



Akış Sitometri ve Veteriner Hekimlikteki Uygulamaları

Ahmet Kürşat AZKUR[✉], Muhammet Eren ASLAN

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji AD, Kırıkkale.

Özet: Akış sitometri hücrelerin fenotipik ve karakteristik özelliklerini kalitatif ve kantitatif olarak inceleyen bir cihazdır. Bu cihaz ile, hücrenin yüzey ve iç proteinleri, organelleri ve diğer bileşenleri analiz ve ayrımı, lazer ve elektronik teknolojisi kullanılarak büyüklük, granülarite ve floresans emisyonu esasına göre gerçekleştirilmektedir. Kısa bir süre içinde heterojen bir popülasyonda analiz yapma ve yüksek saflıkta hücre ayırma yeteneğine sahip olan güçlü bir araçtır. Akış sitometri beşeri hekimlikte hematoloji, immünoloji ve klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra immünoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Akış sitometri, son yıllarda geniş kullanım alanı ile veteriner hekimlik içinde önemli bir araştırma ve klinik teşhis aracı haline gelmiştir. Veteriner hekimlerin klinik saha çalışmalarında akış sitometri cihazlarını kullanmaları sayesinde, hayvan ve insan refahını olumsuz etkileyen birçok persiste ve/veya klinik enfeksiyonun tespiti ve tedavisi çok kısa sürede, kolaylıkla yapılabilecektir. Veteriner hekimlikte akış sitometri kullanımının yaygınlığının sağlanması kullanılan ayıraç maddelerin azlığının giderilip, daha fazla sayıda monoklonal antikorun ticari olarak elde edilebilir ve kullanılabilir hale getirilmesi ile mümkündür. Bu rapor ile akış sitometrinin genel prensipleri, avantajları ve veteriner hekimlikte kullanılan uygulamaları derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Akış sitometri, Hücre analizi, Klinik kullanım, Veteriner hekimlik.

Flow Cytometry and its Applications for Veterinary Medicine

Abstract: Flow cytometry is a device for qualitative and quantitative analyses of the phenotype and characteristics of cells. The outer and inner cellular proteins, organelles and other components analyses and their separations are based on the size, granularity and fluorescence emission detection using laser and electronic technology. Making analysis in heterogeneous population in a short time and is a powerful tool that is capable of high-purity separation of cells. Flow cytometry is used widely in hematology, immunology, and clinical practice of human medicine and it has been an indispensable part of the immunology laboratory. In recent years, flow cytometry has become a valuable clinical diagnostic tool with a wide field of use in veterinary medicine. Detection and treatment of persistent and/or clinical infections having adverse effects on animal and human well-beings would easily be made using flow cytometry in clinical field studies performed by veterinarians in the near future. The prevalence of veterinary use of flow cytometry, is available with the separator material and more commercially monoclonal antibody. With this report, the general principles of flow cytometry, advantages and applications that are used in veterinary medicine has been reviewed.

Key words: Flow cytometry, Cell analysis, Clinical use, Veterinary medicine.

GİRİŞ

İlk çağlardan bu yana insanoğlu, bilinmeyeni keşfetme arzusu ile bilim ve teknoloji alanında hiç durmadan araştırma yapmaktadır. Yapılan çalışmalar günümüze ışık tutmuş ve bilim insanlarını yönlendirerek sorunların çözümü noktasında daha detaylı düşüncelerini sağlamıştır. Böylece, insanlık için önemli birçok sorun araştırılmakta ve çözümler üretilmeye çalışılmaktadır. Bunun paralelinde gelişen bilim ve teknoloji sayesinde birçok, alet, cihaz ve teknik geliştirilmiştir. Özellikle bilgisayarın icadı ve gelişmesi ile moleküler tekniklerin, biyoloji ile birleşmesi sonucu bilim insanlarının en kısa sürede, en doğru sonuca ulaşmalarını sağlamaya başlamıştır.

