



## COVID-19 TANILI ÇOCUKLARDA T HÜCRELERİ VE ALT GRUPLARI

## T CELLS AND SUBGROUPS IN CHILDREN WITH COVID-19

Mehmet Fatih Orhan<sup>\*1</sup>, Öner Özdemir<sup>2</sup>, Gülay Trak<sup>3</sup>

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi <sup>1</sup>Pediyatrik Hematoloji ve Onkoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Anabilim Dalı, <sup>3</sup> Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

**ORCID iD:** Mehmet Fatih Orhan: 0000-0001-8081-6760; Öner Özdemir: 0000-0002-5338-9561; Gülay Trak: 0000-0002-4120-7249

**\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Mehmet Fatih Orhan **e-posta / e-mail:** [forhan@sakarya.edu.tr](mailto:forhan@sakarya.edu.tr)

**Geliş Tarihi / Received:** 13.06.2021

**Kabul Tarihi / Accepted:** 22.09.2022

**Yayın Tarihi / Published:** 30.09.2022

## Öz

**Amaç:** COVID-19 hastalığında, T lenfositlerin sayısal olarak azaldığı, hem CD4+ hem de CD8+'in azalabildiği, bazen de CD8+ düzeyinin anlamlı arttığı görülmüştür. Virüse spesifik CD8+ T-hücrelerin Efektör bellek (TEM) veya RA+ Terminal diferansiyasyon efektör bellek (TEMRA) hücrelerinin olduğu düşünülmektedir. Ancak bu hücrelerin özellikleri, özellikle SARS-CoV-2 enfeksiyonu veya COVID-19 hastalığının patogeneziindeki rolleri belirsizdir. Bu çalışmada, SARS-CoV-2 PCR pozitifliği ile COVID-19 hastalığı tanısı alan çocuk hastalarda tanı sırasında yardımcı T, sitotoksik T hücreleri ve alt tiplerinde gözlenen değişiklikleri akım hücre ölçer ile irdelemeyi amaçladık.

**Yöntem:** COVID-19 tanısı alan, 0-18 yaş arası 22 çocuğa flow sitometri ile; T Yardımcı Hücresi (TH), T Sitotoksik Hücresi (TC), T Naif Hücreleri (TN), Santral bellek (TCM), Efektör bellek (TEM), RA+ Terminal diferansiyasyon efektör bellek (TEMRA) ve Son timik göçmen T hücreleri (RTEs) çalışılmıştır.

**Bulgular:** T hücre sayıları tüm yaş gruplarında normal bulundu. CD4/CD8 oranı 5 yaş altı ve 16 yaş üstü grupta arttı. CD4+T hücreler içinde TCM 16 yaş üstü grupta azalırken, TEM tüm yaş gruplarında azaldı. RTEs, 16 yaş üstü grup hariç diğerlerinde azaldı. Naif CD8+T hücreleri (TN) tüm yaş gruplarında yüksek bulundu.

**Sonuç:** Düşük sayıda saptanan CD4+ ve CD8+ lenfosit sayısı, 2019 Coronavirus hastalığında (COVID-19) ayırt edici bir laboratuvar bulgusu olarak bildirilmiştir. Yeterli sayıda naif T hücresine sahip olmak, bağışıklık sisteminin bilinmeyen patojenlere sürekli yanıt vermesi için gereklidir. Çocuklarda bu hücrelerin normalden yüksek olduğu bu çalışma tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Çocuk, immünoloji, COVID-19, akım hücre ölçer, T-lenfosit alt grupları.

## Abstract

**Objective:** In COVID-19 disease, it was observed that T lymphocytes decreased numerically, both CD4+ and CD8+ could decrease, and sometimes the CD8+ level increased significantly. The virus-specific CD8+ T-cells are thought to be TEM or TEMRA cells. However, the characteristics of these cells, particularly their role in the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection or COVID-19 disease, are unclear. Therefore, this study aimed to examine the flow cytometric changes observed in T helper, T cytotoxic cells, and subtypes during diagnosis in pediatric patients diagnosed with COVID-19 infection with SARS-CoV-2 PCR positivity.

**Methods:** Twenty-two children aged 0-18, diagnosed with COVID-19, with flow cytometry; T Helper Cell (TH), T Cytotoxic Cell (TC), T Naive Cells (TN), Central Memory (TCM), Effector Memory (TEM), RA + Effector memory (TEMRA) and Recent Thymic Emigrants (RTEs) were studied.

**Results:** T cell counts were found to be expected in all age groups. The CD4/CD8 ratio increased in the under-five and over 16 age group. While TCM among CD4+T cells decreased in the group above 16 years of age, TEM decreased in all age groups. RTEs decreased in all except the age group 16+. Naive CD8+ T cells (TN) were found to be high in all age groups.

