adı verilen plazma proteinidir. C3'ün en önemli proteolitik parçası C3b'dir, mikroplara kovalent bağlarla yapışır ve mikrop yüzeyinde diğer kompleman yapıtaşlarının birbirlerini ardışık olarak etkinleştirmelerini sağlayabilir. Konak savunmasında kompleman sisteminin, opsonizasyon ve fagositoz, inflamasyon ve hücre lizisi olmak üzere üç temel görevi vardır (Abbas ve ark., 2022).

1.1.3. Edinsel İmmün Sistem

Mikroorganizma istilasına karşı konak savunması sağlayan doğal immünitenin ardından olaya daha yavaş katılan ve enfeksiyonlara karşı daha özgül savunma sağlayan edinsel immünite sonradan edinilen, kazanılmış immünite olarak da adlandırılır. Edinsel immünite mikroplara karşı etkin savunmayı sağlamadan önce lenfositlerin çoğalması ve farklılaşması gereklidir. Edinsel İmmün sistem, patojenler için oldukça farklı ve çeşitlilik gösteren reseptörleri olan lenfositler ve onların ürettiği antikorlardan oluşur (Abbas ve ark., 2022).

Edinsel immün yanıt, patojenin ASH yolu ile antijene özgü B ve T lenfositleri yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanması ve ardından B ve T hücrelerinin aktive olması şeklinde tanımlanabilir (Diniz ve ark., 2022).

1.1.3.1 Hümoral İmmünite

B lenfositleri kemik iliğinde olgunlaşır ve bu hücreler antikor üretebilen tek hücre grubudur, bu nedenle hümoral bağışıklığı düzenleyen hücrelerdir. B hücre yüzeyinde bukunan zara bağlı antikorlar, antijenleri tanıyan ve hücrenin etkinleşme işlemlerini başlatan reseptör görevini üstlenir. Çözünür antijenler ve mikroplar veya diğer hücreler,

B lenfosit antijen reseptörlerine bağlanabilir, bu bağlanma antijene özgül B hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması ile sonlanır (Abbas ve ark., 2022).

1.1.3.2 Hücresel İmmünite

Hücresel immünitede T lenfositler ve makrofajlar rol alır. T hücreleri timusta olgunlaşır. T lenfositlerinin antijen reseptörleri, antijenlerin peptid parçalarını tanır; bu peptidler antijen-sunan hücreler olarak tanımlanan bir grup özelleşmiş hücrelerde bulunan ana doku uyumluluk (histokompatibilite) antijenleri (MHC) adı verilen özelleşmiş peptid sunan moleküllere bağlı durumdadırlar (Abbas ve ark., 2022). MHC molekülleri HLA (insan lökosit antijeni) ile ilişkili peptit parçaları şeklinde patojen proteinlerinden türetilen antijenleri tanımak için klonal olarak değişken T hücre reseptörlerini (TCR, T cell receptors) kullanırlar. Bu da T hücresinin, istilacı organizmayı kontrol etmek üzere uyarlanmış bir dizi efektör hücre tipine farklılaşmasına yol açar (Jarjour ve ark., 2021)

T lenfositleri arasında CD4+T hücreleri yardımcı T hücreleri olarak tanımlanır, bu hücreler B lenfositlerine antikor üretiminde yardımcı olurlar ve fagositlere yuttuğu mikropları yok etmesine yardım ederler. CD8+T lenfositleri ise sitotoksik T lenfositleri olarak adlandırılırlar, bunlar hücre-içi mikropları taşıyan hücreleri öldürürler. T lenfositlerinin farklı mikropların neden olduğu enfeksiyonlara karşı mücadelede birden fazla işlevleri vardır. T lenfositlerinin esas rolü konak hücrelerin içinde yaşayan ve üreyen mikropların neden olduğu enfeksiyonlara karşı korumayı sağlayan hücre-aracılı immünitedir.

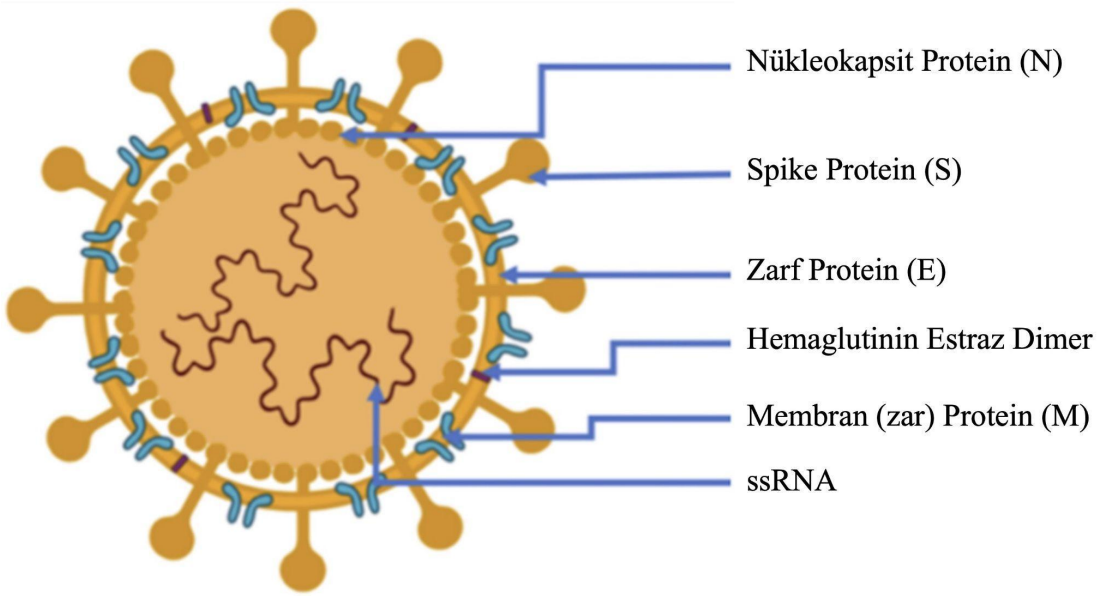
Bazı mikroplar, özellikle virüsler çok çeşitli hücrelerin içinde çoğalma ve hücreleri enfekte etme yeteneğindedirler ve virüslerin hücre siklusu aşamaları sitozol ve nükleusda gerçekleşir. Enfekte olan bu hücrelerin dış veziküllerindeki mikropların yok edilmesi için genellikle intrensek mekanizmaları yoktur. Hatta bazı makrofajların içinde fagosite olan mikroplar, sitozole kaçarak vesiküler bölmedeki mikrobisidal mekanizmalardan korunurlar. T hücreleri enfekte hücreleri öldürür, böylece enfeksiyon kaynağını ortadan kaldırır.

Düzenleyici T lenfositleri immün yanıtı engelleyen veya sınırlayan işlevleri yerine getiren özel bir alt gruptur (Abbas ve ark., 2022). Düzenleyici T (Treg) hücreleri periferde baskın toleransın güçlü sağlayıcılarıdır. Treg hücrelerinin birçok hayvan hastalığı modelinde incelenmesi, otoimmün patogenezi önleme ve bağışıklık homeostazını geri kazanma, aynı zamanda anti-tümör bağışıklık tepkilerini baskılayarak kanser büyümesini teşvik etme yeteneklerini ortaya çıkarmıştır. Bu tür bulgular Treg hücrelerini klinik uygulamalar için umut verici bir hedef haline getirmiştir (Sakaguchi ve ark., 2010).

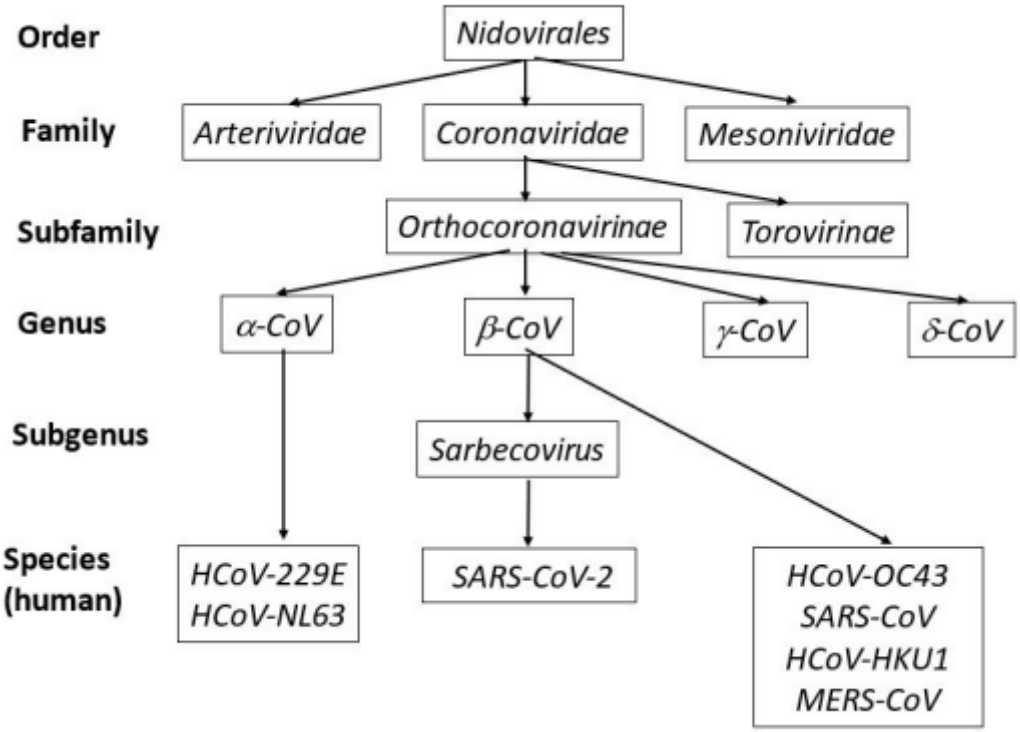
1.1.4 Koronavirüsler ve Genel Özellikleri

Koronavirüsler (CoV'ler), Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) ve Orta Doğu solunum sendromu (MERS) gibi her ikisi de yüksek ölüm oranlarına sahip ve ilk kez sırasıyla 2003 ve 2012'de tespit edilen, birçoğu insanlarda solunum yolu hastalıklarına neden olan geniş bir virüs ailesidir. Elektron mikroskopla bakıldığında dış yüzeyinde bulunan glikoprotein yapıdaki çıkıntılar nedeniyle taç anlamına gelen 'Corona' adı verilmiştir. Koronavirüsler, insanların yanı sıra sığır, domuz, at, hindi, kedi, köpek, sıçan, ve fare gibi pek çok hayvanı da enfekte edebilen bir zoonozdur. *Coronavirinae* alt ailesi içerisinde alfa, beta, delta ve gama olmak üzere dört cinsi bulunmaktadır. İnsanlarda enfeksiyona neden olan türler alfa ve beta cinsleri içerisinde yer almaktadır (Ursavaş ve Akalın, 2021).

Koronavirüsler hem insanlarda hemde hayvanlarda hastalığa neden olabilen *Nidovirales* takımı, *Coronaviridae* ailesi, *Coronavirinae* alt ailesi içerisinde yer almaktadır. Koronavirüsler (CoV) tek iplikli, pozitif polariteli RNA yapısında genoma sahip olup çapı 90–120 nm olan, zarflı virüslerdir (Ursavaş ve Akalın, 2021). Virüs zarı dört yapısal bileşen olan; başak (S), zarf (E), zar (M) ve nüelokapsid (N) proteinini içerir. S proteini virüsün konağa tutunup anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye bağlanarak hücre içerisine girmesinde önemli rol oynar (Gülüm ve ark., 2021). (Şekil 1.1)



Şekil 1.1: Koronavirüslerin yapısal organizasyonunun şematik gösterimi.
Virüs zarı dört yapısal bileşen olan; başak (S), zarf (E), membran (zar) (M) ve nüelokapsid (N) proteinini içerir (Negi ve ark., 2023)



Şekil 1.2: İnsan koronavirüslerin sınıflandırılması (Malik, 2020)

Koronavirüslerin insanlarda bulunan alt tipleri (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 ve HKU1- CoV) çoğunlukla hafif üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur ancak nadiren bebeklerde, küçük çocuklarda ve yaşlılarda şiddetli enfeksiyonlara neden olabilir. (Hasöksüz ve ark., 2020)

Alfa koronavirusler asemptomatik veya hafif semptomatik enfeksiyonlara neden olurken beta koronavirusler şiddetli enfeksiyonlara ve ölümlere neden olabilmektedir. (Velavan ve ark., 2020).

SARS-CoV-2 salgınında yeni varyantları sırayla ortaya çıkmış ve pandemi sırasında baskın suşlar haline gelmiştir.Bu varyantlar farklı ACE2 bağlanma afinitesine, virülansa, bulaşıcılığa ve konakçı bağışıklık tepkilerine sahip olmuşlardır. İlk olarak Güney Afrikada görülen Omicron varyantı hem aşılanmış hem de daha önce enfekte olmuş bireylerde SARS-Cov-2'nin enfeksiyonu sonucunda oluşan antikor nötralizasyonundan kaçışa yardımcı olan ek mutasyonlar taşımaktadır (Zhang ve ark., 2023)

1.5 COVİD-19 İmmünolojisi

Viral enfeksiyon sırasında, CD4+ ve CD8+ T hücre popülasyonları , hem doğuştan gelen bağışıklığın viral replikasyonu içerme yeteneğini hem de antikorların enfeksiyonu önleme yeteneğini tamamlayan immünolojik işlevler gerçekleştirir (Sette ve Crotty, 2021). CD8+ T hücreleri, kendi spesifik T hücre reseptörlerini (TCR'ler) kullanarak, ana histo-uyumluluk kompleksi sınıfı MHC sınıf I molekülleri tarafından sunulan endojen olarak sentezlenmiş viral proteinlerin işlenmesinden türetilen viral dizilerin (epitoplar) tanınması yoluyla kopyalanan virüsleri barındıran konakçı hücre yüzeyinde hücreleri saptar. CD4+ T hücreleri, virüsle enfekte olmuş hücreleri de tanıyabilir ve doğrudan parçalayabilir, ancak bunlar esas olarak, enfekte olmamış profesyonel antijen sunan hücreler (esas olarak dendritik hücreler veya diğer miyeloid soy hücreleri) ve MHC sınıf II molekülleri tarafından sunulur. Naif CD4+ T hücreleri, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun temel olarak Tfh ve Th1 yardımcı CD4+ T hücrelerinin genişlemesini desteklediği, farklı gen ekspresyon programları ile karakterize edilen özel alt kümeler (Th1, Th2, Th17, Treg ve T foliküler yardımcı [Tfh] hücreleri) halinde görülebilmektedir (Heller ve ark, 2006).

1.5.1 COVID-19'da Doğal Bağışıklık

SARS-CoV'nin çeşitli doğuştan tanıma ve yanıt yollarını tetiklediği gösterilmiştir. Mukozal yüzeyler, mukozayla ilişkili lenfoid dokular (MALT) aracılığıyla virüse karşı korunmaktadır. SARS CoV-2'nin solunum yolu, oral mukoza yoluyla insan vücuduna girdiği bilinmektedir ve mukozal IgA muhtemelen bu fiziksel bariyeri korumada önemli rol oynar (Russell ve ark., 2020).

ACE 2 reseptörü, SARS-CoV-2 için ana reseptördür ve virüsün hücreye girmesine izin verir. Virüs bulaşmış epitel hücreleri, interferona yanıt veren genlerle ilişkili olan ve sağlam bir doğal bağışıklık yanıtının oluşmasına izin veren interferonlar üretir (Ziegler ve ark., 2020).

