



Hücre-Aracılı Sitotoksosite Yöntemleri

Cell- Mediated Cytotoxicity Assays

Öner ÖZDEMİR

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı, Sakarya, Türkiye
Department of Pediatrics, Division of Pediatric Allergy and Immunology, Sakarya University Medical Faculty, Sakarya, Turkey

ÖZ

Hücre-aracılı sitotoksosite ölçen yöntemler radyoaktif maddenin kullanılıp kullanılmadığına göre ikiye ayrılabilir. NK hücre-aracılı sitotoksosite hedef hücreleri işaretleyen radyoaktif kromu (51Cr) kullanan kısa süreli bir testle rutin olarak ölçülür. Bu yöntem bazı avantajlara sahiptir. Oldukça hassas, uygulanımı kolay, düşük spontan salınımlı ve hücrelere toksik olmayan işaretleyici kullanan bir yöntemdir. İşaretleyicinin kısa yarılanma ömrü, radyoaktif materyal ile çalışılma ve ortadan kaldırılma zorunluluğu yöntemin eksiklikleridir. Bu sitotoksosite testinin radyoaktivitesinden kurtulup yüksek hassasiyetini devam ettirecek birçok denemede bulunulmuştur. Sonuç olarak, değişik radyoaktif olmayan yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri sitoliz sonucu LDH gibi enzimlerin salınımını ya da PKH-26 gibi membran boyalarını kullanan metod olup, radyoaktif testlerden daha az duyarlıdır. MTT'ye dayanan kolorimetrik/enzimatik testler oldukça duyarlı ve yapılması kolay fakat maalesef, adheran (yapışkan) hedef tümör hücrelerle başarılı şekilde uygulanabilir. Karboksi- floresein diasetat gibi floresan boya hedef ve efektör hücre sitoplazmasında kolaylıkla toplanır. Sitotoksosite sonrası, bu boya'nın supernatanta salınımı veya hedef hücrelerde tutulumu hesaplanır. Bununla beraber, bu boya'nın spontan salınımının oldukça fazla olması testin duyarlılığının azalmasıyla sonuçlanan yanlış sonuçlara ve kısa süreli testlerde kullanımının kısıtlanmasına yol açar. Daha sonra, efektör için anti-CD56 ve hedef hücre için anti-CD33 gibi floresan monoklonal antikorları kullanan flow sitometrik yöntemler tanımlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Flow sitometri, NK hücresi, hücre-aracılı sitotoksosite, sitotoksosite

ABSTRACT

Methods measuring cell-mediated cytotoxicity can be divided in two based on whether radioactive material is used or not. NK cell-mediated cytotoxicity is routinely measured with a short-term assay by utilizing radioactive chromium (51Cr) marking the target cells. This method has several advantages. It is highly sensitive, easy to execute, has low spontaneous release, and utilizes a marker that is nontoxic to the cells. The drawbacks of the method include the short half-life of the label, and the necessity for handling and disposal of radioactive supplies. Many attempts have been made to adapt this cytotoxicity assay to abolish radioactivity while maintaining its high sensitivity. Consequently, various nonradioactive methods have been developed. One of these methods utilizing the release of enzymes (LDH) as a result of cytolysis or membrane dyes (PKH-26) is usually less sensitive than radioactive assays. MTT-based colorimetric/enzymatic assays are highly sensitive and easy to use but unfortunately work well only with adherent tumor cell targets. Fluorescent dyes such as carboxy-fluorescein diacetate can easily accumulate in the cytoplasm of effector or target cells. After cytotoxicity, the release of these dyes into the supernatant or their retention in target cells is calculated. However, spontaneous release of these dyes can be quite high, causing false results resulting in decreased sensitivity and restricting their use in short-term assays. More recently, flow cytometric methods using fluorescent monoclonal antibodies such as anti-CD56 for effector and anti-CD33 for target cells have been defined.

Key words: Flow cytometry, NK cell, cell-mediated cytotoxicity, cytotoxicity

Geliş Tarihi: 07/01/2018 • **Kabul Tarihi:** 21/03/2018

Received: 07/01/2018 • **Accepted:** 21/03/2018

GİRİŞ

Derlememize öncelikle hücre-aracılı sitotoksosite (cell-mediated cytotoxicity)'yi tanımlayarak başlamak istiyoruz. Sitotoksosite efektör hücrenin medyatörleri ve/veya membran reseptörleri aracılığıyla apoptoz/nekroza yol açan mekanizmalarla hedef hücrenin ölümünün gerçekleşebilmesini anlatmaktadır (1). Hedef hücrenin ölümünü (sitoliz) ölçme yöntemleri radyoaktif madde kullanılıp kullanılmadığına göre ana olarak literatüre göre ikiye ayrılabilir. İki değişik ana yöntem radyoaktif ve radyoaktif olmayan enzimatik, membran/floresan boyama ile akan hücre ölçer'in kullanımını içermektedir. Hücre-aracılı sitotoksosite ölçümü klinikte özellikle bazı immünolojik hastalıkların tanısında yardımcı olabilmektedir. Bunlar arasında doğal immünitenin unsuru olan NK (doğal katil) hücre hastalıkları ve immün regülasyonu ilgilendiren ve sitotoksitenin bozulduğu hemofagositik bozukluklar (Chediak Higashi, Griscelli Sendromu vb.) gelmektedir (2).

Hücrel sitotoksositeyi değerlendirmede kullanılan efektör hücre olarak; periferik kandan pür olarak elde edilen NK hücre topluluğu ile tümör hücrelerinden geliştirilen NK hücre dizileri olan KHYG-1, NK-92 ve YT hücre dizileri kullanılır. Ayrıştırılmamış periferik kan mononükleer hücre popülasyonu da periferik kan NK hücre sitotoksitesini ölçmekte kullanılır (3,4). Ayrıştırılmamış CD8+-CTL (sitotoksik T lenfosit) hücreleri veya CTL hücre dizisi AJY gibi hücreler de değişik hedef hücrelerine karşı kullanılabilir (5). Effektör olarak kullanılacak hücreler IL-2 ve/veya IL-15 gibi belli sitokinlerle stimüle edilerek lenfokinle aktive edilmiş katil (LAK)- hücreler haline getirilir ve sitotoksosite testlerinde kullanılabilir (6).