**Conclusion:** A low number of CD4+ and CD8+ lymphocytes have been reported as a distinctive laboratory finding in 2019 Coronavirus disease (COVID-19). Having enough naive T cells is essential for the immune system to respond consistently to unknown pathogens. This study found that these cells were higher than expected in children.

**Keywords:** Child, immunology, COVID-19, flow cytometry, T-lymphocyte subsets.

## Giriş

Bağışıklık sistemi, T, B ve NK hücresi alt grupları arasındaki iş birliğine bağlı olarak uyarlanabilir bağışıklığa sahip, etkileşen alt kümelerin karmaşık bir ağıdır. SARS-CoV-2 T hücre belleğinin muhtemelen yıllarca sürdüğü ve koruma sağladığı varsayılabilir.<sup>1</sup> SARS-CoV-2 koruyucu bağışıklığının net bir şekilde anlaşılması için antikor analizi ve lenfosit alt gruplarının asemptomatik, hafif ve şiddetli COVID-19'daki T hücresi çalışmaları gerekli hale gelmiştir. COVID-19 hastalığında, T lenfositlerinin sayısal olarak azaldığı, hem CD4<sup>+</sup> hem de CD8<sup>+</sup>'in azalabildiği, bazen de CD8<sup>+</sup> düzeyinin veya aktivasyon belirteçlerinin anlamlı arttığı görülmüştür.<sup>2-6</sup> Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında CD4/CD8 oranının COVID-19 hastalığında artmış ya da azalmış olabileceği, bazen de değişmediği saptanmıştır.<sup>6,7</sup> SARS-CoV-2 virüsünün antijenine özgü olarak gelişen yardımcı ve sitotoksik T hücrelerinin alt tipleri olan santral bellek (T<sub>CM</sub>: CCR7(CD197)<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>), efektör bellek (T<sub>EM</sub>: CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup>), terminal diferansiye efektör bellek (T<sub>EMRA</sub>: CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>) ve naif T hücrelerinde (T<sub>N</sub>: CD45RA<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>) bağışıklık cevabı oluşurken değişimin olabileceği düşünülmektedir.<sup>6,8</sup> Virüse spesifik CD8<sup>+</sup> T hücrelerin T<sub>EM</sub> veya T<sub>EMRA</sub> hücrelerinin olduğu düşünülmektedir.<sup>6</sup> Ancak bu hücrelerin özellikleri, özellikle SARS-CoV-2 enfeksiyonu veya COVID-19 hastalığının patogeneziindeki rolleri belirsizdir. Yine CD31, son timik göçmen T hücrelerinde (RTE<sub>S</sub>: Recent Thymic Emigrants) değişimin olup olmadığı ve rolü bilinmemektedir.<sup>7,9,10</sup> Bu çalışmada, SARS-CoV-2 PCR pozitifliği ile COVID-19 enfeksiyonu tanısı alan çocuk hastalarda tanı sırasında T yardımcı, T sitotoksik hücreleri ve alt tiplerinde akım hücre ölçer ile saptanan değişiklikleri irdelemeyi amaçladık.

## Yöntem

Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 27.05.2020 tarih ve 107 sayılı izni ile yürütülmüştür. Çalışma tasarım tipi, olgu serisine müdahale edilmeden gözlemsel ve tanımlayıcı araştırma olarak tasarlanmıştır. Örneklem grubuna; Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Acil ve servislerinde, ayakta/yatarak başvuran, orofarenks/nazofarenks sürüntü örneğinden SARS-CoV-2 PCR testi yapılarak COVID-19 tanısı alan, 0-18 yaş arası 22 çocuk dahil edilmiştir. Yerel etik kurul kararı ile bu hastalara Hastane Pandemi Kurulu'nun ve Bakanlığın vaka yönetim rehberine göre alınmış tüm kan tetkiklerine ilaveten bir mor kapaklı EDTA tüpüne alınmış 2 mL kandan flow sitometri ile T hücre ve alt gruplarını içeren panel çalışılmıştır.

## Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Deneyi

COVID-19 olası vaka tanımına uyan hastaların nazal ve faringeal sürüntü örnekleri SARS-CoV-2 RNA açısından, Sağlık Bakanlığının yetkilendirdiği laboratuvarlardan biri olan XXXX Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi ile değerlendirildi. Örneklerin viral RNA ekstraksiyonu, vNAT® nükleik asit izolasyon kiti (Bioeksen, Türkiye) ile imalatçı firmanın talimatlarına göre yapıldı. RT-PCR reaksiyonu Biospeedy SARS-CoV-2 PCR Detection Kiti (Bioeksen, Türkiye) ile, Rotorgene Hrm 5 plex (Qiagen, Germany) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon 15 dak. 45 °C'de revers (ters) transkripsiyon, 3 dak. 95°C'de

enzim aktivasyonunun ardından; 5 sn. 95°C'de denatürasyon ve 55°C'de 35 saniye bağlanma ve uzama olacak şekilde 50 döngü olacak şekilde kuruldu.

