

AKIM SİTOMETRİ UYGULAMALARI

¹Klara Dalva, ²Zafer Gülbaş

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

²Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı, Eskişehir

1. Giriş

Bu yazımızda Akım sitometri(ASM) uygulamaları ile ilgili öncelikle temel bilgilerin verilmesi hedeflenmiştir. Akım sitometri prensibi hakkında kısa bilgi verildikten sonra; örnek toplama/taşıma, örneklerin saklanması, örnek hazırlık işlemleri, kullanılacak antikorların/reaktiflerin seçilmesi, verilerin toplanması, verilerin analizi/ değerlendirilmesi, verilerin raporlanması, verilerin saklanması ve kısaca hematolojideki uygulamaları konusunda bilgi verilecektir.

Akım sitometresindeki analizler için hücrelerin sıvı içinde süspansiyon halinde bulunması gerektiğinden kan hücreleri, akım sitometride en çok incelenen hücreler olmuştur. Solid dokular ise hücreler disaggrege edilip hücre süspansiyonu hazırlanarak akım sitometrik analizde kullanılmaktadır. Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC, PE, PerCP gibi floresan boya ile işaretlenmiştir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin laser ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirilerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir. Hücrelerin taşıdıkları antijenler yanı sıra hücre içi enzimlerin, DNA, RNA miktarlarının da uygun florokromlar ile işaretlenerek belirlenmesi mümkündür. Akım sitometrik incelemede farklı florokromlar ile işaretlenen hücreler, basınç altında "flow cell" denilen kısımdan geçerler ve burada laser ışınına maruz kalırlar. Hücrelerin üzerine bağlanan monoklonal antikorlar laser ışınına absorbe ederek üzerlerindeki florokromun özelliğine göre farklı dalga boylarında ışın saçarlar, her hücreden saçılan ışınlar çoklu dedektörler yardımı ile her hücre için ayrı ayrı belirlenir ve bu bilgiler bilgisayar ortamına aktarılır. Florokromların saçtığı ışınlar yanı sıra, hücreye çarpıp ileri doğru saçılan ve hücrenin büyüklüğü ile ilgili olan laser ışınları (FSC) hücreden 90° açıyla yana saçılan ve hücrenin granülaritesi/kompleks yapısı ile ilgili olan ışınlarla (SSC) ilgili veriler de aktarılmaktadır. Her hücre ile ilgili depolanan tüm bilgiler, analiz için hazırlanmış programlar yardımıyla bir çok parametreyi bir arada değerlendirecek şekilde analiz edilir.

2. Örnek

Akım Sitometrik inceleme için perifer kan örneği yanı sıra kemik iliği aspirasyonu/biyopsi örnekleri, lenf nodu, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveolar lavaj, ya da mesane irrigasyon materyalleri, hücre kültürlerinden toplanan hücreler örnek olarak kullanılabilir. Akut lösemilerin immunfenotipik değerlendirmesi için kemik iliği aspirasyonu (KİA) örnekleri tercih edilmelidir.

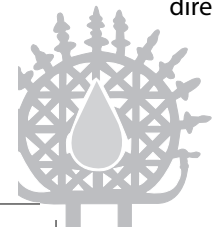
2.1 Örnek toplama / taşıma

2.1.1 Hasta bilgileri

Laboratuvara örnek gönderirken hasta bilgilerini içeren bir formun örnekle birlikte laboratuvara iletilmesi gerekir. Bu formda: Hastaya ait kimlik bilgileri, ön tanı, yaş, cinsiyet, kullanılmakta /kullanılmış olan tedaviler (kemoterapi, radyoterapi gibi), örneğin alındığı tarih ve saat, istemi yapan hekimin kimliği ve örneğin tipi mutlaka belirtilmelidir. Kan sayım değerleri, hücrelerin periferik kandaki dağılımı, lenfadenopati, organomegali varlığı/yokluğu hakkında bilgilerin bulunması da daha sonra yapılacak değerlendirmeler için yararlı olacaktır.

2.1.2 Örnekler

Tüm örnekler aseptik koşullarda toplanmalıdır. Ayrıca belirtilmemiş olsa da tüm örnekler (kan, kemik iliği aspirasyonu materyali, plevral sıvı, asit mayi, beyin omurilik sıvısı...) potansiyel enfeksiyon kaynağı olarak kabul edilmelidir. Örneklerin alınır alınmaz laboratuvara ulaştırılması gerekir. Örnekler başka bir merkeze gönderilecekse boyanmış bir yayma veya doku imprint örneğinin de referans olarak incelenecek örneğin yanına eklenmesi gerekir. Kemik iliği aspirasyonu materyali incelenecek ise örneğin sinus kanı ile seyrelmiş olup olmadığını değerlendirebilmek için periferik kan örneği ve KİA örneğinden yayma yapılarak karşılaştırılmalıdır. Minimum 2 ml periferik kan ve Kİ örneği, 1 ml aferez örneği, 1 ml BOS gönderilmelidir. BOS sıvısının ve mesane irrigasyonu sıvısının eşit miktarda RPMI-1640 içeren bir ortama koyularak, steril bir kap içinde 2-8° C de laboratuvara gönderilmesi önerilir.



2.1.3 Kullanılan antikoagülan

Perifer kan örnekleri için etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), heparin(50 U/mL) veya asit sitrat dekstroz(ACD-A), kullanılabilir. Eğer gelen örnekten morfolojik değerlendirme için yayma hazırlanacaksa EDTA'lı örneklerin kullanılması uygun olur. Beyaz küre sayımlarının örnek alındıktan sonraki ilk 6 saat içinde yapılması gerekir. EDTA kullanımının bir dezavantajı kan bekledikçe ısık saçılım özelliklerinin (FSC, SSC) daha çabuk bozulmasıdır. EDTA'lı örneklerin bir avantajı ise olgun miyeloid hücrelerin tübün çerperine daha az yapışması, trombosit agregatlarının daha az görülmesidir. Altı saatten fazla beklemiş EDTA lı örneklerin Ficoll ile ayırımında nötrofil, eritrosit kontaminasyonu riski artmaktadır. Kİ örnekleri için kullanılacak antikoagülan için kesin bir tanımlama bulunmasa da heparin ya da ACD-A kullanılabilir. Effüzyon örnekleri lösemi-lenfoma fenotiplemesi için gönderilecekse 10 ünite/ml prezervatifsiz heparin içerecek şekilde örnek alınmalı ve effüzyon kadar RPMI-1640 eklenerek 2-8°Cde taşınmalıdır. Diğer vucut sıvıları için EDTA/heparin/ACD-A kullanılabilir. ACD-A lı örneklerin tüm gece bekletilmesi de canlılığın kaybına sebep olabilir, hücrelerin bekletmekle bozulmadığına dair yeterli veri bulunamamıştır. Bazı hücre yüzey markerlarının kaybolmaması için kalsiyum varlığı gerekli olup EDTA veya ACD-A risk yaratabilir, sodyum heparin önerilir. Aferez örneği için de sodyum heparin önerilir. Özel çalışmalar için seçilecek antikoagülan rutinde kullanılan farklı olabilir; örneğin hücre içi sitokin ölçümlerinde prezervatifsiz heparin kullanılmalı, Ca⁺⁺ bağlayıcı ajanlardan kaçınılmalıdır. Trombosit aktivasyonunun belirlenmesi hedeflendiğinde ACD-A lı kan örnekleri alınarak trombositlerin saflaştırılması ve tespit edilmesi gerekir, bu amaçla kullanılacak ticari ürünler mevcuttur.

