



# Akım Sitometrinin İmmünolojik ve Allerjik Hastalıklarda Kullanımı

## Utilization of Flow Cytometry in Immunologic and Allergic Diseases

Öner ÖZDEMİR<sup>1</sup>, Çağla KARAVAIZOĞLU<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları Bölümü, Sakarya, Türkiye  
Department of Pediatric Allergy and Immunology, Sakarya University, Medical Faculty, Training and Research Hospital, Sakarya, Turkey
- <sup>2</sup> Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü, Sakarya, Türkiye  
Department of Pediatrics, Sakarya University, Medical Faculty, Training and Research Hospital, Sakarya, Turkey

### ÖZ

Akım sitometri hücre veya partiküllerin sıvı bir sistem içerisinde tek tek geçerken fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerini analiz eden bir cihazdır. Her bir hücre veya partikül sıvı sistemin içinden geçerken sapıtılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilip optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülür. Bu sinyaller de dijitalleştirilerek histogramlar olarak ekrana aktarılır. Bu histogramlar ise ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel olarak gösterilmesi ilkesine dayanmaktadır. Elde edilen veriler farklı grafikler ile gösterilebilirken, hücrelerin ayrılması ise hücre büyüklüğü ve granül yapısına göre yapılmaktadır. Ayrıca birden fazla yüzey antijenlerinin aynı anda analizini sağlayan floresan işaretli antikorlarla hücre gruplarının analizi de yine akım sitometride yapılabilmektedir. Akım sitometrinin günümüzde en sık kullanıldığı alanların başında immünolojik hastalıklar gelmektedir. Akım sitometride lenfosit alt gruplarının tayininde kullanılan monoklonal antikorlar hastalık grubu ve tiplerinin teşhisinde önemli yer tutmaktadır. Bu makalede akım sitometride teşhis edilebilen bazı immünyetmezlik tiplerine örnekler verilmiştir. İmmünolojik hastalıklardan ağır kombine immünyetmezlik, Bruton hastalığı, kronik granümatöz hastalık, yaygın değişken immünyetmezlik, çıplak lenfosit sendromu gibi hastalıkların akım sitometri ile değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Allerjik hastalıklarda kullanımı ise bazofil aktivasyonunun akım sitometride ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bazofilin allerjenle temasında hücre aktive olup yüzeyinde CD63 ekspresyonu izlenmektedir. Bununla birlikte bazofil aktivasyon testinin allerjen immünoterapisinin etkinliğini izlemede de kullanıldığını gösteren klinik çalışmalar vardır. Yakın gelecekte, akım sitometri yeni belirteç ve gelişmiş teknolojisi ile allerjik ve immünolojik hastalıkların teşhis ve takibinde daha yoğun bir şekilde kullanılmaya devam edilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Akım sitometri, allerji, immünoloji

**Geliş Tarihi:** 04/11/2015 • **Kabul Tarihi:** 18/01/2016

### ABSTRACT

Flow cytometry is a device that analyzes the physical and/or chemical characteristics of cells or particles as they pass through a fluid system one by one. Laser beam diffracted and fluorescent light emitted by each cell or particle while passing through the fluid system are gathered by optic filters and mirrors, separated into varying wavelengths, and transformed into analogue signals. The signals are digitalized and transferred to a screen as histograms. The histograms are based on the principle of demonstrating the frequency distributions of the parameters measured visually. While the data obtained can be demonstrated in different graphics, the cells are separated according to cell size and granular structure. Analysis of cell groups through fluorescently labeled antibodies enabling analysis of more than one surface antigen at the same time can also be performed by flow cytometry. Today, immunologic diseases are one of the most common fields where flow cytometry is used. Monoclonal antibodies used to detect lymphocyte subgroups in flow cytometry are crucial in the diagnosis of disease groups and types. Examples of some types of immunodeficiency diagnosed by flow cytometry are given in this study. Immunologic diseases such as severe combined immunodeficiency, Bruton's disease, chronic granulomatous disease, common variable immunodeficiency and bare lymphocyte syndrome can be assessed with flow cytometry. Its use in allergic diseases is based on measuring basophil activation in flow cytometry. When the basophil contacts with antigen, the cell activates and expresses CD63 on the surface. Besides, there are clinical studies showing that the basophil activation test can be used to monitor the effectiveness of allergen immunotherapy. In near future, flow cytometry will be continued to be used more intensely in the diagnosis and follow-up of allergic and immunologic diseases with new markers and more developed technology.

**Key words:** Flow cytometry, allergy, immunology

**Received:** 04/11/2015 • **Accepted:** 18/01/2016

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence**

Öner ÖZDEMİR

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları Bölümü, Sakarya, Türkiye  
e-posta: ozdemir\_oner@hotmail.com

## GİRİŞ

Sitometri hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel veya kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Akım sitometri ise hücre veya partiküllerin sıvı bir sistem içerisinde tek tek geçerken fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerini analiz eden bir cihazdır (1,2).

Akım sitometride sıvı içindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölmeden geçirilir ve hücrelerin ışıktan geçerken verdikleri uyarılar toplanıp analiz edilir. Burada hücrelerin büyüklük, granülerite gibi fiziksel özellikleri gösterilebileceği gibi; hücre yüzeyindeki veya içeriğindeki antijenik yapılar da belirlenebilir. Böylece partikülün immün yapısı, DNA içeriği, enzim aktivitesi, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında da bilgi edinilebilir (3). Işık mikroskopisi ile karşılaştırılınca çok daha fazla hücreyi daha kısa sürede analiz edebildiği ve bu teknik ile ortalama 10.000 hücrenin 20 saniyede değerlendirilebildiği gösterilmiştir (4,5).

İnsan lökosit antijeni hücre farklılaşma (HLA CD: Human Leucocyte Antigen Cluster of Differentiation) belirteçlerine dayanarak alt gruplarına kadar hücre tespiti ve biyolojik çalışmalar için epitop ekspresyonu gibi alanların yanı sıra kanserli hücrenin tanısında, AIDS hastalarının kanındaki CD4<sup>+</sup> lenfosit sayısının ölçümünde, çeşitli allerjik ve immünolojik hastalıklarda, bakterilerde canlılık ve tip tayini gibi durumlarda giderek kullanımı artmaktadır. Önceleri hematoloji ve onkolojide malignitelerin, immünolojide primer immün yetmezliklerin tanısında kullanılan bu sistem günümüzde organ nakil üniteleri ve araştırma laboratuvarları ile mikrobiyoloji, patoloji, histoloji, biyokimya gibi klinik laboratuvarlarda kullanılan önemli bir araştırma yöntemi haline gelmiştir (6-8).

Bu derlememizde öncelikle akım sitometrinin çalışma prensipleri anlatıldıktan sonra, klinikte kullanım alanlarından olan bazı immünolojik ve allerjik hastalıklardan bahsedilmektedir.

## AKIM SİTOMETRİNİN TEMEL BİLEŞENLERİ VE ÇALIŞMA PRENSİBİ

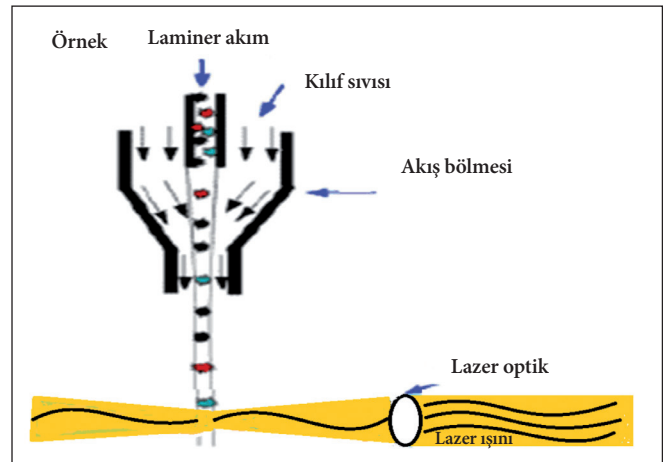
Akım sitometri cihazı başlıca akış (sıvı) sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler, sinyal dedektörleri, bilgisayar/yazılım programları ve hücre ayırma mekanizması (cell sorting) gibi bileşenlerden oluşmaktadır (5).

Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilip optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülür. Bu sinyaller de dijitalleştirilerek histogramlar olarak ekrana aktarılır. Bu histogramlar ise ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel olarak gösterilmesi ilkesine dayanmaktadır (7).