## Flow Sitometri

Tanının konulup yatışın yapıldığı ve tahlillerin yapılacağı aynı gün, hastalardan, EDTA içeren tüplere 4-5 mL periferik kan örneği alınarak bekletilmeden hastanemiz moleküler mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi. EDTA içeren tüplerdeki periferik kan örnekleri monoklonal antikorlar kullanılarak işaretleme yapıldı. Bu amaçla hücre sayısı mL'de 1x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde hesaplandı. Lenfosit alt kümeleri, Machura ve ark.nın daha önce tarif ettiği gibi flow sitometri ile analiz edildi.<sup>15</sup> Birinci tüpe monoklonal antikorlardan CD3 FITC/CD16<sup>+</sup>56PE, CD4 PE-Cy, CD8 APC-Cy7, CD45 APC; ikinci tüpe monoklonal antikorlardan CD31 FITC, CD45RO PE, CD45RA APC, CD197 PerCP-Cy5,5, CD4 PE-Cy, CD8 APC-Cy7 konuldu. Tüpler 20 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edildi, inkübasyon sonunda örnekler içindeki eritrositler, 2-3 mL Lysing Solution (Becton Dickinson, San Jose, CA 95131 USA) ilavesi ile karanlıkta oda ısısında inkübe edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Lysing Solution ile yıkamayı takiben 2 mL PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkanmış, hücreler %1 paraformaldehit içeren 500 µL PBS ile süspansiyon edilmiş ve analiz zamanına kadar 2-8°C'de karanlıkta bekletildi. Hücreler FACSCantoII (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA 95131 USA) model flow sitometri cihazı ile, BD FACSDiva programı kullanılarak analiz edildi.

T hücre ve alt gruplarını içeren panel; CD3<sup>+</sup> T Hücre, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Yardımcı Hücre (T<sub>H</sub>), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Sitotoksik Hücre (T<sub>C</sub>), CD4<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>45RA<sup>+</sup> Naif CD4<sup>+</sup> T Yardımcı hücreleri (T<sub>N</sub>), CD8<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>45RA<sup>+</sup> Naif CD8<sup>+</sup> T Sitotoksik hücreleri (T<sub>N</sub>), CD197<sup>+</sup>45RA<sup>-</sup> Santral bellek T hücreleri (T<sub>CM</sub>), CD197<sup>-</sup>45RA<sup>-</sup> Efektör bellek T hücreleri (T<sub>EM</sub>), CD197<sup>-</sup>45RA<sup>+</sup> Terminal diferansiye efektör bellek T hücreleri (T<sub>EMRA</sub>), CD4<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>45RA<sup>+</sup>: Son timik göçmen T hücreleri (RTE<sub>S</sub>) içermekteydi. Normal referans aralıkları Shearer, Comans-Bitter, Schatorjé ve ark. nın ve sağlıklı çocuk ve ergenlerde (0-18 yaş) lenfosit alt gruplarını gösteren çalışmalarından alınmıştır.<sup>11-14</sup> İlgili çalışmalarda normalerler kıyaslanabilmesi için hastalar; 2-5 yaş, 5-10 yaş, 10-16 yaş ve 16 yaş üstü şeklinde 4 gruba ayrılmıştır. Altta yatan primer immün yetmezlik hastalık tanısı almış çocuklar, 2 haftayı ve 2 mg/kg<sup>1</sup> aşan steroid tedavisi alanlar, son 15 gün içinde kemoterapi alanlar ve çocuğuna ait hiçbir verinin kullanılmamasına dair özellikle beyanda bulunmuş ebeveynlerin çocukları çalışmaya dahil edilmemiştir.

