

## TROMBOPOEZİ DEĞERLENDİRMEDE AKIM SİTOMETRİSİ İLE RETİKÜLOTROMBOSİT (TO+ TROMBOSİT) SAYIMLARININ YERİ

Abdullah HACİHANEFİOĞLU\*, Mustafa N.YENEREL\*\*,  
Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA\*\*, Mehmet TURGUT\*\*\*

### ÖZET

Thiazole orange (TO) nükleik asitlere, özellikle RNA ya bağlandığında fluoresans oluşturan, aslında retikülosit sayımında kullanılmış bir boyadır. TO boyamasını hematolojik olarak normal kişilerde ve çeşitli niceliksel trombosit bozukluğu olan hastalarda tam kan örneklerinde kullandık. 58 kontrol örneğinde TO ile boyanan (TO+) trombositlerin oranı  $3.85 \pm 1.99 (\pm SS)$  bulundu. Kemik iliğinde megakaryosit sayısı normal veya artmış olan 27 trombositopenik hastada TO+ trombosit oranı  $16.93 \pm 12.93$  bulundu. Bu kontrole göre anlamlı olarak yüksek (p<0.0001). Kemik iliğinde megakaryosit sayısının azaldığı 17 trombositopenik hastada TO+ trombosit oranı kontrolden farklı bulunmadı. Fakat mutlak TO+ trombosit sayısı anlamlı olarak düşüktü (p<0.0001). 15 trombositozlu hastada TO+ trombosit oranı  $3.65 \pm 2.28 (\pm SS)$  bulundu ve bu kontrol değerlerinden farklı değildi. Yine bu hasta grupunda TO+ trombositlerin mutlak sayısı kontrol değerlerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.0001). Sonuç olarak retikülotrombositlerin akım sitometrisi yöntemi ile sayımı sensitif ve spesifik bir test olup, trombositopenik hastalarda trombopoetik aktiviteyi noninvazif olarak hızlı bir şekilde değerlendirmeyi sağlamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Retikülotrombosit, thiazole orange, akım sitometrisi

### SUMMARY

*Flow-cytometric analysis of reticulated platelets in estimating thrombopoiesis.* Thiazole Orange (TO), a fluorescent dye originally used for reticulocyte analysis, is characterized by a large fluorescence enhancement yield on binding to nucleic acids, particularly RNA. We applied TO staining to platelets in whole blood samples from haematologically normal subjects and patients with various quantitative platelet disorders. The percentage of TO+ platelets in 58 control subjects was  $3.85 (1.99 \pm SD)$ . In 27 thrombocytopenic patients whose bone marrow contained normal to increased number of megakaryocytes, the percentage of TO+ platelets  $16.93 (12.93 \pm SD)$ , was significantly elevated (p<0.0001). In contrast, the proportion of positively stained platelets in 17 patients with thrombocytopenia due to various conditions with reduced marrow megakaryocytes did not significantly differ from the controls, whereas the absolute counts of TO+ platelets were significantly lowered (p<0.0001). The percentage of TO+ platelets in 15 patients with thrombocytosis was  $3.65 \pm 2.28 (\pm SD)$  and did not significantly differ from controls, but the absolute counts of TO+ platelets were significantly increased (p<0.0001). We conclude that flow cytometric analysis of reticulated platelets is a sensitive and spesific test that rapidly provides information on the thrombopoietic activity in thrombocytopenic disorders.

**Key words:** Reticulated platelet, thiazole orange, flow-cytometric analysis

### GİRİŞ

Trombositopeni, kemik iliğinde megakaryosit üretiminin azalmasına, çevre kanında yıkımının artmasına veya dalakta göllenmeye (hipersplenizm) bağlı olabilir. Hiperspleniz-

me bağlı olan trombositopeniler çoğu kez dalak büyüklüğünün değerlendirilmesi ve diğer laboratuvar bulgularına dayanılarak tanılabılır. Yapım eksikliği veya yıkım artışına bağlı trombositopeniyi birbirinden ayırabil-

