

"Flow" Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı

Methodology of Flow Cytometry and Its Role in Clinical Laboratory

Fatma Taneli

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa

ÖZET

"Flow" sitometri 1950'li yıllardan beri üzerinde çalışılan ve sürekli geliştirilen, araştırma ve klinik laboratuvarlarının vazgeçilmez tekniklerinden birisidir. "Flow" sitometri birçok bilim dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Önceleri hematoloji laboratuvarlarında kullanılan bu sistem günümüzde başta hematoloji, immunoloji, onkoloji olmak üzere mikrobiyoloji, organ nakli birimleri, araştırma laboratuvarları, patoloji, histoloji, biyokimya gibi klinik laboratuvarlarında hem tanı koydurucu hem de araştırma yöntemi olarak yerini almıştır. Klinik laboratuvarların yanı sıra gıda, toksikoloji, deniz bilimleri araştırmalarında bu teknikten oldukça sık yararlanılmaktadır. "Flow" sitometri tekniğinin temelini iyi bilmemiz bu tekniği birçok patolojide kullanmamızı sağlayarak sonuçlarının standardizasyonunu ve tanı koydurucu değerini de arttıracaktır.

Anahtar Sözcükler: "Flow" sitometri tekniği, klinik kullanım alanları

ABSTRACT

Flow cytometry is a method that has been developed since 1950's and it has a pivotal role in clinical and research laboratories. Flow cytometry has been used in many scientific areas. Formerly this method was used in hematology laboratories, but at the present, it is used in clinical laboratories of hematology, immunology, oncology, microbiology, transplantation units, research laboratories, pathology, histology, and clinical biochemistry as both diagnostic and research tool. Besides clinical laboratories flow cytometry is widely used in reseaches in food, toxicology, and aquatic sciences. Deep knowledge of the principle flow cytometry method will help us to apply this method to different pathologies with outmost standardization and increase the diagnostic value.

Key Words: Flow cytometry method, clinical applications

GİRİŞ

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. "Flow" sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (1-3). Günümüzde "flow" sitometri ya da akım sitometri

terimleri kullanılmaktadır. Akım sitometrinin major kullanım alanları subtiplerine kadar hücre tespiti (HLA CD = Human Leucocyte Antijen Cell Differentiation, İnsan Lökosit Antijeni Hücre Ayırım Belirteci) ve biyolojik çalışmalar için epitop ekspresyonudur. "Flow" sitometri ışık mikroskopi ile kıyaslanınca

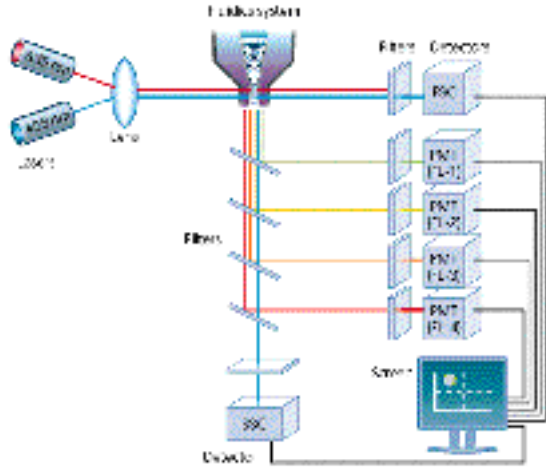
Tablo 1. Işık mikroskobu - "Flow" sitometri karşılaştırması.

Parametreler	Işık Mikroskobu	"Flow" Sitometri
Hücre Analizi	$10^2 - 10^3$ hücre/deney	$10^3 - 10^6$ hücre/deney
Deney Hızı	5 dakika/örnek	1 dakika/örnek
Deney Sonucu	pozitif-negatif	çok parametrelili
Üretkenlik	manuel çalışma	yarı otomatik

çok daha fazla hücreyi daha kısa sürede inceleme fırsatı vermesiyle avantaj sağlamaktadır. "Flow" sitometrik teknik ile 1 saniyede 500 hücre sayılır ve ortalama 10 000 hücreyi 20 saniyede analiz edebiliriz.

