

# Hematoloji'de Akım Sitometri Kullanımı

Dr. Klara DALVA

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

## 1. Giriş

Akım Sitometrisinin (ASM) güncel hematolojik uygulamalardaki kullanımı giderek artmaktadır. Bu artışın nedenleri arasında, kısa sürede sonuç alınabilmesi, kullanımının kolay öğrenilebilmesi, anormal hücrelerin tanınmasına olan katkıları sayılabilir. ASM hematolojide en çok tanı, lösemi/ lenfoma/miyelom gibi hastalıkların sınıflanması ve tedavinin takibi amaçlarıyla kullanılmaktadır.

Akım Sitometresi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir.

## 2. Kullanım Alanları

Akım Sitometrisinin Hematolojide en çok kullanıldığı alanlar arasında:

- Lösemik hücrelerin immunfenotiplemesi
- Hücrenin DNA içeriğinin ve hücre döngüsünün analizi,
- Hematopoetik kök hücrelerin sayılması ve alt gruplarının belirlenmesi,
- Hücre canlılığının tespit edilmesi, apoptoz ile ilgili araştırmalar
- Çoklu ilaç direncinin(MDR) tespit edilmesi
- Hücresel immun yanıtın belirlenmesi
- Trombosit çalışmaları

- Trombosit ürünlerine bulaşmış lökositlerin sayılması,
- Hedef olarak seçilen hücrelerin floresanla işaretlenerek saflaştırılması ve diğer uygulama alanları sayılabilir.

ASM çalışmaları için perifer kan örneği, kemik iliği aspirasyon materyali ve biyopsileri, ince iğne aspirasyon materyalleri, tüm vücut sıvılarındaki hücreler [Bronkoalveolar lavaj(BAL), Lomber ponksiyon(LP) ile alınan örnekler...] kullanılabilir.

### 2.1 İmmun Fenotipleme

İmmunfenotipleme, hematolojik malinitelerin tanınmasına ve morfolojiye ek bilgiler kazandırarak tiplendirilmesine yardımcı olmaktadır. Hücre yüzey antijenlerinin tanımlanmasında "Cluster of Differentiation, CD" terminolojisi kullanılır. Antijenlerin çoğu bir hücre serisine eşlik etseler de o seriye özgün değildirler. Farklılaşmanın değişik evrelerinde sergilenen antijenler, hücrenin olgunlaşmasının takibinde kullanılabilir . Belli tümör hücrelerine özgün antijenlerin sayısı ise çok kısıtlıdır (ör PML de PML-RARa, KML de Bcr-abl gen ürünleri). Bazı tümör hücrelerinde antijenlerin "aberran" bulunmaları söz konusudur (Ör: miyeloid bir hücrede lenfoid bir antijenin bulunması) Hücreyi tanıyıp gelişiminin hangi evresinde olduğunu belirleyebilmek için çeşitli antikor panellerinin kullanılması gerekir. ASM çalışmalarını değerlendirebilmek ve karşılaştırılabilir sonuçlar için çalışma protokolleri ve toplanan veriler standardize edilmelidir. Veri analizinde hedeflenen: 1)anormal, neoplazi potansiyeli olan hücrelerin normalden ayrılması, 2)anormal hücrelerdeki antijen profilinin ortaya koyulmasıdır. Bu amaçla birçok parametrenin birlikte değerlendirilmesi gerekir(dar

açıyla kırılan ışık FSC 90° açıyla kırılan ışık SSC ve antijenlerin işaretlendiği florokromlardan kaynaklanan sinyaller) Aynı hücrede birden çok (en sık 3-4) antijenin belirlenmesi tavsiye edilmektedir. Anormal bir hücre topluluğu görüldüğünde bunun immunfenotipinin tanımlanması gerekir. Bunu ifade etmenin en kolay yolu antijen taşıyan hücrelerin oranlarını (%) bildirmektir. Antijen yoğunluğunu göstermek için de ölçülen floresan sinyallerin şiddeti belirlenir (Mean Fluorescent Intensity, MFI), ancak bu parametre hücre üzerindeki antijen sayısı yanı sıra kullanılan florokrom ile de yakından ilgilidir; gerekirse standartlar kullanılarak antijen/hücre sayısını belirlemek mümkündür. Değerlendirmeler için sadece anormal hücreleri içine alan bir grubun seçilmesi (gating) önerilse de incelenen örnekteki normal antijen dağılımını bilmeden anormal bir topluluğu tanımak mümkün olmaz, örnekteki normal hücreler zaman zaman bir internal kontrol olarak da fonksiyon görürler.

ASM ile immunfenotipleme yapmanın Avantajları:

- Büyüklük (FSC) ve Granüler (SSC) yapılarına göre hücreler sınıflandırılabilir.
- Ölü hücreler çalışma dışı tutulabilir.
- Zayıf eksprese edilen yüzey antijenleri tesbit edilebilir.
- Çok renkli (2,3,4,...) analizler ile hücrenin fenotipi, gelişiminin hangi evresinde bulunduğu belirlenebilir.
- Eş zamanlı bulunan birden çok hematolojik malinitenin, bifenotipik hücrelerin belirlenmesi mümkündür.

Dezavantajları:

- Sklerotik kemik iliğinden, hiposellüler kemik iliklerinden ASM için yeterli sayıda hücre toplanamaz.
- Hücrelerin çevreleriyle olan ilişkileri gözlenemez
- T hücreden zengin lenfomalarda ufak bir monoklonal B hücre klonunun tanınması mümkün olmayabilir.
- T hücreli lenfomaların aberan bir antijen(-örneğin bir panT hücre belirleyicinin kaybı/azalması) bulundurmadıkları sürece tanınması mümkün olmaz.
- Aberan bir T hücre immunfenotipi, her zaman bir malinite göstergesi olmayıp;

enfeksiyöz mononukleoz, reaktif dermatoz, enflamatuvar hastalıklarda da görülebilir.

- Lenfomalarda doku tutulumunun homojen olmadığı durumlarda yalancı negatif sonuçlar alınabilir.
- Hodgkin hastalığında neoplastik hücre sayısının az olması nedeniyle de tanıda ASM kullanımının bir yararı olmaz.

Dezavantajları nedeni ile ASM sonuçlarının daima ışık mikroskopu verileri ile birlikte değerlendirilmesi gerekir. Klinik veriler, moleküler/sitogenetik çalışmalar da verilerin değerlendirilmesinde yardımcı olan unsurlardır. ASM, morfolojik olarak şüphelenilen çeşitli hastalıkları doğrulamakta, hastalık alt tiplerinin belirlenmesinde, ayırıcı tanıda seçenekleri azaltmada, kullanılabilir. Bazı durumlarda morfoloji bilinmese de tanısal değerlendirmelerin yapılabileceği savunulmaktadır (tablo 1)

### 2.1.1 Akut Lösemiler

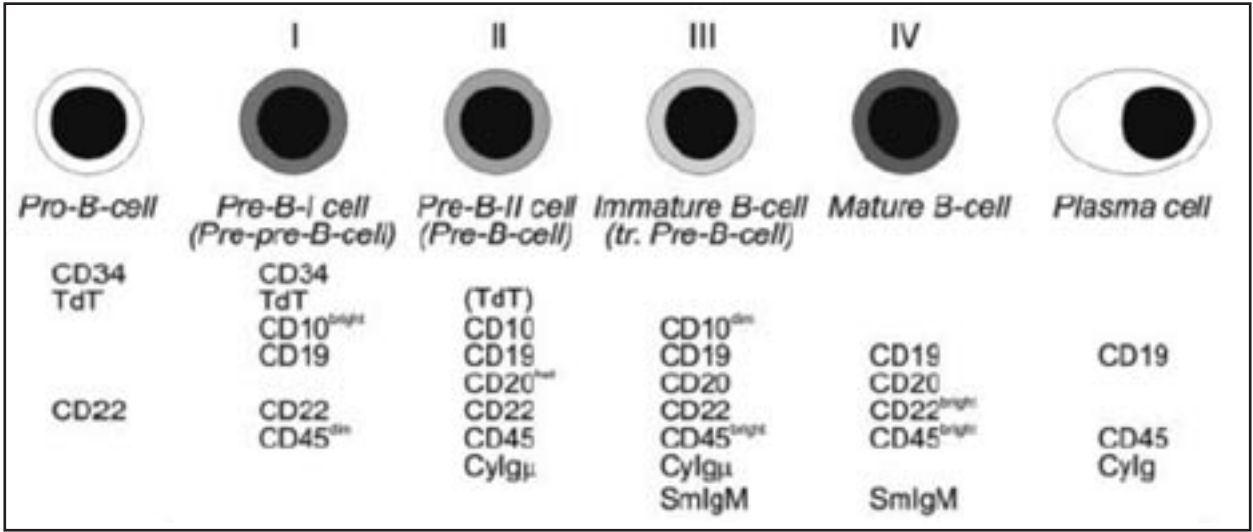
Akut lösemilerin %95 i temel antikorların kullanıldığı bir panel ile tanımlanabilir (tablo 2, koyu yazılanlar). Bu panel ile hücre serisinin tanımlanmadığı durumlarda, morfolojik veriler AML M6 M7 den şüphe ettirdiğinde, minimal rezidüel hastalığın takibinde kullanılacak bir parametre arandığında, prognostik verilere ulaşılmak istendiğinde literatür ışığında kullanılan diğer antikorlar yardımcı olabilir.