Mecmuaya geldiği tarih: 02.03.2001

\* Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Kocaeli

\*\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul

\*\*\* Ondokuzmayıs Üniversitesi, Ondokuzmayıs Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı

mek için kemik iliğindeki megakaryosit sayısının değerlendirilmesi gereklidir. Son yıllarda akım sitometrisinin hematoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanım alanına girmesiyle birlikte retikülosit sayımları da bu yöntemle yapılmaya başlanmıştır. Analizlerin akım sitometresi ile yapılması sadece retikülosit oranını değil, işlemin direkt olarak hücre RNA içeriğini yansıtması nedeniyle, hücrelerin olgunluk durumu hakkında da bilgi sağlamaktadır <sup>(1)</sup>. Bu yöntemde daha genç olan hücreler daha fazla RNA içerdiği için daha yoğun floresans vermektedir <sup>(3)</sup>. Genç eritrositlerin (retikülositler) sayısının değerlendirilmesinde kullanılan bu yöntem aynı şekilde dolaşıma yeni çıkmış genç trombositlerin (retikülotrombosit) sayımı için kullanılmaya başlanmıştır. Bu konuda ilk yapılan çalışmalardan birinde TO (thiazole orange) ile işaretlenmiş trombositlerin oranının trombopoetik aktiviteyi gösterdiği bildirilmiştir <sup>(6)</sup>.

Bu çalışmada kemik iliğinde megakaryosit oranının normal veya artmış olduğu trombositopenik hastalarda (yıkım trombositopenisi), trombositoz ile seyreden myeloproliferatif hastalıklarda ve kemik iliğinde megakaryosit oranının azaldığı hastalıklarda akım sitometresiyle retikülotrombosit sayımları yapıldı. Retikülotrombosit sayımının yıkım ve yapım eksikliğine bağlı trombositlerin ayırıcı tanısında kullanılabilecek bir parametre olarak değeri araştırıldı.

## MATERYAL ve METOD

**Kontrol ve hasta grupları:** Bu çalışmada 59'u hasta 58'i sağlıklı erişkin kişilerden oluşan 117 kişiden alınan kan örnekleri akım sitometresiyle retikülotrombosit yönünden değerlendirildi.

Hastalar trombosit sayısı ve kemik iliği megakaryosit oranı yönünde 3 gruba ayrılarak değerlendirildi. Grup I kemik iliğinde megakaryosit sayısı normal veya artmış olan

trombositopenik hastalardan, Grup II kemik iliği aspirasyonunda megakaryosit sayısı azalmış, trombositopenik hastalardan, Grup III ise trombositozlu hastalardan oluşmaktaydı.

**Kan örnekleri:** Hematolojik olarak normal kişilerden ve hastalardan EDTA (ethylenediamine tetraacetate) lı 5mL venöz kan örnekleri alındı ve aynı gün çalışıldı.

**TO ile boyama:** Bu amaçla Becton Dickinson tarafından pazarlanan TO (ReticCO-UNT™) ın metanolde hazırlanmış stok solüsyonu (1mg/1mL) kullanıldı. 800µL TO ın stok solüsyonu 200µL PBS (phosphate-buffered saline) ile dilüe edildi. Boyasız kontrol tüpü olarak kullanılmak üzere 1mL PBS ile ikinci bir tüp hazırlandı.

**CD41 monoklonal antikoruna ile işaretleme:** Trombositleri daha iyi tanımlama amacı ile TO dan farklı flüoresans özelliği gösteren ve trombositlere özgü glikoproteinlere bağlanan bir anti-glikoprotein monoklonal antikoruna (MoAb) kullanıldı. Bu amaçla Dako tarafından hazırlanan ve 0.05 M Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 15 mM NaN<sub>3</sub> ve %1 bovin serum albümini ortamında RPE (R-phycoerythrin) ile konjuge edilmiş monoklonal fare anti-insan trombosit glikoproteini IIb (CD41) kullanıldı. Çevre kanı örnekleri EDTA'lı kan sayım tüplerine alındı ve Ault KA ve arkadaşlarının belirttiği şekilde hazırlanıp flow sitometride analiz edildi <sup>(2)</sup>.

Daha sonra 1mL PBS ve 10µL CD41 MoAb ile hazırlanan kontrol ve 800µL TO ile 200µL PBS ve CD41 MoAb ile hazırlanan test tüplerine yeni alınmış, 5 µL EDTA'lı tam kan örnekleri eklenerek 30 dakika süreyle, karanlıkta, oda ısısında inkübe edildi ve inkübasyon sonrası bekletilmeden akım sitometrisiyle çalışıldı. Verilerin sağlanması ve değerlendirilmesi sırasında CellQuest software'i kullanıldı. Floresans sinyaller logaritmik olarak güçlendirildi. Dar açıda (forward side scatter (FSC)) ve dik açıda (side

scatter (SSC) ışık saçılımının ölçüldüğü nokta grafikleri kullanılarak önce CD41 (+) trombositler çerçeve içine alındı, ve 50.000 sinyal sayıldı. Analiz için tek floresansın kullanıldığı histogram eğrileri tercih edildi. Önce monoklonal antikor kullanılmaksızın sadece fosfatlı tuz tamponu ile "boş" olarak hazırlanan örnek tüpünün verileri kullanılarak trombositlerin otofloresansı belirlendi. Ardından boyalı tüpün verileriyle elde edilen histogram grafiği üzerine aynı alan işaretlenerek alınan floresans yoğunluk retikülotrombosit oranı olarak kaydedildi.

