

*Derleme-Review*

<http://dx.doi.org/10.7197/1305-0028.67260>

# Sağlıklı kemik iliği ve kan örneklerinde akım sitometri uygulamaları

## *Flow cytometry application in normal bone marrow and peripheral blood*

**Hüseyin Avcılar, Mustafa Yavuz Köker\*, Bülent Eser**

İmmünoloji Anabilim Dalı (Dr. H. Avcılar, Doç Dr. M. Y. Köker), Hematoloji Bilim Dalı (Prof. Dr. B. Eser), Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-38030 Kayseri

### **Özet**

Akım sitometrik analiz ile daha doğru sonuçlara ulaşabilmek için kemik iliği ve periferik kan hücrelerinin fiziksel morfolojisinin iyi bilinmesi gereklidir. Akım sitometride; FS, SS ve CD45 kapısı ile kemik iliği hücresel bileşenleri ve onların karakterleri hakkında iyi bir bilgi edinmek mümkündür. Normal kemik iliği yapısını anlamak, patolojik durumların tanımlanmasında oldukça önemlidir. Sonuç olarak, sağlıklı kemik iliği ve kan örneklerinin akım sitometri ile doğru tanıyabilmek bizim daha iyi immün-fenotiplendirme yapmamızı sağlar.

**Anahtar sözcükler:** Kemik iliği, antikor, blastik hücre, akım sitometri

### **Abstract**

The physical morphology of bone marrow and peripheral blood cells has to be well known to achieve more accurate results with flow cytometric analysis. In flow cytometry; FS, SS and through the gate of CD45, it is possible to obtain a good knowledge about the characteristic of bone marrow cellular components. it is very important to understand the structure of normal bone marrow for the identification of pathological conditions. As a result, to recognize healthy bone marrow and blood samples correctly by flow cytometry enables us to make better immunophenotyping.

**Keywords:** Bone marrow, antibody, blastic cell, flow cytometry

**Geliş tarihi/Received:** 01 Eylül 2014; **Kabul tarihi/Accepted:** 12 Eylül 2014

### **\*İletişim adresi:**

Dr. Mustafa Yavuz Köker, İmmünoloji Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-38030 Kayseri. E-posta: mykoker@erciyes.edu.tr

### **Giriş**

Son yıllarda gelişen teknolojiye bağlı olarak kemik iliği elemanlarının 'immüno' morfolojik özelliklerinin akım sitometri ile değerlendirilmesi oldukça önem kazanmıştır. Akım sitometri ile çok parametrelili analizler yapılabilmekte, hücrelerden oldukça fazla veri elde edilebilmekte ve parametreler arasındaki ilişki ölçülebilmektedir. Hücre analizinden elde edilen bu veriler klinik tanıda ciddi katkılar sağlayabilmektedir. Hasta örneğindeki verilerin rasyonel bir şekilde değerlendirilmesi ve örnek alınan bireydeki klinik duruma ışık tutması ana amaçlardan biridir.

Akım sitometri ile immünfenotiplendirme sürecinde hücrenin öz niteliklerine ait elde edilen verilerin morfolojik bulgular ile ilişkilendirilmesi doğru tanıyı destekleyici olabilmektedir. Son yıllarda, akut lösemiler, kronik lenfoproliferatif hastalıklar ve bazı immün yetmezliklerin tanısında akım sitometri altın standart test olarak kabul edilmeye başlanmıştır [1]

Akım sitometri uygulamasının bir başka özelliği de hücrenin gelişimsel evrelerinin tayin edilebilmesidir. Olgunlaşmış genç (immature) hücrelerin taşıdığı yüzey reseptörleri önceden bilindiğinden, hücre yüzeyindeki reseptörlerin ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak kök hücre, blastik hücre, immature hücre, hematogon, olgun hücre ya da aktivasyon fazında hücre klonları seçilebilmektedir.