Akıcı sistem bir merkezi kanaldan oluşur ve örnek buradan cihaza verilir. Merkezdeki örneği içeren sıvı (laminar akıntı) ve çevreleyen sıvı (sheath fluid) birbirine karışmadan ilerlemektedir. Bu etkiyle partiküller tek bir sıra şeklinde dizilirler. Hücreleri lazer ışınının önüne tek sıra halinde taşımak için bu sıvı sistemi kullanılır. Böylece lazer ışını aynı anda tek hücreye düşer ve tek hücrenin analizi yapılır (Şekil 1). Hücrelerden gelen ışık saçılımı ve floresans emisyonu filtre ve dedektörlerde dijital sinyallere dönüşür. Akım sitometri aletindeki her bir dedektör ve filtre bize farklı veri sağlar (Şekil 2).

1. İleri saçılım kanalı (FSC:Forward scatter channel) dedektörü: Işın öne doğru yayıldığında tipik olarak lazer ışığı ile aynı yönde 20° etrafa yayılan ışınlar FSC denilen bir lens yardımıyla toplanırlar. FSC dedektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verir (5).

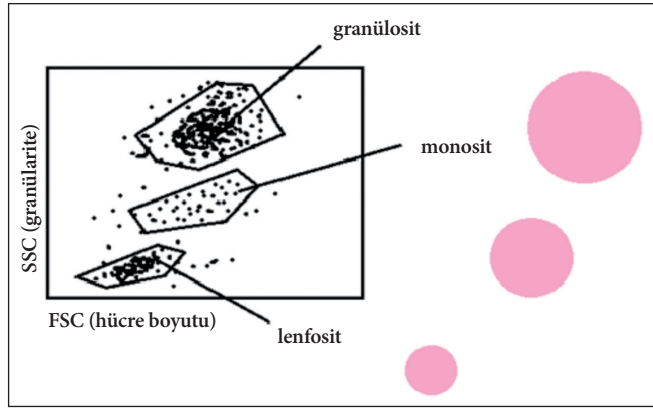
2. Yana saçılım kanalı (SSC: Side scatter channel) dedektörü: Eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayılan ışığın ölçülmesi ise "side scatter" olarak adlandırılır. SSC dedektörü partiküllerin granüler içerikleri, içyapısı hakkında bilgilenmemizi sağlar (5).



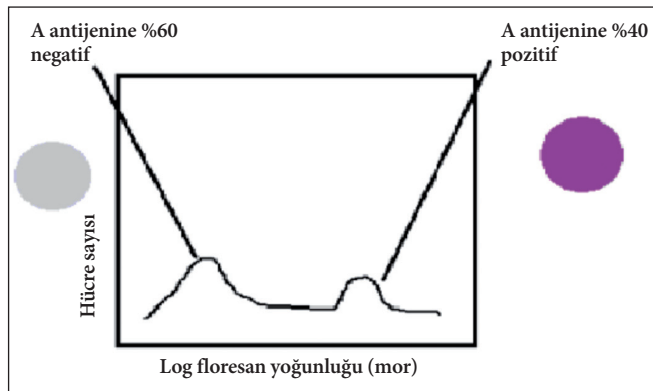
**Şekil 1.** Çalışılan örnek (nümune)'te "akım sitometri" tekniğinde hücrelerin tek tek dizilimi görülmektedir. [http://biology.berkeley.edu/crl/flow\\_cytometry\\_basic.html](http://biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html) den uyarlanmıştır.

3. Floresan filtre ve detektörler: Antikorlar aracılığı ile antijeni göstermek için kullanılan renk maddelerine florokrom maddeler (floresan antikor) denir. Akım sitometride florokrom boya ya da maddelerin kullanılmasının amacı; direkt olarak hedefin tespiti ile biyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin kolayca saptanmasıdır (Şekil 3). Değişik dalga boylarında yapılan ölçümler, florokromla işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri veya sitokinler ve DNA gibi hücre içindeki moleküller hakkında bilgi vermektedir (5,9-11).

Akım sitometri analizi için hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla kan, kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, asit sıvısı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki doku ve hücre kültürü örnekleri kullanılabilir (12-15). Akım sitometri tekniğini kullanan laboratuvarlarda sıklıkla



Şekil 2. FSC ve SSC detektörlerinde elde edilen verilerle lökositlerin hücre büyüklüğü (yatay eksen) ve granülaritesine (dikey eksen) göre ayrılması ve bu gruplara kapılma, gösterilmektedir.



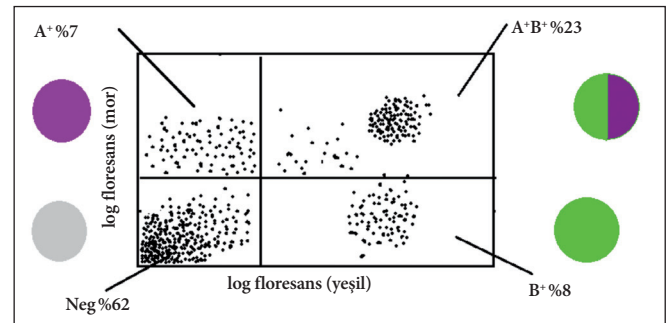
Şekil 3. Tek floresan boya ile işaretli monoklonal antikorun yardımıyla hücre yüzeyinde eksprese edilen belirteçlerin saptanması.

rutin lökosit süspansiyonlarından analizler yapılmaktadır. Lökositlerin ayrılması ise hücre büyüklüğü ve granül yapısına göre yapılmaktadır (9-11).

Akım sitometride tek ya da birden fazla floresan boya ile işaretli antikorun kullanılmasıyla hücre yüzey belirteçlerinin saptanması yapılabilmektedir. Örneğin, bu şekilde örnek sıvıdaki tüm lökositler içindeki CD3<sup>+</sup>-T lenfosit hücre sayısı ve oranı saptanabilir. A antijenine karşı floresan antikorla işaretli hücreler ve bu antijeni içermeyen işaretlenmemiş hücrelerin sayısal dağılımı akım sitometrik analiz sonrası elde edilen rapor formatında Şekil 4'deki gibi görülür.

Birden fazla yüzey antijenlerinin aynı anda analizini sağlayan floresan işaretli antikorlarla hücre gruplarının analizi de yine akım sitometride gösterilebilmektedir. Örneğin: Birden fazla CD belirteçlerinin analizi sayesinde hücre alt gruplarının analizi (T supresör, B hücre, NK hücre ve T yardımcı (helper) hücrelerin sayılarının ve oranlarının saptanması vb.) başarıyla yapılabilmektedir. İki farklı floresan antikor ile işaretleme kullanılmasıyla analiz yapıldığında grafikteki her bir nokta yine tek bir hücreyi göstermektedir.

Hücre içindeki antijenler için de florokrom boyalar kullanılmaktadır. Çok renkli florokromlar ile farklı hücre gruplarının tespiti ve ölçümü, immünofenotiplendirme, hücre içi organellerin tespiti, hücre yüzey antijenlerinin saptanması, hücre ayrıştırılması, nükleik asit miktarının saptanması, enzim aktivitesinin ölçümü, apoptozis incelemeleri ayrı ayrı ya da bazıları birlikte aynı anda yapılabilmektedir (16-19).



Şekil 4. Hücreler her iki floresan antikorunu da taşıyorlarsa A+B+ olarak sağ üst kadranda, grafiğin dikey çizgisinde belirtilen antikorunu taşıyan hücreler sol üst kadranda, grafiğin yatay çizgisinde belirtilen antikorunu taşıyan hücreler sağ alt kadranda ve her iki antikorunu da taşımayan hücreler de sol alt kadranda gösterilmektedir. Bu hücrelerin sayısal olarak ve örnekteki bulunan yüzde oranları da bu grafikler yardımıyla hesaplanmaktadır.

Akım sitometride elde edilen veriler farklı grafikler kullanılarak gösterilebilir. Bu grafik çeşitleri nokta alan grafikleri, kontur alan grafikleri, histogram, 3 boyutlu grafik, bölgeler, kapılar ve istatistik olarak sınıflandırılabilir (9,10).

Bunlardan, nokta alan grafiği kan örneğindeki çok sayıda hücrenin FSC/SSC detektörlerince hücre boyut ve granülaritesine göre dağıtılmasıyla oluşmaktadır. Granülositler, lenfositler ve monositler farklı fiziksel özelliklerine göre grafiğe noktalama tekniğiyle dağıtılmıştır. Bu grafiğin renklendirilmesi de grafiğe üç boyutlu bir görünüm vermektedir (Şekil 2).