Analiz edilecek hücrelerin doğru seçimi önemlidir. Özellikle kemik iliği örneklerinde sadece FSC ve SSC den yararlanarak hücrelerin kesin sınırlarla ayrılması mümkün olmaz. Hücreleri bulduklarları CD45 miktarına ve 90° kırılan ışık (SSC) özelliklerine göre ayırmak yol gösterici olabilir (şekil 1) ancak bu antikorun her tübe eklenmesi maliyeti arttırıcı bir faktördür.

**Tablo 1.** ASM nin tanıya katkıda bulunduğu hematolojik hastalıklar

ASM ile tanı koyulabilir	ASM tanı ve ayırıcı tanıda yardımcıdır
Pre-B ALL	Foliküler NHL
T-ALL	"Mantle Cell" Lenfoma
B-CLL, SLL, "Hairy Cell" Lösemi	Diğer "low grade" lenfomalar
Akut Miyeloid Lösemi	Büyük B hücreli NHL
"Paroxysmal Nocturnal" Hemoglobinüri	Burkitt's lenfoma
	"Large" granuler lenfosit hastalıkları
	Plazma hücre hastalıkları
	MDS

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi, CLL: Kronik Lenfositik Lösemi, SLL: Küçük Lenfositik Lenfoma, NHL: NonHodgkin Lenfoma  
Mitchell S. Ward, pathology (1999) 31 den modifiye



Şekil 1.

### 2.1.1.1 Akut Miyeloid Lösemi (AML)

ASM, AML'nin French-American-British (FAB) sınıflamasına göre gruplanmasında sitokimyasal yöntemlerin önüne geçmiştir. Özellikle M0 ve M7 olgularında tanı için immunolojik yöntemler gereklidir. AML hücreleri CD13, CD33, MPO ya özgün antikorlarla işaretlenir, diğer miyeloid antijenler sınıflamada yardımcı olsalar da prognostik değerleri sınırlıdır (tablo 3). CD11b nin kötü prognostik değeri dışında CD34 başta olmak üzere bazı antijenlerin önemine dair çalışmalar olsa da görüş birliği yoktur. AML hücrelerinde lenfoid antijenlerin bulunması her zaman "mix-lineage" veya bifenotipiye göstermez. Mevcut ise aberan AML hücrelerinin

**Tablo 2.** Akut Lösemi Tanısında kullanılacak temel antikorlar

Hücre Serisi	B	T	M
Hücre serisini belirleyici	cCD79a cCD22 CD19	cCD3 CD3 CD7	cMPO CD13 CD33
Matürasyonu belirleyici	CD34 TdT	CD34 TdT	CD34, CD117 CD15 CD11a, CD11b HLA DR
Diğer karakteristikler	CD10 CD20 CD22 c IgM $\kappa$ $\lambda$	CD1 CD2 CD3 CD5 CD4 CD8	CD14 CD68 CD41, CD61 cCD235a(Gly-A)

**Tablo 3.** AML de immunfenotipik özellikler

FAB tipi	İmmunfenotip	Notlar
M0	FSC, SSC düşük (lenfoblast gibi) 34+, DR+, 13+, 33+, MPO+/-, 7±, CD4±	7+ ve 34+ prognozda olumsuz
M1	SSC(granülarite), M0 dan fazla 13+,33+,DR+,34 daha az, MPO+, 15c, 4±	19+,34+,(56+), t(8;21) lehine
M2	Maturasyon artmış, daha az blast, 45 SSC dağılımında blastlar 34 daha az, 15+, 13+, 33+, DR+	
M3	SSC artmış,45 zayıf, DR- 13 zayıf, 2±, 11a-,18zayıf,9+, 8-, 34-/+, 117+,	Kuvvetli 13 retinoik sendrom lehine 56+ s form(bcr3 lehine)
M4, M5	Benzer özellikleri var M4 de blast daha çok, FSC-SSC M0/M1 dan fazla, monositik komponent+, 33+ >13+, DR+, 14+, 15+, 34+ M5: 33+, 13-, 34-, zayıf 7+, monositlerde 4+	2+ M4Eo lehine, spesifik olmayan Ig bağlanması (↑FcR nedeniyle), CD14 spesifik ama sensitif değil
M6	Nadir, DR+, 34+, 13±, 33±, 45-/zayıf, 235a++	Beklenenden az tanınıyor Erken eritroid işaretlerin kaybı,
M7	61+, 41+,33±, Trombosit adezyonuna bağlı yalancı+ dikkat!!	Tanı için immunfenotipleme ve elektron mikroskopi(trombosit peroksidaz için) gerekir, morfoloji tanısız olmayabilir

Sayılar CD no ifade etmektedir (ör:33=CD33),DR=HLA-DR, +:pozitif, -:negatif, ±:değişken, MPO: miyeloperoksidaz

tanınmasını kolaylaştırırlar (%5-28). CD2 varlığının özellikle çocuklarda kötü prognostik olup; biyolojik olarak farklı olan bir hastalığının işareti olduğu kabul edilir. CD 19 varlığı kötü prognostik [t(9;22)] veya iyi prognostik [t(8;21), t(15;17), inv(16)] sitogenetik belirleyicilere eşlik edebilir. Sitogenetik veriler prognozun belirlenmesinde en güvenilir işaretlerdir ve her genetik işarete özgün olan bir immunfenotip bulunmadığından ASM bunun önüne geçememiştir. NK hücreli akut lösemi, morfolojisi ve immunfenotipi ile AML M3v ile benzerlik gösterse de RARa mutasyonu yoktur. CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup> olan bu hücreler ATRA'ya yanıt vermezler ve CD56<sup>+</sup>, PML/RARa<sup>+</sup> olan AMLM3 olgularından ayrılmaları gerekir. İntegrinlerin kaybı (CD11a, CD11b, CD18) M3 için tipik bir bulgudur.

AML M7 olgularında CD41ve CD61 ile pozitif reaksiyon veren hücrelerin, lösemik blastlara yapışmış olan aktif trombositlerden kaynaklanmadığından emin olunmalıdır. Bu amaçla CC34, CD41 yanısıra matur trombosit işareti olan CD42b nin kullanılması, megakaryoblastlar ile trombositlerin ayrılmasına olanak sağlar.

### 2.1.1.2 B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Hücrelerin farklılaşmasına göre 4 sınıfta toplanabilen (şekil 2) bu lösemilerin immunfenotipik

**Tablo 4.** B hücreli ALL de tipik immunfenotipik özellikler

ALL tipi	İmmunfenotip	Notlar
"null cell" ALL	<b>c19+, c22+, c79a+, TdT+</b> , 34+, 10-	İmmatür B hücrele, kötü prognoz
B-prekürsör ALL (Erken preB) (Pre-preB) ("Common" ALL)	Blastlar küçük (FSC,SSC düşük), TdT4, DR+, 19+, parlak 22+, 34+,slg-, 79a+ <b>CD10+</b> (iyi prognoz), CD10-(kötü prognoz)	Çocukluk ALL nin %70 i, erişkin ALL nin %50 si CD10-, miyeloid ag+(15+) 11q23 anomalisi düşündürür ve kötü prognostik
pre- B ALL	19+, 24+, DR+, c22+,10+, Tdt±, 20±, 34-, <b>clgM</b>	Çocukluk çağı lösemilerin %25i, t(1;19) a bağlı kötü prognoz, 19+,10+,9+,20±,34-
B-ALL	Hücreler daha büyük, 19+, 20+, 22+, 24+, <b>parlak klonal slg, TdT-</b> , 10± zayıf	FAB L3 ile örtüşür c-myc(8q24) ilgili translokasyonlar [Ör: t(8;14), t(2;8), t8;22]

Sayılar CD no ifade etmektedir (ör: 19=CD19), DR=HLA-DR, +: pozitif, -: negatif, ±: değişken c: Sitoplazmik, lg: İmmunglobulin, koyu yazılanlar tipik bulgulardır

karakteristikleri tablo 4'te özetlenmiştir. TdT ve CD34, lenfomalarla ayırıcı tanıda yardımcıdır. Tanı koyulabilmesi için erken B hücre işaretlerinden (CD19, cCD22, cCD79a) en az ikisinin pozitif olması gerekir.

Hematogonlar: Hematogonlar kemik iliğinde, eser miktarda da periferde bulunan CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> hücreler olup; KI deki istirahat halindeki öncü B hücreleri (timustaki T öncülerine karşılık olacak şekilde) tanımlamak için kullanılır. Kemoterapi sonrasında, kök hücre naklinden sonra sayıları çok arttığından, bu dönemlerde incelenen KI örneklerinde hematogonların malin hücreler ile karıştırılmamasına özen gösterilmelidir.