2.1.4 Örnek tüplerinin işaretlenmesi

Tüplerin üzerinde mutlaka hastanın tanınacağı bir kod yanı sıra örneğin tipi ve alınma zamanı (özellikle kemoterapi ve radyoterapi alan hastalarda önemli), özellikleri (ör: KİA /PK) hakkında bilgiler bulunmalıdır. Birden çok tübe alınarak gönderilen örneklerde ilk aspirasyonun hangi tübe yapıldığı mutlaka belirtilmeli, tüpler sırasıyla numaralandırılmalıdır.

2.1.5 Örneklerin taşınması: Tüm örnekler enfeksiyon ajanı taşıdığı varsayılarak paketlenip taşınmalıdır. Taşıma amacıyla polipropilen tüp/şırıngalar kullanılmalıdır, hücrelerin tüplerin çerperine yapışabilmesi nedeniyle polisteren malzemenin kullanılmaması gerekir. Taşıma işlemi oda sıcaklığında yapılmalıdır. Mümkün olduğunca örnekleme yapıldıktan hemen sonra, örnekler işleme alınmalıdır. Beklenmesi zorunlu olan durumlarda örnekler +4°C de saklanabilir (tercihan yatay durumda). Bu durumda laboratuvarların beklemiş örneklerin beklememiş olanlar ile aynı sonucu verdiğiinden emin olmaları (daha önceden bunu kanıtlamış olmaları) gerekir. Lenf nodu, tümör dokusu, dalak gibi örnekler RPMI-1640

gibi bir kültür vasatı içinde ve tercihen 2-4°C de taşınmalıdır. Radyoaktif materyal içeren örnekler kabul edilmemelidir.

2.2 Örnek hazırlık işlemleri

Materyalde incelenmesi hedeflenen hücre sayısının düşük olduğu biliniyorsa (örnek: minimal residüel hastalık takibi) hücre kaybına sebep olan işlemlerden kaçınılmalıdır.

2.2.1 Örneklerin gözle değerlendirilmesi

Örneklerle ilgili karşılaşılabilecek 2 tip problem vardır:

- Örneğin bozulduğunu gösteren belirtiler vardır; örnek rededilmelidir.
- Örneğin yanlış işlem gördüğünün belirtileri vardır, yapılan yanlışlıklar kayda alınmalıdır

Hemoliz: eritrositlere hasar veren bir işlemin lökositlere de zarar vermiş olma olasılığı yüksektir.

Pıhtılı kan/KİA örneği: Ufak pıhtılar hücre kaybına sebep olsa da hedef hücrelerin yeterince bulunması ve yeni örnek almanın mümkün olmaması durumunda çalışma sürdürülebilir. Gözle görülür belirgin pıhtıların bulunması durumunda örnek rededilmelidir.

Eksik miktarda örnek alınması: özellikle ACD-A kullanılan durumlarda antikoagülan miktarının istenenden fazla olması hücrelerde hipertonic koşullardan kaynaklanan hasara sebep olabilir.

Laboratuvara gelen örneklerin ısı kontrol edilmelidir(donma/aşırı ısınma?). anormal bir gözlem mutlaka kaydedilmelidir.

Etiketleme işlemi hatalı olan örnekler kabul edilmemelidir.

2.2.2 Eritrositlerin uzaklaştırılması/hücrelerin seçilmesi

Uygulanan her işlem hücre kaybı riskini arttıran bir faktördür. Kan/Kİ örneklerindeki eritrositleri uzaklaştırmak için Tris ile tamponlanmış amonyum klorür ya da hipotonik solusyonlar, ticari preparatlar eritrosit lizis solusyonu (ELS) olarak kullanılabilir. Ticari preparatlar kullanılırken üreticinin talimatlarına (seyreltme oranı, kullanılacak miktar, beklenecek süre...) sadık kalınması gerekir. Bir diğer yöntem dansite gradienti kullanarak hedeflenen hücrelerin diğerlerinden ayrılmasıdır. Bu işlem daha uzun sürmesi, hücre kayıplarına sebep olabilmesi nedenleriyle tercih edilmeyebilir. Özellikle lösemik kan örneklerinde hücrelerin eritrositleri uzaklaştırmakta kullanılan solusyonlara toleransının farklı olabileceği bilinmelidir.

Doku biyopsisi ya da ince iğne aspirasyon materyallerinin laboratuvara tespit edilmeden taze olarak ulaştırılması ge-



rekir. Biyopsi örnekleri, steril ortamda, fizyolojik serum ile ıslatılmış gazlı bez içinde, oda ısısında taşınabilir. Hücreleri serbestleştirmek için dokuyu kesmeden önce yağ, bağ doku, normal dokular patolojik olan örnekten uzaklaştırılmalıdır. İncelenecek doku örneği, içinde hücreleri besleyen bir ortam bulunan (ör; RPMI 1640, +4°C) plastik bir petri kutusuna alınarak; mekanik olarak parçalanır (bistüri ile keserek) ve naylon filtreler kullanılarak süzöldükten sonra işleme devam edilir. Hücreleri serbestleştirmek için enzimler de kullanılabilir ancak kullanılan enzimin incelenecek antijenik epitoplarda hasara/değişikliğe sebep olmadığı kanıtlanmış olmalıdır. İnce iğne aspirasyonu ile elde edilen materyalin hemen besleyici bir ortama koyulup laboratuvara iletilmesi gerekir.