Akış (Flow) sitometri cihazı ve kullanılan sarf malzemelerin dünya pazarındaki satış hacmi, 2008 yılı itibarıyla 1.5 milyar dolar olduğu ve dünyada yaklaşık yedi bin adet akış sitometri cihazı bulunduğu rapor edilmiştir (Flow Cytometry Report, 2008). Bunun yanında yapılan bilimsel çalışmalara ait ilk makaleler, 1975 yılı sonrasında yayınlanmaya başlanmıştır. 2008-2009 yılları itibarı ile ulusal ve uluslararası dergilerde, akış sitometri tekniğinin kullanıldığı yayın sayısının 11.000 civarında olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen ülkemizde ne yazık ki bu tür istatistiksel analizleri içeren bir çalışma ve hesaplama yapılmamıştır.

Akış sitometri, ilk olarak 1950'li yıllarda araştırma laboratuvarları için geliştirilen, 1980'lerin başında hekimlerin hastalarda yardımcı T hücrelerin düşüşü ile karakterize, o dönemin gizemli bir hastalığı olan HIV'in tespiti sonrasında klinik laboratuvarları için de vazgeçilmez hale gelen bir cihazdır (Shapiro, 2003). Akış sitometri birçok bilim dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Önceleri hematoloji laboratuvarlarında kullanılan bu cihaz ve sistem günümüzde başta hematoloji, immünoloji, onkoloji olmak üzere; viroloji, bakteriyoloji, mikoloji, organ nakil birimleri, araştırma laboratuvarları ile patoloji, histoloji, biyokimya gibi klinik laboratuvarla-

rında kullanılan önemli bir araştırma yöntemi olarak yerini almıştır. Klinik laboratuvarların yanı sıra gıda, toksikoloji, deniz bilimleri araştırmalarında da bu cihazdan oldukça sık yararlanılmaktadır (Herzenberg ve ark., 2002; Ibrahim ve ark., 2007; Kima ve ark., 2008; Kumaraguru ve ark., 2004). Örneğin herpes simpleks gibi viral kaynaklı immunopatolojik hastalıklarda *in vivo* olarak regülatör T hücrelerin rolünü belirlenmesi, NK inhibitör reseptörlerin etkileşimleri ve regülatör sistemin latent enfekte trigeminal gangliyonlarda koruyuculuğunun tespiti, shRNA veya yeşil floresan proteinleri içeren plazmidlerin transfeksiyonda ki etkinliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Azkur ve ark., 2005; Suvas ve ark., 2004; Suvas ve ark., 2006). Akış sitometri ile uygun antikor panelleri kullanılarak, hücre tipi (hematopoietik, lenfoid, veya nonhematopoietik) veya hücre türleri (B ve T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, myeloid/monositik hücreler, neuro/neuroendokrin hücreler ve epitelyal hücreler) ile hücre olgunlaşması aşamasında öncül ve olgun hücrelerin tespiti yapılabilmektedir (Kima ve ark., 2008; Suvas ve ark., 2004; Youli ve ark., 2009). Bunun paralelinde alerjik hastalıklara neden olan etkenlerin ve bunların kontrolünde görevli mekanizmaların rolü akış sitometri cihazı ve tekniğini kullanarak başarılı bir şekilde tespit edilmiştir (Palomares ve ark., 2010).

Akış sitometri cihazı ile analiz için, hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla kan, kemik iliği, beyin, omurilik sıvısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki dokular ve hücre kültürü örnekleri kullanılabilir (Tablo 1) (Azkur ve ark., 2005; Peterson ve ark., 2008; Rose ve Knox, 2007).

İncelenen antijenlerin tespiti için; monoklonal antikorlar ve florokromlar teknolojisi ile fizik ve bilgisayar teknolojisinin birleştirilmesi sonucunda, akış sitometri cihazı keşfedilmiştir (Tablo 1) (Youli ve ark., 2009). Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin kantitatif olarak fiziksel ve/veya

biyokimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Kısaca akış sitometri, bir sıvı içerisinde (süspansiyon) hücre veya partiküllerin, kantitatif ve kalitatif özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (Rahman, 2006). Günümüzde bu işlem için "flow" veya "akış" sitometri terimleri kullanılmaktadır. Akış sitometri ile süspansiyon halinde bulunan hücre veya partiküller, lazer ışığı yansıtılan bir bölmeden geçirilir. Bu bölmeden tek tek geçen hücrelerin, lazer ışığı ile aydınlatılması sonrasında, üstünden yansıyan ışınlar ait sinyaller, uygun detektör ve filtreler tarafından tespit edilir, bu ışınlar toplanır ve analiz edilir (İbrahim ve Engh, 2007; Nunez, 2001). Oluşan bu sinyaller, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özelliklerine bağlı bilgileri verdiği gibi; hücre içi ve dışı reseptör ve yapılarına bağlanan çeşitli florokromlardan da kaynaklanabilir (Herzenberg ve ark., 2002). Böylece, akış sitometri ile yüksek duyarlılıkla, hücre yada partikülün immünofenotipi, DNA içeriği miktarı, enzim aktiviteleri, spesifik antikolar tarafından tanınan hücrenin; yüzeyi,

sitoplazması ve/veya çekirdeğinde bulunan anti-jen/markırların (belirteç) tespiti ve canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilmektedir. Bunun yanında alt tiplerine kadar hücre tespiti ve antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan epitoplara tespiti de kolaylıkla yapılabilmektedir (Dunphy, 2004; Suvas ve ark., 2006; Youli ve ark., 2009).

Akış sitometri cihazı ve tekniği son derece hızlıdır, çok kısa bir sürede binlerce hücreyi analiz ederek, detaylı sonuç raporları elde edilir. Heterojen bir örnek popülasyonunda, hücrelerin ve bileşenlerinin çok parametrelili kantitatif özellikleri çok kısa bir sürede analiz edilebilir (Tablo 1) (İbrahim ve Engh, 2007). Akış sitometri'nin en güçlü ve kendisine özgü avantajı, hücreleri fiziksel olarak birbirlerinden ayırt edebilmesidir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur (Daniel, 2004). Bu tür çalışmalar son dönemde kök hücre ve gen terapi çalışmalarında kullanılmaktadır (Brown ve Wittwer, 2000).

Tablo 1. Akış sitometri cihazı ile analizin başlıca basamakları

Table 1. The main steps of the analysis with flow cytometry

| Aşama | Yapılacak İşlemler |
|-------------------------|--|
| Analiz Öncesi | Deney modeli tasarımı Kan örneklerinin antikoagulanlı şekilde alınması, Diğer örneklerin uygun şekilde temini Taşıma ve saklama koşullarının gözden geçirilmesi Örneklerin uygunluğunun tespiti (pıhtılaşma, hemoliz durumu) Numunenin canlılığının tespiti (% ölü hücre tespiti) Örneklerin çalışılmak üzere hazırlanması |
| Analiz Sırasında | Cihazdaki lazerlerin kalibrasyonu; optik hizalama, optik filtrelerin kontrolü Elektronik aksamın kontrolü; detektör ve voltaj kontrolü Floresan boyaların akış sitometri cihazında kalibrasyonu Kontrol grubu materyallerin düzenlemesi; kontrol boncukları, biyolojik materyaller Antikor seçimi; deney modelindeki materyallerin spesifite, affinite ve antikor panel kombinasyonları belirlenmesi Tek veya çok parametrelili analiz Kapı alma işlemi İstenilen hücrelerin ayrımı ve toplanması (cell sorting), ölü hücrelerin dışlanması |
| Analiz Sonrası | Verilerin yorumlanması Verilerin raporlanması Klinikte kullanım Klinik sonuç |

Akış sitometri cihazları hücrelerin veya bileşenlerinin ayrıntılı olarak morfolojik karakterlerini tayin edemez. Bu yüzden floresan mikroskobu ve/veya konfokal mikroskobu gibi diğer görüntüleme teknikleri ile yapısal detaylar ile ilgili çok daha fazla görsel bilgi elde edilir. Bunun yanında sadece süspansiyon halindeki hücreler analiz için uygundur ve hücrelerin dokulardan ayrıştırılarak süspansiyon haline getirilmiş olması gerekir. Ayrıca, akış sitometri cihazları çok kompleks cihazlar olduğundan, tam performans ile güvenilir sonuçlar elde edilmesi için sadece cihaza hakim ve çok iyi eğitim almış operatörlere gereksinim duyulmaktadır.