NK ve CTL doğal ve adaptif immün cevabın ana hücreleridir. Virüs ile enfekte ya da malin hücre gibi MHC-I ekspresyonunu kaybeden hedef hücrelere karşı savunmada NK hücreler önde gelmektedir. CTL hücreleri ise, adaptif sistemin cevabını oluşturmak için en az üç sinyal ile işlev kazanırlar. Fakat her iki hücre de sitolitik granülleri içermesiyle işlev görürler (7). CTL ve NK hücreleri için hücre-temasına bağlı sitotoksosite gelişimi belirleyici bir durumdur. *In vitro* sitotoksosite çalışmalarında, temasla işleyen iki major mekanizma tespit edilmiştir. İlki hücre içindeki litik granüllerin, por oluşturan perforin ve pro-apoptotik serin proteazlar (granzimler) gibi, dışarı atılmasıyla hedef hücrede lizise yol açan yolları aktive etmesine dayanır. İkincisi;

efektör hücrenin TNF aile üyesi, TNF- α , Fas ligand (FasL) veya TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) gibi, hedef hücrede apoptozu tetikleyen reseptörleri uyarmasıdır (7). Hücrel sitotoksositeyi değerlendirmede hedef hücre tipi olarak; NK hücrelerine duyarlı (NK-sensitif) tümör hücreleri olan K562 (insan kronik myeloid lösemi hücre dizisi), YAC-1 (lenfoma) gibi hücre dizileri kullanılır (8). NK-dirençli / LAK- duyarlı: Raji ve Daudi (Burkitt lenfomadan türeyen) hücre dizileri kullanılır. Diğer kullanılan lösemi hücre dizileri: EM-2 (KML), EM-3 (KML), Jurkat, THP-1, HL60 (AML), U937 gibi hücrelerdir (9).

Burada sitotoksosite ölçmede kullanılan radyoaktif metotlardan başlanarak bunların avantaj ve dezavantajları öncelikle anlatılacak ve sonra radyoaktif olmayan metotlar detaylıca irdelenecektir.

RADYOAKTİF YÖNTEMLER

Krom Salınım Metodu

(Chromium (⁵¹Cr) Release Assay: CRA)

Brunner ve ark. tarafından 1968'de ilk olarak tanımlanmıştır (10). *In vitro* hücre- aracılı sitotoksosite değerlendirmesinde, lizis sonrası hedef hücreye yüklenen radyoaktif ⁵¹Cr - Na₂ 51CrO₄'un salınımının ölçülmesine dayanır. Bu alanda çalışan araştırmacılar tarafından halen altın standart ve en popüler yöntem olarak kabul edilir. Kolay yapılabilen ve tekrarlandığında aynı sonuçların alınabildiği bir test olarak bilinmesi avantajları arasındadır (11). Sitotoksosite ölçmede kullanılan radyoaktif veya non-radyoaktif değişik metotlar araştırma ve metodun oturtulması aşamasında, altın standart test olan CRA ile kıyaslanır ve aralarındaki korelasyona bakılır.

Sakıncaları /Eksiklikleri

⁵¹Cr radyoizotop ve uçucu (volatil) element olduğundan kullanım sırasında itina gerektirmenin yanında, pahalı ve yarı ömrü kısa sürelidir. Radyoizotop madde lisans, depolama, atık ve denetimini gerektirir (12,13). Metabolizması yavaş ya da sitoplazma/nükleüs oranı düşük olan hedef hücreyi işaretlemesi zordur. Hedef hücredeki hasarı/ölümü yansıtmada gecikir. Hedef tek hücre yerine hücre topluluğu düzeyinde ölçüm yapar. Hedef hücreyi teste hazırlama zaman alıcıdır. İşaretleme için fazla hedef hücre sayısını gerektirir. İşaretlediği hedef hücreden spontan olarak salınım özellikle uzun süreli testlerde %15'i bulabilir (5).

JAM (Jurkat Apoptosis Measurement: Jurkat Apoptoz Ölçümü) Testi

Krom salınım metodunun dezavantajlarından dolayı alternatif radyoaktif metot olarak bu test Matzinger tarafından ilk olarak Jurkat hücre dizilerindeki apoptoz ölçüm çalışmaları sonucunda 1991 yılında bildirilmiştir (14). Bu testte hedef hücre radyoaktif prekürsör DNA-nükleotidleri, trityum [3H] metil-timidin DNA fragmanları, işaretleme için kullanılır ve hedef hücre hasarı sonucu işaretli DNA parçacıkları salınımı ölçülerek hedef hücre ölümü ölçülür. Hedef hücrede apoptozu ölçen kantitatif radyoaktif metot olarak kabul edilir. Dezavantajı radyoaktif bir yöntem olması denilebilir. CRA ile karşılaştırıldığında, daha ucuz, kolay, duyarlı ve güvenilir kabul edilmesi avantajları olarak sayılabilir (15).

RADYOAKTİF OLMAYAN ENZİMATİK YÖNTEMLER

Bu yöntemler de hedef hücre içindeki enzimin etkisiyle oluşan reaksiyon ya da bu enzimlerin hücre hasarı sonucu salınımının ölçümüne dayanır.

Laktat Dehidrogenaz (LDH) Salınım Yöntemi (LDH Release Assay)

1983'de Korzenniewski ve Callewaert tarafından ilk olarak tanımlanmıştır (16). Lizise uğramış hedef tümör hücrelerinden LDH salınımı ölçülür. Ortama salınan LDH miktarı, ölen hücre sayısı ile orantılıdır. Ölçümü için hazır kitleri ticari olarak satılmaktadır (17). Önemli dezavantajı ortama salınan enzimin sağlam kalan hücreler tarafından tekrar hücre içine geri alınımı (re-uptake) dır. Yöntemin CRA ile korele, duyarlı ve kolay uygulanabilir olması avantajlarındandır.

MTT Kolorimetrik Yöntem

Hemato-onkolojide tümör hücrelerinin kemoterapötik ajana cevabını (duyarlı/dirençli) ölçmek için araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Kemoterapötik ya da sitotoksikite maruziyeti sonucunda canlı kalan hedef hücrenin mitokondriyel enzim kapasitesine bağlı sarı solübl tuz olan MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)'nin mor-mavi insolübl formazana dönüşen presipitatının organik çözücüde çözünmesi sonrasında spektrofotometrede kantitatif ölçülmesine dayanır (18). MTT testinde formazan üretimi direkt olarak canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Sonuçta, in vitro ortamda K562 tümör hücresine karşı

NK sitotoksitesi ölçülür. Güvenilir, CRA ile iyi oranda korele, kolay uygulanan, duyarlı bir yöntem olan MTT'nin tek kullanımlık çok sayıda küçük kuyucuklarda değişik efektör/hedef hücre oranlarında ölçüme imkân sağlaması da bir avantajıdır. Dezavantajı sadece adherent (yapışkan) hücre dizilerinde uygulanabilmesidir (19).

