

## Akım sitometrisi: Temel prensipler ve klinik kullanımı

### *Flow cytometry: Basic principles and clinical usage*

Berna ASLAN, Nezaket EREN, Nihal YÜCEL

*Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı*

20. yüzyıl ortalarına değin biyolojik bir numune hücre bulunup bulunmadığı, bu hücrelerin tür ve sayılarına ilişkin veriler insan gözü ile mikroskoptaki görüntülerin incelenmesi yoluyla elde edilebiliyordu. Daha sonra ışık ölçüm yöntemlerinin gelişmesi ve bunların mikroskopla birlikte kullanılması ile "sitometri" ortaya çıktı. Bu yöntem öncelikli olarak numunelerin yüksek rezolüsyonlu görüntülerinin elde edilmesini gerektiriyordu. Bu da cihaz maliyetlerinin yükselmesine neden oluyordu. 1950'li yıllarda ilk akım sitometrisi (flow cytometry) cihazları kullanıldı. Bunlar tek parametrelilik optik ve elektronik cihazlardı. 70'li yıllardan itibaren çok parametrelilik gittikçe daha karmaşık olan akım sitometri cihazları üretildi (1).

### I. TANIM

Akım sitometrisi, bir sıvı akımı içerisinde hareket eden hücrelerin özelliklerinin ölçüldüğü teknoloji olarak tanımlanabilir. Akım sitometrisinde birçok teknik bir arada kullanılır. Bilgisayar biliminin, optik, elektronik, hidrodinamik odaklama ve "ink-jet" teknolojilerinin ilerlemesi, lazerin bulunması, monoklonal antikorlar ve DNA analizi yöntemlerinde kaydedilen ilerlemeler heterojen hücre süspansiyonları içindeki her bir hücrenin özelliklerinin ölçülmesine yani akım sitometrisinin gelişmesine olanak sağlamıştır (2).

#### Yazışma Adresi:

Dr. Berna Aslan  
Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Biyokimya Laboratuvarı, ŞİŞLİ  
e-mail: aslan\_berna@hotmail.com

Akım sitometrisi teknolojisini daha iyi tanımlayabilmek için, keşfedildiği 1600'lü yıllardan itibaren patoloğların ve tıp alanında araştırma yapanların hücreleri incelemek için kullandıkları ilk araç olan ışık mikroskobu ile karşılaştırarak incelememiz faydalı olur (2, 3, 4):

**1. Işık Kaynağı:** Tipik mikroskoplarda ışık kaynağı olarak lamba kullanılır. "Akım sitometrisi" de ışık kaynağı sıklıkla lazer'dir. Lazer ışığı "coherent", yoğun ve monokromatik bir ışıktır. Lazer ışığının monokromatik olma özelliği flüoresan ölçümlerde çok önemlidir.

**2. Tabla:** Mikroskop tablasının hareketi sayesinde, incelenen hücreler objektif lensinin görme alanından geçer. Akım sitometrisinde ise hücreler sıvı içerisinde süspansiyon halinde bulunur. Bu sıvı hava basıncı ile objektif lensi önünde akar ve hücreleri görme alanına taşır.

**3. Lens:** Hem mikroskopta hem de akım sitometrisinde lensler hücrelerden gelen ışığı toplar.

**4. Filtreler:** Bazı mikroskoplarda gözlemci için en önemli olan özelliği ışığı seçmeyi sağlayan filtrelerdir. Filtreler özellikle floresan mikroskoplarda kullanılırlar. Flüoresan boya molekülleri, o boya için karakteristik olan dalga boyunda ya da renkte bir ışıkla uyarıldığında ("excited"), dalga boyu daha uzun olan bir ışık yayarlar ("emitted light"). Filtreler uyarıcı ("excitation light") ışığı ortamdan uzaklaştırarak, flüoresan maddenin yaydığı ışığın görülmesini ya da ölçülmesini olası kılar.

**5. Detektörler:** Mikroskopta detektör değerlendirmeyi yapan gözlemcinin kendisidir. Akım sitometrisinde ise "photomultiplier tube" (PMT) denilen son derece duyarlı ışık detektör-

leri kullanılır. Akım sitometrisi cihazlarında bir saniyede binlerce hücre, her biri objektif önünden teker teker ve bir kez olmak üzere geçer. PMT bu hücrelerin yaydığı kısa süreli ışık çakmalarını ölçer.

Işık mikroskopunun en önemli dezavantajı değerlendirmenin subjektif olmasıdır. Elektronmikroskopisi ve immunohistokimyasal yöntemlerin gelişmesine rağmen, mikroskop kullanan araştırmacı insan gözünün rezolüsyon yeteneği ile sınırlıdır. Mikroskopun tersine, “akım sitometrisi” hızlı ve objektif bir yöntemdir. Akım sitometrisi cihazı ile analiz sırasında hücreler teker teker incelenir, hücrelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile ilgili kantitatif ölçümler yapılır. Hücreler özelliklerine göre sınıflanarak incelenebilirler. Akım sitometrisi ile morfolojik yöntemlere göre daha fazla sayıda hücre değerlendirilebilir. Ölçümlerin tekrarlanabilirliği daha iyidir ve daha az iş gücü gerektirir.

## II. NE ÖLÇER

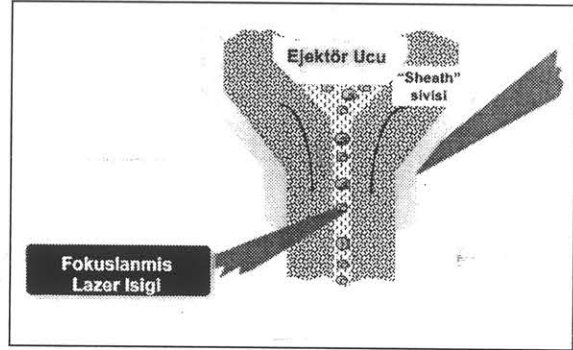
Akım sitometrisi ile hücrelerin büyüklüğü, hacmi, çekirdeğinin yuvarlaklığı, DNA ve RNA içeriği, enzim aktivitesi, hücre yüzey reseptörlerinin tipi ve miktarı ölçülebilir.