Akış sitometri'de, hücrenin ve/veya bileşenlerinin kalitatif ve kantitatif analizleri kısaca dört şekilde yapılabilmektedir (Brown ve Wittwer, 2000; Dunphy, 2004; Herzenberg ve ark., 2002; Rahman, 2006). Bunlar;

- 1-Hücrelerin büyüklük ve granül yapısına göre analiz;
- 2-Tek floresan boya kullanılarak işaretlenen monoklonal antikör kullanılarak yapılan analiz;
- 3-Çok renkli floresan boyalar (2-17 renk) ile işaretlenen antikörler kullanılarak gerçekleştirilen analiz;
- 4-Hücre içerisinde bulunan antijenlerin ve yapıların hücre zarının geçirgenliğinin artırılması sonucu eklenen floresan boya ile işaretli monoklonal antikörler ile yapılan analizi şeklinde sayılabilir (Maecker ve ark., 2005; Wood, 2006).

Akış Sitometri'nin Veteriner Hekimlikte Kullanımı

Akış sitometri cihazı, insan dokularında ve hücrelerinde olduğu kadar, hayvanlara ait doku ve hücrelerinin fiziksel ve fonksiyonel özelliklerinin tespiti içinde kullanılmaktadır (Elizabeth ve ark., 2002; Katherine ve ark., 2000; McSharry, 1994).

Bu cihaz, henüz ticari veteriner teşhis laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun yanında akış sitometri cihazına sahip akademik

enstitüler, veteriner hekimlik hizmetlerinin rutin teşhisine yönelik sınırlı düzeyde hizmet vermektedirler. Akış sitometri cihazının yerine veteriner hekimlik hizmetleri için Olympus AU-600 gibi hematoloji analiz cihazları yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Veteriner hekimlik biliminde bu durumun yakın bir gelecekte değişerek, hayvan hastalıklarının tanısının konulmasında hematoloji analiz cihazlarının yerini daha gelişmiş analiz yeteneğine sahip akış sitometri uygulamalarının alacağı düşünülmektedir (McSharry, 1994; Tarrant, 2005). Akış sitometri cihazlarının veteriner hekimlikte daha az kullanılmasının en önemli nedeni, tıp hekimliğine oranla veteriner hekimlikte akış sitometri uygulamalarında kullanılmak üzere ayıraç maddelerin azlığıdır. Ancak daha fazla sayıda monoklonal antikörün ticari olarak elde edilebilir ve kullanılabilir hale gelmesi ile bu cihazın ve tekniğin veteriner hekimlikte de daha yaygın olarak hastalıkların tanısı ve diğer klinik uygulamaları için kullanılabilir (Katherine ve ark., 2000).

Günümüzde gelişmiş batı ülkelerinde, akış sitometri uygulamaları çeşitli hayvan türlerine ait hastalıkların immüнопатolojisi, teşhisi ve aşı geliştirilmesi gibi birçok araştırma alanında sıklıkla kullanılan bir metot olarak yerini almıştır. Bu çalışmaların tamamını bu derlemede özetlememiz imkansızdır. Bu yüzden, derlemenin bu bölümü veteriner hekimlikte akış sitometrinin kullanıldığı belirli disiplinlere ait önemli ve öne çıkan bazı çalışmaların nasıl yapıldığına odaklanmıştır.

Koess ve ark. (2008) sığırlarda erken safhada meme dokusundan subklinik mastitisi, akış sitometri kullanarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları araştırmada öncelikle somatik hücre sayısının belirlenmesinde temel yöntem olan mikroskop ile, akış sitometri kullanımını karşılaştırmışlardır. Akış sitometri ile daha kısa sürede en az 10.000 hücre sayılabildiğini rapor etmişlerdir ve somatik hücre sayımına ilaveten, mastitisin erken dönemde tespiti için gerekli olan yangı hücrelerini belirlemek için polimorfonükleer granülositler için CD11b, lenfositler için CD3, monositler ve makrofajlar için CD14'e

