

## Flow sitometri ve kullanım alanları

Martin Orlinov Kanev<sup>1\*</sup>, Fulya Dilek Gökalp Muranlı<sup>2</sup>

*27.06.2015 Geliş/Received, 11.09.2015 Kabul/Accepted*

### ÖZ

Hücrelerin biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin senelerdir primer mikroskop özellikleri kullanılarak saptanmasına karşılık, günümüzde flow sitometri tekniği kullanılmaya başlanmıştır. Flow sitometri, çeşitli hücrelerin bir süspansiyon halinde bir akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu sırada hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre sınıflandırılması esasına dayanan bir teknik ve cihazdır. Bu cihaz ile hücrenin yüzey ve iç proteinleri, organelleri ve diğer bileşenleri analiz ve ayrımı, lazer ve elektronik teknolojisi kullanılarak büyüklük, granülarite ve floresans emisyonu esasına göre gerçekleştirilmektedir. Flow sitometri tekniğinin temelini iyi bilmemiz bu tekniği birçok patolojide kullanmamızı sağlayarak sonuçlarının standardizasyonunu ve tanı koydurucu değerini de arttıracaktır.

**Anahtar Kelimeler:** flow sitometri, hücre analizi, hücre gruplama, kullanım alanları

## Flow cytometry and its uses

### ABSTRACT

Response of cells to be detected using biochemical and physical properties of the microscope for many years the primary specifications have been used for flow cytometry techniques. Flow cytometry is a technique and apparatus based on a single pass along the flow channel and the basis for classification based on cell size and granularity in this order as a suspension of various cells. The surface and internal proteins of cells with this equipment, organelles and other components analysis and separation, size using laser and electronic technology are performed by the granularity and fluorescence emission as basis. Flow cytometry is the basis of technical know well this technique will increase the diagnostic value of standardization and allowing us to use the results in many pathologies.

**Keywords:** Flow cytometry, cell analysis, cell sorting, usage areas

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1 Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne – martinkanev@trakya.edu.tr

2 Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü – fulyadilek@trakya.edu.tr

## 1. FLOW SİTOMETRİ (FLOW CYTOMETRY)

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Flow sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir. Günümüzde flow sitometri ya da akım sitometri terimleri kullanılmaktadır. Flow sitometrinin temel yaklaşımı; hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granülitesini açısından değerlendirilmesidir. Bu amaçla hedeflenen yapı ya da hücre önce fluoresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya (nükleik asitlere özel propidium iodide) kullanılarak işaretlenir. Bazı durumda ise klorofil gibi maddeler kendileri fluoresan özelliğe sahiptir [1].

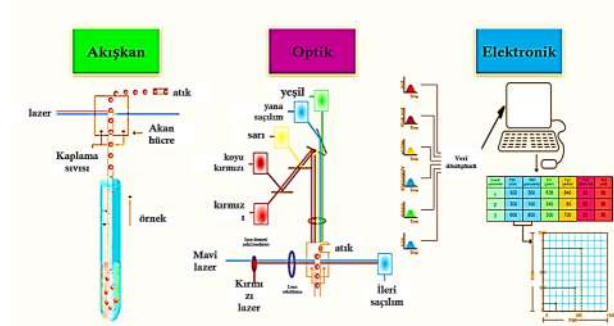
Flow sitometrinin çalışma prensipleri 1870 yıllara kadar eski olsa da 1969 yılında argon lazerinin kullanılmaya başlaması, 1980 yılında ayırma işleminin bulunması ve son 10 yıldır sürekli olarak geliştirmesiyle günümüze kadar gelişmiştir. Flow sitometrinin temel yaklaşımı; hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granülitesini açısından değerlendirilmesidir. Bu amaçla hedeflenen yapı ya da hücre önce fluoresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya (nükleik asitlere özel propidium iodide) kullanılarak işaretlenir. Bazı durumda ise klorofil gibi maddeler kendileri fluoresan özelliğe sahiptir [2].