Granzyme B ELISPOT Testi

Sitotoksik hücreler olan CD8+- CTL ve NK hücresinde bulunan serin esteraz düzeyini ölçmeye yönelik testtir. Hedef hücre ile karşılaşan sitotoksik hücrede meydana gelen stimülasyon ile granzim B enzim düzeyi artar. Bu metot için de, özel bir kit geliştirilmiştir (20). Güvenilir, CRA ile korele olması ve kolay uygulanabilmesi yanında, gerçek bir sitolizden ziyade sitotoksik hücrenin kapasitesini yansıması dezavantajıdır.

RADYOAKTİF OLMAYAN FLORESAN İŞARETLEME YÖNTEMLERİ

Radyoaktif ve radyoaktif olmayan yöntemlerdeki yetersizlik ya da zorluklardan dolayı radyoaktif olmayan floresan boya ya da monoklonal antikorlarla hedef hücreyi işaretleme teknikleri ve bunların akan hücre ölçerde kullanımlarıyla yeni yöntemler geliştirilmiştir.

Akan Hücre Ölçer Yöntemlerinin Genel Özellikleri

Akan hücre ölçer yöntemlerinden halen standart kabul edileni ve rutin kullanılanı yoktur. Her merkez kendine göre uyarladığı yöntemlerle ölçüm yapmakta ve yönteminin geçerliliğini altın standart kabul edilen krom salınım metoduna göre belirlemektedir.

Akan hücre ölçer yöntemleri önce tek, çift ve sonra çok renkli yöntemler haline gelmiştir (1). Tek boyalı ve hücrenin ışık saçıcı (light scattering) özelliklerine dayalı akan hücre ölçer yöntemleri ilk olarak kullanılanlardandır (Şekil 1). Değişik floresan boya ya da mAb ile hedef hücrenin membran ya da DNAsını boyayarak hedef hücrede ölümü (sitotoksiteyi) ölçmeye yararlar.

Floresan Madde ile Membran Boyama Örnekleri

Burada bazı floresan madde ile membran boyama tekniklerine dayalı sitotoksikite ölçmeye örnekler verilecektir.

Lipofilik Membrana Bağlanan Floresanlar

Lipofilik olup membrana bağlanan boyalar F-18 (octadecylamine- fluorescein isothiocyanate), PKH-2, PKH-26, Europium (Eu3+), MitoTracker Green (MTG)

gibi floresan olup sitotoksosite ölçümünde kullanılabilir. Bunlar genellikle yeşil ve kırmızı floresan boyalar olup, hedef ve efektör hücreyi işaretlemeye kullanılırlar. PKH-26, DiOC18 gibi boyalarda ise membran fiksasyonu belirgin olup bunun ko-inkubasyon esnasında sitotoksosite üzerine etkisi net bilinmemektedir (5,9,11,21-24). Kolay, duyarlı ve güvenilir olmaları yanında, hücrelerin bu boyaları sızdırması da önemli bir dezavantajdır.

Karboksi- Fluoresein Diasetat (CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl ester)

Membran boyamaya ve sitoliz sonrası boya salınımını mikroflorimetre ile ölçmeye dayanan metottur. Kısa süreli deneylerde yüksek orandaki salınım yanlış sonuca yol açar (25).

Floresan Madde ile DNA Boyayan Yöntemler

Aminoactinomycin (7-AAD), PI (propidium iyodür), CAM (Calcein-AM: calcein acetoxymethyl ester) ve TO-PRO-3 iodide vb. hedef hücrede DNA boyayarak hücrede ölümü yansıtır. Önceden aminoactinomycin (7-AAD) ve PI sıklıkla kullanılmasına rağmen (25,26), daha sonraları günümüzde CAM ön plana çıkmıştır. Dezavantajı membran lizise uğradığında sızıntı problemi

olabilir. Floresan madde ile DNA boyayan yöntemler kolay uygulanır, duyarlı ve güvenilir olmasına ilaveten; uzun süreli (4 saatten uzun) sitotoksosite testlerinde özellikle başarılıdır (27).

CAM (Calcein-AM: calcein acetoxymethyl ester)

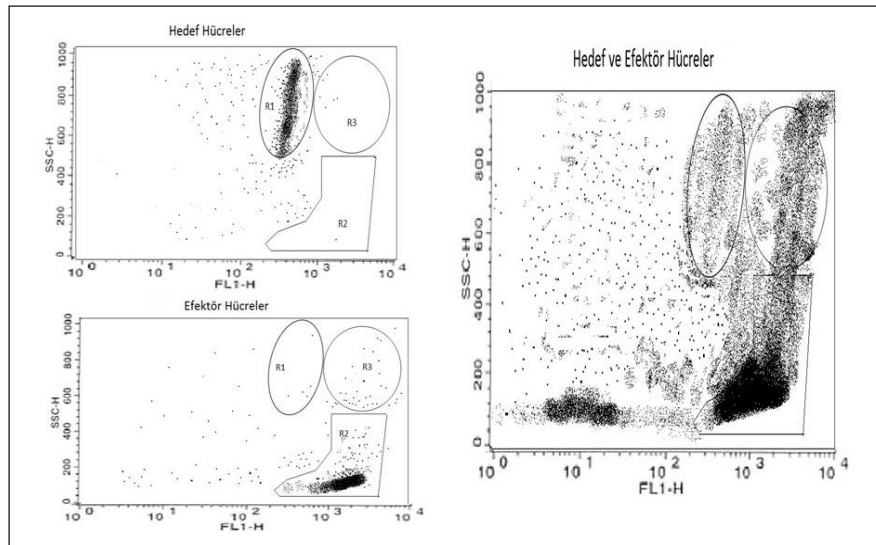
Effektör ve hedef hücre boyama için kullanılmış bir DNA boyamasıdır. İnkübasyon sonrası diğerlerine göre düşük oranda bile olsa spontan salınım ve hücreye yüklenmesinin düşüklüğü/zorluğu dikkat çekmektedir (27).

Kırmızı / Yeşil Floresan Boyalar

Membran ve DNA işaretleyicilerden PI ve PKH-26 kırmızı floresan boyalardır. PKH-2, F-18, CAM, DiOC18 (D275) ise yeşil floresan boyalar olarak bilinmektedir (21-27).

