

FLOW SİTOMETRE İLE NÖTROFİLLERİN OKSİDATİF PATLAMA AKTİVİTESİ ÖLÇÜLEBİLİR Mİ?

Yasemin BUDAK*, Gülbu İŞİTMANGİL*, Yavuz TAGA**

ÖZET

Nötrofil fonksiyonlarının ölçüm yöntemleri oldukça zahmetlidir ve standardize edilmeleri zordur. Nötrofil fonksiyonları flow sitometre yöntemleri ile incelenebilmektedir. Bu çalışmada nötrofillerin oksidatif patlama aktivitesi flow sitometre'de modifiye edilmiş tekniklerle ölçüldü. Hücreler oksidatif patlama için phorbol 12-myristate 13-acetate ile uyarıldı. Çalışmada nötrofillerin spontan oksidatif patlama aktivitesi çok düşük olmasına rağmen, uyarıldıktan sonra 5. dakikada başlayarak ve 15. dakikada %99'a ulaşmaktaydı. Fagositoz aktivitesi için aynı metot ve *Escherichia coli* kullanıldı. Hücrelerin %46'sı 45. dakikada fagositoz yapmaktaydı. Bu çalışmadaki bulgularımıza göre flow sitometre, oksidatif patlama ve fagositoz gibi nötrofil fonksiyonlarının ölçümünde kullanılabilir bir metottur.

Anahtar kelimeler: Nötrofil, flow sitometre, oksidatif patlama aktivitesi

SUMMARY

Can oxidative burst activity of neutrophils be measured by flow cytometry? Measurement of neutrophil functions are labor intensive and often very difficult to standardize. In this study oxidative burst activity of neutrophils has been measured by modified techniques of flow cytometry. We activated the cells with phorbol 12-myristate 13-acetate. This induction causes an increase in oxidative burst activity which begins at the 5th minute and reaches to %99 percent at 15th minute. The same method and *Escherichia coli* was used for phagocytosis activity. We found that 46% of cells showed phagocytosis activity at the 45th minute. According to these results, flow cytometry can be used for measurement of oxidative burst activity and phagocytosis of neutrophils.

Key words: Neutrophil, flow cytometry, oxidative burst activity

GİRİŞ

Polimorfonükleer nötrofiller (PMN), infeksiyon hastalıklarına karşı nonspesifik hücresel immün cevabın major komponentidir. Hastalıklardaki PMN fonksiyon bozukluğu kantitatif veya kalitatif sebeplere bağlı olabilir. PMN, fagosite ettiği mikroorganizmalara karşı oksijen radikalleri ve lizozomal enzimler salarak bakterisid etki ile konak savunmasında önemli bir rol oynarlar (6). Solunum patlaması bakterisid etkilerde önemlidir ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, fagositik hücrelerin solunum patlama reaksiyonunda kilit enzimidir (6,14). Bu enzim stimüle olduğu zaman elektronlar NADPH'dan oksijene trans-

fer olur. Sonuçta oluşan superoksit anyon, hidrojen peroksit (H₂O₂) ye spontan olarak veya superoksit dismutaz enzimi yoluyla dönüştükten sonra H₂O₂ reaktif oksijen radikallerine dönüşür (13). Spesifik biyokimyasal metotlar gibi farklı yöntemler, nötrofil oksidatif fonksiyonların ölçümünde kullanılabilir. Fakat bu metotlar arasında standardizasyon problemi vardır (13). Nötrofil fonksiyonlarını çeşitli floresan boya kullanılarak flow sitometre ile ölçmek mümkündür (1). Bu çalışmanın amacı nötrofillerin oksidatif patlama aktivitesi ile *Escherichia coli* (E. Coli)'yi fagosite etme kapasitesini flow sitometre ile tayin etmektir.

sının araştırılmasında değerli olabileceğini öne sürmüşlerdir (7).

Bass ve ark. (1) PMN'nin oksidatif patlamasını moniterize etmek amacıyla flow sitometride tek hücre analizini kantitatif olarak gerçekleştirmişlerdir. Normal nötrofiller, diklorofloresein diasetat ile inkübe edildikten sonra, 2',7'-diklorofluoresein (DCFH)e hidrolize olmuş ve phorbol myristate acetate ile membran stimülasyonuna dereceli bir cevap olarak PMN'nin oksidatif ürünü ortaya çıkmıştır. Smith ve ark. (15) oksidatif prob olarak diklorofluoresein diasetat (DCFH-DA) ve dihidrorodamin 123 (DHR) kullanmak suretiyle flow sitometre'de opsonize zymosan veya phorbol myristate acetate ile nötrofillerde oksidatif patlamayı araştırmışlar ve bu metodun, oksidatif aktivitelerin ölçümü için çok duyarlı bir teknik olduğunu bildirmişlerdir.