2.2.3 Hücre konsantrasyonunun ayarlanması

Üreticiler monoklonal antikorların hangi hücre miktarları için hangi konsantrasyonlarda kullanılması gerektiğini tanımlamış olsalar da bu değerler genellikle normal hücreler düşünülerek hesaplanmıştır, lösemik hücreler istisna oluşturabilir. Hücre sayısının optimum değerlerin çok üstünde olması durumunda hücrelerin yüzeyindeki antijenik determinantların hepsi, hedef antikor ile reaksiyona giremeyeceğinden yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir. Hücre sayısının çok yüksek olması, veri toplanması işleminde cihazın tıknasına da sebep olabilir. Her laboratuvar kendi kriterlerini belirlese de aşağıdaki değerler yol gösterici olabilir.

(1): Beyaz Küre değerleri (BK) < $1 \times 10^9/L$ ise 200 L kan ile başlanıp; ELS miktarı buna göre artırılır (2): $1 \times 10^9/L < BK < 10(20) \times 10^9/L$ iken 100 L kan ve standart miktarlarda ELS kullanılır. (3): $BK > 10(20) \times 10^9/L$ iken 50 L kan kullanılır veya kan örneği fosfatla tamponlanmış serum fizyolojik (PBS, pH:7.2) ile 2. maddede yer alan konsantrasyonlara gelecek şekilde seyreltilerek kullanılır. Kemik iliği örnekleri kullanılırken örneğin PBS ile seyreltilmesini takiben (genellikle 1/10 oranında) BK sayımının yapılması ve yukarıdaki oranlar doğrultusunda çalışmanın kurulması önerilir. Dansite gradienti ile ya da hücre kültüründen toplanan hücreler kullanılmadan önce yoğunlukları $1-5 \times 10^6/mL$ olacak şekilde ayarlanır, antikorlar üreticinin önerdiği konsantrasyonlarda kullanılır.

2.2.4 Hücre canlılığının gösterilmesi

Canlı olmayan hücreler non-spesifik olarak antikorları bağlayabileceğinden çalışmaya başlamadan önce hücre canlılığının (viyabilite) belirlenmesi gerekir. Bu amaçla tripan mavisi gibi vital boyalar, Propidyum iyodür ve 7-aminoaktinomisin D (7AAD) gibi floresan veren boyalar kullanılabilir. Seçilen boyaya göre sırasıyla göz ile ışık mikroskopunda veya akım sitometresinde değerlendirme yapılır. Bu çalışmalardan önce örneklerin tesbit edilmemesi gerekir, kullanılacak boya konsantrasyonlarının da laboratuvar tarafından test edilerek uygun olduğunun doğrulanmış olması gerekir.

2.2.5 Fc reseptörler aracılığı ile gerçekleşen özgün olmayan antikor bağlanmasının engellenmesi

Bazı lösemik hücrelerin normalin çok üstünde Fc reseptörü taşıması nedeniyle görülen spesifik olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için, bu reseptörlerin, ortama antikorun eklenmesinden önce genellikle "murine" IgG kullanılarak ($2mg/mL$) kapatılması gerekebilir. Tam kan veya KI örneklerinde plazmada bulunan immunglobulinler bu reseptörleri sature ettiğinden yıkanmamış örnekler kullanılırken Fc reseptör fazlalığı bir sorun yaratmayabilir. Örneklerin önceden yıkandığı durumlarda bu risk mevcuttur. Hücre yüzeyinde immunglobulin düzeyleri belirlenmek istediğinde Fc reseptörlerin murine IgG kullanılarak kapatılmaması gerekir. Özellikle monositik lösemilerde Fc aracılığı ile ortaya çıkan özgün olmayan bağlanmalar her zaman engellenemez. Farklı immunglobulin alt sınıflarının Fc reseptörlere affinitesi farklı olduğundan antikor bağlanması ile görülen reaksiyonların değerlendirilmesinde zorluklar yaşanabilir.

3. Kullanılacak antikorların / reaktiflerin seçilmesi

3.1 Kullanılacak antikor klonunun seçilmesi

Farklı klonlardan kaynaklanan antikorların aynı CD antijenlerine bağlanma performansları farklılıklar gösterir. Örneğin: bazı antikorların epitoplara bağlanması pH'a duyarlı iken kimisinin antijenin glikozile olma durumuna göre bağlanma özellikleri değişebilir; ya da antijendeki genetik bir polimorfizm antijen-antikor bağlanmasında değişikliklere sebep olabilir. Her laboratuvarın kullanacağı klonları, bunların hangi konjugatlarla işaretlenmiş olması gerektiğini dikkatle seçmesi gerekir. Kullanılmasına karar verilen antikorların temininde devamlılığın sağlanması da önemlidir, ancak bu şekilde sonuçların birbirleri ile veya geçmişteki aynı bireyden alınmış olan örneklerle karşılaştırılması mümkün olabilir. Referans laboratuvarların önerdiği antikorlar bu konuda yol gösterici olabilir. Örneğin myeloperoksidaz analizi için sadece aktif olan enzimi değil proenzimi de tanıyabilecek antikorlar seçilmelidir.

3.2 Kullanılacak antikor gruplarının belirlenmesi

Hematopoetik sistemin farklı serilerindeki hücrelerin yüzeyinde o seriye özgün antijenler yanı sıra özgün olmayan antijenler de bulunabilir (Ör: CD45 tüm lokositlerde, HLA-DR " B" lenfosit ve monositlerde bulunur). Lösemik hücreler ile çalışıldığında da bu hücrelerin buldukları seriye özgün antijenleri normal örneklerinden genellikle daha az, nadiren de daha çok bulundurmaları söz konusudur (Örneğin genç miyeloid seri hücrelerinde CD33 ekspresyonu olgun hücrelerinkinden fazladır, malin plazma hücrelerindeki CD38 ekspresyonu malin olmayan plazma hücrelerinkinden zayıftır). Malin hücrelerde antijen kayıpları olabildiği gibi aynı hücrede farklı serilere ait antijenlerin bir arada bulunması da mümkündür. Bu nedenle bir hastalığın köken aldığı hücre



serisini/serilerini tanımlayabilmek için o seriye ve diğer serilere ait pek çok antijenin bir arada izlenebilecekleri panellerin oluşturulması gerekebilir. Tanı için kullanılacak panellere bir kısıtlama getirmek mümkün olmasa da, en sık görülen örnekler temel alınarak bazı panellerin oluşturulması tavsiye edilebilir (Tablo 1).