Kontur diyagramı ise dansite haritasına benzemektedir. Benzer sayıdaki hücreleri gösteren noktaların çizgisel olarak birleştirilmesiyle oluşur (5).

Tek parametrelili histogramın ise y-ekseni; hücre sayısını, x-ekseni; analizi yapılan tek parametrenin floresans şiddetini gösterir. Histogramların istatistiksel verileri otomatik olarak cihaz yazılımlarıyla hesaplanır (Şekil 3).

Bölgeler histogram ve nokta alanlar içinde, popülasyon alt gruplarının istatistiğini yapmak için oluşturulurlar (Şekil 4). Kapılar(gate) ise başlıca analiz edilen alandaki dışlanmak istenen olguların uzaklaştırılması veya azaltılmasında kullanılır (Şekil 2).

## **AKIM SİTOMETRİNİN İMMÜNOLOJİK VE ALLERJİK HASTALIKLARDA KULLANIMI**

Akım sitometrinin günümüzde en sık kullanıldığı alanların başında allerjik ve immünolojik hastalıklar gelmektedir. Burada öncelikle akım sitometrinin bazı immünolojik hastalıkların teşhis ve sınıflandırılmasında

**Tablo I. Lenfosit alt gruplarının tayininde kullanılan monoklonal antikorlar türleri**

CD3+	Tüm T hücreleri
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	Yardımcı T hücresi
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Sitotoksik T hücresi
CD3-CD16+CD56+	NK (natural killer) hücresi
CD19 + veya CD20+	B hücresi
CD25+	Aktifleşmiş hücre
CD45+	Tüm lökosit hücreleri
CD RO + CD4 <sup>+</sup> veya CD8 <sup>+</sup>	Hafıza T hücreleri
CD45 RA+ - CD4 <sup>+</sup> veya CD8 <sup>+</sup>	Doğal (naive) T hücreleri

kullanımı anlatılacaktır. İlk olarak, hastalıklardan bahsetmeden önce lenfosit alt gruplarının değerlendirilmesinde kullanılan floresan monoklonal antikorlardan bahsetmek gerekir. Akım sitometride lenfosit alt gruplarının tayininde sık olarak kullanılan monoklonal antikorlar türleri Tablo I'de gösterilmektedir.

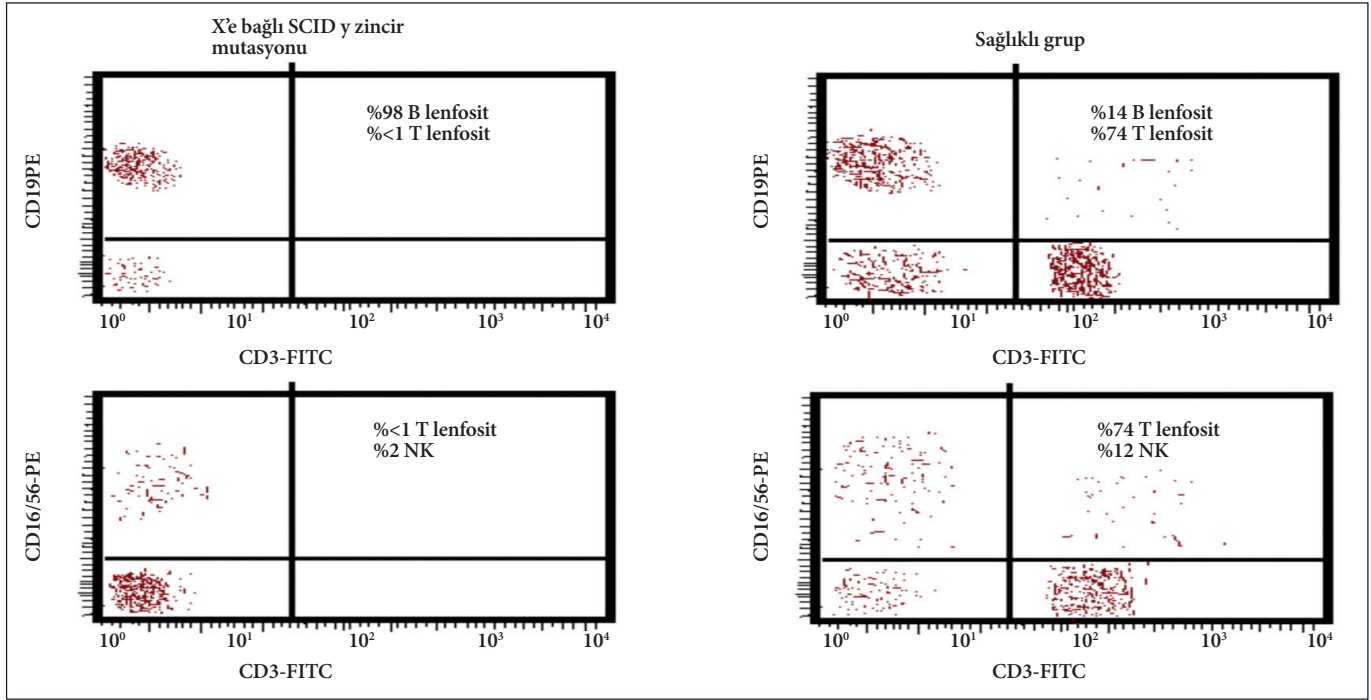
## **İMMÜNOLOJİK HASTALIKLARDA KULLANIMI**

Bu makalede floresan monoklonal antikorlar kullanılarak lenfosit alt gruplarının akım sitometride değerlendirilmesiyle teşhis edilebilen bazı immünyetmezlik tiplerine örnekler verilmiştir.

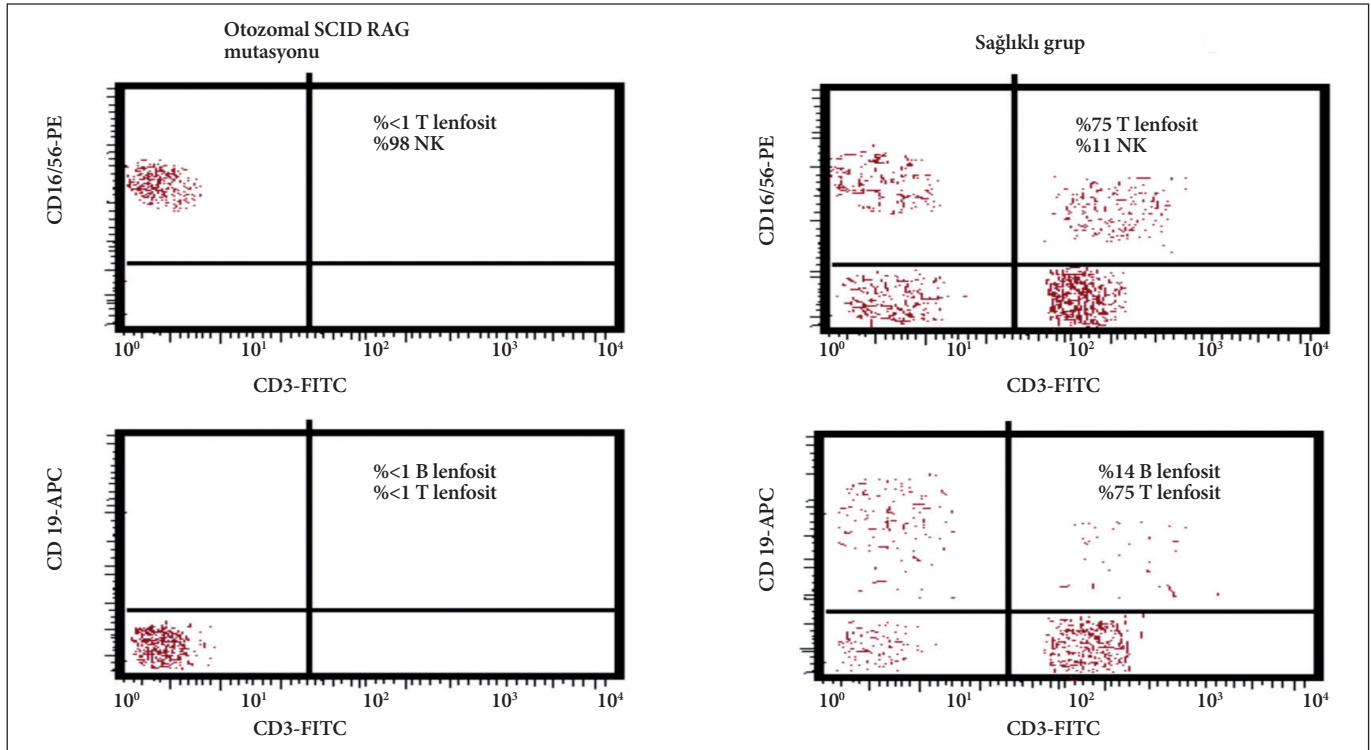
**1. Ağır Kombine İmmünyetmezlik (SCID: Severe Combined Immunodeficiency):** Fonksiyonel T lenfositlerin aşırı derecede düşüklüğü veya yokluğu ile karakterize, en az 15 bağımsız genetik defektin sonucunda oluşan, erken tanı konulmazsa ölümcül olabilen hücresel ve humoral immün cevabın birlikte bozulduğu hastalıktır. Klinikte postnatal dönemde ağır, tekrarlayan ve fırsatçı patojenlerle olan enfeksiyonlar gözlenir. Persiste eden oral ve genital candidiazis, interstisyel pnömoni, kronik diyare, saç ve cilt bulguları, lenfadenopati, hepatosplenomegali, canlı aşı sonrası fatal reaksiyonlar ve bunlara bağlı büyüme gelişme geriliği gözlenir (20,21). Akım sitometride hastanın lenfosit alt tipleni yapılarak, hangi alt grubun azaldığı ya da yok olduğu görülerek SCID tipi teşhis edilir (Şekil 5,6).

