



## Akım Sitometride Temel Uygulamalar ve Tanısal Kullanımı

### Fundamental Flow Cytometry Procedures and Application for Diagnosis

<sup>1</sup>Sevil Şimşek<sup>1</sup>, <sup>2</sup>Nezihe Köker<sup>1,2</sup>, <sup>1</sup>Huriye Çelikzencir<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Mustafa Yavuz Köker<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İmmünoloji Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri, Türkiye

<sup>2</sup>Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Malatya, Türkiye

#### ÖZ

Akım sitometrik analiz başta hematolojik malignansiler ve immün sistem hastalıkları olmak üzere sıklıkla başvuru alan bir laboratuvar tanı yöntemidir. Gelişen teknolojiye bağlı olarak klinik tanı ve bilimsel araştırmalarda uygulama alanı hızla genişlemekte. Akım sitometrinin başlıca özelliği binlerce hücrenin eş zamanlı, çok parametrelili ölçüm ve karakterizasyonunun hızlı ve doğru bir şekilde yapılabilmesidir. Akım sitometri ile başta kan ve kemik iliği olmak üzere bütün vücut sıvıları, kültür sıvıları, hatta doku örneklerinden elde edilen sıvılarda bulunan hücrelerin analizi, hücresel yapıların canlılık değerlendirmesi ve gelişimsel aşamaları gösterilmesi mümkündür. Ayrıca, çeşitli mitojenlerle uyum sonrasında hücre içi ve yüzeydeki reseptör ekspresyonları ve fonksiyonlardaki değişimin belirlenebilir. Akım sitometri ile periferik kan analizinde ilk aşamada floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granülaritesine göre (FSC, SSC) ve ortak lökosit (CD45) kanalında farklı hücre gruplarının dağılımı incelenir. Hasta ve sağlıklı kişilerden elde edilen kan / kemik iliği vb. örneklerinin akım sitometride incelenmesi patolojik durumların ayırt edilmesine katkı sunan bir göstergedir. Teknolojik gelişmelere bağlı olarak akım sitometri yönteminin klinik laboratuvar tanı, takip ve bilimsel araştırma uygulamalarında kullanımında dönemsel güncellenmeye ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kemik iliği, klonal antikor, hücre sayımı, akım sitometri

#### ABSTRACT

Flow cytometric analysis is a laboratory diagnostic method frequently used in immune system diseases, especially hematological malignancies. Its application area in clinical diagnosis and research is rapidly expanding due to developing technology. The main feature of flow cytometry is that it can rapidly perform simultaneous, multi-parameter measurement and characterization of thousands of cells. With flow cytometry, it is possible to analyze cells in all body fluids, especially blood and bone marrow, culture fluids, and even fluids obtained from tissue samples. It is possible to monitor the vitality and developmental stages of cellular structures with flow cytometry. In addition, it is also possible to monitor the changes in receptor expressions and functions on cell surfaces after cellular stimulation with various mitogens. In flow cytometric analysis, the distribution of different cell groups in the FS, SS and CD45 gates is examined in the first stage. In addition to patient samples, examination of blood and bone marrow samples from healthy individuals by flow cytometry is an important indicator in distinguishing pathological conditions. Depending on technological developments, the use of flow cytometry method in clinical laboratory and research applications requires frequent updates.

**Keywords:** Bone marrow, monoclonal antibody, cell enumeration, flow cytometry

#### GİRİŞ

Akım sitometri uygulamaları, kök hücre sayımı, lenfosit alt grup tayini, bazı immün sistem hastalıklarının tanısı ve özellikle hematolojik malignansilerin tanı ve takibinde sıklıkla başvuru alan yöntemleridir. Bu derlemede, kan ve kemik iliği örneklerinde hücresel yapılarının tanımlanması ve hastalıkların tanı ve takibinde akım sitometrinin nasıl uygulanacağı, normal ile patolojik yapıların ayrımının ne şekilde yapılacağı gibi bazı temel konulardaki güncellemeler akım sitometri kullanıcıları ve klinisyenlere sunulacaktır.

Akım sitometri ile hücresel tanımlama (immüno-fenotipleme) veya hücre alt tiplerin belirlenmesine yönelik uygulamalar gün geçtikçe çeşitlenmekte ve yaygınlaşmaktadır (1). Akım sitometrinin en güncel klinik uygulaması, kemik iliği ve periferik kan örneklerinden hematolojik malignansilerin tanımlanması ve CD34+ kök hücre sayımı işlemidir. Özellikle akut lösemiler, kronik lenfoproliferatif hastalıklar ve bazı immün yetmezliklerin tanısında akım sitometrik analizlere ihtiyaç duyulur. Tanımlanması hedeflenen protein yapıya (reseptör veya enzim) özgün floresan işaretli monoklonal kullanılır. Ayrıca floresan işa-

**Corresponding Author:** Nezihe Köker

**Address:** İmmünoloji Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri, Türkiye / Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Malatya, Türkiye