karşı elde edilen uygun monoklonal antikorları kullandılar. Buna ilaveten propidium iodide (PI) florokrom ile hücre içindeki DNA'nın boyaması yapılarak, canlı ve canlı olmayan hücreleri tüm popülasyondan kolaylıkla ayırt edebilmişlerdir. Sonuç olarak akış sitometri kullanarak süttteki lökosit hücreleri; yaşayan ve yaşamayan polimorfonükleer nötrofil, lenfosit ve makrofaj hücreleri olarak ayrılması ile bu hücrelerin popülasyondaki yüzdesinin tespit ettiler. Buna ilaveten canlı polimorfonükleer nötrofillerin tespiti ile memede oluşan yangının hangi dönemde olduğunu ve klinik semptom göstermeden mastitisin akış sitometri ile rutin olarak 10 dk gibi bir sürede tespit edilebildiğini bildirmişlerdir.

Qvist ve ark. (1990) bovine viral diarrhoea virüsünün (BVDV) belirlenmesi için akış sitometri cihazını kullandılar. BVDV'nin kontrol ve mücadelesinde persiste enfekte sığırların belirlenmesi ve sürüden ayrılması önemlidir. Bu yüzden araştırmacılar sığır kanlarındaki mononükleer lökositleri, FITC ve ethidium bromide florokromları ile işaretleyerek, akış sitometri cihazı ile analiz sonucunda BVDV PI hayvanları belirlemişlerdir. Araştırmacılar, PI enfekte hayvanların lökositlerinde BVDV'yi %3.0-21.0 oranında tespit ettiler. Sonuç olarak akış sitometri tekniği kullanılarak, PI sığırlarda lökositlerin sitoplazmasında bulunan BVDV antijenlerinin tespitinin yapılabildiği ve bu uygulamalar için hücre kültürüne gereksinim duyulmadığını belirttiler. Ayrıca bu hızlı tekniğin BVDV enfeksiyonu kontrolü için yakın gelecekte rutin kullanımda yerini alacağını rapor etmişlerdir.

Hussein ve ark. (2002) *Escherichia coli* O157:H7'yi sığır rumen sıvısı ve dışkılarından akış sitometri tekniği kullanarak tespit ettiler. İlgili çalışmada patojenleri işaretlemek için FITC florokromu ile işaretli anti-O157:H7 monoklonal antikorunu kullandılar. Sonuç olarak *E. coli* O157:H7'nin akış sitometri yöntemi kullanılarak tespiti ve miktarının belirlenmesinin, rumen sıvısı ve dışkıda mililitrede 10^4 ile 10^7 hücre düzeyinde

bulduğunda kolaylıkla yapılabildiğini aksi takdirde ön zenginleştirme gerektiğini bildirdiler.

Rath ve ark. (2008) çiftlik hayvanlarında yaptıkları, akış sitometri cihazı kullanılarak sperm analizi ve cinsiyet ayrımı çalışması ile saatte ortalama on milyon spermin %90 saflık ile elde edilmesi imkanının olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar başta sığırlar olmak üzere, keçi ve atlarda, Hoechst florokromu ile hücre çekirdeği boyaması yapılarak, elde edilen grafiklerin yorumlanması sonucu yaşayan X ve Y kromozomlarını taşıyan DNA içeriğine göre sperm ayrımı yaptılar. Bu sayede yüksek verimliliğe sahip boğalardan elde edilen spermlerin ayrımı ile istenilen cinsiyete sahip yavrular elde edilmektedir. Bu uygulama Amerika'da elli Avrupa'da üç merkez tarafından rutin olarak yapılmaktadır. Cansız spermlerin uzaklaştırıldığı, yüksek kalitede ve istenilen cinsiyet kromozomlarına sahip DNA'ları içeren canlı spermler ile yapılan tohumlamalar sayesinde döl tutmama sorunu minimum seviyelere indirilebildiği rapor edilmiştir.