**Trombosit sayımları ve trombosit hacim ölçümleri:** Trombosit sayımı ve hacim ölçümleri (MPV: mean platelet volume) EDTA'lı venöz taze tam kan örnekleri kullanılarak Cell-DYN C1600 (Abbott) kan sayım aletinde yapıldı.

**İstatistiksel Analiz:** Retikülotrombosit oranı (%RT), mutlak RT sayısı (absolute, aRT) ve trombosit sayılarının gruplar arasındaki anlamlılığı Tukey-HSD ve Kruskal-Wallis testi ile; %RT, trombosit sayıları ve cinsiyetler arasındaki farklılıklar Mann-Whitney U-Wilcoxon testi ile araştırıldı (6). Korelasyon katsayıları ve aynı grup içerisindeki trombosit sayıları, MPV ve %RT değerleri arasındaki ilişkiler Pearson yöntemi ile hesaplandı.

## BÜLGULAR

Retikülotrombosit açısından değerlendirilmek üzere 117 kişi çalışmaya dahil edildi. Bunların 58'i hematolojik açıdan herhangi bir patoloji saptanmamış olan erişkin kişiler idi ve bunlar kontrol grubu olarak değerlendirildi. Yaşları 14-70 arasında değişmekte olan grubun 27'si erkek, 31'i kadın idi ve trombosit sayıları  $157 \times 10^9/L$  ile  $419 \times 10^9/L$  arasında değişmekteydi.

Tanıları ve laboratuvar özellikleri Tablo 1'de özetlenen hastalar, kemik iliği megakaryosit oranları ve trombosit sayıları temel alınarak

oluşturulan üç ayrı grupta incelendi. Buna göre Grup I'de kemik iliğinde megakaryosit sayısı normal veya artmış olan 27 trombositopenik hasta, Grup II'de kemik iliği hipoplazisi ve megakaryosit oranında azalmayla birlikte trombositopenik olan 17 hasta ve Grup III de trombositozu olan 15 hasta değerlendirildi.

**Tablo 1.** Çalışmada retikülotrombosit analizi yapılan hastalık grupları

Gruplar	Olgu sayısı
(Grup I) Megakaryosit ↑ veya N, Trombosit ↓	27
İTP	24
Hipersplenizm	3
(Grup II) Megakaryosit ↓, Trombosit ↓	17
Kemoterapi sonrası	15
Aplastik anemi	2
(Grup III) Megakaryosit ↑ veya N, Trombosit ↑	15
Polistemia vera	5
Esansiyel trombositemi	3
Kronik miyeloid lösemi	4
Sekonder trombositoz	3

Akım sitometrik inceleme sonuçları Tablo 2'de özetlendi. Kontrol grubundaki 58 kişide TO+ trombosit oranını (%RT)  $3.85 \pm 1.99$  (ortalama±SS) bulundu. Bu grupta değerler %1.37-11.02 arasında idi. Kemik iliğinde megakaryosit sayısının normal veya artmış olduğu trombositopenili hasta grubunda (Grup I) %RT oranını  $16.93 \pm 12.93$  (ortalama±SS), (aralık %5.04-52.99) olarak saptandı ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık mevcuttu ( $p < 0.0001$ ). Kemik iliğinde megakaryosit sayısının azalmış

**Tablo 2.** Akım sitometrik analiz sonuçlarının gruplara dağılımı

Gruplar	%RT(±SS)	Mutlak RTx10 <sup>9</sup> /L(±SS)
Grup I	$16.93 \pm 12.93$	$8.91 \pm 4.77$
Grup II	$2.99 \pm 1.17$	$1.75 \pm 1.17$
Grup III	$3.65 \pm 2.28$	$26.10 \pm 15.28$
Kontrol	$3.85 \pm 1.99$	$9.54 \pm 5.50$

olduğu trombositopenik 17 hastada (grup II) %RT değeri  $2.99 \pm 1.17$  (ortalama  $\pm$  SS) (aralık %1.09-4.96) olarak saptandı. Kontrol grubuyla %RT arasında farklılık saptanmadığı halde mutlak RT sayısı açısından kontrol grubuyla anlamlı farklılık gözlemlendi ( $p < 0.0001$ ). Trombositozlu hastalardan oluşan Grup III de %RT değerleri kontrol grubuna göre farklı değildi ( $3.65 \pm 2.28$ , aralık: 1.15-9.24). Ancak mutlak RT oranları bakımından bu iki grup arasında anlamlı farklılık vardı ( $p < 0.0001$ ).