### 1.1. Temel Bileşenleri (The Basic Components)

Flow sitometri cihazı; akış (sıvı) sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler ve sinyal dedektörleri, bilgisayar ile yazılım programları ve ayırma mekanizması (cell sorting) bileşenlerinden oluşmaktadır. Temel olarak bir flow sitometri cihazında üç temel bileşen bulunmaktadır (Şekil 1). Hidrolik bileşen, akış sistemidir ve partüküllerin lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem olarak görev almaktadır. Optik bileşen lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan floresan saçılımının çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak düzgün bir şekilde fotodetektöre aktarılmasında görev almaktadır. Elektronik bileşen ise elde edilen optik sinyalin photo multipler tubes (PMT) ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevriminden ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur [3].

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 ve bu hidrodinamik odaklanma olarak isimlendirilir. Böylece lazer ışını aynı anda tek hücreye düşer ve tek hücrenin analiz yapılır. Işın öne doğru yayıldığında tipik olarak lazer ile aynı yönde 20° etrafa yayılan ışınlar forward scatter chanel (FSC)

denilen bir lens yardımıyla toplanırlar. FSC detektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. Eksitasyon



Şekil 1. Flow sitometrinin temel bileşenleri (The basic components of flow cytometry) [4]

çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayılan ışının ölçülmesi ise side scatter olarak adlandırılır. SSC partiküllerin granülitesini ve iç yapısı hakkında bilgi verir [5].

### 1.2. Çalışma prensibi (Working principle)

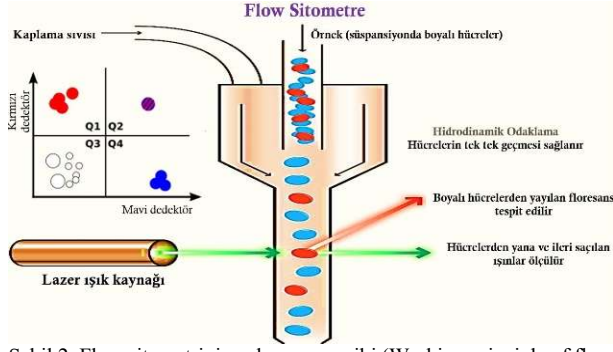
Flow sitometri floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granülitesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir (Şekil 2). Süspansiyon halindeki hücreler hava basıncı ile sıvı içinden geçirilir. Sıvının çok hızlı akışı yüksek bir hidrostatik basınç oluşturur ve bu basınçla hücreler cam veya quartzdan yapılmış (flow cell) akış kabineye gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde lazer kaynağı önünden geçişini sağlar. Hücrelerin analizi için sistemde forward scatter(FS), side scatter(SS) ve floresan(FL-1,FL-2,FL-3 vb.) dedektörler bulunur. Temel olarak bir flow sitometri cihazından ileri saçılma grafiği (Forward scatter) ile yaklaşık büyüklüğü, yana saçılma grafiği (Side scatter) ile yaklaşık granülitesini, floresan grafiği (belli dalga boyuna has parıldama eldesi) ile yaklaşık floresan miktarı hakkında bilgiler ediniriz [6,7].

Temel olarak bir flow sitometri cihazından:

1-İleri saçılma grafiği (Forward scatter) ile yaklaşık büyüklüğü

2-Yana saçılma grafiği (Side scatter) ile yaklaşık granülitesini

3-Floresans grafiği (belli dalga boyuna has parıldama eldesi) ile yaklaşık floresans miktarı hakkında bilgiler ediniriz [8].



Şekil 2. Flow sitometrinin çalışma prensibi (Working principle of flow cytometry) [9]

### 1.3. Analiz (Analysis)

Flow sitometri cihazı ve tekniği son derece hızlıdır, çok kısa bir sürede binlerce hücreyi analiz ederek, detaylı sonuç raporları elde edilir. Heterojen bir örnek popülasyonunda, hücrelerin ve bileşenlerinin çok parametrelili kantitatif özellikleri çok kısa bir sürede analiz edilebilir. Flow sitometri'nin en güçlü ve kendisine özgü avantajı Tablo 1'de görüldüğü gibi hücreleri fiziksel olarak birbirlerinden ayırt edebilmesidir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur [8]. Bu tür çalışmalar son dönemde kök hücre ve gen terapi çalışmalarında kullanılmaktadır. Flow sitometri'de, hücrenin ve/veya bileşenlerinin kalitatif ve kantitatif analizleri kısaca dört şekilde yapılabilmektedir [10,11,12,13].