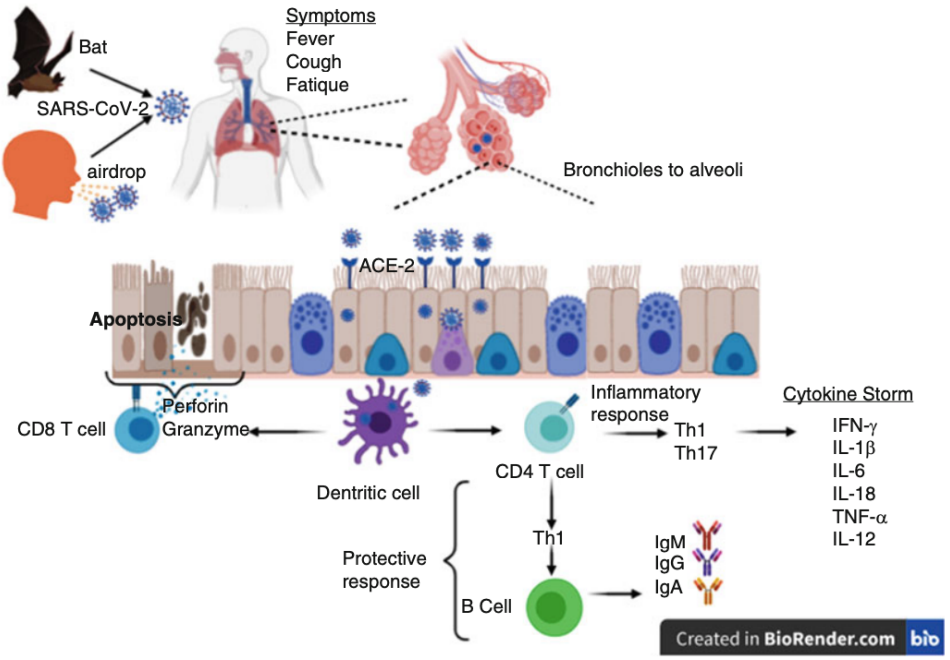
Antijen sunan hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi mikropları (pattern recognition receptors) PRR'ler, özellikle Toll benzeri reseptörler, RIG benzeri reseptörler (RLR'ler), (NOD-like receptor family proteins) NLR ve AIM2 gibi RIGI (retinoic acid inducible gene I-like receptors) aracılığıyla tespit edilebilir. PAMP'ler ve hasarla ilişkili moleküler modeller ile temas halinde olan PRR'ler aracılığıyla piroptoz olarak adlandırılan hücre ölümüne yol açan iltihaplanma oluşumunu indükleyebilir. Koronavirüsler, PRR-aracılı viral algılama ve efektör viral kontrol mekanizmalarına müdahale eden, en önemlisi PAMP reseptörleri yoluyla IFN yanıtlarını veya viral RNA tanımayı bloke birden fazla proteini kodlar (Li. ve ark., 2020)

SARS-CoV-2'nin, IL-6 ve TNF-α gibi diğer proinflamatuar sitokinleri aktive eden IL-1β'nin aktivasyonu ve olgunlaşması üzerinde etkili olduğu görülmektedir. COVID-19'un immünopatolojisi, IL-6 ve TNF-α'nın yükselmesi ile karakterize edilir. Bu sitokinler, doğuştan gelen bağışıklığın bir parçası olan TLR4'ün aktivasyonunun ürünleridir. IL-1 seviyeleri, bulaşıcı sürecin virülansı ve ciddiyeti ile ilişkilidir (Ruiz ve ark.,2020). SARS-CoV-2'nin, IL-6 ve TNF-α gibi diğer proinflamatuar sitokinleri aktive eden IL-1β'nin aktivasyonu ve olgunlaşması üzerinde etkili olduğu görülmektedir. IL-1 seviyeleri, enfeksiyöz sürecin virülansı ve ciddiyeti ile ilişkilidir (Ruiz ve ark.,2020). IL-6, konağın enfeksiyonlara ve doku hasarına karşı savunmasına katkıda bulunur. IL-6, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık fonksiyonlarının bir aracısı olarak işlev gören bir pleiotropik sitokindir. SARS-CoV-2 pnömonisi olan hastalardan alınan ilk raporlar, interlökin (IL)-6'yı akut solunum sıkıntısı sendromunun (ARDS) başlamasında potansiyel

bir patojenik faktör olarak tanımlamıştır. IL-6, bağışıklık hücresi farklılaşmasının yönü, istilacı patojenlere karşı koruyucu tepkiler ve çeşitli bağışıklık ve biyolojik etkilere sahiptir (Jordan S C., 2021).

COVID-19 ile enfekte olan hastalar, IL-6 ve IL-1β salgılayan geniş bir dolaşımdaki monosit popülasyonunu barındırır, sonuç olarak, COVID-19'lu hastalarda serum IL-6 ve ayrıca sağlıklı kontrollere kıyasla laktat dehidrogenaz seviyeleri yükselir.

IL-6, COVID-19 hastalarında sitokin fırtınalarının ana nedeni olmasına rağmen, COVID-19 patolojisinde karmaşık bir rol oynayan hem anti-inflamatuar hem de proinflamatuar özelliklere sahiptir (Jordan S C., 2021). (Şekil 3)



Şekil 1.3: SARS-CoV-2 ye özgü immün yanıt

SARS-CoV-2 hava yolu ile yayılır ve çoğunlukla hava yolu bronşiyollerini enfekte eder. Dendritik hücreler viral antijeni CD4+T hücrelerine sunar ve şiddetli vakalarda daha fazla sitokin fırtınası başlar. Humoral immün yanıt IgG, IgM ve IgA üretimini artırır ve diğer hücrelere viral giriş engellenir. CD8+T hücreleri viral olarak enfekte olmuş hücreleri öldürmek için perforin ve granzim salgılar (İnandıklıoğlu ve Akkoc, 2020)

SARS-CoV-2'nin genel anti viral doğuştan gelen mekanizmaları, 'kendine karşı' ve 'kendi kendine olmayan' ayrımına esas olarak viral nükleik asitlerin sitozoldeki spesifik patojen tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) olarak tanınmasının aracılık ettiği tahmin edilebilir. Bu konseptin ayırt edici özelliği, çift sarmallı RNA'yı (dsRNA) viral üreme döngüsünün zorunlu bir ara maddesi olarak algılayan RNA virüsleridir (Schlee ve ark., 2009) . Dendritik hücreler, makrofajlarve nötrofiller ilk savunma hattı olarak bağışıklık reaksiyonunu başlatır sonrasında türünü ve yoğunluğunu etkiler. COVID-19'dan ölen hastalardaki otopsiler, bronkopnömoni alanında yüksek bir makrofaj infiltrasyonunu ortaya çıkarmıştır (Barton ve ark., 2020).

SARS-Cov-2 enfeksiyonunda NK hücrelerininde güçlü yanıtlar oluşturduğu belirtilmiştir. Sitotoksisite ve sitokin salgılanması dahil olmak üzere anlık NK hücre aktivasyonları SARS-Cov-2 enfeksiyonlarına karşı viral replikasyonun sınırlandırılmasına katkıda bulunmuştur (Hammer ve ark., 2023)

1.5.2 COVID-19'da Edinilmiş bağışıklık

COVID-19'un diğer viral enfeksiyonlarla benzer bir Th1 tipi bağışıklık tepkisi oluşturduğu varsayılmaktadır (Chen ve Wherry, 2020). CD8+ T hücrelerinin sayısının COVID-19 enfeksiyonu sırasında azaldığı ve ciddi vakalarda bellek düzenleyici CD4+ T hücresi sayısının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2020) Bu bulgulara, lenf düğümlerinde CD4+ T ve CD8+ T hücrelerinin sayısında azalma eşlik etti. COVID-19 hastalarında lenf düğümleri ve dalak atrofik olarak tanımlanmıştır, bu da SARS-CoV-2'nin hücre dejenerasyonunu güçlendirmedeki rolü vurgulamaktadır (Tabary ve ark., 2020) CD8+ T hücreleri ile ilgili olarak, bu hücrelerin NKG2A, PD1 ve TIM-3 ekspresyonu gibi fonksiyonel tükenme paternleri sergilediği ortaya çıkmıştır (Moon, 2020). Bununla birlikte, antiviral tedaviden sonra iyileşen NKG2a ekspresyonu azalmıştır. Bu nedenle, T hücrelerinin antiviral tedaviden sonra fonksiyonel aktivitelerini geri kazandıklarını varsayılmaktadır. NKG2A'nın ekspresyonuna ilişkin benzer gözlemler, NK hücrelerinde de görülmüştür (Zheng ve ark., 2020). Hafif evrelerde ve/veya yalnızca hafif semptomlarla gelen hastalarda, lenfosit sayısının, şiddetli hastalığı olan hastalarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu

aynı zamanda hem T hücresi (CD3+ hücreleri) hem de CD8+ T hücresi (CD3+/CD8+ hücreleri) popülasyonları için geçerlidir (Cao, 2020). Hafif ve şiddetli COVID-19 vakalarında, CD8+ T hücre sayıları sağlıklı donörlere kıyasla azaldığı raporlanmıştır. COVID-19 hastalarında sunulan CD8+ T hücrelerinin, sağlıklı donörlere kıyasla daha az degranüle (azalmış CD107a eksternalizasyon) ve daha düşük IL2, IFN y ve granzim B seviyeleri ürettiği bulunmuştur (Zheng ve ark., 2020).

Geliştirilen çoğu aşının ana hedefi CD4+T hücre yanıtlarının artışıdır ve bununla birlikte bu durum anti-SARS-CoV-2 IgG ve IgA titrelerinin büyüklüğü ile ilişkilendirilmiştir (Grifoni ve ark., 2020). Ayrıca toplam CD4+ yanıtının M, spike ve N proteinlerine yönlendirildiğini ve her birinin diğerlerinin yanı sıra yaygın olarak nsp3, ORF3 ve ORF8'i hedefleyen ek yanıtlarla birlikte %11-27'yi oluşturduğu rapor edilmiştir. (Li ve ark., 2020)

SARS-CoV-2, diğer koronavirüslere benzer şekilde, MHC sınıf I ve II moleküllerini down regüle ederek antijen sunumunu kısıtlar, bu da T hücresinin aracılık ettiği bağışıklık tepkilerini inhibe eder (Zheng ve ark., 2020)

B hücreleri virüs enfeksiyonundan sonra nötralize edici antikorları üreterek virüsün konakçı hücreye girmesini engelleyebilir. Bu nedenle, bu antikorlar virüs temizlenmesinde önemli bir rol oynar. Nötralize edici antikorlar, 2 yıllık takip süresi boyunca SARS hastalarında tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2006) Humoral immün yanıtta, antikorlar virüsü nötralize etmek için yeterli olmasa da COVID-19 enfeksiyonlarında da önemli bir rol oynar. Her hasta tamamen farklı hümoral yanıt kinetiğine sahiptir (Guo ve ark., 2020), hastaların çoğu hastalığın başlangıcından 7 gün sonra antikor geliştirir. Hastalığın ilk yedi günü boyunca, COVID-19 hastalarında virüse özgü antikorların saptanabilirliği %40'ın altında bulunmuştur ve bu nedenle seroloji testinin kullanımı sınırlı değere sahiptir. Hastalığın başlamasından sonraki 15. günden itibaren IgM ve IgG antikorları sırasıyla hastaların %94,3 ve %79,8'inde tespit edilmiştir (Zhao ve ark., 2020).

1.5.3 COVID-19'da Aktif ve Pasif Bağışıklık

1.5.3.1 COVID-19 'da pasif konvalesan plasma

İyileşen kişilerden elde edilen plazma, serum veya immünglobulin konsantrelerinin uygulanmasının, COVID-19 enfeksiyonunun önlenmesinde veya tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir. İmmün plazma kullanımı, 2009-2010 H1N1 influenza virüsü salgını, 2003 SARS-CoV-1 salgını ve 2012 MERS-CoV salgınında başarı ile uygulanmıştır. İmmün plazmaların aktif virüs enfeksiyonu nedeniyle hastanede yatan hastalara terapötik amaçla verilmesi "pasif bağışıklık transferi" olarak tanımlanabilir. Pasif bağışıklık antikorları, hedef organların hasarını azaltabilir ve etkili patojenleri doğrudan nötralize edebilir hastanın iyileşmesine katkı sağlaması ve enfeksiyondan koruması hedeflenir (Bakanlığı, T. S. (2021). Kullanımı 1880'lere dayanan ve çeşitli salgınlarda kullanılan immün plazma SARS-CoV-2 salgını ile tekrar gündeme gelmiştir. Diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi COVID-19 geçiren hastalarda da virüse özgül IgM, IgG ve IgA antikorlarının geliştiği saptanmıştır (Azkur ve ark., 2020). Konvelasan serumlar içerisinde ki nötralize edici antikor seviyesi koruyuculuk ve etkinlik açısından çok önemlidir. Bunun nedeni SARS-CoV-2 S proteini S1 kısmının RBD'de bölgesine karşı gelişen antikorlar başlıca nötralize edici antikorlar olarak tanımlanmaktadır, çünkü direkt olarak virüsün hücreye tutunmasını engellemesinde rol almaktadırlar (Azkur ve ark., 2020).

1.5.3.2 COVİD-19 Aşıları

COVID-19 aşıları tarafından indüklenen nötralize edici antikorlar için SARS-CoV-2 spike proteininin RBD'si, birincil hedeftir. RBD epitoplarına karşı spesifik IgG antikorları, SARS-CoV-2'nin ACE2 ile bağlanmasını engelleme ve koruyucu bağışıklık sağlama potansiyeline sahiptir (Zhang ve ark., 2022)
COVID-19 için birkaç farklı aşı türü geliştirilmektedir. Tablo 1.3 de anlatılmaktadır.

Tablo 1.3: Farklı SARS-CoV-2 aşılarının etkinliği ve bağışıklık tepkisi (Zhang ve ark., 2022)

Aşı Adı	Aşı Tipi	Etkileri ve Bağışıklık cevabı
BNT162b2	**mRNA aşıları**	•COVID-19'u önlemede %95 etkili •İndüklenen IgG antikorları, mutasyona uğramış RBD'ye doğal enfeksiyonla uyarılmışlardan daha yüksek aviditeye sahiptir.
Moderna	**mRNA aşıları**	•COVID-19'u önlemede %94,1 etkili •Gelişmiş klinik değerlendirmede preklinik testler, Th1'e çarpık bir aşı yanıtı gösterdi ve patolojik akciğer infiltratları göstermemiştir.
AZD1222	**Viral Vektör**	•İkinci dozdan sonra, prime-boost aralığı daha uzun olanlarda (aşı etkinliği ≥12 haftada %81,3) kısa araya sahip olanlara (<6 haftada aşı etkinliği %55,1) göre etkinlik daha yüksektir. •Daha uzun prime-boost aralığına sahip serumlarda daha yüksek bağlayıcı ve nötralize edici antikor titrelerine sahiptit.
Sputnik V	**Viral Vektör**	•COVID-19'a karşı %91,6 etkilidir (ilk dozdan sonraki 21. günden ikinci dozun alındığı güne kadar) •RBD'ye özgü IgG, 8996 geometrik ortalama titre (GMT) ve %98,25 serokonversiyon oranı ile numunelerin %98'inde tespit edilmiştir. •İlk aşılamadan sonraki 28. günde, aşılanan tüm katılımcılar, ilk dozun uygulandığı güne kıyasla, antijen yeniden uyarılması üzerine önemli ölçüde daha yüksek IFN-γ sekresyonu seviyelerine sahip bulunmuştur.