"FLOW" SİTOMETRİ CİHAZININ BİLEŞENLERİ

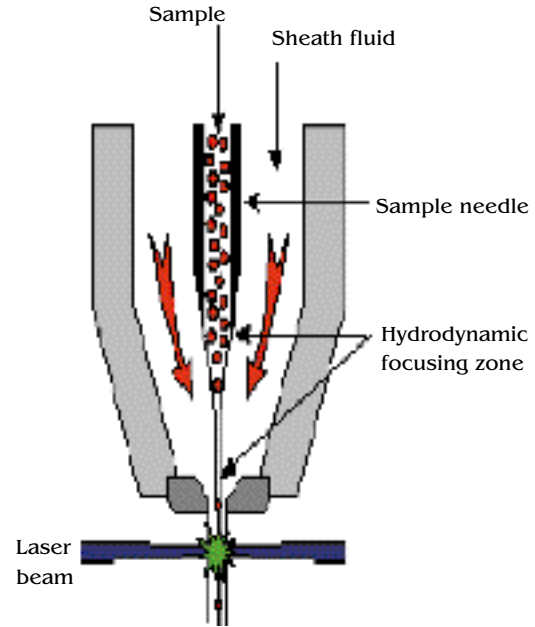
"Flow" sitometri cihazı başlıca akış (sıvı) sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler ve sinyal dedektörleri, bilgisayar ve yazılım programları ve ayırma mekanizması (cell sorting) bileşenlerinden oluşmaktadır (Şekil 1). "Flow" sitometri tekniğinde hücreler, sıvının içerisinde bir ışık demetinin önünden tek tek geçerler. Bu sırada hücreler hakkında elde edilen veriler istatistiksel analiz ve grafik haline getirilir ve yorumlanır (3).



Şekil 1. Tipik bir "Flow" sitometri cihazının şematik görünümü (3).

Akıcı sıvı sistemi: 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 (Şekil 2).

Bu etkiyle partiküller tek bir sıra şeklinde dizilirler ve bu hidrodinamik odaklanma olarak isimlendirilir. Hücreleri lazer ışınının önüne tek sıra halinde taşımak için sıvı sistemi kullanılır. Böylece lazer ışını aynı anda tek hücreye düşer ve tek hücrenin analiz yapılır.



Şekil 2. "Flow" sitometri tekniğinden hücrelerin tek tek dizilimi (3).

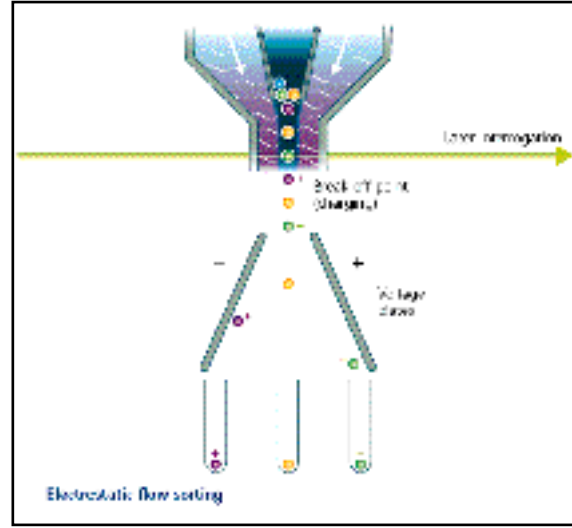
Işık kaynağı olarak "Flow" sitometri cihazında ksenon ve kseneon civa lambalar kullanılabilirse de sıklıkla farklı tip lazerlere ek olarak argon ve helium lazer kaynağı kullanılır.

"Flow" sitometri cihazında bulunan detektör ve filtreler:

Hücrelerden gelen ışık saçılımı ve floresans emisyonu filtre ve dedektörlerde dijital sinyallere dönüşür. "Flow" sitometride her bir detektör ve filtre bize farklı veri sağlar.

1. Forward scatter chanel (FSC) Detektör (İleri saçılım kanal detektörü): Işın öne doğru yayıldığında tipik olarak lazer ışığı ile aynı yönde 20° etrafa yayılan ışınlar "forward scatter chanel (FSC)" denilen bir lens yardımıyla toplanırlar. FSC detektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verir.
2. Side Scatter Channel (SSC) Detektör (Yana saçılım kanal detektörü): Eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayılan ışığın ölçülmesi ise "side scatter" olarak adlandırılır. SSC partiküllerin granüler içerikleri, iç yapısı hakkında bilgi verir.
3. Floresan Filtreler ve detektörler: Antikorlar aracılığı ile antijeni göstermek için kullanılan renk maddelerine florokrom maddeler (floresan antikor) denir. "Flow" sitometride florokrom boya yani florokrom maddelerin kullanılmasının amacı; direkt olarak hedefimizin tespiti ile biyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin kolayca saptanmasıdır. Değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler, florokromla işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri veya sitokin ve DNA gibi intraselüler moleküller hakkında bilgi verir (1-4).