**2. Bruton Hastalığı (XLA: X-Linked Agammaglobulinemi):** Bruton tarafından tarif edilmiş X'e bağlı geçen ve B lenfositlerin olgunlaşmaması sonucu immünooglobülinlerin yapılamayıp vücutta antikor yapımının olmaması sonucunda genellikle tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, ayrıca lenf bezleri ve tonsillerin muayenede saptanmaması ile karakterize hastalık grubudur. Akım sitometride CD19 ve CD20 gibi monoklonal antikorlarla bakılan örnekte B lenfosit olup olmadığı saptanabilir (22,23). Yine benzer şekilde in vitro ortamda uyarılmış monositlerde akım sitometride btk (bruton kinaz) ekspresyonu ve genetik incelemelerle değerlendirilip, hastalığın kişide olup olmadığı kesinleştirilmiş olur (Şekil 7).

**3. Yaygın Değişken İmmünyetmezlik (CVID: Common Variable Immunodeficiency):** Her iki cinsi eşit olarak tutan, antikor yapımında bozukluk ve tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla karakterize heterojen bir hastalıktır. Hastalık genellikle 18 aylıktan sonra



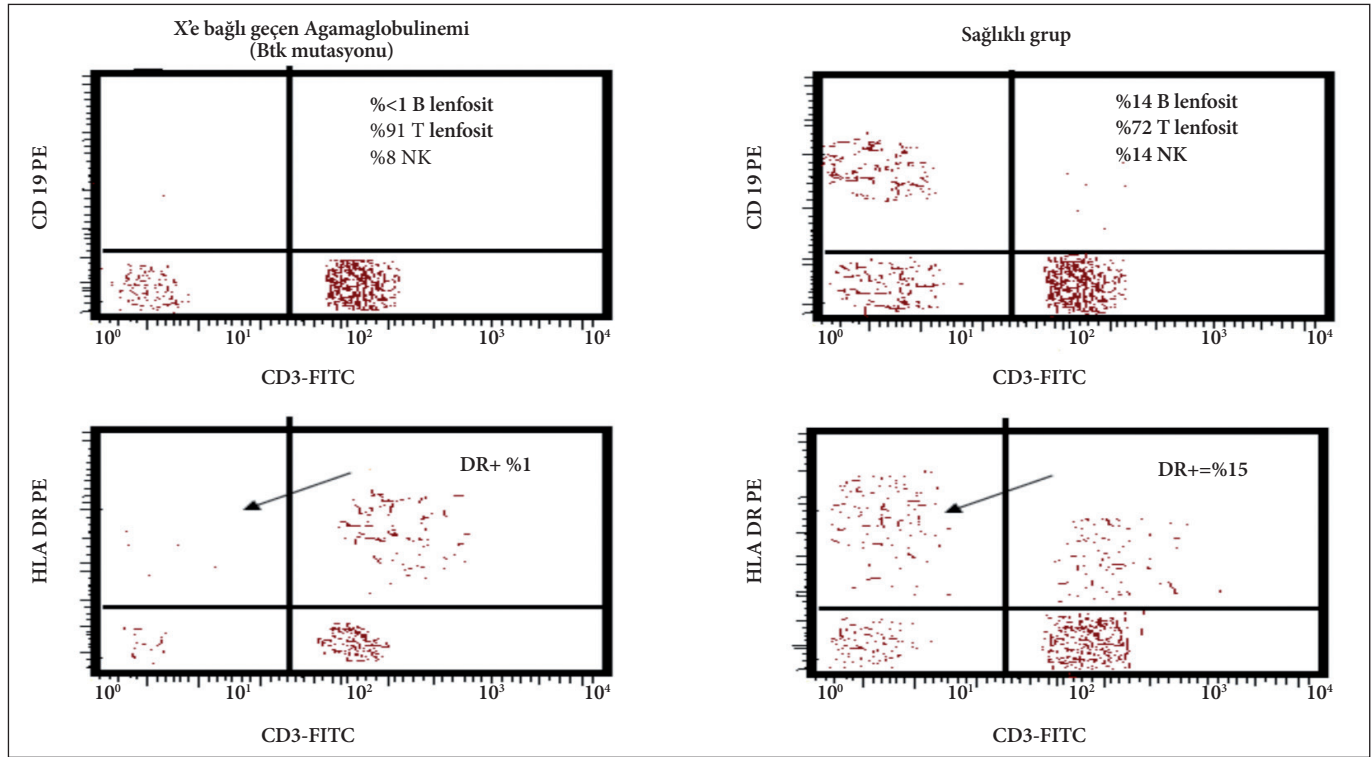
**Şekil 5.** Sağ kolondaki sağlıklı kontrol grubun histogramlarında B,T lenfositleri ve NK hücrelerin dağılımı normalken, X'e bağlı geçen SCID'de yatay ekseninde T lenfositleri ve dikey ekseninde NK ve B hücreleri gösteren dağılımının azaldığı görülmektedir. (Bu da SCID'in y zincir defekti olan tipi ile uyumludur).



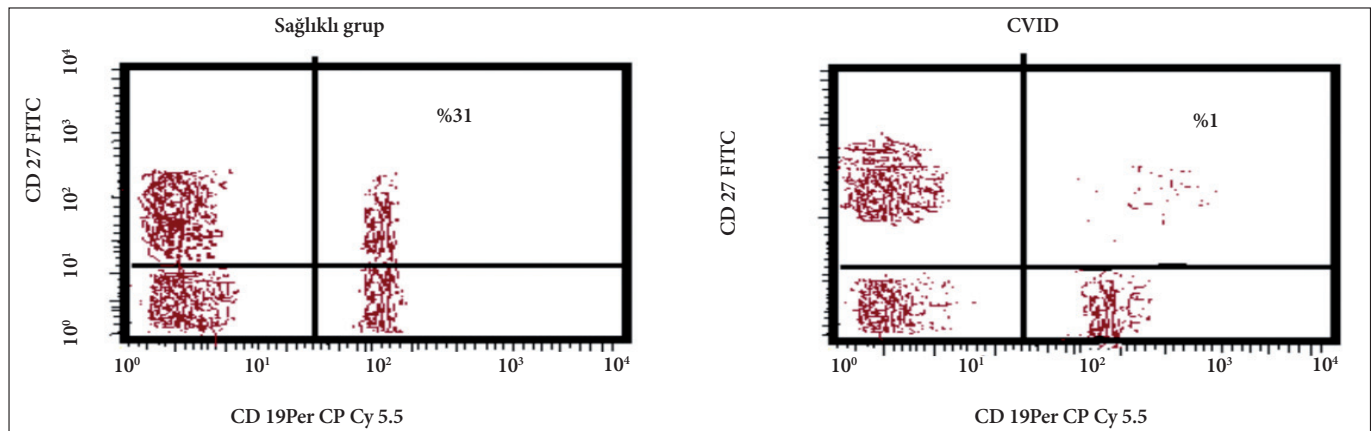
**Şekil 6.** Sol taraftaki kolon absolu lenfosit sayısı 250/mm<sup>3</sup> olup klinik ve aile hikayesi otozomal dominant geçişli SCID ile uyumlu örnek 5 aylık kız hastaya ait akım sitometri sonucudur. B ve T lenfositlerinin yokluğu (her ikisinin de <1 olması) ile giden hastalıkta bu sonuç ilgilidir (rekombinasyonu aktive eden genler: RAG1 ve RAG2) mutasyonlar hakkında uyarıcıdır.

görülme; 1-5 ve 16-20 yaşları arasında olmak üzere iki pik yapmaktadır. Çoğunda kan ve lenfoid dokuda normal veya normale yakın B lenfosit olduğu ancak bunların plazma hücrelerine dönüşmesinde bozukluk olan hastalık grubudur (24). Akım sitometride hafıza B lenfositlerindeki azalmayı gösteren CD27 ekspresyon eksikliğinin saptanması tanıda yardımcıdır (Şekil 8).