Akan Hücre Ölçerde Hedef ve Effektör Hücrenin Monoklonal Antikorla İşaretlenmesi

Membrana bağlanan floresan monoklonal antikor (mAb) efektör, hedef hücre ve konjugat (effektör hücrenin hedefe yapışmasının) seçiminde ve işaretlemeye kullanılır. Effektörleri işaretlemeye kullanılan monoklonal antikorlar anti-CD2, anti-CD5, anti-CD7, anti-CD16



Şekil 1. Başlangıç flow sitometrik hücre-aracılı sitotoksosite çalışmalarında, hücrelerin ışık saçma karakteristikleri (SSC: granülasyon gibi) de hesaba katılarak hedef ve efektör hücreler ayırt edilmiştir. Hedef hücre olan K562 ve konjugat (effektörün hedefe bağlandığı) topluluğu histogramda yukarıda ve efektör periferik kan lenfositleri aşağıda yer alarak net ayırım görülmektedir. Histogramda R1,R2,R3 alanları birinci, ikinci ve üçüncü bölgedir. Hedef (R1) ve efektör (R2) hücreler önce kendi başlarına sonra koinkube edildiklerinde, konjuge halde (effektörün hedefe bağlandığı: R3 alanı) histogramda temsili dağılımı görülmektedir. Bu yöntemde koinkubasyon sonrası hedef hücre ve konjugattaki hedef hücrelerde olan ölüm PI, 7-AAD, AnnV gibi floresan boyalarla ölçülerek sitotoksosite hesaplanmaktadır (34 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

ve anti-CD56'dır (8,9). Hedef hücreleri işaretlemeye kullanılan monoklonal antikorlar anti-CD19, anti-CD33, anti-CD58' dir. Hedef hücrelerinde apoptozu ölçmek için AnnexinV (AnnV); nekrozu ölçmek için 7-AAD veya PI kullanılır (28-30).

Akan hücre ölçerlerde floresan mAb ile işaretleme kullanan yöntemlere örnek olarak aşağıda kendi yöntemi-mizden kısaca bahsedeceğiz.

Yöntemimiz: Flow Sitometrik Hücre-Aracılı Sitotoksinite Testi (Flow Cytometric Cell-Mediated Cytotoxicity Assay)

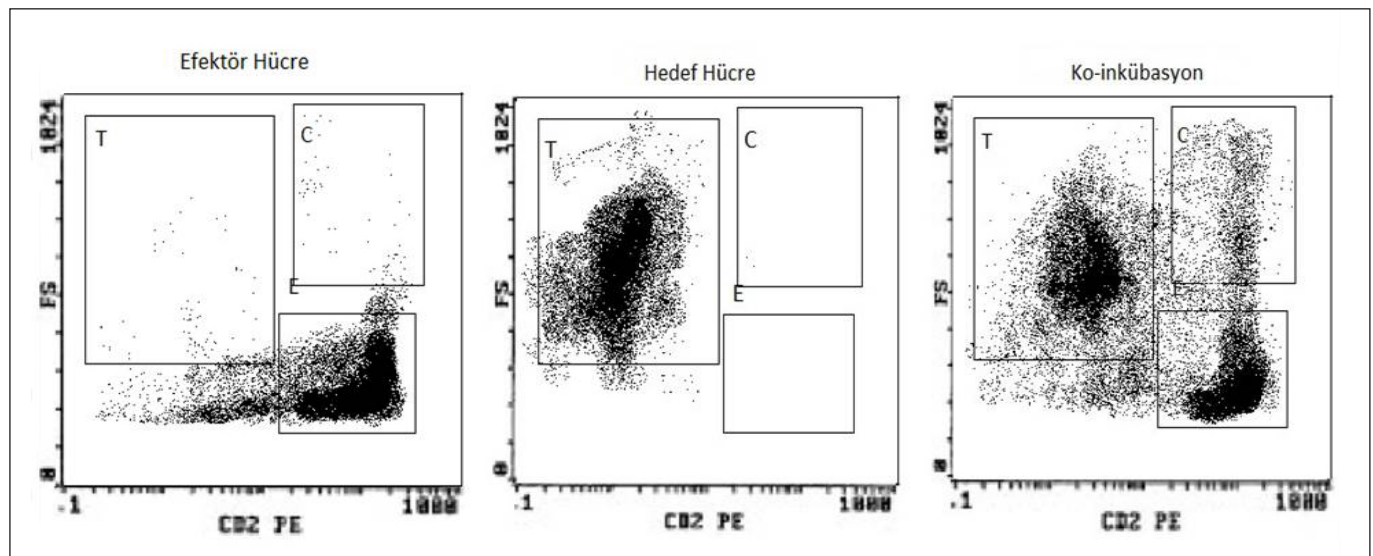
Üç renkli akan hücre ölçer yöntemidir. Spesifik florokrom- bağlı mAb boyama ile hedef hücre ve efektör ayrımı yapılır. K-562 hedef hücre boyaması için anti-CD33-PE, Daudi veya Raji hücreleri için anti-CD19-PE florokrom boya kullanılır (8).

Effektör boyama için bu yöntemi geliştirme esnasında, anti-CD2-PE, anti-CD5-PE, anti-CD7-PE mAb kullanılmıştır. En başarılı mAb olarak anti-CD2-PE bulunmuştur. Ko-inkübasyon sonrasında, hedef hücre ölümünü ölçmek için annexin V (AnnV) / propidium iodid (PI) ortama katılır (Şekil 2,3). Mutlak apoptotik/nekrotik hücre ölüm sayıları da ortama katılan floresan boncuk: fluorosfer sayıları yardımı ile hesaplanır. Fluorosfer ile kalibrasyon ve absöüt sayı (%'de değil, kümülatif ölüm) ölçülmüş olur (8).

Yöntemimizin avantajları arasında; başlıca boya sızıntı probleminin ve hücre membran fiksasyonunun olmamasını sayabiliriz. Yöntemimizle hedef hücre ve konjugasyon toplulukları seçilip bunlarda direkt olarak ölüm hesaplanabilir. Kısa sürede gerçekleşen (≤ 4 saat) sitotoksiniteyi saptamada olduğu kadar, uzun süreli sitotoksinite (≤ 24 saat) ölçümlerinde de çok etkindir. Yine ölümü erken apoptoz ve nekrotik ölüm olarak ölçer. CRA ile çok iyi korele ($\geq 90\%$) bulunmuştur (8,15,35). Effektör ya da hedef hücreyi değiştirerek yani değişik efektör (mast hücre) ve hedef tümör hücreleri (Daudi, Raji, U937, HLA, Meg-01 vb.) kullanılarak yöntem yine de uygulanabilir (31-33). İleride multiparametrik uygulamaların (ölüm dışında hücredeki farklı metabolik vb. değişimleri) aynı anda yapılmasına açıktır. Kesitsel olarak anlık değil de kümülatif ölçümü değerlendirebilmesi de diğer bir üstünlüğüdür (34,35).

