**AKAN HÜCRE ÖLÇER (FLOW CYTOMETRY)- PRENSİPLER**

 **Dr Klara Dalva**

**“Flow Cytometry” (FCM),** kullanılan cihaz ve analiz sistemlerinin, gelişmesine bağlı olarak giderek daha fazla alanda, yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar uygulamasıdır. “Flow Cytometry” nin diğer pek çok teknikten ayrılmasını ve bu isimle anılmasını sağlayan temel özelliği, bir sıvı içinde ilerlemekte olan hücrelerin yönlendirildikleri ölçüm kamarasında (flow cell) verdikleri sinyaller aracılığı ile çok kısa bir zaman diliminde (Ör: 500-5000hücre/sn), hücre bazında değerlendirilebilmesidir. Türk İmmunoloji Derneği, bu yöntemi “Akan Hücre Ölçer” olarak Türkçeye kazandırmıştır.

Aynı hücre üzerinde çeşitli parametrelerin eş zamanlı değerlendirilmesine fırsat veren FCM yöntemi ile hücrenin yüzey antijenleri tespit edilerek immunfenotiplendirme yapılmasının yanı sıra hücre içi proteinlerin, fosfoproteinlerin, sitokinlerin, hücre aktivasyonu ve apoptoz ile ilişkili olarak hücrede meydana gelen değişikliklerin ölçülmesi de mümkündür. Hücre içi FCM teknikleri ile DNA’nın işaretlenmesi yoluyla hücre döngüsünün değerlendirilmesi, hücrelerin çeşitli uyaranlara verdikleri yanıtın ölçülmesi ve hücre bölünmesinin takibi mümkün olmaktadır. Yeni sayılabilecek bir diğer uygulama alanı, antijenlere özgün olan T hücre alt gruplarının belirlenmesidir. Çeşitli boyutlarda boncukların taşıyıcı olarak kullanılması ile sıvı fazda bulunan pek çok analitin ölçülmesi de mümkündür. Bu şekilde hücre içindeki sitokinlerin yanı sıra sıvı faza salınan sitokinler ve çeşitli antijenlere özgün antikor yanıtları değerlendirilebilmektedir (Ör: Solid organ nakillerinde kullanılan çapraz karşılaştırmalar, verici antijenlerine özgün antikorların “panel reaktif” antikorların, anti endothelial antikorların tespiti).

**Donanım:**

FCM analizlerinde kullanılan cihazlar (Flow Cytometer) üç temel bileşenden oluşmaktadır (şekil 1). Bu üç bileşen: Işık kaynakları ve onu yönlendiren mercek, filtrelerden oluşan “*optik” sistem*, hücrelerin ışık ile karşılaşacağı ölçüm kamarasına yönlendirilmesini sağlayan sıvılar, “*fluidic” sistem* ve hücreler ışığın önünden geçerken açığa çıkan ışık sinyallerini toplayıp analiz edilebilecek elektronik sinyallere çeviren “*elektronik sistem*” olarak özetlenebilir.

Cihazlarda ışık kaynağı olarak genellikle her biri farklı dalga boyunda monokromatik ışık üreten lazer(ler) kullanılmaktadır. Lazer kaynağından çıkan ışık, lensler aracılığı ile şekillendirilip; hücre ile karşılaşacağı ölçüm kamarasına (flow cell) yönlendirilir. Modern cihazlarda daha kaliteli ışık üretebilen daha ufak olan solid lazer kaynaklarının kullanılması tercih edilmektedir. Kullanılan lazer kaynakları mor ötesi (350 nm), mor (405nm), mavi (488nm), yeşil (532nm), sarı (560 nm), turuncu (610nm) ve kırmızı (633 nm) renkte ışık verebilirler.