## Bulgular

Çalışmaya daha önce sağlıklı olan 22 (6 kız, 16 erkek) COVID-19 hastası alındı. Hastaların medyan yaşı 8,1 (2,3-17,5) yıl idi. Medyan WBC sayısı 6.145 (3.137-11.000) / µL bulundu. Lenfosit sayı ve yüzdesinin medyan değeri 2-5 yaş arası çocuklarda yaşa göre yüksek çıkarken diğer çocuk gruplarında normaldi. CD3<sup>+</sup>T hücre sayı ve yüzdesi de tüm yaş gruplarında normaldi. CD4<sup>+</sup> Yardımcı T hücre mutlak sayısı 2-5 yaş arası düşük iken diğer gruplarda normaldi. CD8<sup>+</sup> Sitotoksik T hücre yüzdesi 2-5 yaş grubunda yüksek iken mutlak sayıları 16 yaş üstünde düşük bulundu. CD4<sup>+</sup>T<sub>H</sub> hücrenin CD8<sup>+</sup>T<sub>C</sub> hücre'ye (CD4/CD8) oranı 5 yaş altı ve 16 yaş üstü grupta azalmıştı (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** COVID-19 tanılı çocukların yaş gruplarına göre, lenfosit alt gruplarının yüzde medyan (min-max) ile mutlak sayılarının medyan (min-max) değerleri

	2-5 Yaş (n=8)	5-10 Yaş (n=5)	10-16 Yaş (n=7)	16 Yaş üstü (n=2)
<b>Yaş</b>	2,6 (2,3-3,6)	6,9 (5,2-9,7)	13,5 (11,5-15,5)	16,7 (15,8-17,5)
<b>WBC (/μL)</b>	7315 (3137-11000)	7010 (5420-9170)	6110 (4690-6740)	5180 (4190-6170)
<b>Lenfosit (%)</b>	57 (40-71) ↑	41 (31-60)	43 (32-48)	49 (48-50)
<b>Lenfosit (/μL)</b>	4283 (1835-7205) ↑	2874 (2128-4459)	2273 (1955-2938)	2538 (1990-3085)
<b>CD3<sup>+</sup> T Cell (%)</b>	72 (51-84)	75 (68-79)	74 (66-79)	72 (67-77)
<b>CD3<sup>+</sup> T Cell (/μL)</b>	3033 (1330-4532)	2141 (1651-3014)	1663 (1281-2306)	1792 (1532-2052)
<b>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th Cell (%)</b>	36 (29-38)	39 (29-45)	42 (32-48)	40 (37-42)
<b>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th Cell (/μL)</b>	980 (489-1641) ↓	870 (642-968)	689 (482-1105)	703 (648-757)
<b>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tc Cell (%)</b>	28 (13-41) ↑	26 (21-35)	28 (23-36)	24 (23-24)
<b>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tc Cell (/μL)</b>	681 (220-1309)	550 (452-895)	567 (297-601)	422 (371-472) ↓
<b>CD4/CD8 Oranı</b>	1,3 (0,9-2,2) ↓	1,2 (1,0-2,1)	1,6 (0,9-1,8)	1,7 (1,6-1,7) ↓

Naif CD4<sup>+</sup>T hücre (T<sub>N</sub>) 10-16 yaş grubunda azalmış, diğer gruplarda normaldi. CD4<sup>+</sup> santral bellek T hücre (T<sub>CM</sub>) 5 yaş altı normal, 16 yaş üstü azalmış, diğer yaş gruplarında normaldi. CD4<sup>+</sup> efektör bellek T hücre (T<sub>EM</sub>) tüm yaş gruplarında hem yüzde hem de mutlak değer olarak azalmış bulundu. CD4<sup>+</sup>T<sub>EMRA</sub> (Terminal diferansiye efektör bellek ) 16 yaş üstünde hiç tespit edilemedi, diğer yaş gruplarında normaldi. CD31<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Recent Thymic Emigrants (RTEs) oran ve mutlak sayıları 16 yaş üstü grup hariç diğerlerinde azalmış bulundu (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** COVID-19 tanılı çocukların yaş gruplarına göre, helper T hücre alt tiplerinin yüzde medyan (min-max) ve mutlak medyan (min-max) değerleri

	2-5 Yaş (n=8)	5-10 Yaş (n=5)	10-16 Yaş (n=7)	16 Yaş üstü (n=2)
<b>T<sub>N</sub> CD4<sup>+</sup> (%)</b>	73 (53-86)	70 (63-82)	54 (27-68) ↓	65 (62-68)
<b>T<sub>N</sub> CD4<sup>+</sup> (/μL)</b>	667 (265-1409)	585 (403-727)	380 (148-753) ↓	455 (443-467)
<b>T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> (%)</b>	26 (18-40)	29 (13-38) ↑	46 (31-66) ↑	36 (33-40) ↓
<b>T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> (/μL)</b>	300 (88-440)	224 (129-402) ↑	351 (195-487)	303 (169-436) ↓
<b>T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> (%)</b>	0,45 (0,00-1,30) ↓	0,70 (0,10-5,00) ↓	1,40 (0,10-4,60) ↓	0,05 (0,00-0,10) ↓
<b>T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> (/μL)</b>	4 (0-13) ↓	6 (1-44) ↓	10 (1-24) ↓	0,5 (0-1) ↓
<b>T<sub>EMRA</sub> CD4<sup>+</sup> (%)</b>	0,55 (0,10-1,50)	0,30 (0,10-4,00)	0,40 (0,10-2,00)	0,00 (0,00-0,00) ↓
<b>T<sub>EMRA</sub> CD4<sup>+</sup> (/μL)</b>	6 (0-11)	2 (1-35)	3 (1-10)	0 (0-0) ↓
<b>RTE<sub>s</sub> CD31<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (%)</b>	51 (13-58) ↓	49 (51-58) ↓	38 (17-50) ↓	44 (37-51)
<b>RTE<sub>s</sub> CD31<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (/μL)</b>	476 (62-950) ↓	378 (315-554) ↓	263 (91-556) ↓	304 (279-328)