3.3 Antijenlerin işaretlendiği florokromların seçilmesi

Florokrom seçimi yapılırken verilerin toplanacağı cihazın özellikleri yanı sıra, antijenin hücrede ne miktarda bulunduğu ve hücre içindeki yerleşimi öncelikle önem taşır. Az miktarda bulunan antijenleri boyamak için Phycoerythrin (PE) gibi daha parlak florokromların seçilmesi önerilirken; hücre içi antijenlerin işaretlenmesi için florokrom olarak molekül ağırlığı en az olan Florescein isotiyosyanat(FITC) tercih edilir. Seçilecek florokromların sık sık değiştirilmeyip, verilerin eski tarihlerde yapılan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılması mümkün olmalıdır.

3.4 Negatif Kontrollerin kullanılması

Negatif kontrol kullanmanın amacı hücrelerde otofloresan ya da özgün olmayan bağlanmadan kaynaklanan zemin boyanmasının tesbit edilebilmesidir. Bu amaçla en sık tercih edilen reaktif; incelenen antikor ile aynı Ig alt tipine sahip olan sıçan kaynaklı antikorlardır (izotipik kontrol). Farklı firmaların ürettikleri antikorların verdikleri reaksiyonlar farklılıklar gösterdiğinden farklı üreticilerin ürettiği antikorlar bir arada kullanıldığında aynı izotipik kontrolün tüm reaktifler için kullanılması beklenen performansı sağlayamaz. Otofloresansın değerlendirilmesi için, ortama antikor koyulmadan çalışmanın gerçekleştirilmesi önerilir. Granüllü hücrelerde granülsüz olanlara göre oto floresansın daha yüksek olması beklenir (eozinofillerde nötrofilden çok, miyeloid seride lenfoid seriden daha çok). En iyi kontrolün o seriye ait normal hücreler olduğuna dair görüşler de vardır. Dansite gradienti uygulanmaması; normal ve anormal hücrelerin ve farklı serilerdeki hücrelerin bir arada değerlendirilip karşılaştırılması yarar sağlayacaktır.

3.5 Pozitif kontrollerin kullanılması

Kullanılan yöntemin doğru olduğundan ve sistemin çalıştığından emin olmak için pozitif kontrol örnekleri hazırlanmalıdır. Bu amaçla iki çeşit çalışma yapılabilir. i) Hedef antijeni taşıdığı bilinen bir hücre(referans hücre) test edilen antikor ile reaksiyona sokulur (Bu amaçla en sık CD45, HLA Sınıf I antijenleri kullanılır). ii) İncelenen hücrenin taşıdığından veya reaksiyona gireceğinden emin olduğumuz bir antikor/reaktif panele eklenir. Test edilen hücre ile belli miktarda normal olduğu bilinen hücre karıştırılarak aynı tüpte test edilip; negatifliğin gerçek bir değer olduğu doğrulanabilir. Yanlışlıkla bir tübün içine antikor koyulmaması sebebiyle yalancı negatif sonuçlar alınması sık karşılaşılabilen bir hatadır. Bu

amaçla geliştirilmiş kontrol materyalleri ticari olarak mevcuttur.

Hücre fonksiyonlarını değerlendirirken aranan parametrenin hücrede pozitifleşmesine sebep olan ön işlemler ile pozitif kontrol materyalleri hazırlanabilir. Bu tür işlemler genellikle üreticilerin hazırladığı çalışma sayfalarında tanımlanmıştır.

3.6 Hücre içi antijenlerin belirlenmesi

Hücre içi antijenlerin işaretlenmesi için antikorların ortama eklenmesinden önce uygulanan, delerek geçirgen hale getirme (permeabilizasyon) ve tespit işlemleri antijenik epitopların değişmesine ve antikorların yetersiz bağlanmasına sebep olarak; yalancı negatif sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir. Bu işlemler için öncelikle üretici firmaların önerdiği protokoller denenmelidir. Sonuçların tatmin edici olmadığı durumlarda farklı permeabilizasyon/fiksasyon solusyonları ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılmalıdır. Bu amaçla kullanılabilen malzemeler arasında Triton X100 , Tween20, saponin gibi deterjan bazlı solusyonlar, metanol sayılabilir. Uygulanan reaktifin, uygulama süresi ve ısısının elde edilecek sonuçlar üzerine etkisi olduğundan seçilecek işlemin standardize edilmesi gerekir.

3.7 Hücrelerin tespit edilmesi

İmmunfenotipleme çalışmalarında, hücreler hazırlandıktan sonra veriler cihazda hemen toplanamayacaksa hücrelerin üzerine formaldehid/paraformaldehid solusyonları (%1) eklenerek veri toplama işlemleri geciktirilebilir. Bu şekilde bekleyen hücrelerin 24 saati aşmadan cihazda okunması tavsiye edilir. Özellikle eritrositleri lizise uğrattırırken kullanılan reaktifin içinde belli miktarda fiksatif bulunmadığı durumlarda veri toplama işlemi hızla yapılmalıdır. Örneğin içinde ölü hücrelerin varlığından şüpheleniliyorsa (ör KIA) içinde fixatif bulunan ELS'ler kullanılmamalıdır. Özel çalışmalarda örneklerin hazırlandıktan hemen sonra bekletilmeksizin okunması gerekir. (Ör: CD34+ hücre sayımı ya da diğer hücre sayımı yapılan çalışmalar, apoptoz tayini, hücre içi sitokin ölçümü, DNA ploidi analizi...)

4. Verilerin toplanması

4.1 Cihazın hazırlığı/kalibrasyon

Cihaz üreticinin önerdiği şekilde okuma yapmaya hazır hale getirildikten sonra cihazın optik duyarlılığı ve doğrusallığı kontrol edilmelidir. Bu amaçla genellikle floresanla işaretli olan/olmayan boncuklar kullanılır (Ticari olarak mevcut). Bu materyaller kullanılarak cihazda ölçülecek her parametre için (ışık saçılımı ve floresan ölçümleri) performansın yeterli olduğunun ve bir sapma olmadığının gösterilmesi gerekir. Sapma görülmesi halinde önce sebebi araştırılır, tesbit edi-



lebilen bir sebep varsa giderilir, sorun tekrarlıyorsa, teknik servisten yardım istenir ya da kullanıcı deneyimli ise gerekli bazı düzeltmeleri kendisi yapabilir. Örneğin cihaz yeni açıldığında okumada kullanılacak tamponun (sheat fluid) bulunduğu tankın iyi kapatılmamış olması, sistemin içinde hava bulunması, elde edilen piklerin geniş olmasının en sık görülen nedenidir. Bu çalışmaların sonucu mutlaka kayda alınarak gerektiğinde değerlendirilmek üzere saklanmalıdır. Floresan ölçümünde kullanılan ayarların kalibrasyonu yanı sıra farklı florokromların birbirlerinden nasıl etkilendikleri de kontrol edilmelidir. Çeşitli florokromların verdikleri sinyaller birbirleriyle çakışabilir (overlap). Bu sebeple ortaya çıkan ve verilerin değerlendirilmesinde yalancı sonuçlar üretilmesine sebep olan bu durumun kompanze edilmesi gerekir. Kompanzasyon için genellikle kullanılmakta olan florokromlar ile işaretlenmiş boncuklar kullanılsa da deneyimli kişiler, hücreler ile de bu ayarlamaları yapabilir. Hücreler ile kalibrasyon yapılacak ise ayarların az sayıda bulunan parametreleri de gösterebilecek şekilde yapılması özellikle önem taşır. Dikkat ve emek gerektiren kompanzasyon işlemleri, sadece ehil ellerde ve gerektiğinde yapılmalıdır.