## III. NASIL ÖLÇER

Akım sitometrisi cihazları, sıvı akımı içindeki parçacıkların odaklanmış lazer ışını önünden geçerken incelenmesini sağlayan cihazlardır. Lazer ışını ile hücre etkileştiğinde, flüoresan boya ile işaretli olan hücre ışık üretir ve kendine gelen ışığın bir bölümünün de saçılmasına neden olur. Birçok ayna ve filtrenin yardımı ile bu ışınlar detektörlerin üzerine düşürülür. Detektörler optik sinyali elektronik sinyale dönüştürürler. Bu sinyaller bilgisayar ile incelendiğinde hücrelerin özelliklerine ilişkin veriler elde edilir. Bu işlevleri yapabilmesi için akım sitometrisi 3 sistem içerir:

**1. Sıvı sistemi:** Hücrelerin tek sıra halinde lazer ışığının önünden geçmesini sağlar. Bunun için “sheath fluid” denilen izotonik bir sıvı, koni şeklinde, geometrik olarak laminer akım oluşturmaya müsait bir probun içinden belirli

bir basınç ile geçirilir. Probun ucundaki açıklık 50–250µm çapındadır. Bu açıklıktan sıvı 10 m/sn hızı ile geçer. Ancak bazı uygulamalar için daha yavaş hızlara da gereksinim duyulabilmektedir. Kendi izotonik sıvısı içerisindeki numune daha yüksek bir basınç ve bir ince boru vasıtası ile “sheath fluid” akımının tam ortasına uygulanır. Prob içerisindeki laminer akım, numune akımının sheath sıvısı akımını tam ortasında kalmasını sağlar. Buna hidrodinamik odaklama denilmektedir (Şekil 1). İki sıvı akımını sağlayan basınçlar arasındaki fark optimize edildiğinde, içerisinde numuneyi taşıyan akımın çapı içerdiği hücrelerin çapından daha geniş olamaz (2, 3, 4).

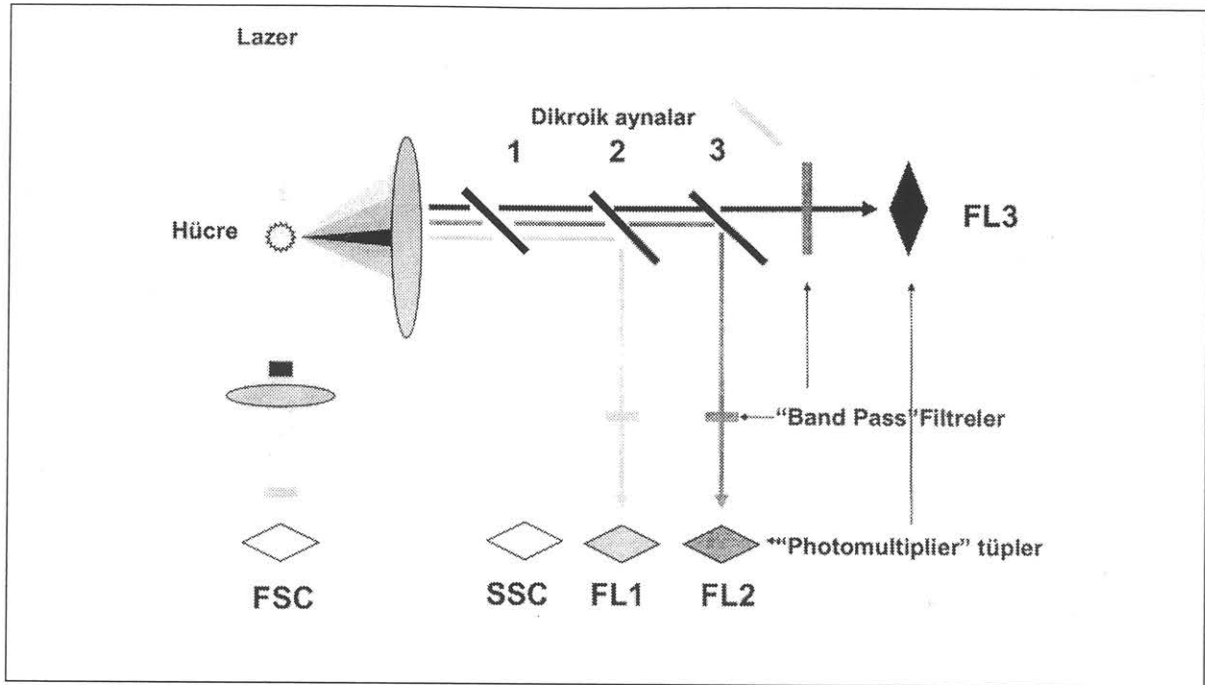


Şekil 1: Akım sitometrisinde akım hücresinin şematik görünümü

**2. Optik sistem:** Işık kaynağı ve optik sinyal toplayıcılarından oluşur. Birçok akım sitometri cihazında florokromları uyarmak ve hücre içi parametreleri ölçmek için ışık kaynağı olarak argon (dalga boyu: 488 nm) lazer kullanılır. Lazer ışığı iki özelliği ile adi ışıktan ayrılır:

- Lazer ışığı koherentdir: Işığı oluşturan dalgalarının tümü birbirine paraleldir.
- Lazer ışığı monokromatiktir: Işığı oluşturan dalgaların hepsinin dalga boyu ve frekansı aynıdır.