Spesifik florokrom- bağlı özgün mAb boyama ile hedef ve efektör hücre ayrımı yapılır. Effektör olarak periferik kandan üretilen NK ve LAK hücreleri dışında mast hücre kullanıldığında da yöntemimiz başarılı bulunmuştur (6,31). Lösemi grubu tümör hücrelerini hedef hücre olarak kullanırsak anti-CD33-PE mAb en uygun olanıdır (Şekil 2,3).

Çok düşük ($1/2:1$) E (effektör):T (target/hedef hücre) oranlarından başlamak üzere 128:1 ya da 256:1'lere kadar,



Şekil 2. Flow sitometride kullanılan efektöre özgün floresan monoklonal anti-CD2 PE antikoruna bağlanma ve ışık saçma karakteristiğine (FS: büyüklük) göre efektör (E alanı), hedef hücre (T alanı) ve koinkübasyon sonrası konjugasyon (effektörün hedefe bağlandığını) gösteren hücrelerin (C alanı) birbirinden ayrılması histogramda görünmektedir. Effektör hücreler aşağıda, hedef hücre ve konjugat daha yukarıda görünmektedir (9 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

doğru ve CRA ile korele sonuç verdiğini gözlemledik. Sitotoksitenin de artan E:T oranlarına paralel şekilde arttığını gösterdik (8).

Yine kısa ve uzun süreli sitotoksosite ölçümlerinde; ½ saatten 18- 24 saate kadar kısa ve uzun süreli inkubasyonlarda bu metodun sitotoksositeyi diğerlerine kıyasla daha başarıyla ölçtüğünü gördük (36).

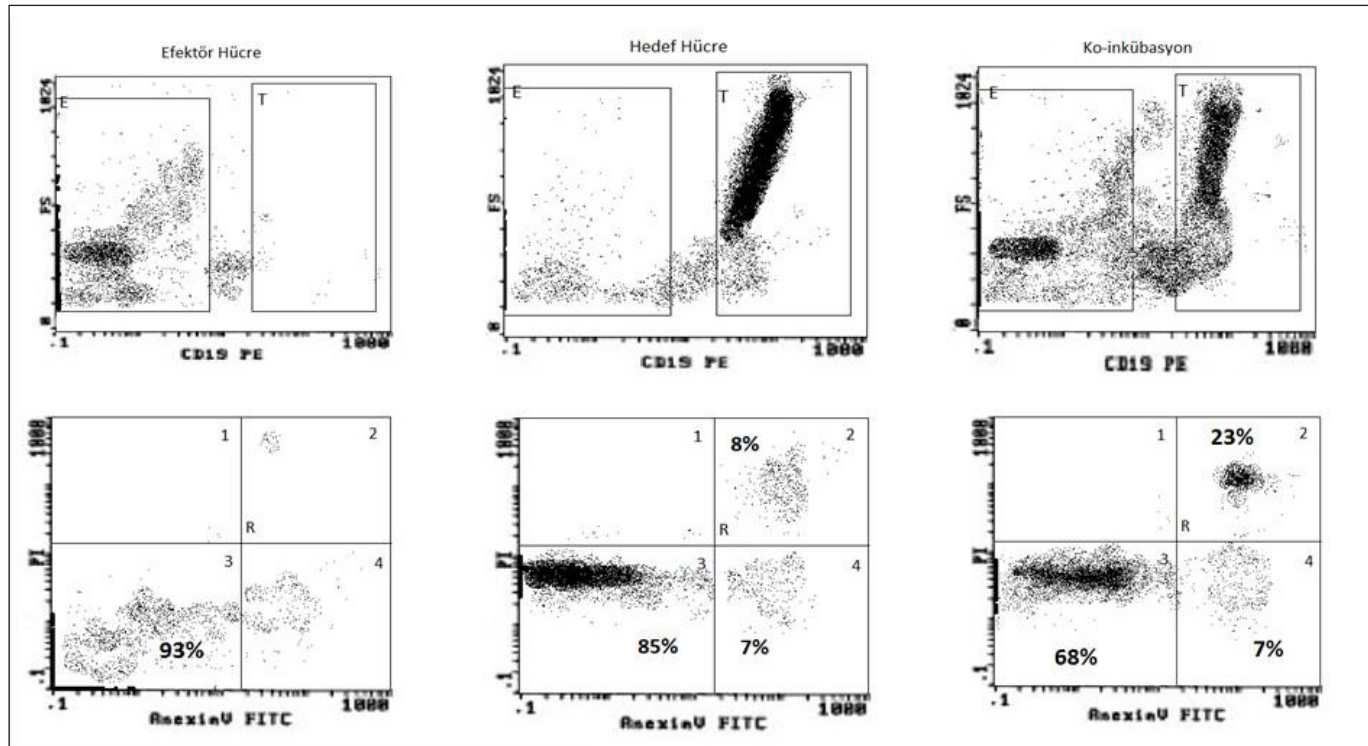
Kesitsel olarak 'yüzde sitotoksosite' hesaplamasında, hedef hücrede olan ölüm (sitotoksosite) hesaplanır. Öncelikle kontroldeki canlı hücre oranı, kontroldeki toplam hücre sayısının spontan gerçekleşen ölümden çıkartılmasıyla bulunur. '% sitotoksosite: %Kontrol canlı hücre- %Ko-inkubasyon canlı hücre / %Kontrol canlı hücre' olarak formüle edilebilir. 'Kümülatif sitotoksosite' ölçümünde, yukarıda belirtilen oranlar floresferle belirlenen mutlak rakamlar üzerinden hesaplanır. Çoğu akan hücre ölçer çalışması hücre konsantrasyon ve

mutlak hücre sayılarını göstermede yetersiz olduğundan, bu eksikliği gidermek için floresferler (hücre sayım boncukları) geliştirilmiştir (8,31).