**E-mail:** nezihe.koker@inonu.edu.tr

**Başvuru Tarihi/Received:** 01.12.2024

**Kabul Tarihi/Accepted:** 23.03.2025

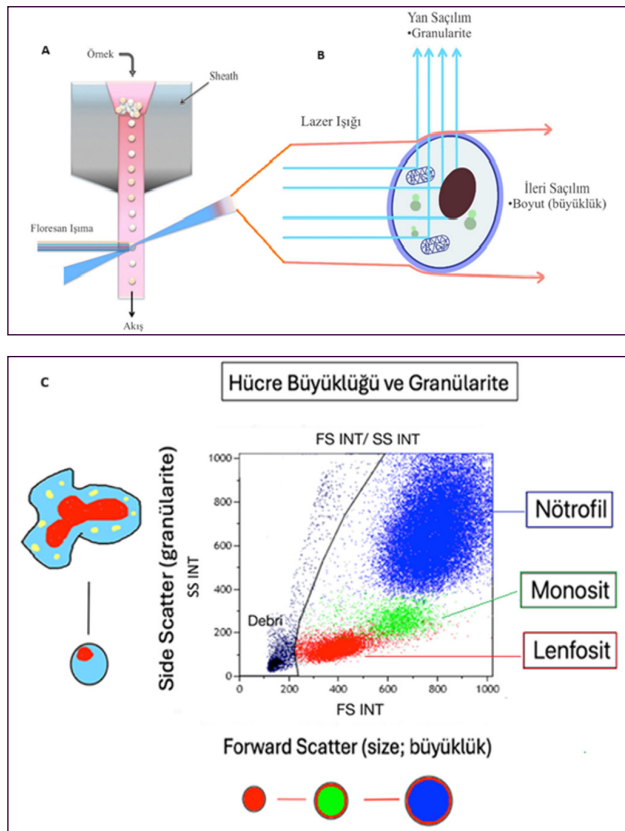


retleme olmadan da FS/SS ayarında hücre büyüklüğü ve granül yoğunluğuna göre ayırım sağlanabilir (2).

Akım sitometri cihazı ile okuma ve analiz işleminde kullanıcı açısından en önemli beceri, normal örneklerin kapılama görünümüne aşına olmak, şekil hafızasına sahip olmak ve böylece anormal yapıları ekranda görsel olarak tanıyabilmektir. Patolojik yapıların doğru bir şekilde ayırma yardımcı olmak ve normal yapıların nasıl ayırt edileceği ve tanımlanacağı hususunda kullanıcı ve uygulayıcılara Türkçe bir bilgilendirme yapmayı hedefledik.

### 1-Akım Sitometri Laboratuvar Uygulama Stratejileri;

Akım sitometride hücre popülasyonunun özellikleri hem görünür ışık saçılımı ile hem de çoklu (örnek 10 renk) floresan işaretli spesifik antikorlar eşliğinde analiz edilebilir. Görünür ışık saçılması iki farklı yönde ölçülür, ileri yön saçılım (Forward Side Scatter: FSC) ile hücrenin göreceli boyutunu ve lazer ışınının yaklaşık olarak 90° açı ile yansması veya yan saçılım (side scatter; SCS) ile hücrenin iç yapısı yani granülaritesi değerlendirilir (**Şekil 1A-B**) (2,3). Bazı kaynaklarda bu iki parametre "FSC, SSC" nin kısaltması FS, SS olarak kullanılabilir (4). Özellikle heterojen bir hücre popülasyonunda hücre tiplerini ayırt etmek için FC ve SS ilişkili ölçümler yardımcı olabilir. Lökositlerin ayrılması hücre büyüklüğü ve granül yapısına göre yapılmaktadır (**Şekil 1C**).



**Şekil 1.** Akım Sitometri İşleyişi ve İki Parametre ile Hücrelerin Gruplandırılması. A. Akım sitometri şematik işleyişi; B. Lazer ışınının ile farklı açılarda yansması- ileri ve yan saçılım okunması C. Lökositlerin hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre ayrılması. Resimler kendi çizimlerimizdir. (Paint, Procreate programı kullanıldı). Dot-blot data: (Bekman Coulter, Navios, Kaluza Software).

**a) Ortak Lökosit Antijeni, CD45 Görüntüsü:** Akım sitometride kan örneğindeki normal hücresel elemanları ortak bir antikor kapısında izlemek, patolojik oluşumların görsel olarak ayırt edilmesinde büyük kolaylık sağlar. Bu amaçla, ortak lökositlerin antijeni CD45 spesifik floresan işaretli monoklonal antikor (MoA) kullanılarak CD45 ekspresyonuna göre hücre dağılımı gösterilir (Şekil 1). Lökosit ortak antijeni (CD45), olgun eritroid hücreler dışında hematopoietik soydaki tüm çekirdekli hücrelerde ifade edilir. Kemik iliği ve kan hücreleri üzerinde çalışan klinik laboratuvarlarda akım sitometri okuma panellerinde CD45 MoA işaretlemesi ile standart hücre popülasyonu tespiti yapılır. Hücrelerin CD45 ekspresyonu [negatif, zayıf (dim), orta (moderate), pozitif (bright) veya değişken (variable)] şekilde sınıflandırılabilir (4,6).

### b) Antikor Çeşitleri ve Akım Sitometride Kullanımı:

Tanısal antikorların yüksek özgüllük ve seçici bağlanma özellikleri nedeniyle klinik ve laboratuvar testlerinde kullanım alanı sürekli güncellenmektedir ve her bir antikor başına CD (Cluster of differentiation, farklılaşma kümesi) konularak numara ile ifade edilmektedir. Tanısal antikorlar, B hücrelerin antikor sentezleyen plazma hücresine dönüşmesi sonrasında özel laboratuvar teknikleri ile sürekli antikor sentezleyebilen "hibridoma"ların elde edilmesi ile yaygınlaşmış ve laboratuvar testlerinde kullanılan MoAb eldesi kolaylaşmıştır. Antikorlar saflıklarına göre monoklonal ya da poliklonal özellikte olabilirler. Akım sitometri uygulamalarında genellikle florokrom işaretli ve monoklonal karakterli antikorlar tercih edilir ve şişe üzerinde ilgili elde edildiği klon ve üretim lot numarası belirtilir (7). İndirekt işaretleme işlemlerinde florokrom etiketi olmayan "primer" antikor kullanılır. Bu durumda görüntülenmesini sağlamak için aynı türden etiketli sekonder antikor kullanılır. Örnek: GAM-FITC.