Tarihte ilk "flow" sitometri cihazı Wallace H. Coulter tarafından High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer başlığıyla 1956 yılında yayınlanmıştır (5). Len Herzerberg ve ark. (6,7), 1974'de Standford Üniversitesinde Fluorescence Activated Cell Sorter = hücre ayrışması ismiyle "flow" sitometride önemli bir yenilik getirmişlerdir. Elektrostatik FACS hücre ayrışması "flow" sitometrik analizde ölçülen özelliklerine göre hücrelerin ayrılması işlemine floresanla aktive edilmiş hücre ayrışması (fluorescence-activated cell sorting, FACS) denir. Bu özellik her "flow" sitometri modelinde bulunmakta daha çok araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bu cihazlar, kan gibi karışık bir hücre topluluğunun içeren süspansiyonlarda istediğimiz özelliğe sahip hücre alt gruplarının farklı tüplere ayrılabilmesini sağlar. Aynı anda 4 farklı hücre popülasyonu ayrıştırılabilir (6-9).



Şekil 3. Elektrostatik hücre ayrıştırılması (FACS) tekniği şematik görünümü (3).

"FLOW" SİTOMETRİK ANALİZDE KULLANILAN ÖRNEKLER

"Flow" sitometrik analiz hücre süspansiyonunun hazırlanması, hücrelere monoklonal antikor eklenmesi, cihazın kalibrasyonu, kontrol ve örneklerin cihazda çalışılması, veri analizi ve veri yorumu ve raporu aşamalarından oluşur.

"Flow" 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 dokular ve hücre kültürü örnekleri kullanılabilir. Tam kan örneğinden ön işlemler ile manuel ya da otomatik ön işlem cihazları ile çalışılması arzu edilen hücre süspansiyonu (eritrosit, lökosit ve trombosit) hazırlanabilmektedir (10-13).

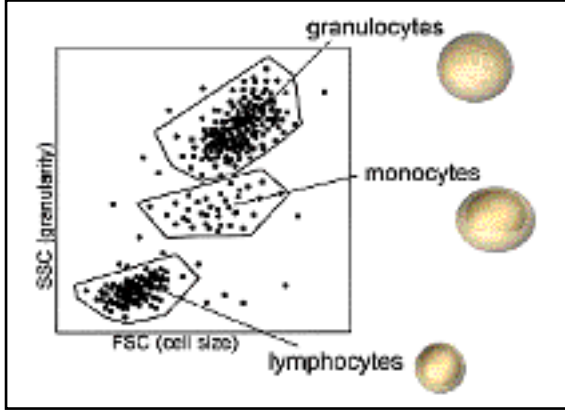
"FLOW" SİTOMETRİDE ANALİZ YÖNTEMLERİ

"Flow" sitometrede, hücrenin büyüklüğu, hücrenin iç yapısı (granülaritesi), ve hücrede incelemek istediğimiz antijene ait işaretlediğimiz monoklonal antikorun floresansı ölçülmektedir.

"Flow" sitometri tekniği ile sıklıkla rutin laboratuvarlarda lökosit süspansiyonlarında ana-

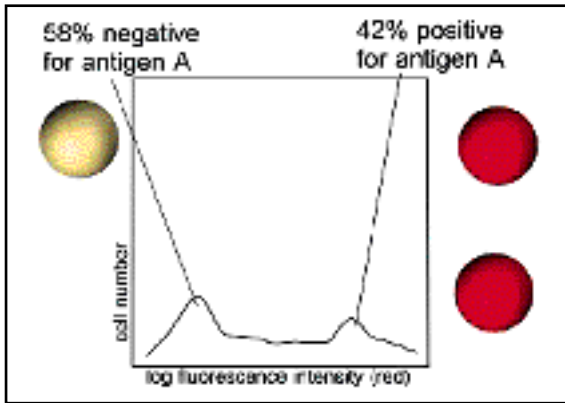
Taneli F.

lizler yapılmaktadır. Lökositlerin ayrılması ise hücre büyüklüğü ve granül yapısına göre yapılmaktadır (1-3).