### 2.1.1.3 T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

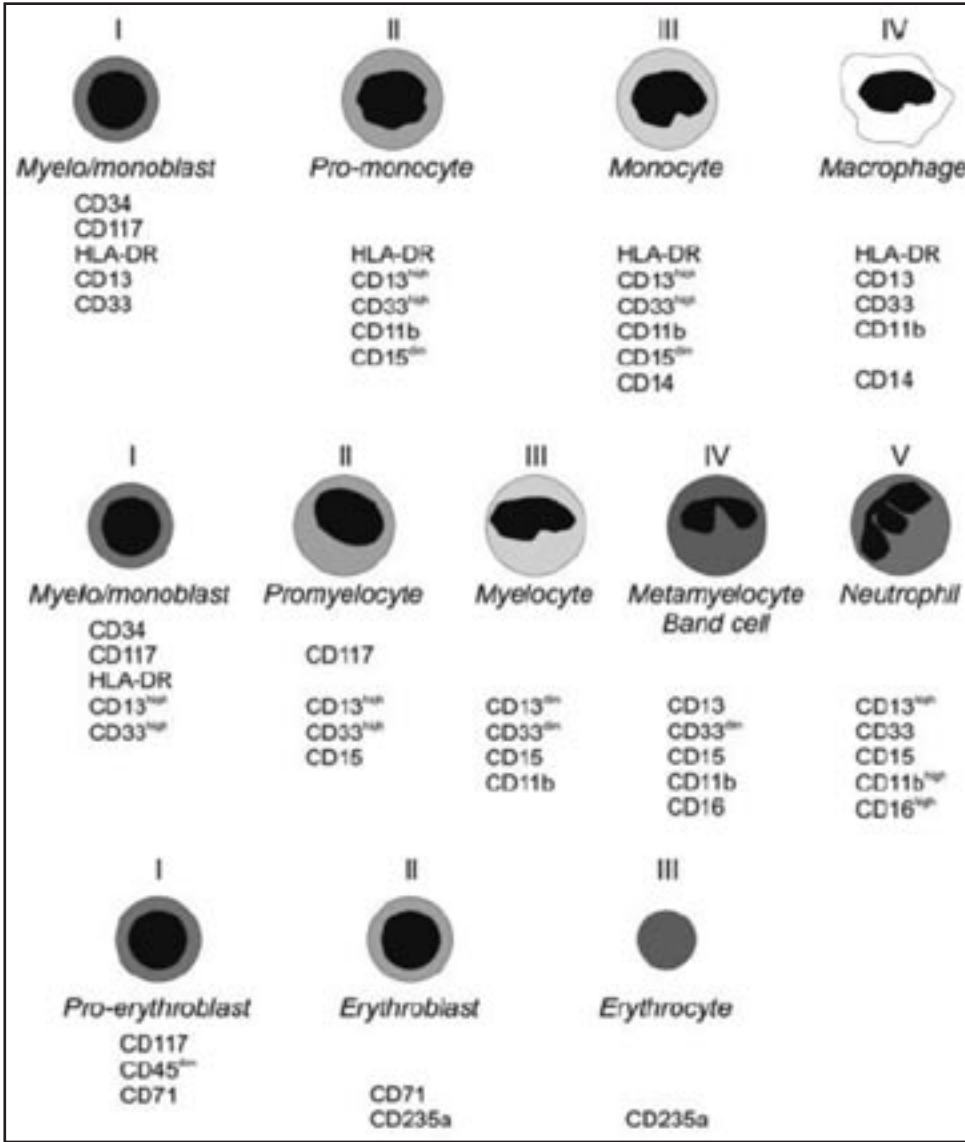
T-ALL erişkin ALL lerin %25 çocukluk çağının ise %15 inden sorumludur. Blastların CD45-SSC dağılımına göre lenfoblast/ miyeloblast/ monositik bölgede yer alabilmeleri nedeniyle "gate" almak zor olabilir. FSC değerleri de yüksek olabilir(büyük hücreler). T- ALL tanısı için sitoplazmik ya da yüzeyel CD3 varlığı koşul olup; CD2 veya CD7 varlığı tanı için yeterli değildir. Sınıflama timik farklılaşma evrelerine göre (CD1,4, 5,8) yapılır (tablo 5). CD10, iyi prognostik bir işarettir. T-ALL de spesifik T hücre antijenlerinin bulunmaması (Ag kaybı), aberan ekspresyonlar çok tipiktir.

ALL olgularını DNA içeriklerine (ploidi) göre sınıflamak da mümkündür. Hiperdiploidi daha iyi; hipodiploidi daha kötü prognoz işarettir.

**Tablo 5.** T hücreli ALL de tipik immunfenotipik özellikler

ALL tipi	İmmunfenotip	Notlar
Pre(pro)T-ALL	c3+, 7+, diğer T antijenleri-	Kötü prognoz
Erken kortikal timik	2+, 5+, 7+, TdT parlak+	
Geç Kortikal timik	1a+, 2+, 5+, 7+, dual 4+/8+, minimal s3+, TdT+	Seyrek
Medullar	2+, 5+, 7+, 4+ veya 8+, TdT, 3±	

Sayılar CD no ifade etmektedir (ör: 3=CD3), +: pozitif, -: negatif, ±: değişken c: Sitoplazmik, s: yüzeyel,



**Şekil 2.** Kemik iliğinde normal A: B hücre, B: monositik, C: granulositik, D: eritroid hücre gelişimi ve immunfenotipik özellikleri

#### 2.1.1.4 Bifenotipik Akut Lösemiler

Lösemik hücre üzerinde lenfoid ve miyeloid antijenlerin birarada bulunduğu bir erken öncü hücre(pluripotent) malinitesi olarak tanımlanır. Bu durumun lenfoid antijen taşıyan AML ya da miyeloid antijen taşıyan lenfoid malinitelerden farklı olduğu vurgulanmalıdır. Bu ayrımı kolaylaştırmak için bir skorlama sistemi kullanılmakta olasa da bazı araştırmacılar, antijen sayısına göre yapılacak bir değerlendirmenin doğru olmadığını düşünmektedir. Hücre serilerini en iyi tanımlayan antijenler B hücre için CD22, T hücre için CD3, miyeloid hücreler için MPO dur. Nadir olarak aynı anda iki farklı malin hücre serisinin bir arada bulunduğu durumlar söz konusu olabilir

ki “mixed lineage” veya “bilineage” lösemi olarak adlandırılır.

#### 2.1.1.5 Akut, farklılaşma göstermeyen (undifferentiated) Lösemiler

Lösemilerin %1 kadarı sınıflandırılmamaktadır. Bu olguların tipik olarak CD34+, HLA-DR+, ve genellikle CD38+, CD7+ olup, bir hücre serisine özgün olan başka bir antijen taşımadıkları görülmüştür.

#### 2.1.2 Kronik Miyelositer Lösemi (CML, KML) ve NON-KML Miyeloproliferatif Hastalıklar (NCMPDS)

ASM nin KML nin kronik fazında kullanımı sınırlıdır. Hücrelerin en az %10 unda miyeloid

seri antijenlerinin dağılımında (özellikle CD33, CD13) artma ya da azalma yönünde değişiklikler, iki miyeloid antijenin dağılımındaki senkronizasyonun bozulması (ör. CD13- CD16, CD11b-CD16 arasında) izlenebilir. Blastik transformasyonda ise farklılaşmanın lenfoblastik ya da miyeloblastik yönde mi olduğu tanınabilir. Bcr-abl onkogenine özgün antikolar, KML hücrelerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

Non-KML miyeloproliferatif hastalıklarda CD2, CD5, CD7, CD56, CD36, CD71 gibi miyeloid olmayan antijenlerin aberan ekspresyonu bulunabilir. Birden çok antijen dağılımının bozulması söz konusudur. Anormal veriler arasında: (1) polisitemia verada bcl-XL ekspresyonunda artma, (2) esansiyel trombositozda trombosit yüzeyindeki gp1a/IIa, gp1b ve gpIIb/IIIa da azalma, p-selektin, trombopodin, gpIV ve c-Mpl de artma, (3) Miyeloproliferatif bazı hastalıklarda miyeloid hücrelerde CD66 ve CD14 ün aberan koekspresyonu bulunabilir. ASM ile kronik miyelomonositer lösemilerdeki monositlerin oranı ve bu monositlerdeki anormal antijen ekspresyonları (ör CD13, CD14 CD15 de azalma, CD56 ekspresyonu) belirlenebilir.

Miyelodisplaziler(MDS):

İmmunfenotiplemenin tanısal ve prognostik önemine dair çalışmalar olsa da standart tanımlamalar yoktur. Klonal bir sitogenetik anomali bulunduran olgularda aberan antijen ekspresyonları (NCMPD deki gibi), hücrelerin ışık saçılım özelliklerindeki değişiklikler (özellikle hipogranülarite) dikkat çekmektedir.

### 2.1.3 Kronik Lenfoproliferatif Hastalıklar

ASM, malin (klonal) lenfoid proliferasyonun benign proliferasyondan ayrılmasında, T-, B-hücre kaynağının belirlenmesinde ve ayırıcı tanıdaki seçenekleri minimize indirmek konularında yardımcı veriler sağlar. Tanımlayıcı tek bir antijen olmasa da antijenlerin dağılım özellikleri, yoğunlukları yol göstericidir (tablo 6).