Hücrelerin aktivasyon fazının akım sitometri ile tayin edilebilmesi enfeksiyonların tanısında yeni bir uygulama olarak gündeme taşınmıştır. Daha şimdiden Fc-gamma reseptör I (FcRI) i ifade eden CD64 ekspresyonundaki artış yeni doğan enfeksiyonlarının erken tanısında kullanılmaya başlamıştır [2, 3].

### ***Akım sitometride uygulama***

Akım sitometride temel eylem, analizi planlanan sıvının lazer ışınına maruz bırakılması ve sıvının (kan, kemik iliği veya diğer) içerisinde mevcut olan elemanlara (eritrosit, granülosit, trombosit, lenfosit vb.) çarpan ışının yansımaları, bunun elektronik detektörler tarafından algılanması ve etkileşim bilgisinin bir yazılım programında toplanarak yorumlanmasıdır.

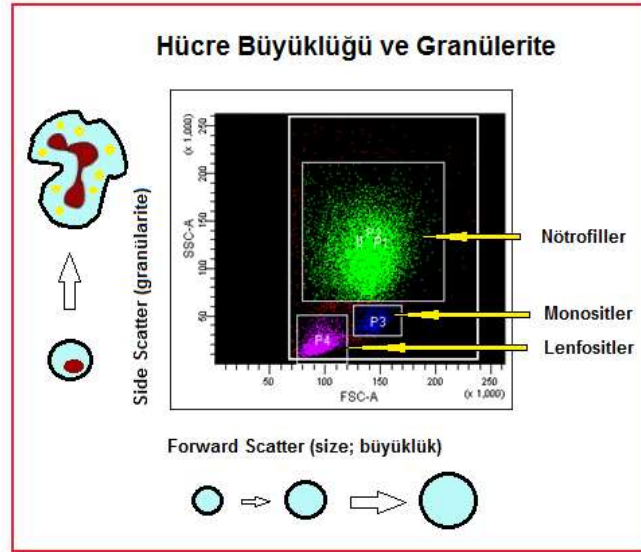
Kemik iliği ve kan örneklerinde; hücre morfolojisinin tanımlanmasında üç önemli bileşen kullanılmaktadır. Forward scatter (ileri dağılım), side scatter (yan dağılım) ve ortak lökosit antijeni CD45 (floresan işaretli antikor, MoA) kapısındaki hücre dağılımıdır. Bu düzlemlerin 2 boyutlu ya da 3 boyutlu karşılaştırmalarından elde edilen datalar hücrelerin immün-fenotiplendirilmesinde kullanılır. Son yıllarda bu temel uygulamalara ek yüzlerce farklı antikorla elde edilen hücre görüntüsü (pozu) elde edilmeye başlanmış ve değerlendirme süreci karmaşıklaşmıştır. Bu anlamda akım sitometri uygulaması bir tür Manyetik Rezonans ile organ görüntülenmesine benzetilebilir. MR da değişik kesitlerde dokulardan elde edilen görüntüler, akım sitometride ise hücrelerden farklı antikorlarla elde edilmektedir. Bu sonuçlar, hücre morfolojisi ve patolojisi ile ilişkili durumlara göre yorumlanmakta ve hücrelerin hastalık ilişkisi raporlanmaktadır [2].

### ***Forward scatter (FS, hücre büyüklük ölçümü)***

hücreler akım sitometri cihazından geçerken lazer ışığının çarpması ile oluşan görüntüden hücrenin boyutları ve çapı hakkında bir bilgi almada kullanılır. Burada görüntü; bir el feneri önünde yakındaki bir duvarda oluşan bir basket topunun yada futbol topunun gölgesi gibidir. Benzer bir şekilde, daha geniş çaplı hücrelerde yüksek ve küçük hücrelerde ise daha az FS (relative size) değeri vardır.