**4. Çıplak Lenfosit Sendromu (Bare Lymphocyte Syndrome):** Çıplak lenfosit sendromu, erken bebeklik döneminde başlayan otosomal resesif olarak geçiş gösteren, SCID'e benzer klinik tabloya neden olan tekrarlayan akciğer enfeksiyonları, persistan diyare ve büyüme geriliği ile karakterize bir hastalık tablosudur. Tip 2' de MHC-II genlerini kodlayan transkripsiyon faktörlerindeki



Şekil 7. Hikâye, klinik bulgular ve laboratuvar ile desteklenen XLA' li hastanın sol sütunda gösterilen CD19+ hücrelerin yokluğu (sol üst histogram) ve sol alttaki histogramda da CD3- (negatif) hücrelerde HLA-DR ekspresyonunun belirgin azlığı gösterilmiştir.



Şekil 8: Sol sütundaki örnek sağlıklı kişinin hafıza B lenfositlerini gösteren CD19'un üzerindeki CD27 pozitifliği (%31) gösterilmiştir. Sağ sütunda ise CVID hastasındaki CD27 ekspresyonu %1 seviyesinde görülmektedir.

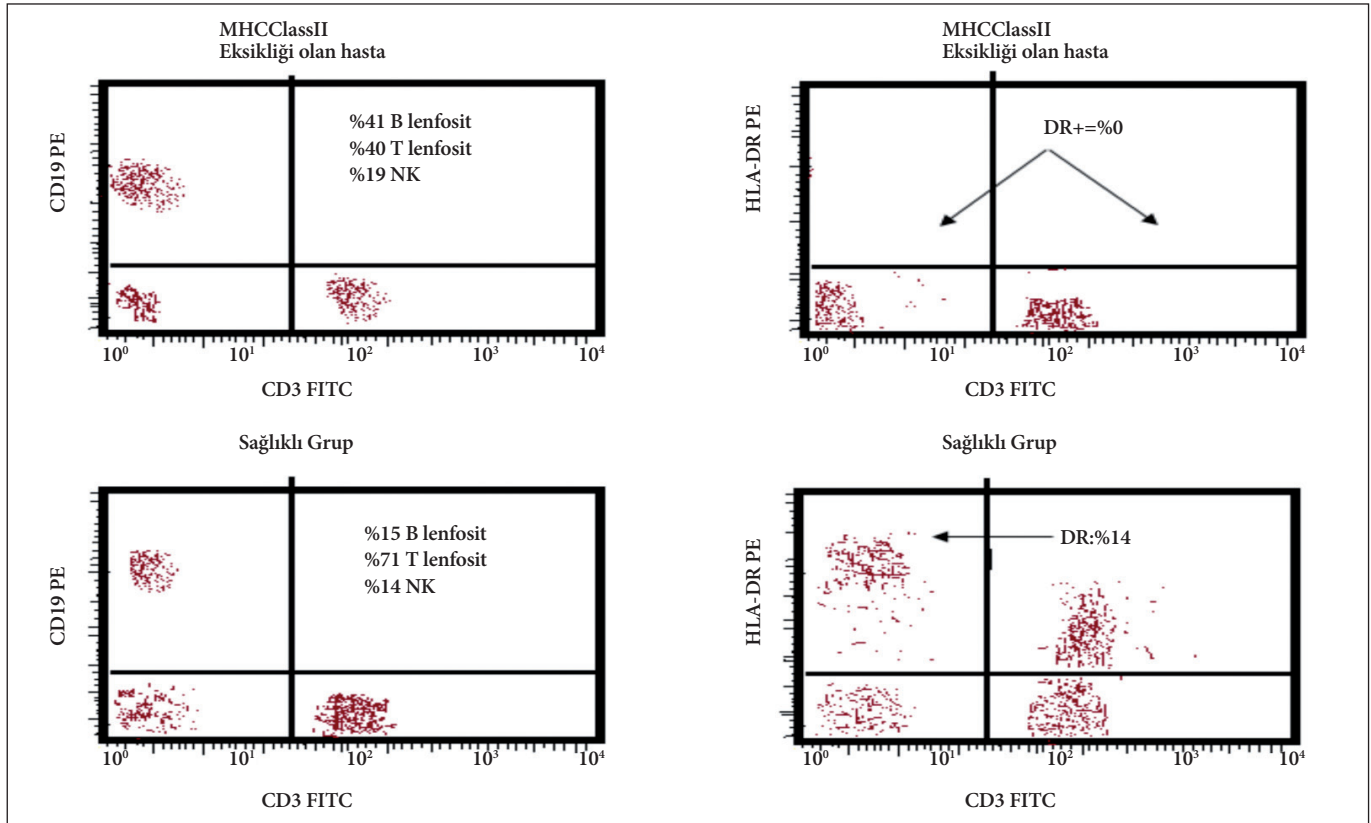
mutasyon sonucu lenfosit öncüllerinde anormal gelişim söz konusu olup; tip 1 de ise HLA-I ekspresyonundaki defekt sonucu meydana geldiği gösterilmiştir (25). Akım sitometride HLA-DR ekspresyonu, eksikliği veya yokluğu olan hastalarda sağlıklı gruba göre açık bir şekilde azalmıştır (Şekil 9).

**5. Kronik Granülomatöz Hastalık (CGD):** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz sistemindeki defektlere bağlı olarak gelişen, tekrarlayan ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar ve artmış enflamatuvar yanıtı bağlı granülom oluşumu ile karakterize heterojen, kalıtsal primer bir immünyetmezlik hastalığıdır. Klinikte akciğer, deri, lenf nodları ve karaciğer, enfeksiyon nedeni ile en çok tutulan organlardır. Teşhis klinik öykü, klinik bulgular ve solunumsal patlamanın (respiratuvar burst) gerçekleşemediğinin gösterildiği nötrofil fonksiyon testleri ile konular ve genotipleme ile kesinleştirilir (26). Akım sitometride NBT (nitro-blue-tetrazolium)'ye alternatif olarak DHR-123 (di-hidro-rodamin 123) testi