Numune akımı içindeki hücre lazer ışık demeti ile karşılaştığında (hücresinin içerisinde ya da üzerinde florokromların da bulunduğunu kabul edersek) iki olay gerçekleşecektir:



Şekil 2: Akım sitometrisi optik sistemi

**a. Işık saçılımı:** Hücrenin üzerine düşen ışık hücre tarafından 360 derece açı ile her yöne saçılacaktır. Lazer ışığının eksenini boyunca saçılan ışığı bir detektör üzerinde topladığımızda "forward-angle light scatter" (FSC; ileri doğru ışık saçılımı) parametresini elde etmiş oluruz ki, bu değerın büyüklüğü kabaca hücre ya da parçacık büyüklüğü ile orantılıdır. Üzerinde çalışılan parçacık küre şeklinde ve içerisi de homojen olduğunda FSC ile parçacık büyüklüğü arasında doğru orantı bulunur. Eğer saçılan ışık lazer ışın demetinin sağ tarafına ışın demeti ile  $90^\circ$  açı yapan bir detektör üzerinde toplanır ise " $90^\circ$  light scatter" veya "side scatter" (SSC; yana doğru ışık saçılımı) olarak isimlendirilir. Deneysel olarak SSC'nin hücrelerin iç yapıları ve membran kıvrımları tarafından yansıtılan ışıkları içerdiği saptanmıştır. Bu nedenle bu parametre hücre granülaritesi ile korelasyon gösterir. FSC ve SSC'ye ölçümleri için dışarıdan eklenen reaktiflere gereksinim olmadığı için "içsel özellikler" olarak isimlendirilirler. Ölçümleri için dışarıdan reaktif eklenmesi gereken özelliklere ise "dışsal özellikler" denir (2, 3, 4).

**b. Flüoresan:** Flüoresan bir molekölün belirli bir dalga boyundaki ışığı emip daha uzun dalga boyunda bir ışık yayması özelliğidir. Bu olay,  $10^{-6}$  saniye içinde, son derece hızlı bir şekilde gerçekleşir ve flüoresan ışık ta tıpkı saçılan ışık gibi 360 derece açı ile her yöne yayılır. Tipik olarak, çok sayıdaki cihaz, yayılan flüoresan ışık ile SSC'yi aynı anda ve aynı optik sistemle ölçer. Bu durumda, ölçüm odacığına birden çok sayıda farklı dalga boylarında ışık ("multicolor", "multiwavelength") gelir. (Saçılan ışık cihazın lazerinin ürettiği ve hücre tarafından yansıtılan ışık ve florokromların ürettiği daha uzun dalga boyundaki ışıklar). Işık miktarı diğer bir deyişle foton sayısı hücre içi veya yüzeyindeki florokrom sayısı ile orantılıdır. Birden fazla sayıda renkten oluşan ışık kendisini oluşturan renklere ayrıştırılır. Bu ayrıştırma işlemi "short pass" ve long pass" filtreler ile dikroik aynalar kullanılmak suretiyle gerçekleştirilir (2, 3, 4) (Şekil 2).

Akım sitometrisi incelemelerinde kullanılacak çok sayıda flüoresan boya vardır. Bunlar nükleik asitlere, proteinlere, hücre membranları, çekirdek ve sitoplazmadaki reseptörle-

**Tablo 1:** Akut lösemi panelinde sıklıkla yer alan antikörler

Myeloid	CD13, CD33
B-Lenfosit	CD10, CD19, İmmunglobulinlerin $\kappa$ ve $\lambda$ hafif zincirleri
T- Lenfosit	CD2, CD5, CD7
Megakaryosit	CD61
Kök Hücre	CD34
İmmatür Lenfosit	TdT (Terminal deoksi ribonükleotidil transferaz)

re; hücre içerisindeki moleküllere vb. hücrelerin çeşitli sitokimyasal bileşenlerine bağlanırlar. Kullanılan flüoresan boyanın uyarıcı (eksitasyon) dalga boyu, cihazdaki lazerin verdiği ışığın dalga boyu ile uyumlu olmalıdır. Lazerli akım sitometrisinde bu dalga boyu genellikle 488 nmdir. Işık saçılımı hücre süspansiyonu içinden ilgilendiğimiz, üzerinde çalışmayı istediğimiz hücre grubunu seçmemize yardımcı olur. Flüoresan şiddeti ise her bir hücre ile ilgili spesifik bilgiler verir. Flüoresan boya ile işaretlenmiş monoklonal antikörler hücre yüzey antijenlerinin belirlenmesinde kullanılırken, doğrudan ve spesifik olarak hücrenin belirli komponentlerine bağlanan (örneğin DNA'ya) flüoresan boyalar hücre döngüsü ("cell cycle") analizinde kullanılır (2, 3, 4).

**3. Elektronik sistem:** Son olarak detektörlerden gelen tüm optik sinyaller bilgisayarda derlenir, orantılı olarak elektronik ve dijital sinyallere dönüştürülür. Bilgisayar, kullanıcı silene kadar her bir hücreye ait tüm verileri saklar ve bu verilerin kullanıcı isteğine göre değişik parametrelere göre değerlendirilmesi olasıdır (2, 3, 4).

Sonuç olarak, akım sitometrisi, bilgisayar ve lazer teknolojileri, monoklonal antikör üretimi, sitokimya ve florokrom kimyasındaki gelişmeler gibi birbirinden bağımsız olarak üretilen bilginin kullanılması ile üretilmiştir.

#### IV. FLOW SİTOMETRİNİN KLİNİK KULLANIM ALANLARI

##### 1. YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN ÖLÇÜMÜNE DAYANAN YÖNTEMLER

Bunlar arasında klinik laboratuarda en yaygın olarak kullanılan yöntemler kemik iliği ve periferik kandaki lökositlerin yüzeylerindeki antijen özelliği taşıyan "cluster of differantiation" (CD) denilen moleküllere karşı flüoresan işaretli antikörler kullanılarak yapılan immüno-fenotiplemedir. Bu antijenlerin bazıları bir hücre dizisine özgü iken ("lineage specific"), bazıları hücre dizisindeki bir differansiasyon basamağına özgüdür ("differantiation specific"). Diğer bir grup antijen ne bir hücre dizisine ne de bir differansiasyon aşamasına spesifite gösterir, ancak hücrenin aktivasyonu ile ilişkilidir (5).