Tüm gruplarda %RT oranı, yaşla, cinsiyetle ve MPV değerleri ile ilişki göstermemektedir.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada TO kullanılarak flow-sitometrik yöntemle, dolaşıma yeni çıkan retikülotrombositler sayıldı (%RT). Bu çalışmada kullanılan TO in uygun konsantrasyonunu belirlemek kritik bir önem taşımaktadır. Kullanılan boyanın konsantrasyonları birçok çalışmada birbirinden farklı %RT oranları bulunmasına neden olmaktadır. Yine boya konsantrasyonunun ve inkübasyon süresinin artışı ile yoğun granüllere penetrasyonun artması da burada rol oynuyor olabilir (6). Çalışmamızda retikülosit sayımında geçerli olan konsantrasyonlarda TO kullanıldığında oldukça yüksek flüoresans sinyalleri oluşturmaktaydı. Bu olumsuzluk stok TO solüsyonun dilüe edilerek kullanılmasıyla düzeltilmiştir.

İlk olarak TO 1 kullanarak flow-sitometrik olarak RT sayımını gerçekleştirenler Kienast ve Schmitz dir. Tam kan kullanarak yaptıkları çalışmada normal kişilerde %RT oranını  $8.6 \pm 2.8$  olarak saptamışlardır (6). Yine aynı yöntemle Watanabe ve ark tarafından %RT oranı normal kişilerde  $0.98 \pm 0.41$  bulunmuştur (10). Trombosit zengin plazma kullanan araştırmacılar, örneğin Rinder ve ark. tarafından %RT oranı kontrol grubunda

$2.9 \pm 2.2$  (8), Romp ve ark. tarafından  $4.2 \pm 1.9$  (3), Robinson ve ark. nın yaptıkları çalışmada %RT oranı  $15.6 \pm 2.19$  (9), Ault ve ark. ise  $0.9 \pm 0.1$  (2) bulmuşlardır. Yaptığımız çalışmada tam kanda %RT oranını  $3.85 \pm 1.99$  bulduk. Çeşitli çalışmalarda immün trombositopenili hastalarda yapılan TO ile flow-sitometrik analizlerde kemik iliği trombopoetik aktivitesinin arttığını gösterecek şekilde yüksek değerler (normalin 2 ile 10 katı) bulunmuştur. Kawai ve ark. tarafından normal %RT oranı  $0.35 \pm 1.70$  iken İTP li hastalarda  $3.37 \pm 2.10$  bulunmuştur (5). Fujii ve ark. nın çalışmasında kontrol grubunda %RT oranı  $15.21 \pm 4.98$  den İTP li hastalarda  $26.94 \pm 12.19$  a kadar çıkmaktadır (4). Rinder ve ark. yaptıkları bir çalışmada İTP li hastalarda %RT  $38.6 \pm 27.4$  olarak bildirilmiş olup bu oran normal kişilerdekinin yaklaşık 12 katıdır (8). Başka bir çalışmada kemik iliğinde megakaryositlerin normal veya arttığı, çoğu İTP li olan hastalarda bu oran  $26.9 \pm 10.9$  (kontrol grubunda % $8.6 \pm 2.8$ ) bulunmuştur (6). Son olarak Watanabe ve ark. bu gruptaki hastalarda %RT oranının  $4.95 \pm 3.23$  (kontrolü:  $0.98 \pm 0.41$ ) olduğunu bildirmişlerdir (10). Yine aynı çalışmada mutlak RT sayılarının kontrol grubundakinden farklı olmadığını vurgulamışlardır.