Cihazdaki atık tankının içine hipoklorit eklenerek biyolojik aktif materyallerin inaktive edilmesi sağlanmalıdır (0.7 M sodyum hipoklorit solusyonu 1/10 seyreltilerek kullanılabilir).

4.2 Verilerinin toplanmasından önce gerekli ayarlar/kontroller

Verilerin toplanıp hafızaya alınmasından önce cihaz "set-up" modunda iken hücreler, cihaza verilerek dağılımları kontrol edilmelidir. İncelenecek tüm hücrelerin ekranda görülebilmesi gerekir. Bu amaçla ışık saçılımı ile ilgili parametrelerde gerekli değişiklikler yapılabilir. Örneğin trombositler ve retikulositler ile lökositlerin çok farklı boyutlarda olmaları nedeniyle bu hücrelerin aynı ayarlarda okunması mümkün değildir. Sinyallerin linear ya da logaritmik bir skala kullanarak izlenmesi ile bu sorun giderilebilir. Lökositlerle yapılan çalışmalarda FSC ve SSC parametrelerinin değerlendirilmesinde linear bir skalası bulunan grafiklerin kullanılması uygun olsa da trombosit ve retikulositlere ait veriler toplanırken logaritmik bir skala seçilmelidir. Örnekte çok büyük hücrelerin bulunması durumunda FSC sinyalinin amplifikasyonu için kullanılan değer biraz azaltılarak tüm hücrelerin görüş alanına girmesi sağlanabilir. DNA ploidi analizi gibi özel testlerde ölçülecek sinyallerin optimum analizi için ilgili floresan kanalındaki sinyallerin immunfenotiplemeden farklı olarak logaritmik değil linear skalada izlenmesi, hücre akış hızının minimumda tutulması gerekir (incelenecek parametrelerin geniş bir dağılım göstermesi beklenen durumlarda, ör: hücre yüzey antijenlerinin tanımlanması, logaritmik modda okuma yapılması gerekir). Bu ayarları, kılavuzlarda yer alan bilgiler ışığında ve deneyerek bulmak gerekebilir, önemli olan incelenecek hücrenin fiziksel özelliklerinin iyi bilinme-

sidir. Gerekli ayarlamalar yapıldıktan sonra (hedef hücreler görülüyor, debri minimal) sadece hedef hücrelerden kaynaklananların değil, tüm verilerin hafızaya alınması gerekir. Seçim işlemi, veri toplanırken değil veri analiz edilirken yapılmalıdır. İmmunfenotipleme işlemleri için lökositler ile çalışılırken içinde CD45 antikorlu ile işaretlenmiş hücreler bulunan tüp, hücrelerin toplanması için yapılan ayarlama en sık kullanılan örnektir. Normal örneklerle çalışırken seçilen ayarlar ile CD45 taşıyan tüm hücrelerin verilerinin toplanabilmesi gerekir. B-ALL durumunda bazı lenfositlerde, plazma hücrelerinde, ve bazı diğer malin hücrelerde CD45 ekspresyonu bulunmayabileceğinden, ayarlamalar yapılırken FSC-SSC parametrelerinin izlendiği nokta grafiklerinde tüm lenfosit ve granülositlerin görüş alanı içinde olması, ayarlar nedeniyle görüntüde kayıp oluşmaması sağlanmalıdır.

4.3 Verisi toplanacak hücre sayısı

İmmun fenotiplendirme işlemleri için 10×10^3 çekirdekli hücrenin verilerinin toplanması önerilir. Ancak değerlendirilecek hücrelerin çekirdekli hücreler içindeki oranı düşük ise (ör lenfosit alt grupları incelenecek, lenfopeni mevcut) en azından $1-2 \times 10^3$ hedef hücre toplayacak şekilde incelenecek hücre sayısının artırılması gerekir. CD34 hücre sayımında güvenilirliği arttırmak için en az 60-100 bin hücre toplanana dek sayım yapılması uygun olur. Minimal residüel hastalık tesbiti veya seyrek görülen hücrelerin (ör: endotelial hücreler) aranması durumunda sayılan hücreler $0.5-1 \times 10^6$ 'ya dek arttırılabilir.

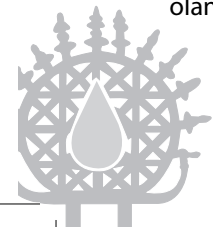
5. Verilerin analizi/değerlendirilmesi

Akım sitometresinden elde edilen verilerin klinik değeri olan veriler haline getirilmesi için ard arda uygulanması gereken işlemler vardır

- i. İncelenecek hücre grubunun seçilmesi (Kapı alma),
- ii. Bu hücrelerdeki incelenen parametrenin (fenotipik özellikler/canlılık/DNA miktarı .) değerlendirilmesi ve raporlanması,
- iii. Verilerin klinik önemini özetleyen bir değerlendirmenin yapılması gerekir.

5.1 İncelenecek hücrelerin seçilmesi

Öncelikle hiçbir hücre grubu seçilmeden antijen dağılımları kontrol edilir. Bu amaçla 2 parametrenin birlikte değerlendirilebileceği nokta grafikler (Dot plot) kullanılır; gerekirse tek parametrenin takip edilebileceği histogramlar kullanılabilir. İki parametrenin birlikte değerlendirilmesi anormal hücrelerin tanınması için önem taşır. (Mümkünse kurulan çalışmalar en az 3-4 parametre bir arada değerlendirilecek şekilde planlanmalıdır).