Günümüzde akım sitometrisi hematolojik neoplazilerin tanısının konulması ve bu neoplazilerin özelliklerinin belirlenmesinde rutin olarak kullanılmaktadır. Bu teknolojinin sağladığı verilerle, hematolojik malignitelerin tanıları konulabilmekte, hangi hücre dizisinden kaynaklandıkları, gradelerinin ne olduğu ve prognozları saptanabilmektedir (6).

Analizler periferik kan, kemik iliği aspirat ve biyopsileri, serozal sıvılar, beyin omurilik sıvısı, deri, mukoza (endoskopik biyopsiler), ince iğne aspirasyon biyopsisi ile kitlelerden alınan örnekler üzerinde yapılabilir (5, 6).

### A. Akut Lösemilerin İmmünofenotiplemesi

Akut Lösemi paneli lösemik blastların myeloid mi yoksa lenfoid kaynaklı mı olduklarını belirlemek ve hücreleri B lenfosit, T-lenfosit, monosit, myelosit, megakaryosit vb gibi sınıflamaya yönelik olarak hazırlanır. Akut lösemi panelinde sıklıkla yer alan antikorlar tablo 1’de gösterilmiştir (5).

Akut lösemiler için lösemnin kaynaklandığı hücre dizisinin (“lineage”) saptanması amacıyla, akut myeloid lösemi (AML) için sitoplazmik myeloperoksidaz (MPOc), CD33, CD13; B hücreli akut lenfositik lösemi (B-ALL) için CD79a ve CD19; T hücreli akut lenfositik lösemi (T-ALL) için sitoplazmik CD3 (CD3c) ve CD7’nin tarama panelinde bulunması önerilirken, matürasyon belirlenmesinde AML için CD34, CD15, HLA-DR; B ve T ALL için CD34 ve TdT kullanılması önerilmiştir (7).

**B-Prekürsör ALL’de** CD19 ve CD79a pozitif iken, CD10 lösemik hücrelerin bir bölümünde eksprese edilir. CD20 ve CD45 ya negatiftirler ya da zayıf bir pozitiflik gösterirler. CD22 yüzeyde veya sitoplazmada pozitifdir. Yüzey immünglobulini negatiftir. Genellikle CD34 pozitifliği saptanır. CD34 ve/veya TdT

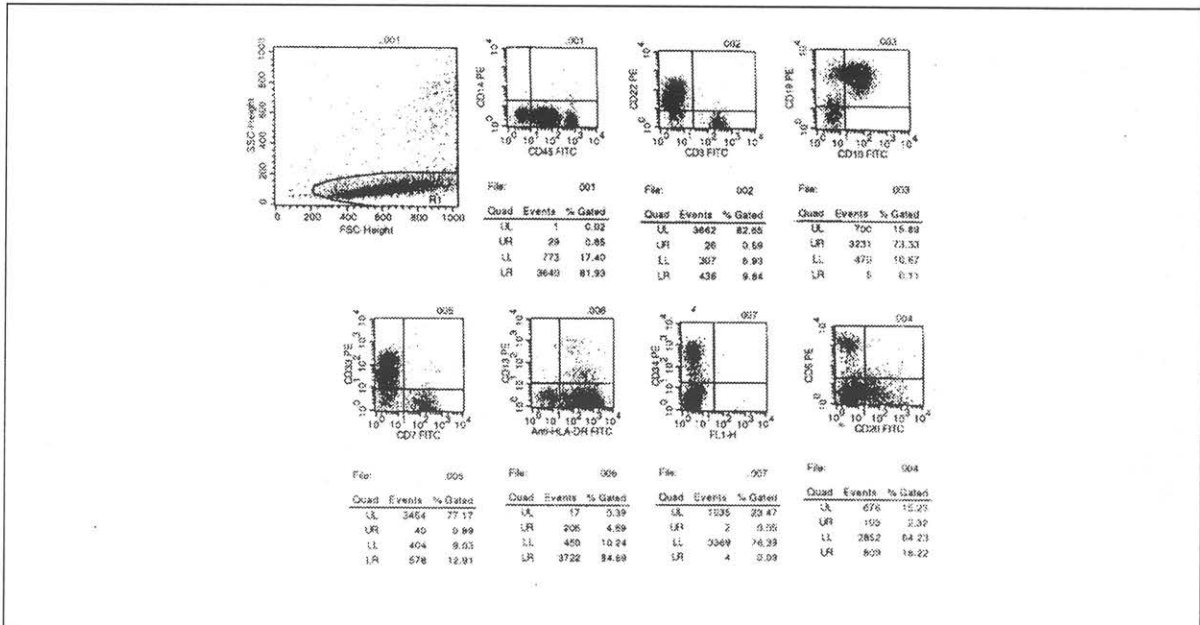
pozitifliği B-prekürsör ALL’nin lenfomalardan ayrılmasında yardımcı olur (8).

**T-Prekürsör ALL’de** CD7, CD5, CD2, CD3c pozitif, CD3 negatif veya zayıf pozitif, sitoplazmik CD3 pozitif bulunur. CD4 ve CD8’in ya her ikisi de negatiftir ya da her ikisi birden pozitif bulunur. CD4 ve CD8’in her ikisinin birden pozitif olması ve/veya CD1’in pozitif olması T-Prekürsör ALL için tanı koydurucudur. Yine TdT veya CD34 pozitifliği ile birlikte sitoplazmik CD3’ün pozitif olması da diagnostiktir (8).

**Akut Myeloid Lösemide (AML)** CD45, CD34 pozitifliği saptanır, ancak her ikisi de zayıf pozitiflik gösterir. CD11b, CD15 pozitifdir. AML’de T hücre belirteçlerinden CD7, CD4, CD2 veya B hücre belirteçlerinden CD19 pozitif bulunabilir (8).

