

AKIM SİTOMETRİSİYLE RETİKÜLOSİT ANALİZİ: RETİKÜLOSİT OLGUNLAŞMA İNDEKSİNİN KEMİK İLİĞİ ERİTROPOİETİK AKTİVİTESİNİN GÖSTERGESİ OLARAK DEĞERİ

Mustafa N. YENEREL, Reyhan DİZ-KÜÇÜKKAYA, Abdullah HACİHANEFİOĞLU,
Mehmet TURGUT, Sevgi KALAYOĞLU-BEŞİŞİK, Melih AKTAN, Hüseyin KESKİN,
Meliha NALÇACI, Günçağ DİNÇOL*

ÖZET

Çevre kanı örneğinde retikülosit sayımı, kemik iliğinin eritropoietik aktivitesini belirlemek amacıyla en sık kullanılan laboratuvar yöntemidir. Analizlerin akım sitometresi ile yapılması sadece retikülosit oranını değil, işlemin direkt olarak hücre RNA içeriğini yansıtması nedeniyle, hücrelerin olgunluk durumu hakkında da bilgi sağlamaktadır.

Çalışmamızda kemik iliği eritropoietik aktivitesini değerlendirmek amacıyla 9'u otoimmün hemolitik anemi, 6' s'ı paroksizmal nokturnal hemoglobüri, 21'i miyelodisplastik sendrom, 6'sı vitamin B12 eksikliği, 15'i demir eksikliği anemisi ve 7 si β Talassemia intermedia olan toplam 64 hasta ve 25 sağlıklı erişkinin çevre kanı örneklerinde akım sitometrisiyle retikülosit analizleri yapıldı. Bu çalışma sonucunda akım sitometrisiyle retikülosit sayımının hızlı, objektif ve güvenilir bir yöntem olduğu ve bu yöntemle değerlendirilen ROİ nin kemik iliğinin eritropoietik aktivitesini belirlemede ek bilgiler verebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Kemik iliği eritropoietik aktivitesi, anemi, akım sitometri, retikülosit olgunlaşma indeksi

SUMMARY

Flow cytometric reticulocyte analysis: the value of reticulocyte maturity index (rmi) as an indicator of erythropoietic activity of bone marrow. Reticulocyte quantification in peripheral blood samples is a commonly used diagnostic indicator of bone marrow erythropoietic activity. Flow cytometric reticulocyte analysis gives additional information about maturity of the reticulocytes because light scatter directly proportional to the reticulocyte RNA.

We present here a prospective study to evaluate the erythroid activity of the bone marrow in 64 anemic patients. We performed flow cytometric reticulocyte analysis in 9 patients with autoimmune hemolytic anemia, 6 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, 21 patients with myelodysplastic syndrome, 6 patients with vitamin B12 deficiency, 15 patients with iron deficiency, 7 patients with β Thalassemia intermedia and 25 healthy adults.

We conclude that flow cytometric reticulocyte analysis is fast, sensitive and reproducible method and reticulocyte maturation index (RMI) measurement provides an additional information about the engraftment kinetics.

Key words: Bone marrow erythropoietic activity, anemia, flow cytometry, reticulocyte maturity index.

GİRİŞ

Çevre kanında retikülosit sayımı kemik iliğinin eritropoietik aktivitesini belirlemede en sık kullanılan laboratuvar yöntemlerinden biridir (3,4). Klinik uygulamalar sırasında öncelikle anemilerin tanı ve sınıflandırması ile

nutrisionel eksikliklere bağlı anemilerin tedavi cevaplarının değerlendirilmesinde kullanılırken son yıllarda hematopoitik kök hücre transplantasyonlarından sonra kemik iliği yamanmasının erken göstergesi olarak da kullanılmaya başlanmıştır (2,5,6,7). Standart

yöntemde metilen mavisi ile vital boyama yapılarak hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirilir. Bu yöntemle nisbeten sınırlı sayıda hücre sayıldığı için normal ve düşük retikülosit oranlarında yöntemin duyarlılığı azalmaktadır. Son yıllarda akım sitometrisinin hematoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanım alanına girmesiyle birlikte retikülosit sayımları da bu yöntemle yapılmaya başlanmıştır. Akım sitometresi ile dakikalar içinde 50000 eritrosit sayarak retikülosit oranını hesaplanabildiği için normal ve hatta düşük retikülosit oranları arasındaki çok küçük farklılıklar bile tanınabilmektedir. Hücrelerin floresans yoğunluğu direkt olarak hücre RNA içeriğine bağlı olduğundan bu yöntemle eritrositlerin olgunluk durumu hakkında da objektif bilgiler sağlanmaktadır. Bu yöntemde daha genç olan hücreler daha fazla RNA içerdiği için daha yoğun floresans vermekte ve retikülosit olgunlaşma indeksi (ROI) de bununla orantılı olarak daha büyük çıkmaktadır. Bu çalışmada anemi nedeniyle tetkik edilen 64 hastada tedavi öncesi veya özellikle OİHA vakalarında nüks sırasında ve kontrol amacı ile 25 sağlıklı erişkinde akım sitometrisiyle retikülosit analizleri yapıldı ve ROI nin eritropoietik aktivitenin göstergesi olarak değeri araştırıldı.