Ad26.COV 2.S	**Viral Vektör**	•Orta ve şiddetli hastalığın koruma düzeyi değişiklik göstermiştir: Amerika Birleşik Devletleri'nde %72; Latin Amerika ülkelerinde %66; ve aşılamadan 28 gün sonra Güney Afrika'da %57. •Araştırılan aşının tüm coğrafi bölgelerde şiddetli/kritik COVID-19'u önlemede %85 etkili olduğu bildirilmiştir. •Klinik öncesi SARS-CoV-2 yükleme çalışmalarında düşük dozlarda sağlanan kalıcı koruma; ilk klinik veriler, 5 × 1010 viral partiküldeki tek bir dozun güvenli olduğunu ve mükemmel hümoral ve hücresel bağışıklık tepkilerini indüklediğini göstermiştir.
BBIBP COVID-19 vaccine	**İnaktif**	•Sinopharm tarafında yapılan açıklamaya göre %79 etkilidir. •Birinci ve ikinci dozlardan sonra SARS-CoV-2 enfeksiyonunu takiben antikor konsantrasyonlarında keskin bir artış gözlenmiştir.
Covaxin (BBV152)	**Viral Vektör**	•Faz 2 denemesinde, BBV152, faz 1 denemesine kıyasla hümoral ve hücre aracılı bağışıklık tepkilerini arttırdı.
CoronaVac	**İnaktif Virüs**	•Brezilya, şili, Endonezya, Türkiye gibi farklı ülkelerde çoklu çalışma yapılmıştır: •2. aşamadaki bağışıklık tepkileri, 1. aşamada kaydedilenlerden çok daha iyiydi; Hem 3 hem de 6 µg gruplarında %90'ın üzerinde serokonversiyon oranları •SARS-CoV-2'ye karşı iyi tolere edilen ve indüklenen hümoral tepkiler oluşturur. •Yaşa göre keşifsel bir analizde, ikinci dozdan sonraki 28. günde serokonversiyon oranları, 60-64, 65-69 ve 70 yaş veya daha büyük katılımcılar için 3 ve 6 ug gruplarında %94'ün üzerindedir.

AD5-nCOV	**Viral Vektör**	•Sağlıklı yetişkinlerde tolere edilebilir ve immünojeniktir. SARS-CoV-2'ye karşı spesifik hümoral tepkiler, aşılamadan sonraki 28. günde zirveye ulaştı ve tek atıştan sonra 14. günden itibaren hızlı, spesifik T hücresi tepkileri kaydedildi. •Aerosolize Ad5-nCoV iyi tolere edilir ve iki doz aerosolize Ad5-nCoV, bir doz intramüsküler enjeksiyona benzer şekilde nötralize edici antikor tepkileri ortaya çıkardı. İlk intramüsküler enjeksiyondan 28 gün sonra aerosolize rapel aşılama, güçlü IgG ve nötralize edici antikor tepkilerini indükledi.
CV2CoV	**Unmodified RNA aşısı**	•SARS-CoV-2 varyantlarına ve insan olmayan primatlara karşı bellek B ve T hücre yanıtlarına karşı daha yüksek titrelerde bağlanma ve nötralize edici antikorlar indüklendi.
PreS-RBD vaccine	**Recombinant fusion protein**	•RBD'nin ACE2'ye yönelik medyan inhibisyonları (100 ng RBD: %8,6–%98,3 inhibisyon, medyan inhibisyon: %16,0; 50 ng RBD: %14,4–%99,4 inhibisyon, medyan inhibisyon: %52,8) •Serum ve mukoza sekresyonlarında saptanabilen erken bir IgG1 ve sürekli IgG4'ten oluşan tavşanlarda güçlü anti-RBD IgG yanıtı •Aşı ile indüklenen antikorlar, RBD'nin ACE2 ile etkileşimini güçlü bir şekilde inhibe etti ve omikron VOC'yi nötralize etme yeteneğine sahipti.

2.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu' nun 12.01.2022 tarih ve 09.2022.157 sayılı izni ile onaylandı. COVİD-19 PCR pozitif hastalardan kan temini, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğinde Koronavirüs hastalığı sebebi ile yatan hastalardan temin edildi. Tez çalışmasını deneyleri Marmara Üniversitesi Hastanesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Laboratuvarı' nda gerçekleştirildi.

2.1 Çalışma Planının Özeti

Bu tez çalışmasında, mRNA (Biontech) aşısının COVİD-19 hastaların da immünolojik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla;
1. COVİD-19 hastalarından periferik kan örnekleri alındı.
2. Periferal kan örneklerinden tam kan immünfenotipleme yapıldı.
3. Periferal kan örneklerinden PKMH izolasyonu ve serum ayrımı yapıldı.
4. PKMH'ler CD-mix (CD3,CD28) ve peptivatör ile kültüre edildi. 3 günlük kültür sonrasında hücre proliferasyonu, Treg düzeylerine bakıldı.

Tüm hücre kültürü çalışmalarında, test edilmiş steril ve tek kullanımlık hücre kültürü malzemeleri kullanıldı ve bu işlemler laminar akışlı steril kabinde steril koşullarda gerçekleştirildi.
Bu tez çalışmasına dahil edilen tüm hastalara, hazırlanmış olan "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutuldu ve "Gönüllü Onam Formu" onayları alındı.
Aşılı ve aşı olmamış COVİD-19 hastaları, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs hastalıkları Ana Bilim Dalı'na başvuran poliklinik takipli hastalar arasından doktor kontrolünde seçildi. Hastalardan venöz kan alımı için onam formları etik kurul gerekenlerine uygun şekilde açıklama yaparak onaylatıldı.

2.2 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- PBS (Sigma, Cat. No. P4417)
- Penicillin/streptomycin (Pan Bio, Cat. No. P06-07100)
- Amphotericin B (Pan Bio,Cat. No. P06-01100)
- RPMI-1640 (Biowest, Cat. No. B.L0500)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, B.S1810)
- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu
- % 0,5 Tripan mavisi solüsyonu (Gibco, Grand Island, USA; 15250061)
- DMSO (ChenCruz, Cat. No. sc-358801)
- Ficoll-Paque (Diagnovum,D604)
- Anti-CD3-FITC (Beckman Coulter, Cat. No. A07746)
- Anti-CD4+-APC (Beckman Coulter, Cat. No. 10874)
- Anti-CD25-PC5 (Beckman Coulter, Cat. No. IM2646)
- Anti-CD45RO-ECD (Beckman Coulter, Cat. No. B49192)
- PerFix-nc Reagent 1 (Beckman Coulter, PerFix-nc Kit, Cat. No. B31167)
- FoxP3 (Beckman Coulter, Cat. No. B30650)
- CD3/16+56 (BD, 342403)
- CD3/19 (BD, 342404)
- CD3/8/45RA/RO (BD, 340574)
- PepTivator SARS-CoV-2 (130-129-712,Miltenyi Biotec)
- CD3/28 T cell aktivatör (Stem Cell, Cat. No. 10971)
- MEM NEAA(Sigma, M7145)
- MEM Vitamins solution(Gibco, Cat. No. 11120-037)
- Kanamycin sulfate (Gibco, cat no: 15160-047)
- L-glutamine 200 mM (Biowest ,Cat. No.B.X0550)

2.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri ve Cihazlar

- Heparinli kan alma tüpü (Yeşil kapaklı) (Hongyu Medical, China; 131211)
- EDTA'lı kan alma tüpü (Mor kapaklı)
- 48 kuyucuklu plaklar
- Thoma lamı (Marienfeld, Germany; 06.407.10)
- %70 alkol
- 15 ml falkon
- 50 ml falkon
- 1000 ul'lik pipet ucu
- 200 ul'lik pipet ucu
- 10 ul'lik pipet ucu
- 1000 ul' lik otomatik pipet
- 100 ul'lik otomatik pipet
- 10 ul'lik otomatik pipet
- 2,5 ml'lik Pastör pipeti
- Flow tüpü
- 1,5 ml'lik Ependorf tüpü

Kullanılan Cihazlar

- Laminar kabin (Nüve,MN120)
- Su banyosu (Nüve,BM 30)
- İnkübatör (Nüve, EC160)
- Santrifüj (Nüve,NF400R)
- Flow Sitometri (Beckman Coulter)
- İnvert Mikroskop (Nikon Eclipse Ts2)
- Vorteks

2.4 Kullanılan solüsyonların hazırlanması

PKMH'i Dondurma Solüsyonun Hazırlanması

İzole edilen PKMH'leri dondurma solüsyonu için %10 FBS ve %10 DMSO ilave edilen RPMI 1640 besiyeri hazırlandı. DMSO içerikli besiyeri ile dondurulan PKMH'ler -80^{o}C de saklandı.

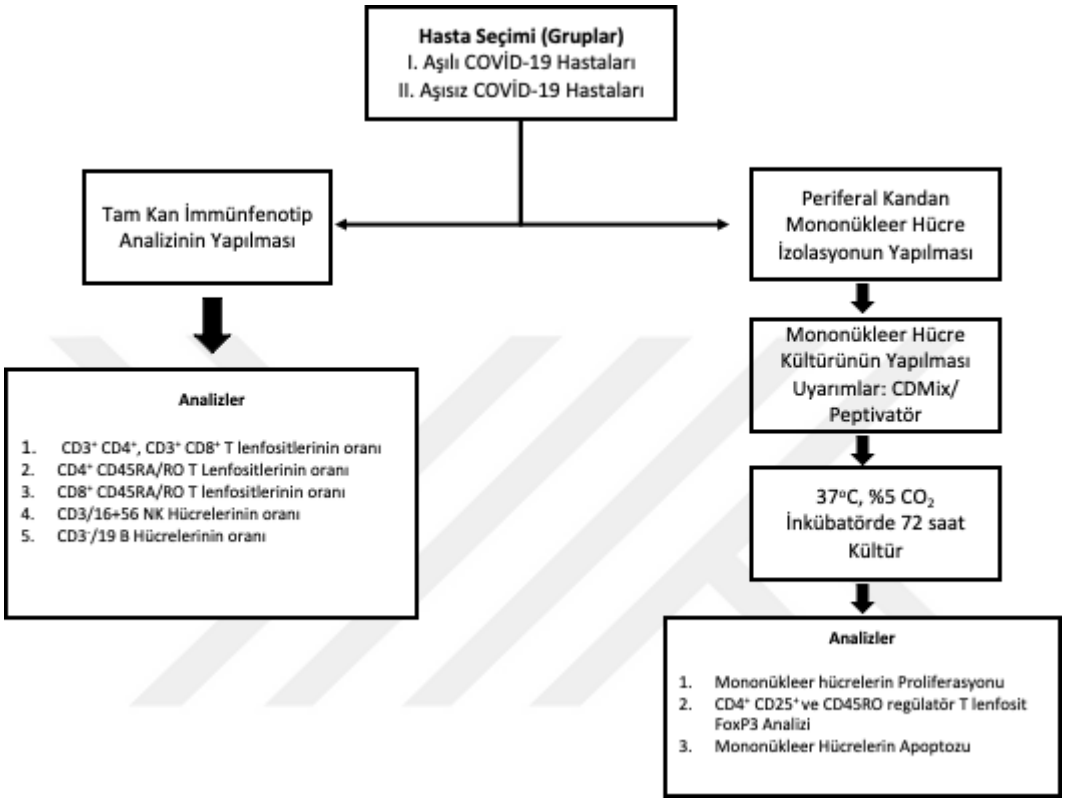
PKMH'i Kültürleri için Besiyeri Hazırlanması

PKMH' i kültürü için %1 Penicilin streptomisin, %1 Kanamycin sulfate , %1 L-glutamine ,%1 MEM Vitamins solution, %1 Sodium Pyruvate, %1 MEM NEAA ve %10 FBS ilave edilen RPMI 1640 besiyeri kullanıldı.

PBS solüsyonunun hazırlanması

200 ml distile su içerisinde 1 PBS tableti çözdürülüp 0,22 um'lik filtreden geçirildi

Çalışma Planı



2.5 Çalışma Planı

2.5.1 COVİD-19 Hastalarının Belirlenmesi ve Periferal Kan Örneklerinin Alınması

- COVİD-19 Hastalarının Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen tüm bireylere 'Gönüllü Bilgilendirme Formu' okutuldu ve 'Gönüllü Onam Formu' ile onayları alındı. Bireyler T.C. Sağlık Bakanlığı Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları polikliniğinde Koronavirüs hastalığı sebebi ile yatan hastalar arasından aşağıdaki kriterlere göre seçildi.

2.5.2 COVİD-19 hastalarının çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

Aşılı COVİD-19 hastaları için,

- Son aşı olma tarihi ile PCR pozitif olma tarihi arasındaki sürenin 15-90 gün aralığında olan,
- mRNA Biontech/Pfizer (BNT-162b2) aşısı ile aşı olan,
- PCR-sonucu pozitif olan,
- 18-80 yaş aralığında olan hastalar seçilmiştir.

Aşısız COVİD-19 hastaları için,

- Son aşı olma tarihi ile PCR pozitif olma tarihi arasındaki sürenin 90 gün ve üstü olan,
- PCR-sonucu pozitif olan,
- 18-80 yaş aralığında olan hastalar seçilmiştir.

Çalışmadan dışlanma kriterleri

- PCR sonucu negatif olan,
- İmmün baskılayıcı veya steroid kullanmış olan bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir.

    - COVİD-19 Hastalarından Periferal Kan Örneklerinin Alınması

Gönüllü onam formunu onaylayan ve çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun hastalardan 2 mor kapaklı- EDTA'lı tüpte, 2 yeşil kapaklı heparinli tüpte ve 1 sarı kapaklı tüpte kan alınmıştır.

2.5.3 Periferal Kan Örneklerden Tam Kan İmmünfenotip Markerları ile Boyanması

COVID-19 hastalarından mor kapaklı EDTA'lı tüplerle alınan kanlar 5 farklı flow tüpünde CD3, CD8, CD4, CD3/8/45RA/RO, CD3/16+56, CD3/19 markerları ile boyanmıştır. Deney planı şu şekilde oluşturulmuştur.

1. tüpte: CD3/CD4/CD8
2. tüpte: CD3/8/45RA/RO
3. tüpte: CD3/16+56
4. tüpte: CD3/19
5. tüpte: IgG Mouse

Tüpler Beckman Coulter akım sitometri cihazında okutulmuştur.

2.5.4 PKMH İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen bireylerin her birinden yeşil kapaklı heparinli tüplere 10 ml venöz periferal kan alındı. Heparinli tüplere alınan kanlardan aşağıdaki protokole göre mononükleer hücre izolasyonu yapıldı.

PKMH izolasyonu laminer hava akımlı aseptik kabinde gerçekleştirildi. Hastalardan alınan 10 ml kan 50 ml'lik steril falkon tüpe aktarıldı ve üzerine 10 ml steril PBS solüsyonu eklenerek pastör pipeti ile yavaşça karıştırıldı. 15 ml'lik konik kapaklı falkon tüplere 4 ml fikol solüsyonu eklendi. 15 ml'lik konik kapaklı tüpte bulunan fikol solüsyonunun üzerine birbiriyle karışmayacak ve toplam hacim 14 ml olacak şekilde PBS ile homojenize edilmiş kan pastör pipetle 45C'lik açıyla yavaşça eklendi. Kan fikol üzerine yayıldıktan sonra 20 dakika 2000 rpm devirde santrifüj edildi. 20 dakika sonrasında yoğunluklarına göre en altta eritrositler, orta kısımda opak görünümlü mononükleer hücreler ve üst kısımda plazma elde edildi. Orta tabakada opak görünümlü olan (buffy coat) mononükleer hücrelerin bulunduğu kısım pastör pipeti ile alındı ve steril 15 ml'lik boş falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 5 ml PBS eklendi ve pipetaj yapıldı. 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüjlendikten sonra supernatant atıldı dipte kalan hücre pelleti cRPMI besiyeriyle 5 ml'ye tamamlandı ve pipet yardımıyla hücreler süspanse edildi. Eritrosit içeren PKMH hücre süspansiyonu eritrositlerin lizizi için lizat

solüsyonuyla süspanse edilerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda hücre süspansiyonu 1500 rpm devirde 5 dk santrifüjlendi ve santrifüj sonrasında supernatant atıldı dipte kalan hücreler 1 ml C-RPMI ile süspanse edilip hücre sayısının belirlenmesi için içinden 10 µl alınıp 96'lı kuyucuklu plağa aktarıldı. 96'lı kuyucuklu plakta bulunan hücre süspansiyonun üzerine 10 µl tripan mavisi solüsyonu eklenip hücreler pipetaj yapılarak homojenize edildi. Bu içerikten pipetle 10 µl alınarak thoma lamına aktarıldı ve hücre sayısı belirlendi. 1 ml'deki toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre belirlendi.