#### 2.1.3.1 Kronik Lenfositik Lösemi, CLL

Erişkin lösemiler arasında en sık görülen tip olan CLL de, CD5+, CD19+ olması tipiktir.. CLL ve SLLnin aynı hücreden köken alan ancak doku dağılımı farklılık gösteren hastalıklar olduğu düşünülmektedir. CLL nin atipik morfoloji gösteren bir alt grubunda sIg parlak+, CD20+, CD23-, FMC7+ CD79b+ izlenir. Bu durum trizomi 12 ve kötü prognoz ile birliktedir. İmmunfenotip ile "high

grade" transformasyon(Richter) ve prolenfositik transformasyonların CLL den ayrılması mümkün olmaz. CD5- CLL tanısı şüphe ile karşılanıp; diğer "low grade" lenfomaların ekarte edilmesi gerekir. CLL/SLL olgularında aberan antijen ekspresyonları (CD2, CD7, CD10, CD13, CD33, CD34) beklenen yaşam süresinin kısa olması lehinedir. Zap-70 ekspresyonunun Ig ağır zincir mutasyonları ile ilişkili olduğu ve kötü prognoz, hızlı seyir lehine bir veri olduğu bilinmektedir (tablo 7).

#### 2.1.3.2. "Non-Hodgkin" Lenfomalar, NHL

NHL, genelde doku biyopsilerindeki tipik immünfenotipik özellikleri ile tanınır. Kan ve kemik

**Tablo 6.** B hücre Lenfoproliferatif hastalıklarında fenotipik özellikler

Hastalık	İmmunfenotip	Notlar
CLL/SLL	5+, <b>19+</b> , <b>20 z+</b> , DR+, <b>slgM/D z+</b> , <b>23parlak+</b> , FMC7-, 10-, 22-, klonal hafif zincir z+	5, 19 ko ekspresyonu tipik
PLL	slg parlak+, 5-, 22+, 19+, 20parlak+, DR+, FMC7+, 23-, 10-	%50 sinde 5+
MCL	5+, <b>slgM parlak+</b> , slgD±, <b>23-</b> , 19+, 20+, DR+, 22+, 43+, 10-	I > k, t(11;14)
FCC	slg parlak+, <b>5-</b> , <b>10+</b> , 23±, 19+, 20+, DR+, 22+, <b>43-</b> , 11c-	<%20 10-
MZL	19+, 20+, DR+, 22+, <b>slg+</b> , 11c+, <b>5-</b> , <b>10-</b> , 23-, 21-, 24-, 25-,	MALT&monositoid B-NHL
SMZL/SLVL	19+, 20+, 22+++, slgparlak+, 24+, 5-, 103-,	
HCL	19+, 20+, DR+, 79a+, <b>25+</b> , <b>103+</b> , slg ılımlı+, <b>FMC7+</b> , 21-, <b>5-</b> , <b>10-</b> , <b>23-</b> , <b>11c+++</b> , <b>22++</b>	HCLvariant: 11c z+, 25z+
LCL	slg- olabilir, 19+, 20+, 22+, 34-, TdT-, 45±, Anaplastik LCL: <b>30+</b> , 25+, 71+	Büyük hücreli karsinomdan ayırır
"Hodgkin" Hastalığı RS hücreleri	Genellikle: 30+, 70+, 15+, 45-, B7/BB1 +++ Aktivasyon: 25+, DR+, 71+ T antijenleri: %50 sinde 2,3,4 +	Nodüler lenfositten zengin HD farklı bir tip olup; 20+, 45+, 15-, 30-, 70- görülür

Sayılar CD no ifade etmektedir (ör: 19=CD19), DR=HLA-DR, +: pozitif, -: negatif, ±: değişken z+: zayıf pozitif, CLL: kronik lenfositik lösemi, SLL: küçük lenfositik lenfoma, PLL: prolenfositik lösemi, MCL: "Mantle cell" lenfoma, FCC: "Follicular center" hücreli lenfoma, SMZL: splenik "marginal zone" lenfoma, SLVL: villöz lenfositli splenik lenfoma, HCL: "hairy cell" lösemi, LCL: Büyük hücreli lenfoma, RS: Reed Stenberg hücreleri, kalın yazılanlar karakteristik özellikleri vurgulamaktadır

iliği örneklerindeki karakteristik bulgular daha az tanımlanmıştır. Tanının morfoloji ve immunfenotipik bulgularla birlikte koyulması gerekir.

“Mantle Cell” lenfoma: İmmunfenotipleme; blastik MCL nin (sIg+, CD5+, TdT-) lenfoblastik lenfomadan (sIg-, CD5-, TdT+) ayrılmasında kullanılabilir, CD23 ile de CLL ile ayırıcı tanı mümkün olur (tablo 6). CyclinD1'in moleküler analizini gerektiren durumlar olabilir(zayıf CD23 ekspresyonları) . CD79b MCL 'de pozitif iken CLL/SLLde genellikle bulunmaz.

“Follicular centre cell” lenfoma: Tüm lenfomaların yaklaşık %45i bu tipte olup; akım sitometrideki ışık saçılımından(FSC) büyük hücrelerin oranı saptanabilir. Ancak büyük hücreler daha duyarlı olduklarından, hazırlık işlemleri sırasında parçalanmaları ve tanınmamaları sık karşılaşılan bir durumdur.

“Marginal zone” lenfoma: Mukozalardaki lenfoid doku (MALT, eksta nodal) ve monositik B hücreli (nodal) lenfomalar, bu grupta yer alır, immun fenotipik özellikleri benzerdir. Kan ve kemik iliği örnekleri yerine lenf nodülünden yapılacak immunfenotipleme daha anlamlıdır. MCL, CLL ve HCL den ayırıcı tanısı gerekir, variant HCL ile ayırımı zor olabilir.

“Hairy cell” lösemi: doğru tedavi ile tedavisi mümkün olan bir hastalık olduğundan tanınması

önemlidir. CD11c, CD103, CD25 gibi antijenlerin varlığı tipiktir. Şüpheli durumlarda(splenomegali, Kİ aspirasyonunda zorluk, pansitopeni) bu antijenlerin aranması gerekir. Tedaviye farklı yanıt veren variant tipinde CD25- beklenir.

“Large Cell” lenfoma: Perifer kanında pek görülmeyen bu hücreler, hassas olup kolayca parçalanabilir. ASM incelemesinde “debri”lerin bulunduğu kısı kalabalıktır. Erişkinlerde genellikle B hücreli olup, immunfenotipi ile diğer büyük hücreli kanserlerden ayrılabilir. T hücreden zengin B hücre lenfomalarının HH ve T hücreli lenfomalardan ayrılması zordur. Genellikle sIg(-) olduğundan monoklonalite de gösterilemez.

“Anaplastic large cell” lenfoma: CD30+ olan bu hücreler, aktivasyon işaretlerini de (CD25, CD71, HLA-DR) taşımaları karmaşaya neden olabilir. Tanı için immunfenotip, morfoloji, klinik özellikleri birlikte değerlendirilmelidir.

### 2.1.3.3 “Hodgkin” Hastalığı

Hodgkin Hastalığında malin hücrelerin sayısı az olup (<%1) çoğunluğu enflamatuvar hücreler oluşturduğundan CD4+ hücrelerin hakim olduğu karışık bir hücre topluluğu izlenir. Reed Sternberg hücreleri bireyler arasında değişip; bazı çalışmalarda CD30+ B hücreler, bazılarında sadece poliklonal hücreler veya karışık hücre topluluklarından bahsedilmektedir.

**Tablo 7.** Lenfoid/Plazma hücre hastalıklarında İmmunfenotipik prognostik işaretler

Hastalık	İşaretler	Prognostik önemi
CLL/SLL	CD2,CD7 CD10 CD13, CD33 CD34 CD38 ZAP-70 MUM1	Tümü kısa OS ve hızlı progres ile karakterize
Plazma hücre diskrazileri	CD11c, CD13, Cd14, CD15, CD10	Miyelomonositik işaretler ve CD10, kısa OS ve agresif hastalıkla birlikte
Büyük B hücreli Lenfoma	Bcl-2 CD10+, Bcl-6+, MUM1-(germinal merkez fenotipi)	Kısa OS, ileri evre lehine Uzamış OS, uzun hastalısız yaşam lehine

CLL: Kronik lenfositik lösemi, SLL: Küçük lenfositik lenfoma, OS: “Overall Survival”

**Tablo 8.** T hücre lenfoproliferatif hastalıklarında fenotipik özellikler

Hastalık	İmmunfenotip	Notlar
T-PLL	2+, 3+, 5+, 7+, 4+, 8-	Dual 4+/8+, 4-/8+ nadir 4+/8-: tedaviye daha iyi yanıt
T-LGL lösemi	2+, 3+, 5-, 7-, 4-, 8+, 16+, 11b+, 56-, 57+, 25-	3+,56+: daha agresif
NK-LGL	2+, 3-, 16+, 56+, 4-, 8±, 57-, 25-	
MF/Sézary	2+, 3+, 5+, 7-, 4+, 8-, 25-	Tanı zor TCR gen rearanjmanı gösterilmedikçe reaktif T hücre proliferasyonu ekarte edilemez
Erişkin T lösemi/lenfoma	2+, 3+, 5+, 7-, 4+, 8-, 25parlak+	L selektin ekspresyonu ↑
T-CLL	2+, 3+, 5+, 7+, 4+, 8-, 25-	Aberran patern , nadiren 8+

Sayılar CD no ifade etmektedir (ör:3=CD3), +:pozitif, -: negatif, ±:değişken, LGL: “Large granular Lymphocyte”, NK: “Natural Killer Cell”, MF: mycosis fungoides

### 2.1.3.4 T Hücre Hastalıkları

Bu hastalıklarda perifer tipi T hücre fenotipi izlenir. CD3 yanısıra CD4 veya CD8 pozitifdir. Normal T hücre antijenlerinin kaybı ya da yoğunluklarının değişmesi tipiktir (tablo 8).