CD4<sup>+</sup>: Yardımcı T Hücreleri, T<sub>N</sub>: Naive T Hücreleri, T<sub>CM</sub>: Santral Bellek T Hücreleri, T<sub>EM</sub>: Efektör Bellek T Hücreleri, T<sub>EMRA</sub>: Terminal Diferansiye Efektör Bellek T Hücreleri, RTE<sub>s</sub>: Yeni Timik Göç Yaşayan T Hücreleri

Naif CD8<sup>+</sup>T hücreleri (T<sub>N</sub>) tüm yaş gruplarında hem yüzdesel hem de mutlak değer olarak yüksek bulundu. 5 yaş altında CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> düşük iken tüm yaş gruplarında normaldi. CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> 5-10 yaş ve 16 yaş üstünde düşük bulundu. CD8<sup>+</sup>T<sub>EMRA</sub> ise mutlak sayı ve oransal olarak sadece 5-10 yaş grubunda düşüktü (Çizelge 3).

**Çizelge 3.** COVID-19 tanılı çocukların yaş gruplarına göre, sitotoksik T hücre alt tiplerinin yüzde medyan (min-max) ve mutlak medyan (min-max) değerleri

	2-5 Yaş (n=8)	5-10 Yaş (n=5)	10-16 Yaş (n=7)	16 Yaş üstü (n=2)
<b>T<sub>N</sub> CD8<sup>+</sup> (%)</b>	62 (38-89) ↑	74 (53-85) ↑	74 (43-86) ↑	82 (79-86) ↑
<b>T<sub>N</sub> CD8<sup>+</sup> (/μL)</b>	436 (122-1006) ↑	405 (384-564) ↑	328 (255-490) ↑	348 (291-405) ↑
<b>T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> (%)</b>	8 (3-21) ↑	3 (2-48)	3 (1-9)	4 (1-8)
<b>T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> (/μL)</b>	39 (16-275) ↑	17 (9-430)	18 (7-38)	16 (3-29)
<b>T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> (%)</b>	25 (8-55)	18 (0-28) ↓	24 (10-44)	15 (15-16) ↓
<b>T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> (/μL)</b>	112 (87-517)	96 (0-222) ↓	111 (29-265)	64 (54-74) ↓
<b>T<sub>EMRA</sub> CD8<sup>+</sup> (%)</b>	18 (3-60)	13 (0-44) ↓	26 (10-44)	21 (3-39)
<b>T<sub>EMRA</sub> CD8<sup>+</sup> (/μL)</b>	76 (31-686)	72 (0-225) ↓	116 (50-265)	99 (12-186)

CD8<sup>+</sup>: Sitotoksik T Hücreleri, T<sub>N</sub>: Naive T Hücreleri, T<sub>CM</sub>: Santral Bellek T Hücreleri, T<sub>EM</sub>: Efektör Bellek T Hücreleri, T<sub>EMRA</sub>: Terminal Diferansiye Efektör Bellek T Hücreleri