Ölçüm kamarasında ışık ile karşılaşan hücreler, floresan olan ya da olmayan çeşitli sinyaller oluşturur. Oluşan sinyaller, herbiri bir fotodedektörle bağlantılı olan filtre sistemleri aracılığı ile algılanır. Floresan olmayan sinyallerin algılanması için lazer kaynağı ile aynı dalga boyunda ölçüm sağlayacak filtreler tercih edilir. Floresan ölçümü için ise kullanılan florokromların ayrı ayrı algılanmasını sağlayacak filtreler ve düzenlemeler mevcuttur. Her cihaz, sahip olduğu lazer(ler), fitre setleri ile ilişkili olarak farklı özelliklere sahip olabilir.

FCM içinde bulunan elektronikler, analog ışık sinyallerini (fotoelektronlar) algılayarak biriktirilip depolanabilecek dijital sinyallere dönüştürür. Dönüştürülen bu sinyaller, kanal numaraları ile ifade edilen bir ölçüm aralığı içinde değerlendirilir (Ör: 256 kanal, 1024 kanal). Ölçüm skalası, sinyallerin lineer ya da logaritmik olarak değerlendirilmesine fırsat verecek şekilde seçilebilmektedir.

Toplanan bu sinyallerin analiz edilmesini sağlayan çok sayıda yazılım mevcuttur. Bu yazılımlar ile sinyallerin çeşitli grafikler halinde görüntülenerek analiz edilmesi mümkün olmaktadır. Bu grafikler arasında seçilen bir parametreye göre hücre sayısal dağılımını gösteren histogramlar, iki parametrenin karşılaştırmalı değerlendirilmesini sağlayan nokta grafikleri (dot-plot), bu karşılaştırmaya hücrelerin sayısal dağılımını da ekleyen üç boyutlu grafikler (contour-plot, density plot), ve çeşitli çok boyutlu grafikler sayılabilir (Şekil 2). Kullanılan programlar, analiz edilen parametreler ile ilgili çok sayıda istatiksel bilgi verebilecek özelliklere sahiptir (Ör: ortanca-ortalama değerleri, tepe noktası, % oran, toplam veri sayısı).

**Floresan veren reaktifler**

FCM ile incelenecek bir hücrenin lazer ile uyarıldığında floresan sinyaller verebilecek reaktifler ile işaretlenmesi gerekir.

FCM nin en yaygın kullanım alanı olan immunfenotipleme işleminde hücrenin işaretlenmesi, kullanılan çeşitli monoklonal antikorlar (moab) aracılığı ile olmaktadır. Floresan ışıma yapabilen boyalar (florokrom) ile doğrudan ya da dolaylı olarak işaretlenmiş olan bu antikorlar, özgün oldukları antijeni taşıyan hücreye tutunduklarında onun da floresan verecek şekilde işaretlenmesini sağlamaktadır. Hücreler sadece moab aracılığı ile değil, çeşitli hücre organellerine bağlanabilen florokromlar, ortam koşullarına göre ışıma yapabilen florokromlar, hücre içine aktif olarak alınıp dışarıya pompalanabilen florokromlar ile de işaretlenebilmektedir.

Kullanılan boyalar, lazer ile uyarıldıklarında (eksitasyon) açığa çıkan enerji daha düşük enerjisi olan, daha yüksek dalga boyunda floresan sinyaller olarak yayılır (emisyon). Ticari kaynaklaradan temin edilebilecek, kullanımda olan florokrom sayısı hızla artmaktadır. Florokromlar özelliklerine göre gruplanabilir. Florescein isotyocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridin Chlorophyll Protein (PerCP), Allophycocyanin (APC) gibi *organik boyalar* ve iki florokromun konjuge edilmesi ile oluşturulan “*tandem*” boyalar (Ör: PE ve APC’nin Cyaninler ile konjugasyonuyla oluşan Cy5, Cy5.5, Cy7, Alexa Fluor bileşenleri,....) yaygın olarak kullanılmaktadır. Tandem boyalar kullanılınca lazer ile uyarılan ilk florokromun enerjisi ile uyarılan ikinci bir florokrom aracılığı ile lazer sayısını arttırmaya gerek kalmadan ölçülebilen floresan sayısının arttırılması mümkün olmaktadır. Son yıllarda yeni nesil, *inorganik, floresan veren yarı iletken nanokristaller* (Quantum dots) kullanıma girmiştir. Bu partiküllerin geniş bir eksitasyon spektrumlarının olması (525-800 nm) ve emisyon spektrumlarının birbirleri ile çakışmayacak kadar dar olması nedeniyle tek lazer kaynağı kullanarak çok daha fazla sayıda renk ile çalışma imkanı bulunmaktadır. Bu moleküllerin dayanıklı olmaları, hücrelerin daha uzun süre izlenmelerine de olanak tanımaktadır.

