

# KLİNİK LABORATUVAR BİLİMLERİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR:

## BİYOBELİRTEÇLER VE İLERİ ANALİZ TEKNİKLERİ

*Editör:* SERAP ÖZER YAMAN



**BİDGE Yayınları**

**Klinik Laboratuvar Bilimlerinde Güncel Yaklaşımlar:  
Biyobelirteçler ve İleri Analiz Teknikleri**

**Editör: SERAP ÖZER YAMAN**

**ISBN: 978-625-8995-37-4**

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 2026-03-25

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

[www.bidgeyayinlari.com.tr](http://www.bidgeyayinlari.com.tr) - [bidgeyayinlari@gmail.com](mailto:bidgeyayinlari@gmail.com)

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltpe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /  
Ankara





## İÇİNDEKİLER

KLİNİK LABORATUVARDA FLOW SİTOMETRİ ANALİZİNİN ROLÜ VE ÖNEMİ .....	1
<i>UĞUR FAHRİ YÜREKLİ</i>	
ANTİ-MÜLLERİYAN HORMON .....	98
<i>NURULLAH AY, EMİNE EMSAL DURUSOY</i>	
POSTMENAPOZDA OMENTİN 1'İN ROLÜ .....	117
<i>NAZİFE DOĞAN</i>	
MODERN TOKSİKOLOJİK ANALİZDE LC-MS/MS: TARAMA, DOĞRULAMA VE KLİNİK UYGULAMALAR ..	137
<i>UĞUR FAHRİ YÜREKLİ</i>	

# KLİNİK LABORATUVARDA FLOW SİTOMETRİ BÖLÜM:1 ANALİZİNİN ROLÜ VE ÖNEMİ

UĞUR FAHRİ YÜREKLİ <sup>1</sup>

## Giriş

Klinik laboratuvar tanı yöntemleri, modern tıbbın en önemli bileşenlerinden birini oluşturmaktadır. Hastalıkların erken tanısı, prognozun belirlenmesi, tedavi yanıtının değerlendirilmesi ve hastalık seyrinin izlenmesinde laboratuvar temelli analizler kritik rol oynamaktadır. Son yıllarda biyoteknolojik gelişmeler ve ileri analitik tekniklerin klinik uygulamalara entegrasyonu ile birlikte hücresel düzeyde ayrıntılı analiz yapılabilmesine olanak sağlayan yöntemler büyük önem kazanmıştır. Bu yöntemler arasında flow sitometri, çok parametrelili hücresel analiz kapasitesi sayesinde klinik laboratuvar pratiğinde vazgeçilmez bir tanısal araç haline gelmiştir (Brown & Wittwer, 2000).

Flow sitometri, süspansiyon halindeki hücrelerin veya partiküllerin lazer ışığı kullanılarak fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin hızlı ve hassas bir şekilde analiz edilmesini sağlayan bir teknolojidir. Bu yöntem, hücrelerin büyüklüğü, granülaritesi ve yüzey veya sitoplazmik antijen ekspresyonu gibi birçok özelliğin aynı anda değerlendirilmesine olanak tanır. Floresan işaretli monoklonal antikorların kullanılmasıyla hücre yüzeyindeki spesifik antijenlerin tanımlanabilmesi, flow sitometrinin özellikle hematoloji,

---

<sup>1</sup> Dr, S.B.Ü. Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya, Orcid: 0000-0002-7969-5196

immünoloji ve onkoloji alanlarında yaygın biçimde kullanılmasına zemin hazırlamıştır (Ortolani, 2021).

Klinik laboratuvarlarda flow sitometrinin kullanım alanları oldukça geniştir. Hematolojik malignitelerin tanısı ve sınıflandırılması, lösemi ve lenfomaların immünofenotipik karakterizasyonu, minimal rezidüel hastalığın (MRD) izlenmesi, immün yetmezliklerin değerlendirilmesi ve hematopoetik kök hücre sayımı bu teknolojinin başlıca klinik uygulamaları arasında yer almaktadır. Ayrıca transplantasyon sonrası immün rekonstrüksiyonun izlenmesi, hücre döngüsü analizi, DNA ploidi belirlenmesi ve apoptozis değerlendirmesi gibi ileri düzey analizler de flow sitometri ile gerçekleştirilebilmektedir (Kruse et al., 2020).

Günümüzde yüksek parametrelili ve spektral flow sitometri sistemlerinin geliştirilmesi, tek bir örnekten çok sayıda hücreli belirtecin eş zamanlı olarak analiz edilmesini mümkün kılmıştır. Bu gelişmeler, özellikle hematolojik malignitelerin detaylı immünofenotipik sınıflandırılmasında ve minimal hastalık düzeylerinin saptanmasında tanısallık artırımı sağlamıştır. Bununla birlikte, elde edilen verilerin doğru yorumlanabilmesi için uygun örnek hazırlama teknikleri, standartlaştırılmış analiz protokolleri ve deneyimli laboratuvar personeli büyük önem taşımaktadır (Kruse et al., 2020; Liu et al., 2026).

Bu kitap bölümünde, klinik laboratuvarlarda flow sitometri analizinin temel prensipleri, cihaz yapısı ve çalışma mekanizması ele alınacak; hematoloji, immünoloji ve onkoloji başta olmak üzere farklı klinik alanlardaki uygulamaları ayrıntılı olarak incelenecektir. Ayrıca veri analizi yöntemleri, kalite kontrol süreçleri ve gelecekteki teknolojik gelişmeler de değerlendirilerek flow sitometrinin modern klinik tanı süreçlerindeki rolü ve önemi kapsamlı bir şekilde ortaya konulacaktır.