## Tartışma

SARS-CoV-2'nin lenfositleri direkt olarak ya da ACE-2 ekspresyonu aracılığı ile lizise uğratabileceği öngörülmektedir. Yine periferik kan lenfosit sayısının azalmasında, lenfositlerin solunum yoluna virüsle savaşmak için toplanması da rol oynayabilir. Lenfosit sayısındaki azalma hastalık başlangıcından sonraki ilk 2 haftada belirginleşir.<sup>15</sup> İlk haftada (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) lenfosit alt grupları normal sınırların altında, ikinci haftada dip yapar ve üçüncü haftadan itibaren kademeli olarak artış başlamaktadır.<sup>3</sup> Hafif hastalara göre, hastalığı ağır geçirenlerde CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücre sayılarında düşüklüğün hastalığın başlangıcından 4-6 gün sonra en belirgin olduğu gözlenmiştir. İlk 9 gün içinde bu farkın anlamlı hale geldiği bildirilmiştir. CD4<sup>+</sup>T hücre sayısındaki farkın anlamlılığa ulaşmadığı gösterilmiştir. Hastalığın başlangıcından yedinci günden sonra T hücrelerinde artış, 16 günden sonra hafif geçiren hastalarda anlamlı hale gelmektedir.<sup>16</sup> Beşinci haftada da normal seviyelerine yaklaştığı görülmüştür.<sup>3</sup> Çalışmamızda yer alan en küçük yaş grubunda lenfosit oranı normale göre artmışken diğer yaş gruplarında normaldi. Yoğun bakıma girmeyen tüm hastalarımızın lenfositlerinin de azalmadığını görmüş olduk. Lenfosit sayısındaki (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup>) azalmanın, hastalığın şiddeti/ağırılığı kadar hastalıkta gelişen sistemik enflamatuvar cevapla da ilişkili olduğu bulunmuştur.<sup>3,17</sup> Yoğun bakım yatışı olan ya da hastalığı şiddetli geçiren hastalarda, lenfopeni ve diğer alt gruplarda (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) düşüklük, CD8<sup>+</sup> gibi alt grupta genellikle artış bildirilmiştir.<sup>2-</sup> <sup>4</sup> Yine bu (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) lenfosit alt gruplarının ağır hastalıkta ve ölenlerde hastalığı atlatana göre anlamlı şekilde düşük olduğu saptanmıştır.<sup>3</sup> COVID-19 hastalığında, lenfopeni hastalık şiddetini ve hastane yatışını gösteren iyi bir indikatör olarak kabul edilmektedir. Lenfopeninin varlığı ağır COVID-19 hastalığının gelişimini 3 kat arttırmaktadır. Lenfopeninin  $\leq 1.5 \times 10^9/L$  şeklinde olması klinik sonuçların şiddetinin tahmininde faydalıdır.<sup>5</sup> Şiddetli geçirilen hastalıkta, CD3<sup>+</sup> T hücre, CD4<sup>+</sup> T hücre değerlerinde azalma veya aynı kalma, CD8<sup>+</sup> T hücre değerlerinde ise çalışmaya göre hem artma hem de azalma bildirilmiştir.<sup>3,4,16,18</sup> Bu durumun hastalığın şiddeti ve hastalıkta oluşan enflamatuvar durum ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Periferik lenfosit alt gruplarının sayılarındaki değişimin hastalığın karakteristikleri kadar tedaviden de etkilendiğini akılda bulundurmak gerekmektedir. Düşük sayıda saptanan CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> lenfosit sayısı, 2019 Coronavirus hastalığında (COVID-19) ayırt edici bir laboratuvar bulgusu olarak bildirilmiştir.<sup>15</sup> CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Sitotoksik T lenfositlerin enflamatuvar sitokin fırtınasında kritik rol oynayabileceği düşünülmüştür.<sup>19</sup> COVID-19 enfeksiyonu ile tetiklenen hücresel bağışıklık tepkilerinin, CD8'in aşırı ekspresyonu ve sitotoksik T lenfositlerinin hiperaktivasyonu yoluyla geliştirildiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda yer alan en küçük yaşa sahip olan 2-5 yaş grubunda CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> azalırken CD8<sup>+</sup> T<sub>C</sub> artmış bulundu. Bu da erişkinlere benzer bir yön olduğunu göstermiştir. Buna rağmen hastalarımızın tamamı yatan hasta olsa bile hastalığın başlangıcının ilk haftasının ilk günlerinde bu değerlendirmeler yapılmış olup hepsi ağır hastalığa yakalanmadan ve/veya yoğun bakıma gerek kalmadan çoğunlukla ilk 5 gün içinde taburcu edilmişlerdir. T lenfositlerin sayısal olarak (hem CD4 hem de CD8'in) azaldığı bazı vakalarda görülmüştür. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında CD4/CD8 oranının COVID-19 hastalığında değişmediği, CD8 düzeyinin anlamlı olarak

yükseldiği saptanmıştır.<sup>2</sup> CD4/CD8 oranının artabileceği, azalabileceği ve aynı kalabileceği de değişik makalelerde bildirilmiştir.<sup>2-6</sup> Hastalarımızın en küçük ve en büyük 2 grubunda (2-5 yaş ve 16 yaş üstü) CD4/CD8 oranı azalmış olarak bulundu. Bu da neden küçük çocukların ve erişkin yakın adolesan hastaların daha ağır seyredebileceğine açıklık getirebilir. Bu çalışma kapsamında klinikleri not edilmemiş olup, pandemi döneminde takip ettiğimiz hastaların seyrine ilişkin subjektif gözlemimizdir. Yeterli sayıda CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri bulunması, çocukların COVID-19 hastalığına daha dirençli bir grup olduğunu gösterebilir.<sup>20,21</sup>