Şekil 4. FSC ve SSC detektörlerinde elde edilen verilerle lökositlerin hücre büyüklüğü ve granülarteleriyle ayrılması (4).

2. Tek floresan boya ile işaretli antikorun kullanılmasıyla hücre yüzey belirteçlerinin saptanması. Ör: Tüm lökositler içinde CD3+T lenfosit hücre sayısı ve oranının saptanması. A antijenine karşı floresan işaretli hücreler ve bu antijeni içermeyen işaretlenmemiş hücrelerin sayı dağılımı "flow" sitometrik analiz sonrası elde edilen rapor formatında aşağıdaki şekilde görülür:

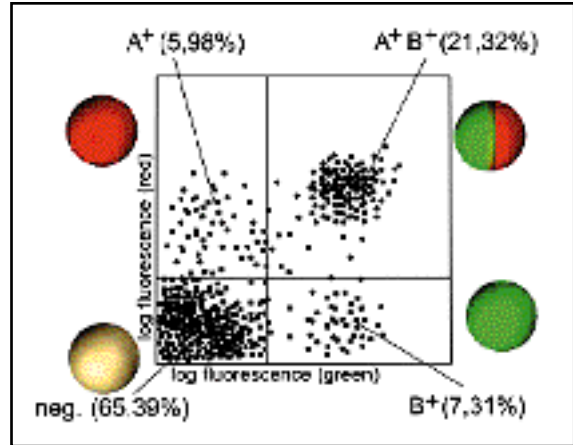


Şekil 5. Tek floresan boya ile işaretli antikorun kullanılmasıyla hücre yüzey belirteçlerinin saptanması (4).

3. Birden fazla yüzey antijenlerini aynı anda analizi sağlayan floresan işaretli antikorlarla hücre popülasyonunun analizi. Ör: Birden fazla CD belirteçlerinin analizi

sayesinde h hücre alt gruplarının analizi, T supresör hücre, B hücre, NK hücre, T helper hücrelerin sayılarının ve oranlarının saptanması gibi analizler yapılmaktadır.

İki farklı floresan antikor ile işaretleme kullanılmasıyla analiz yapıldığında grafikteki her bir nokta yine tek bir hücreyi göstermektedir. Hücreler her iki floresan antikoruna taşıyorlarsa A+B+ olarak sağ üst kadranda, grafiğin dikey çizgisinde belirtilen antikor taşıyan hücreler sol üst kadranda, grafiğin yatay çizgisinde belirtilen antikor taşıyan hücreler sağ alt kadranda ve her iki antikor da taşımayan hücreler de sol alt kadranda gösterilmektedir. Bu hücrelerin sayısal olarak ve örnekteki bulunan yüzde oranları da bu grafikler yardımıyla hesaplanabilmektedir. Tüm lökositlerin sayısı aynı örnekte eş zamanlı hemogram analizi ya da "flow" sitometride mikro boncuk kullanılarak bulunur. "Flow" sitometrik analiz ile hesaplanan yüzde değerleri ile kantitatif alt grup değerleri hesaplanabilir.



Şekil 6. İki farklı floresan antikor ile elde edilen grafik ile hücre ayrımı ve kantitatif yüzde analizi (4).

Multikolor floresans (çok renkli analiz) ise birden fazla florokrom madde kullanılarak bir çalışmada aynı anda birden fazla parametre incelenebilir. Çok renkli analizde 2-17 renk arası florokrom boya ile analiz mümkündür. Rutin klinik çalışmalarda 3-4 renkli analizler yeterlidir. 4 renkten fazla renkli analizler ileri tecrübe gerektirir ve genelde

araştırma laboratuvarlarında ayrıntılı analizlerde kullanılır (14).

İntraselüler antijenler için de florokrom boyalar kullanılmaktadır. Sitokinler gibi intrasellüler antijenlerin tespiti güçtür, çünkü florokrom boyalı antikörlerin hücrenin içine girmesi zor olmaktadır. Bu nedenle hücreler florokrom boya eklenmeden önce bir seri solüsyonda fikse edilip, morfolojik zarara uğramadan, hücre zarının permeabilitesi artırılır ve sonra eklenen florekro boyalar ile işaretleme yapılabilmektedir. Günümüzde kullanılan birçok ticari boya kiti bu basamakları kolaylaştırmıştır.