Hücreler büyüklük ve granüler yapılarına göre, floresan özelliklerine göre gruplanabilir. Her tüpte farklı bir parametre/antijen test edilmiş olduğundan bu gruplamanın her tüp için kullanılması mümkün olmaz. Bu amaçla genellikle CD45 antikor ile işaretleme yapılan tüp kullanılarak, CD45-SSC/ CD45-CD14 dağılımındaki verilerden de yararlanarak hücreler FSC-SSC grafiğindeki dağılımlarına göre gruplanır (gate=kapı almak). FSC-SSC grafiğinde genellikle lenfositler ve blastlar, monositler ve farklılaşma göstermiş genç miyeloid hücreler, nötrofiller ve eozinofiller birlikte dağılırlar (şekil 1, 2). Ancak özellikle lösemik hücrelerin bulunduğu bir örnekte FSC-SSC dağılımı ile normal ve anormal hücreleri birbirinden sağlıklı bir şekilde ayırmak mümkün olmaz. Anormal hücrelerin yeterince fazla olmaması durumunda her tübe CD45 antikorumun eklenmesi ile daha sağlıklı bir değerlendirme yapılması mümkün olur (Maliyeti çok arttırsa da kullanılması gerekebilir).

5.2 Antijen ekspresyonlarının analizi

Hücrelerin taşıdıkları antijenler ve bunların yoğunluğu, onların kaynak aldıkları hücre serisi ve olgunlaşmaları ile ilgilidir. Bir antijenin bulunduğunu ifade etmenin yolu negatif kontroller yardımı ile bir eşik değer belirleyerek bu değer üstünde sinyal veren hücre oranlarının bildirilmesidir. Eşik değeri, her florokrom için ayrı ayrı belirlenmelidir. Hücre içi parametrelerin incelendiği durumlarda uygulanan ön işlemler nedeni ile hücrelerin granüllerini kaybedebilmesi nedeniyle FSC-SSC dağılımlarında değişiklik olabileceğinden bu parametreleri değerlendirirken hücre gruplarının dağılımında oluşan değişiklikler FSC-SSC grafiklerinden mutlaka kontrol edilmeli ve gerekli ayarlamalar yapılmalıdır.

Antijen taşıyan hücrelerin oranı kadar, farklı hücrelerin bu antijeni farklı yoğunluklarda taşıması da önem taşır, bu veriler ile hücrenin kimliği, maturasyonu hakkında fikir sahibi olunabilir. Bu amaçla kullanılacak referans boncuklar, objektif bir değerlendirme sağlar, ancak bu boncukların kullanılması özel araştırmalarla sınırlı kalmaktadır. Rutin çalışmalar için genellikle "Mean Fluorescent Intensity" (MFI) değerleri kullanılarak karşılaştırmalar yapılmaktadır.

DNA ploidi çalışmalarında test edilen hücreler yanı sıra mutlaka normal hücreler ile karıştırılmış bir örneğin de analiz edilmesi ve DNA indeksi belirtilirken bu normal hücrelere göre görülen sapmaların dikkate alınması gerekir. İncelenecek örnekteki patolojik hücre oranlarının bilinmesi de bir iç kontrol sağlayacağından önem taşır

5.3 Sonuçlar raporlanmadan önce yapılan çalışmanın kalitesinin değerlendirilmesi:

i. Örnekteki normal hücrelere bağlanan antikorlar kontrol edilerek parametrenin doğru çalıştığı değerlendirilebilir. Örneğin Pan T antijenlerden CD3, CD5, CD7, (CD2), benzer oranlarda bulunmalıdır, CD33 parlak hücreler ile

CD14 parlak+ hücre oranları monositleri göstermekte olup, oranları benzer olmalıdır.

- ii. Bulunan değerler toplanarak beklenen toplama ulaşılmadığı kontrol edilebilir: Örneğin CD3+ ve CD4+ hücrelerle CD3+ ve CD8+ hücrelerin toplamı CD3+ hücrelere yakın /eş olmalıdır ya da incelenen lenfositler için bulunan T , B, NK hücre oranları toplandığında %100 değerine ulaşılmalıdır, ulaşılmıyorsa katkısı olan bir başka hücre grubunun (örneğin blastlar) veya hücre seçiminde kullanılan parametrelerdeki bir sapmanın kontrol edilmesi gerekir.
- iii. Örnekte çok sayıda debri bulunması analizi zorlaştırabilir, eşik değerlerinin belirlenmesinde veya yüzdelerin belirlenmesi için eşik değerlerine göre yerleştirilen çizgilerle oluşan kadranslar kullanılırken daha esnek yaklaşımlar gerekebilir.

Not: Örnek içi kontroller yanı sıra mutlaka eksternal kalite programları kullanılarak genel performans hakkında bir değerlendirmenin yapılması önem taşır. Bu programlar, pek çok kullanıcının deneyimlerini de paylaşılabilecekleri ve başkalarının çalışmalarından sonuç çıkarılabilecek değerleri verilere ulaşmamızı sağlamaktadır.

6. Verilerin raporlanması

Laboratuvar için hazırlanan raporda teknik bilgilerin yer alması; doktor raporlarında ise elde edilen sonuçların, hücre gruplarının ve bu hücre gruplarında normal/matür eş değerlerine göre görülen sapmaların özetlenmesi gerekir. Sonuçlar ifade edilirken farklı laboratuvarlardan gelen sonuçlar ile karşılaştırma yapılabilecek bir format kullanılmasına dikkat edilmelidir.

6.1 Laboratuvar raporları

Örneğin özellikleri, teslim alınma/çalışma/veri toplanma saatleri, sonuçları etkileyebilecek bir durumun varlığı, beklemiş örneklerde viyabilite(canlılık) oranları not edilmelidir. Örneklerin hangi ayarlarda okunduğu hangi hücre gruplama stratejilerinin ve gruplarının kullanıldığına dair verilerin raporda bulunması gerekir. Bu amaçla "list mode" veriler de uzun süreli saklanmalıdır. Analiz için kullanılan gruplar(gate), eşik değerler ve antijen dağılımlarını gösteren yazılı materyal, rapora birlikte saklanmalıdır. İşlemleri uygulayan teknik elemanın çalışılacak panellere, varsa yapılan değişikliklere karar veren kişi(ler)nin kayıtları da raporda yer almalıdır.