CD4<sup>+</sup> hücreleri, immün cevabı sitokinler salarak artırmasıyla bilinir. CD8<sup>+</sup> hücreleri, gelişen immün cevabın aktivasyonunu baskılar, ayrıca salgıladığı sitokinler ve sitotoksik etkileriyle hematopoetik kök hücrelerin fonksiyonlarını etkileyebilmektedir. Yeterli sayıda naif T hücrelerine sahip olmak, bağışıklık sisteminin bilinmeyen patojenlere sürekli yanıt vermesi için gereklidir.<sup>22</sup> Naif CD4<sup>+</sup>T hücre (T<sub>N</sub>) 10-16 yaş grubunda azalmış, diğer gruplarda normaldi. Bu çocuklarda immün cevabın sitokin fırtınasına neden yol açmadığını izah edebilir. Buna karşın Naif CD8<sup>+</sup>T hücreleri (T<sub>N</sub>) tüm yaş gruplarında hem yüzdesel hem de mutlak değer olarak yüksek bulundu. Bu da çocuklarda immün sistemin Naif CD8<sup>+</sup>T hücreleri (T<sub>N</sub>) ile baskılanarak salınması engellenen sitokinlerin organ hasarını minimize etmektedir.

CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri alt gruplarındaki değişim T<sub>CM</sub> ve T<sub>EM</sub> alt gruplarına yansır. T<sub>CM</sub> hücreleri sekonder lenfoid organlarda yerleşir, T<sub>EM</sub> ise daha sitolitik olup integrin-kemokin reseptörleri üzerinden enflame dokulara yerleşir. T<sub>CM</sub> hücreleri sekonder lenf organlarındaki yerleşim ve üstün proliferasyon kapasiteleriyle spesifik enfeksiyonlarla baş etmede daha iyidir. T<sub>EM</sub> hücreleri ise periferik organlardaki yerleşim kapasitesi ve sitolitik etkileriyle oralarda meydana gelen enfeksiyonla savaşır.<sup>22</sup> CD4<sup>+</sup>efektör bellek T hücreleri (T<sub>EM</sub>) tüm yaş gruplarında hem yüzde hem de mutlak değer olarak azalmış bulundu. SARS-CoV-2'nin uç organlarda sitolitik (hücre yıkıcı) etkiyle kendisiyle savaşacak T<sub>EM</sub> hücreleriyle karşılaşmaması da çocuklarda COVID-19 seyrini erişkinlerden farklı kılan unsurlardan biri olmaya adaydır. Bellek T hücreleri hakkındaki çoğu bilgi şu anda CD8 alt kümesindeki gözlemlere dayansa da hem yardımcı hem de sitotoksik T hücreleri için benzer popülasyonların var olduğu görülmektedir. Virüslerin antijenine karşı özgü bellek T hücreleri, hem merkezi bellek (T<sub>CM</sub>) hem de efektör bellek (T<sub>EM</sub>) alt kümelerinde bulunabilir.<sup>6</sup>

Son timik göçmen T hücreleri (RTEs), periferdeki en genç T hücreleridir ve naif T hücre havuzundaki daha olgun muadillerinden farklı fenotipik ve fonksiyonel özellikler sergiler.<sup>22</sup> Çalışma kapsamındaki çocuklarda, CD31<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Son timik göçmen T hücreleri (RTEs) oran ve mutlak sayıları 16 yaş üstü grup hariç diğerlerinde azalmış bulundu. Bu da periferdeki en genç T hücrelerinin çocuklarda az olduğunu ve bununla birlikte COVID-19 hastalığını erişkinlere oranla daha hafif atlatmasının nedenlerinden biri olabileceğini düşündürmüştür.

Yine, hafif hastalığa göre aşırı şiddetli geçiren hastalarda CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerindeki CD45RO (hafıza lökositlerinin belirtecinin) ekspresyonunun arttığı görülmüştür.<sup>18</sup> Özellikle hafıza CD8<sup>+</sup>T hücre alt gruplarında artış, T<sub>CM</sub> ve T<sub>EM</sub> alt gruplarını etkilemesi beklenir. Virüse spesifik CD8<sup>+</sup> hücrelerinin çoğunun T<sub>EM</sub> veya T<sub>EMRA</sub> tipi olduğu bir çalışmada gösterilmiştir.<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup>T<sub>EMRA</sub> 16 yaş üstünde hiç tespit edilemedi, diğer yaş gruplarında normaldi. Erişkin yaş grubuna yakın 16 yaş üstü hariç

tutulduğunda çocuklarda CD45RO ekspresyonunun artmadığı, normal kaldığı, bu nedenle hastalığın hafif seyrettiği literatür ile uyumlu bulunmuştur.<sup>18</sup>

### Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın kısıtlılıkları arasında kontrol grubunun olmaması, hasta sayısının az olmasını ve sadece belli zaman diliminde kesitsel olan hücre sayımını yansıtmasını sayabiliriz.