Çok renkli florokromlar ile farklı hücre gruplarının tespiti ve ölçümü, immunofenotiplendirme, intraselüler organellerin tespiti, hücre yüzey antijenlerinin saptanması, hücre ayrıştırması, nükleik asit miktarını saptanması, enzim aktivitesinin ölçümü, apopitozis incelemeleri yapılabilmektedir (15-18).

"FLOW" SİTOMETRİK VERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen veriler farklı grafikler kullanılarak gösterilebilir. Bu grafikler çeşitleri nokta alan grafikleri, kontur alan grafikleri, histogram, 3 boyutlu grafik, bölgeler, kapılar ve istatistik sınıflandırılabilir (1-3).

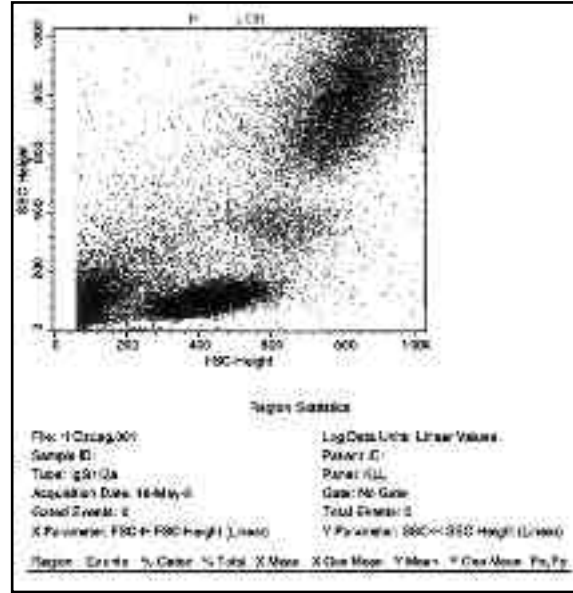
1. Nokta alan grafiği: Çok sayıda hücre içeren hemolize kan örneğinin FSC/SSC grafiği görülmektedir. Granülositler, lenfositler ve monositler farklı fiziksel özelliklerine göre grafiğe noktalama tekniğiyle dağılmıştır. Renk grafiğe üç boyutlu görünüm verir. Sarı/yeşil renkler o bölgeye yığılan yoğun hücre popülasyonu sonucunda oluşur.

2. Kontur diyagramı: Dansite haritasına benzer. Benzer sayıdaki hücreleri gösteren noktaların çizgisel olarak birleştirilmesiyle oluşur.

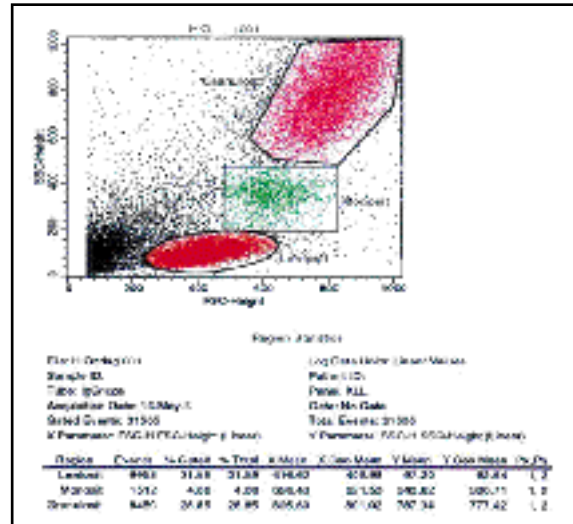
3. Tek parametrel histogram: y-ekseni; hücre sayısını, x-ekseni: analizi yapılan tek parametrenin floresans şiddetini gösterir.

Histogramların istatistiksel verileri otomatik olarak cihaz yazılımlarıyla hesaplanır.