Monoklonal antikorlar (MoAb) doğası gereği monospesifiktir ve bir antijenin tek bir bölge (epitopuna) karşı yüksek afiniteye ve özgüllüğe sahiptir. MoAb'ler plazma hücreleri tarafından bir antijen veya immünojenin üzerinde bulunan herhangi bir epitopa karşı üretilebilir (8). Poliklonal antikorlar (pAb), farklı B hücre soyları tarafından üretilen ve belirli bir antijenin birden fazla epitopuna karşı tepki veren immünooglobulin yapıda antikor havuzudur. Poliklonal Antikorlar (pAb), belirli antijene karşı yüksek titrelerde antikor üretmek için bir primer-boost bağışıklama stratejisi kullanılarak bir immünojenin deney hayvanına enjekte edilmesiyle üretilir. Bağışıklamadan sonra, pAb doğrudan veya saflaştırılmış formda kullanılabilir ve çoklu epitop bağlama özellikleri gösterir. Monoklonalitede aynı antijen ve epitopa karşı yüksek afinite sağlanırken, poliklonalitede, aynı antijenin farklı epitoplara karşı da afinite sağlanır (9). MoAb akım sitometride, pAb ise eliza testleri ve western blot uygulamalarında tercih edilir.

Monoklonal antikorlar genellikle hibridoma kaynaklıdır. Hibridoma iki somatik hücrenin sitoplazma ve çekirdeğinin özel koşullarda kaynaşması ile elde edilir. Her bir hibridoma hücresi bir antijene özgün MoAb üretme kaynağı olarak

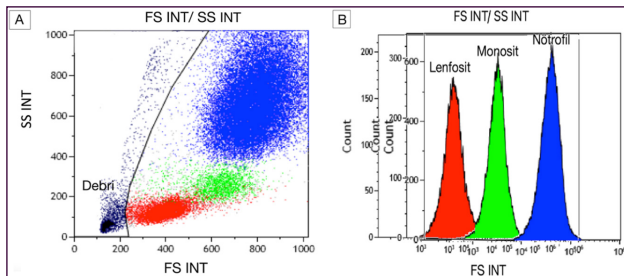
patentlenebilir. Hibridoma teknolojisi, in vivo uygulamaları için MoAb eldesi için en çok tercih edilen teknolojidir (10).

İzotipik kontrol (Isotype control): İzotip ve test antikorunun aynı konak türünden ve aynı sınıftan (yani fare IgG2b gibi) olması gerekir; bu da Fc reseptörleri veya diğer hücre bileşenleriyle nasıl etkileşime girdiğini etkiler. İzotip, test antikoruyla aynı florokrom konjugata da sahip olmalıdır. İzotip ve test antikoru arasındaki tek fark antijen özgüllüğü olmalıdır (4).

Ayrıca Fc bölgesi ve non-spesifik bağlanmaların önlenmesi için Fc-bloking işlemi yapılır.

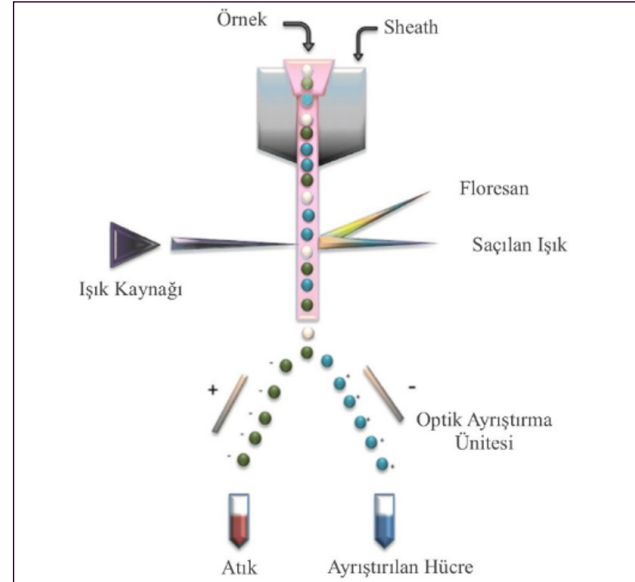
**c) Akım Sitometri ve Floresan Etiketler (Florokromlar):** Akım sitometri cihazları üretici firmaların tasarımlarına göre farklı özellikler içerebilir. Cihazın içerdiği lazer sayısına göre okuma yapabileceği floresan renk sayısı ve floresan aralığı değişebilir. Antikorları etiketlemek için florokrom adı verilen onlarca farklı floresan prob kullanılabilir. En yaygın kullanılan florokromlar FITC, fikoeritrin (PE) ve alofikosiyenin (APC) dir. İki florokrom içeren tandem boya geliştirilmesi ile kullanılacak etiketli protein sayısını artırmıştır. Örnekler arasında PE ve APC'nin çeşitli siyanin boya ile konjugatları kullanılabilir (11). Antikor etiketi florokromlar lazerle etkileşime girerek farklı dalga boylarında ışımaya yaparlar. Bu ışımaya akım sitometri detektörü tarafından ölçülerek dataya dönüştürülür. Sık kullanılan lazer tipleri ve floresan kanal yerleşimleri; mavi lazer (FS, SS, FL1-FL5; B525-FITC, AF488, B575-PE / RD1, B620-ECD, B675-PC5, B700-PC5.5, B770-PC7), kırmızı lazer (FL6-8; R660-APC, R763-APC-750), viole lazer (FL9-10; V450-PB, V525-KrO) şeklindedir.