MATERYAL ve METOD

Anemi ön tanısıyla polikliniğimize gönderilen hastalar içinde otoimmün hemolitik anemi (OİHA), paroksizmal noktürnal hemoglobinüri (PNH), miyelodisplastik sendrom (MDS), vitamin B12 eksikliği (B12↓) demir eksikliği anemisi (DEA) ve Talassemia intermedia tanısı konulanlar ile kontrol grubu olarak değerlendirilmek üzere sağlıklı erişkin kişiler çalışmaya dahil edildi.

Hastalar, tetkikleri tamamlandıktan sonra OİHA, PNH, MDS, B12↓, DEA, β Talassemia intermedia olarak gruplandı. Tanı amaçlı yapılan rutin tetkiklerin ve standart olarak

yapılan retikülosit sayımlarının yanında hastaların tam kan örneklerinde akım sitometrisiyle retikülosit analizleri yapıldı. Bu amaçla CellDyne 1600 otomatik kan sayım cihazı, FacsCalibur (Becton Dickinson) flow sitometri cihazı ve RNA boyası olarak thiazole orange'ın kullanıldığı ReticCount (Becton Dickinson) kit'i kullanıldı. Çevre kanı örnekleri EDTA'lı kan sayım tüplerine alındı ve Davies ve arkadaşlarının belirttiği şekilde hazırlanıp flow sitometride analiz edildi (2). Kısaca, her bir analiz için birinde 1ml fosfatlı tuz tamponu, diğerinde 1mL ReticCOUNT (Thiazole Orange) solüsyonu olan iki tüp hazırlandı. Tüplerin üzerine 5'er µl EDTA'lı tam kan örneği eklendi. Örneklerin karışımı sağlandıktan sonra 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 eritrositler çerçeve içine alındı, ve 50.000 sinyal sayıldı. Analiz için tek floresansın kullanıldığı histogram eğrileri tercih edildi. Önce monoklonal anti-kor kullanılmaksızın sadece fosfatlı tuz tamponu ile "boş" olarak hazırlanan örnek tüpünün verileri kullanılarak eritrositlerin otofloresansı belirlendi. Ardından boyalı tüpün verileriyle elde edilen histogram grafiği üzerine aynı alan işaretlenerek alınan floresans yoğunluk retikülosit oranı olarak kaydedildi. Şekil 1. de birisi OİHA 'li bir hastaya diğeri DEA' li bir hastaya ait olan iki retikülosit analiz histogramı sunuldu. Analiz sırasında retikülosit olgunlaşma indeksi (ROI), retikülosit pozitif olarak değerlendirilen topluluğun verdiği floresans yoğunluğunun kanal numaralarının geometrik ortalaması olarak belirtildi (2). Daha sonra hastaların standart yöntemle elde edilen retikülosit değerleri akım sitometri verileriyle karşılaştırıldı. Ar-

dından altı gruba ayrılarak incelenen hastaların akım sitometrisiyle elde edilen retikülosit oranları, ROİ değerleri, hemoglobin ve hematokrit değerleri karşılaştırılarak kemik iliğinin eritropoietik aktivitesi değerlendirildi.

Sonuçların değerlendirilmesinde kullandığımız Student's T testi ve Mann Whitney U testi bilgisayar ortamında SPSS for windows 7.0 istatistik programı yardımıyla gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 64'ü hasta 25 i kontrol grubu olarak sağlıklı erişkinlerden oluşan toplam 89 olgu değerlendirildi. Çalışmaya alın 64 hasta tetkikleri tamamlandıktan sonra dokuzu otoimmün hemolitik anemi (OİHA), altısı paroksizmal noktürnal hemoglobinüri (PNH), 21'i miyelodisplastik sendrom (MDS), altısı vitamin B12 eksikliği (B12 ↓) 15' i demir eksikliği anemisi (DEA), yedisi β Thalassemia intermedia olarak gruplandı. Kontrol grubuyla birlikte tüm hastaların demografik özellikleri Tablo 1.de, laboratuvar sonuçları ise Tablo 2 de özetlendi. Standart, manuel yöntemle ölçülen retikülosit oranları ile akım sitometrisi ile değerlendirilen retikülosit oranları ve ROİ leri birlikte değerlendirildi. Hastaların ve kontrol grubunun tümü dikkate alındığında standart yöntemle ve