Toplam hücre sayısı= $AxSFx10^4$

A; 16 büyük karede sayılan hücre sayısı, SF; hücre süspansiyonun tripan mavisi ile seyreltme faktörüdür. 10^4 ise thoma lamının 0,1 mm3 de hücre sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek için kullanılan sabittir.

2.5.5 Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi

Karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE), lenfositlerin in vitro ve in vivo çoğalmasını gözlemlemek ve immün yanıtın incelenmesine imkan sunan hücre zarından geçebilen floresan bir boyadır. CFSE uzun ömürlü hücre içi molekülleri yüksek oranda floresan boya olan karboksifloresein ile kovalent olarak etiketleme yeteneğine dayanır. Her hücre bölünmesinin ardından, bu flüoresan moleküllerin soy hücrelere eşit dağılımı, yavru hücrelerin flüoresansının yarıya inmesine neden olur.

PKMH izolasyon yöntemi ile elde edilen mononükleer hücrelerin sayım işlemi gerçekleştirildikten sonra 48'li kuyucuklu plakta kültür işlemi gerçekleştirildi. Toplam $3X10^6$ mononükleer hücre kullanıldı. Her kuyucuk da $5X10^5$ hücre/500ul besiyeri olacak şekilde hücre süspansiyonu 3ml ayarlandı. $3X10^6$ hücre 50 ml'lik falkon tüpe aktarıldı üzerine 6 ul CFSE eklendi. 20 dakika 37°C de inkübatörde bekletildi. 20 dk sonra 15 ml besiyeri hücre süspansiyonun üzerine eklenip 5 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. 5 dk sonra 1500 rpm'da 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı pellet 3 ml besiyeri ile çözüldü. Her kuyucuk da $5X10^5$ hücre/500ul besiyeri olacak şekilde 6 kuyucuğa kültür işlemi gerçekleştirldi. 72 saat 37°C'de %5 CO_2 ortamda inkübe edildi.

72 saat 37ºC'de %5 CO_2 ortamda inkübe edilen CFSE ile boyanmış PKMH'ler flow tüpüne aktarıldı. 3ml PBS ile 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı 500 ul PBS eklendi ve vorteks yapıldı. Tüpler Flow sitometride okutuldu.

2.5.6 Lenfositlerin Treg Analizi için Ko-Kültürünün yapılması

Treg kültürü için 48'li kuyucuklu plakta 6 kuyucuğa her kuyucukta $5x10^5$ hücre /500ul besiyeri olacak şekilde eklendi. Uyarımsız kültürlere herhangi bir işlem yapılmadı. Uyarımlı kültürlere 1ul CD3/CD28 (CD-mix) T cell aktivatör eklendi ve pipetaj yapıldı. Peptivatör ile uyarımlı kültürler 96'lı kuyucuklu plakta $2x10^5$ hücre /200ul besiyeri olacak şekilde eklendi. Besiyerinde FBS yerine hastaların kendi serumları 56ºC'de 30dk inaktive edilerek kullanıldı. Besiyerinin %10'u miktarında inaktive edilmiş serum eklendi. Kuyucuklara 4ul peptivatör eklendi ve pipetaj yapıldı. 72 saat 37ºC'de %5 CO_2 ortamda inkübe edildi.

Hücre kültür Planı

1. Kültür grubu (Lenfosit Proliferasyonu)

Uyarımsız CFSE işaretli Mononükleer Hücreler	CD-mix uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler	Peptivatör uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler

2. Kültür Grubu (Treg)

Uyarımsız Mononükleer Hücreler	CD-mix uyarımlı Mononükleer Hücreler	Peptivatör uyarımlı Mononükleer Hücreler

Treg analizi için inkübasyon işleminden sonra kuyucuklardan hücre süspansiyonları flow tüpüne aktarıldı ve Staining Buffer eklenerek 1600 rpm de 5 dk santrifüj edildi.

Süpernatant atıldı 50ul staining buffer eklendi. 5 ul yüzey markerları, CD45RO-ECD(REF:B49192; Beckman Coulter),CD3-FITC (REF:A07746, Beckman Coulter), CD25-PC5 (REF:IM2646; Beckman Coulter), CD4-APC (REF:B10874; Beckman Coulter) eklendi. Vorteks yapıldıktan sonra 20dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. 3 ml staining buffer eklendi 500g de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı 50 ul FBS ile pellet resüspanse edildi. 2,5ul PerFix-nc Reagent 1 eklenip vorteks yapıldı ve 15dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Vorteks yapıldıktan sonra 150 ul PerFix-nc Reagent 2 eklenir tekrar vorteks yapıldı. 5 ul FOXP3-A647 eklendi ve vorteks yapıldı 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. 3ml 1X PerFix-nc Reagent 3 eklenir 500g de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp 0.5ml PerFix-nc Reagent 3 eklendi ve Flow sitometride okutuldu.

2.5.7 İstatiksel Analiz

Veriler her grupta ortalama (Ort) ± standart deviasyon (SD) (minimum-maksimum) değerleri olarak verildi. İkiden fazla grup verilerinin bir arada karşılaştırılması için Three-way ANOVA analizi yapıldı. Dönüştürülmüş tanımlayıcılar Tukey testi ve Post Hoc testi uygulandı. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student *t* testi kullanıldı. *P*- değeri ≤ 0.05 değerler anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1 Klinik Bulgular

Çalışmamıza dahil edilme kriterlerini taşıyan gönüllü hastaların klinik bulguları aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.1: Aşısız PCR + hastaların klinik bulguları

Aşısız Hasta Grubu								
Hasta No	**Hastalık Şiddeti**	**Hastanede Kalış Süresi**	**Lenfosit sayısı**	**Lenfosit %**	**CRP**	**Ferritin**	**D-dimer**	**Yaş**
1	1	8 gün	1100	16,0	130	704	2,63	22
2	2B	6 gün	1700	33,9	66	345	0,22	74
3	2A	5 gün	500	11,2	83	167	8,11	69
4	2B	11 gün	1100	16,8	113	976	0,39	40
5	2A	3 gün	1400	31,7	13	191	0,09	76
6	2A	11 gün	3300	30,5	26	205	0,53	71
7	1	Ayaktan	2500	26,8	1,19	-	-	26
8	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	25
9	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	45
10	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	24
11	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	33
12	1	9 gün	1200	9,6	113	725	1,51	29
13	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	89
14	2B	10 gün	800	9,6	102	380	1,2	28
15	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	65
16	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	29

Tablo 3.2: Aşılı PCR + hastaların klinik bulguları

Aşılı Hasta Grubu								
Hasta No	**Hastalık Şiddeti**	**Hastanede Kalış Süresi**	**Lenfosit sayısı**	**Lenfosit %**	**CRP**	**Ferritin**	**D-dimer**	**Yaş**
1	1	2	2000	35,6	0,6	85	0,37	23
2	2 B	11 gün	800	8,8	91	185	0,92	56
3	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	21
4	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	25
5	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	25
6	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	28
7	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	24
8	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	24
9	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	30
10	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	53
11	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	29
12	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	27
13	1	Ayaktan	-	-	-	-	-	56

3.2 Tam Kan İmmünfenotipleme Bulguları

Çalışmamızda aşılı ve aşısız SARS-CoV-2 PCR pozitif hastaların venöz kanlarından izole edilen PKMH'lerinde lenfosit alt gruplarına bakılmıştır. Analiz edilen lenfosit alt grupları ve akım sitometri antikorları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.3: Lenfosit alt grupları ve yüzey işaretleri

Lenfosit alt grubu	Yüzey işaretleri	Antikor
T Hücresi	CD3+	anti-CD3 PercP
Sitotoksik T hücresi	CD3+CD8+	anti-CD3 PercP anti CD8 APC
Yardımcı T hücresi	CD3+CD4+	anti-CD3 PercP anti-CD4 Pe
Naive Sitotoksik T hücresi	CD8+CD45RA+	anti-CD8 APC anti-CD45RA FİTC
Memory Sitotoksik T hücresi	CD8+CD45RO+	anti-CD8 APC anti-CD45RO PE
Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer-NK)	CD3-CD16+56+	anti-CD3 FITC anti-CD16+56 PE
NKT hücreleri	CD3+CD16+56+	anti-CD3 FITC anti-CD16+56 PE
B Hücresi	CD3-CD19+	anti-CD3 APC anti-CD19 KO
Regülatör T hücresi	CD4+CD25+FoxP3+	anti-CD4 A700 anti-CD25 PC5 anti-FOXP3 APC

3.2.1 T hücre alt grupları ile ilgili bulgular

Bu çalışmada aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarında T hücre alt grupları araştırılmıştır. Çalışmamız kapsamında COVID-19 hastalarından alınan periferal kanlarından 0. günde akım sitometri cihazında CD3, CD4, CD45RA, CD45RO markerları analiz edilmiştir.

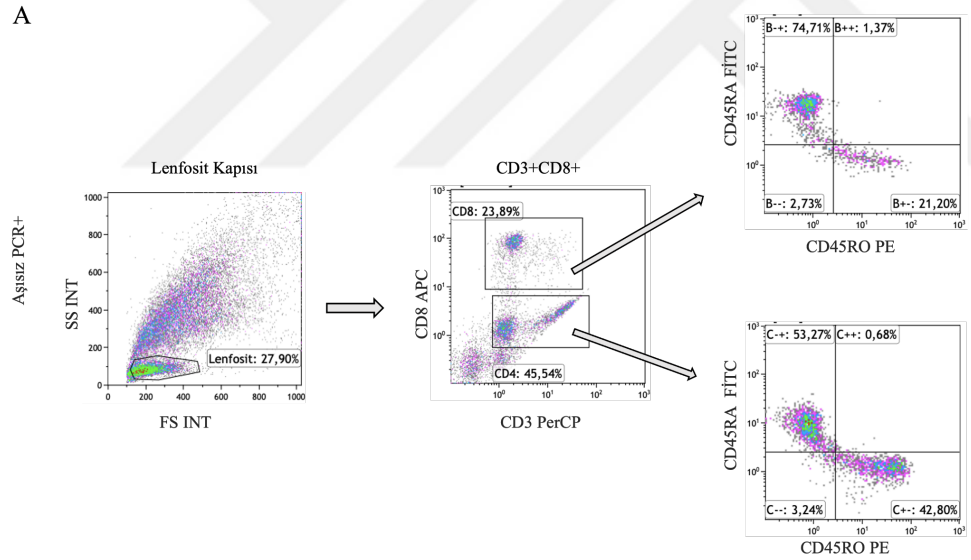
Aşısız COVID-19 hastalarında CD4/CD8 hücre oranı ortalama 2.1 (±0.8), aşılı COVID-19 hastalarında CD4/CD8 hücre oranı ortalama 2.0 (±0.7) bulunmuştur.
Aşısız COVID-19 hastalarında CD3+ T hücresi , yardımcı T hücresi ve sitotoksik T hücresinin yüzdesinin ortalaması ile (91.4 ±5.7, 47.4 ±8.37 ve 25.9 ±9.95) aşılı COVID-19 hastalarının hücre yüzdelerinin ortalaması (90.6 ±6.69, 45.8 ±9.44 ve 24.5 ±5.43) ile karşılaştırıldığında i farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

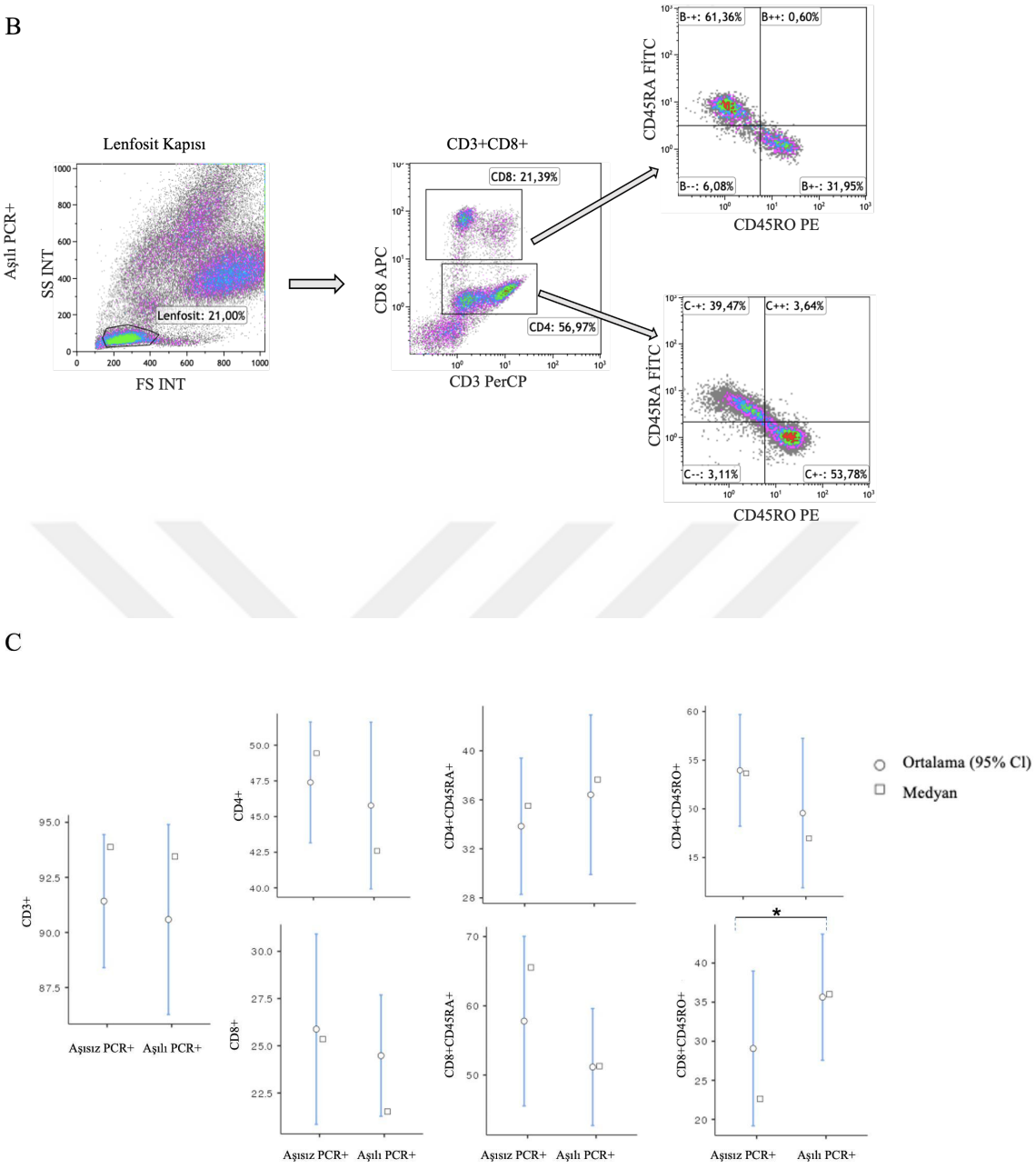
3.2.1.1 Aşılı COVID-19 PCR+ hastalarında Sitotoksik Bellek T hücre oranı yüksek bulundu

Bu çalışmamızda yardımcı T hücresi ve sitotoksik T hücresinin naif ve bellek hücre yüzdelerinin oranları karşılaştırılmıştır.