4. Bölgeler: Histogram ve nokta alanlar içinde, popülasyon alt gruplarının istatistiğini yapmak için yaratılırlar.

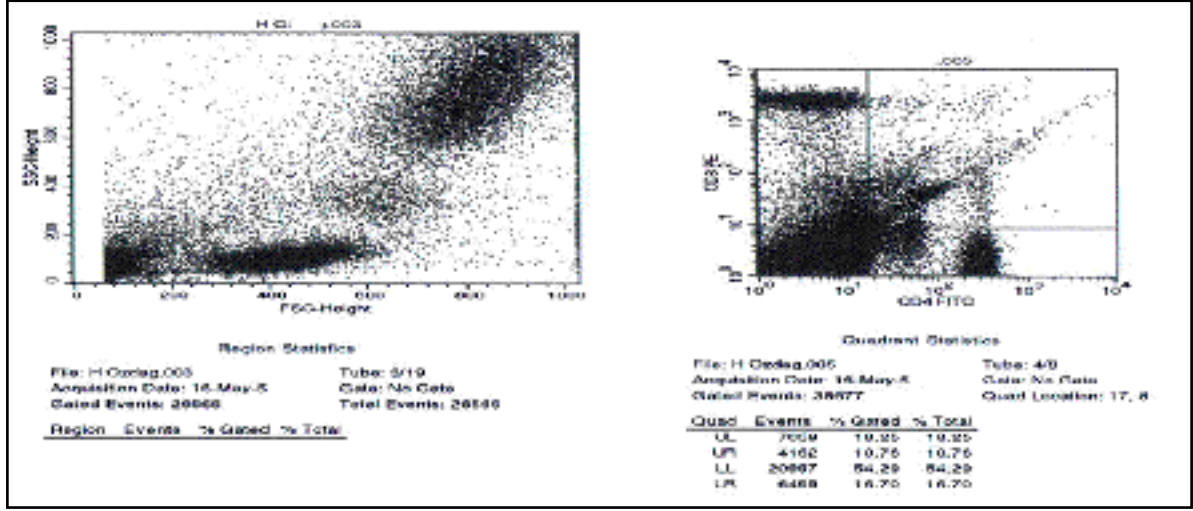


Şekil 7a. Bölge işaretlemesi yapılmamış rapor.