Bunlar;

- 1-Hücrelerin büyüklük ve granül yapısına göre analiz;
- 2-Tek floresan boya kullanılarak işaretlenen monoklonal antikor kullanılarak yapılan analiz;
- 3-Çok renkli floresan boyalar (2-17 renk) ile işaretlenen antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen analiz;
- 4-Hücre içerisinde bulunan antijenlerin ve yapıların hücre zarının geçirgenliğinin artırılması sonucu eklenen floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlar ile yapılan analizi şeklinde sayılabilir [14,15].

## 2. KULLANIM ALANLARI (USAGE AREAS)

Akış sitometri cihazı ile analiz için hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla; kan, kemik iliği, beyin, omurilik sıvısı, alveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki dokular, hücre kültürü örnekleri kullanılabilir.

Tablo 1. Flow sitometri ile ölçümü yapılabilecek hücresel özellikler (Cellular characteristics that can be measured by flow cytometry) [16]

Özellikler	Yapısal	Fonksiyonel
İntrinsik	Hücre boyutu	Redoks hali Canlılık
	Hücre şekli	
	Sitoplazmik granülite	
	Pigment içeriği	
Ekstrinsik	Yüzey antijenleri	Membran devamlılığı
	Lektin bağlama	Yüzey elektrik yükü
	Total protein	İntrasellüler pH
	Sülfidril grupları	Membran potansiyeli
	DNA içeriği	Sitoplazmik yüzey reseptörü
	RNA içeriği	Enzim aktivitesi
	Kromatin yapısı	Sitoplazmik matris yapısı
		Membran viskozitesi

Flow sitometri yöntemi sıklıkla hücre ölümü(apoptozis), hücresel özellikler (Tablo 2) ve proliferasyonun belirlenmesi; mikroorganizma (hücre içi bakteri, virüs, bakteri ve alg) sayısı ve tür analizi yapılması; parazit ve mantar belirlenmesi; hücre kültüründe virüs, bakteri ve hücre sayımı; nötral yağ içeriğinin belirlenmesi; bağlı klorofil içeriğine bağlı alt popülasyonların, türlerin ve bireylerin belirlenmesi; algerde toksik madde etkileri; LC50 değerlerinin bulunmasında; algerde sitotoksik çalışmalarda ve ekotoksikoloji çalışmalarında kullanılmaktadır [17,18,19,20].

### 2.1. İmmünofenotipleme (Immunophenotyping)

İmmünofenotipleme 1970'li yıllarda monoklonal antikor teknolojilerinin geliştirilmesi sonrasında, tıbbın birçok alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmünofenotipleme; floresan boyalarla görünür hale gelen hücre yüzeyi ve hücre içi belirteçlerin saptanması yöntemidir. Özgül antikorlarla saptanmak istenen antijenik yapıların varlığı ya da yokluğu saptanmaktadır [19]. 1970'li yıllarda mikroskopla immünofenotipleme yapılmakta iken; immunolojide ve akan hücre ölçer (flow cytometry) sistemlerindeki gelişmeler ve yazılım programlarının hızla aşama kaydetmesi sayesinde günümüzde çok renkli immünofenotipleme analizlerinin kısa sürede yapılabilmesi mümkündür.

Hücre yüzey antijenlerinin tanımlanmasında "Cluster of Differentiation-CD" terminolojisi kullanılır. Anormal bir hücre topluluğu görüldüğünde bunun immünofenotipinin tanımlanması gerekir. Bunu ifade etmenin en kolay yolu antijen taşıyan hücrelerin oranlarını (%) bildirmektir. Antijen yoğunluğunu göstermek için de ölçülen floresan sinyallerin şiddeti belirlenir (Mean Fluorescent Intensity-MFI) ancak bu parametre hücre üzerindeki antijen sayısının yanı sıra kullanılan florokrom ile de yakından ilgilidir [21].