**Megakaryositik Lösemide** güçlü CD61 ve ya CD41 pozitifliği gözlenir. CD33, CD13, CD45, CD34 değişen derecelerde eksprese edilir (8).

**Promyelositik lösemide** CD33 ve CD13 pozitifdir. HLA-DR negatiftir. CD9 ve CD68’in tanıda yararlı olduğu bildirilmiştir (8).



Şekil 3: Calla (+) B-ALLsi olan bir örnek hasta raporu

## B. Monoklonal Gammapatiler

Monoklonal gammapatilerde, akım sitometrisi, normal ve neoplastik plazma hücrelerinin birbirlerinden ayrılmasında kullanılır. Akım sitometrisi ile yapılan immunfenotiplemenin multiple myelom ile diğer monoklonal gammapatilerin ayırıcı tanısındaki değeri ispatlanmıştır. Panelde en azından CD38, CD19 ve CD56 bulundurulması önerilmektedir. Neoplastik plazma hücrelerinde CD38 ekspresyonu normal plazma hücrelerinden daha zayıftır. Artmış CD56 ise neoplastik plazma hücrelerinin özelliğidir (7).

## C. Lenfoma ve Lenfoproliferatif Hastalıklarda İmmunfenotipleme

Lenfoma panelleri genellikle matür B ve T hücrelerini içeren lenfoproliferatif hastalıkları tanımaya yönelik olarak hazırlanır. B hücre maligniteleri için sadece immunglobulinlerin  $\kappa$  veya  $\lambda$  zincirlerinden birini üreten monoklonal bir klonun gösterilmesi gerekir. T ve NK ("natural killer") hücelere özgü klonaliteyi gösterecek bir hücre yüzey belirteci yoktur. Anormal T lenfosit fenotipinin gösterilmesi T hücre malignitesini kuvvetle düşündüren ancak başka yöntemlerle desteklenmesi gereken bir bulgudur. Rutin lenfoma panelleri B lenfositleri için CD19, CD20, CD23 ve immunglobulinlerin  $\kappa$  veya  $\lambda$  zincirlerini; T hücreleri için CD2 ve CD5'i içerirler (4, 5, 7). Zayıf CD20 ekspresyonu B hücreli kronik lenfositik lösemi (B-KLL) hücrelerinin özelliğidir ve KLL B hücreleri ile normal B hücrelerinin ayrılmasında kullanılır (7). Eğer büyük granüler lenfositlerin bir hastalığı söz konusu ise panele T lenfosit belirteçlerinden CD3, CD4, ve CD8 ile NK belirteçlerinden CD16, CD56 ve CD57 eklenir (4, 5, 7).

## D. T Lenfosit sub grupları

Periferik kandaki mutlak CD4 pozitif T lenfositlerinin sayısı AIDS hastalarının immünolojik durumlarının izlenmesinde kullanılır. Bu amaçla periferik kanda CD3, CD4, CD8 ve CD45 çalışılır. CD 45 pan-hematopoetik mar-

ker olup bütün hematopoetik hücrelerde pozitifdir. Burada ve immunfenotiplemelerde "gating" (kapılama: bilgisayar ortamında akım sitometrisi ile analiz edilecek hücre grubunun seçilmesi) ve kalite kontrol amacı ile kullanılır. Daha sonra her bir belirteci taşıyan hücrelerin yüzde oranları belirlenir. Bu sırada CD4 ve CD8 taşıyan hücrelerin mutlak sayılarını elde etmek için hasta örneği ile birlikte cihaza kalibre edilmiş sayıda flüoresan "bead" (boncuk) da saydırılır. Daha sonra "bead" sayıları karşılaştırılarak mutlak hücre sayıları elde edilir (4, 6, 9, 10).

## E. İmmun supresif tedavi ve allograft reddinin takibi

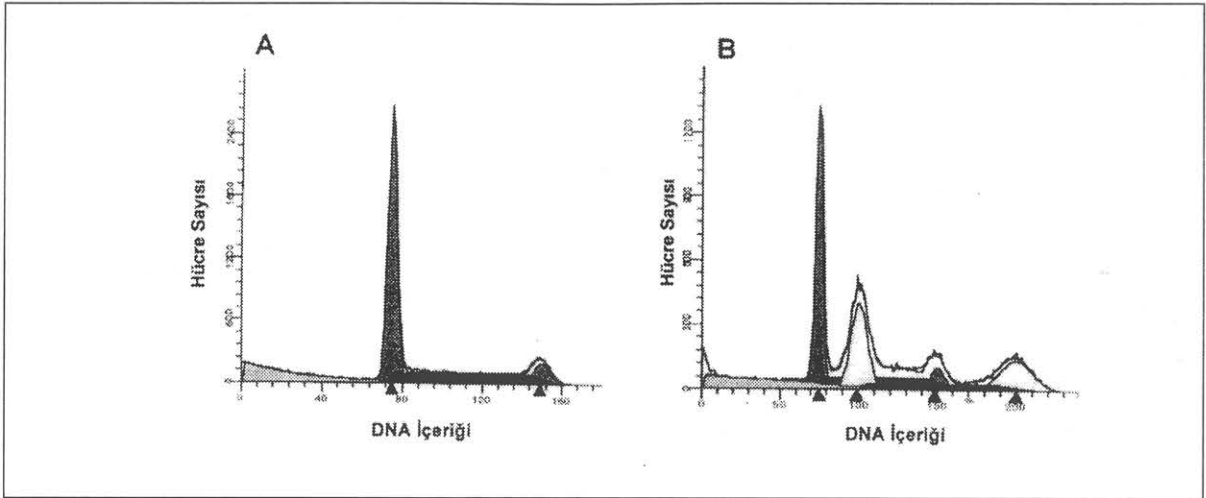
Böbrek, karaciğer, kalp, kalp-akciğer ve pankreas organ naklinden sonra hastalara antitimosit globülin (ATG) veya OKT3 (lenfositlerinin T-hücre reseptörü (TCR) ile ilişkili CD3 kompleksinin 20-kd'lik glikoprotein  $\epsilon$ -zincirine karşı fare monoklonal antikoru) verilir. Bu hastalarda immunsupresif tedavi rutin olarak lenfosit sayımı ile yapılır buna ek olarak organ nakli antikor panelinde CD2, CD3, CD4, CD5, CD8 ve CD14, CD19, CD45, CD57 yer alır (11).