#### 2.1.3.5 "Large granular" Lenfositik (LGL) Lösemi

LGL Lösemi morfolojisi tipik olup; fenotipine göre T ve NK olarak ikiye ayrılır

T-LGL'de CD24, CD3+, CD8zayıf+, CD16+, CD57+, CD56-, CD5-, TCR+ olup; genellikle nötropeni ve otoimmün hastalıklar eşlik eder, daha sessiz seyreder.

NK-LGL'de CD2+, CD16+, CD56+, CD3-, CD4, CD8-, CD57-, TCR- izlenir. Anemi, trombositopeni ve hepatosplenomegali daha belirgin olup; daha agresif seyreder.

LGL nin CD3+, CD56+ olan bir varyantı hepatosplenik g d hücre lenfoması olarak da bilinmekte ve kötü prognoz göstermektedir.

### 2.1.4 Multipl Miyelom

Plazma hücreleri farklılaştıkça B hücre antijenlerini (CD19, CD22, sIg, HLA-DR), CD45i kaybeder ve CD38(çok parlak), PCA-1, CD138 gibi yeni antijenler taşır. CD 38, T, NK hücrelerde monositlerde de bulunduğu tek başına değil de CD56, CD45, gibi diğer antijenlerle birlikte kullanılırsa daha iyi bir ayırım sağlanabilir. Tipik fenotipler şöyle özetlenebilir:

Primitif plazma hücreleri: CD45++, CD38++, CD19+, CD10+, CD56+, VLA5+

İmmatür plazma hücreleri: CD45+, CD38++

Matür plazma hücreleri: CD45-, CD38++, CD19-

Primitif hücrelerin varlığı kötü prognoz işaretidir.

Miyeloma aslında kemik iliğinin bir hastalığı olsa da bazı miyelom hastalarında ve reaktif durumlarda(karaciğer hst, HIV) perifer kanında da plazma hücrelerine rastlanabilir. Her iki durumda da immatür plazma hücreleri bulunabilir ve özgün olmayan bir uyarılma işaretidir. Matür hücreler ise sadece aktif hastalığı olan miyelom hastalarında bulunup monoklonal özelliktedirler. Kemik iliğindeki hücrelerde CD138 ve VLA5 eksprese edilirken; periferdeki hücrelerde bu antijenler yoktur

ya da çok zayıf eksprese edilirler. Kemik iliğindeki miyelom hücrelerinin normal plazma hücrelerinden farklı olarak CD56 ekspresyonlarının yüksek olduğu görülür.

#### 2.1.5 Paroksizmal Nokturnal hemoglobinüri (PNH)

PNH, nadir görülen edinsel, klonal bir hastalık olup; Posfatidil İnozitol Glikan sınıf A (PIG-A) genindeki mutasyonlara bağlı ortaya çıkar ancak; klonal gelişme için bu mutasyonun varlığı yeterli değildir. Hemoliz ve hemoglobinüri, periferik kanda sitopeni, venöz tromboza yatkınlık en karakteristik klinik bulgulardır. PNH, Miyelodisplastik Sendrom, Aplastik Anemiye eşlik edebilir veya dönüşebilir. Hücre membranına Glikozilfosfatidilinozitol (GPI) ile bağlı bulunan proteinlerin eksikliği söz konusudur. Bu proteinlerden CD55, CD59'un eksikliği "membran attack complex", MAC'ın eritrositleri parçalamasına neden olur. Eritrositler yanısıra granulosit, monositlerde de bu proteinlerin eksikliği görülür. Granulositler için CD55, CD59 CD66b, monositler için CD55, CD59, CD14, CD48 in en iyi belirleyiciler olduğu CD16 nin eozinofillerde bulunmaması nedeniyle eksikliğin dikkatle değerlendirilmesi gerektiği bilinmektedir. PNH eritrositleri fenotiplerine göre 3 gruba ayrılabilir. PNH I komplemana duyarlılığın normal olduğu tip olup; CD55,CD59 eksikliği gösterilemez. PNH III ise hassasiyetin 15-25 kat fazla olduğu tipi temsil eder ve CD55, CD59 ekspresyonu hiç yoktur. Tip II hücreler ise komplemana orta derecede hassasiyet gösterirler ve bu proteinler için kısmi bir eksiklik söz konusudur. PNH klonunun büyüklüğünü saptamak için eritrosit ve lenfositlerden ziyade granulosit ve monositlerdeki ekspresyonunun kullanılması önerilmektedir.

#### 2.1.6 Minimal Residüel Hastalık (MRD)

Hematolojik malinitelerin tedavisini takiben MRD'nin tesbiti giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Genetik işaretler için kullanılan moleküler yöntemler, çok az sayıdaki tümör hücrelerinin bile belirlenmesini sağlar. ASM ile ışık saçılım özelliklerinden de yararlanarak uygulanan multiparametrik analizler ile MRD belirlenebilir. Önemli olan tümöre özgün olan antijen/sinyallerin kullanılmasıdır. Bunlar tanı anındakiler ile aynı olabilir veya, hastalıklardaki klonal değişimler nedeniyle fenotipte değişiklikler ortaya çıkabilir. Duyarlılık  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  düzeyindedir. Nadir görülen aberan bir ekspresyon,



MRD için uygun bir takip parametresidir. Kemik iliğindeki hematogonlar, pre B hücreleri ile aynı antijenleri taşırlar. Bu hücreler ancak antijen ekspresyonunun şiddeti veya eşlik eden aberan bir antijenden yararlanarak malin hücrelerden ayrılabilir.

Lösemik lenfoblastlarda 11q23 anomalisi bulunduğu, MRD tesbiti için 7.1 antijenine yönelik antikolar kullanılabilir.

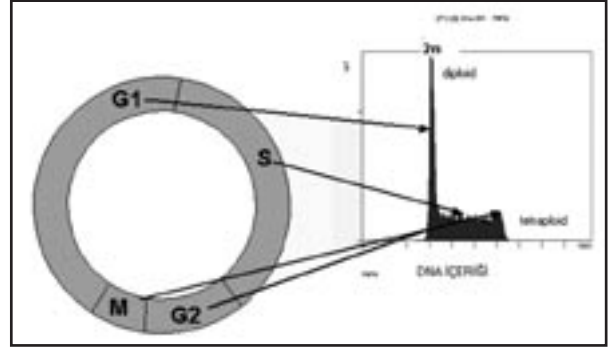
B hücreli CLL de CD19, CD5 birlikteliği %5 duyarlılıkla MRD yi saptarken bu ikiliye k/1 monoklonalitesinin eşlik etmesi halinde duyarlılık %1'e yükselir.

Tek bir ölçümde MRD nin pozitif olması relapsın habercisi olabilirse de ardışık ölçümlerde MRD varlığı relaps için çok daha iyi bir göstergedir. Bu konu ilgili konuşmacılar tarafından ayrıca işlenecektir.

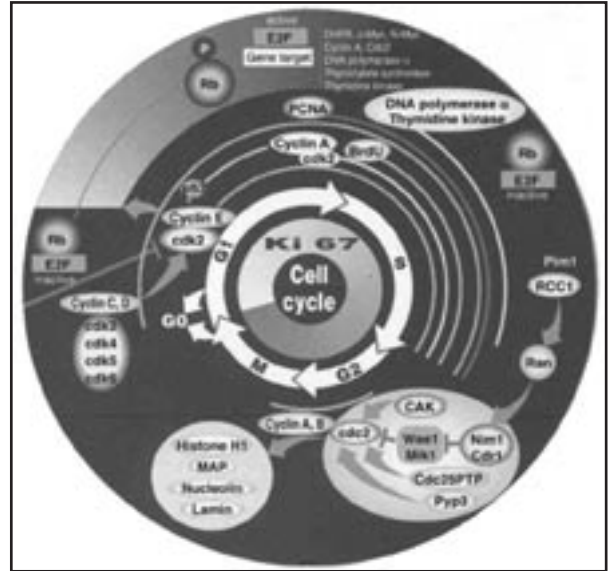
## 2.2 Hücre DNA İçeriğinin Belirlenmesi (PLOİDY)

DNA, çift sarmalla şelat yapabilen floresan boyalarla işaretlenebilir. Boyama sitokiyometrik; yani boyanın miktarı hücrede bulunan DNA miktarıyla doğru orantılıdır. Bu amaçla en sık kullanılan boyalar Propidyum İyodür (PI), DAPI, Hoechst dür. Bu tür florokromların bir kısmı sadece DNA ya bağlanırken çoğu DNA ve RNA ya bağlanabilme özelliğindedir. Bu durumun sonuçları etkilememesi için DNA'nın, hücre zarı geçirgen hale getirildikten ve RNase ile işlem gördükten sonra boyanması önerilmektedir.