Akan Hücre Ölçerde Effektör Hücre Membranında Floresan Monoklonal Antikorla Ekspresyon Değişimini / Degranülasyonu Ölçerek Gerçekleştirilen Sitotoksosite Testi

Akan hücre ölçerde efektör hücre de benzer şekilde, lipofilik boya membrana tutunarak ya da hücre içine girerek işaretlenir. Böylece efektör hücre de işaretlenerek hedef hücreden ayrılır ve hedefe kapılma yapılarak ölümün ölçülmesi sağlanabilir.

Yukarıda anlatıldığı gibi, efektör hücrede degranülasyon moleküllerinin (LAMP1/ CD107a) ekspresyonu ile ölçülür. Effektör hücre anti-CD56 mAb ile işaretlenip, hedef tümör hücreyle karşılaşma sonrasında oluşan



Şekil 3. Flow sitometride kullanılan hedef hücreye özgün floresan anti-CD19 PE monoklonal antikor ve ışık saçma karakteristiğine (FS: büyüklük) göre efektör (E alanı), hedef hücre (T alanı) ve konjugasyon (effektörün hedefe bağlandığını) gösteren hücrelerin birbirinden ayrımı üstteki histogramlarda görünmektedir. Konjugasyon yapan hücreler hedef hücre topluluğunun içinde (koinkübasyonun ilk aşaması) ve koinkübasyonun ilerlemesi ile alt kısmında toplanmaktadır. Altta grafiklerin soldan başlayarak ilki üstteki efektör (E alanına), ikincisi yukarıdaki target (T) topluluğuna ve üçüncüsü de yine T topluluğuna kaplanmış. Altta histogramlarda annexin V/PI boyalılarıyla efektör, hedef ve konjugasyon yapan hedef hücrelerdeki ölüm değerlendirilebilmiştir. Altta histogramlarda R1 nekrotik (AnnV- / PI+), R2 geç apoptotik (AnnV+/ PI+), R4 erken apoptotik (AnnV+ / PI-) ve R3 canlı hücreleri (AnnV- / PI-) ifade etmektedir. Koinkübasyon sonrası hedef hücredeki canlılığın %93'den %68'e indiği anlaşılmaktadır. (9 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

stimülasyona cevap veren efektör NK hücre yüzdesini gösterir. Fakat bu yöntemin gerçekte hedef hücredeki sitolizisi doğru yansıtıp yansıtmadığı hakkında tartışma vardır (37).

CD107a, NK hücre sitotoksitesinin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmekle beraber, NK hücre işlevlerinin detaylı değerlendirilmesinde de faydalı olabilir. Yukarıda bahsedilen metotta tam kan kullanılmakla beraber, hücre dizisi kullanılmadığından hücre kültür laboratuvarları gerekmez. Düşük miktar tam kan gerektirmesi, maliyet etkin olması ve daha az zaman alıcılığı nedeniyle akan hücre ölçerinin bulunduğu yerlerde rutin klinikte uygulanabilecek bir test örneğidir (37).

NK hücre sitotoksitesinin ölçümü NK hücre sayı ve fonksiyonlarındaki bozuklukla (klasik veya fonksiyonel NK hücre eksiklikleri) giden durumlarda gereklidir. NK hücre fonksiyonunda bozulma veya azalmış NK hücre ve alt grup sayıları ile sonuçlanan genetik mutasyonlar, 50'den fazla primer immünyetmezlik hastalığı ile ilişkilidir (38).

Bu testle aynı zamanda yapılan hücre içi perforin boyaması immün regülasyon bozukluklarından olan lemfoblastik tip 2 hastalığının tanısında faydalıdır. Bu metot ayrıca defektif granül salınım mekanizmasıyla giden tip 3, tip 4, Griscelli sendromu ve Chediak-Higashi sendromunun akkiz lemfoblastik hastalığından ayırımında yardımcıdır (37).

Akan Hücre Ölçerinde Hedef Hücrede Floresan Boya ile Apoptozu Ölçen Enzimatik (florojenik kaspaz substratı) Yöntem

Yukarıda değinildiği gibi, apoptozu giden hedef hücre membranında dışa doğru yer değiştiren fosfatidilserine bağlanan membran boyası Annexin V apoptozu ölçmek için yaygın olarak kullanılır. Bunun yanında hedef hücrede apoptozu ölçen enzimatik metot da tarif edilmiştir. Bu metotla, C57BL/6 faresinde efektör hücre ile ko-inkubasyon sonrası CTO (cell tracker orange) boyalı hedef hücrede başlayan apoptotik sürecin ölçülmesi, kaspaz enziminin aktivasyonu gösteren floresan boyama (florojenik kaspaz substratı) ile gösterilir. Kaspaz, bilindiği gibi apoptozu başlatan yolun ilk enzimatik (erken apoptoz) unsurudur. Bu yöntemin apoptozu yansıtmada daha hızlı, duyarlı, güvenli ve topluluk yerine tek hücre düzeyinde ölçüm yaptığı iddia edilmektedir (39). Bu yolun değişik stimulanlarla tetiklenebilmesi ve kaspazla

başlayan apoptozun her zaman ölümle sonuçlanıp sonuçlanmayacağına dair sorular gibi dezavantajları vardır.

Akan Hücre Ölçer Yöntemlerinin Genel Dezavantajları

Floresan boyamalar hedef hücrenin sitotoksitesine hassasiyetini değiştirebilirler. Yine çoğu boyamada yöntem lizis sonrası hedef hücre membran permeabilite artışına dayanır. Fakat bu inkubasyon esnasında sızıntı nedeniyle artefaktlara yol açabilir. Ayrıca, bazı boyaların floresan sinyali de düşük yoğunlukta olduğundan sitotoksitesiyi saptamada zorluğa yol açabilir (Tablo I) (3-5,11,15,22,23).

HÜCRE-ARACILI SİTOTOKSİSİTE ÖLÇEN YÖNTEMLERİN KISACA KARŞILAŞTIRILMASI

Radyoaktif yöntemler hâlâ altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, yakın gelecekte yerini daha geliştirilmiş akan hücre ölçer yöntemlerine bırakacağı kesin gibidir (Tablo I). Akan hücre ölçerinde kullanılan bu yöntemlerde de mAb' ların hedef ve efektör hücre için floresan işaretleyici olarak kullanılması en uygun görünmektedir. Diğer floresan boyamaların çoğunun ko-inkubasyon öncesinde hedef hücreye yüklenmesi gereklidir. Halbuki mAb ile boyama ko-inkubasyon sonrasında yapıldığından; bu hem ko-inkubasyondaki sızıntı problemini hem de öncesinde oluşabilecek membran fiksasyonu nedeniyle sitotoksitesiyi etkileme ihtimalinin önüne geçebilmektedir (3-5,8,9,11,15,22,23). Tüm yöntemlerin kendi içinde ve birbiriyle kıyaslandığı tablo aşağıda verilmiştir (Tablo I).