## **Flow Sitometrinin Temel Prensipleri**

Flow sitometri, süspansiyon halindeki hücre veya partiküllerin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini lazer ışığı kullanarak yüksek hızda analiz eden ileri bir biyofiziksel analiz yöntemidir. Bu teknik, tek hücre düzeyinde çok sayıda parametrenin eş zamanlı olarak değerlendirilmesine olanak tanıdığı için klinik laboratuvar tanısında önemli bir yer edinmiştir. Hücrelerin büyüklüğü, iç yapısı, yüzey ve sitoplazmik antijen ekspresyonu gibi özellikleri floresan işaretli antikorlar yardımıyla analiz edilebilmektedir (Brown & Wittwer, 2000; Liu et al., 2026; Ortolani, 2021).

Flow sitometrinin temel prensibi, hücrelerin akışkan bir ortam içerisinde tek sıra halinde lazer ışığından geçirilmesi ve bu sırada oluşan ışık saçılımı ile floresan sinyallerinin dedektörler tarafından ölçülmesine dayanır. Hücre lazer ışını ile karşılaştığında iki temel ışık saçılımı oluşur: ileri saçılım (forward scatter, FSC) ve yan saçılım (side scatter, SSC). İleri saçılım sinyali hücre büyüklüğü ile ilişkili bilgi sağlarken, yan saçılım hücre içi granülarite ve sitoplazmik kompleksite hakkında bilgi verir. Bu optik sinyaller hücre popülasyonlarının fiziksel özelliklerine göre ayrılmasını mümkün kılar (Brown & Wittwer, 2000; Liu et al., 2026).

Flow sitometrinin en önemli avantajlarından biri, floresan işaretli monoklonal antikorlar aracılığıyla spesifik hücresel belirteçlerin analiz edilebilmesidir. Farklı dalga boylarında floresan emisyonu yapan boyalar veya antikor konjugatları kullanılarak aynı hücre üzerinde birden fazla antijen eş zamanlı olarak değerlendirilebilir. Böylece hücre popülasyonlarının immüfenotipik özellikleri ayrıntılı şekilde belirlenebilir ve heterojen hücre toplulukları içerisinde alt popülasyonlar tanımlanabilir (Kruse et al., 2020).

Flow sitometri cihazları genel olarak üç ana bileşenden oluşmaktadır: akışkanik sistem (fluidics), optik sistem (optics) ve elektronik veri işleme sistemi (electronics). Akışkanik sistem, hücre süspansiyonunun hidrodinamik odaklama prensibi ile tek sıra

halinde lazer ışığından geçirilmesini sağlar. Optik sistem, lazer kaynağı ve dedektörlerden oluşur ve hücrelerden yayılan ışık saçılımı ile floresan sinyallerini algılar. Elektronik sistem ise dedektörlerden gelen analog sinyalleri dijital verilere dönüştürerek bilgisayar ortamında analiz edilmesini sağlar (Kruse et al., 2020; Liu et al., 2026).

Flow sitometrik analiz sonucunda elde edilen veriler genellikle histogramlar, nokta grafikleri (dot plot) veya yoğunluk grafikleri şeklinde görselleştirilir. Bu grafikler sayesinde farklı hücre popülasyonları büyüklük, granülarite ve antijen ekspresyonu gibi parametrelere göre ayrılabilir. Ayrıca çok parametrelili analizler sayesinde karmaşık hücre popülasyonları detaylı şekilde sınıflandırılabilir ve klinik tanı süreçlerinde yüksek doğruluk sağlanabilir (Kanegane et al., 2018).

### **Flow Sitometrinin Tarihsel Gelişimi**

Flow sitometrinin temelleri 20. yüzyılın ortalarında hücre sayımı ve partikül analizi üzerine yapılan çalışmalarla atılmıştır. Hücrelerin fiziksel özelliklerine göre sayılması ve sınıflandırılması amacıyla geliştirilen erken dönem fotoelektrik ölçüm sistemleri, modern flow sitometri teknolojisinin öncülleri olarak kabul edilmektedir. Özellikle optik ölçüm prensiplerine dayanan bu sistemler, biyolojik partiküllerin ışık saçılım özelliklerinin analiz edilmesine olanak sağlayarak ilerleyen yıllarda geliştirilecek olan akış tabanlı analiz teknolojilerinin temeli oluşturmuştur (Brown & Wittwer, 2000).

1950'li ve 1960'lı yıllarda Coulter prensibine dayanan otomatik hücre sayım cihazlarının geliştirilmesi, hücre analizinde önemli bir ilerleme sağlamıştır. Bu prensip, hücrelerin elektriksel direnç değişiklikleri kullanılarak sayılmasına dayanmakta olup hematoloji laboratuvarlarında otomatik hücre sayımının temeli oluşturmuştur. Bu teknolojik gelişme, yüksek hızda hücre sayımı yapılabilmesine

olanak tanımış ve daha sonra geliştirilecek optik analiz yöntemleri için önemli bir altyapı sağlamıştır (Brown & Wittwer, 2000).