Yukarıda sayılanların yanı sıra *kalsiyuma, glutatyona, süperokside, hidrojoen iyonlarına duyarlı olan* çeşitli florokromlar mevcut olup bu ve benzeri flourokromlar, hücrelerin fonksiyonlarının değerlendirlmesi için kullanılmaktadır.

*DNA ve RNA içine girebilen* Propidyum iodide (PI), Ethidyum bromide (EB), DNA’ya özgün olan Hoeschst 33258 ve DAPI, DNA ve RNA ile bağlandığında farklı sinyaller veren Acridine Orange (AO) hücre döngüsünün takibinde ve hücre DNA/RNA içeriğinin saptanması amacı ile kullanılan florokromlardır.

Bir hücrenin işaretlenmesi için planlama yaparken seçilecek florokromların mevcut lazerler ile uyarılabildiğinden (eksitasyon dalga boyu) ve istenen dalga boyundaki sinyalleri toplayabilecek filtre ve dedektörlerin varlığından emin olunmalıdır. Farklı parametrelerin sağlıklı olarak değerlendirilebilmesi için bir arada kullanılacak flurokromların birbirleriyle etkileşime girmeyen ve ortak emisyon dalga boyuna sahip olmayanlar arasından seçilmesi gerekir.

**Kullanılan Örnekler:**

FCM uygulamaları için süspansiyon halinde bulunan hücreler ya da bu amaçla geliştirilmiş partiküller kullanılabilir. Rutin çalışmalarda en sık kullanılan örnekler, kan ve kemik iliği aspirasyon materyali olsa da tüm vücüt sıvılarından toplanan hücreler, lenf nodülü ya da dalak gibi dokulardan serbestleştirilen hücreler ve hücre kültürlerinden toplanan hücreler ile inceleme yapmak mümkündür. Esas olan, canlılığını ve bütünlüğünü koruyan hücrelerin tek hücre süspansiyonu haline getirilerek kullanılmasıdır.

İmmunfenotiplemede kullanılacak kan ve kemik iliği aspirasyon örneklerini toplamak için antikoagülan olarak EDTA veya heparin kullanılabilir. Trombositler ile yapılacak çalışmalar için ise koruyucu içeren özel tüplerin kullanılması önerilir. Sitokin çalışmaları ve diğer fonksiyonel testlerde ise genellikle kalsiyumu bağlamayan heparinin kullanılması tercih edilmektedir. Solid doku örnekleri laboratuvara iletilirken heparin içeren bir sıvı (Ör: RPMI) içinde transfer edilmelidir. Gelen örnekler mekanik olarak parçalandıktan sonra agregatlardan uzaklaştırmak için bir filtreden geçirildikten sonra kullanılır. Vücut sıvılarının da hiç bekletilmeden laboratuvara ulaştırılması esastır. Bekleyen örneklerde hücre ölümü, hücre antijen ifadelerinde değişimler olabileceğinden gelen her örneğin bekletilmeden çalışılmasına özen gösterilir. Bekleme süresince hücrelerin fizyolojik koşullarda kalması sağlanmalıdır (özel çalışmalar dışında kan/kemik iliği örneklerinin oda ısısında transfer edilmesi önerilmektedir).

**Hücre Hazırlama Yöntemleri**:

Hücrelerin FCM analizine hazırlanması aşamasında izlenen çok değişik yöntemler mevcuttur. Sonuçlar üzerinde doğrudan etkisi olacağı için kullanılan her yöntemin geçerli kılınmadan önce doğruluğunu test eden çalışmaların yapılmış olması gerekir.