## 2. HÜCRE DÖNGÜSÜ VE DNA İÇERİK ANALİZİ

Hücrelerin tekrarlayan büyüme ve bölünmelerine hücre döngüsü ("cell cycle") denir. Hücre döngüsü sıklıkla beş faza ayrılır. Bunların dördü:

G<sub>1</sub> ("Gap 1"): DNA replikasyonundan önceki büyüme periyodudur (12). Bu fazda RNA ve protein sentezi görülür. Ancak hücrenin DNA içeriği sabit kalır (2C). G<sub>0</sub> ve G<sub>1</sub> fazlarının her ikisinde de 2C DNA bulunduğundan akım sitometrik DNA analizinde iki grup birbirinden ayrılamaz ve G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> olarak işaretlenir.

S ("Synapsis"): DNA replikasyonunun gerçekleştiği fazdır (12). S fazı tüm DNA molekülünün replikasyonu tamamlanana kadar devam eder. S fazı sonunda hücrenin DNA içeriği iki katına çıkar ve 4C olarak ifade edilir.



Şekil 4: DNA içerik Analizi Histogramları: A: Diploid DNA histogramı B: Anöloit DNA Histogramı

**G<sub>2</sub> (“Gap 2”):** DNA replikasyonunu takip eden büyümedir. Bu faz boyunca DNA içeriği 4C olarak kalır.

**M (“Mitosis):** Hücre bölünmesidir. Hücreler iki yavru hücreye ayrılincaya kadar DNA içeriği 4C olarak kalır. Her yavru hücre 2C DNA içerir.

Mitozdan sonra yavru hücreler yeniden ya G<sub>1</sub> fazına girer ya da beşinci faz olan G<sub>0</sub> fazına girerler. G<sub>0</sub> fazında büyüme ve replikasyon durmuştur. G<sub>0</sub> fazındaki hücreler sonunda ya G<sub>1</sub> fazına girer ya da ölürlür (12).

Şekil 4A’daki grafikte hücre döngüsündeki popülasyonun akım sitometrisi veri göstergesinde nasıl görüldüğüne ilişkin bir örnektir. Grafiğin horizontal eksen her bir hücredeki DNA miktarını gösterir ve göreceli birimlerle ifade edilir. Vertikal eksen belirli bir miktarda DNA içeren kaç hücre olduğunu gösterir. Bu tip grafiklere histogram denir. Grafikte görülen örnekte G<sub>1</sub> fazındaki hücreler 75’de pik oluşturmuştur. G<sub>2</sub> ve M fazındaki hücreler birlikte 150’de pik oluşturmuştur. Yani bu hücrelerin her biri G<sub>1</sub> fazındaki bir hücrenin içerdiğinin iki katı kadar DNA içermektedirler. Bu da DNA replikasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu iki pik arasında düz bir plato izlenir. Bu bölgedeki hücreler G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> fazı arasında olup değişen miktarlarda DNA içermektedirler. Bu faza S fazı denilmektedir (12).

Akım sitometrisi bilgisayarı her bir pik altında kalan alanı grafiğin entegralini alarak hesaplar. Böylece her bir fraksiyonun diğer bir deyişle hücre popülasyonunun oransal miktarı belirlenmiş olur. Tipik olarak hücrelerin çoğu G<sub>1</sub> fazında bulunur. G<sub>0</sub>’daki hücreler G<sub>1</sub> fazındaki hücrelerle aynı miktarda DNA içerdiği için bu iki faz akım sitometrisi ile yapılan ölçümlerde birbirlerinden ayıramaz. S ve G<sub>2</sub>/M fraksiyonlarını ölçerek bir hücre popülasyonunun ne hızla büyüdüğüne ilişkin bilgi edinebiliriz (12).

Sitogenetikçilerin kullandığı bir terminoloji olan “ploidi” bir hücredeki kromozom sayısını ifade eder. Normal somatik hücrelerde bir çift kromozom seti bulunur. Bu hücrelerin içerdiği kromozom sayısı 2N veya 2C şeklinde ifade edilir ve bu normal sayıda kromozom içeren hücelere diploit hücreler denir. Normal hücrelerin içerdiğinin yarısı kadar kromozom içeren hücelere haploit, iki kopyadan daha fazla içeren hücelere poliploit hücreler denir. Poliploit hücreler 3C, 4C vb. sayılarda kromozom içerirler ve bunlar sırasıyla triploit ve tetraploit olarak adlandırılırlar. Haploit sayının katları kadar kromozom içeren hücelere öploit, haploit sayının tam katları olmayan sayıda kromozom içerenlere ise anöloit hücreler denir (12).

Akım sitometrisel DNA içerik analizinde gerçek kromozom sayısı değil nükeer DNA’ya bağlanan flüoresan boya ölçülür. Boya ile DNA

arasındaki bağlanma fiksasyon, proteaz ile ön işlem, florokromun cinsi, doku türü vb. birçok faktörden etkilendiğinden flüoresan yoğunluğu DNA içeriğini kesin olarak yansıtmaz. Bu nedenle DNA içeriği saptanırken, diploit olduğu bilinen hücre standardı kullanılır. Standart olarak aynı kişinin aynı dokusundan diploit hücrelerin kullanılması önerilir (12). Numunedeki DNA miktarı referans standarttan farklı olduğunda anoploit veya poliploit şeklinde değerlendirilir.