1960'lı yılların sonlarında lazer teknolojisinin biyolojik analizlerde kullanılmaya başlanmasıyla birlikte hücrelerin optik özelliklerinin ölçülmesine dayanan ilk modern flow sitometri sistemleri geliştirilmiştir. Lazer ışığının kullanılması, hücrelerin ışık saçılım özelliklerinin daha hassas biçimde ölçülmesini mümkün kılmış ve tek hücre düzeyinde yüksek doğrulukta analiz yapılmasına olanak sağlamıştır. Bu gelişmeler, flow sitometrinin araştırma laboratuvarlarından klinik uygulamalara doğru ilerlemesinde önemli bir dönüm noktası olmuştur (Brown & Wittwer, 2000; Cossarizza et al., 2021).

1970'li yıllarda floresan boyalar ve özellikle monoklonal antikor teknolojisinin geliştirilmesi, flow sitometrinin biyomedikal araştırmalardaki kullanımını büyük ölçüde genişletmiştir. Floresan işaretli antikorlar aracılığıyla hücre yüzeyindeki spesifik antijenlerin tanımlanabilmesi, immünolojik hücre alt gruplarının ayrıntılı şekilde analiz edilmesine olanak sağlamıştır. Bu gelişme özellikle hematoloji ve immünoloji alanlarında hücre fenotiplemesinin temel yöntemlerinden birinin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Kruse et al., 2020).

1980'li ve 1990'lı yıllarda çok renkli floresan analizinin geliştirilmesiyle birlikte aynı hücre üzerinde birden fazla antijenin eş zamanlı olarak değerlendirilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu dönemde geliştirilen çok parametrelili analiz teknikleri, hematolojik malignitelerin immünofenotipik sınıflandırılmasında ve minimal rezidüel hastalığın saptanmasında flow sitometrinin klinik önemini önemli ölçüde artırmıştır (Brown & Wittwer, 2000).

Günümüzde ise yüksek parametrelili ve spektral flow sitometri sistemlerinin geliştirilmesi sayesinde tek bir hücrede çok sayıda biyolojik belirtecin eş zamanlı olarak analiz edilmesi mümkün hale

gelmiştir. Modern cihazlar, gelişmiş optik sistemler ve güçlü veri analiz yazılımları sayesinde kompleks hücre popülasyonlarının ayrıntılı şekilde karakterize edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu gelişmeler, özellikle immünoloji, hematoloji ve translaşyonel tıp alanlarında flow sitometrinin kullanım alanlarını giderek genişletmektedir (Kruse et al., 2020; Liu et al., 2026).

### **Flow Sitometri Çalışma Prensibi**

Flow sitometri analizinde hücreler sıvı bir taşıyıcı akışkan içerisinde hidrodinamik odaklama (hydrodynamic focusing) prensibi ile tek sıra halinde lazer ışığının bulunduğu analiz bölgesine yönlendirilir. Bu süreçte hücre süspansiyonu, kılıf sıvısı (sheath fluid) ile çevrelenerek dar bir akış hattı içerisinde hizalanır ve böylece hücrelerin lazer ışığından tek tek geçmesi sağlanır. Bu düzenek, tek hücre düzeyinde güvenilir ölçüm yapılabilmesi için kritik öneme sahiptir (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000).

Hücreler lazer ışını ile karşılaştığında ışığın bir kısmı farklı yönlere saçılırken, floresan boyalar ile işaretlenmiş hücresel yapılar uyarılarak belirli dalga boylarında floresan ışık yayar. Bu süreçte iki temel ışık saçılımı sinyali oluşur: ileri saçılım (forward scatter, FSC) ve yan saçılım (side scatter, SSC). FSC sinyali hücre büyüklüğü ile ilişkili bilgi sağlarken, SSC sinyali hücre içi granülarite ve sitoplazmik kompleksite hakkında bilgi verir. Buna ek olarak, floresan işaretli antikolar aracılığıyla hücre yüzeyi veya hücre içi antijenlerin ekspresyonu da ölçülebilir (Liu et al., 2026).

Ortaya çıkan optik sinyaller, fotodiyotlar veya fotomultiplier tüpleri (PMT) gibi yüksek hassasiyetli dedektörler tarafından algılanır. Dedektörler tarafından algılanan bu ışık sinyalleri analog elektrik sinyallerine dönüştürülür ve daha sonra elektronik sistemler aracılığıyla sayısal verilere çevrilir. Elde edilen dijital veriler bilgisayar tabanlı analiz yazılımları kullanılarak işlenir ve hücre

popülasyonlarının karakterizasyonu için grafiksel formatlarda sunulur (Robinson et al., 2026).

Flow sitometri sistemleri temel olarak üç ana bileşenden oluşur: akış sistemi (fluidics), optik sistem (optics) ve elektronik/veri analiz sistemi (electronics). Akış sistemi hücrelerin lazer ışığından tek tek geçmesini sağlarken, optik sistem lazer kaynağı, aynalar, filtreler ve dedektörlerden oluşur. Elektronik sistem ise dedektörlerden gelen sinyalleri sayısal verilere dönüştürerek analiz yazılımına aktarır. Bu yapı sayesinde saniyede binlerce hücre analiz edilebilmekte ve hücresel heterojenite yüksek doğrulukla değerlendirilebilmektedir (Brown & Wittwer, 2000; Kanegane et al., 2018; Kruse et al., 2020).

Flow sitometri analizinden elde edilen veriler genellikle histogram, nokta grafiği (dot plot) veya yoğunluk grafiği (density plot) şeklinde görselleştirilir. Bu grafiksel analiz yöntemleri sayesinde farklı hücre popülasyonları belirli parametrelere göre ayrıştırılabilir ve hücresel alt gruplar detaylı biçimde tanımlanabilir. Bu çok parametrelili analiz kapasitesi, özellikle hematolojik malignitelerin tanısı, immünofenotipleme ve minimal rezidüel hastalık takibi gibi klinik uygulamalarda flow sitometrinin vazgeçilmez bir araç haline gelmesini sağlamıştır (Kanegane et al., 2018; McKinnon, 2018).