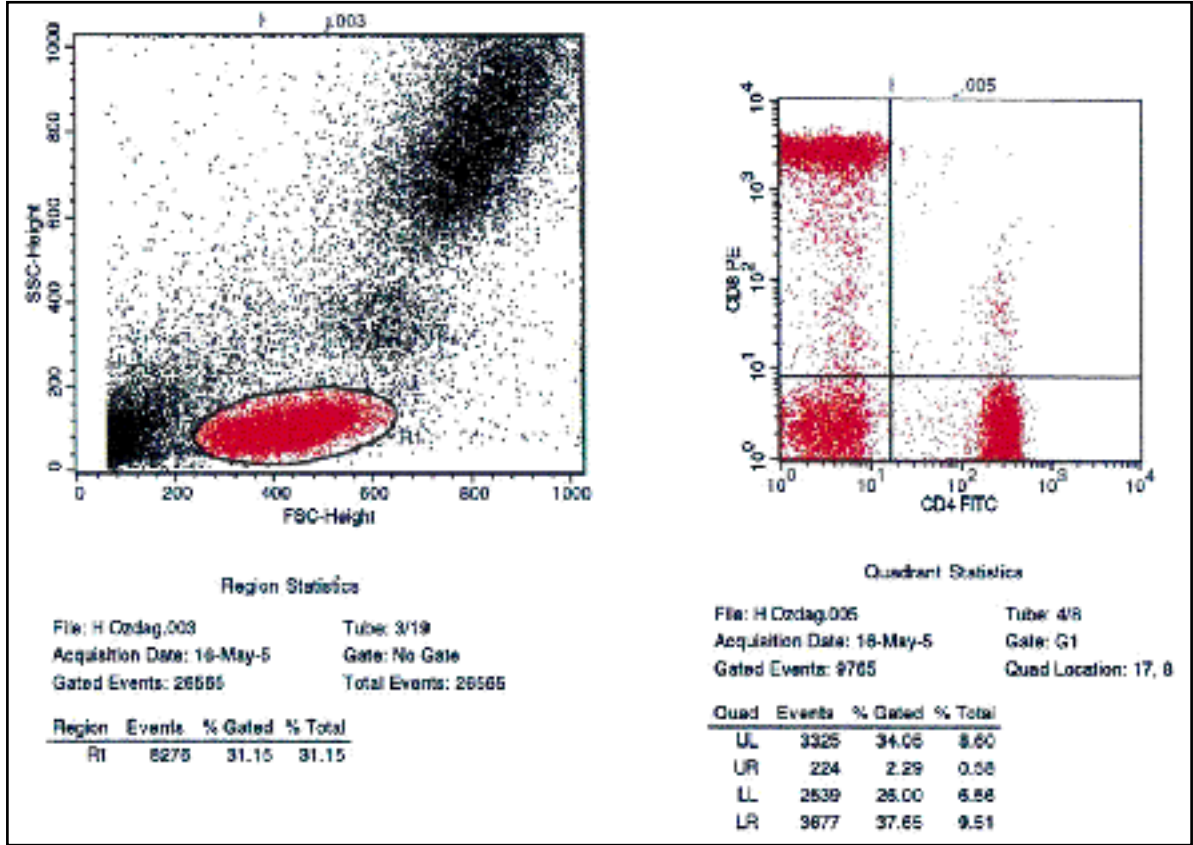


Şekil 7b. Bölge işaretlemesi yapılmış rapor format örneği (3).

Kapılar: Bir veya daha çok bölge içerebilir. Başlıca analiz edilen alandaki dışlanmak istenen olguların uzaklaştırılması veya azaltılmasında kullanılır. İlgilenilen hücre veya partiküllerin izole edilmesi amacıyla kullanılır. Renklendirme özelliği amacıyla kullanılır.



Şekil 8a. Kapı tanımlaması (gate alma) yapılmamış grafik örneği.



Şekil 8b. Aynı numunede kapı alma tanımlaması yapıldıktan ve bu hücrelerin dışlanmasıyla elde edilen grafik (3).

"FLOW" SİTOMETRİ KULLANIM ALANLARI

Klinik ve araştırma laboratuvarlarında immüno-
 noloji, hematoloji onkoloji, moleküler biyo-
 loji, mikrobiyoloji, parazitoloji, enfeksiyon,
 yardımcı üreme teknikleri, patoloji, radyasyon

onkolojisi, enfeksiyon hastalıklarında HIV
 tüberküloz, paroksizmal nokturnal hemoglo-
 binüri, malaria, bitki biyolojisi ve deniz bi-
 yolojisi alanlarında kullanılmaktadır (19-32).
 İmmunofenotiplendirme analizinde, tüm hücre

lerin yüzeyinde ve hücre içinde hücreye ve maturasyonuna spesifik antijenler mevcuttur. "Flow" sitometri ile hücrelerin eksprese ettikleri antijenlere karşı monoklonal antikorlar kullanılarak kan yada kemik iliği gibi karışık populasyonda belli bir hücrenin belirlenmesi ve ayrılması yapılabilir (15). İmmünofenotiplenmenin tıpta kullanım alanları: Lenfoma ve lösemi immünotiplenmesi (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 (16-19). Günümüzde en sık lösemi, lenfoma ve myeloma hastalarında kullanılır. Lösemi immünofenotiplenmesinde 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 (20).

Mikro-boncuklar ile Analizler:

Farklı özelliklerde boncuklar kullanarak aynı test tüpünde birden fazla molekül (64-100'e kadar molekül) incelenebilir. Mikro-boncuklar ile sitokinler, Ig Alt gruplarının analizi, DNA temelli doku tiplenişmesi, sinyal iletimi analizi, alerji testleri analizi, TORCH analizi, otoimmünite testleri analizi (SSA, SSB, Sci-70) kullanılabilecek alanlara örnek oluşturmaktadır (21-34).

Sonuç olarak, AACC (American Association of Clinical Chemistry) ve IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) asistan eğitim programlarında 3 haftalık "flow" sitometri eğitimi önermektedir. "Flow" sitometri günümüzde klinik ve araştırma laboratuvarlarda temel teknikler arasında yerini almıştır. Biyokimya laboratuvarlarında da gelecekte kullanım alanının artacaktır. "Flow"