Bordignon ve ark. (2002) akış sitometri cihazını kullanarak kuduz virüsü antijenini, hücre kültüründe başarılı bir şekilde tespit ettiklerini rapor ettiler. Araştırmacılar enfeksiyondan sonra 12, 48 ve 72'nci saatlerde kuduz virüsünün hücre içerisinde replikasyonunu akış sitometri ile incelediler. Akış sitometride yaptıkları analiz sonrasında virüs ile enfekte hücrelerin yüzdesini tespit ettiler. Bu deney için doğal enfekte sığırdan izole edilen "Pasteur virüsü" kuduz virüsü suşunu kullandılar. İzolasyon sonrasında BHK-21 ve C6 hücre hatları, vahşi tip virüs ile enfekte edildi. Virüs antijenini BHK-21 ve C6 hücre hatlarında belirlemek için, daha önceden hazırladıkları ve FITC ile işaretledikleri anti-rabies ribonükleoprotein monoklonal antikorunu hücre içi boyamada kullandılar. Boyama işlemi takiben, enfeksiyondan sonra 12'nci saatte %4.7-7.1, 48'nci saatte %88 ve 72'nci saatte %71-81 virüs ile enfekte BHK-21 hücrelerini akış sitometri ile tespit ettiler. Sonuç olarak, akış sitometrinin hücre kültüründe intrasitoplazmik kuduz virüsünün tespiti için hızlı,

hassas ve güvenilir bir yöntem olduğunu rapor ettiler.

Cole ve ark. (1999) atlarda *Cryptosporidium parvum*'un tespitinde akış sitometri tekniğini, *criptosporidium* oosistlerinin tespiti için altın standart olarak belirtilen asit-fast boyama (AF) yöntemi ve immünofluorescence antikor (IFA) yöntemi ile karşılaştırdılar. Araştırmacılar bu amaç için herhangi bir hastalık semptomu göstermeyen üç adet yetişkin at seçtiler. İlk olarak atlardan 5'er gram taze dışkı örneği toplayarak her bir dışkı örneğinin, oosist yönünden negatif olduğunu asit fast boyama ile teyit ettiler. Sonrasında, daha önceden sığırdan elde edilen ve yoğunluğu bilinen criptosporidial oosistleri (10^8) on katlı sulandırma basamakları şeklinde PBS ile muamele ederek hazırladıkları dışkı örneklerine, yoğunlukları 10^1 , 10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 ve 10^6 oosist/g olacak şekilde inokule ettiler. Asit fast boyama için sürme preparat işlemini takiben Kinyoun asit-fast boyama kiti kullanarak boyamayı gerçekleştirirken IFA testi için önceden hazırlanan, farklı dışkı-oosist konsantrasyonları ve negatif kontrolde ticari immunofloresan kiti kullandılar. Akış sitometri için ise FITC işaretli oosist spesifik monoklonal antikorlar ile boyama yaparak bu üç testi karşılaştırdılar. Sonuç olarak bir gram dışkıda, asit fast yöntemi ve immunofloresan antikor tekniği ile *C.parvum* oosistlerini %100 sensitivite ile, en az 5×10^5 oosist/gr oranında hazırlanan dışkı-oosist konsantrasyon basamağında tespit ettiler. Akış sitometri ile *C.parvum* oosistlerini en az 5×10^4 oosist/gr dışkı-oosist konsantrasyon basamağında tespit etmişlerdir. Sonuç olarak akış sitometrinin altın standart olarak gösterilen asit-fast ve immunofloresan antikor boyama tekniğine göre 10 kat daha duyarlı bir yöntem olduğunu rapor ettiler.

Barratt-Boyes ve ark. (1992) akış sitometri cihazını kullanarak mavi dil virüsü (BTV) replikasyonunu, *in vitro* olarak enfekte edilen sığır mononükleer hücrelerinde incelediler. Kültüre ettikleri hücreleri mavi dil virüsü ile enfekte edilmesi ardından,