Bu açıdan immünofenotipleme yapmanın avantajları:

1. Büyüklük (FSC) ve granüler (SSC) yapılarına göre hücreler sınıflandırılabilir.
2. Ölü hücreler çalışma dışı tutulabilir.
3. Zayıf eksprese edilen yüzey antijenleri tespit edilebilir.
4. Çok renkli (2,3,4,...) analizler ile hücrenin fenotipi, gelişiminin hangi evresinde bulunduğu belirlenebilir.
5. Eş zamanlı bulunan birden çok hematolojik malitenin, bifenotipik hücrelerin belirlenmesi mümkündür [19].

İmmünofenotiplemenin tıpta kullanım alanları ise lenfoma ve lösemi immünotiplemesi (KLL, ALL, AML, KML), hematolojik hastalıkların belirlenmesi (ITP, nötrofil fonksiyon defektleri), immün yetmezliklerin teşhisi, kemoterapi etkinliğinin izlenmesi, otoimmün hastalıkların tanısı, transplantasyon öncesi ve sonrası hasta durumunun gözlemlenmesi ve allerjik hastalıklarda kullanılmaktadır [21,22,23,24].

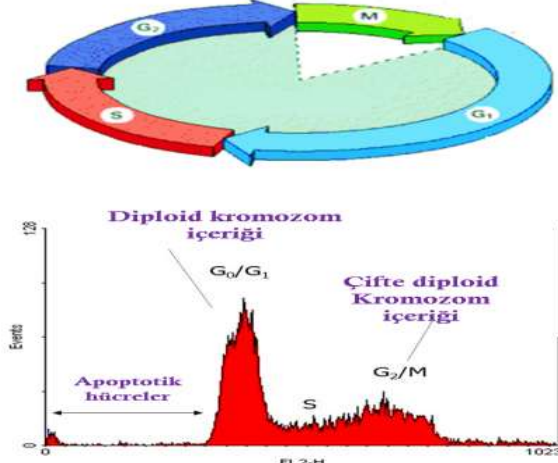
Günümüzde en sık lösemi, lenfoma ve myeloma hastalarında kullanılır. Lösemi immünofenotiplemesinde en sık kullanılan örnekler kan ve kemik iliğidir. Sağlıklı bir insanla lösemili bir insanın kan örnekleri arasında dramatik farklılıklar mevcuttur. Sağlıklı insanlarda kan profili kesindir ve bilinir ancak lösemili hastalarda profil çok değişkendir. Bu alanda kök hücre çalışmalarında özellikle flow sitometrik analizlerle tedaviler yönlendirilebilmektedir [25,26].

## 2.2. Hücre döngüsünün incelenmesi (Investigation of cell cycle)

DNA, çift sarmalla şelat yapabilen floresan boyalarla işaretlenebilir. Boyama sitokiyometrik, yani boyanın miktarı hücrede bulunan DNA miktarıyla doğru orantılıdır. Bu amaçla en sık kullanılan boyalar Propidyum İyodür (PI), DAPI, Hoechst dır. Bu tür florokromların bir kısmı sadece DNA ya bağlanırken çoğu DNA ve RNA ya bağlanabilme özelliğindedir. Bu durumun sonuçları etkilememesi için DNA'nın, hücre zarı geçirgen hale getirildikten ve RNase ile işlem gördükten sonra boyanması önerilmektedir [26].

Diploid bir hücredeki DNA miktarı FL-2 PE antikoruna işaretlendiğinde 2n olarak tanımlanır (Şekil 3). Bu durumda test edilen hücredeki DNA'nın normal hücrelerdeki DNA miktarlarına oranlanması ile elde edilen değer DNA indeksi olup; hücrenin DNA içeriğini yansıtmaktadır. Normalde 1 +/- %10 olması beklenir; bundan farklı değerler bulunduğu anaploididen söz

edilir. DNA indeksinin >1 olması hiperploidi, <1 olması hipoploidi olarak tanımlanır. Anaploidinin bulunması malignite lehine bir bulgu olsa da bu her zaman doğru değildir; benzer şekilde anaploidi daima kötü prognozun bir işareti olarak algılanmamalıdır [27].