### ***Side scatter (SS, hücre granüler yapı ölçümü)***

Yan dağılım (SS), ışık yolu 90 derecelik bir açıdan hücreyi aydınlatan ve sonra yansıyan lazer ışığı ile elde edilir. Organeller ve granül yapısı karmaşık olan hücreler (Eozinofil ve nötrofil) daha fazla ışık yansıtır (Şekil 1). Bu özellik hücre gruplarının tanımlanmasında kullanılır.



Şekil 1. Akım sitometride analiz örneğinin hücresel dağılımı, FS/SS düzlemi.

### **CD45 pozitifliği**

Ortak lökosit antijeni, leukocyte common antigen olarak ta bilinir ve akım sitometrik değerlendirmede oldukça önemli bir parametredir. CD45 trans-membran glikoprotein yapısında olan bir tirozin fosfatazdır ve hücrenin aktivasyon düzeyine göre 5 izoformu bulunur. Bütün hematopoetik hücrelerde anti-CD45 antikoru ile değişik düzeylerde ekspresyon izlenir. CD45 hücrelerin hematopoetik kökeni ayırmada kullanılan en yararlı belirteçlerden biri olarak kabul edilir. Birçok laboratuarda kemik iliği hücreleri üzerinde çalışan hemen hemen tüm panellerde CD45 yer almaktadır. Hücrelerin CD45 pozitifliği [negatif, zayıf (dim), orta (moderate), pozitif (bright) veya değişken (variable)] şekilde sınıflandırılmaktadır.

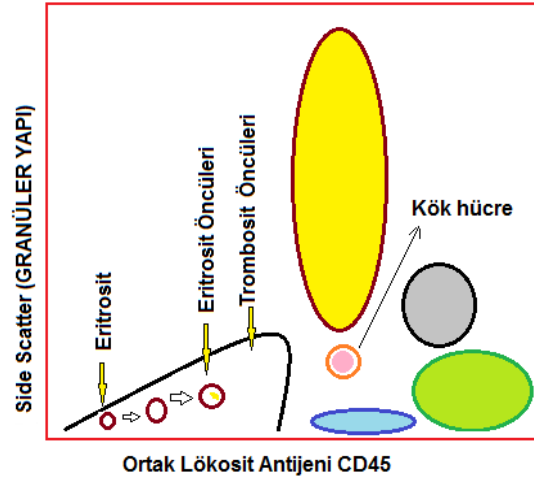
Akım sitometrik analizde; FS, SS ve CD45 kapısında hücrelerin dağılımından sağlanan bilgiler birleştirilerek kemik iliği veya kan örneğindeki hücresel dağılım yüzdesi ölçülebilir. Rutin analizde, özel değerlendirmelerde kapı alınarak (elektronik seçilen) kemik iliğini oluşturan tüm bileşenler hakkında daha detaylı ve birbiri ile bağlantılı bilgiler elde edilebilmektedir. SS/FS, SS/CD45 yada FS/CD45 ilişkileri normal bir örnekte ilk önce incelenmelidir (Şekil 2).

### **Akım sitometride analiz**

Periferik kan ve kemik iliğini oluşturan sağlıklı elemanlar;

### **Eritroid seri elemanları**

Erken eritrosit öncülerinde CD45 pozitifliği orta düzeydedir. Eritrosit öncüleri olgunlaştıkça CD45 pozitif özelliklerini kaybederler, kanda eritrosit haline dönüşünce tamamen CD45 negatif olurlar. Eritrositler ve öncülerinin tayinde kullanılan bir başka antikor CD235a (glikoforin A, glycophorin-A) dır. Tüm hematopoetik elemanlar aynı kök hücre öncülerinden kaynaklanır ve olgunlaşmamış eritroid hücreler blast hücrelerle aynı büyüklükte (FS) olabilir. Eritrosit öncüleri olgunlaştıkça hacim olarak küçülür ve daha solda yerleşir. Bu grubun SS de yerleşimi de düşük derecededir ve olgun eritrositlerin SS değeri sifıra yakındır (Şekil 2). Bazı durumlarda eritroid elemanların nütrisyonel anemiler (yani, B12/folat eksikliği), miyeloproliferatif sendromlar, myelodisplastik sendromlar ve genetik eritrosit bozukluklarında, SS/45 değeri artabilir ve yukarıdaki hastalık olasılıkları değerlendirilir.