Aşısız COVID-19 hastalarında yardımcı naif ve bellek hücrelerinin yüzdelerinin oranlarının ortalaması 33.8 (±10.99) ve 52.4 (±9.87) aşılı COVID-19 hastalarında ise 36.4 (±11.02) ve 49.6 (±12.98) bulunmuştur. Aşılı ve aşısız hasta grubunda naif ve bellek hücreleri arasında olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Aşısız COVID-19 hastalarında sitotoksik naif ve bellek hücrelerinin yüzdelerinin oranlarının ortalaması (61.0 ±16.42 ve 23.8 ss14.67) aşılı COVID-19 hastalarında ise (51.2 ±14.3 ve 38.1 ±11.58) bulunmuştur. Aşılı COVID-19 hastalarında sitotoksik bellek T hücresi anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).





Şekil 3.1: Lenfosit kapılama stratejisi ve $CD3^+$, yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri, naive ve bellek T hücrelerinin oranları. A) Aşısız PCR+ COVID-19 hastalarının yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T hücrelerinden seçilen naive ve bellek T hücrelerinin akım sitometri analizi gösterilmiştir. B) Aşılı PCR+ COVID-19 hastalarının yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T hücrelerinden seçilen naive ve bellek T hücrelerinin akım sitometri analizi gösterilmiştir. C) İstatiksel verilere göre aşılı COVID-19 hastalarının sitotoksik bellek T lenfosit oranları ($CD8^+CD45RO^+$) aşısız COVID-19 hastalarına göre anlamlı yüksektir *($p<0.05$).

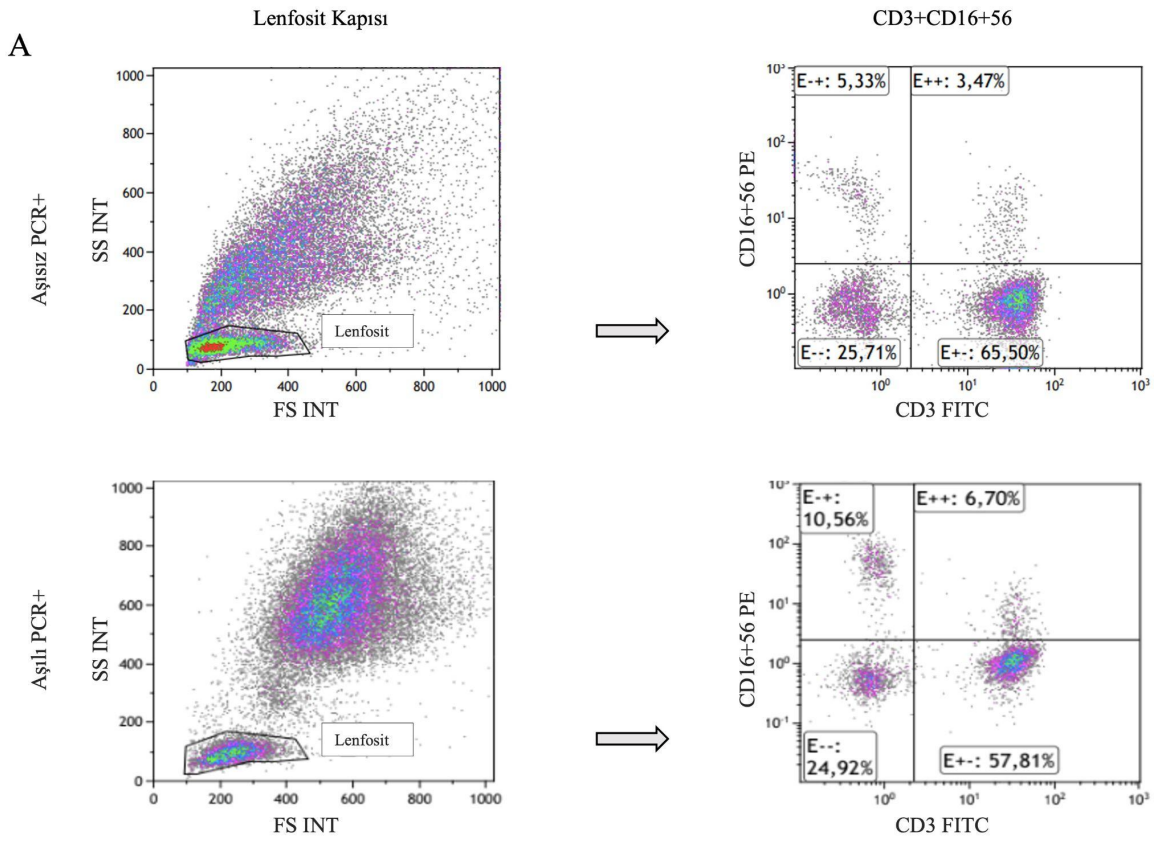
Tablo 3.4: Aşılı ve Aşısız PCR + COVID-19 hastalarının T hücresi alt gruplarının hücre yüzdeleri

					Shapiro-Wilk	
	Hasta Grubu	**N**	**Ortalama**	**SD**	**W**	**p**
CD3+	**AşısızPCR+**	14	91.4	5.77	0.856	0.027
	Aşılı PCR+	10	90.6	6.96	0.762	0.005
CD4+	**AşısızPCR+**	15	47.4	8.37	0.960	0.687
	Aşılı PCR+	10	45.8	9.44	0.920	0.353
CD8+	**AşısızPCR+**	15	25.9	9.95	0.910	0.135
	Aşılı PCR+	11	24.5	5.43	0.704	< .001
CD4+CD45RA+	**AşısızPCR+**	15	33.8	10.99	0.961	0.703
	Aşılı PCR+	11	36.4	11.02	0.882	0.112
CD4+CD45RO+	**AşısızPCR+**	14	52.4	9.87	0.946	0.495
	Aşılı PCR+	11	49.6	12.98	0.920	0.321
CD8+CD45RA+	**AşısızPCR+**	14	61.0	21.55	0.895	0.095
	Aşılı PCR+	11	51.2	14.30	0.981	0.970
CD8+CD45RO+	**AşısızPCR+**	13	23.8	14.67	0.895	0.114
	Aşılı PCR+	10	38.1	11.58	0.967	0.858

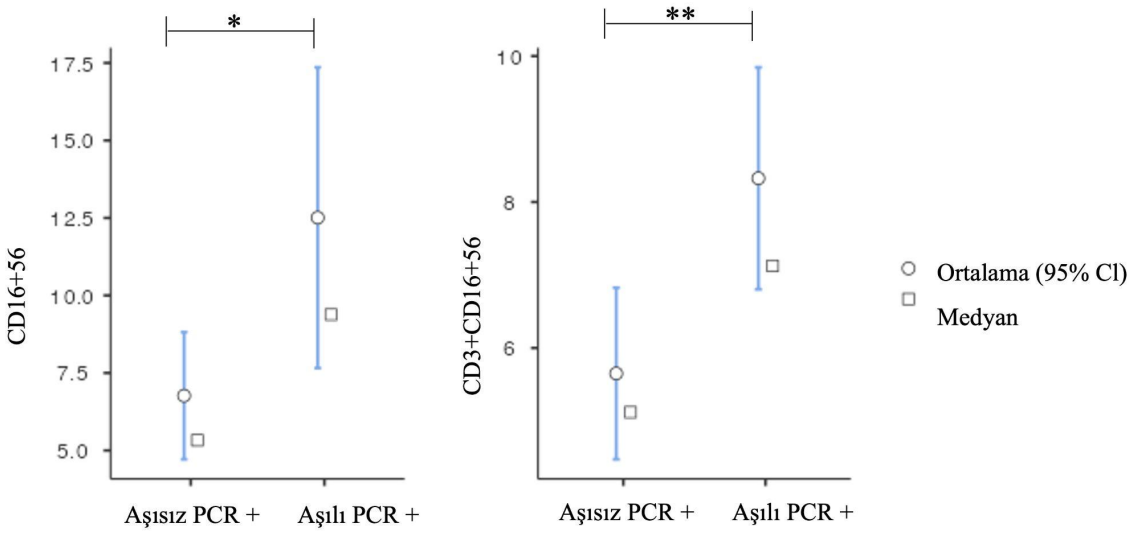
3.2.2 Doğal öldürücü (NK) ile ilgili bulgular

Bu çalışmada aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarında NK ve NKT hücrelerinin yüzde oranı araştırılmıştır. Çalışmamız kapsamında COVID-19 hastalarından alınan periferal kanlarından 0. günde akım sitometri cihazında CD3 FİTC, CD16+56 PE markerları analiz edilmiştir.

Aşılı COVID-19 hastalarında CD16+56 ve CD3+CD16+56 hücre yüzdeleri 12.51(±7.83) ve 8.32(±2.19) ile aşısız COVID-19 hastalarının CD16+56 ve CD3+CD16+56 hücre yüzdeleri 6.77 (±3.78) ve 5.65 (±2.16) ile olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



B



Şekil 3.2. Lenfosit kapılama stratejisi ve (NK) CD16+56, (NKT) CD3+CD16+56 hücrelerinin oranı A)Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarının NK ve NKT hücrelerinin akım sitometri analizi. B) İstatiksel verilere göre aşılı COVID-19 hastalarının NK ve NKT hücreleri aşısız COVID-19 hastalarının NK ve NKT hücrelerine göre anlamlı yüksek bulunmuştur *p<0.05, **p<0.05.

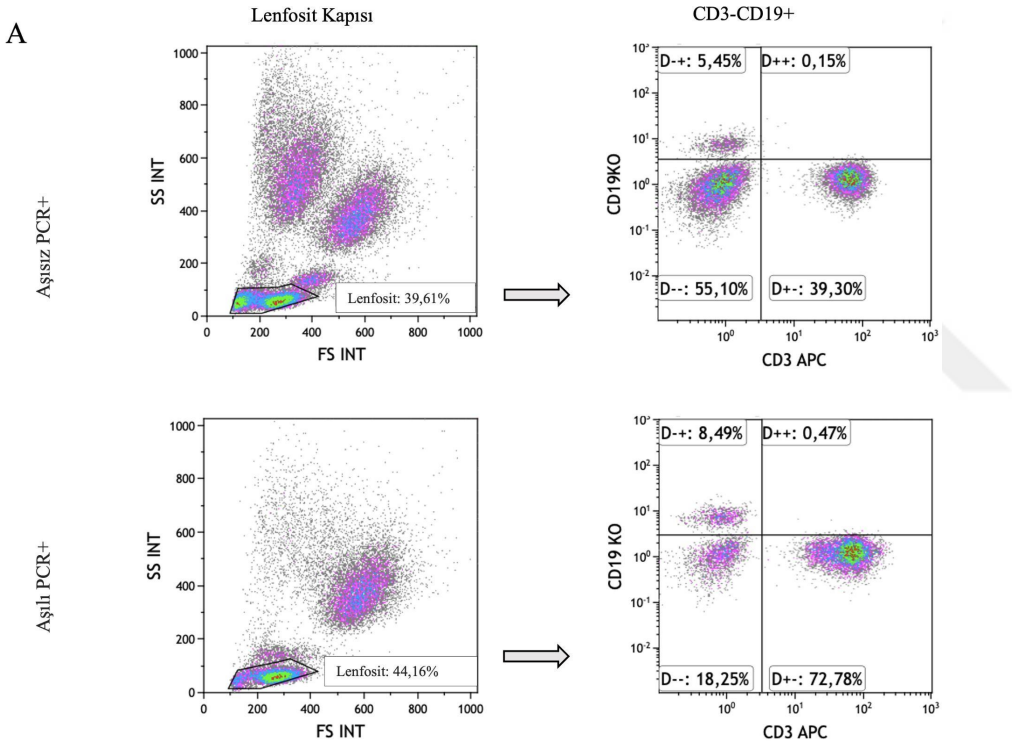
Tablo 3.5: Aşılı ve Aşısız COVID-19 hastalarının NK ve NKT hücre yüzdeleri

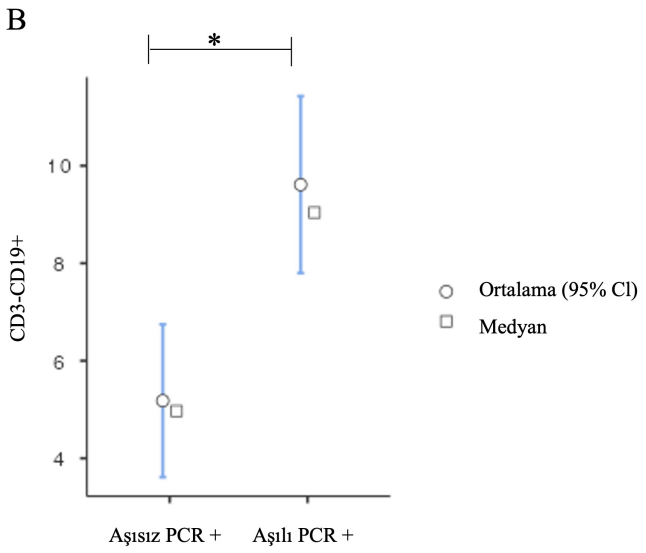
					Shapiro-Wilk	
	Hasta grubu	**N**	**Ortalama**	**SD**	**W**	**p**
CD16+CD56+	**Aşısız**	**13**	**6.77**	**3.78**	**0.863**	**0.042**
	Aşılı	**10**	**12.51**	**7.83**	**0.702**	**< .001**
CD3+CD16+56	**Aşısız**	**13**	**5.65**	**2.16**	**0.962**	**0.781**
	Aşılı	**8**	**8.32**	**2.19**	**0.818**	**0.044**

3.2.3 B lenfositleri ile ilgili bulgular

Bu çalışmada aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarında B lenfositlerinin yüzde oranı araştırılmıştır. Çalışmamız kapsamında COVID-19 hastalarından alınan periferal kanlarından 0. günde akım sitometri cihazında CD3 FİTC, CD19 KO markerları analiz edilmiştir.

Aşısız COVID-19 hastalarında CD3-CD19+ hücre ortalaması 5.18(±2.88) ile aşılı COVID-19 hastalarının CD3-CD19+ hücre ortalaması 9.61'den (±2.78) anlamı düşük bulunmuştur ($p<0.05$).