Şekil 3. Flow sitometri ile hücre döngüsünün incelenmesi (Examination of the cell cycle with flow cytometry) [28]

Akım Sitometresi ile hücrelerin hangi bölünme fazında ne miktarda hücre bulunduğunu tespit etmek de mümkündür. Bu şekilde hücrelerin çoğalma hızları hakkında bilgi toplanır. Diploid hücreler, G0/G1 fazında yer alırken S (sentez) fazındaki hücrelerin DNA içeriği diploid ile tetraploid hücreler arasında olacaktır. G2 ve Mitozdaki hücreler ise 4n miktarında DNA taşıdıklarından tetraploid olarak izlenecektir. S+G2+M fazındaki hücreler S Fazı Fraksiyonu (SPF) olarak tanımlanıp; SPF nin yüksek olması, proliferasyon hızının yüksek olduğunun bir göstergesidir [29]. Hücre döngüsü analizlerinde: analiz edilecek hücrelerin seçimi ve kullanılacak yazılım programlarında seçilen modeller, karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmesinde büyük önem taşır. Hücre döngüsü analizlerinde karşılaşılan bir problem malign olan ve olmayan hücrelerin bir arada bulunabilmesidir. Bu durumda DNA'yı işaretlemeyen önce malign hücreleri ayırabilecek bir antijeni (ör: epitelyal kökenli hücrelerde sitokeratin, B lenfoid tümörlerde CD19) işaretlemek yardımcı olabilir. Hücre döngüsü analizlerini hücre döngüsüne eşlik eden proteinlerin ölçümü ile eş zamanlı değerlendirmek de mümkündür [30].

## 2.3. Hücre canlılık analizi (Cell viability assay)

Flow sitometre ile henüz nükleer değişiklikler oluşmadan membrandaki erken değişiklikler sırasında bile apoptozis ölçülebilmektedir. Apoptozis geliştiğinde hücre membranının normalde iç kısmında bulunan fakat apoptozis ile hücre yüzeyine çıkan fosfatidil serine

bağlanma özelliği gösteren Annexin V ile hücrelerde apoptozis tayini yapılabilmektedir. Ölü-canlı hücre ayırımı içinde ise hücrelerin eşzamanlı olarak propidium iodide ile boyanması sonuçları daha güvenilir hale getirmektedir [31].

#### 2.4. Mikrobiyolojide flow sitometri (Flow cytometry in microbiology)

Flow sitometri son yıllarda mikrobiyolojide mikroorganizmaların canlılığını, sayısını, identifikasyonunu ve antibiyotik duyarlılığını saptamada kullanılmaya başlanmıştır. Malarya türlerini ayırma ve su, toprak ve yiyeceklerde mikroorganizma tayini bunlar arasında sayılabilmektedir. Flow sitometride virüs çalışmalarını da son yıllarda hız kazanmıştır. Hüresel makromolekül sentezindeki değişiklikler ve viral enfeksiyonun ardından oluşan immünolojik değişiklikler, viral antijen varlığı ve miktar tayini flow sitometri ile tespit edilebilmektedir [32].

#### 2.5. İlaç alım ölçümleri (Drug uptake measurements)

Birçok kemoterapötik ajanın etki yeri DNA'dır. Tümör hücrelerinde multi-ilaç rezistansının değerlendirilmesinde de flow sitometri rol almaktadır. Ayrıca flow sitometri ile ilaçların hücre içine girişini arttıran veya hücreden çıkışını bloke ederek retansiyonu arttıran ajanların etkilerinin incelenmesi de mümkündür [33].

### 3. FLOW SİTOMETRİNİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI (ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF FLOW CYTOMETRY)

Güçlü yazılım programlarının bir bileşimi olan flow sitometreler, araştırmacılara geniş hücre toplulukları hakkındaki verilerin hızlıca toplanmasını ve analizini sağlayan karmaşık metottur. Bu cihazlar ile saniyede 70.000 partikülden fazlasını işlemek ve her partikül veya hücre başına dokuz floresan renk ve iki yöne saçılan ışık sinyallerini saptamak mümkündür [34].