Rutinde en çok kullanılan yöntem olan immunfenotiplendirmede hücreler, seçilen antikorlar ile bir süre bekletilir ve takip eden bir yıkama işlemi ile bağlanmayan antikorlar, hücre kalıntıları ve lizis solusyonu ortamdan uzaklaştırılır. Yıkama, genellikle fosfatla tamponlanmış serum fizyolojik (PBS) ile yapılır. Yıkamayı takiben FCM cihazından geçirilen hücrelerden açığa çıkan sinyaller toplanır (acquisition). Kullanılan örnek kan ya da kemik iliği ise daha temiz bir görüntü elde edebilmek için eritrositlerin ortamdan uzaklaştırılması istenir. Bu amaçla çeşitli özelliklerde “lizis” solusyonları kullanılabilir. Eritrosit parçalama (lizis) işlemi, hücreleri antikor ile karşılaştırmadan önce ya da sonra yapılabilir. Önce yapıldığında genellikle gelen tüm materyaldeki eritrositler topluca parçalanıp hücreler tüplere sonra dağıtılır (bulk lysis). Antikor ile bağlanmayı takiben yapılan lizis işeminde ise lizis işlemini takiben hücreler yıkanabilir (lysis Wash, LW) ya da yıkanmayabilir (Lysis no Wash, LNW). Her laboratuvar, kullanım amacına ve deneyimine göre seçeceği yöntemi belirlemelidir.

Hücre içi değerlendirilmeler için hücrelerin geçirgen hale getirilerek hazırlanması için de farklı yöntemler uygulanmaktadır. Bu aşamada hücreyi geçirgen hale getirip membranı tespit etmek amacı ile kullanılan reaktifler arasında hücreyi delen deterjan olan/olmayan ajanlar, çeşitli alkol solusyonları, farklı derişimlerde formalin solusyonları örnek olarak verilebilir. Bunların herbirinin içerik ve derişimi test sonuçları üzerinde doğrudan etkili olmaktadır.

**Verilerin Toplanması**:

Sağlıklı bir değerlendirme yapabilmek, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar almak için hücrelerden veri toplamaya başlamadan önce cihazın günlük performasının test edilmesi gerekir. Bu amaçla kullanılan, floresanla işaretli olan ve olmayan partiküllerden oluşan çeşitli ticari ürünler mevcuttur. Bazı uygulamalar için üretilmiş olan stabilize edilmiş kan örkeleri de bu amaçla kullanılabilir (Ör: CD34 pozitif hücreleri sayımı, lenfosit alt gruplarının tespiti için geliştirilmiş kontrol kanları).

Yeni nesil cihazlar ile bazı ince ayarlar, veriler toplandıktan sonra, analiz sürecinde yapılabilmektedir. Ancak bu şansı kullanabilmek için verilerin doğru ayarlanmış bir cihazda toplanması gerekir. Burada en önemli olan parametreler: Dedektörlerin voltaj değerleri, veri toplanacak parametrelerin seçilmiş olması, parametreler için amplifikasyon türünün doğru seçilmesi (linear/logaritmik), toplanacak sinyaller için belirlenen eşik değeri ve hücrelerin ölçüm kamarasından geçiş hızlarıdır.

Analizler için veri toplanacak hücre sayısı önceden belirlenmelidir. Toplanan hücre sayısı arttıkça duyarlık da artacağından özellikle az sayıda bulunan hücreler incelenecekse toplanacak hücre sayısı yüksek tutulmalıdır.

Veri toplarken önemli olan bir diğer konu da örnekler arasında olabilecek taşınmadır. Özellikle hastalık kalıntısı gibi az sayıda hücrenin arandığı durumlarda cihazın, ölçüme başlamadan önce ve örneklerin okunmalarının arasında distile su ile yıkanması önerilmektedir.