sitometri ile karmaşık hücre süspansiyonlarında geleneksel metotlara oranla daha hızlı, hassas, doğru ve kantitatif sonuçlar almamızı sağlar. "Flow" sitometri tekniğinin temelini iyi bilmemiz bu tekniği birçok patolojide kullanmamızı sağlayarak sonuçlarının standartizasyonunu ve tanı koydurucu değerini gelecekte arttıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Deniz G. Flow sitometrik tekniklerin klinik kullanımı. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007; 3(43): 73-80.
2. Villas BH. Flow cytometry: an overview. Cell Vis 1998; 5: 56-61.
3. Rahman M. Introduction to flow cytometry. Serotec Ltd. Oxford (UK): Published by Serotec Ltd; 2006.
4. <http://www.uni-greifswald.de/~immuteach/methods/facs/facs.html#>
5. Coulter W. Coulter electronics. Chicago, Illinois, 1956; 1034-1042.
6. Hulett HR, Bonner WA, Sweet RG, Herzenberg LA. Development and application of a rapid cell sorter. Clin Chem 1973; 19(8): 813-6.
7. 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.
8. Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Modern flow cytometry: a practical approach. Clin Lab Med 2007; 27(3): 453-68.
9. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. Adv Biochem Eng Biotechnol 2007; 106: 19-39.
10. Rose AS, Knox KS. Bronchoalveolar lavage as a research tool. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28(5): 561-73.
11. 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.
12. Peterson RA, Krull DL, Butler L. Applications of laser scanning cytometry in immunohistochemistry and routine histopathology. Toxicol Pathol 2008; 36(1): 117-32.
13. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood 2008; 111(8): 3941-67.
14. Wood B. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. Arch Pathol Lab Med 2006; 130: 680-90.

15. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometry Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72B: S5.
16. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, Demoly P, Ebo DG, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. Diagnostic Tests Based on Human Basophils: More Potentials and Perspectives than Pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol* 2008 11; 146(3): 177-89.
17. Ocmant A, Peignoys Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Schandené 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; 30; 320(1-2): 40-8.
18. 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; 25; 3(108): 1064-9.
19. Appel JZ 3rd, Hartwig MG, Cantu E 3rd, Palmer SM, Reinsmoen NL, Davis RD. Role of flow cytometry to define unacceptable HLA antigens in lung transplant recipients with HLA-specific antibodies. *Transplantation* 2006 15;81(7): 1049-57. Walczak H, Haas TL. Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol Biol* 2008; 414: 221-39.
20. Johnson KW, Dooner M, Quesenberry PJ. Fluorescence activated cell sorting: a window on the stem cell. *Curr Pharm Biotechnol* 2007; 8(3): 133-9.
21. Diaz D, Prieto A, Reyes E, Barcenilla H, Monserrat J, Alvarez-Mon M. Flow cytometry enumeration of apoptotic cancer cells by apoptotic rate. *Methods Mol Biol* 2008; 414: 23-33.
22. Janossy G. The changing pattern of "smart" flow cytometry (S-FC) to assist the cost-effective diagnosis of HIV, tuberculosis, and leukemias in resource-restricted conditions. *Biotechnol J* 2008; 3(1): 32-42.
23. Janossy G, Shapiro H. Simplified cytometry for routine monitoring of infectious diseases. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74 Suppl 1: S 6-10.
24. Wilson GD, Marples B. Flow cytometry in radiation research: past, present and future. *Radiat Res* 2007; 168(4): 391-403.
25. Delanghe J. New screening diagnostic techniques in urinalysis. *Acta Clin Belg* 2007; 62(3): 155-61.
26. Richards SJ, Barnett D. The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* 2007; 27(3): 577-90.
27. Sklar LA, Carter MB, Edwards BS. Flow cytometry for drug discovery, receptor pharmacology and high-throughput screening. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7(5): 527-34.
28. Nolan JP, Yang L. The flow of cytometry into systems biology. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2007; 6(2): 81-90.
29. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007; 65: 515-25.
30. Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5(3): 485-95.
31. Fletcher HA. Correlates of immune protection from tuberculosis. *Curr Mol Med* 2007; 7(3): 319-25.
32. Hougardy JM, Place S, Hildebrand M, Drowart A, Debie AS, Loch C, Mascart F. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(4): 409-16.
33. Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* 2007; 123(1): 50-9.
34. Bigalke B, Langer H, Geisler T, Lindemann S, Gawaz M. Platelet glycoprotein VI: a novel marker for acute coronary syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(2): 179-84.

Yazışma adresi:

Dr. Fatma Taneli
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
45020 Manisa
Tel : 0.236 232 58 89/300
GSM: 0.533 519 48 38
Faks: 0.236 237 02 13
E-posta: fatma.taneli@bayar.edu.tr