**d) Akım Sitometride Tek ve İki Parametrelili Data Analizi:** Tek parametre analizinde, histogram görüntüsü kullanılır. Histogramda X eksenini floresan kanaldaki parametrenin sinyal yoğunluğu değerini ve Y ekseninin kanal numarası başına hücre sayısını (Count) temsil ettiği tek parametrelili bir çizimdir (Şekil 2). Akım sitometri iki parametrelili analiz, biri X ekseninde ve biri Y ekseninde olan iki ölçüm parametresi vardır ve nokta grafiği (dot blot) olarak görüntülenir. Nokta grafiği, iki parametrelili görüntüsünü sağlar ve her nokta bir veya daha fazla hücreyi temsil eder (Şekil 2) (12). Nadiren Z eksenine de eklenerek 3 parametrelili analize ihtiyaç duyulur.



**Şekil 2.** Akım Sitometri Data Analiz ve Gösterim Çeşitliliği; (A) Akım sitometri iki parametre FS/SS dot plot (B) Tek parametre histogram ile veri analiz görüntüsü. Laboratuvarımızdan elde edilmiştir (Bekman Coulter, Navios, Kaluza software).

**e) Akım Sitometri ile Hücre Safaştırma (Sorting) İşlemi:** Akım sitometride analiz edilen hücrelerin fiziksel olarak ayrılması ve hücre saflaştırma (sıralama, sorting) işlemi için kullanılmaktadır. Hücrelerin sorting ile ayrılması optik saptırma ya da manyetik işaretleme antikorları kullanılarak yapılır (Şekil 3) (13). İşaretli antikorlar eklenerek istenilen işareti hücre grubu ayrıştırılabilir.



**Şekil 3.** Akım Sitometri ile Hücre Safaştırma (Sorting) İş Akışı. Resim için Paint, Procreate programı kullanıldı.

## 2- Sağlıklı Hücresel Elemanların Akım Sitometride Analizi;

Akım sitometrik analizde hedeflenen hücre gruplarının seçilerek gösterilmesi ve hücresel yapıya ait veriler alınarak normal ve patolojik durumların ayrılması hedeflenir. Bu nedenle ilk aşamada kan veya kemik iliği örneğindeki normal hücresel grupların FS, SS ve CD45+ kapısında dağılımı (nötrofil, monosit ve lenfosit) gösterilerek hücresel dağılım yüzdesi ölçülür. Bu yüzdesel dağılımının referans değerlerle uyumlu olup olmadığı kontrol edilir, gerektiğinde hemogram verileri ile karşılaştırma yapılır ve absölu hücre sayıları hesaplanır. Kan ve kemik iliğini oluşturan tüm hücresel yapılar hakkında daha detaylı ve birbiri ile bağlantılı bilgiler elde etmek için SSC/FSC, SSC/CD45 ya da FSC/CD45 ile rutin analize ek olarak gerektiğinde spesifik antikor bazlı özel değerlendirme kapılarında analiz yapılabilir (Şekil 1).

Hücresel tanılamada patolojik/neoplastik olmayan değişimlerin Akım Sitometri ile gösterilmesi;

Hematogon; kemik iliğinde yer alan progenitor B lenfositlerin fizyolojik gelişiminin bir aşamasında oluşan henüz olgunlaşmamış öncü B hücrelerdir. Genellikle kemik iliğinde yer alırlar nadiren periferik dolaşıma çıkarlar. Bu hücreler akım sitometride heterojen bir popülasyondan oluşur ve SSC/CD45+ kapısında ayırt edici bir model sergiler. CD45dim de yerleşik blast bölgesinden olgun



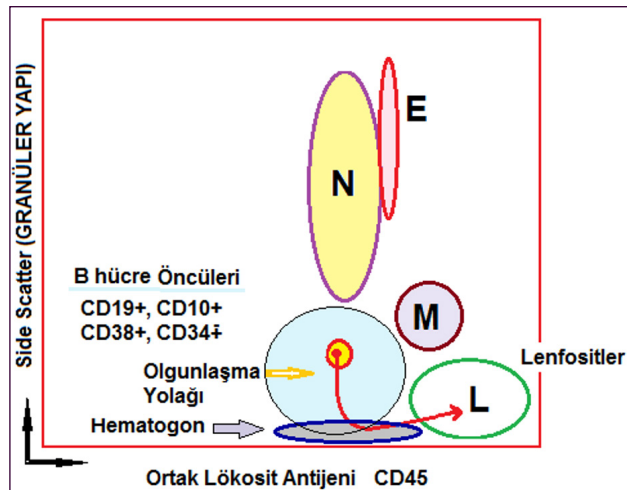
B lenfositlere kadar olup X eksenine yapışık olarak görünürler (Şekil 1,4,5). Hematogon çocuklarda normal kemik iliği hücrelerinin yaklaşık %5'ini yetişkinlerde ise yaklaşık %1'ini oluşturabilir. Bu oranlar bazı hastalık, enfeksiyon ve kemoterapi gibi durumlarda değişiklik gösterebilir (14).

Hematogon'un üç fenotipik aşaması akım sitometride şu şekilde tanımlanır (14) (Şekil 5);

Evre 1 hematogon, TdT+ ve progenitor hücre belirteci CD34'ü+ CD38+, CD19, parlak CD10 seviyeleri vardır ve CD20' ekspresyonu yoktur, CD45 zayıf (dim)tır.

Evre 2 hematogon, TdT kaybolur, artmış CD19+ ekspresyonu, devam eden CD38 ekspresyonu ve dağıntık CD20 ekspresyonu vardır. CD10 ekspresyonu kademeli olarak azalır.