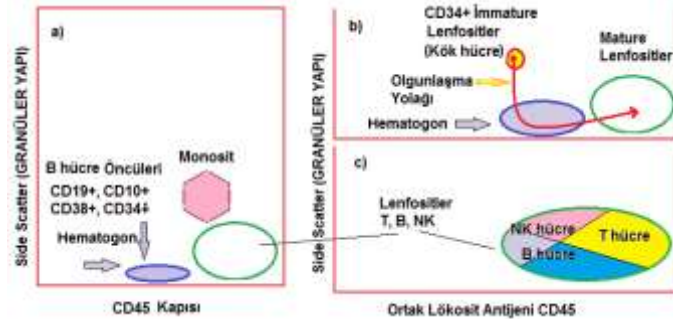


Şekil 2. Eritroid seri ve trombosit öncülerinin akım sitometrik analizde CD45 kapısında yerleşimi.

### Lenfositler

Kemik iliklerinde bulunan lenfositler heterojendir. Çoğu durumda, lenfositler, T hücreleri ve olgunlaşmış ve olgunlaşmamış B hücre (hematogon) topluluklarından oluşur. Olgun lenfosit topluluklarının çeşitli morfolojik özellikleri vardır, ama genellikle yoğun kromatini ve az bir mavi sitoplazması olan küçük hücrelerden oluşur. Hücrelerin morfolojik karakterleri alt-gruplara ve aktivasyon durumlarına göre de değişebilir. Dinlenme fazında (resting) olan lenfositler FS'de daha küçük boyutludur. Aktivasyon fazına girdiği zaman boyutları artabilir. SS değerleri genellikle düşüktür. Ancak aktive olan hücrelerde bu oran artabilir (büyük granüllü lenfositlerde SS yerleşimi yukarı doğru kayabilmektedir) (Şekil 3).

Lenfosit için CD45 pozitifliği çok karakteristiktir ve lenfositlerin kolayca tanımlanmasında yardımcı olur. Düşük SS ve parlak CD45 pozitifliği, akım sitometri kadranında sağ alt köşede yerleşen lenfoid hücre grubunu tanımlamada oldukça yardımcı olur. Şekil 3'te görüldüğü gibi T, B ve NK hücreleri akım sitometri ile görüntü kadranında en yaygın yerleşimlerine göre şematize edilmiştir. Sitotoksik karakterli ve granüllü olan CD8 + T hücreler CD4 + T hücrelere nispeten T lenfositlerin yerleşim yerinin daha yukarı sınırlarında bulunmaktadır. Bunda aktivasyon fazı ve granüler yapıların etkili olduğu düşünülmektedir. Sağlıklı T lenfositler CD3, CD4/CD8, CD5, CD7, CD2 gibi temel markırları taşırlar, NK hücreler ise CD56, CD16, CD45 gibi yüzey markırlarına sahiptir.

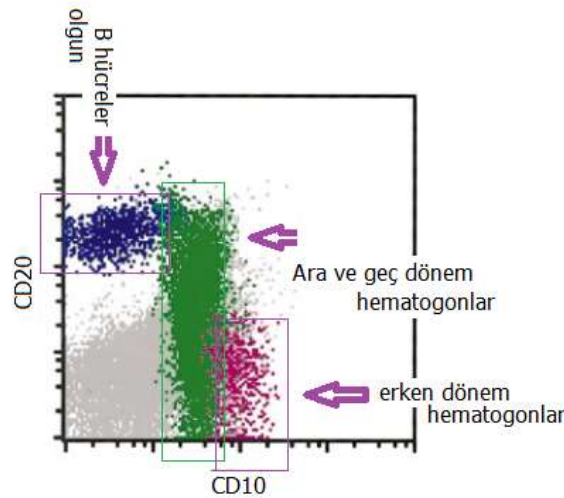


Şekil 3. Lenfoid seri elemanları ve hematogonun akım sitometri cihazında CD45 kapısında yerleşimi. a) CD45 kapısında hematogon yerleşimi ve yüzey markırları, b) CD34 + kök hücrelerin B hücresine farklılaşma yoluğu ve CD45 kapısında yerleşimi, c) CD45 kapısında yerleşen lenfoid hücre grubunda T, B, NK hücrelerinin yerleşimi.