DNA indeksi (DI) ve  $G_0/G_1$ ,  $G_2-M$  ve  $S$  faz oranları DNA histogramlarından hesaplanır. DI tümörün  $G_0/G_1$  pik kanalının, diploit standardın  $G_0/G_1$  pik kanalına oranıdır. DNA indeksi 1 olduğunda hücrenin diploit olduğu söylenir. Eğer oran 1'e eşit değil ise numune anaploit olarak isimlendirilir (12).

Diploit standarttan farklı ilave pikler görüldüğünde, bu anormal hücre dizilerine ait  $G_0/G_1$  ve  $G_2/M$  pikleri ile tümöre ait  $S$  faz fraksiyonu izlenir. Bu durumda DNA'nın anoploit olduğu söylenir. Tümör hücre popülasyonu diploit hücre standardından ayrılmadığında, DNA'nın diploit ya da diploit range içerisinde olduğundan söz edilir. Bu durumda da kromozomsal anomalilerin bulunması muhtemeldir. Bazı tümörlerde kromozomal delesyon ve duplikasyonlar dengededir. Bu durumda akım sitometrisi analizinde DNA içeriği normal görüldüğü halde karyotip anormal olabilir (12).

Şekil 4B'de hücre döngüsünde bulunan iki farklı tip hücre izlenmektedir. Her bir grubun kendi  $G_1$ ,  $S$  ve  $G_2/M$  fraksiyonları vardır. 75 ve 150. kanallardaki pikler normal diploit hücrelerin bulunduğu birinci hücre grubuna, 100 ve 200. kanallardaki pikler ise anoploit olan ikinci hücre grubuna aittir. 110 ve 140 kanallar arasında grafiğin basık olduğu bölge saf  $S$  fazına aittir. Bu bölgede iki hücre popülasyonunun  $S$  fazında bulunan üyeleri bir arada bulunur. Yine diploit hücre grubunun  $S$  fazı ile anoploit hücrelerin  $G_1$  piki ve benzer şekilde anoploit hücrelerin  $S$  fazı ile diploit hücre grubunun  $G_2/M$  piki üst üste binmiştir. Örneğimizde iki hücre grubunun  $G_1$  pikleri arasındaki deviasyon 1.33

(100/75) faktörü ile ifade edilir. Bu sayıya daha öncede söz edildiği gibi DNA indeksi denir.

Bu tip ölçümler kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılır. Tıpta bu ölçümden bazı kanser türlerinin prognoza göre sınıflanmasında yararlanır. Araştırmalarda hücrenin DNA içeriği hücre döngüsü ve dolayısı ile uygulanan bir uyarıcı veya ilaca karşı hücrenin verdiği yanıtı incelememize olanak sağlar (12).

DNA içerik analizi sonuçlarının tanı ve prognoz amaçlı kullanımında farklı neoplazilerde farklı anlamlar taşıdığı dikkate alınmalıdır. Günümüzde DNA sitometrisi tanısal değer taşımaktan çok geleneksel mikroskopik tanıya katkısı olan bir yöntem olarak düşünülmemelidir.

## V. AKIM SİTOMETRESİNİN DİĞER KULLANIM ALANLARI

Akım sitometrisinin henüz klinik rutin kullanımında yerini almamış çok sayıda araştırma amaçlı olarak kullanıldığı alanlar vardır.

"Flow sorting": Heterojen bir hücre süspansiyonu içerisindeki hücrelerden arzu edilen belli bir hücre grubunun fiziksel olarak ayrılmasıdır. Genellikle akım sitometri cihazlarında sorting işlemi "ink-jet" yazıcılarında kullanılan teknolojinin bir benzeri olan yüklü damlacıkların elektrostatik olarak yön değiştirmesi prensibinden yararlanılarak gerçekleştirilir. Numuneden aspire edilen hücreler cihazın probundan "sheat" sıvısı akımı içerisinde dışarı atılır. "Sheat" sıvısı fosfat ile tamponlanmış serum fizyolojik içerir. Ancak herhangi bir iyonize sıvı da aynı işlevi yapabilir.

Bütün akımlar gibi burada oluşan "sheat" sıvısı akımı da unstabildir ve damlacıklara bölünerek devam eder. Akım sitometrisinde sıvı akımı üzerine amplitüd ve frekansı belirli olan bir titreşim uygulanarak akımın damlacıklara dönüşmesi standardize edilir ve her bir damlacık içerisinde tek bir hücre bulunur. Elektriksel yük taşıyan bu damlacıklar yüksek voltaj uygulanan iki plaka arasından geçirilirler. Bu sırada yüklü damlacıklar kendi taşıdıkları yükün tersi yükü taşıyan plaka doğru yön değiştirirler. Akım sito-



metrisi bilgisayarı ile hangi özellikteki hücrelerin toplanacağı ve hangilerinin cihazın atık kabına gönderileceği belirlenmek suretiyle arzu edilen hücreler deney tüpleri içerisinde toplanabilir. Akım sitometrilerinde bir seferde iki farklı özellikteki hücre toplanabilir. Bu ayrılan hücreler canlıdır. Steril olarak elde edilmeleri mümkündür. Ayrılan hücrelerin kültürlerinin yapılması mümkündür. Her bir hücre ayrı bir mikro test kuyucuğuna alınarak tek bir hücrenin kültürünün yapılması (klon oluşturulması) mümkün olabilmektedir (2).

Akım sitometrisi ve "cell sorting" teknolojileri ile kromozomların yapıları çok net olarak belirlenebildiği gibi spesifik kromozomları, üzerinde, ileri araştırmalar yapmak için izole etmek de mümkün olabilmektedir. Moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemeler ve DNA dizisi analizi yapan araştırmacıların akım sitometrisi üreticilerinden daha hızlı ve kaliteli neticeler üreten cihazlar konusundaki beklentileri teknolojinin daha da gelişmesine neden oldu. Cihazların "sorting" performansındaki artma "high-speed cell sorters" (yüksek hızlı hücre ayırıcılar) denilen yeni kuşak akım sitometrilerinin üretilmesi ile sonuçlandı. Kromozom "sorting" birçok gene veya diziyeye spesifik araştırmada kullanılmaktadır. Günümüzde akım sitometrisi ile yapılan karyotipleme evölüsyon, hastalık etiyojisi, prediktif tıp ile sitogenetik araştırma ve tetkikler için önemli bir araç haline gelmiştir (13).