enfeksiyon gelişimini akış sitometri ile tespit etmişlerdir. T hücreleri, B hücreleri, monosit veya granülosit hücreleri, her hücreye spesifik hücre yüzey markırlarını FITC ile işaretli mavi dil virüsüne spesifik monoklonal antikorlar kullanarak mavi dil virüsü antijenlerini tespit ettiler. Sonuç olarak, hücre popülasyonunun tamamına oranla düşük yüzdeye sahip mavi dil virüsü ile enfekte hücrelerin immunofloresan mikroskop tekniği ile tespitinin zor olacağını ve akış sitometrinin kullanılmasının daha avantajlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Dean ve ark. (1992) kedilerde feline lösemi virüsünü (FeLV), akış sitometri kullanarak; FeLV'yi enfekte kedilerin myeloid, erythroid ve lenfoid kökenli kemik iliği hücrelerinde tespit etmişlerdir. Bu işlem kısaca, FeLV ile enfekte olan kedilerden elde edilen kemik iliği hücreleri %3'lük paraformaldehide ve %0.5 Triton X-100 ile muamele edilerek plazma membranı geçirgenliği artırılmıştır. Ardından FeLV ile enfekte hücreleri, viral p27 antijenine karşı elde edilen monoklonal antikorları kullanılarak tespit etmişlerdir. Kemik iliğinden elde ettikleri hücre popülasyonu akış sitometride myeloid, erythroid, ve lenfoid hücreler olarak ayrılmıştır. Her hücre grubu içinde, p27 antijeni ile enfekte olduğu tespit edilen hücrelerin yüzdeleri belirlenmiştir. Sonuç olarak her üç hücre grubunda FeLV ile enfekte olduğunu tespit etmişlerdir. Akış sitometri kullanarak yaptıkları bu tip çok parametrelili analizin klasik ışık ve floresan mikroskop kullanarak çok zor olacağını ve akış sitometrinin bunlar karşısında son derece avantajlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Yukarıda örnekleri verilen çalışmalar dışında tüm hayvan türlerine ait; viral, bakteriyel, paraziter etkenler başta olmak üzere immünolojik, patolojik bozuklukların araştırılması ile reproduktif uygulamalara ait yüzlerce çalışma ve araştırma bulunmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalar incelendiğinde, akış sitometri tekniği ile birçok teknik, sensitivite ve hız bakımından karşılaştırılmaktadır. Bilim insanları tarafından akış sitometrinin mevcut kullanılan tekniklere göre son derece duyarlı, hızlı ve

kapsamlı araştırmalar için uygun olduğu rapor edilmektedir. Bu bilgiler ışığında gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de veteriner hekim araştırma-cı ve bilim insanlarının geçerliliğini yitirmeye başlayan bir çok uygulamanın yerini alan akış sitometri cihazının kullanıldığı araştırmalar dizayn etmeleri gerekmektedir. Hayvan hastalıklarının ve özellikle zoonoz hastalıkların erken dönemde, hızlı ve kesin tanısının konulması hem hayvan refahı hem de insan sağlığı açısından son derece önemlidir. Bunun yanı sıra doğum öncesinde boğalara uygulanacak sperm tayini ve ayrımı çalışmaları ile yavruların cinsiyet tespiti ve ayrımı uygulamalarının batılı ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de kullanımına başlanmalıdır. Bu sayede üreticiler daha fazla verim elde ederek, daha sağlıklı ve dengeli hayvan popülasyonları oluşturabilirler. Akış sitometri cihazının veteriner hekimlik uygulamalarında kullanılması, hekimlere gelecekte hastalıklarla mücadelede olduğu kadar enfeksiyonların immünopatolojisine ait birçok bilinmeyi aydınlatmada fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Azkur AK., Kim B., Suvas S., Lee Y., Kumaraguru U., Rouse BT., 2005. Blocking mouse MMP-9 production in tumor cells and mouse cornea by short hairpin (sh) RNA encoding plasmids. *Oligonucleotides*, 15, 72-84.
- Barratt-Boyes SM., Rossitto PV., Stott JL., Maclachlan NN., 1992. Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine mononuclear cells. *J. Gen. Virol.*, 73, 1953-1960.
- Bordignon J., Ferreira SCP., Caporale GMM., Carrieri ML., Kotait I., Lima HC., Zanetti CR., 2002. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. *J. Virol. Methods.*, 105, 181-186.
- Brown M., Wittwer C., 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.*, 46, 1221-1229.
- Cole DJ., Snowden K., Cohen ND., Smith R., 1999. Detection of cryptosporidium parvum in horses: thresholds of acid-fast stain, immunofluorescence assay, and flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 457-460.
- Daniel H., 2004. A Review and Applications of Flow Cytometry, Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, Dec. 17.
- Dean GA., Groshek PM., Mullins JL., Hoover EA., 1992. Hematopoietic target cells of anemogenic subgroup C versus nonanemogenic subgroup A feline leukemia virus. *J. Virol.*, 66, 5561-5568.
- Dunphy CH., 2004. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 128, 1004-1022.
- Elizabeth GD., Wilkerson MJ., Rush BR., 2002. flow cytometry: clinical applications in equine medicine. *J. Vet. Intern. Med.*, 16, 404-410.
- Flow Cytometry Report, 2008. Market Overview and Industry Survey Executive Summary. Biocompare Surveys and Reports, Published August 29.
- Herzenberg LA., Parks D., Sahaf B., Perez O., Roederer M., Herzenberg LA., 2002. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from stanford. *Clin. Chem.*, 48, 1819-1827.
- Hussein SH., Brandolyn HT., Doug R., 2002. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine rumen fluid and feces by flow cytometry. *Food Control*, 13, 387-391.
- Ibrahim SF., Engh GVD., 2007. Flow cytometry and cell sorting. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.*, 106, 19-39.
- Katherine MB., Greg AR., Michael GH., 2000. Standardized flow cytometry gating in veterinary medicine. *Methods. Cell. Sci.*, 22, 191-198.
- Kima B., Sarangia PP., Azkur AK., Kaisthaa SD., Rousea BT., 2008. Enhanced viral immunoinflammatory lesions in mice lacking IL-23 responses. *Microbes. Infect.*, 10, 302-312.
- Koess C., Joern H., 2008. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J. Dairy. Res.*, 75, 225-232.
- Kumaraguru U., Suvas S., Biswas PS., Azkur AK., Rouse BT., 2004. Concomitant helper response rescues otherwise low avidity CD8 memory CTLs to become