akım sitometrik yöntemle araştırılan retikülosit oranları sırasıyla 4.17 ± 2.18 ve 4.18 ± 2.25 olarak bulundu ve standart sapmalar arasında da istatistiksel açıdan fark bulunmadı ($p=0.40$) ve bundan sonra yapılan yapılan istatistiki analizler akım sitometrisi ile elde edilen veriler temel alınarak gerçekleştirildi. Hastalık gruplarına göre elde edilen sonuçlar ayrı ayrı değerlendirildi ve Tablo 2. de sunuldu. Bu tabloda da görüldüğü gibi OİHA, PNH ve β Thalassemia intermedia olgularında retikülosit sayısı ve ROİ ikisi de artmış bulundu. Hb değerleri de retikülosit oranları ile ters orantılı olacak şekilde düşük olarak saptandı. MDS olgularında (21 olgu) retikülosit sayıları düşük bulunurken ROİ lerinin daha büyük olduğu saptandı (ortanca 93 (77-127)) ($p=0.04$). ROİ nin hemoglobin (Hb) ile ters orantılı olduğu gözlemlendi. DEA ve B12 olgularının ise retikülosit oranlarının ikisinin de düşük olmasına rağmen ROİ'lerinin B12 olgularında kontrol grubuna göre daha büyük olduğu gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.69$).

TARTIŞMA

Retikülosit sayımı anemilerin tanısı, sınıflandırılması ve tedavi cevaplarının değerlendirilmesinde kullanılan en önemli testlerden biridir. Thiazol orange kullanılarak yapılan akım sitometrik retikülosit analizi ile oldukça hızlı, nispeten basit ve duyarlı bir yöntemdir^(5,8). Standart manuel yöntemlerle 1000 hücre üzerinden yapılan değerlendirmeler akım sitometrisiyle 50000 hücre üzerinden oldukça kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Hücrelerin floresans yoğunluğu direkt olarak hücre RNA içeriğine bağlı olduğundan bu yöntemle eritrositlerin uygunluk durumu hakkında da objektif bilgiler sağlanır⁽³⁾. Bu yöntemde daha genç olan hücreler daha fazla RNA içerdiği için daha yoğun floresans vermekte ve ROİ de o derece yüksek çıkmaktadır. ROİ, akım sitomet-

Tablo 1. Hastaların ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	Vaka sayısı	Yaş (Ortalama±SS)	Cinsiyet (K/E)
MDS	21	59±11	5 / 16
OİHA	9	46±11	8 / 1
PNH	6	32±3	5 / 1
Vit. B12 ↓	6	69±19	2 / 4
Demir eksikliği anemisi	15	28±12	14 / 1
β Thalass. intermedia	7	20±4	3 / 4
Kontrol grubu	25	28±6	9 / 16

Tablo 2. Olguların laboratuvar özellikleri

	Lökosit (/mm ³) ±SS	Hb, (g/dl) ±SS	MCV (fl) ±SS	Trombosit (/mm ³) ±SS	Ret. Oran (Standart) % ±SS	Ret. Oran (Akım sitometrik) % ±SS	ROİ ±SS
MDS	6200±7300	7,7±1,8	95±10	93000±96000	1,84±1,3	1,89±1	95±15
OİHA	7500±2900	11±1,9	97±9	290000±138000	5,9±3,3	5,6±3,9	88±8
PNH	4200±2100	9,3±2,5	101±15	172000±254000	8,3±4,9	8,6±5,5	88±13
Vit. B12 ↓	2900±2000	7,2±4,5	116±7	82300±57200	2,7±0,9	2,7±1,1	90±5
DEA	6300±2300	7,8±2,1	67,4±6	270000±125000	1,8±1	1,8±0,9	78±4
β Thalass. intermedia	11200±7200	7,7±0,9	68±14	528000±330000	5,9±3	5,5±2,8	89±5,7
Kontrol grubu	6500±1200	14,1±1,9	86±4	250000±60000	2,8±0,9	2,8±0,6	78±7,2

Tablo 3. Anemi altgruplarına göre hastalarımızda elde edilen eritrosit ve retikülosit parametreleri

	Hb	MCV	Retikülosit oranı	ROİ
MDS	↓	N, ↑	N, ↓	↑↑
OİHA	↓	N, ↑	↑	↑
PNH	↓	N, ↑	↑	↑
Vit. B12 ↓	↓	↑	N, ↓	↑
DEA	↓	↓	N, ↓	N, ↓
β Thalass. intermedia	↓	↓	↑	N, ↑

resi veya manuel yöntemle bakılan retikülosit oranıyla ilişkisiz bir parametre olduğu halde son yıllarda Kİ eritropoietik aktivitesini belirlemek için kullanılan oldukça önemli bir parametredir. Son zamanlarda ROİ'nin kök hücre nakli (KHN) yapılmış hastaların takibinde kullanıldığı çalışmalar da yayımlanmıştır (1,2,6,7).