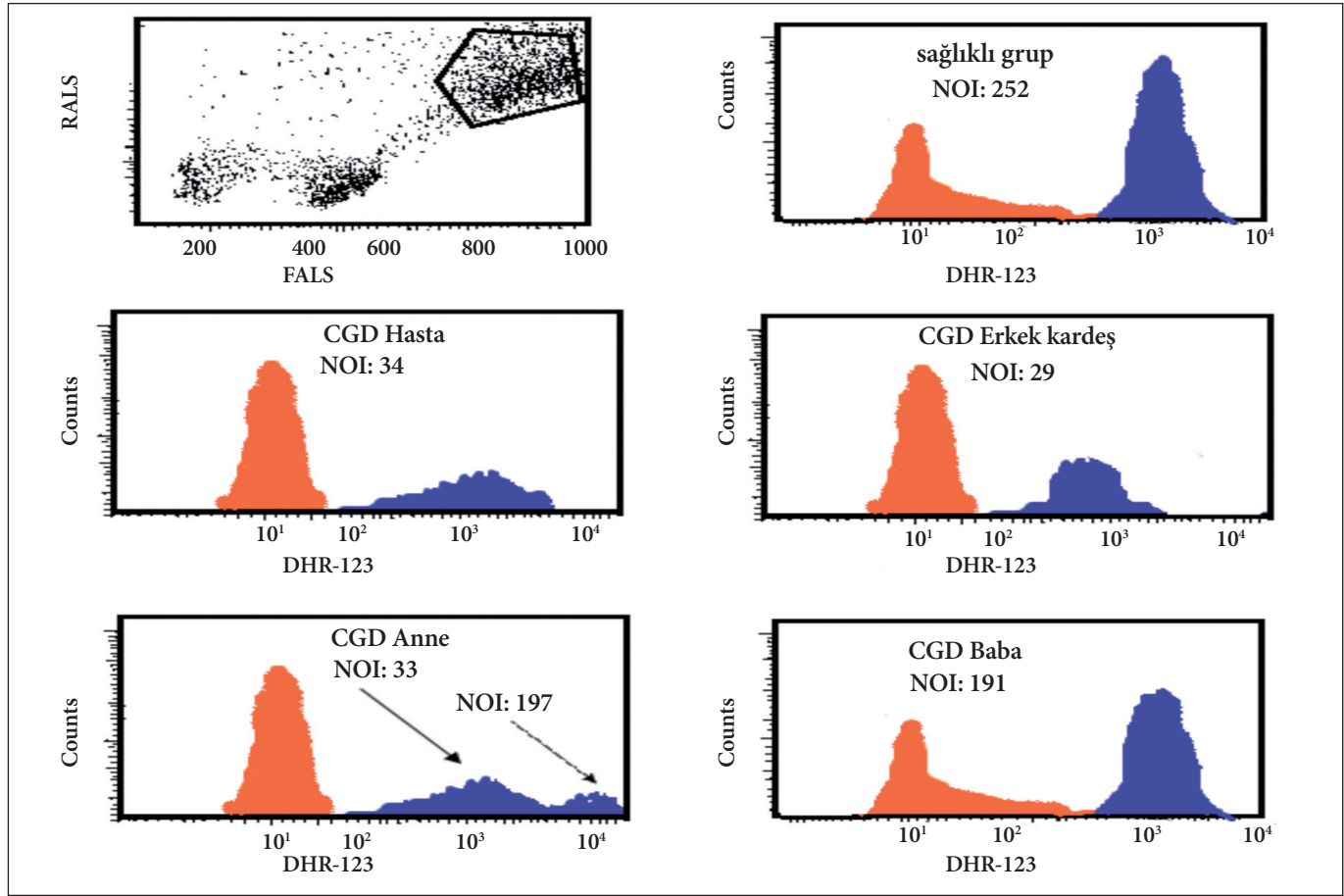
kullanılır ve hasta tespiti yanında taşıyıcı grupta kolaylıkla belirlenebilir (Şekil 10).

**6. İdiyopatik CD4+ Lenfositlerin Yokluğu (CD4 Eksikliği):** İlk kez 1992'de, CD4+ hücre sayısının < 300 olması veya CD4+ hücrelerin toplam T lenfositlerin <%20 olması ile karakterize, bununla birlikte kanıtlanmış herhangi bir akiz (HIV enfeksiyonu) veya doğuştan (Down sendromu) CD4 lenfositleri deprese edecek bir neden olmaması olarak tanımlanmıştır (27). Akım sitometride lenfositlerdeki CD4+ hücrelerin yokluğu ile tanı konulabilir.

**7. CD25 (IL-2-Alfa) Ekspresyon Eksikliği:** Bazı T hücreleri, otoreaktif T hücrelerin aktive olup yayılmalarını engelleyerek periferik kanda düzenleyici (T reg: CD4+CD25+ forkhead box protein 3, FoxP3+) rol oynarlar. T reg, IL-10 ve TGF- $\beta$  gibi immünsupresif sitokinlerin sekresyonunu gerçekleştirerek immünsupresif fonksiyonları ve bunun yanı sıra otoimmün olaylar ve inflamasyonda da baskılayıcı görev üstlenerek immün



**Şekil 9.** Örnek beş aylık erkek hastanın absöüt lenfosit sayısı  $1.500/ \text{mm}^3$  ve CD4/ CD8: 0.3 olarak saptanmıştır. B lenfositlerin oranı %41 olmasına rağmen, toplam T lenfosit sayısı (CD3: %40) düşük seviyede saptanmıştır. HLA-DR ekspresyonu, yokluğu/eksikliği olan hastalarda (üst satır) sağlıklı gruba göre açık bir şekilde azalmıştır.



Şekil 10. İlk histogramda monosito-fagositik hücelere gate (kapılma) yapıldıktan sonra, sağ alttaki histogramlarda sağlıklı kardeş ve babada (dihidro-rodamin'in) oksidasyonun gerçekleşmesine bağlı floresans sapması görülmektedir. Sol alt sütünlarda ise hasta ve taşıyıcı annenin hücelerinde oksidasyon (NOI: nötrofil oksidasyon indeksi) yetersizliğine bağlı küntleşmiş floresans sapması görülmüyor.

homeostazın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu immünyetmezlikte B lenfositlerin sayısı ve fonksiyonları normal iken, T lenfositler hem sayısal olarak hem de fonksiyonel olarak anormaldir. CD25 eksikliğinden dolayı T lenfositler timusta farklılaşamaz. Dokularda, karaciğer, akciğer, kemikte lenfosit infiltrasyonu mevcut olup bu tablo inflamasyon ve dokularda atrofik olmaya neden olur ve hastalarda inatçı diyareler, akciğer enfeksiyonları ve alopesi gibi klinik bulgular gözlenebilir (28,29). Akım sitometride lenfositlerdeki CD25 ekspresyon eksikliği / yokluğu ile tanı konulabilir.

**8. IPEX (X'e Bağlı Geçen İmmün Disregülasyon, Poliendokrinopati, Enteropati) Sendromu:** Ciddi ve dirençli diyare, kronik dermatit, otoimmün endokrinopatilerle (erken başlangıçlı IDDM, tirodit) karakterize, X'e bağlı geçiş gösteren, Fox P3 genindeki mutasyon sonucu (T reg hücrelerin regülasyonundan

sorumlu) immün sistemi etkileyen, nadir görülen, fatal seyredilebilen bir bozukluktur. İmmünesupresif tedavi metotları kullanılmakla birlikte kemik iliği transplantasyonu en iyi küratif tedavi yöntemidir (30). Akım sitometride lenfositlerdeki Fox P3 ekspresyon eksikliği / yokluğu ile tanı konulabilir.

### AKIM SİTOMETRİNİN ALLERJİK HASTALIKLARDA KULLANIMI

#### 1. Bazofil Degranülasyonu (Bazofil Aktivasyon Testi) ile Allerjenlerin Saptanması

Allerjik hastalıkların teşhisinde kullanılabilen bu metot, allerjik hastalıkların önemli bir efektör hücresi olan bazofillerin allerjenle temas sonrası aktivasyonuna dayanır. Bunun gerçekleşmesi için uygun konsantrasyondaki allerjenlerin bazofillerle in vitro aynı ortamda karşılaştırılması gerekir. Aktivasyon sonrası



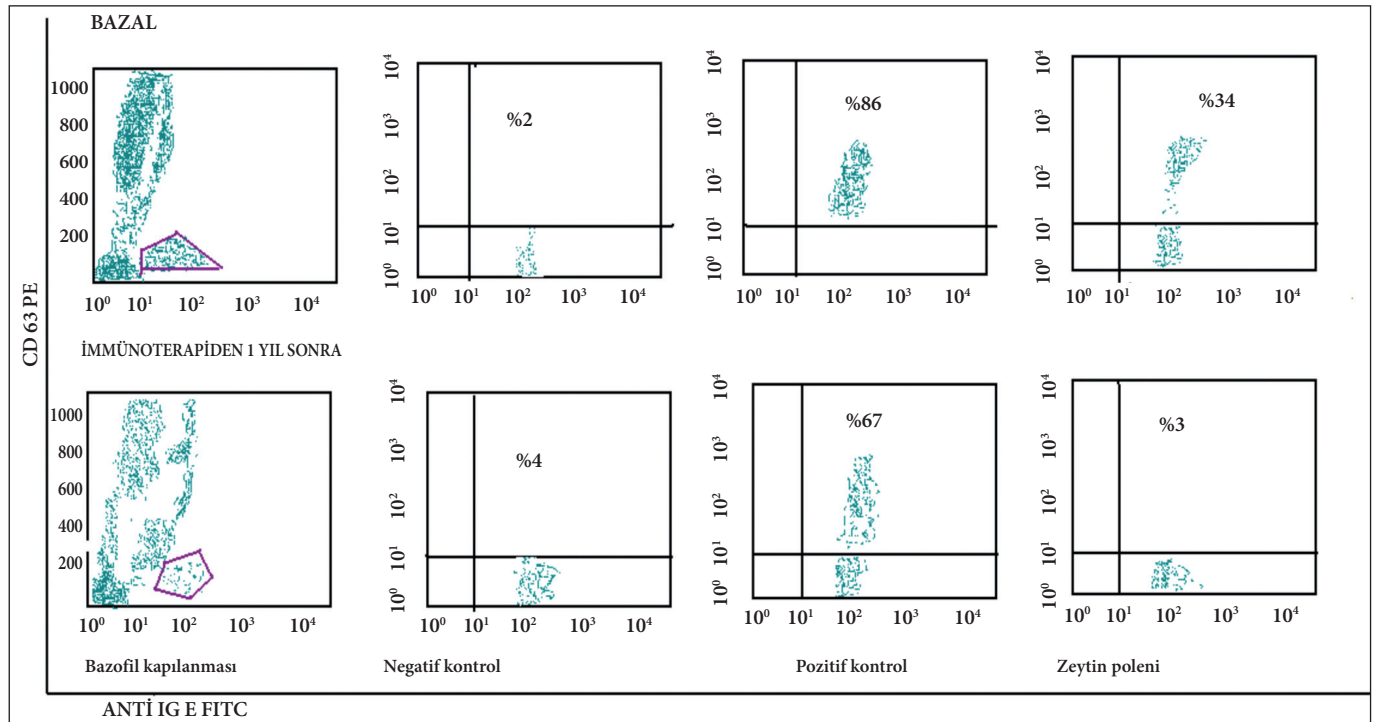
bazofil hücre membran yüzeyinde CD63 adı verilen molekülünün eksprese olduğu görülür. CD63 molekülü aslında hücre içinde depolanmış medyatörleri içeren granüllerden oluşan veziküllerin üzerinde bulunur. Degranülasyon esnasında veziküller hücre membranı ile birleşince CD63 hücre yüzeyinde eksprese olmaya başlar. CD63 ekspresyonu doğrudan bazofillerin içindeki veziküllerde bulunan medyatörlerin degranülasyonunu gösteren bir markırdır. Fakat CD63 ekspresyonu periferik kanda bulunan bazofillerin yanı sıra trombosit gibi diğer hücrelerin üzerinde de bulunabildiğinden, sadece bazofilde bulunduğu düşünülen ve aktivasyon sonrası ekspresyonu artan bir diğer yüzey molekülü de CD203c olarak saptanmıştır.