- efficient effectors in vivo. *J. Immunol.*, 172, 3719-3724.
- Maecker HT., Rinfret A., D'souza P., Darden J., Roig E., Landry C., Hayes P., Birungi J., Anzala O., Garcia M., Harari A., Frank I., Baydo R., Baker M., Holbrook J., Ottinger J., Lamoreaux L., Epling CL., Sinclair E., Suni MA., Punt K., Calarota S., El-Bahi S., Alter G., 2005. Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol.*, 6, 1471-2172.
- McSharry JJ., 1994. Uses of flow cytometry in virology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7, 576-604.
- Nunez R., 2001. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Curr. Issues. Mol. Biol.*, 3, 39-45.
- Palomares O., Yaman G., Azkur AK., Akkoc T., Akdis M., Akdis CA., 2010. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.*, 40, 1232-1240.
- Peterson RA., Krull DL., Butler L., 2008. Applications of laser scanning cytometry in immunohistochemistry and routine histopathology. *Toxicol. Pathol.*, 36, 117-132.
- Qvist P., Aasted B., Bloch B., Meyling A., Rønsholt L., Houe H., 1990. Flow cytometric detection of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle. *Can. Vet. J.*, 54, 469-472.
- Rahman M., 2006. Introduction to flow cytometry. Serotec Ltd. Oxford (UK). Published by Serotec Ltd.
- Rath D., Johnson LA., 2008. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 43, 338-346.
- Rose AS., Knox KS., 2007. Bronchoalveolar lavage as a research tool. *Semin. Respir. Crit. Care. Med.*, 28, 561-573.
- Shapiro HM., 2003. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. Wiley-Liss, USA.
- Suvas S., Azkur AK., Kim BS., Kumaraguru U., Rouse BT., 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J. Immunol.*, 172, 4123-4132
- Suvas S., Azkur AK., Rouse BT., 2006. Qa-1b and CD94-NKG2a interaction regulate cytolytic activity of herpes simplex virus-specific memory CD8 T cells in the latently infected trigeminal ganglia. *J. Immunol.*, 176, 1703-1711.
- Tarrant JM., 2005. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet. J.*, 170, 278-288.
- Wood B., 2006. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 130, 680-690.
- Youli Z., Shahjahan M., Chang CC., 2009. Basic principles of flow cytometry. basic concepts of molecular pathology. *Molecular Pathology Library*, 2, 139-146.