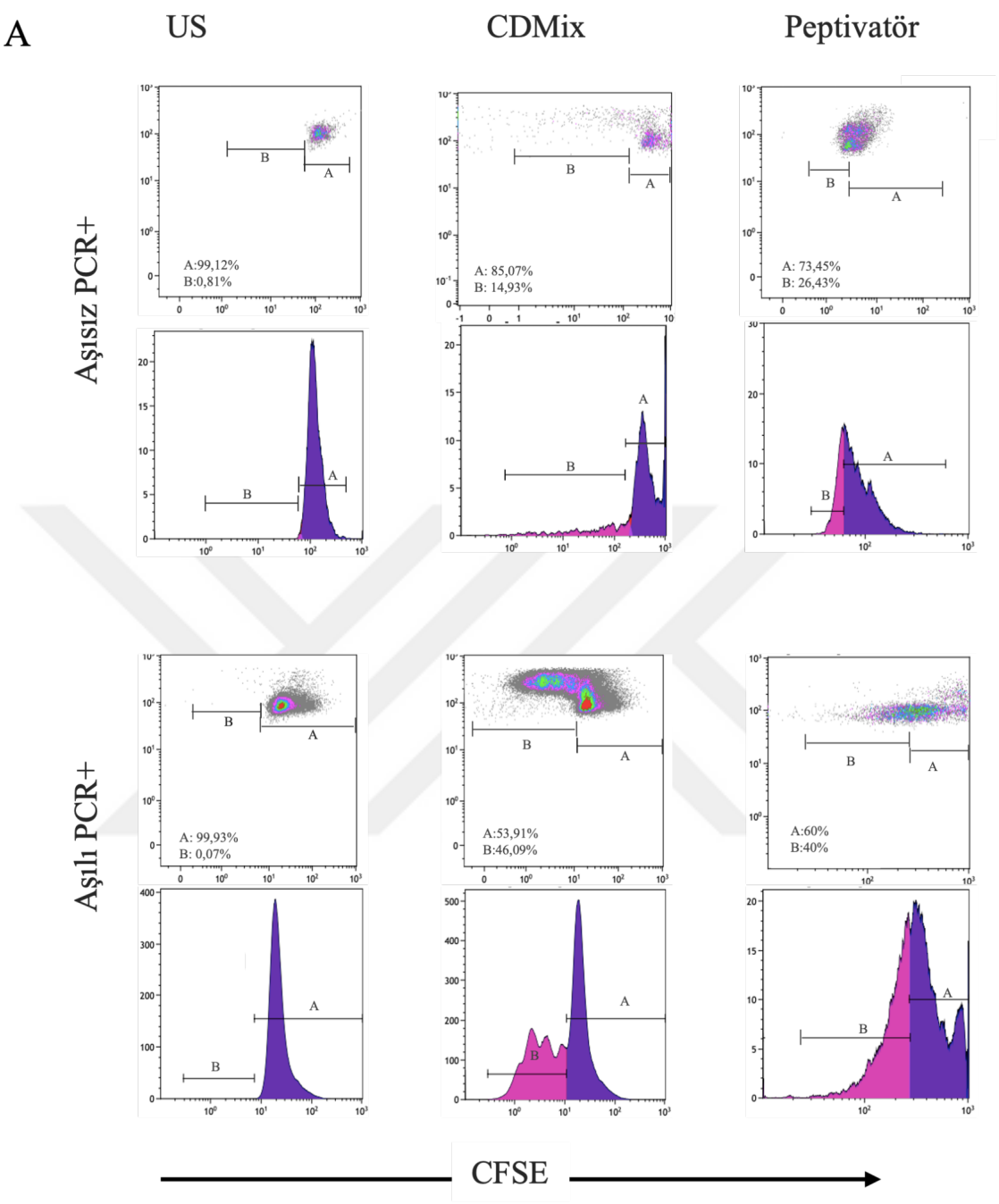
Şekil 3.3. Lenfosit kapılama stratejisi ve B Lenfositlerinin oranı. A) Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarının B Lenfositlerinin akım sitometri analizleri. B) İstatiksel verilere göre aşılı COVID-19 hastalarının B lenfosit oranları Aşısız COVID-19 hastalarının B lenfosit oranlarından anlamlı yüksek bulunmuştur *p<0.05.

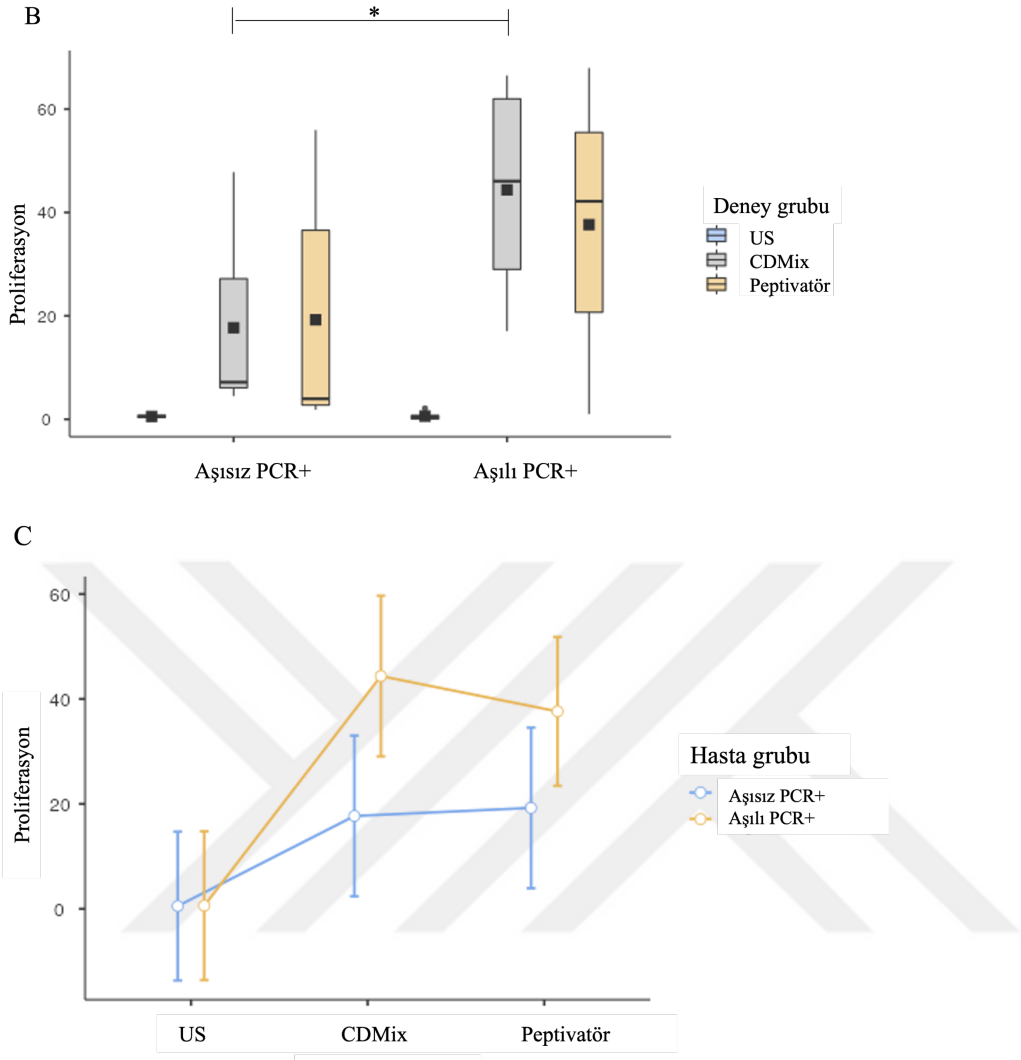
Tablo 3.6: Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarının B lenfositlerinin yüzdeleri

						Shapiro-Wilk	
	Hasta grubu	**N**	**Ortalama**	**Medyan**	**SD**	**W**	**p**
CD19	**AşısızPCR+**	13	5.18	4.97	2.88	0.973	0.925
	Aşılı PCR+	9	9.61	9.04	2.78	0.839	0.057

3.3 Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarında lenfosit proliferasyonuna ait bulgular

Bu çalışmada mRNA aşısının COVID-19 hastalarına ait mononükleer hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi araştırılmaktadır. CFSE ile boyanan mononükleer hücrelerin bir grubu uyarılmadan kültür edildi (US) diğer gruplar ise CD-mix, Peptivatör ile uyarılarak kültür edildi. İnkübasyon sonrasında toplanan mononükleer hücreler flow sitometri ile okutuldu. Elde edilen verilere göre aşısız COVID-19 hastalarının US kültürleri (0.54 ±0.35) ile aşılı COVID-19 hastalarının US mononükleer hücre kültürlerinin (0.6 ±0.74) proliferasyonunda anlamlı bir değişiklik olmadı ($p>0,05$). Aşısız COVID-19 hastalarının CD-mix kültürleri (17.7 ±18.5) aşılı COVID-19 hastalarının CD-mix mononükleer hücre kültürlerinin (44.37 ±20.57) proliferasyonuna göre anlamlı düşük bulunmaktadır ($p<0,05$). Aşısız COVID-19 hastalarının Peptivatör ile uyarılmış kültürleri (19.24 ±25.2) aşılı COVID-19 hastalarının Peptivatör ile uyarılmış mononükleer hücre kültürlerinin (37.63 ±26.5) proliferasyonuna göre aralarında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).(Şekil 3.4)


A
US
CDMix
Peptivatör
Aşısız PCR+
Aşılı PCR+
A:99,12%
B:0,81%
A: 85,07%
B: 14,93%
A: 73,45%
B: 26,43%
A: 99,93%
B: 0,07%
A:53,91%
B:46,09%
A:60%
B:40%
CFSE



Şekil 3.4: Aşılı ve aşısız PCR+ hastalarına ait lenfosit proliferasyonu. A) Aşılı ve aşısız PCR+ hastalarından elde edilen PKMH'lerin uyarılmamış (US), CD-mix uyarımlı ve peptivatör ile uyarımlı hücrelerin akım sitometri analizleri gösterilmiştir. CFSE ile işaretlenen PKMH'ler histogramda sola doğru prolifere olan hücrelerin oranını göstermektedir. B) CD-mix uyarımlı lenfosit proliferasyonu aşılı COVID-19 hastalarında aşısız hasta grubuna göre anlamlı yüksek bulunmaktadır (* $p<0,05$).C)Aşılı ve aşısız PCR+ hastalarından elde edilen PKMH'lerin uyarılmamış (US), CD-mix uyarımlı ve peptivatör ile uyarımlı lenfosit proliferasyonun karşılaştırılması.

Tablo 3.7: Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarının mononükleer hücrelerinin proliferasyon oranları

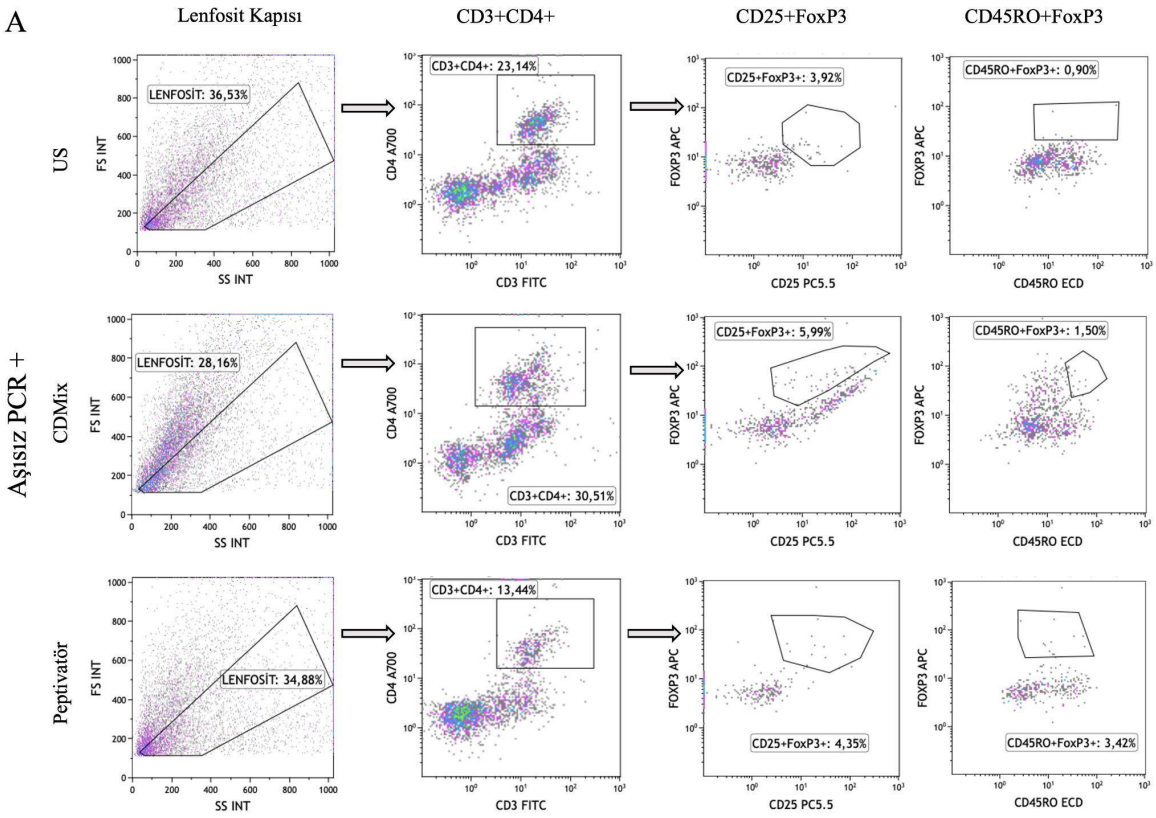
Hasta grubu	Deney Grubu	N	Ortalama	SD	Shapiro-Wilk	
					W	p
AşısızPCR+	**US**	7	0.536	0.349	0.920	0.469
	CD-mix	6	17.698	18.461	0.750	0.020
	Pep	6	19.243	25.170	0.711	0.008
Aşılı PCR+	**US**	7	0.599	0.738	0.808	0.049
	CD-mix	6	44.370	20.566	0.919	0.498
	Pep	7	37.634	26.540	0.878	0.220

3.4 Aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarında CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücre oranını ve CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücrelerine ait bulgular

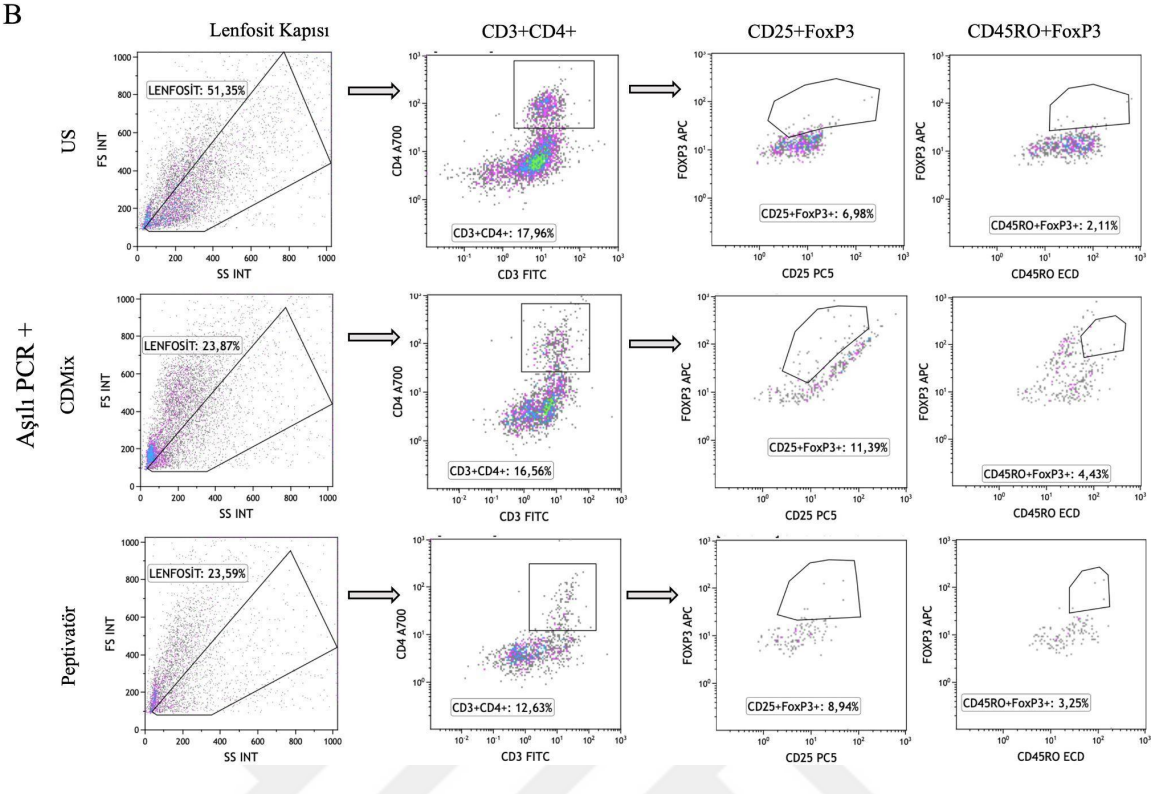
Bu çalışmada aşılı ve aşısız COVID-19 hastalarına ait regülatör hücreleri ve bellek T hücreleri araştırılmaktadır. COVID-19 hastalarının venöz kanından elde edilen PKMH ler uyarılmadan (US) ve CD-mix, Peptivatör ile uyarılarak kültür edildi. 72 saat inkübasyon sürecinin ardından mononükleer hücreler akım sitometri cihazında okutuldu. Elde edilen verilere göre aşısız COVID-19 hastaların US (3.15 ±0.7) kültür edilen CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücreleri aşılı COVID-19 hastalarının US (4.59 ±2.48) kültürleri arasında anlamlı fark görülmemiştir($p>0.05$). Aşısız COVID-19 hastaların CD-mix (6.73 ±2.0) kültür edilen CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücreleri ile aşılı COVID-19 hastaların CD-mix (8.9 ±5.4) kültürleri arasında anlamlı fark görülmemiştir($p>0.05$) Aşısız COVID-19 hastalarının peptivatör uyarımlı (9.4 ±2.7) kültür edilen CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücreleri ile aşılı COVID-19 hastalarının peptivatör uyarımlı kültürleri (7.1 ±2.8) arasında istatiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir($p>0.05$)