**Diploid** bir hücredeki DNA miktarı **2n** olarak tanımlanır (şekil 3). Bu durumda test edilen hücredeki DNA'nın normal hücrelerdeki DNA miktarlarına oranlanması ile elde edilen değer **DNA indeksi** olup; hücrenin DNA içeriğini yansıtmaktadır. Normalde **1 +/- %10** olması beklenir; bundan farklı değerler bulunduğu **anaploididen**



Şekil 3. Hücre döngüsünün ASM ile izlenmesi



Şekil 4. Hücre döngüsüne eşlik eden proteinler

söz edilir. DNA indeksinin **>1** olması **hiperploidi**, **<1** olması **hipoploidi** olarak tanımlanır. Anaploidinin bulunması malinite lehine bir bulgu olsa da bu her zaman doğru değildir; benzer şekilde anaploidi daima kötü prognozun bir işareti olarak algılanmamalıdır. Hematolojik malinitelerde en sık karşılaşılan anaploidi sebepleri tablo 9'da özetlenmiştir.

Akım Sitometresi ile hücrelerin hangi bölünme fazında ne miktarda hücre bulunduğunu tespit etmek de mümkündür. Bu şekilde hücrelerin çoğalma hızları hakkında bilgi toplanır. Diploid hücreler, **G0 /G1** fazında yer alırken **S** (sentez) fazındaki hücrelerin DNA içeriği diploid ile tetraploid hücreler arasında olacaktır (şekil 3). **G2 ve Mitozdaki** hücreler ise **4n** miktarında DNA taşıdıklarından **tetraploid** olarak izlenecektir.

Tablo 9. Hematolojik malinitelerde anaploidi nedeni olabilen kromozomal değişiklikler

Hastalık	Kromozomal değişiklikler
Akut Miyeloid Lösemi	+8 (%13), -7(%10)
Kronik Lenfositik Lösemi	+12 (%30)
Akut lenfoblastik Lösemi	+4, +6, +10, +14, +17, +18, +20
"Non-Hodgkin" lenfoma	+12

S+G2+M fazındaki hücreler **S** Fazı Fraksiyonu (**SPF**) olarak tanımlanıp; SPF nin yüksek olması, proliferasyon hızının yüksek olduğunun bir göstergesidir.

Hücre döngüsü analizlerinde: analiz edilecek hücrelerin seçimi ve kullanılacak yazılım programlarında seçilen modeller, karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmesinde büyük önem taşır.

Hücre döngüsü analizlerinde karşılaşılan bir problem malin olan ve olmayan hücrelerin bir arada bulunabilmesidir. Bu durumda DNA yı işaretlemeyen önce malin hücreleri ayırabilecek bir antijeni(ör: epitelyal kökenli hücrelerde sitokeratin, B lenfoid tümörlerde CD19..... ) işaretlemek yardımcı olabilir.

Hücre döngüsü analizlerini hücre döngüsüne eşlik eden proteinlerin ölçümü ile eş zamanlı değerlendirmek de mümkündür (şekil 4).

### 1.3 Hematopoetik Kök Hücrelerin Sayılması

Kemik iliği örneklerindeki lökosit sayısı graft kalitesi hakkında bir ön bilgi verse de perifer kan örneğinde hematopoetik kök hücreleri (HPKH) saymadan hızlı bir değerlendirme yapmak mümkün değildir. Multiparametrik ölçümler kullanılan ASM çalışmaları ile: (1)Perifer kanından toplanan CD34+ HPKH ve progenitörler sayılarak, toplanan ürünün kalitesi değerlendirilebilir.(2) önceden yapılan sayımlar, hücre toplanması için optimal zamanın belirlenmesini sağlar. Özellikle MM gibi mobilizasyonun ilerleyen günlerinde malin hücre kontaminasyonu riski artan durumlarda en erken dönemde ürün toplanmasının önemi vurgulanmalıdır. (3)Çeşitli sitokinlerin ve /veya kemoterapi rejimlerinin CD34+ hücre sayılarını ve alt gruplarını nasıl etkilediği incelenebilir. (4) Aferez ürününe yapılan müdahalelerin etkisi değerlendirilebilir (viyabilite, CD3 eksiltilmiş ürünlerde kalan T lenfosit, HPKH sayıları) (5) Kriyoprezervasyonun hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirilebilir. (6) CD34+ hücrelerin alt grupları değerlendirilebilir .**CD34+**, **CD38-**, **lin-**, **CD90+** hücrelerin uzun süreli kalıcı engraftmanda; CD34+, CD41+ /CD61+ /CD62L+ hücrelerin erken dönem engraftmanda önem taşıdığını gösteren çalışmalar vardır.

İstirahat halindeki HPKH lerin CD34- oldukları ve uyarıcı bir sinyal aldıklarında CD34 ekspresyonunun başladığı bilinmektedir; CD34, aktif HPKH

belirleyicisidir. Kord kanı örneklerinde lin-, CD38-, CD7-, CD133 + hücrelerin de hematopoetik aktivite gösterdiğine dair veriler olsa da “multilineage” hematopoez kapasitesi taşıyanların CD34+ hücreler olduğu kabul edilmektedir.

ASM ile CD34 sayımı için: (1)Beyaz küredeki (BK) **CD34+ hücre oranları** bulunup hemogramda elde edilen **mutlak BK** değerleri kullanılarak hesaplanır(Dual platform). (2)Birim hacimde bulunan CD34+ hücre sayısı doğrudan ölçülür(Single platform) Bu ölçüm için ya volumetrik cihazlar kullanılır ya da mutlak sayısı bilinen parlak floresan veren boncuklar eklenerek birim hacimdeki hücre sayısı hesaplanır. Bu yöntemle kan dışı ürünlerde (kord kanı, kemik iliği gibi) görülebilen çekirdekli kırmızı küre ya da küme trombositlerden kaynaklanan hatalı BK sayımlarına bağlı hatalar dışlanmış olur. Laboratuvarlar arası değişkenlik azalır. Sayımlar için seçilecek antikolar, “Class” III veya II epitoplara özgün olmalı ve tercihan Phycoerytrin (PE) işaretli olmalıdır, “Class”II FITC konjuge antikolar kullanılmamalıdır . En sık kullanılan “Single”platform ISHAGE metodu ile yapılan ölçümlerdir. Yönteme yapılan bazı eklemeler ile CD34+ hücre alt gruplarının veya hücre canlılığının da değerlendirilmesi mümkün olmaktadır.

Son yıllarda kullanılmaya başlanan bir teknikte yüksek miktarlarda aldehit dehidrogenaz(-ALDH) aktivitesi bulunan hücreler tesbit edilerek kök hücreler tanınmaktadır. Ürüne dönüştüklerinde floresan verme özelliği olan ALDH substratları kullanarak akım sitometresi aracılığıyla fazla floresan veren kök hücreler tanınır, miktarları belirlenebilir.

### 1.4 Hücre Canlılığını Tesbiti, Apoptoz ile İlgili Çalışmalar

ASM ile İmmunfenotipleme uygulamalarında özgün olmayan antikor bağlanmalarından kaçınabilmek için canlı hücrelerle çalışılması gerekir. Bu amaçla 7AAD, Propidyum İyodür(PI)gibi floresan veren boyalar kullanılarak hiç bir ön işlem yapılmadığı halde membranı geçirgen hale gelmiş olan hücrelerin DNAsının boyanması sağlanarak canlı/ölü hücre ayırımı yapılabilir. Canlı hücreler floresan vermezken ölü hücrelerin kullanılan florokromun özelliklerine göre farklı sinyal verdikleri gözlenir.

Akım Sitometresinin nekrobiyolojide kullanımının 2 temel amacı vardır:

1. Hücre ölümüne eşlik eden moleküler ve fonksiyonel mekanizmaların aydınlatılması
2. Ölü hücrelerin miktarının tayini, apoptoz ve nekroz ile oluşan ölümlerin ayırt edilebilmesi

Hücre ölümüne eşlik eden moleküller arasında en çok çalışılanlar: bcl-2 ailesinin elemanları, kaspazlar, protoonkojenler (ör:c-myc, ras...), tümör suprese edici genler (ör: p53, pRB...)dir. ASM'de fonksiyonel analizler de yapılabildiği için mitokondrial membran potansiyelindeki değişimlerin ölçülmesi, oksidatif stresin belirlenmesi, hücre içi pH ve iyonize Ca düzeylerinin ölçülebilmesi ile apoptoz hakkında yardımcı bilgiler toplanabilir. ASM'nin en büyük avantajı ise bu ölçümlerin birkaçının aynı anda aynı hücre üzerinde yapılabilmesidir.