### **Hücrelerin Optik Özellikleri: Forward Scatter ve Side Scatter**

Flow sitometrinin temel ölçüm parametrelerinden biri, hücrelerin lazer ışığı ile etkileşimi sonucu oluşan ışık saçılımı (light scatter) sinyalleridir. Hücreler lazer ışını ile karşılaştığında ışığın bir kısmı farklı yönlere saçılır ve bu saçılım hücrelerin fiziksel özellikleri hakkında önemli bilgiler sağlar. Flow sitometri analizinde ışık saçılımı iki temel parametre üzerinden değerlendirilir: forward scatter (FSC) ve side scatter (SSC) (Drouet & Lees, 1993; Liu et al., 2026; McKinnon, 2018).

**Forward scatter (FSC)**, lazer ışığının hücre tarafından ileri yönde saçılması sonucu oluşan sinyaldir ve büyük ölçüde hücrenin boyutu ile ilişkilidir. Hücre çapı arttıkça ileri saçılım sinyalinin genliği de artma eğilimindedir. Bu nedenle FSC parametresi, hücre popülasyonlarının büyüklüklerine göre ayırımında önemli bir rol oynar. Örneğin eritrositler, lenfositler ve monositler gibi farklı hücre tipleri FSC değerlerine göre belirli ölçüde ayırt edilebilir (Drouet & Lees, 1993).

**Side scatter (SSC)** ise lazer ışığının hücre içindeki granüller, veziküller ve organeller tarafından yan yönde saçılması sonucu oluşur. Bu parametre hücrenin iç yapısal karmaşıklığı ve granülaritesi hakkında bilgi verir. Granüler yapıya sahip hücreler, daha fazla ışık saçılımına neden oldukları için daha yüksek SSC sinyali üretirler. Bu nedenle granülositler yüksek SSC değerleri gösterirken, daha az granüler yapıya sahip olan lenfositler genellikle düşük SSC sinyali ile karakterizedir (Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018).

FSC ve SSC parametrelerinin birlikte değerlendirilmesi, flow sitometrik analizde hücre popülasyonlarının ön ayırımının yapılmasına olanak tanır. Bu iki parametre genellikle iki boyutlu FSC–SSC dot plot grafikleri üzerinde gösterilir ve farklı hücre popülasyonları bu grafikte belirli bölgelerde kümelenir. Bu yaklaşım, analiz sırasında hücre alt popülasyonlarının belirlenmesinde kullanılan gating stratejilerinin oluşturulmasında temel bir adımdır. Özellikle hematolojik analizlerde lenfosit, monosit ve granülosit popülasyonlarının ilk ayırımı çoğu zaman FSC ve SSC parametreleri kullanılarak yapılmaktadır (Brown & Wittwer, 2000; Kruse et al., 2020; McKinnon, 2018).

Bu optik parametrelerin doğru yorumlanması, flow sitometri verilerinin güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır. Hücre büyüklüğü, hücre içi granül yoğunluğu ve örnek hazırlama koşulları

gibi faktörler FSC ve SSC sinyallerini etkileyebilir. Bu nedenle analiz sırasında uygun kalite kontrol uygulamaları ve standartlaştırılmış ölçüm protokollerinin kullanılması, elde edilen verilerin doğruluğunu artırmaktadır (Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018).

### **Florokromlar ve Floresan İşaretleme Teknikleri**

Flow sitometri analizinde hücre yüzey veya sitoplazmik antijenlerinin tanımlanabilmesi için floresan özellik gösteren moleküller olan florokromlar (fluorochromes) kullanılmaktadır. Florokromlar belirli bir dalga boyundaki lazer ışığı ile uyarıldıklarında daha uzun dalga boyunda floresan ışık yayarlar. Bu yayılan floresan ışık optik filtreler ve dikroik aynalar aracılığıyla spektral olarak ayrıştırılır ve farklı dedektörler tarafından ölçülür. Bu prensip sayesinde aynı örnek içerisinde birden fazla floresan belirteç eş zamanlı olarak analiz edilebilmektedir (Bajgelman, 2019; Drouet & Lees, 1993; McKinnon, 2018; Robinson et al., 2026).

Klinik laboratuvar uygulamalarında florokromlar çoğunlukla monoklonal antikörlerle konjuge edilmiş halde kullanılmaktadır. Bu antikörler hedef hücresel antijenlere özgül olarak bağlanarak belirli hücre popülasyonlarının tanımlanmasını sağlar. Antikor–florokrom konjugatları sayesinde hücre yüzey reseptörleri, diferansiyasyon antijenleri ve bazı hücre içi proteinler yüksek özgüllükle tespit edilebilmektedir. Bu yaklaşım özellikle immünofenotipleme analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Brown & Wittwer, 2000).

Flow sitometri uygulamalarında sık kullanılan florokromlar arasında fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll protein (PerCP) ve allophycocyanin (APC) gibi moleküller yer almaktadır. Bu florokromlar farklı uyarılma ve emisyon spektrumlarına sahip oldukları için çok renkli analizlerde birlikte kullanılabilir. Ayrıca günümüzde tandem boyalar ve

gelişmiş floresan konjugatların geliştirilmesi, aynı örnek içerisinde daha fazla parametrenin ölçülmesini mümkün kılmıştır (Kruse et al., 2020; McKinnon, 2018).