Çalışmada hücreyi işaretlemek için kullanılan florokromların sayısı ve kullanılan cihazın sahip olduğu donanım ile ilişkili olarak toplanacak verilerin sayısı/çeşitliliği değişkenlik gösterir. Kullanılan temel parametreler ve bunlarla ilgili kullanılan kısaltmalar Tablo 1 de özetlenmiştir

|  |
| --- |
| Tablo 1: FCM ile Ölçülebilecek Temel Parametreler |
| Parametre  | İlgili Özellik | Kısaltma |
| Dar açı ile kırılan, öne geçen ışık \*(Forward Scatter ) | Hücre çapı | FSC |
| Genellikle 90° ile kırılan ışık \* (Side Scatter) | Hücrenin optik olarak ne kadar homojen olduğu (granularite ile doğrudan ilişkili) | SSC |
| Floresan1-n | Değişken\*\* | FL 1-n |
| Zaman (time) | Ölçüm zamanı, süreç | t |
| \*: Gerek FSC, SSC gerekse FL sinyaller için oluşan sinyallerin yükseklik ve genişliği ayrı ayrı ve bir bütün (alan) olarak kaydedilmektedir. \*\*: Kullanım amacına göre çeşitli flourokromlar aracılığı ile hücre yüzeyi veya içindeki pek çok parametre (antijenler, DNA-RNA, fosfoproteinler, sitokinler, hücre içi pH, Ca++, membran potansiyelleri, fonksiyonel kapasite, bölünme sayısı,…… ) değerlendirilebilir. FL sayısı, cihazın optik donanımına, elektroniklerine ve çalışmada kullanılan florokrom sayısına göre farklılıklar gösterir. |

**Verilerin analizi**:

Toplanan Verilerin Görüntülenmesi

FCM ile elde edilen verileri görüntülemek için kullanılacak en basit yöntem, tek parametreli bir “histogram” grafiğinin kullanılmasıdır. Grafiğin “x” ekseninde, seçilen floresan parametre için alınan “sinyal yoğunluğu” ve “y” ekseninde her bir sinyal yoğunluğuna düşen hücre sayısı yer alır. Bu değerler birleştirildiğinde yoğunluğa göre hücrelerin dağılımını gösteren bir eğri elde edilir. Kabaca bir değerlendirme ile floresan yoğunluğu az olanlar negatif (eksenin sol tarafında sıfır ya da sıfırdan önce başlayacak şekilde), yoğunluğu çok olanlar ise pozitif olarak kabul edilir.

Hücreleri daha iyi tanımlayabilmek için aynı anda iki parametrenin değerlendirilmesi tercih edilir. Bu amaçla “x” ve “y” eksenlerine farklı birer parametre yerleştirilerek birbirlerine göre dağılımları gözlenir. Eksenlerde floresan veren bir parametre varsa bu şekilde dört farklı hücre grubu tanımlanabilir (x-y-/x+y-/x+y+/x-y+). Bu grafiklere üçüncü bir parametre olarak hücre sayısı eklendiğinde grafiklere derinlik kazandırılarak hangi bölmede daha çok hücre bulunduğu ve bunların dağılım özellikleri daha kolaylıkla izlenebilir ( Bkz şekil 2).

Rutin çalışmalar için iki parametreli grafiklerin kullanılması yeterli olsa da çok sayıda parametre kullanıldığında polikromatik grafiklerin kullanılması önemli bir uygulama kolaylığı sağlar.

Hücrelerin Seçilmesi:

Bir hücre karışımındaki hücrelerin özelliklerinin belirlenebilmesi için öncelikle bu karışımın içindeki farklı hücre serilerinin belli özelliklerine göre kümelere ayrılarak sınıflanması gerekmektedir. Bu işlem için, istenen hücre topluluğunu çevreleyecek geometrik bir şekil çizilir (gate). Çalışmanın amacına göre lenfosit, monosit, granulosit, eritrosit ya da trombosit gibi hematopoietik hücrelerin ya da incelenmek istenen hedefteki diğer hücrelerin seçilmesi ve analizin bu seçilen hücre grupları içinde yapılması, elde edilen verilerin daha özgün olmasına katkı sağlamaktadır. Örneğin kan örneğinde yapılan bir çalışmada lenfositleri seçmeden tüm hücreler içinde CD4 ifade eden hücrelerin sayısı değerlendirilirse, örnekteki monositlerin de CD4 ifade etmesi nedeni ile, bulunan değerlerin THelper hücreleri temsil etmesi söz konusu olamaz. Farklı hücrelerin aynı antijeni aynı ya da farklı düzeylerde ifade etmesi, yüzeylerindeki Fc reseptörler aracılığı ile antikorları özgün olmayan bir şekilde bağlamaları, otofloresan veren özellikleri ve ortamdaki sitofilik antikorların düzeyi, hücreleri kümelere ayırmadan analiz etmeyi zorlaştıran diğer faktörlerdir.

Hücreleri kümelere ayırmak için çeşitli stratejiler kullanılabilir. Çalışılan materyalin kan olduğu, hematopoietik hücrelerin incelendiği durumlarda en sık başvurulan yöntem, hücreleri büyüklük ve granüler yapılarına göre (sırasıyla FSC ve SSC) ayırmaktır. Kemik iliği aspirasyon incelemelerinde ise bu yöntemle alınan kümelerin sıklıkla kesişmesi nedeniyle sadece FSC vs SSC kullanılan yöntem yetersiz kalır ve hücrelerin granularite ve CD45 ifadelerine göre seçilmesi tercih edilir (CD45 ve SSC). Genel olarak CD45 ile en parlak boyanan agranuler hücreler lenfosit, SSC leri biraz daha fazla olan CD45 parlak hücreler monosit, CD45 düzeyi daha düşük olan ve granulariteye göre geniş bir SSC dağılımı gösteren hücreler granulosit olarak bilinir. Varsa çekirdekli eritroid seri hücreler ve yıkama ile uzaklaşmamış trombositler CD45 ile işaretlenmemiş olan agranüler partiküller olarak farkedilir; progenitör hücreler ise genellikle lenfositlerden daha az CD45 ifade eden agranüler/hipogranüler elemanlardır ( Bkz şekil 3-5). Bunu takiben, odaklanmak istenen hücreye göre bir antikor seçilerek onu bağlayan hücreler bir başka küme olarak adlandırılabilir. Örneğin B lenfositler için CD19, monositler için CD64, granulositler için CD15 ifade eden hücreler seçilebilir. Bu seçimlerin yapılmasında önerilen antikorlar için kesin tanımlamalar yapmaktan kaçınmak gerekir. Özellikle kemik iliği gibi farklı olgunlaşma seviyesindeki hücreleri bir arada bulunduran örneklerde, kalıtsal ya da edinsel bazı antijen ifade eksikliklerinde yukarıda örneği verilen antikorlar aracılığı ile kümeler oluşturmak hücre kayıplarına sebep olabilir . Doğru bir değerlendirme yapabilmek için hücreleri kümelere ayırıp hedef hücre grubunda analize geçmeden önce resmin bütününü farklı bakış açıları ile değerlendirmek vazgeçilmez bir öneme sahiptir ve mutlaka uygulanmalıdır.

Örnekte kümeler tanımlandıktan sonra bunları birleştirip kesiştirerek yeni kümeler tanımlamak da mümkündür (region). Yapılacak tanımlamaya göre seçilen kümelerin içinde bulunan elemanlar (hücreler) analiz edilebilir ya da dışlama yoluyla o kümenin elemanı olmayan partiküller (ör: debri, artefaktlar) analiz dışında tutulabilir. Seçilen veya oluşturulan bir kümenin her tüpte geçerli olabilmesi için seçimde kullanılan parametrelerin kullanılan her tüpte bulunmasına gerekir. Küme almada kullanılan bu temel elemanlar, genellikle panelin iskeleti (backbone) olarak tanımlanır ve çok parametreli analizler yapılırken parametrelerin en az birkaç tanesi bu amaç için kullanılır. Örneğin 8 renk floresanla yapılan bir çalışmada B hücreli lenfoblastik lösemiler değerlendirilirken her tüpte CD45, CD19 ve CD34 bulunması ve bunlara göre seçilen malin B hücre kümesinde diğer fenotipik özelliklerin değerlendirilmesi yaygın kabul gören bir uygulamadır. Renk sayısı 4 ile sınırlı olduğunda iskeletteki parametrelerden birinin eksiltilmesi gerekebilir.