Elde edilen verilere göre aşısız COVID-19 hastalarının US kültür edilen CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücreleri 1,71 (±0,9) ile aşılı COVID-19

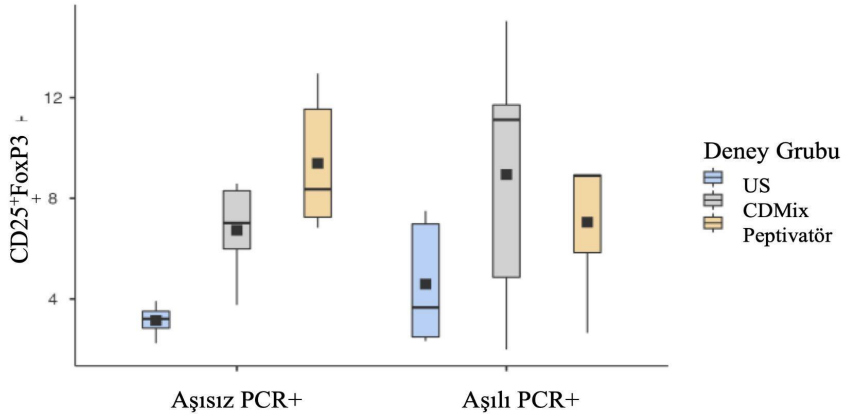
hastalarının US kültürleri 2,27 (±1,2) ile aralarında istatiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p>0,05). Aşısız COVID-19 hastalarının CD-mix ile kültür edilen CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücreleri 2,84 (±1,4) ile aşılı COVID-19 hastalarının CD-mix kültürü 2,55'den (±2,16) ile istatiksel açıdan anlamlı fark görülmedi (p>0,05). Aşısız COVID-19 hastalarının Peptivatör ile kültür edilen CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücre ortalaması 5,53 (±2,8) ile aşılı COVID-19 hastalarının Peptivatör kültürü 4,13'den (±2,16) ile anlamlı fark görülmedi (p>0,05). (Şekil 3.5)



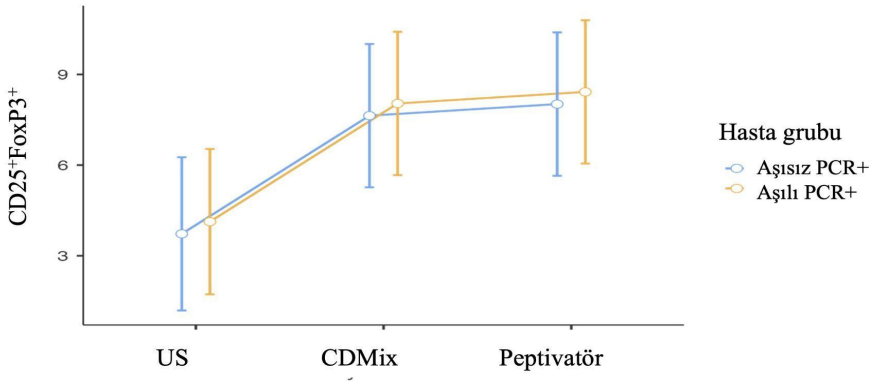
B

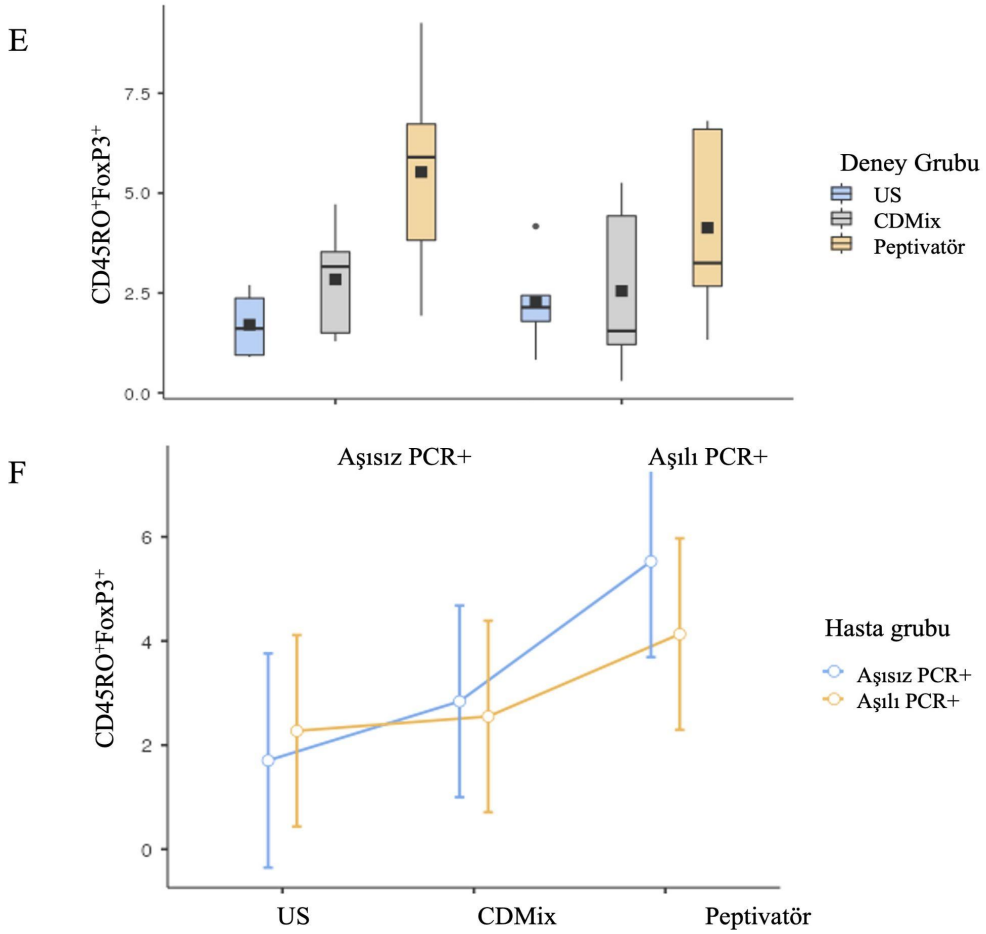

Lenfosit Kapısı
CD3+CD4+
CD25+FoxP3
CD45RO+FoxP3
Aşılı PCR +
US
CDMix
Peptivatör
LENFOSİT: 51,35%
LENFOSİT: 23,87%
LENFOSİT: 23,59%
CD3+CD4+: 17,96%
CD3+CD4+: 16,56%
CD3+CD4+: 12,63%
CD25+FoxP3+: 6,98%
CD25+FoxP3+: 11,39%
CD25+FoxP3+: 8,94%
CD45RO+FoxP3+: 2,11%
CD45RO+FoxP3+: 4,43%
CD45RO+FoxP3+: 3,25%
FS INT
SS INT
CD4 A700
CD3 FITC
FOXP3 APC
CD25 PC5
CD45RO ECD

C


CD25+FoxP3+
12
8
4
Aşısız PCR+
Aşılı PCR+
Deney Grubu
US
CDMix
Peptivatör

D


CD25+FoxP3+
9
6
3
US
CDMix
Peptivatör
Hasta grubu
Aşısız PCR+
Aşılı PCR+



Şekil 3.5. Aşılı ve aşısız PCR+ hastalarına ait CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücresi ve CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücre oranları. A) Aşısız PCR+ hastalarından elde edilen mononükleer hücrelerin uyarılmamış (US), CD-mix uyarımlı ve peptivatör ile uyarımlı hücrelerin akım sitometri analizleri gösterilmiştir. CD3 FİTC, CD4 A700, CD25ECD, CD45RO ve FoxP3 APC ile işaretlenen T lenfositlerinin kapılama stratejisi gösterilmiştir. B) Aşılı PCR+ hastalarından elde edilen mononükleer hücrelerin uyarılmamış (US), CD-mix uyarımlı ve peptivatör ile uyarımlı hücrelerin akım sitometri analizleri gösterilmiştir. CD3, CD4,CD25, CD45 ve FoxP3 ile işaretlenen T lenfositlerinin kapılama stratejisi gösterilmiştir. C) CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T lenfositlerinin aşısız ve aşılı PCR+ hastalarındaki karşılaştırılması. D) CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T lenfositlerinin deney grupları arasındaki karşılaştırılması. E) CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T lenfositlerinin ortalamalarının aşısız ve aşılı PCR+ hastalarındaki karşılaştırılması F)

CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T lenfositlerinin ortalamalarının deney grupları arasındaki karşılaştırılması

Tablo 3.8: Aşılı ve aşısız COVID 19 hastalarının CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücre yüzdeleri ve CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücre yüzdeleri

						Shapiro-Wilk	
	Hasta Grubu	**Deney Grubu**	**N**	**Ortalama**	**SD**	**W**	**p**
CD25+FoxP3+	**AşısızPCR+**	**US**	4	3.15	0.704	0.987	0.943
		CD-mix	5	6.73	1.958	0.922	0.544
		Peptivatör	5	9.39	2.719	0.883	0.324
	Aşılı PCR+	**US**	5	4.59	2.478	0.832	0.143
		CD-mix	5	8.94	5.352	0.931	0.601
		Peptivatör	5	7.05	2.800	0.774	0.049
CD45RO+FoxP3+	**Aşısız PCR+**	**US**	4	1.71	0.913	0.844	0.209
		CD-mix	5	2.84	1.441	0.923	0.550
		Peptivatör	5	5.53	2.801	0.990	0.981
	Aşılı PCR+	**US**	5	2.27	1.221	0.948	0.722
		CD-mix	5	2.55	2.164	0.886	0.336
		Peptivatör	5	4.13	2.451	0.877	0.296

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada mRNA aşısı olmuş ve olmamış COVID-19 hastalarından alınan venöz periferal kandan immünfenotipleme analizi ve venöz periferal kandan elde edilen mononükleer hücrelerin immünolojik etkinliğinin *in vitro* ortamda araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında COVID-19 hastalarından alınan peripheral kandan immünolojik analizler yapılmıştır. EDTA'lı kan tüpü ile alınan periferal kan ile immünfenotipleme analizleri yapılmıştır. Heparinli kan tüpü ile alınan periferal kandan mononükleer hücreler izole edilerek uyarımlı ve uyarımsız kültür sürecinin ardından akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Çalışmamızda COVID-19 hastaları PCR testi pozitif olmadan 90 gün ve daha fazla süre önce aşı olanlar aşısız grup kabul edilmiştir, 90 günden daha kısa süre önce aşı olanlar ise aşılı grup olarak kabul edilmiştir.

COVID-19 hastalarında gelişen lenfopeni, eozinopeni hastalığın patolojisi ve şiddetinin derecesi ile ilişkilendirilen önemli belirteçler olarak görülmektedir (Azkur, 2020) Hafif evrelerde veya hafif semptomlarla hastaneye başvuran hastalarda lenfosit sayısının şiddetli evrelerde gelen hastalara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Cao, 2020). Viral enfeksiyon sırasında immünolojik işlevlerde rol oynayan , CD4+ ve CD8+ T lenfosit popülasyonları , hem doğuştan gelen bağışıklığın viral replikasyonu içerme yeteneğini hem de antikorların enfeksiyonu önleme yeteneğini göstermektedir. (Sette ve Crotty, 2021). COVID-19 hastalarında immünfenotipleme çalışması yapan Gülüm ve arkadaşları yaptığı çalışmada hastaneye başvuran 18-71 yaş aralığında rastgele seçilen 54 hastadan elde edilen veriler CD3+ T-lenfosit %73,96 ±7,96, CD4+T-lenfosit %45.06±10.22, CD8+ T lenfosit %25.72±8.58, CD4/CD8 oranı 1.89±0.85, CD19 %9.82±4.45, CD56 % 14.38±6.28 olarak rapor etmişlerdir (Gülüm ve ark. 2021).
Yaman ve arkadaşlarının 220 sağlıklı bireyde yaptığı çalışmaya göre CD3+ T lenfosit %72.7±8.44, CD4+ T lenfosit %47.37±9.1, CD8 T lenfosit %28.99±5.99, CD4/CD8 oranı 1.68±0.43, CD19 %10.96±4.44, CD56 %7.03±3.26 olarak rapor etmişlerdir (Yaman ve ark., 2005).

Bu çalışmada aşılı (n=11) ve aşısız (n=15) COVID-19 hastalarında CD3+, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). CD3+ T lenfositleri hem aşısız COVID-19 hastalarında %91.4±5.77 hem de aşılı COVID-19 hastalarında %90.6±6.96 Yaman ve arkadaşlarının sağlıklı bireylerde yaptığı çalışmaya göre yüksek bulunmuştur. CD4+ T lenfositleri aşısız COVID-19 hastalarında % 47.4 ±8.37 ve aşılı COVID-19 hastalarında % 45.8 ± 9.44 ile sağlıklı bireylerin CD4+ T lenfosit yüzdelerine yakın değere sahip olduğu görülmüştür. CD8+ T lenfositleri aşısız COVID-19 hastalarında %25.9±9.95 ve aşılı COVID-19 hastalarında %24.5 ± 5.43 ile sağlıklı bireylerle yapılan çalışmaya göre yakın değerlere sahip olduğu görülmüştür. Aşısız COVID-19 hastalarında CD4/CD8 hücre oranı 2.1± 0.8 ve aşılı COVID-19 hastalarında CD4/CD8 hücre oranı 2.0±0.7 ile sağlıklı bireylerle yapılan çalışmaya göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada COVID-19 hastalığında ağır klinik tablo sergileyen hastalarda doğal öldürücü hücreler ve B lenfositlerinde azalma görülmüştür, bu çalışmada aşılı COVID-19 hastalarının doğal öldürücü hücreleri % 12.51(±7.83) ve B lenfositleri %9.61 (±2.78) ile aşısız COVID-19 hastalarının CD16 +56 hücre %6.77 (±3.78) ve CD19 hücrelerine %5.18(±2.88) göre istatiksel açıdan daha yüksek olduğunu gözlemledik ($p<0.05$).