## Hematogon

B lenfositlerin öncüleri olarak adlandırılan hematogon kemik iliği içerisinde olgunlaşır. Özellikle çocukların kemik iliği örneklerinde reaktif koşullarda hematogon oranı artabilir. Kemoterapi ya da Kİ baskılayıcı tedaviler sonrası rejenerasyon aşamasında olan kemik iliğinde hücrelerin %5-10'unu hematogon oluşturabilir [4, 5].

Birçok yönden, hematogon ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) deki lenfoblastik hücrelerin morfolojik görünümü, örtüşmektedir. Bu hücrelerin akım sitometrik özellikleri de zaman zaman karışıklığa neden olabilir ve hatta hematogonlar neoplastik bir grup olarak tanımlanabilir. Hematogon ve küçük lenfositlerin benzer FS ve SS değeri vardır. Olgun lenfositlerden hematogonu ayıran en önemli karakter daha düşük bir seviyede CD45 pozitifliği olmasıdır (Şekil 3) [4]. Sadece FS/SS/CD45 analizi ile hematogon ve lenfoblast ayırımı zor olabilir.



**Şekil 4. B hücre öncüsü hematogonun akım sitometri CD10/CD20 kadranında yerleşimi ve gelişimsel evrelerinin dağılımı [4]. Erken dönem hematogonlar CD10 parlak pozitif (+), CD20+, ara ve geç dönem hematogonlar CD10+, CD20 parlak +, olgun B hücreler ise CD10 negatif, CD20 parlak + karakterlidir.**

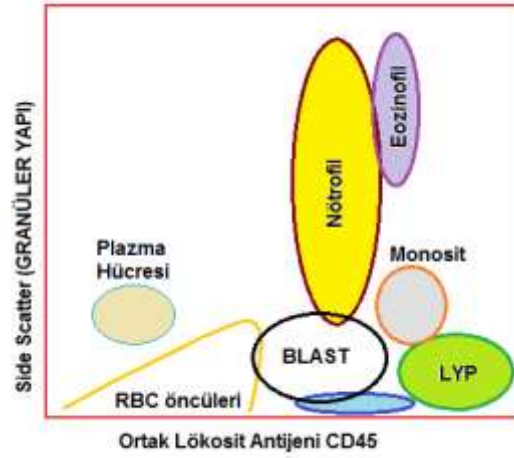
Akım sitometri uygulamalarında hematogonu ayırt etmek için kullanılan özellikleri şunlardır [4, 5].

- Matürasyon aşamasında farklı B hücre klonları ihtiva eder (Şekil 4).
- Heterojen bir hücre grubudur, genel olarak ALL den farklı olarak, CD34, CD10, CD38, CD20, CD22, CD19 ve Tdt tam ya da kısmi pozitifliği vardır.
- Hipogranüler karakter nedeniyle alt düzleme yakın, yapışık (SS değeri çok düşük) lokalize olabilir.
- Gerektiğinde CD44 ve CD54 gibi adezyon moleküllerinin heterojen ekspresyonunun varlığı kontrol edilerek, CD44+, CD54+, CD19+ olan lösemik blasttan ayırt edilebilir [5].