Günümüzde birçok hayvan türünde, doğacak yavrunun cinsiyeti fertilizasyondan önce %85–95 doğrulukla saptanabilmektedir. Bu

dikkate değer başarıyı ilk olarak 1989 yılında Johnson ve arkadaşları gösterdi. Kromozomal karyotipleme, yapay döllenme, DNA spesifik boyama, akım sitometrisi, bilgisayar bilimleri ilerlemeleri bir arada kullanıldı (14, 15). Bu teknik birçok ülkede X'e bağlı hastalıklardan kaçınmak için dişi sığır ve atların üretilmesinde kullanılmaktadır (15).

Yine akım sitometrisi ile maternal kandan fetal lenfosit, trofoblast ve çekirdekli kırmızı kan hücrelerinin elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Anne kanından elde edilen fetal hücreler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve flüoresan insitu hibridizasyon yöntemleri ile incelenebilmektedir. Böylece fetüsün cinsiyeti, doğu grubu (HLA), Rh ve kan grubu; trizomi 13, 18 ve 21; triploidi; ile orak hücreli anemi ve talasemi belirlenebilmektedir. Anne kanından fetal hücrelerin elde edilmesi gelecekte anöploidi taraması ve prenatal tanıda kullanılabilecektir. Ayrılan fetal hücrelerin kültürde üretilmeleri ve karyotiplerinin yapılması, birçok kromozomal ve genetik hastalığın tanısında kullanılabilir. Ancak bu tekniklerin rutin laboratuarlarda kullanılabilmeleri için daha fazla geliştirilmeye ve standardize edilmeye gereksinimleri vardır (16).

Bunların dışında akım sitometrisi, hücrelerin total protein ve RNA miktarlarının belirlenmesi, hücre ve hücre organellerinin pH'larının ve membran potansiyellerinin, hücrelerin redoks potansiyellerinin, hücre yüzey reseptörlerini (örneğin LDL reseptörü) hücre içi enzim aktivitelerinin ölçülmesi gibi çok sayıda alanda kullanılabilen bir araştırma aracıdır.

## KAYNAKLAR

1. Shapiro HM, "Cellular Astronomy"- A Foreseeable Future in Cytometry. Cytometry Part A, 60A:115-124, 2004.
2. McCoy JP, Basic Principles in in Clinical Cytometry. In: Keren DV, Hanson CA, Hurtubise PE, (ed) Flowcytometry and Clinical Diagnosis, Chicago: American Society of Clinical Pathologist, 1994, 26-55.
3. Nguyen AND, Sunheimer RL, Henry JB, Principles of Instrumentation. In Henry JB (ed) Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Philadelphia: WB Saunders Company, 2001, 60-78
4. Paxton HMA, Cunningham-Rundles S, O'Gorman MRG, Laboratory evaluation of the Cellular Immun System. In Henry JB (ed) Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Philadelphia: WB Saunders Company, 2001, 850-877
5. Carey JL, Hanson CA, Flowcytometric Analysis of Leukemia and Lymphoma. In: Keren DV, Hanson CA, Hurtubise PE, (ed) Flowcytometry and Clinical Diagnosis, Chicago: American Society of Clinical Pathologist, 1994, 197-308.

6. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, et.al. US:- Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotype Analysis of Hematologic Neoplasia by Flowcytometry: Standardization and Validation of Laboratory Procedures. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 30: 214-230, 1997.
7. ArguellesAR, Duque RE, Orfao A, Report on the First Latin American Consensus Conference for Flowcytometric Immunophenotyping of Leukemia. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 34: 39-42, 1998.
8. Borowitz MJ, Bray R, GascoyneR, et al. US:- Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotype Analysis of Hematologic Neoplasia by Flowcytometry: Data Analysis and Interpretation. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 30: 236-244, 1997.
9. Sadler DA, Keren DF, Surface Marker Assay in Immunodeficiency Disease. In: Keren DV, Hanson CA, Hurtubise PE, (ed) *Flowcytometry and Clinical Diagnosis*, Chicago: American Society of Clinical Pathologist, 1994, 309-343.
10. Bergeron M, Faucher S, Minkus T, et al Impact of Unified Procedures as Implemented in the Canadian Quality Assurance Program for T-Lymphocyte Subset Enumeration. *Cytometry* 33:146-155, 1998.
11. Hurtubise PE, Monitoring of Monoclonal Antibody Therapy in Transplant Patients. In: Keren DV, Hanson CA, Hurtubise PE, (ed) *Flowcytometry and Clinical Diagnosis*, Chicago: American Society of Clinical Pathologist, 1994, 357-368.
12. Zarbo JR, Quality Control Issues and Technical Conciderations in Flowcytometric DNA and Cell Cycle Analysis of Solid Tumors. In: Keren DV, Hanson CA, Hurtubise PE, (ed) *Flowcytometry and Clinical Diagnosis*, Chicago: American Society of Clinical Pathologist, 1994, 425-469.
13. Ibrahim SF, van den Engh G. High-speed chromazom sorting. *Chromosome Res.* 12 (1): 5-14, 2004.
14. Jhonson LA, Flook JP, Hawk HW, Sex preselection in rabbits; live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting, *Biology of Reproduction* 41: 199-203, 1989.
15. Seidel GE Jr, Garner DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction.* Dec; 124(6): 733-43, 2002.
16. Wachtel SS, Shulman LP, Sammons D. Fetal cells in maternal blood, *Clin Genet.* Feb; 59 (2): 74-9, 2001