Richardson ve ark. (11) bir çalışmalarında flow sitometrik analiz ile nitroblue tetrazolium (NBT) testini mukayese etmişler ve DHR'nin substrat olarak kullanıldığı ve tam kanda yapılan flow sitometrik analiz ile, konvansiyonel bir yöntem olan NBT testi arasında bir korelasyon tespit etmişlerdir. Vuorte ve ark. (19) flow sitometride DCFH-oksidasyon deneyini, nötrofillerde oksidatif patlama aktivitesinin ölçümü için optimize ederek nötrofil altgruplarını değerlendirmişlerdir. Pelt ve ark. (8) aktive olmuş nötrofillerde oksijen metabolitlerinin üretimini tayin etmek amacıyla dihidrorodamin 123'ün, floresan bileşik Rodamine 123'e intrasellüler oksidasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Peticarari ve ark. (9) PMN'nin aynı anda fagositoz ve solunumsal patlama aktivitelerinin ölçülmesi amacıyla hızlı ve duyarlı bir metod olan iki-renkli flow sitometrik metodu denemişlerdir. Fagosit edilen floresan işaretli *Staphylococcus aureus* ile stimüle olduktan sonra oksidatif patlamada oluşan nötrofil ürünleri vasıtasıyla Hydroethidine (HE), etidium bromide (EB)'e oksitlenmiştir. Flow

sitometrede kırmızı EB floresan ile yutulan floresanlı bakterilerin yaydığı yeşil floresan birlikte ölçülmüştür. Floresan şiddeti, yutulan bakteri sayısı ile orantılı bulunmuştur. Bu iki-renkli boyanma sayesinde nötrofillerin iki farklı fonksiyonu tek basamakta ölçülebilmıştır (9). Bizim çalışmamızda oksidatif patlama, nötrofillerin dihidrorodamin 123 (DHR)'in floresan boyası rodamin 123'ü oksitleme kapasitesi ile değerlendirildi ve phorbol myristate acetate ile stimüle olmuş nötrofiller sağlıklı kişilerde 5 dakika içinde floresan yaymaya başladılar. Bu aktivite 15. dakikada %99 düzeyine kadar çıktı. 15 ve 20. dakikalardaki ölçümler arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Tüzün ve ark. (16,17) nötrofillerde fagositoz çalışmaları yaparak flow sitometrik yöntemin, gözle sayılmaya göre daha hızlı ve daha kantitatif olduğunu öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda flow sitometre ile hücrelerin %46'sının 45. dakikada fagositoz yaptığı tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışmadaki bulgularımıza göre flow sitometre, oksidatif patlama ve fagositoz gibi nötrofil fonksiyonlarının ölçümünde kullanılabilir objektif ve hızlı bir metottür.

KAYNAKLAR

1. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szeda P: Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophil: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*, 130: 1910 (1983).
2. Clark P, Layon AJ, Duff P: Effect of isoflurane on neutrophil phagocytic function during pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 1: 98 (1993).
3. Clark P, Patrick D: Inhibition of neutrophil oxidative burst and phagocytosis by meconium. *Am J Obstet Gynecol*, 173: 1301 (1995).
4. Frohlich D, Rothe G, Wittmann S, Schmitz G: Nitrous oxide impairs the neutrophil oxidative response. *Anesthesiol*, 88: 1281 (1998).
5. Gelfand JA, Fauci A, Green I, Frank M: A simple method for the determination of complement receptor bearing mononuclear cells. *J Immunol*, 116: 595 (1976).
6. Hansbrough J, Tenenhaus M, Wikstrom T, Braide M, et al: Effects of recombinant bactericidal/ permeability-increasing protein (rBPLsub2sub3) on neutrophil activity

- in burned rats. *J Trauma: Injury Infect Crit Care*, 40: 886 (1996).
7. Hirabayashi Y, Taniuchi S, Kobayashi Y: A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. *J Immunol Method*, 82: 253 (1985).
 8. Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG: Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Method*, 191: 187 (1996).
 9. Peticarari S, Presani G, Mangiarotti MA, Banfi E: Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils. *Cytometry*, 12: 687 (1991).
 10. Peters MJ, Dixon G, Kotowicz KT, Hatch DJ: Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br J Haematol*, 106: 391 (1999).
 11. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG: A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitroblue-tetrazolium test. *J Immunol Method*, 219: 187 (1998).
 12. Rhee P, Wang D, Ruff P, Austin B: Human neutrophil activation and increased adhesion by various resuscitation fluids. *Crit Care Med*, 28: 74 (2000).
 13. Robinson JP, Carter WO, Narayanan PK: Oxidative product formation analysis by flow cytometry. *Method Cell Biol.*, 41: 437 (1994).
 14. Roitt I, Brostoff J, Male B: Immunodeficiency. In *Immunology*, 4th ed, Mosby, London, (1996), p: 21.1.
 15. Smith JA, Weidemann MJ: Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Method*, 162(2): 261 (1993).
 16. Tüzün B: Fagositoz ve flow cytometry ile ölçüm metodolojisi. *Flow Cytometry*. Yılmaz MT, Deniz G (editörler). İstanbul Üniversitesi DETAE ABD Yayınları (1), İstanbul, (1996), p: 33.
 17. Tüzün B: Flow cytometry ve nötrofil fonksiyonları. *Flow Cytometry*. Yılmaz MT, Deniz G (editörler). İstanbul Üniversitesi DETAE ABD Yayınları (2), İstanbul, (1999), p: 89.
 18. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M: Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Method*, 178: 89 (1995).
 19. Vuorte J, Jansson SE, Repo H: Standardization of a flow cytometric assay for phagocyte respiratory burst activity. *Scand J Immunol*, 43: 329 (1996).