6.2 Doktor raporları

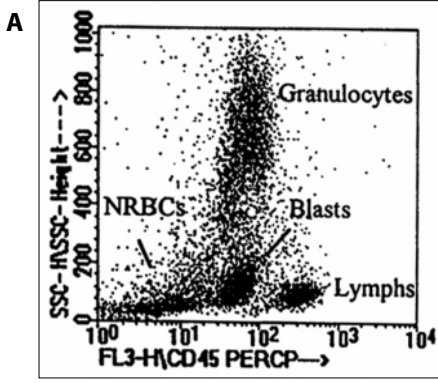
Doktor için hazırlanan raporlarda, hastanın kimliği ile ilgili bilgiler yanı sıra doktor tarafından yapılmış olan istemin ne



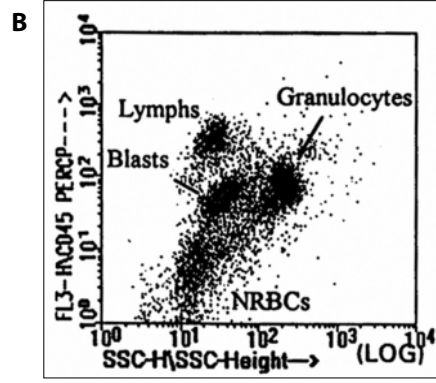
Tablo 1. Sık kullanılan monoklonal antikolar ve eksprese edildikleri hücreler

CD	Eksprese edilen hücre
CD1	Dendritik retiküler hücreler, Langerhans hücreli histiositozis, lenfoblastik lenfoma
CD2	T, NK lenfositler
CD3	T lenfositler
CD4	Helper T lenfositler
CD5	T lenfositler , B lenfosit alt grubu, KLL, mantle hücreli lenfoma
CD7	T lenfositler , NK lenfositler , erken myeloid hücreler, AML alt tipleri
CD8	Sitotoksik ve supressör T lenfositler , NK lenfositler
CD10	Erken B lenfositler
CD11b	Monositler, granulositler
CD11c	Granulositler, monositler, hairy hücreli lösemi
CD13	Myeloid hücreler
CD14	Monositler
CD15	Granulositler, Reed-Sternberg hücreleri, endotelial hücreler
CD16	NK lenfositler , granulositler
CD19	B lenfositler
CD20	B lenfositler
CD22	B lenfositler
CD23	Aktive B lenfositler , KLL
CD25	Aktive T lenfositler , aktive B lenfositler , hairy cell lösemi, ATL/L
CD28	T lenfositler
CD29	Aktive T lenfositler
CD30	Aktive T lenfositler , Reed-Sternberg hücreler, anaplastik büyük hücreli lenfoma, germ hücreli tümörler
CD33	Myeloid hücreler
CD34	Progenitor hücreler
CD38	Lenfoid progenitor hücreler, plazma hücreleri
CD40	B lenfositler
CD41	Megakaryosit, trombosit
CD42b	Megakaryosit, trombosit
CD43	T lenfositler , myeloid hücreler
CD45	Tüm hematolojik hücreler
CD45RA	B lenfositler , naïve T lenfositler
CD45RO	Memory T lenfositler
CD54	Endotel, active hücreler
CD55	Çoğu hematopoetik hücreler
CD56	NK lenfositler
CD57	NK lenfositler
CD59	Çoğu hematopoetik hücreler , PNH da az eksprese yada yok
CD61	Megakaryosit, trombosit
CD62P	Aktive trombosit
CD71	Eritroid, lenfoid öncül hücreler
CD80	B lenfositler , dendritik cells
CD86	B lenfositler , dendritik cells
CD95	T lenfositler
CD103	Intestinal epiteliyal lenfositler, Hairy hücreli lösemi
CD122	T lenfositler
HLA-DR	B lenfositler, monositler, myeloid progenitor hücreler, aktive T lenfositler
IgM heavy chain (mu)	Naïve B lenfositler
IgG heavy chain (gamma)	Antijenle karşılaşmış B lenfositler
IgD heavy chain (delta)	Naïve B lenfositler
IgA heavy chain (alpha)	Antijenle karşılaşmış B lenfositler
IgE heavy chain (epsilon)	Antijenle karşılaşmış B lenfositler
Kappa light chain	B lenfositler
Lambda light chain	B lenfositler
TdT	Immatür lenfoid hücreler





Şekil 1. Hücrelerin CD45-SSC özelliklerine göre dağılımı



Şekil 2. Hücrelerin FSC-SSC özelliklerine göre dağılımı

olduğu, laboratuvara gelen materyalin özelliği ve laboratuvara ulaşma zamanı (gün ve saat olarak), değerlendirmeyi etkileyebilecek bir durumun varlığı (ör: hemoliz, donmuş/sıcak örnek...) mutlaka yer almalıdır.

6.2.1 Raporda mutlaka bulunması gereken veriler

- Örnekteki çekirdekli hücre oranı,
- Normal hücresel elemanların morfolojik ve immunfenotipik özelliklerini özetleyen kısa bir açıklama,
- Örnekte varsa mevcut olan anormal hücrelerin oranı ve bu karara dayanak oluşturan verilerin kısa bir özeti,
- Anormal olarak tanımlanmış hücrelerin immunfenotipi, normalde beklenen fenotipin ne olduğu olarak özetlenebilir.

Anormal bir hücre topluluğunu tanımlarken çeşitli kriterler kullanılabilir.

- Bir seriden kaynaklanan hücrelerin artması, buna maturasyonun belli evresinde kalmış hücrelerin oranındaki artışın eşlik etmesi
- Klonalite gösteren bir grup hücrenin saptanması (ör kappa veya lambda için)
- Antijen ekspresyonunda görülen senkronizasyonun bozulması (örneğin slg taşıyan B hücrede halen TdT varlığının sürmesi, CD15 taşımaya başlayan miyeloid hücrelerde CD34 varlığının sürmesi....)
- Farklılaşmayı gösteren antijenlerin ekspresyon şiddetinde görülen artma/azalmalar, bunların birbiriyle uyumu (bazıları normal görünürken buna eşlik edenlerde azalma/artma olması)
- Bir seriye ait hücrelerde o seride olması beklenmeyen (aberran) antijen ekspresyonlarının tesbit edilmesi (ör: miyeloid hücrelerde CD19 pozitifliği, lenfoid hücrelerde CD33 varlığı...)
- Normal maturasyon gösteren hücrelerin oranındaki azalma, genç hücrelerin artmış olması

- DNA ploidi çalışmalarında DNA içeriği farklı olan hücrelerin bir arada gözlenmesi örnek olarak verilebilir.