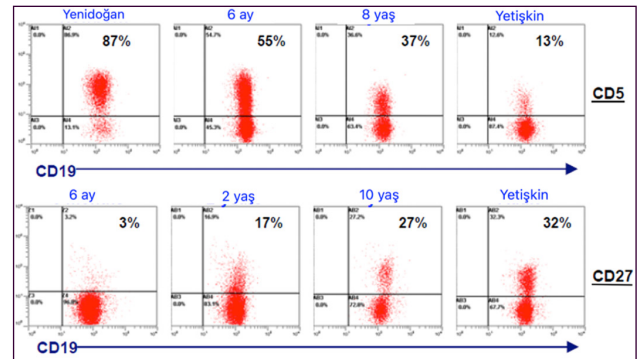
Evre 3 hematogon düşük CD10 ekspresyonu, değişken CD38 ekspresyonu ve artmış CD20+ ve CD45+ ekspresyonu güçlenmiştir. Zamanla, CD10 ekspresyonunda azalış, CD38 kısmen azalış, CD45 ve CD22 ekspresyonunda bir artış gözlenir.



Şekil 5. CD45+ Kanalda Hematogon Yerleşimi ve B Hücre Olgunlaşma Süreci. Resim için Paint, Procreate programı kullanıldı.

Yüzey immünoglobulin IgM oluşumun tamamlandığı, klonal kappa/lamda dağılımı olan ve CD10 ekspresyonun kayb olduğu hücreler olgun B lenfositler olarak kabul edilir (15). Hematogon hipogranüler karakteri nedeniyle genellikle X-ekseni alt düzleme yakın, yapışık (SS değeri çok düşük) olarak gözlenir. B-ALL minimal rezidüel hastalık takibinde lösemik blast-hematogon ayırımında CD44, CD58 ve CD81 gibi adezyon moleküllerinin heterojen ekspresyonların varlığı kontrol edilebilir (14).

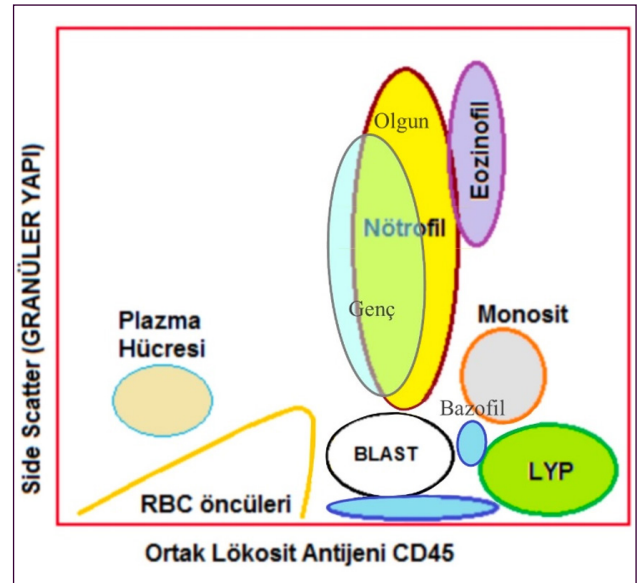
Ayrıca çocukluk erken döneminde B hücrelerin yüzeyinde bir T hücre antijeni olan CD5 ekspresyonu izlenebilir ve ileriki yaşlarda bu durum yaşa bağlı olarak kaybolur. Benzer şekilde yeni doğan bebeklerde çok düşük olan CD27 pozitif hafıza lenfoid hücreler yetişkinlerde normal düzeye gelebilir (4,14) (Şekil 6).



Şekil 6. B Lenfositlerin Yüzey Belirteçlerinin Yaşa Bağlı Değişimi; CD5, CD19, CD27 <https://www.cytometry.org/web/education> dan tercüme edildi (Bekman Coulter, Navios, Kaluza Software).

### Eritroid Seri Elemanları

Eritroid serisindeki hücreler, eritroid progenitor hücrelerden köken alır ve olgun eritrosit hücrelerine dönüşürler. Eritrositlerin anormal morfolojisinin olduğu eritroid lösemi (CD71, CD235, CD238) ve herediter sferositoz gibi bazı hastalıkların tanısında akım sitometri kullanılmaktadır. Herediter sferositoz tanısında Ema (eosin-5 maleimide) testi ve osmotik fragilite (osmatik çatlatma) testi akım sitometri ile uygulanmaktadır (14).



Şekil 7. SSC/CD45 Kanal Görüntüsü, Normal Hücrelerin ve Blastik Hücrelerin CD45+ İliği ve Granüler Özelliğe Göre Yerleşimi, (Resim için Paint, Procreate programı kullanıldı).

Olgunlaşmamış eritroid hücreler blast hücrelerle aynı büyüklükte (FSC) de yerleşebilir. Eritrosit öncülleri olgunlaştıkça hacim olarak küçülür ve akım sitometri kadranında sola yerleşir. Eritrosit grubunun SSC de yerleşimi de düşük derecededir SSC değeri sıfıra yakındır (Şekil 7) (Tablo 1).

### Lenfosit Tanımlanmasında Akım Sitometri Uygulamaları

Lenfoid hücreler lenfoid progenitör kök hücrelerden köken alır; mikroorganizmalara karşı bağışıklık yanıtının oluşumunda görev alırlar. Ayrıca, otoimmünite ve kanser gibi

birçok durumda rol alır. T ve B hücrelerin köken aldığı lenfosit öncü hücreleri (prolenfositler) olgun lenfositlerden daha büyük sitoplazma ve daha büyük bir çekirdeğe sahiptir, kaba bir kromatin yapısı ve genellikle belirgin bir nükleolus içerirler (5). Olgunlaşmasını tamamlayan lenfositler B, T veya NK hücrelerine dönüşür (15). Bu hücreler farklılaşma sürecine göre farklı yüzey markırları sergilerler (**Tablo 1**).