Floresan işaretleme teknikleri genel olarak doğrudan (direct) ve dolaylı (indirect) boyama yöntemleri şeklinde sınıflandırılmaktadır. Doğrudan boyama yönteminde florokrom ile konjuge edilmiş antikolar doğrudan hedef antijene bağlanarak sinyal oluşturur. Bu yöntem daha hızlı ve pratik olmakla birlikte, sinyal amplifikasyonu sınırlıdır. Dolaylı boyama yönteminde ise önce hedef antijene bağlanan primer antikor kullanılır, ardından bu antikora bağlanan florokrom konjuge sekonder antikor uygulanır. Bu yaklaşım sinyal gücünü artırabilmekte ve düşük ekspresyonlu antijenlerin tespitinde avantaj sağlayabilmektedir (Bajgelman, 2019; McKinnon, 2018; Robinson et al., 2026).

Günümüzde çok renkli boyama panellerinin geliştirilmesi ile aynı hücre üzerinde çok sayıda antijenin eş zamanlı olarak analiz edilmesi mümkün hale gelmiştir. Çok parametrelili flow sitometri yaklaşımları özellikle hematolojik malignitelerin immünofenotipik karakterizasyonunda, minimal rezidüel hastalık (MRD) analizinde ve immün hücre alt popülasyonlarının detaylı incelenmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır (Bajgelman, 2019; McKinnon, 2018; Robinson et al., 2026).

Flow sitometrinin temel prensiplerinin anlaşılması, bu teknolojinin klinik laboratuvarlarda doğru ve etkin bir şekilde kullanılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle hücresel optik özelliklerin doğru yorumlanması ve uygun floresan işaretleme stratejilerinin seçilmesi, güvenilir ve tekrarlanabilir analiz sonuçlarının elde edilmesinde kritik rol oynamaktadır (Brown & Wittwer, 2000).

## **Flow Sitometri Cihaz Yapısı ve Teknik Bileşenleri**

Flow sitometri sistemleri, hücre veya partiküllerin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini yüksek hızda analiz edebilmek için birbiriyle entegre çalışan üç temel teknik bileşenden oluşur: akış sistemi (fluidics), optik sistem ve elektronik/veri toplama sistemi. Bu bileşenlerin koordineli çalışması sayesinde hücreler tek tek analiz bölgesinden geçirilir, oluşan optik sinyaller algılanır ve sayısal verilere dönüştürülerek bilgisayar ortamında analiz edilir. Ayrıca gelişmiş yazılım sistemleri, elde edilen çok parametrelili verilerin yorumlanmasına ve hücre popülasyonlarının ayrıntılı olarak değerlendirilmesine olanak sağlar (McKinnon, 2018).

### **Akış Sistemi (Fluidics)**

Flow sitometri cihazının akış sistemi (fluidics), analiz edilecek hücrelerin lazer ışığı ile etkileşime girdiği analiz bölgesine düzenli ve kontrollü bir şekilde taşınmasını sağlar. Bu sistemin temel amacı, hücrelerin tek sıra halinde lazer ışınından geçmesini sağlayarak her bir hücrenin bağımsız olarak analiz edilmesine olanak tanımaktır (Drouet & Lees, 1993; McKinnon, 2018; Robinson et al., 2026).

Akış sistemi genellikle iki temel sıvıdan oluşur: örnek sıvısı (sample fluid) ve kılıf sıvısı (sheath fluid). Hücreleri içeren örnek sıvısı, daha yüksek hızda akan kılıf sıvısı tarafından çevrelenir ve hidrodinamik odaklama (hydrodynamic focusing) adı verilen bir mekanizma ile dar bir akış hattına yönlendirilir. Bu sayede hücreler lazer ışınından tek tek geçer ve her hücre için ayrı FSC, SSC ve floresan sinyalleri kaydedilir. Hidrodinamik odaklama, hücrelerin kümelenmesini önleyerek ölçümlerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini artırır (Brown & Wittwer, 2000; Ortolani, 2021).

Akış sisteminin stabilitesi ve akış hızının doğru ayarlanması, flow sitometri analizinin güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir. Akış hızındaki değişiklikler hücrelerin lazer ışını ile etkileşim süresini etkileyebilir ve bu durum sinyal kalitesinde değişikliklere yol açabilir. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda akış sistemi düzenli

olarak kalibre edilmeli ve standart kalite kontrol protokolleri uygulanmalıdır. Ayrıca modern cihazlar, akış sisteminin basınç ve hız parametrelerini sürekli izleyerek otomatik hata düzeltme mekanizmaları ile analiz güvenilirliğini artırmaktadır (Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018; Ortolani, 2021).

Akış sisteminin etkinliği, özellikle çok renkli ve yüksek parametrelili flow sitometri uygulamalarında önemlidir; çünkü tek bir hücreden eş zamanlı olarak birden fazla sinyal elde edileceğinden, hücrelerin hizalanması ve lazer ile optimal etkileşimi kritik bir faktördür. Bu nedenle akış sisteminin tasarımı, cihaz performansını doğrudan etkileyen temel bileşenlerden biri olarak kabul edilir (Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018; Ortolani, 2021).