#### 3.1. Avantajları (Advantages)

Teknik hızlıdır, saniyede binlerce partikül sayımı yapabilir (tek hücreli fluoresan özelliği olan canlıların çok kısa zamanda çok duyarlı olarak sayılmasına izin verir). Yüksek duyarlılıkla analiz yapma imkanı vardır (her bir dalga boyunu yada her bir partikül boyunun ayrı ayrı sayılması mümkündür). Tek tip mikro küreciklerin ışık saçılımı ve fluoresan ölçümleri için varyasyon sabiti ( $CV = \frac{\text{standart sapma}}{\text{ortalama}}$ ) %1'den küçüktür [35]. Flow sitometrinin en güçlü ve kendisine özgü avantajı, herhangi bir optik karakteristiğe veya bunların kombinasyonlarına bağlı olarak hücrelerin fiziksel olarak

birbirlerinden ayırabilmesidir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur. Flow sitometri cihazlarının kurulum maliyetleri yüksek olmasına karşın, kullanım bakım maliyetleri düşüktür [36].

#### 3.2. Dezavantajları (Disadvantages)

Flow sitometreler tipik olarak sadece ileri yapısal detayları değil de pik yapan veya entegre sinyalleri ölçebilir. Bu sorun ölçüm yapılması istenen partikülere özel olarak bağlanan ya da incelenmesi istenen yapı dışında tüm yapılara bağlanan optik olarak aktif kimyasallarla çözülebilir. Birçok flow sitometri çok küçük hacimleri (<0.5 mm<sup>3</sup>) analiz eder. Oysa, hücreler en az yaklaşık 103/ml olarak bulunurlar. Bu nedenle flow sitometri cihazının doğru şekilde kalibre ve ayarlanması gerekir [37].

### KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] D. Demirel, "Flow sitometrik DNA analizinin temel prensipleri", Türk Patoloji Dergisi, 11(2), 1995.
- [2] C.H. Dunphy, "Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology", Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 128(9), 1004-1022, 2004.
- [3] P. Pozarowski, J. Grabarek, Z. Darzynkiewicz "Flow cytometry of apoptosis", Curr Protoc Cell Biol. 18 (18), 2004.
- [4] [https://prezi.com/4wqeuvsd9qff/cell\\_separation\\_flow\\_cytometry/](https://prezi.com/4wqeuvsd9qff/cell_separation_flow_cytometry/)
- [5] F.E. Craig, K.A. Foon, "Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms", Blood. 111(8), 3941-67, 2008.
- [6] F. Taneli, "Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı", Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 5(2), 75-82, 2007.
- [7] Z. Youli, M. Shahjahan, C.C. Chang, "Basic principles of flow cytometry. basic concepts of molecular pathology", Molecular Pathology Library, 2, 139-146, 2009.
- [8] <http://flowcytometry.med.ualberta.ca/>
- [9] H. Daniel, "A Review and Applications of Flow Cytometry. Department of Chemistry", University of Illinois at Urbana-Champaign, 2004.
- [10] M. Brown, C. Wittwer, "Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology", Clin. Chem., 46, 1221-1229, 2000.
- [11] S.F. Ibrahim, G.V.D. Eng., "Flow cytometry and cell sorting", Adv Biochem Engin/Biotechnol. 106, 19-39, 2007.
- [12] L.A. Herzenberg, D. Parks, B. Sahaf, O. Perez, M. Roederer, "The history and future of the

- fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford”, *Clin. Chem.* 48, 1819–1827, 2002.
- [13] M. Rahman, *Introduction to flow cytometry*. Serotec Ltd. Oxford (UK). Published by Serotec Ltd. 2006.
- [14] B.H. Villas, “Flow cytometry: an overview”, *Cell Vis.* 5, 56-61, 1998.
- [15] S. Adın Çınar, *Akan hücre cihazında veri analizi*. İstanbul: Medya Tower, 2009.
- [16] B. Wood, “9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory”, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130, 680-690, 2006.
- [17] A.S. Rose, K.S. Knox, “Bronchoalveolar lavage as a research tool”, *Semin Respir Crit Care Med.* 28(5), 561-73, 2007.
- [18] E. Matteucci, O. Giampietro, “Flow cytometry study of leukocyte function: analytical comparison of methods and their applicability to clinical research”, *Curr Med Chem.* 15(6), 596-603, 2008.
- [19] R.A. Peterson, D.L. Krull, L. Butler, “Applications of laser scanning cytometry in immunohistochemistry and routine histopathology”, *Toxicol Pathol.* 36(1), 117-32, 2008.
- [20] H.R. Hulett, W.A. Bonner, R.G. Sweet, L.A. Herzenberg, “Development and application of a rapid cell sorter”, *Clin Chem.* 19(8), 813-6, 1973.
- [21] G. Yanikkaya Demirel, G. Deniz, E. Ekşioğlu Demiralp “Lenfosit immünofenotipleme için kılavuz bilgiler”, *Türk İmmünoloji Derneği Akan Hücre Ölçer Alt Grubu*, 1-19, 2010.
- [22] E.G. van Lochem, V.H.J. van der Velden, H.K. Wind, J.G. te Marvelde, N.A.C. Westerdaal, J.J.M. van Dongen, “Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts cytometry”, *Clinical Cytometry*, 60B, 1–13, 2004.
- [23] A.L. de Weck, M.L. Sanz, P.M. Gamboa, W. Aberer, J. Bienvenu, M. Blanca, P. Demoly, D.G. Ebo, L. Mayorga, G. Monneret, J. Sainte-Laudy, “Diagnostic Tests Based on Human Basophils: More Potentials and Perspectives than Pitfalls”, *Int Arch Allergy Immunol.* 11(146), 177-89, 2008.
- [24] A. Ocmant, Y. Peignois, S. Mulier, L. Hanssens, A. Michils, L. Schanden, “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.* 30(320), 40-8, 2007.
- [25] D. Georgescu, S. Ferrari-Lacraz, J. Villard, “Anti-HLA antibody detection and rejection in kidney transplantation: impact of the new Technologies”, *Rev Med Suisse.* 25(3), 1064-9, 2007.
- [26] J.Z. Appel, M.G. Hartwig, E. Cantu, S.M. Palmer, N.L. Reinsmoen, R.D. Davis, “Role of flow cytometry to define unacceptable HLA antigens in lung transplant recipients with HLA-specific antibodies”, *Transplantation.* 81(7), 1049-57, 2006.
- [27] A. Tabll, H. Ismail, “The Use of Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Liver Biopsies in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma”, *Liver Biopsy: CC BY-NC-SA 3.0 license*, 2011.
- [28] H. Walczak, T.L. Haas, “Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex”, *Methods Mol Biol.* 414, 221-39, 2008.
- [29] J.E. Martinez, J.R. Beck, W.C. Allsbrook, C.G. Pantazis, “Flow cytometric DNA analysis”, *Clinical Laboratory Science*, 3, 180-183, 1990.
- [30] B. Barlogie, W. Godhe, D.A. Johnston, L. Smallwood, J. Schumann, B. Drewinko, “Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry”, *Cancer Res.* 38, 3333-3339, 1978.
- [31] D. Diaz, A. Prieto, E. Reyes, H. Barcenilla, J. Monserrat, M. Alvarez-Mon, “Flow cytometry enumeration of apoptotic cancer cells by apoptotic rate”, *Methods Mol Biol.* 414, 23-33, 2008.
- [32] W. Knapp, H. Strobl, O. Mojdic, “Flow cytometric analysis of the cell surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis”, *Cytometry.* 18, 187, 1994.
- [33] M. Shapiro, “Flow cytometric approaches to clinical microbiology”, *Labmedica.* 4(20), 1990.
- [34] M. Macey, *Flow cytometry clinical applications*. Blackwell scientific publications, chapter 2, 1994.
- [35] S. Langsrud, G. Sundheim, “Flow cytometry for rapid assessment of bacterial viability”, *International Biodeterioration & Biodegradation.* 36(3), 467-467, 2000.
- [36] A.K. Azkur, M.E. Aslan, “Akış sitometri ve veteriner hekimlikteki uygulamaları”, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* 7(1), 59-66, 2012.
- [37] K. Dalva, Z. Gülbaş, “Akım sitometri uygulamaları”, *Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji*, 44-52, 2005.