Apoptozun belirlenmesi için kullanılan çok sayıda yöntem vardır. (1)Akım sitometresinde ışığın dar(FSC) ve dik açı ile kırılma(SSC) özelliklerinden yararlanılarak sırasıyla hücrenin boyutları ve granüler yapısındaki değişiklikler kaydedilir. Apoptozun erken dönemlerinde hücredeki büzüşmeye bağlı olarak FSC de bir azalma meydana gelir, SSC'de başlangıçta genellikle bir farklılık gözlenirse de bazı hücrelerde SSC'nin kromatindeki ve sitoplazmadaki yoğunlaşmayı yansıtacak şekilde arttığı gözlenir.Olay ilerleyip hücre büzüşünce ise SSC nin de azaldığı gözlenir. Nekroz olayında ise hücrede büzüşme değil şişme olduğundan FSC başlangıçta bir artış gösterir; plazma membranının yırtılıp sitozolün boşalmasını takiben FSC ve SSC de belirgin bir azalma göze çarpar. (2)Plazma membranındaki fosfolipidlerin dağılımı incelenebilir Plazma membranındaki fosfolipidler iç ve dış yapraklar arasında asimetric bir dağılım gösterirler, apoptoz sırasında bu asimetric bozularak fosfatidilserin, hücre membranının dış yaprağına geçer. Antikoagulan bir protein olan Annexin V'in yüksek affinite ile fosfatidilserine bağlanmasından yararlanarak florokromla işaretli anti-Annexin aracılığı ile apoptotik hücreler saptanabilir. (3) plazma membranındaki aktif transportun kaybı değerlendirilebilir, ya da mitokondrial membran potansiyelindeki değişimler ölçülebilir.(4) Bazı yöntemler ise apoptoz sırasında meydana gelen DNA fragmanlarını saptamada yardımcı olur Ortama dışarıdan eklenen "terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)" aracılığı ile gerçekleşen bu deney, TUNEL deneyi (Tdt Mediated deoxyUridine Triphosphate-biotin Nick-End- Labeling) olarak

adlandırılır. ASM ile apoptoza eşlik eden proteazlar, kaspazlar ve "serine" proteazların aktivasyonu ölçülebilmektedir.

### 1.5 Çoklu İlaç Direncinin (MDR) Tesbit Edilmesi

MDR, hematolojik malinitelerde kemoterapiye yanıt alınmamasının önemli sebeplerinden biridir. MDR nin p-glikoprotein(p-gp) olarak bilinen ATP-bağımlı bir ilaç pompasının etkisiyle ortaya çıktığı bilinmektedir. P-gp'ye ve ilaç direnci ile ilgili diğer proteinlere yönelik çeşitli antikolar (MDR1 çeşitli klonları, LRB1, MRP) kullanılarak MDR varlığı hakkında bilgi alınabilir. Ancak bu proteinlerin normal hücrelerde de bulunabilmesi değerlendirmeyi zorlaştıran bir faktördür . Pgp fonksiyonun Rhodamine 123, Hoescht gibi floresan veren substratların hücre içine alınıp/dışına atılmalarına bağlı görülen floresan sinyal değişiklikleri ile takip edilmesi fonksiyonel bir ölçüm olduğundan MDR tesbiti için daha duyarlı ve özgün olduğu kabul edilir. Bu konu ilgili konuşmacılar tarafından ayrıca işlenecektir.

### 1.6 Hücresel İmmun Yanıtın Belirlenmesi

Çeşitli hematolojik malinitelerde tümör antijenlerine karşı mevcut olan ya da geliştirilen hücresel yanıtın ölçülmesi önem taşır. Bu şekilde tümör aşuları gibi çeşitli tedavi uygulamalarının sonuçlarını değerlendirmek de mümkündür. Üzerinde en çok çalışılan malinitelerden biri KML olup; peptid bağlayan tetramer ya da pentamer yapısında HLA kompleksleri kullanılarak bcr-abl peptidlerine reaktif T hücrelerin kantitatif tayini mümkün olmaktadır. AML, MM ile ilgili benzer çalışmalar mevcuttur. AML blastlarında WT1, proteinaz3 kaynaklı peptidlere karşı immün yanıtın artmış olduğunu; Miyelomda ise viral antijenlere karşı yetersiz immün yanıt oluştuğunu destekleyen veriler vardır.

Bir diğer uygulama alanı da minör doku antijenlerine (mHags) özgün sitotoksik hücre kullanımınıdır. Kök hücre naklinden sonra görülen relaps olgularında minor doku antijenlerine özgün Sitotoksik T lenfositlerin verilmesi ile bu antijenler aracılığıyla antilösemik etki sağlanabilmektedir. ASM, oluşan bu yanıtların takibi için iyi bir araçtır.

Antijenik bir uyarana karşı gelişen hücre proliferasyonunun CFDA gibi bir florokrom aracılığı ile takibi de mümkündür. Bölünen bir hücrede her bölünme floresan miktarında azalmaya sebep olacaktır. Bu yöntemle ardışık 5-6 bölünme takip edilebilir.

Antijenik bir uyarıyı takiben T hücrelerdeki hücre içi sitokinlerin ASM ile tayini oluşan immun yanıtın tipi hakkında yararlı bilgiler sağlayabilir. Bu çalışmaların aktivasyonu takip eden hangi zaman diliminde yapıldığı, kullanılan yöntemler, kontrol için seçilen hücreler ve yöntemler alınacak sonuçlar üzerinde doğrudan etkili olduğundan iyi planlanarak kullanılması gerekir.

Uyarılan hücrelerin fenotipinde meydana gelen değişikliklerden yararlanarak 4-18 saatlik bir antijenik uyarıyı takiben yanıtın değerlendirilmesi mümkündür. Bu amaçla en sık kullanılan antikolar CD69, CD25, CD40L antijenlerine yönelik olanlardır.

Sitotoksitenin, hücre yüzeyinde beliren CD107a/b, salınan granizim B/perforinin floresan işaretli antikolar kullanarak ölçülmesi de mümkündür.

### 1.7 Trombosit Çalışmaları

ASM kullanarak trombositlerin klinik önem taşıyan hemen hemen tüm fonksiyonlarının ölçülmesi mümkündür. ASM ile trombositlerin (1)Düşük değerlerde bile doğru sayımı, (2)yapım hızlarının değerlendirilmesi, (3)dolaşımdan uzaklaşmalarının takibi, (4) tam kandaki agregasyonları, (5) Aktivasyonlarının takibi belirlenebilir Aktivasyona bağlı glikoprotein (gp)IIb/IIIa reseptördeki şekilsel değişim, granül salınımı ile açığa çıkan öğeler, diğer hücreler ile etkileşimleri ölçülebilir.

Immunplatelet sayımı: Hücreye özgün antijenler kullanarak trombositler sayılabilir ve trombosit sayımı için referans bir ölçüm yöntemi olarak kabul edilmektedir. Böyle duyarlı yöntemler kullanıldığında transfüzyon gereklilik sınırları 10.000/mcl ye kadar inebilmektedir. Antikolarla(ör:CD41) işaretlenen trombositlerle birlikte kandaki diğer hücreler de sayılıp; trombosit/eritrosit oranı belirlenir. Daha sonra kan sayım cihazında elde edilen KK sayım değerleri kullanılarak trombosit sayıları belirlenir.Diğer bir yöntemde ise ortama eklenen floresan boncuklar aracılığı ile birim hacimdeki trombosit sayıları hesaplanır. Hızın yavaş tutulması ve kanın yeterince seyreltilmesi gerekir.

Retiküle Trombositler: Genç trombositleri temsil eden bu hücreler, yüksek RNA içerikleri nedeniyle Thiazol Orange(TO) gibi nükleik asitlere özgün boyalar ile işaretlenip ASM de sayılabilirler. Benzer yöntem retikulositlerin sayımı için de kullanılmaktadır. Retiküle trombositlerin dolaşımdaki

sayısı, trombopoetin uyarımı ile artar, kemik iliği baskılandığında ise azalır. Böylece immun ya da yıkıma bağlı trombositopeniler, kemik iliği yetmezliklerinden ayrılabilir. Ancak adı geçen boyaların plastiğe kolayca bağlanma özellikleri nedeni ile her ölçümden sonra cihaz dikkatle temizlenerek takip eden immunfenotipleme çalışmalarını etkileyecek yabancı sinyaller yaratılmasından kaçınılmalıdır.

Trombositlerin immunfenotiplemesi: ASM ile hücre yüzeyinde anormal glikoprotein ekspresyonundan yararlanarak Glanzmann's trombastenisi ( CD41/CD61 eksikliği), Bernard Soluier sendromu(CD42a/CD42b eksikliği) gibi bazı genetik trombosit hastalıklarının tanınması mümkündür.

Trombositlerdeki "dense" granüllere giren mepakrin gibi floresan boyaları kullanarak; depolama defektlerinin saptanması, granül salınımının takibi mümkündür.

Trombositlere bağlı antikolar(PaIlg): ELISA yöntemlerine göre daha az işlem gerektiren ASM ölçümleri, trombositlere bağlı antikoların belirlenmesinde kullanılabilir. Retiküle trombositlerle birlikte kullanıldığında immun trombositopeni ayırıcı tanısında yol göstericidir.

Trombosit Aktivasyonu: Aktive olan trombositlerde (1) Normalde granüllerde bulunan antijenlerin (CD62P, CD63) yüzeye çıktığı; (2) PAC-1, LIBS gibi antijenlerde aktivasyondan sonra meydana gelen şekil değişiklikleri nedeniyle yeni epitoplara açığa çıktığı görülür. İmmunfenotipleme ile bu değişikliklerin saptanması mümkündür. Sağlıklı sonuçlar elde edilmesi için örnekleme ile analiz arasında geçen süre, örneğin doğru hazırlanması önem taşır. Aktifleşen trombositler hızla dolaşımdan uzaklaştıkları için mümkün olduğunca aktivasyon yerine yakın noktalardan örnekleme yapılmalıdır.