## **Optik Sistem**

Flow sitometri cihazının optik sistemi, hücrelerin lazer ışığı ile etkileşimi sonucu oluşan ışık saçılımı (scatter) ve floresan sinyallerinin (fluorescence signals) algılanmasını sağlayan en kritik bileşenlerden biridir. Optik sistem temel olarak lazer kaynakları, optik filtreler, aynalar ve dedektörlerden oluşur (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; Drouet & Lees, 1993).

**Lazer Kaynakları:** Lazerler, hücreleri ve florokromları uyarmak için gerekli olan belirli dalga boylarında ışık üretir. Modern flow sitometri sistemlerinde birden fazla lazer bulunabilmekte ve bu sayede farklı dalga boylarında uyarılabilen çok sayıda florokrom aynı anda analiz edilebilmektedir. Lazerlerin dalga boyları, kullanılan florokromlarla uyumlu olacak şekilde seçilir; böylece sinyal karışıklığı ve spektral örtüşme minimize edilir (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; Drouet & Lees, 1993).

**Işık Saçılımı ve Floresan Emisyonu:** Hücreler lazer ışını ile karşılaştığında iki temel optik sinyal oluşur (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; Drouet & Lees, 1993):

1. **Işık saçılımı (light scatter):** Hücrelerin fiziksel özellikleri hakkında bilgi verir. Forward scatter (FSC) hücre büyüklüğü ile, side scatter (SSC) ise hücre içi granülarite ve yapısal karmaşıklık ile ilişkilidir.
2. **Floresan emisyonu (fluorescence emission):** Florokrom ile işaretlenmiş antijenlerin veya hücresel yapıların tespit edilmesini sağlar. Floresan sinyalleri optik filtreler ve dikroik aynalar aracılığıyla dalga boylarına göre ayrıştırılır ve ilgili dedektörlere yönlendirilir.

Dedektörler genellikle fotodiyotlar (photodiodes) veya fotomultiplier tüpleri (PMT, photomultiplier tubes) olarak sınıflandırılır. Fotodiyotlar genellikle forward scatter sinyallerini ölçerken, PMT'ler düşük yoğunluklu floresan sinyallerini yüksek hassasiyetle algılayabilir. Bu sayede hem hücrelerin fiziksel hem de moleküler özellikleri güvenilir bir şekilde ölçülebilmektedir. Dedektörler tarafından toplanan analog sinyaller elektronik sistem aracılığıyla dijital verilere dönüştürülür ve bilgisayar yazılımına aktarılır (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; Drouet & Lees, 1993).

Modern optik sistemler, birden fazla lazer ve dedektör kombinasyonu ile çok renkli (multicolor) ve spektral (spectral) analizlere olanak tanır. Bu sayede tek bir hücreden onlarca parametre eş zamanlı olarak ölçülebilir. Optik sistemin doğru tasarımı ve kalibrasyonu, özellikle hematolojik maligniteler, immünfenotipleme ve minimal rezidüel hastalık analizlerinde yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlar (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; Drouet & Lees, 1993; Kruse et al., 2020).

## **Elektronik ve Veri Toplama Sistemi**

Flow sitometri cihazının elektronik ve veri toplama sistemi, optik dedektörlerden gelen analog sinyallerin dijital verilere

dönüştürülmesi ve verilerin bilgisayar ortamında toplanmasını sağlayan kritik bileşendir (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018). Bu sistem, hücrelerin hem fiziksel hem de moleküler özelliklerinin yüksek doğrulukla analiz edilmesini mümkün kılar.

**Sinyal İşleme ve Amplifikasyon:** Dedektörler tarafından algılanan ışık sinyalleri, önce elektriksel sinyallere dönüştürülür. Forward scatter (FSC) ve side scatter (SSC) gibi saçılım sinyalleri genellikle fotodiyotlar tarafından, düşük yoğunluklu floresan sinyalleri ise fotomultiplier tüpleri (PMT) aracılığıyla algılanır. Bu analog sinyaller daha sonra amplifikasyon işlemine tabi tutulur; düşük yoğunluklu sinyaller güçlendirilir ve böylece analiz sırasında daha hassas ölçümler sağlanır (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018).

**Analog-Dijital Dönüşüm:** Amplifiye edilen analog sinyaller, analog-dijital dönüştürücüler (ADC, analog-to-digital converters) aracılığıyla sayısal verilere çevrilir. Bu sayısal veriler bilgisayar yazılımına aktarılır ve her bir hücre için tek hücre verisi (single-cell data) olarak kaydedilir. Bu yaklaşım, çok parametrelili analizler ve hücre alt popülasyonlarının ayrıntılı değerlendirilmesi için temel altyapıyı oluşturur (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018).

**Veri Toplama ve Kalite Kontrol:** Elektronik sistem aynı zamanda aşağıdaki işlevleri de yerine getirir:

- Sinyal gürültüsünün azaltılması (noise reduction)
- Eşik değerlerinin belirlenmesi (threshold setting)
- Veri toplama hızının kontrol edilmesi (event rate management)

Modern flow sitometri cihazları saniyede binlerce hatta on binlerce hücreyi analiz edebilme kapasitesine sahiptir. Bu yüksek veri toplama hızı, klinik örneklerde bulunan heterojen hücre popülasyonlarının ayrıntılı ve güvenilir şekilde değerlendirilmesini sağlar. Özellikle hematolojik maligniteler, immüfenotipleme ve minimal rezidüel hastalık (MRD) analizlerinde bu yetenek kritik öneme sahiptir (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018).