Pozitif-Negatif ayırımının yapılması

FCM ile yapılan pek çok çalışmada, özellikle de immunfenotipleme çalışmalarında bir hücrenin seçilen parametreyi ifade edip etmediğini (sırasıyla pozitif veya negatif olduğunu) belirlemek kritik öneme sahiptir. Bu tür değerlendirmeler göreceli olup; negatif ve pozitif bir kontrol materyali olmadan elde edilen sinyalin “+” mı “-“ mi olduğunu söylemek mümkün olamaz. Yapılan çalışmaya göre “negatif” sınırlarını belirlemek için çeşitli kontroller kullanılabilir. Aynı florokromla konjuge izotipik kontroller, izoklonik kontroller ile işaretlenmiş hücreler, hiç boyanmamış hücreler, fonksiyonel testlerde uyarılmamış hücreler kullanılabilir ancak bunların hiçbirinin “ideal” olduğu söylenemez. Son zamanlarda özellikle immunfenotipleme çalışmaları için önerilen “Fluorescence Minus One”, FMO ile ifade edilen kontrollerin kullanılmasıdır. Bu durumda aynı anda değerlendirilen “n” sayıda floresan parametre varsa negatif tanımlaması yapılacak olan dışında tüm diğer floresan parametreler (n-1) hücreye bağlandıktan sonra test edilen ancak floresanla işaretlenmemiş olan parametreye ait grafik ekrana getirilerek negatifin bulunması gereken yer bir işaretle belirlenir (işaretin solunda olanlar negatif, sağındakiler ise pozitif kabul edilir). FMO kullanmanın en büyük dezavantajı maliyeti ve getirdiği iş yüküdür. Ancak özellikle yeni bir çalışma ya da panel oluşturulmak istendiğinde bu çalışmanın yapılması kullanıcıya büyük kolaylık sağlar. Hassas çalışmalarda ısrarla önerilmektedir. Önemli bir kontrol materyali de aynı örnek içinde yer alan farklı fenotipik özellikleri olan hücrelerdir. Örneğin bir T hücre işareti için negatif sınırlarını belirlemek amacıyla aynı örnekte yer alan “B” lenfositlerden yararlanılabilir. Bu tür bir uygulamayı yapmadan önce hücrelerdeki antijen dağılımları hakkında bilgi sahibi olmak esastır.

Kompanzasyon

Çalışmalarda kullanılan flourokromların verdikleri sinyaller, kullanılan filtrelere rağmen kesin sınırlarla birbirlerinden ayrılmayabilirler. Bu durumda floresan sinyallerin bazı dalga boylarında üst üste binmesine (overlap) bağlı olarak bir parametre için hatalı değerlendirmeler yapılması söz konusu olabilir. Buna engel olmak için “kompanzasyon” uygulanır. Kompanzasyon, bir detektöre gelen yabancı sinyalin (çakışan kısım) orijinal sinyalden çıkarılması yoluyla daha temiz ve doğru bir analiz yapılmasını sağlar. Eski teknolojilerde veri toplamadan önce doğru bir kompanzasyon yapılması zorunlu iken, yeni nesil cihazlarda voltaj ayarı doğru olan detektörlerle yapılan okumalar tamamlandıktan sonra deneyin ilk kurulması sırasında oluşturulan bir kompanzasyon matriksi sayesinde kompanzasyonun veri analizi sırasında yapılması mümkün olmaktadır. Matriksin oluşturulması için genelde hiçbir florokrom ile işaretli olmayan bir “negatif” ve her bir florokrom için ayrı tüpte olmak üzere birer “pozitif” sinyal kaynağı hazırlanır. Seçilen pozitifin kendi floresan kanalında pozitif olması diğer floresan kanallarda ise negatif olması beklenir. Grafikler aracılığı ile o floresan sinyalin negatif olması gereken alanlara ne kadar taştığına bakılır ve gerekli çıkarmalar (kompanzasyon) yapılarak negatif olması gereken alanların temizlenmesi sağlanır.