6.2.2 Anormal hücreleri tanımlarken kullanılan parametrelerin önemi/değerlendirilmesi:

- Hücrenin kaynaklandığı serinin tanımlanması: Bu amaçla belli antijen ekspresyonlarının varlığı yanı sıra o grup hücreleri içinde farklı şiddette antijen ekspresyon eden hücrelerin bulunması, bazı antijen ekspresyonlarının geniş bir dağılım (heterojenite) göstermesi de önem taşır. Normal hücreler yanı sıra daha az veya daha çok antijen ekspresyon edenlerin bulunması aberran bir ekspresyon lehinedir.
- Maturasyonun tanımlanması: Bu amaçla antijen ekspresyon şiddetlerinde beklenen senkronizasyonun bozulması ve aberran antijenler yol gösterici olmaktadır. Örnekte hakim olan hücre topluluğunun maturasyonu hakkında bir değerlendirmenin raporda yer alması gerekir.
- Diğer özellikler: Hücrenin fenotipik özellikleri yanı sıra büyüklüğü, granüler yapısı gibi özelliklerinden kaynaklanan ışık saçılımındaki anormallikler ve olası sebepler raporda yer almalıdır.
- Örnekte yer alan normal hücreler hakkında da (oran..) bilgi verilmelidir
- İmmun fenotipik değişikliklerin morfolojik değişikliklerle birlikte değerlendirilmesi büyük yarar sağlar

7. Verilerin saklanması

Her ülkenin kendi yasal düzenlemelerine göre raporların saklanması gereken süre belirlenmiştir. Ülkemizde asgari 5 yıl süreyle saklamak gerekmektedir. Saklanması gereken veriler: Dar açıyla ışık saçılımı (FSC), 90° açıyla ışık saçılımı (SSC), ölçülen tüm floresan parametreler, kullanıldıysa ölçüm zamanı, list mode olarak (hücre bazında ayrı ayrı veriler) saklanmalıdır. Bu amaçla kullanılmakta olan cihazların belleği yetersiz kalabileceğinden taşınabilir bellekler kullanılarak bu kayıtların mutlaka saklanması gerekir.



8. Hematolojik hastalıklarda rutin akım sitometri uygulamaları

- 1- Myelodisplastik sendrom: Anormal myeloblast oranının saptanması ve miktarının değerlendirilmesi, anormal matürasyon gösteren myeloid hücrelerin ve monositlerin saptanması ile myelodisplastik sendrom tanısı, eritroid myeloid ve lenfoid elemanların değerlendirilmesi
- 2- Akut lösemi: Tanısı ve sınıflaması, promyelositik lösemnin ayırt edilmesi, MDS den AML ye değişimi saptamak, tedavi sırasında ve sonrasında minimal rezidüel hastalığı izlemek, prognostik belirteçleri belirlemek
- 3- Kronik myelositik lösemi: Blastik krizde immünofenotipi belirlemek
- 4- Kronik lenfositik lösemi: Tanısı, rezidü hastalığın izlenmesi, prognozun belirlenmesi
- 5- "Hairy" hücreli lösemi, "large granüler" lenfositik lösemi:

Kaynaklar

1. Clinical Applications of Flow Cytometry: Immunophenotyping of Leukemic Cells; Approved Guideline , NCCLS H43-A, 1998; Vol 13 No: 23.
2. Clinical Applications of flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline, NCCLS H42-A ,1998; Vol 12 No:6.
3. Rothe G., Schmitz G. : Concensus Document on Leukemia Immunophenotyping, 1996; Leukemia 10, 877-895.
4. Bene M.C.: Immunophenotyping of Acute Leukemias: Immunology Letters, 2005; 98, 9-21.
5. Szczepanski T: Classification systems for acute and chronic leukaemias; Best Practice & Research Clinical Haematology, 2003;Vol. 16, No. 4, pp. 561-582.
6. Ian Storie, Quality Control In Flow Cytometry, UKNEQAS for leucocyte immunophenotyping, Sheffield. UK, IFCC 2002 kongre notlarından.
7. Aguilera R.P., Guzman L.R., Santiago N.L., et al Flow Cytometric Analysis of Cell-Surface and Intracellular Antigens in the Diagnosis of Acute Leukemia, 2001; AJH 68: 69-74
8. Vos J.A., Simurdak J. H., Davis B. J., et al: Vortex Disaggregation for Flow Cytometry Allows Direct Histologic Correlation: A Novel Approach for Small Biopsies and Inaspirable Bone Marrows, 2003; Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 52B:20-31 (2003).
9. Lochem E.G., Velden V.H.J., Wind H.K., et al: Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts, 2004; Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 60B:1-13.

Tanısı, rezidü hastalık izlemi

- 6- Plazma hücresi hastalıkları: tanısı, klonalite değerlendirilmesi, hastalığın izlenmesi
- 7- Hodgkin dışı lenfoma: B,T ve NK hücreli lenfomaların tanısı, B ve T hücreli klonalitenin saptanması, izlemi
- 8- Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri:Tanısı ve izlemi
- 9- Lenfosit immünofenotipleme: hastalık tanısı, transplant sonu ve immünoterapi sırasında izlem
- 10- Kök hücre miktarının kantitatif belirlenmesi: Periferik kan, aferez ve kemik iliği örneklerinde CD34 + hücre miktarının saptanması
- 11- Retikülosit sayımı
- 12- Trombositlerin analizi:Kalıtsal trombosit hastalıklarının tanısı, trombosit aktivasyon ve agregatlarının değerlendirilmesi.

10. Stacchini A., Demurtas A., Godio L., et al: Flow Cytometry in the Bone Marrow Staging of Mature B-Cell Neoplasms,2003; Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 54B:10-18.
11. Ogata K , Satoh C., Hyodoa H., et al: Association between phenotypic features of blasts and the blast percentage in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes,-2004; Leukemia Research 28 : 1171-1175.
12. Xu D., Schultz C., Akker Y., et al: Evidence for Expression of Early Myeloid Antigens in Mature, Non-Blast Myeloid Cells in Myelodysplasia,2003; AJH 74:9-16.
13. Arber D. A., N. H. Carter, MS, Ikle D.,: Value of Combined Morphologic, Cytochemical, and Immunophenotypic Features in Predicting Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia,2003; Human Pathology 34 (5): 479-483.
14. Michelson A.D., Barnard M.R, Krueger L.A., et al: Evaluation of Platelet Function by Flow Cytometry, 2000; METHODS 21, 259- 270.
15. Santonocito A.M., Consoli U., Bagnato S.,et al: Flow cytometric detection of aneuploid CD38++ plasmacells and CD19+ B-lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and PBSC harvest in multiple myeloma patients, 2004; Leukemia Research 28: 469-477.
16. Mateo G., Castellanos M., Rasillo A., et al: Genetic Abnormalities and Patterns of Antigenic Expression inMultipleMyeloma,2005; Clin Cancer Res 11(10): 3661-67.
17. Pallis M, Seedhouse C., Grundy M., Russell N.: Flow cytometric measurement of phosphorylated STAT5 in AML: lack of specific association with FLT3 internal tandem duplications,2003; Leukemia Research 27: 803-805.