## Nötrofiller

Nötrofiller ve bunların öncüleri kemik iliğinin en önemli bileşenlerinden biridir. Nötrofil morfolojik karakterleri olgunlaştıkça değişkenlik gösterebilir (Şekil 4). Nötrofillerin en tanınan öncüleri myeloblasttır. Bu hücreler oldukça büyük hücrelerdir, olgunlaştıkça volüm olarak küçülür ve granüler karakterleri (SS) artar. Myeloblastlar (AML de olduğu gibi) aşırı miktarda artarsa CD45 Dim/Moderate kapısında yoğunlaşma olur. Nötrofillerin akım sitometride kullanılan başlıca markırları MPO, CD13, CD33, CD10, CD16, CD15 dir. Ayrıca CD11b, CD38, CD4, CD24 ekspresyonları da gözlenebilir.

Nötrofiller gibi blastik hücrelerde de orta düzeyde CD45 pozitifliği vardır. Ancak blastik hücrelerin genellikle çok az granüler özelliği olduğu için SS özelliği düşüktür (Şekil 5) [6]. İstisnai olarak sadece akut promyelositik lösemi (APL, hipergranüler M3) de yüksek miktarda SS değeri vardır (fazla miktarda granülleri olması nedeni ile).



Şekil 5. Akım sitometri cihazı ile CD45 kapısında analizde hücrelerin yerleşimi ve blastik hücrelerin en fazla bulunduğu CD45 dim-moderate bölgesi [2, 6, 7].

### **Eozinofiller**

Eozinofiller, yoğun kromatin içeren loblu çekirdeği ve büyük, turuncu-kırmızı granülleri ile ilginç bir morfolojiye sahiptir. Bu hücrelerin pek çok işlevi vardır, ancak parazitik enfeksiyonlar, alerji ve myeloproliferatif sendromlar bunlardan bazılarıdır. SS/FS karakterleri nötrofile benzer ve SS genel olarak daha yüksek bir seviyededir. İmmün fenotiplendirmede CD45 pozitifliği, CD16 negatifliği ve SS değeri nötrofillerden daha fazla olması önemli ayırıcı özellikleridir (Şekil 5). AML M4Eo'da belirgin eozinofil artışı beklenebilir.

### **Bazofiller**

Bazofiller, granülositlere benzer bir morfolojik karaktere sahip nadir hücrelerdir, immünolojik ve alerjik yanıtlarda yer alırlar. Bu hücrelerin akım sitometrik özellikleri, CD45 ile orta-yüksektir ve SS değeri çok küçüktür. NK hücrelerine yakın bölgede yerleşirler, bazen lenfoid hücre grubundan CD45 dim özellikleri nedeniyle ayrılırlar. Akım sitometride ilginç bir olay da; bazofillerin granüllerinin kullanılan ışığı emmesidir ve SS değeri düşüktür. Periferik kan veya kemik iliği artışı, sadece çok nadiren reaktif veya bulaşıcı enfeksiyonlarda görülür. Çoğu zaman, myeloproliferatif bozukluklar, özellikle kronik myeloid lösemilerde artar.

### **Monositler**

Monositler bağışıklık sisteminin efektör hücreleridir ve diğer hücrelerle özellikle lenfositlerle birçok etkileşimi vardır. Monosit morfolojik karakter olarak, geniş sitoplazmalı ve bazen küçük sitoplazmik granülleri olan orta-büyük ölçekli hücredir ve myeloid öncülerinden köken alır. Monositler aktif hale gelince, granüler yapısı ve büyüklüğü artar. Ayrıca aktivasyon durumunda CD45 ve CD64 pozitifliği artar, SS/FS yerleşimi olarak lenfosit ve granülosit gruplarının arasında yerleşir (Şekil 5). Başlıca monosit markırları, CD33, CD14, HLA-DR, CD11b dir. Ayrıca CD16, MPO, CD13 monositlerde eksprese edilebilir ancak ekspresyon nötrofillere göre daha zayıftır. Bu özellikler monositlerin akım sitometri ile analizinde panel belirleyici olarak dikkate alınır. Monositler bazı reaktif ve Tbc gibi enfeksiyöz durumlarda oransal olarak artabilir. Monositler ve monositik öncüleri bazı neoplastik koşullarda (kronik miyelomonositik lösemi, myeloproliferatif/miyelodisplastik bozukluk ve akut monositik ve monoblastik lösemilerde) artabilir. Monositler dokuya geçtiklerinde makrafaj ve dendritik hücrelere dönüşerek görev yaparlar.