**Çok Parametrelili Veri Analizi:** Toplanan sayısal veriler, modern yazılımlar aracılığıyla grafiksel formatta (histogram, dot plot, density plot) görselleştirilir. Bu yazılımlar, hücre alt popülasyonlarının manuel veya otomatik olarak belirlenmesine, istatistiksel analizlerin yapılmasına ve kalite kontrol süreçlerinin yönetilmesine olanak tanır. Böylece elektronik sistem ve veri toplama altyapısı, flow sitometrinin hem klinik hem de araştırma uygulamalarındaki başarısını doğrudan etkiler (Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; McKinnon, 2018)

### **Veri Analizi ve Yazılım Sistemleri**

Flow sitometri analizinde elde edilen çok parametrelili verilerin doğru ve güvenilir şekilde yorumlanabilmesi için gelişmiş veri analiz yazılımları kullanılmaktadır. Bu yazılımlar, hücre popülasyonlarının grafiksel olarak görselleştirilmesini ve istatistiksel olarak değerlendirilmesini sağlar, böylece klinik ve araştırma uygulamalarında yüksek doğruluk elde edilir (Bajgelman, 2019; Liu et al., 2026).

**Grafiksel Görselleştirme ve Gating:** Veri analizi genellikle aşağıdaki grafiksel yöntemlerle gerçekleştirilir:

- **Histogramlar:** Tek parametrelili dağılımların incelenmesinde kullanılır.

- **İki boyutlu dot plot grafikleri:** İki parametrelili karşılaştırmalar ile hücre alt popülasyonlarının ayrımı yapılır.
- **Çok parametrelili dağılım grafikleri:** Yüksek parametrelili analizlerde hücrelerin daha detaylı incelenmesine olanak tanır.

Bu grafikler aracılığıyla farklı hücre popülasyonları belirlenebilir ve belirli özelliklere sahip hücre grupları seçilerek ayrıntılı analiz yapılabilir. Hücre alt popülasyonlarının seçimi ve analizi “gating” olarak adlandırılır ve flow sitometri analizinin en kritik aşamalarından biridir (Brown & Wittwer, 2000; Drouet & Lees, 1993; Kruse et al., 2020).

**Otomatik Analiz ve Kompansasyon:** Gelişmiş yazılım sistemleri, aşağıdaki işlemleri de gerçekleştirebilir:

- **Otomatik popülasyon tanımlama:** Hücre alt gruplarını önceden tanımlanmış kriterlere göre otomatik olarak sınıflandırır.
- **Veri normalizasyonu:** Ölçümler arasındaki teknik varyasyonu minimize eder.
- **Floresan spektrum örtüşmelerinin düzeltilmesi (compensation):** Çok renkli analizlerde bir florokromun diğer dedektörde oluşturduğu sinyal etkisi düzeltilir.
- **Çok parametrelili veri analizi:** Yüksek boyutlu veri kümeleri üzerinden kapsamlı değerlendirme yapılmasını sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Kanegane et al., 2018).

Günümüzde bazı gelişmiş sistemlerde yapay zekâ (AI) ve makine öğrenmesi tabanlı algoritmalar kullanılarak veri analizi süreçleri daha hızlı, standardize ve güvenilir hale getirilmiştir. Bu yaklaşımlar, özellikle karmaşık hematolojik ve immünolojik

örneklerde analiz doğruluğunu artırmaktadır (Liu et al., 2026; Robinson et al., 2026).

**Klinik Önemi:** Flow sitometri cihazlarının akış, optik ve elektronik sistemlerinin uyumlu çalışması, gelişmiş yazılım desteği ile birleştiğinde, hücre analizlerin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile gerçekleştirilmesini sağlar. Bu teknik altyapı, klinik laboratuvarlarda:

- Hematolojik hastalıkların tanısı ve sınıflandırılması,
- İmmünojenik değerlendirmeler ve hücre alt popülasyonlarının analizi,
- Hücre fonksiyon testleri (apoptozis, proliferasyon, sitokin üretimi),

gibi birçok alanda güvenilir ve hızlı sonuçların elde edilmesine olanak tanır (Drouet & Lees, 1993; Kruse et al., 2020).

### **Klinik Laboratuvarlarda Flow Sitometri Uygulamaları**

Flow sitometri, klinik laboratuvar pratiğinde çok yönlü ve güçlü bir tanısal araç olarak kullanılmaktadır. Yüksek hassasiyeti, hızlı analiz kapasitesi ve çok parametrelilik değerlendirme imkânı sayesinde özellikle hematoloji ve onkoloji alanlarında vazgeçilmez bir yöntem haline gelmiştir. Flow sitometri, hücrelerin fenotipik özelliklerini detaylı biçimde belirleyebilme kapasitesi ile hem tanısal hem de prognostik bilgi sağlamaktadır (Liu et al., 2026; Robinson et al., 2026).

Bu teknoloji sayesinde, bir örnek içerisinde bulunan hücrelerin alt popülasyonları ve heterojenitesi ortaya konabilir. Hücre yüzey antijenlerinin veya sitoplazmik belirteçlerin belirlenmesi, hastalığın tipini ve alt tiplerini tanımlamada kritik rol oynar. Özellikle hematolojik malignitelere, flow sitometri ile elde edilen veriler tedaviye yanıtın izlenmesi, minimal rezidüel hastalığın saptanması

ve nüks riskinin değerlendirilmesi gibi klinik karar süreçlerine doğrudan katkıda bulunur (Liu et al., 2026; Robinson et al., 2026).