Çalışmamızda kemik iliğinde megakaryosit sayısının normal veya artmış olduğu trombositopenik hastalarda (grup II) (24 ü İTP ye, 3 ü hipersplenizme bağlı) %RT oranını  $16.93 \pm 12.93$  bulduk. Bu değer kontrol grubundakinin yaklaşık 5 katıydı. Çalışmamızda bu gruptaki hastalarda %RT değerleri ile MPV değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamadık ( $r=0.10$ ,  $p=0.6$ ). Trombositopeninin ağırlığı ile %RT oranları arasında anlamlı negatif ilişki vardı ( $r=-0.66$ ,  $p < 0.001$ ). Fakat trombositopeninin ağırlığı ile mutlak RT sayıları arasında aynı şekilde anlamlı bir ilişki yoktu. Bu durum Watanabe ve ark. nın üzerinde durdukları konu ve sonuçlarla uyumlu (10). Bunun tersine başka bir ça-

lişmada %RT oranları ile MPV değerleri arasında benzer hasta grubunda anlamlı bir ilişkiden söz edilmektedir (6). Aynı şekilde Richards ve ark.nın çalışmasında İTP li hastalarda %RT ve MPV değerleri arasında ancak zayıf bir ilişkiden söz edilebileceği bildirilmiştir (7). Rinder ve ark tarafından yapılan çalışmada ise İTP li hastalarda %RT değerleri ile MPV değerleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı, bu yüzden sadece MPV değerlerinin %RT değerlerini dolaylı olarak yansıtamayacağı bildirilmiştir (8). Bu durumun analizlerde tam kan veya trombosit zengin plazma kullanımı ile ilgili olabileceği ileri sürülmüşse de (7), çalışmamızda tam kan kullanılmış olmasına rağmen %RT ile MPV arasında anlamlı ilişki bulamamış olmamız trombosit zengin plazma kullanan araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bir sonuçtur. Nedeni ne olursa olsun hasta gruplarının tanınmasında MPV değerlerinin %RT oranları kadar değerli olmadığını söyleyebiliriz.

Kemik iliğinde megakaryosit sayısının azalmış olduğu trombositopenik hastalarda (15 i kemoterapiye bağlı kemik iliği süpresyonu, 2 si aplastik anemili) %RT oranını  $3.65 \pm 2.28$  (ortalama  $\pm$  SS) bulduk. Mutlak RT sayısı kontrol grubuna göre belirgin derecede düşük bulundu ( $1.75 \pm 1.17 \times 10^9/L$ ). Bu durumda %RT oranı kontrol grubundan anlamlı bir farklılık göstermezken mutlak RT değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak farklı bulundu ( $p < 0.0001$ ). Bu grupta MPV değerleri ile trombosit sayıları, %RT ve mutlak RT değerleri arasında anlamlı ilişki yoktu. Bu sonuçlar Kienast ve Schmitz' in çalışma sonuçları ile uyumluydu (6). Mutlak RT değerlerinin trombopoetik aktiviteyi daha iyi değerlendirmede önemli olduğu görülmektedir.

Bu sonuçlarla retikülotrombosit sayımının kemik iliği trombopoetik aktivitesinin göstergesi olarak kullanılabilir son derece ucuz bir yöntem olduğunu ve özellikle yapım eksikliği ve yıkım trombositopenilerinin ayırıcı tanı ve sınıflamalarında ek bilgiler sağlayabilecek bir parametre olarak kullanılabilirliğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda trombositopenik hastaların değerlendirilmesinde sadece %RT oranlarının değil, ayrıca mutlak RT değerlerinin de önemli olduğu gösterilmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Ault KA: Flow-cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. Ann NY Sci Acad p. 293, (1992).
2. Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, et al: The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. Am J Clin Pathol 98:637 (1992).
3. Ferguson DJ, Lee S-F, Gordon PA: Evaluation of reticulocyte counts by flow-cytometry in a routine laboratory. Am J Hematol 33:13 (1990).
4. Fujii T, Shimomura T, Fumimoto T: Evaluation of thrombopoiesis by the measurement of immature platelets with thiazol orange and serum thrombopoietin concentration in thrombocytopenic disorders. Blood 140a (1997) (abstr).
5. Kawai Y, Nakamoto H, Kitamura K: Automated measurement of both reticulated platelets and large platelets is good tool for evaluation of thrombopoiesis. Blood 140a (1997) (abstr).
6. Kienast J, Schmitz G: Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: A diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. Blood 75:116 (1990).
7. Richards EM, Baglin TP: Quantitation of reticulated platelets: methodology and clinical application. Br J Haematol 91:445 (1995).
8. Rinder HM, Menz UJ, Ault KA: Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. Arc Pathol Lab Med 117:606 (1993).
9. Robinson MSC, Mackie IJ, Khair K, et al: Flow cytometric analysis of reticulated platelets: Evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. Br J Haematol 100:351 (1998).
10. Watanabe K, Takeuchi K, Kawai Y: Automated measurement of reticulated platelets in estimating thrombopoiesis. Eur J Haematol 54:163 (1995).