İstatistiksel Veriler

FCM’de hücrelerin çeşitli özellikleri toplanan verilerden elde edilen/hesaplanan sayısal değerler ile ifade edilebilir. Burada önem taşıyan kriterler: her bir parametre için hücrelerin dağılım özellikleri (homojenite, dağılım şekli ve genişliği), seçilen parametre için tepe noktaları (hücreler en çok nerede birikti?), seçilen kümelerdeki hücre sayıları (oransal dağılım) olarak özetlenebilir.

Dağılımın genişliği, “x” ekseninde seçilen parametre için alınan “sinyal yoğunluğu” ve “y” ekseninde hücre sayısı olan bir histogram ile değerlendirilebilir. Bu durumda elde edilen eğrinin genişliği, standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (CV) ile izlenebilir. Dağılımın merkezini belirlemek için, ölçüm linear bir skalada yapılmışsa *aritmetik ortalama* (mean); logaritmik bir skalada yapılmışsa *geometrik ortalama* (geometic mean) tercih edilir. Parametrelerden biri skalanın dışına çıkıyorsa geometrik ortalama yerine ortanca (*median*) değerleri tercih edilmelidir. Mod değeri ise en çok veri toplanmış olan noktayı temsil eder. Veriler normal bir dağılım gösteriyorsa ortalama, ortanca ve mod değerleri birbirine eşit olacaktır. Normal olmayan dağılımlarda dağılımın özelliklerine göre ortanca değeri ortalama değere eşit ya da farklı olabilir (şekil 6). Dökümanlarda sık karşılaşılan bir kısaltma olan “MFI” nın “Median Fluorescence Intensity” ya da “Mean Fluorescence Intensity” yi temsil ettiğine dair kesin bir tanımlama yoktur. Bu tanımlamanın neyi temsil ettiği metin içinde açıklanmış olmalıdır.

FCM cihazlarında seçilen bir küme içindeki hücrelerin sayıları (number, event) veya oranları (ratio) belirlenebilir. Sistemde tüm hücreler arasındaki oran ve seçilmiş bir hücre grubu içindeki oranlar öğrenilebilir.

Dağılımın genişliği histogramlar ile daha iyi görüntülense de hücrede aynı anda iki ya da daha çok sayıda parameterenin ifade edilişini değerlendirilebilmek için en az 2 eksenli nokta grafiklerinin (dot-plot) kullanılması ve seçilen kümelerdeki hücre oranlarının belirlenmesi gerekir.

 Özet:

 FCM, süspansiyon halindeki hücrelerin detaylı olarak incelenmesine imkan veren önemli bir tekniktir. Bu teknik ile elde edilecek sonuçların güvenirliğini sağlamak için veriler, dogru ayarlanmış, bu ayarı muhafaza eden cihazlarda yapılmalıdır. Toplanan verilerin, doğruluğu kanıtlanmış bir yöntemle hazırlanmış olması ve yeterli sayıda verinin toplanması gerekir. Toplanan veriler doğru bir yöntemle analiz edilmeli, sonuçlar doğru istatistiksel ifadeler ile anlatılmalı, aktarılmalıdır. Verilen sonuçların hücreye özgün ve gerçek olduğundan emin olabilmek için, toplanan veriler arasından artefaktların uzaklaştırılması, analize sadece canlı hücrelerin dahil edilmesi ve doğru bir strateji ile seçilen hücre gruplarında analizlerin yapılması önemlidir. Göreceli bir değerlendirme sistemi olan FCM’de hücrelerin seçimi için genel kabul görmüş parametrelerin kullanılması ve seçilen hücrelerin değerlendirilmesi aşamasında uygun kontrol materyallerinin kullanılması vazgeçilmez öneme sahiptir.