CD203c aslında bazal durumda da bazofillerin yüzeyinde çok düşük seviyede eksprese olur fakat, aktivasyon sonrası ekspresyonu upgrade (ekspresyon seviyesinde artma) olur. CD63 ekspresyonu ise aktivasyon sonrası logaritmik kaymaya yol açacak derecede akım sitometride artışa yol açar. Akım sitometrik bazofil aktivasyon testi değerlendirilirken allerjenle temas sonrası bazofillerde saptanan CD63 ekspresyonunu negatif kontroldeki yani bazofillerin bazal /spontan CD63

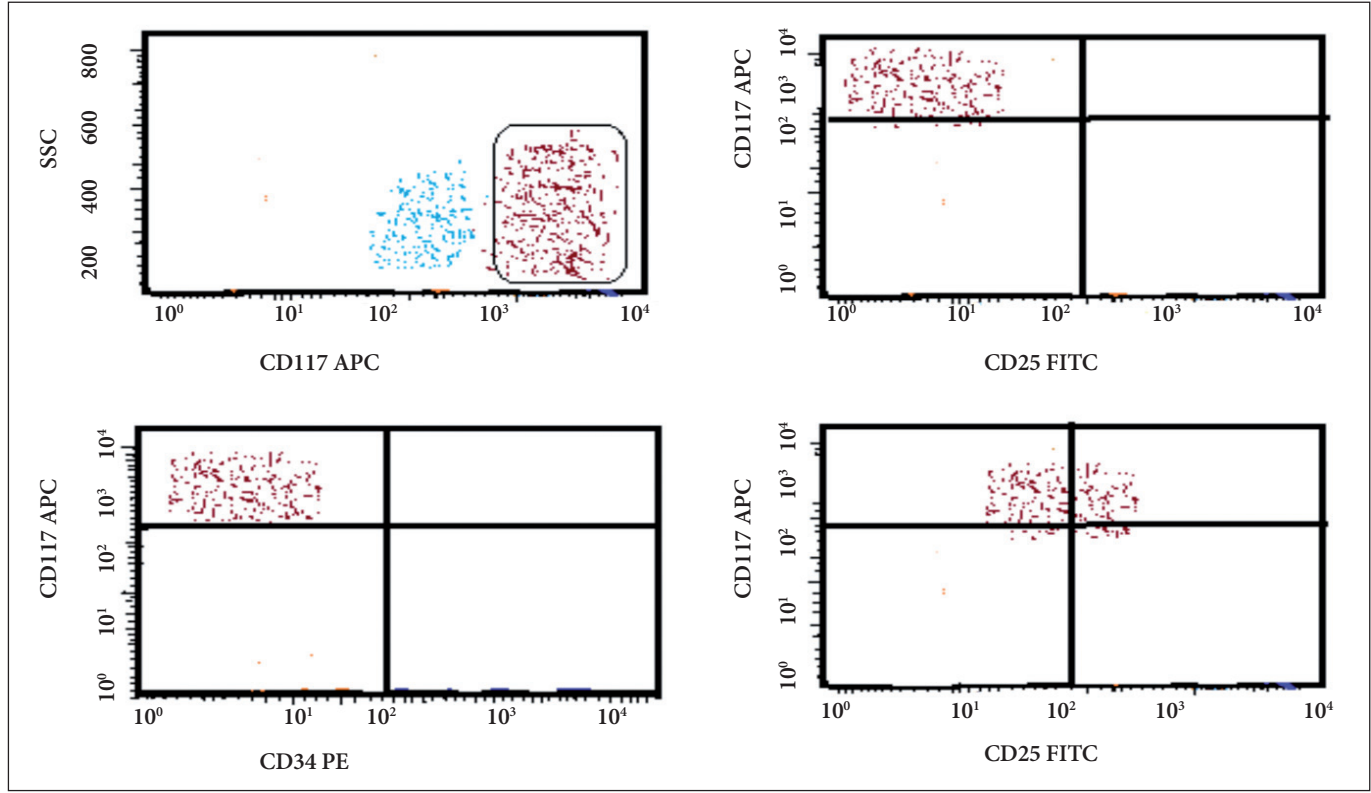
ekspresyonundan çıkarmak gerekir. Spontan aktivasyon için cut-off (kesme) değeri genelde %5 kabul edilir. Allerjenin türüne (ilaç, polen vb.) göre değişmekle birlikte allerjenin bulunduğu test ortamındaki ile negatif kontroldeki %5-15 'lik CD63 ekspresyon farkı (stimulasyon/aktivasyon) varsa test pozitif kabul edilmelidir (Şekil 11). İlaç (antibiyotik, analjezik, nöromuskuler blokaj ajan vb.) allerjileri dışında, polen gibi aeroallerjenler, lateks ve bazı besinlerle olan allerjilerin saptanmasında bu testin sensitivite ve spesifitesi oldukça yüksek bulunmuştur. Genellikle bu tür allerjilerin ve bunlara bağlı olan anafilaksin saptanmasında deri testlerine komplementer ve güvenilir bir test olarak kabul edilir. (17,18,31-33).

## 2. Allerjen İmmünoterapisinin Takibi ve Tedavinin Etkinliğini Ölçmek

Akım sitometrik bazofil aktivasyon testinin allerjen immünoterapisinin etkinliğini izlemeye de kullanıldığını gösteren klinik çalışmalar vardır (34-36). Örneğin, venom immünoterapisi, Betula ve zeytin poleni immünoterapisinin klinik etkinliğini semptom skorları yanı sıra bazofil aktivasyon testi ile gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Şekil 11).



**Şekil 11.** Örnek olgumuzda, mevsiminden önce rush 7 injeksiyonluk rejimle zeytin polenine karşı yapılan tekli desensitizasyon gösterilmiştir. Üstteki ilk şekilde zeytin poleni enjekte ettikten sonra CD63+ bazofillerin yüzdesi, alt şekilde ise immünoterapi sonrası gözlenen bazofillerin yoğunluğunun azalması gösterilmiştir. Hastalarda, zeytin polenine allerjisi olmayan gruba göre CD63 salınımı %30'dan daha fazla bulunmuştur (34).



Şekil 12. Sol sütun histogramlarında granülasyon ve monoklonal antikörlerle (CD34-/117+) boyanmasına göre kemik iliğinden elde edilen mast hücrelerinin yerleşimi gösteriliyor. Sağ üst sütunda ise, normalde CD25 eksprese etmemelerine rağmen, mastositozlu hücrelerin CD25 eksprese etmeye başladıkları görünmektedir.