GELECEKTEN BEKLENTİLER: ÇOK RENKLİ AKAN HÜCRE ÖLÇER TESTİ, MULTİPARAMETRİK YÖNTEMLER VE GÖRÜNTÜLEME

Günümüzdeki akan hücre ölçer yöntemlerinde efektör mAb ile (CD3-CD16/56+) ve hedef hücre floresan boya (CTO) yanında FCS/SSC gibi ışık saçma karakteristikleri ile aynı anda gerçekleşen çalışmada net şekilde ayrılabilen, 7-AAD ile de hedef hücrede ölüm ölçülebilmektedir. Aynı anda çok sayıda boyama ve hücrenin kendi özellikleriyle hücreler ayrıştırılarak durumu hakkında değerlendirme yapılabilmektedir (25,35).

Son zamanlarda akan hücre ölçer yöntemlerinde birden fazla değişik amaca yönelik boyama kullanılarak hücreyi multiparametrik olarak değerlendirdiği kadar, efektör ve hedef hücreleri yanında konjugasyondaki hücrelerin

Tablo I. Hücre (NK) - aracı sitotoksosite yöntemlerinin karşılaştırılması.

Metotlar	Avantajları	Dezavantajları	Kaynaklar
I. Radyoaktif			
CRA	Altın standart	Radyoizotop	5,12,13
	Basit test	Pahalı ve yarı ömrü kısa	
	Tekrarlanabilir sonuç	Spontan salınım	
JAM	Nekrozu ölçer	Büyük ve çok sayıda hücre gerekir	14,15
	Apoptozu ölçer	Radyoaktif	
	Ucuz	Kolay, duyarlı ve güvenilir	
II. Non-radyoaktif Enzimsel testler			
LDH, MTT, Granzim B	Korele, kolay, duyarlı	Geri alım-reuptake (LDH) Adherent hücre (MTT) İndirekt ölçüm (Granzim)	16-20
III. Non-radyoaktif Floresan Boyalar			
<i>DiOC18, PKH, CAM</i>	Kolay, duyarlı ve güvenilir	Membran fiksasyonu	21-27
		Sızdırma	21-27
Florojenik kaspaz	Daha hızlı, duyarlı, güvenli	Hücre ölümünün gerçekleştiğini yansıtır mı?	38
	Tek hücre düzeyinde ölçüm	Farklı stimulanların etkisi?	
FCM- mAb	Tek hücre düzeyinde	Antikor özgünlüğü	28-30
	Konjugasyon	Ölü hücre işaretleme zorluğu	
	Kolay ve direkt ölçüm	Düşük floresan sinyali	
FCM- CMCA (mAb)	Multi-parametrik		6,8,9,31-33
	Apoptoz-Nekroz ölçme	Ölü hücre işaretleme zorluğu	
	Uzun-kısa süreli		
Degranulasyon (mAb)	Çok iyi korele		37
	Kümülatif sitotoksosite		
	Kolay	İndirekt ölçüm (gerçek ölüm?) Farklı stimulanların etkisi?	

NK: Natural killer, **CRA:** Krom salınım testi, **mAb:** Monoklonal antikor, **FCM:** Flow sitometrik, **CMCA:** Hücre-aracı sitotoksosite testi.

tek hücre düzeyinde ve net olarak imajı alınabilir, resimle görüntülenebilir hale gelmiştir (40,41). Yine bu akan hücre ölçerlerde kullanılan hücre-aracı sitotoksositeyi ölçen metotlar NK ya da CTL dışında da başka T- hücreler ($\gamma\delta$ T hücresi) için de kullanılmaya ve geliştirilmeye (hızlandırılmaya) çalışılmaktadır (42,43).

Klinik uygulama alanı bu yöntemlerin günümüzde yaygın olmamakla beraber, yakın gelecekte özellikle kanser immünoterapisi (yeni klinik denemeler ve kanser aşlarına immün sistemin cevabının ölçülmesi gibi) ya da sitotoksitenin bozulduğu bağışıklık sistemi hastalıkları gibi alanlarda çok renkli ve çok değişkenli ölçümlerin aynı zamanda yapılabildiği akan hücre ölçer yöntemleri önem kazanacaktır.

SONUÇ

Sitotoksosite ölçen radyoaktif yöntemler altın standart olma özelliklerini kaybetmemesine rağmen, hedef ve efektör hücre işaretleyicisi mAb'ların kullanıldığı akan hücre ölçer yöntemleri günümüzde ön plana çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

- Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 1998;188(12):2375-80.
- Sieni E, Cetica V, Mastrodicasa E, Pende D, Moretta L, Griffiths G, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: A model for understanding the human machinery of cellular cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(1):29-40.