Qin ve arkadaşlarının 452 COVID-19 hasta da yaptığı çalışmada CD3+CD4+CD45RA + 40.7±13.3, CD3+CD4+CD45RO+ 59.3 ±13.3 şeklinde raporlanmıştır. Bellek T hücreleri, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna veya aşılamaya karşı daha hızlı yanıtları teşvik edebilir ve nötralize edici antikorların oluşumunu arttırarak bu tür çapraz reaktif hücreleri taşıyan bireylere fayda sağladığı bildirilmiştir (Jarjour ve ark., 2021). Bu çalışmada ise aşısız COVID-19 hastalarında (n=15) CD3+CD4 +CD45RA+ T hücreleri 33.8±10.99 aşılı COVID-19 hastalarının (n=11) CD3+CD4 +CD45RA+ T hücreleri 36.4±11.02 ile düşük bulunmuştur, iki hasta grubu arasında istatiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$).

Aşısız COVID-19 hastalarında CD3+CD4+CD45RO+ T hücreleri 52.4 ± 9.87 ile aşılı COVID-19 hastalarının CD3+CD4+CD45RO+ T hücreleri 49.6±12.98 ile yüksek bulunmuştur, iki hasta grubu arasında istatiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$).

Aşısız COVID-19 hastalarında CD3+CD8+CD45RA+ T hücreleri 61.0±21.55 ile aşılı COVID-19 hastalarında CD3+CD8+CD45RA+ T hücreleri 51.2±14.3 ile yüksek

bulunmuştur, iki hasta grubu arasında istatiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir($p>0.05$).
Aşılı COVID-19 hastalarında (n=13) CD3+CD8+CD45RO+ hücreleri aşısız (n=10) gruba göre istatiksel açıdan anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Ortiz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre SARS-COV-2 virüsüne ait 250 ng/mL S, N ve 25 nM P protein ile kültür edilen sağlıklı bireylerden alınan mononükleer hücre proliferasyon yeteneğinin düşük olduğu görülmüştür (Ortiz ve ark., 2020). Bu çalışmada aşısız COVID-19 hastalarının (n=6) CD-mix kültürleri (17.7 ±18.5) aşılı COVID-19 hastalarının (n=6) CD-mix mononükleer hücre kültürlerinin (44.37 ±20.57) proliferasyonuna göre istatiksel açıdan anlamlı düşük bulunmaktadır ($p<0,05$). Aşısız COVID-19 hastalarının Peptivatör ile uyarılmış kültürleri (19.24 ±25.2) aşılı COVID-19 hastalarının Peptivatör ile uyarılmış mononükleer hücre kültürlerinin (37.63 ±26.5) proliferasyonuna göre daha düşük görüldü, aralarında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Qin ve arkadaşlarının 452 COVID-19 hastasında yaptığı çalışmada regülatör T hücreleri 4.1±1.2, naive regülatör T hücreleri 1.0±0.5 olarak raporlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre aşısız COVID-19 hastaların (n=4) US kültür edilen CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücreleri 3.15 ±0.7 aşılı (n=5) COVID-19 hastalarının US kültürleri 4.59 ±2.48 ile daha düşüktür, iki hasta grubu arasında istatiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir($p>0.05$). Aşısız COVID-19 hastaların CD-mix kültür edilen CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücreleri yüzdeleri 6.73 ±2.0 ile aşılı COVID-19 hastaların CD-mix kültürlerine 8.9 ±5.4 ile göre daha düşüktür, iki hasta grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir($p>0.05$) Aşısız COVID-19 hastalarının peptivatör uyarımlı kültür edilen CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regülatör T hücrelerinin yüzdeleri 9.4±2.7 ile aşılı COVID-19 hastalarının peptivatör uyarımlı kültürleri 7.1 ±2.8 ile iki hasta grubu arasında istatiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir($p>0.05$)

Elde edilen verilere göre aşısız COVID-19 hastalarının US kültür edilen CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücrelerinin yüzdeleri 1.71±0.9 ile aşılı COVID-19 hastalarının US kültürlerinin hücre yüzdeleri 2.27 ±1.2 ‘den daha düşük

bulunmuştur, aralarında istatiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir (p>0,05). Aşısız COVID-19 hastalarının CD-mix ile kültür edilen CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücreleri 2,84 ±1,4 ile aşılı COVID-19 hastalarının CD-mix kültürü 2,55 ±2,16 ile istatiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir (p>0,05). Aşısız COVID-19 hastalarının Peptivatör ile kültür edilen CD3+CD4+CD45RO+FoxP3+ bellek T hücre ortalaması 5,53±2,8 ile aşılı COVID-19 hastalarının Peptivatör kültürü 4,13±2,16 ile istatiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (p>0,05).

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, (2022) Temel İmmünoloji, İmmün Sistem İşlevleri ve Bozuklukları, 6. Baskı, Güneş Tıp Kitap evleri
- Alter, G., & Altfeld, M. (2006). Perspective natural killer cells: bridging innate and adaptive immunity?. IAVI report : newsletter on international AIDS vaccine research, 10(3), 1–10.
- Avendaño-Ortiz, J., Lozano-Rodríguez, R., Martín-Quirós, A., Maroun-Eid, C., Terrón, V., Valentín, J., Montalbán-Hernández, K., Ruiz de la Bastida, F., García-Garrido, M. A., Cubillos-Zapata, C., Del Balzo-Castillo, Á., Aguirre, L. A., & López-Collazo, E. (2020). Proteins from SARS-CoV-2 reduce T cell proliferation: A mirror image of sepsis. Heliyon, 6(12), e05635. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05635
- Azkur, D., & Azkur, A. K. (2020). COVID-19 hastalığının immünopatolojisi ve immünolojisindeki güncel veriler. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, *36*.
- Bao J, Li C, Zhang K, Kang H, et al., 2020. Comparative analysis of laboratory indexes of severe and non-severe patients infected with COVID-19. Clin Chim Acta, 509, 180-194.
- Barton, L. M., Duval, E. J., Stroberg, E., Ghosh, S., & Mukhopadhyay, S. (2020). Covid-19 autopsies, oklahoma, usa. American journal of clinical pathology, 153(6), 725-733.
- Cao, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. Nat Rev Immunol 20, 269–270 (2020). https://doi.org/10.1038/s41577-020-0308-3
- Chen, Z., & John Wherry, E. (2020). T cell responses in patients with COVID-19. Nature Reviews Immunology, 20(9), 529-536.
- Cizmecioglu, A., Akay Cizmecioglu, H., Goktepe, M. H., Emsen, A., Korkmaz, C., Esenkaya Tasbent, F., Colkesen, F., & Artac, H. (2021). Apoptosis-induced T-cell lymphopenia is related to COVID-19 severity. Journal of medical virology, 93(5), 2867–2874. https://doi.org/10.1002/jmv.26742
- Costela-Ruiz VJ et al. (2020) SARS-CoV-2 infection: the role of cytokines in COVID-19 disease. Cytokine & Growth Factor Reviews 54, 62–75.

- De Vito A, Fiore V, Princic E, Geremia N, Panu Napodano CM, Muredda AA, et al. Predictors of infection, symptoms development, and mortality in people with SARS-CoV-2 living in retirement nursing homes. PLoS ONE. 2021;16(3): e0248009.
- Deniz G, NK ve NKT hücreler, Turkiye Klinikleri J Int Med Sci. 2007;3(43):18-25
- Diniz G, Yaşın Y, Çoban C, Evcimen Ş, Karakayalı M. Immune System: Is a Trusted Friend, is a Collaborative Enemy? Forbes J Med 2022;3(1):1-9
- Grifoni, A., Sidney, J., Vita, R., Peters, B., Crotty, S., Weiskopf, D., & Sette, A. (2021). SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19. Cell host & microbe, 29(7), 1076-1092.
- Gülüm, C., Balcı, Ş., Çimen, M. B. Y., Aslan, G., & Tamer, L. COVID-19 Hastalarında İmmün Yanıtta Rol Alan Hücrelerin İmmün Fenotipik Özellikleri.
- Hammer, Q., Cuapio, A., Bister, J., Björkström, N. K., & Ljunggren, H. G. (2023). NK cells in COVID-19—from disease to vaccination. Journal of Leukocyte Biology, qiad031.
- Hasöksüz, M., Kilic, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and sars-cov-2. Turkish journal of medical sciences, 50(9), 549-556.
- Heller, L., Mota, C. R., & Greco, D. B. (2020). COVID-19 faecal-oral transmission: Are we asking the right questions?. Science of the Total Environment, 729, 138919.
- İnandıklıoğlu, N., Akkoc, T. (2020). Immune Responses to SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. In: Turksen, K. (eds) Cell Biology and Translational Medicine, Volume 9. Advances in Experimental Medicine and Biology(), vol 1288. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/5584_2020_549
- Jarjour, N. N., Masopust, D., & Jameson, S. C. (2021). T Cell Memory: Understanding COVID-19. Immunity, 54(1), 14–18. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.009
- Jiang, Y., Chen, H., Loew, M., & Ko, H. (2020). COVID-19 CT image synthesis with a conditional generative adversarial network. IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics, 25(2), 441-452.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., & Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in

the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. European journal of immunology, 5(2), 117–121. https://doi.org/10.1002/eji.1830050209

- Li, M., Lei, P., Zeng, B., Li, Z., Yu, P., Fan, B., ... & Liu, H. (2020). Coronavirus disease (COVID-19): spectrum of CT findings and temporal progression of the disease. Academic radiology, 27(5), 603-608.
- Li, M., Lei, P., Zeng, B., Li, Z., Yu, P., Fan, B., ... & Liu, H. (2020). Coronavirus disease (COVID-19): spectrum of CT findings and temporal progression of the disease. Academic radiology, 27(5), 603-608.
- Malik, Y. A. (2020). Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. The Malaysian journal of pathology, 42(1), 3-11.
- Malik, Y. S., Kumar, N., Sircar, S., Kaushik, R., Bhat, S., Dhama, K., ... & Singh, R. K. (2020). Coronavirus disease pandemic (COVID-19): challenges and a global perspective. Pathogens, 9(7), 519.
- Miriam Merad et al. ,(2022). The immunology and immunopathology of COVID-19.Science375,1122-1127.DOI:10.1126/science.abm8108
- Moon, C. (2020). Fighting COVID-19 exhausts T cells. Nature Reviews Immunology, 20(5), 277-277.
- Negi, K., Agarwal, M., Pahuja, I., Bhardwaj, B., Rawat, M., Bhaskar, A., & Dwivedi, V. P. (2023). Combating the challenges of COVID-19 pandemic: Insights into molecular mechanisms, immune responses and therapeutics against SARS-CoV-2. Oxford open immunology, 4(1), iqad001. https://doi.org/10.1093/oxfimm/iqad001
- Niknam, Z., Jafari, A., Golchin, A., Danesh Pouya, F., Nemati, M., Rezaei-Tavirani, M., & Rasmi, Y. (2022). Potential therapeutic options for COVID-19: an update on current evidence. European journal of medical research, 27(1), 1-15.
- 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*, *71*(15), 762-768.
- Russell, C. D., Lone, N. I., & Baillie, J. K. (2023). Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. Nature medicine, 29(2), 334-343.

- S C Jordan, Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses, Clinical and Experimental Immunology, Volume 204, Issue 3, June 2021, Pages 310–320, https://doi.org/10.1111/cei.13582
- Sağlık Bakanlığı, (2021). COVID-19 İmmün (Konvalesan) Plazma Tedarik ve Klinik Kullanim Rehberi.)
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 10, 490–500 (2010). https://doi.org/10.1038/nri2785
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V., Barchet, W., ... & Hartmann, G. (2009). Recognition of 5′ triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. Immunity, 31(1), 25-34.
- Schultze, J. L., & Aschenbrenner, A. C. (2021). COVID-19 and the human innate immune system. Cell, 184(7), 1671–1692. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.029
- Shen, Q., Li, J., Zhang, Z., Guo, S., Wang, Q., An, X., & Chang, H. (2022). COVID-19: systemic pathology and its implications for therapy. International journal of biological sciences, 18(1), 386–408. https://doi.org/10.7150/ijbs.65911
- Silva, M. J. A., Rodrigues, Y. C., Lima, K. V. B., & Lima, L. N. G. C. (2022). Innate immunity to SARS-CoV-2 infection: a review. Epidemiology and infection, 150, e142. https://doi.org/10.1017/S095026882200125X
- Sivori, S., Vacca, P., Del Zotto, G., Munari, E., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2019). Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. Cellular & molecular immunology, 16(5), 430–441. https://doi.org/10.1038/s41423-019-0206-4
- Tabary, M., Khanmohammadi, S., Araghi, F., Dadkhahfar, S., & Tavangar, S. M. (2020). Pathologic features of COVID-19: A concise review. Pathology-Research and Practice, 216(9), 153097.
- Taefehshokr N et al. (2020) COVID-19: perspectives on innate immune evasion. Frontiers in Immunology 11, 580641–580641.

- Ursavaş, A., Akalın,H., (2021) COVID-19, 1. baskı, Medyay, Bursa
- Velavan, T. P., Pallerla, S. R., Rüter, J., Augustin, Y., Kremsner, P. G., Krishna, S., & Meyer, C. G. (2021). Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. EBioMedicine, 72.
- Viveiros A et al. (2021) Sex differences in COVID-19: candidate pathways, genetics of ACE2, and sex hormones. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 320, H296–H304.
- Yaman A, Çetiner S, Kibar F, Taşova Y, Şeydaoğlu G, Dündar İH. Reference Ranges of Lymphocyte Subsets of Healthy Adults in Turkey. Med Princ Pract. 2005;14:189-193. DOI:https://doi.org/ 10.1159/000084638
- Zhang, H-p, Sun, Y-l, Wang, Y-f, et al. Recent developments in the immunopathology of COVID-19. Allergy. 2023; 78: 369- 388. doi:10.1111/all.15593
- Zhao, J., Zhao, S., Ou, J., Zhang, J., Lan, W., Guan, W., ... & Zhang, Q. (2020). COVID-19: coronavirus vaccine development updates. Frontiers in immunology, 11, 602256.
- Zheng, Y. Y., Ma, Y. T., Zhang, J. Y., & Xie, X. (2020). COVID-19 and the cardiovascular system. Nature reviews cardiology, 17(5), 259-260.
- Ziegler, C. G., Miao, V. N., Owings, A. H., Navia, A. W., Tang, Y., Bromley, J. D., & Ordovas-Montanes, J. (2021). Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. Cell, 184(18), 4713-4733.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı İletişim Bilgileri **:Zeynep Tunca**

2. Unvanı **:Biyolog**

3. Öğrenim Durumu **:Yüksek Lisans Öğrencisi**

4. Öğrenim Durumu **:Yüksek Lisans**

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyoloji	Hacettepe Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	Devam ediyor

5. Çalışma Durumu: MARSTEM Hücre Teknolojileri A.Ş.

6. Yer Aldığım Projeler:

TEYDEP Projeleri

- Yara Tedavisi İçin Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksosom Taşıyan Biyo-Uyumlu Yara Örtüsünün Geliştirilmesi- Prj. No:7210394
- Akustik Tabanlı Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Ve Canlılık Analiz Cihazı Geliştirme-Prj. No:7210373

TÜSEB Projeleri

- İnterstisyel sistit/ Ağrılı mesane sendromu oluşturulmuş sıçanlarda mezenkimal kök hücre uygulaması sonrasında sinir sistemi ve mesane üzerindeki değişimlerin incelenmesi-Prj.No:24535