### **Plazma hücreleri**

Plazma hücreleri, B hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşan immünglobulin üreten hücrelerdir. Morfolojik olarak, orta büyüklüktedir, düşük-orta düzeyde SS vardır, immünglobulin üretiminde görev alan belirgin kaba endoplazmik retikulum mevcuttur. B lenfositlerden farklı olarak CD20, CD19 ekspresyonlarında azalma ve kayıp buna karşılık CD38 ve CD138 ekspresyonunda artış gözlenebilir. Fiziksel özellikleri lenfositlere benzemekle beraber, olgun plazma hücreleri genellikle CD45 pozitifliğini kaybederler (Şekil 5).

Sonuç olarak; akım sitometrik analiz sonuçlarının daha iyi anlaşılabilmesi için kemik iliği hücrelerinin fiziksel morfolojisinin gözden geçirilmesi ve bilinmesi çok önemlidir. Akım sitometride; FS, SS ve CD45 parametrelerini kullanarak, kemik iliği hücresel bileşenleri ve onların karakterleri hakkında iyi bir bilgi edinmek mümkündür. Normal kemik iliği yapısını anlamak, patolojik durumların tanımlanmasında oldukça önemlidir. Kemik iliği ve kanda normal "immün" morfolojiyi akım sitometri ile tanıyabilmek bizim daha iyi immün-fenotiplendirme yapmamızı sağlar. Hücrelerin aktivasyon fazının akım sitometri ile tayin edilebilmesi enfeksiyonların tanısında yeni bir uygulama olarak gündeme taşınmıştır. Daha şimdiden yeni doğan enfeksiyonları ve immün yetmezliklerin erken tanısında kullanılmaya başlamıştır [1, 3]. Benzer şekilde gram negatif ve pozitif enfeksiyonların ayırımı, viral enfeksiyonların tanısı ve mantarla ilişkili enfeksiyonların tanısını hücre yüzey markırlarına dayanarak yapabilmeye ve izleme yönelik araştırmalar devam etmektedir. Akım sitometrinin geleceğinde, onlarca monoklonal antikoru aynı anda dakikalar içinde analiz ederek hücre yüzeyi reseptör haritalamasının yapılması beklenmektedir. Bu sayede hücre yüzey reseptör dağılımını derecelendirerek hastalık tanısı ve takibi yapabilecek uygulamaların geliştirilmesi mümkün olacaktır. Bütün bu süreçler; yüksek kapasiteli akım sitometre cihazları, klinik ile uyumlu çok parametrelili analiz yazılımları ve analizlerde kullanılacak monoklonal antikoları geliştirme teknolojisine sahip olan Ar-Ge gruplarını, bu alanda bilim dünyasının önüne taşıyacaktır.

### **Kaynaklar**

1. O’Gorman MRG. Role of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of primary immunodeficiency disease. Clin Lab Med 2007; 27: 591-626.
2. C. Darrell Jennings and Kenneth A. Foon Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. Blood 1997 90: 2863-2.
3. Dilli D, Oguz SS, Dilmen U, Koker MY, Kizilgun M. Predictive values of neutrophil CD64 expression compared with interleukin-6 and C-reactive protein in early diagnosis of neonatal sepsis. J Clin Lab Anal 2010; 24: 363-70.
4. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. Blood 2001; 98: 2498-507.
5. Rimsza LM, Larson RS, Winter SS, Foucar K, Chong YY, Garner KW, Leith CP. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression, and architectural features. Am. J. Clin. Pathol 2000; 114: 66-75.