### Sonuç

COVID-19'un insan sağlığı ve toplumumuzun sosyoekonomik dokusu üzerindeki uzun vadeli etkisinin ne olacağını yapılan çalışmalar belirleyecektir. Bu salgın, yeni patojen salgınlarına cevap verme ve bunları azaltma yeteneğimizin eksikliklerini bir kez daha ortaya koymuştur. Çocuklar bu süreç içinde en az hastalığa yakalanma ve ölüm oranlarının görüldüğü gruba oluşturmuştur. Dolayısıyla çocuklarda farklı olanın ne olduğunu ortaya koymak önemlidir. Hastalığın immünopatogenezinde CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, naif ve hafıza hücrelerinin rolünün anlaşılması diğer tedavi seçenekleri yanında immünoterapötik yaklaşımların başarısını artıracığı düşünülmüştür.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarların herhangi bir çıkara dayalı ilişkisi yoktur.

### Araştırmanın Etik Yönü

Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 27.05.2020 tarih ve 107 sayılı izni ile yürütülmüştür.

### Maddi Destek

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur.

### Yazar Katkıları

MFO, GT, ÖÖ; Çalışmanın Tasarımı: MFO, GT, ÖÖ; Veri toplanması: MFO, GT; Kaynak Taraması: MFO; Analiz ve/veya yorum: MFO, GT, ÖÖ; Makale Yazılması: MFO, GT, ÖÖ; Eleştirel İnceleme: MFO, ÖÖ; Yayınlama Süreci: MFO, ÖÖ.

### Kaynaklar

1. Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Sci Immunol.* 2020;5(49):eabd6160.
2. Ganji A, Farahani I, Khansarinejad B, Ghazavi A, Mosayebi G. Increased expression of CD8 marker on T-cells in COVID-19 patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2020;83:102437.
3. Deng Z, Zhang M, Zhu T, et al. Dynamic changes in peripheral blood lymphocyte subsets in adult patients with COVID-19. *Int J Infect Dis.* 2020;98:353-358.
4. Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2620-2629.
5. Zhao Q, Meng M, Kumar R, et al. Lymphopenia is associated

- with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020;96:131-135.
6. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol.* 2020;5(48):eabd2071.
7. Tan M, Liu Y, Zhou R, et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology.* 2020;160(3):261-268.
8. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science.* 2020;369(6508):eabc8511.
9. Özdemir Ö. İmmün Sistemin COVID-19 Hastalığındaki Rolü: Patogenezi Tedaviye. *Türkiye Klinikleri COVID-19.* 2020;1(16):14-21.
10. Özdemir Ö, Erkun O. Solving puzzle of the immunopathogenesis for management of COVID-19 disease. *MOJ Immunol.* 2020;7(1):13-15.
11. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(5):973-980.
12. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr.* 1997;130(3):388-393.
13. Schatorjé EJH, Gemen EFA, Driessen GJA, et al. Age-matched Reference Values for B-lymphocyte Subpopulations and CVID Classifications in Children. *Scand J Immunol.* 2011;74(5):502-510.
14. Schatorjé EJ, Gemen EF, Driessen GJ, et al. Age-matched reference values for B-lymphocyte subpopulations and CVID classifications in children. *Scand J Immunol.* 2011;74(5):502-510.
15. Tan L, Wang Q, Zhang D, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):33.
16. Liu J, Li S, Liu J, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine.* 2020;55:102763.
17. Wang F, Nie J, Wang H, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis.* 2020;221(11):11762-11769.
18. Wang F, Hou H, Luo Y, et al. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. *JCI Insight.* 2020;5(10):e137799.
19. Wu Y, Huang X, Sun J, et al. Clinical Characteristics and Immune Injury Mechanisms in 71 Patients with COVID-19. *mSphere.* 2020;5(4):e00362-20.
20. Melek Arsoy HE, Özdemir Ö. Mysterious Side of COVID-19 Pandemic: Children. *Istanbul Medical Journal.* 2020;21(4):242-257.
21. Ozdemir Oner. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Diagnosis and Management. *Erciyes Med J.* 2020;42(3):242-247.
22. Martin MD, Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol.* 2018;9:2692.