Biz de bu çalışmada 64 anemik hastada eritrosit sayısı, diğer eritrosit parametreleri, retikülosit oranı ve retikülosit sayılarını değerlendirdik. ROİ ile Hb, Hct, retikülosit oranları arasında çok zayıf bir ilişki bulduk. Hastalık grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise OİHA, PNH ve β Talassemia intermedia'lı olgularda retikülosit sayısı ve ROİ ikisi de artmış bulundu. Ancak bu gruplarda vaka sayıları az olduğu için istatistiksel olarak farklılığı ortaya konulamadı. Retikülosit ortamı yanında ROİ lerde artış gösteren

bu olgular hiperproduktif paterne uymaktaydı.

ROİ'nin en yüksek saptandığı olgular MDS'li olgulardı. Bu grupta 95±15 olarak saptanan ortalama ROİ kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek idi (p=0.04). Retikülosit sayısının normalden düşük olarak saptanması bu olguların ikinci önemli özelliği idi.

Kontrol grubuna en yakın ROİ sonuçları demir eksikliği anemisi olan olgulardı. Bu olgularda ROİ leri normal sınırlarda saptanırken (p=1), retikülosit oranları normal veya normalin altında olduğu gözlemlendi. B12 eksikliği olgularında ise retikülosit oranları normal saptanırken ROİ leri hafif yüksek bulundu.

Retikülosit oranları ve retikülosit olgunlaşma indeksleriyle Hb ve MCV değerlerinin anemi alt grupları arasında görülme sıklığına göre dağılımları Tablo 3 de özetlenmiştir.

ROİ nin yüksek saptandığı olgular yüksek eritropoietik aktiviteye sahip olgular olarak kabul edilmektedir. MDS ve B12 gibi retikülosit oranlarının düşük saptandığı olgular hipoproliferatif olarak kabul edilse de ROİ değerlendirildiğinde MDS ve B12 olgularının yüksek eritropoietik aktivitesi olduğu görülmektedir ve inefektif eritropoiezin indirekt bulgusu olarak kabul edilebilir. Aynı şekilde retikülosit oranının normal ve düşük

olarak saptandığı DEA olgularımızda ise ROİ normal sınırlarda bulunmuştur. Bu durum DEA olgularındaki azalmış eritropoezin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir⁽⁸⁾.

Retikülosit sayımı anemilerin tanısı, sınıflandırılması ve tedavi cevabının değerlendirilmesinde kullanılan en önemli testlerden biridir. Standart manuel yöntemle yapılan sayımların düşük retikülosit sayımlarında duyarlılığının da düşük olması sayımı yapan kişiden kişiye değişiklikler göstermesi ve belli bir sürede belli sayıda eritrosit ve retikülosit sayılarak işlemin gerçekleştirilebilmesi sınırlayıcı faktörlerdir.

Bu sonuçlarla ROİ nin eritropoietik aktivitenin göstergesi olarak kullanılabilir son derece ucuz bir yöntem olduğunu ve özellikle hipoproliferatif anemilerin yüksek ve düşük eritropoietik aktiviteli olarak sınıflandırılabilmesi için ek bilgiler sağlayabilecek bir parametre olarak kullanılabilirliğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Dalal BI, Stockford GR, Naiman SC, Spinelli JJ, Phillips GL. Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplantation* 17: 91 (1996).
2. Davis BH, Bigelow N, Ball ED, Mills L, Corawell GG. Utility of flow cytometric reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. *Am J Hematol Oct*; 32:81 (1989).
3. Davis BH, Bigelow NC. Flow cytometric reticulocyte quantitation using thiazole orange provides clinically useful reticulocyte maturity index. *Arch Pathol Lab Med* 113: 684 (1989).
4. Davis BH, Ornvold K, Bigelow NC. Flow cytometric reticulocyte maturity index: a useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia. *Cytometry* 15; :35 (1995).
5. d'Onofrio G, Kuse R, Foures C, Jou JM, Pradella M, Zini G Reticulocytes in haematological disorders. *Clin Lab Haematol.* 1:29 (1996).
6. d'Onofrio G, Tichelli A, Foures C, Theodorsen L. Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. *Clin Lab Haematol Dec*; 1:45 (1996).
7. Lazarus HM, Chahine A, Lacerna K, Wamble A, Jaffaldano C, Straight M, Rabinovitch A, Schimenti KJ, Jacobberger J. Kinetics of erythropoiesis after bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol Apr*; 97:574 (1992).
8. Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu N, Iri H, Ikeda Y, Houwen B. Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *J Clin Pathol.*47:736 (1994).