3. Suck G, Branch DR, Smyth MJ, Miller RG, Vergidis J, Fahim S, et al. KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity. *Exp Hematol* 2005;33(10):1160-71.
4. Valiathan R, Lewis JE, Melillo AB, Leonard S, Ali KH, Asthana D. Evaluation of a flow cytometry-based assay for natural killer cell activity in clinical settings. *Scand J Immunol* 2012;75(4):455-62.
5. Goldberg JE, Sherwood SW, Clayberger C. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. *J Immunol Methods* 1999; 224(1-2):1-9.
6. Ozdemir O, Savaşan S. Combinational IL-2/IL-15 induction does not further enhance IL-15-induced lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against human leukemia/lymphoma cells. *Clin Immunol* 2005;115(3):240-9.
7. Zaritskaya L, Shurin MR, Sayers TJ, Malyguine AM. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Rev Vaccines* 2010;9(6):601-16.
8. Kasatori N, Ishikawa F, Ueyama M, Urayama T. A differential assay of NK-cell-mediated cytotoxicity in K562 cells revealing three sequential membrane impairment steps using three-color flow-cytometry. *J Immunol Methods* 2005;307(1-2):41-53.
9. Ozdemir O, Ravindranath Y, Savaşan S. Cell-mediated cytotoxicity evaluation using monoclonal antibody staining for target or effector cells with annexinV/propidium iodide colabeling by fluorosphere-adjusted counts on three color flow cytometry. *Cytometry A* 2003;56(1):53-60.
10. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; Inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968;14(2):181-96.
11. King MA. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000;243:155-66.
12. Roder JC, Haliotis T, Klein M, Korec S, Jett JR, Ortaldo J, et al. A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature* 1980;284(5756):553-5.
13. Morales A, Ottenhof PC. Clinical application of a whole blood assay for human natural killer (NK) cell activity. *Cancer* 1983;52(4):667-70.
14. Matzinger P. The JAM test: A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* 1991;145:185-92.
15. Langhans B, Ahrendt M, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. Comparative study of NK cell-mediated cytotoxicity using radioactive and flow cytometric cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 2005;306(1-2):161-8.
16. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983;64(3):313-20.
17. Weidmann E, Brieger J, Jahn B, Hoelzer D, Bergmann L, Mitrou PS. Lactate dehydrogenase-release assay: A reliable, nonradioactive technique for analysis of cytotoxic lymphocyte-mediated lytic activity against blasts from acute myelocytic leukemia. *Ann Hematol* 1995;70(3):153-8.
18. van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* 1991;141(1):15-22.
19. van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods* 1994;174(1-2):311-20.
20. Ewen C, Kane KP, Shostak I, Griebel PJ, Bertram EM, Watts TH, et al. A novel cytotoxicity assay to evaluate antigen-specific CTL responses using a colorimetric substrate for Granzyme B. *J Immunol Methods* 2003;276(1-2):89-101.
21. Ozdemir O. Evaluation of human mast cell-mediated cytotoxicity by DIOC18 target cell labeling in flow cytometry. *J Immunol Methods* 2007;319(1-2):98-103.
22. Fischer K, Mackensen A. The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity. *Methods* 2003;31(2):135-42.
23. Hopkinson K, Williams EA, Fairburn B, Forster S, Flower DJ, Saxton JM, et al. A MitoTracker Green-based flow cytometric assay for natural killer cell activity: Variability, the influence of platelets and a comparison of analytical approaches. *Exp Hematol* 2007;35(3):350-7.
24. von Zons P, Crowley-Nowick P, Friberg D, Bell M, Koldovsky U, Whiteside TL. Comparison of europium and chromium release assays: Cytotoxicity in healthy individuals and patients with cervical carcinoma. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4(2):202-7.
25. Lecoer H, Février M, Garcia S, Rivière Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001;253(1-2):177-87.
26. Lee-MacAry AE, Ross EL, Davies D, Laylor R, Honeychurch J, Glennie MJ, et al. Development of a novel flow cytometric cell-mediated cytotoxicity assay using the fluorophores PKH-26 and TO-PRO-3 iodide. *J Immunol Methods* 2001;252(1-2):83-92.
27. Jang YY, Cho D, Kim SK, Shin DJ, Park MH, Lee JJ, et al. An improved flow cytometry-based natural killer cytotoxicity assay involving calcein AM staining of effector cells. *Ann Clin Lab Sci* 2012;42(1):42-9.
28. Thakur A, Zaman A, Hummel J, Jones K, Hortelano G. Single-colour flow cytometric assay to determine NK cell-mediated cytotoxicity and viability against non-adherent human tumor cells. *Biotechnol Lett* 2012;34(3):447-53.
29. Cholujová D, Jakubíková J, Kubes M, Arendacká B, Sapák M, Ihnatko R, et al. Comparative study of four fluorescent probes for evaluation of natural killer cell cytotoxicity assays. *Immunobiology* 2008;213(8):629-40.
30. Zimmermann SY, Esser R, Rohrbach E, Klingebiel T, Koehl U. A novel four-colour flow cytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemic cells in peripheral or bone marrow specimens containing greater than 20% of normal cells. *J Immunol Methods* 2005;296(1-2):63-76.

31. Ozdemir O. Flow cytometric mast cell-mediated cytotoxicity assay: A three-color flow cytometric approach using monoclonal antibody staining with annexin V/propidium iodide co-labeling to assess human mast cell-mediated cytotoxicity by fluorosphere-adjusted counts. *J Immunol Methods* 2011;365(1-2):166-73.
32. Savaşan S, Buck S, Ozdemir O, Hamre M, Asselin B, Pullen J, et al. Evaluation of cytotoxicity by flow cytometric drug sensitivity assay in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2005;46(6):833-40.
33. Ozdemir O. Flow cytometric cell-mediated cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 2007;318(1-2):158-9; author reply 160-1.
34. Godoy-Ramirez K, Franck K, Gaines H. A novel method for the simultaneous assessment of natural killer cell conjugate formation and cytotoxicity at the single-cell level by multi-parameter flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000;239(1-2): 35-44.
35. Kim GG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Gooding W, Whiteside TL. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: Comparisons to a 4h ⁵¹Cr-release assay. *J Immunol Methods* 2007;325(1-2):51-66.
36. Johann S, Blümel G, Lipp M, Förster R. A versatile flow cytometry-based assay for the determination of short- and long-term natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 1995;185(2):209-16.
37. Shabrish S, Gupta M, Madkaikar M. A modified NK cell degranulation assay applicable for routine evaluation of NK cell function. *J Immunol Res* 2016;2016:3769590.
38. Mace EM. Requirements for human natural killer cell development informed by primary immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016;16(6):541-8.
39. Chahroudi A, Silvestri G, Feinberg MB. Measuring T cell-mediated cytotoxicity using fluorogenic caspase substrates. *Methods* 2003;31(2):120-6.
40. La Muraglia GM, O'Neil MJ, Madariaga ML, Michel SG, Mordecai KS, Allan JS, et al. A novel approach to measuring cell-mediated lympholysis using quantitative flow and imaging cytometry. *J Immunol Methods* 2015;427: 85-93.
41. Somanchi SS, McCulley KJ, Somanchi A, Chan LL, Lee DA. A novel method for assessment of natural killer cell cytotoxicity using image cytometry. *PLoS One* 2015;10(10):e0141074.
42. Jin Q, Jiang L, Chen Q, Li X, Xu Y, Sun X, Zhao Z, Wei L. Rapid flow cytometry-based assay for the evaluation of $\gamma\delta$ T cell-mediated cytotoxicity. *Mol Med Rep* 2018;17(3): 3555-62.
43. Kandarian F, Sunga GM, Arango-Saenz D, Rossetti M. A flow cytometry-based cytotoxicity assay for the assessment of human NK cell activity. *J Vis Exp* 2017;(126).