Lenfositler için CD45+ pozitifliği çok karakteristiktir ve lenfositlerin kolayca tanımlanmasında yardımcı olur. Özellikle düşük SSC ve parlak CD45+ ekspresyon, akım sitometri SSC/CD45 kadranda sağ alt köşeye yerleşen lenfoid hücre grubu kolaylıkla ayırt edilebilir (**Şekil 7**). Sitotoksik karakterli ve granüllü olan CD8+ T hücreler, CD4+ T hücrelere nispeten T lenfositlerin yerleşim yerinin daha yukarı sınırlarında bulunmaktadır. Bunda aktivasyon fazı ve granüler yapıların etkili olduğu düşünülmektedir. Dinlenme fazında (resting) olan lenfositler FSC'de daha küçük boyutludur. Aktivasyon fazına girdiği zaman hücre boyutları artabilir. Büyük granüllü lenfositlerde SSC yerleşimi yukarı doğru kayabilmektedir (4) (**Şekil 7**).

Lenfosit dağılımı; fizyolojik lenfoid/myeloid dağılımı yaşa göre değişebilir. Çocuklarda yaşamın ilk yıllarındaki lenfosit hâkimiyeti erişkin dönemde nötrofil hâkimiyetine doğru kayar. Erişkinlerde dolaşımında bulunan beyaz kan hücrelerinin yaklaşık %30'unu lenfositler oluşturur. Patolojik durumlarda ise lenfoid/myeloid oranlarında yaştan bağımsız değişimler gözlemlenebilir. Örneğin enfeksiyon durumlarında nötrofil hakimiyeti artarken bazı viral enfeksiyonlarda lenfositoz ya da lenfopeni görülebilmektedir.

Lenfosit gelişimi; Lenfositler T, B ve NK olarak ayrılır (14); B hücreler kemik iliğinde lenfoid öncü hücrelerden köken alır, self-nonsel self ayırım kabiliyetini (ontojenez) burada kazanır ve olgunlaşan B hücreleri CD19+IgM+ olarak dolaşıma çıkar. T lenfositlerin öncüleri (timositler) kemik iliğinde üretilir, timusa göç ederek ontojenez sürecine girer, timüs korteks ve medullasında self-nonsel self ayırım kabiliyetini kazanarak olgunlaşır veya CD3+CD4+ ya da CD3+CD8+ lenfositler şeklinde dolaşıma çıkar (5).

Lenfosit alt grupları; T, B ve NK hücre oranlarının akım sitometri ile ölçülmesi sonucu elde edilir. İmmün yetmezlik düşünülen hastalarda, tanı ve izlem amacıyla kullanılır. Özellikle enfeksiyon ve neoplastik oluşumlarda da normalden sapmalar gözlenir.

Neoplastik oluşumların izlenmesi: Bu amaçla lenfositlerde yaygın olarak kullanılan akım sitometrik testler arasında, Akut lenfoblastik lösemi taraması ve takibi yer alır. Ayrıca, kronik lenfoproliferatif hastalık ve lenfoma hastalarının tanı ve takibini değerlendirmek için kullanılmaktadır.

Ölçülebilir kalıntı hastalık (MRD 'Minimal Residual Disease'); tarama takibi, ölçülebilir kalıntı hastalık her bir hasta için önceden hazırlanmış MRD panelleri ile değerlendirilir. Akım sitometride on bin hücrede bir blastik hücrenin yakalanması mümkündür. Daha yüksek hassasiyetli analizler için QPCR ya da NGS panellerinin araştırılması gerekmektedir (17).

## Nötrofiller

Nötrofiller granülositler veya polimorfonükleer nötrofiller (PMN), yaygın olarak doğuştan gelen bağışıklık sistem hücreleri olup, çok loblu bir çekirdeğin (polimorfonükleer) varlığıyla tespit edilebilirler. Dolaşımdaki hücrelerin yaklaşık %50 ila %70'ini oluşturabilir (5). Nötrofil kaynaklı blastik hücrelerinde (AML) orta düzeyde CD45+ pozitifliği vardır. Blastlar genellikle çok az granüler özelliği olduğu için SS özelliği düşüktür (**Şekil 7**). Sağlıklı nötrofilde görülen temel belirteçler vardır (**Tablo 1**)(16,18). Nötrofillerin olgun ve genç olarak ayrıştırılmasında CD16 ve CD45 kanalında kapılanması ve bu kapılardaki yerleşiminden yararlanılır.

DHR Testi, nötrofillerin mikroorganizmaları öldürme kabiliyeti değerlendirilir. Bu testte uyarıcı olarak phorbol miristate aasetat (PMA) ve işaretleyici olarak Dihidrorodamin boyası (DHR) 123 ile inkübe edilmiş normal granülositlerde floresan yoğunluk ölçülür. Nötrofil aktivasyon derecesini belirlemede kullanılan bir testtir. DHR 123, aktive edilmiş granülositlerde oksijen reaktif türlerinin (ROS) saptanması için en duyarlı indikatördür. Akım sitometri ile elde edilen histogramlar KGH hastalarını ve X'e bağlı taşıyıcılarını tanımlamaya yardımcı olur. DHR testinde stimülasyon indeksi (SI) değeri; Normal sağlıklı bireylerde SI değeri 60-150, hastalarda 1-10 aralığında değişebilmektedir (19).

## Eozinofiller

Eozinofiller, dolaşımdaki lökositlerin sırasıyla %1-3'ünü temsil eder. Bu hücreler, farklı boylarla tespit edilebilen çok loblu çekirdeklerin ve sitoplazmik granüllerin varlığıyla karakterize edilir. CD45dim, CD16-, HLA-DR+ özellikli olup granüler yağsı nedeniyle SSC özelliği yüksektir (5,21).