### 3. T Hücre Aktivasyonu (CD69 ekspresyonu) ile İlaç Allerjilerinin Saptanması

Ayrıca akım sitometri son dönemlerde ilaç allerjilerinin tanısında da kullanılmaya başlanmıştır. Hastadan periferik kan mononükleer hücreleri alınıp, ilaçla inkübe edilir. Sonra T lenfositler için bir belirteç kabul edilen % CD69 ekspresyonu ölçülür. İlaçla karşılaşma sonrasında T hücrelerinde aktivasyona bağlı CD69 ekspresyonunun artması, klinikteki bulgulardan bu ilacın sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (35).

### 4. Mastositoz Teşhisi

Mastositoz, mast hücrelerinin kontrolsüz aşırı çoğalması ve bu hücrelerin başta deri ve/veya kemik iliği olmak üzere diğer organlarda yerleşimi ile karakterize bir hastalıktır. Mast hücrelerinin bünyesinde bulunan c-kit reseptörü (CD117)' nin mutasyonu sonrası mast hücrelerinin kontrolsüz aşırı çoğalması neticesinde diğer dokularda birikmesiyle hastalık meydana gelir. Mast hücrelerinin toplanıp biriktiği doku cilt ise hastalık kutanöz

mastositoz olarak adlandırılırken, kemik iliği gibi cilt dışı organlarda birikmesine sistemik mastositoz denilmektedir. Normal bazal durumda mast hücreleri CD2 ve CD25 yüzey moleküllerini eksprese etmezken, mastositozlu olgularda CD2 ve CD25 ekspresyonlarının saptanması akım sitometrik olarak teşhis koydurur. Normal kişilerde ve mastositozlu olgularda mast hücreleri CD34 eksprese etmezler (38-40). Sonuçta; kemik iliği aspirasyon materyali alınan bir olguda gerçekleştirilen akım sitometride CD117 pozitifliği ile tanınan (kapılanan) mast hücrelerinde CD34 negatifken CD2 ve CD25 ekspresyonlarının pozitif olduğunun görülmesi ile mastositozis teşhisi akım sitometrik olarak konulabilmektedir (Şekil 12).

### SONUÇ

Günümüzde birçok immünolojik ve allerjik hastalıkların tanısında akım sitometrinin kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıntılı bir anamnez ve sistemik fizik muayenenin ardından klinik şüphe dahilinde yapılacak akım sitometri çalışması ile birçok hastalığın tanısının konulabildiğini, tedavinin etkinliğini takipte de akım

sitometrinin önemli bir yeri olduğunu vurgulamak isteriz (41). Yakın gelecekte, akım sitometri yeni belirteçlerle ve gelişmiş teknolojisi ile allerjik ve immünolojik hastalıkların teşhis ve takibinde daha yoğun bir şekilde kullanılmaya devam edilecektir (42).

## KAYNAKLAR

- Aydın A, Özerol İH. Lösemi ve lenfomaların irdelenmesi ve teşhisinde flow sitometrik immün tip tayini. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1996;3:130-6.
- BD Biosciences. Introduction to flow cytometry: A learning guide 2000. Available at: [http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med\\_80691.pdf](http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf). (Erişim tarihi 30 Eylül 2015)
- CH Dunphy. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. Arch Pathol Lab Med 2004;128:1004-22.
- SF Ibrahim, Engh GVD. Flow cytometry and cell sorting. Adv Biochem Engin/Biotechnol 2007; 106:19-39.
- Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2007; 5: 75-82.
- Azkur AK, Aslan ME. Akış sitometri ve veteriner hekimlikte uygulamaları. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi 2012;7: 56-66.
- Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: A view from stanford. Clin Chem 2002;48: 1819-27.
- Laane E, Tani E, Björklund E, Elmberger G, Everaus H, Scoog L, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. Cytometry Part B Clinical Cytometry 2005;64(1):34-42.
- Deniz G. Flow sitometrik tekniklerin klinik kullanımı. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007; 3(43): 73-80.
- Villas BH. Flow cytometry: An overview. Cell Vis 1998; 5: 56-61.
- Rahman M. Introduction to flow cytometry. Oxford: Serotec Ltd,2006:16-23.
- Rose AS, Knox KS. Bronchoalveolar lavage as a research tool. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28(5): 561-73.
- Matteucci E, Giampietro O. Flow cytometry study of leukocyte function: analytical comparison of methods and their applicability to clinical research. Curr Med Chem 2008; 15(6): 596-603.
- Peterson RA, Krull DL, Butler L. Applications of laser scanning cytometry in immunohistochemistry and routine histopathology. Toxicol Pathol 2008; 36(1): 117-32.
- Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood 2008; 111(8): 3941-67.
- Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. Cytometry B Clin Cytom 2007;72 Suppl 1:S3.
- De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M et al. J. Diagnostic tests based on human basophils: More potentials and perspectives than pitfalls. Int Arch Allergy Immunol 2008;146(3):177-89.
- Ocmant A, Peignois Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Schanden L. Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. J Immunol Methods 2007; 320(1-2): 40-8.
- Georgescu D, Ferrari-Lacraz S, Villard J. Anti-HLA antibody detection and rejection in kidney transplantation: Impact of the new technologies. Rev Med Suisse 2007; 3(108): 1064-9.
- Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. J Allergy Clin Immunol 2007;120(4):776-94.
- Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. J Allergy Clin Immunol 2010;125(2 Suppl 2):S182-94.
- van der Burg M, van Zelm MC, Driessen GJ, van Dongen JJ. New frontiers of primary antibody deficiencies. Cell Mol Life Sci 2012;69(1):59-73.
- de Vries E, Driessen G. Educational paper: Primary immunodeficiencies in children: A diagnostic challenge. Eur J Pediatr 2011;170:169-77.
- Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. Clin Immunol 2005; 116(1):37-41.
- Reith W, Mach B. The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. Annu Rev Immunol 2001;19:331-73.
- Holland SM. Chronic granulomatous disease. Clin Rev Allergy Immunol 2010;38:3-10.
- Smith DK, Neal JJ, Holmberg SD. Unexplained opportunistic infections and CD4+ T-lymphocytopenia without HIV infection. An investigation of cases in the United States. The Centers for Disease Control Idiopathic CD+ T-lymphocytopenia Task Force. N Engl J Med 1993;328:373-9.
- Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the a chain of the interleukin-2 receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94(7):3168-71.
- Bezrodnik L, Caldirola MS, Seminario AG, Moreira I, Gaillard MI. Follicular bronchiolitis as phenotype associated with CD25 deficiency. Clin Exp Immunol 2013;175:227-34.
- Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: Forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. J Allergy Clin Immunol 2007;120(4): 744-50; quiz 751-2.

31. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: Current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; 61:1028-39.
32. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy* 2015; 70: 1393-405.
33. Eberlein B, Hann R, Eyerich S, Pennino D, Ring J, Schmidt-Weber CB, et al. Optimizing of the basophil activation test: Comparison of different basophil identification markers. *Cytometry B Clin Cytom* 2015; 88(3): 183-9.
34. Gokmen NM, Ersoy R, Gulbahar O, Ardeniz O, Sin A, Unsel M, Kokuludağ A. Desensitization effect of preseasonal seven-injection allergoid immunotherapy with olive pollen on basophil activation: The efficacy of olive pollen-specific preseasonal allergoid immunotherapy on basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;159(1): 75-82.
35. Beeler A, Zaccaria L, Kawabata T, Gerber BO, Pichler WJ. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2008; 63(2):181-8.
36. Erzen R, Kosnik M, Silar M, Korosec P. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: A long-term sting challenge study. *Allergy* 2012; 67(6):822-30.
37. Novak N, Mete N, Bussmann C, Maintz L, Bieber T, Akdis M, Zumkehr J, Jutel M, Akdis C. Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(5):1153-8.
38. Teodosio C, Mayado A, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, et al. The immunophenotype of mast cells and its utility in the diagnostic work-up of systemic mastocytosis. *J Leukoc Biol* 2015;97(1):49-59.
39. Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, Nunez Lopez R, García-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 2004;58(1):1-8.
40. Gökmen NM, Gülbahar O. Alerjik hastalıkların tanısında serolojik ve flowsitometrik testler. *Turkiye Klinikleri J Allergy-Special Topics* 2012;5(2):57-61.
41. Mortaz E, Gudarzi H, Tabarsi P, M Adcock I, Masjedi MR, Jamaati HR, et al. Flow cytometry applications in the study of immunological lung disorders. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2015;14(1):12-8.
42. Herderschee J, Fenwick C, Pantaleo G, Roger T, Calandra T. Emerging single-cell technologies in immunology. *J Leukoc Biol* 2015;98(1):23-32.