Trombositlere özgün yüzey antijenlerini taşıyan ve trombositlerden çok daha fazla trombojenik olan trombosit mikropartiküllerinin tanınması da mümkündür.

### 1.8 Trombosit Ürünlerindeki Lökositlerin Sayımı

Çok sayıda trombosit transfüzyonu yapılan hastalarda anti HLA antikolarının gelişmesinden korunmak için ürün içindeki lökosit sayısının minimal düzeylerde olması istenir. Bu amaçla kantitatif ölçüm yaparak birim hacimdeki lökosit

sayılarını veren kitler geliştirilmiştir. Genellikle RNA'nın parçalanmasını takiben DNA'ya bağlanan florokromlar ile çekirdekli hücrelerin işaretlenmesi prensibine dayalı bir yöntem kullanılır.

### 1.9 Hücre Saflaştırma (SORT)

Kullanılan ilk akım sitometreleri, hücreleri verdikleri ışık sinyalleri esas alınarak karışık bir hücre topluluğu içinden ayırmak üzere (sort) düzenlenmişse de bugün rutin laboratuvarlarda kullanılan akım sitometrelerinin çok azında "sort" etme kapasitesi bulunmaktadır. Akım sitometresinden çok daha hızlı ve kolay olan saflaştırma tekniklerinin (ör: monoklonal antikorlar ile kaplı magnetik boncuklar) gelişmesi de bunda etkili olmuştur. Ancak özellikle hücre üzerindeki bir belirleyici zayıf olduğunda ya da çok parametre kullanılarak daha saf hücre toplulukları elde etmek istendiğinde en iyi seçenek akım sitometresi olmaktadır. Akım Sitometresi ile "sort" edilen hücreler, fonksiyonel analizlerde, hücreye özgün olan DNA sekanslarının PCR ile çoğaltılmasında, Floresan *in-situ* hibridizasyon (FISH) gibi tekniklerin uygulanmasında, transfekte hücrelerin klonlanmasında kullanılabilir. Kromozomların "sort" edilmesi ile DNA veri bankaları için veri toplamak mümkün olabilmektedir. Biz de A:Ü.T.F Hematoloji B. D. Laboratuvarında multipl miyelomla ilişkili FISH uygulamalarından önce kemik iliği örneğindeki plazma hücrelerini saflaştırarak kullanıyoruz.

### 3. Sonuç

Akım Sitometrisi hematolojide yukarıda özetlenmeye çalışılanlar yanı sıra pek çok klinik uygulama ve araştırma alanında daha kullanılabilir. Özellikle moleküler yöntemlerle kombine edilebilecek yeni uygulama alanları ile ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Nadir bulunan malin hücrelerin saflaştırılarak PCR yöntemleri, FISH gibi moleküler teknikler için kullanılması, hibrid teknolojilerinin akım sitometride değerlendirilecek şekilde uygulanması, 8-10 renkli analizlerle fonksiyon-fenotip ilişkilerinin kurulabileceği çeşitli çalışmalar, birer örnektir. Ancak her yöntemde olduğu gibi tekrarlanabilir, karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmek için akım sitometriden yararlanırken standardize edilmiş yöntemlerin kullanılması, cihazın optimum koşullarda kullanılması, periyodik kontrolü, kalibrasyonu şarttır. Elde edilen verilerin multidisipliner değerlendirilmesi elde edilecek yararı büyük ölçüde arttıracaktır.

### Kaynaklar

1. Cherie H. Dunphy, MD Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology Arch Pathol Lab Med—Vol 128, September 2004
2. MI T C H E L L S. WA R D The Use Of Flow Cytometry In The Diagnosis And Monitoring Of Malignant Hematological Disorders, Pathology (1999) 31, pp. 382–392
3. E.G. van Lochem, V.H.J. van der Velden, H.K. Wind, J.G. te Marvelde, N.A.C. Westerdaal, and J.J.M. van Dongen: Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 60B:1–13 (2004)
4. Rogelio Paredes-Aguilera, Lina Romero-Guzman, Norma Lopez-Santiago et al: Flow Cytometric Analysis of Cell-Surface and Intracellular Antigens in the Diagnosis of Acute Leukemia American Journal of Hematology 68:69–74 (2001)
5. Daniela Voskova, Claudia Schoch, Susanne Schnittger Stability of Leukemia-Associated Aberrant
6. Immunophenotypes in Patients With Acute Myeloid Leukemia Between Diagnosis and Relapse: Comparison With Cytomorphologic, Cytogenetic, and Molecular Genetic Findings Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 62B:25–38 (2004)
7. Samir A. Kheiri, Thomas MacKerrell, Vincent R. Bonagura et al: Flow Cytometry With or Without Cytochemistry of Acute Leukemias?, Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 34:82–86 (1998)
8. E. Paietta, O. Goloubeva, D. Neuberger, J. M. Bennett et al: A Surrogate Marker Profile for PML/RAR<sub>α</sub> Expressing Acute Promyelocytic Leukemia and the Association of Immunophenotypic Markers with Morphologic and Molecular Subtypes, Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 59B:1–9 (2004)
9. M. Barbier, B. D. Gray, K. A. Muirhead, X. Ronot et al: A Flow Cytometric Assay for Simultaneous Assessment of Drug Efflux, Proliferation, and Apoptosis Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 59B:46–53 (2004)
10. Renato Bassan, Gemma Gatta, Carlo Tondini Roel Willemze: Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
11. Critical Reviews in Oncology/Hematology 50(2004)223–261
12. Matthew Smith, Michael Barnett, Renato Bassan et al: Adult Acute Myeloid Leukemia Critical Reviews in Oncology/Hematology 49(2004)197–222
13. Ming Chen, DVM; Artemis Chakerian, PhD; David Combs; Kelly Garner, MT(ASCP); David S. Viswanatha, MD Post-PCR Multiplex Fluorescent Ligation Detection Assay and Flow Cytometry for Rapid Detection of Gene-Specific Translocations in Leukemia Am J Clin Pathol 122(5):783–793, 2004.
14. Jun-ichi Nishimura, Yoshiko Murakami, and Taroh Kinoshita: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: An Acquired Genetic Disease American Journal of Hematology 62:175–182 (1999)

15. Ming Chen, DVM; Artemis Chakerian, PhD; David Combs; Kelly Garner, MT(ASCP); David S. Viswanatha, MD Post-PCR Multiplex Fluorescent Ligat-ion Detection Assay and Flow Cytometry for Rapid Detection of Gene-Specific Translocations in Leuke-mia *Am J Clin Pathol* 122(5):783-793, 2004.
16. Wolfgang Kern, Alexander Kohlmann, Christian Wuchter et al: Correlation of Protein Expression and Gene Expression in Acute Leukemia *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 55B:29-36 (2003)
17. Anna Guarini, Gianluca Gaidano, Francesca Romana Mauro, Daniela Capello et al Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features *BLOOD*, 102( 3) 2003
18. J. Ford\*, P.G. Hoggard, A. Owen et al: A simplified approach to determining P-glycoprotein expressi-on in peripheral blood mononuclear cell subsets *Journal of Immunological Methods* 274 (2003) 129- 137
19. Kiyoyuki Ogata, Chikako Satoh, Hideya Hyodo et al: Association between phenotypic features of blasts and the blast percentage in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes *Leukemia Research* 28 (2004) 1171-1175
20. Thomas Rasmussen Lene M. Knudsen Tuan K. Huynh Hans E. Johnsen: Molecular and Clinical Follow-Up after Treatment of Multiple Myeloma *Acta Haematol* 2004;112:105-110
21. A. Stacchini, A. Demurtas, L. Godio, G. Martini, V. Antinoro, and G. Palestro Flow Cytometry in the Bone Marrow Staging of Mature B-Cell Neoplasms *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 54B:10-18 (2003)
22. Marc Maynadie', Franc,oise Picard, Bernard Hus-son, Bernard Chatelain, Yvan Cornet et al Immu-nophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes *BLOOD*, 1 OCTOBER 2002 \_ VOLUME 100, NUMBER 7
23. Steven J. Kussick, MD, PhD; Brent L. Wood, MD, PhD Four-Color Flow Cytometry Identifies Virtually All Cytogenetically Abnormal Bone Marrow Samples in the Workup of Non-CML Myeloproliferative Disor-ders *Am J Clin Pathol* 120(6):854-865, 2003
24. Alan D. Michelson, Marc R. Barnard, Lori A. Kru-eger et al: Evaluation of Platelet Function by Flow Cytometry *METHODS* 21, 259-270 (2000)
25. Andreas Thiel and Alexander Scheffold Antigen-spe-cific cytometry: The Monitoring of Immune Respon-ses and Immunopathology *ISAC 2004 Tutorial IV*
26. Indra Ramasamy. Inherited Bleeding Disorders: Disorders of Platelet Adhesion and Aggregation *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49(2004)1-35