## Bazofiller

Bazofil granülositler karakteristik olarak, çekirdeğin üzerini örten büyük, yuvarlak, bazofilik (mavi-siyah) sitoplazmik granüller bulunur. Bazofiller en az yüzdedeki granülosit alt kümesidir ve CD45 ekspresyonları lenfositlerden düşüktür, SSC değeri lenfositlere yakındır ve NK hücrelerine yakın bölgede yerleşirler, bazen lenfoid hücre grubundan CD45dim, HLA-DR-, CD123 özellikleri nedeniyle ayrılırlar (22). Bazofil Aktivasyon Testi (BAT) ile çeşitli alerjik durumların ayırıcı tanısında, bazofil yüzey belirteçleri olan CD63 ve CD203 ekspresyonları akım sitometri yöntemi ile ölçülebilir (23,24).

## Monositler

Monositler myeloid seriden köken alır ve dolaşımdaki hücrelerin yaklaşık %5-15'ini oluşturabilir. Akım sitometride monositler SSC/FSC yerleşimi olarak lenfosit ve granülosit gruplarının arasında yerleşir (**Şekil 7**) (**Tablo 1**) (25). Monositler ve monosit öncüleri bazı neoplastik koşullarda (akut monositik ve monoblastik lösemiler AML M5 gibi) ve enfeksiyon durumlarında artabilir. Ayrıca Kronik monositozla karakterize olan kronik miyelomonositik lösemi (KMML) teşhisinde de KML tarama test paneli kullanılır.

## Plazma hücreleri

B hücre aktivasyon sonrasında plazma hücrelerine veya bellek B hücrelerine farklılaşabilir. Plazma hücresi morfolojik olarak orta büyüklüktedir ve birincil rolü antikor üretmektir (25). Her bir plazma hücresi sadece bir antijene özgün antikoru sadece bir ağır zincir alt tipi Ig (A,G,E ya da M) şeklinde üretebilir (25). Fiziksel özellikleri lenfositlere benzemekle beraber, olgun plazma hücreleri genellikle CD45dim karakterlidir (**Tablo 1**). Neoplastik durumlarda yani multiple myelom (MM) olgularında monoklonal plazma hücresi beraberinde CD56+, CD38+,CD138+ karakterli hücreler izlenir (4).

**Tablo 1. Dolaşımda yer alan hücresel elemanlar, yüzey belirteçleri ve ilgili testler (4,23,24,26).**

Hücre Tipi	Yüzey Belirteçleri	İlgili Patolojik durum Taraması
Lenfosit	CD45+ parlak: CD45+	Lenfosit subset analizi Crossmatch testleri Akut ve kronik lösemi paneli
	T CD3+	
	T helper CD3+ CD4+	
	T cytotoxic CD3+ CD8+	
	NK CD16+ CD56+	
	B CD19+	MRD testi
Plazma hücre	CD38+ ve CD138+, CD19 zayıf	MM paneli
Nötrofil	CD16, CD15, MPO	DHR testi AML paneli
Monosit	CD14, CD33, CD64, CD11b	Lösemi paneli, KMML
Eozinofil	CD45 zayıf, CD16-, HLA-DR+	
Bazofil	CD123, CD63, CD203c	Bazofil aktivasyon test
Eritrosit	CD71, CD235, CD238	Lösemi paneli
Trombosit	CD41, CD42a-b, CD61,	Lösemi paneli Glazmann & Bernar solier tarama

CD: Cluster of differentiation., DHR: dihidrorhodamin testi, MRD: minimal reziduel disease

Aberan ekspresyon: Belirli bir soy ile ilişkili olmayan, bir veya birden fazla belirtecin pozitif ifadesi veya normalde pozitif olan bir antijenin yokluğu, şeklindeki anormal antijen ifadesi olarak adlandırılır. Aberan bir belirteç varlığı sadece neoplastik bir süreci tanımlamaya yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda MRD takip sürecindeki hücreleri tanımlamaya yardımcı olur (4).

Akım Sitometri ile Kök Hücre (CD34) Sayımı, allojenik (hastanın vericisinden) ve otolog (hastanın kendisinden) kemik iliği nakli yapılmak üzere toplanan/alınan kök hücre sayısının bilinmesi ve verilecek kök hücre miktarının hesaplanması amacıyla çalışılmaktadır. Bu ölçüm için sayısı bilinen parlak floresan veren boncuklar kullanılır ve birim hacimdeki(mikroL) hücre sayısı hesaplanır. Bu yöntem ile kan dışı ürünlerde (kord kanı, kemik iliği gibi) görülebilen istenmeyen hücre grupları ekarte edilir. En sık kullanılan "Single" platform ISHAGE metodu ile yapılan ölçümlerdir (27).

Kök hücre canlılık analizi, allojenik (hastanın vericisinden) ve otolog (hastanın kendisinden) kemik iliği nakillerinde toplanan ve ileride hastaya verilmek üzere dondurulan örneklerdeki canlı hücre sayısının bilinmesi ve kullanılması gereken kök hücre miktarının hesaplanması amacıyla Aferez üniteleri için çalışılmaktadır.

Akım Sitometri ile Lenfosit Cross-Match Testleri, Cross-match testleri ile alıcının serumunda vericinin lenfositlerine karşı HLA antikorlarının varlığı araştırılmaktadır. Özellikle böbrek nakli öncesi yapılan en hayati uyumluluk testlerinden birisidir. Antikor mevcut ise, bu durum alıcının immün sistemini verici antijenlerine karşı duyarlı olduğunu gösterir nakil yapılmaz. Doku tiplene ve organ nakli laboratuvarlarında, cross-match testleri olarak, kompleman bağımlı mikrolenfositotoksiste ve akım sitometrik cross-match testleri kullanılmaktadır (4).

## SONUÇ

Bu derleme ile akım sitometrinin çalışma prosedürleri bileşenleri ve sağlıklı örneklerden elde edilen laboratuvar verileri kullanarak akım sitometrik analiz için genel bir bakış imkanı sunulmuştur. Literatürde Türkçe kaynakların kısıtlı olması nedeniyle, bu eksikliğin tamamlanması amaçlanmıştır. Verilerin Türkçe olması kısıtlı Türkçe kaynak ihtiyacının karşılanmasında bir boşluğu dolduracaktır.

Gelişen teknolojiye bağlı olarak bilimsel araştırmalar ve hastalıkların tanısında klinik tanı ve araştırmada uygulamalarında akım sitometrinin kullanımı hızla genişlemektedir. Günümüzde akım sitometrinin öne çıkan başlıca özelliği; binlerce hücrenin eş zamanlı, çok parametreliliği, karakterizasyonu ve dakikalar içerisinde hızlı ve güvenilir sonuç alınabilmesidir. Akım sitometri ile başta kan ve kemik iliği olmak üzere bütün vücut sıvıları, kültür sıvıları, hatta doku örneklerinden elde edilen sıvılarda bulunan hücrelerin analizi, hücresel yapıların canlılık ve gelişim aşamalarının izlenmesi mümkündür. Ayrıca, çeşitli mitojenlerle hücresel uyum sonrasında hücre yüzeyindeki ve içindeki reseptör ekspresyonları ve fonksiyon değişimi de izlenebilmektedir. Son yıllarda akım sitometrik analiz hem rutin hem de bilimsel araştırma laboratuvarlarının vazgeçilmez bir altyapısı olmuştur. Akım sitometrinin gelecekte daha kompakt cihazlarla onlarca antikorlu dakikalar içinde analiz ederek yapay zekâ yardımı ile hücreler hakkında bilgi sahibi olmayı kolaylaştıracağı ve kanser taramalarında daha yaygın olarak kullanılacağı öngörülmektedir.

## ETİK BEYANLAR

**Hakem Değerlendirme Süreci:** Harici çift kör hakem değerlendirmesi.

**Çıkar Çatışması Durumu:** Yazarlar bu çalışmada herhangi bir çıkarı dayalı ilişki olmadığını beyan etmişlerdir.

**Finansal Destek:** Çalışmamız Erciyes Üniversitesi BAP birimi TDK-2024-14151 ve TSAÜ-2023-12509 nolu proje çalışmaları kapsamında desteklenmiştir.

**Yazar Katkıları:** Yazarların tümü; makalenin tasarımına, yürütülmesine, analizine katıldığını ve son sürümünü onayladıklarını beyan etmişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Rees P, Summers HD, Filby A, Carpenter AE, Doan M. Imaging flow cytometry: a primer. *Nat Rev Methods Primers*. 2022;2:86.
2. Iyer A, Hamers AAJ, Pillai AB. CyTOF® for the Masses. *Front Immunol*. 2022;13:815828.
3. Rees P, Summers HD, Filby A, Carpenter AE, Doan M. Imaging flow cytometry: a primer. *Nat Rev Methods Primers*. 2022;2:86.
4. Gaye Erten, Gülderen Y Demirel, Günnur deniz. Akan hücre ölçer ve uygulama alanları. Medya Tower Yayıncılık Hiz. 2009
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 2021.
6. Rieger AM. Flow cytometry and cell cycle analysis: an overview. *Methods Mol Biol*. 2022;2579:47-57.
7. Basu K, Green EM, Cheng Y, Craik CS. Why recombinant antibodies - benefits and applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;60:153-8.
8. Nordmann GC, Malkemper EP, Landler L, et al. A high sensitivity ZENK monoclonal antibody to map neuronal activity in Aves. *Sci Rep* 2020;10:915.
9. Ascoli CA, Aggeler B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *Biotechniques*. 2018;65(3):127-36.
10. Kumar R, Parray HA, Shrivastava T, Sinha S, Luthra K. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *Int J Biol Macromol*. 2019;135:907-18.
11. Manhas KR, Blattman JN. Flow Cytometry Analysis of Immune Cell Responses. *Methods Mol Biol*. 2023;2597:105-20.
12. Hays A. Approaches to overcome the challenge of sample stability for flow cytometry analysis in clinical trials. *Bioanalysis*. 2021;13(21):1587-9.
13. Nolan, JP. Spektral akış sitometrisinin evrimi. *Sitometri A*. 2022;101:812-7.
14. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*. 2001;98(8):2498-507.
15. Nair A, Manohar SM. A flow cytometric journey into cell cycle analysis. *Bioanalysis*. 2021;13(21):1627-44.
16. McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(2):277-85.
17. Heuser M, Freeman SD, Ossenkuppe GJ, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021;138(26):2753-67.
18. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459-89.
19. Köker N. Kronik granülomatoz hastalıkta nadph oksidaz aktivitesi ve patogenezi ilişkisinin yeni tanısal yöntemlerle araştırılması. Doktora tezi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2023.
20. Şimşek S. Nötrofil Aktivasyon Bozukluğunda Etkilenen İmmüno-lojik Yolakların Akım Sitometrik Uyarım Testleri İle Araştırılması. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2023:60-62.
21. Akuthota P, Weller PF. Eosinophils and disease pathogenesis. *Semin Hematol*. 2012;49(2):113-9.
22. Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A, et al. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(5):813-9.
23. Santos AF, Alpan O, Hoffmann HJ. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy*. 2021;76(8):2420-32.
24. Eberlein B. Basophil Activation as Marker of Clinically Relevant Allergy and Therapy Outcome. *Front Immunol*. 2020;11:1815.
25. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
26. Köker MY. Diagnostic Management of Chronic Granulomatous Disease. *Asthma Allergy Immunol* 2023;21:1-2.
27. Lanzavecchia A, Sallusto F. Human B cell memory. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(3):298-304.