Flow sitometri aynı zamanda immünfenotipleme açısından da geniş uygulama alanına sahiptir. Örneğin, lenfosit alt gruplarının (T, B ve NK hücreleri) analizi, immün yetmezliklerin tanısında ve immün sistemin fonksiyonel durumunun değerlendirilmesinde önemli bilgiler sunar. Bu sayede hem konjenital hem de edinilmiş immünolojik bozukluklar, laboratuvar düzeyinde hassas şekilde incelenebilir (Liu et al., 2026; Robinson et al., 2026).

Ayrıca flow sitometri, klinik laboratuvarlarda tedavi planlaması ve izleme süreçlerinde de kullanılır. Hastalığın seyrini değerlendirmek ve tedaviye yanıtı izlemek için hücresel profil değişiklikleri takip edilebilir. Bu özellik, özellikle hematolojik malignitelerde, hastalığın ilerlemesini veya remisyon durumunu belirlemede büyük öneme sahiptir (Czechowska et al., 2025; Liu et al., 2026; Robinson et al., 2026).

Sonuç olarak, flow sitometri, hücresel analizlerde yüksek doğruluk, tekrarlanabilirlik ve çok parametreliliği elde etme avantajı sunarak, klinik laboratuvarlarda hematoloji ve onkoloji alanlarının yanı sıra immünoloji ve transplantasyon takiplerinde de vazgeçilmez bir araçtır. Bu teknoloji, modern tıpta tanı ve takip süreçlerinin etkinliğini artırmakta ve klinik karar verme mekanizmalarına önemli katkılar sağlamaktadır (Liu et al., 2026; Robinson et al., 2026).

### **Hematolojik Malignitelerin Tanısı**

Hematolojik maligniteler, köken aldıkları hücre tipi, maturasyon düzeyi ve moleküler profiline göre sınıflandırılır ve tanı sürecinde immünfenotipik karakterizasyon kritik bir rol oynar. Flow sitometri, hematoloji laboratuvarlarında özellikle lösemi, lenfoma ve miyelom gibi malign hücre popülasyonlarının hızlı, hassas ve çok parametreliliği

olarak tanımlanmasını sağlayan temel bir yöntemdir (Brown & Wittwer, 2000; Kruse et al., 2020).

**Akut Lösemilerde Flow Sitometri:** Akut miyeloid lösemi (AML) ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanısında flow sitometri, malign hücrelerin yüzey ve sitoplazmik antijen profillerini analiz ederek normal hematopoietik hücrelerden ayırım yapılmasına olanak tanır (Brestoff, 2023; Robinson et al., 2023). Örneğin:

- **AML'de** CD13, CD33, CD117 ve myeloperoksidaz (MPO) ekspresyonları myeloid klonu tanımlar.
- **ALL'de** B hücre kökenli lenfoblastlar CD10, CD19, CD20 ve CD22 ile, T hücre kökenli lenfoblastlar CD2, CD3, CD5 ve CD7 ile karakterize edilir.
- Bu antijen profilleri, hastalığın alt tipinin belirlenmesinde ve uygun tedavi protokolünün seçilmesinde kritik öneme sahiptir.

Flow sitometri ayrıca blast hücrelerin immünofenotipik heterojenitesini ortaya koyar; örneğin aynı AML örneğinde myeloid ve monositik belirteçlerin eş zamanlı ekspresyonu görülebilir. Bu, hem hastalığın biyolojik özelliklerinin anlaşılmasını hem de risk stratifikasyonunu sağlar.

**Kronik Lösemiler ve Lenfoproliferatif Bozukluklar:** Kronik lösemilerde (CLL, CML) ve diğer lenfoproliferatif hastalıklarda, flow sitometri malign hücre klonlarını normal lenfositlerden ayırt etmek için kullanılır:

- CLL'de CD5+CD19+CD23+ B hücreleri belirlenir; kappa veya lambda hafif zincirleri ile klonalite doğrulanır.
- CML'de myeloid serilerdeki CD13, CD33 ve CD34 pozitif hücreler izlenir.

Bu sayede tanı sadece morfolojiye değil, fonksiyonel ve fenotipik karakterizasyona dayandırılabilir, yanlış sınıflandırma riski azaltılır (Brestoff, 2023; Robinson et al., 2023).

**Genetik ve Sitogenetik Korelasyonlar:** Flow sitometri, belirli genetik mutasyonlar veya sitogenetik anomalilerle ilişkili immünofenotipik özelliklerin saptanmasına da olanak tanır (Lachowiez et al., 2025; Promsuwicha et al., 2025; Yadav et al., 2024). Örneğin:

- AML'de t(8;21) veya inv(16) taşıyan hastalarda, myeloid antijenlerin belirli kombinasyonları sıklıkla görülür.
- ALL'de t(9;22) (Philadelphia kromozomu) pozitif hastalarda, CD34 ve CD10 ekspresyon paternleri karakteristiktir.

Bu bilgiler, sadece tanı koymakla kalmaz; minimal rezidüel hastalık (MRD) takibi ve tedavi yanıtının izlenmesi için de kullanılabilir.

**Klinik ve Prognostik Önemi:** Flow sitometri, hematolojik malignitelerde tanı doğruluğunu artırır, tedaviye yanıtı izler, ve prognozu belirlemede kritik bilgiler sağlar. Tek bir analiz ile hüresel heterojenite, klonalite ve maturasyon durumu hakkında ayrıntılı bilgi elde edilmesi, klinik karar alma süreçlerinde büyük avantaj sağlar. Ayrıca, flow sitometrik veriler diğer moleküler ve sitogenetik testlerle birlikte kullanıldığında, hematolojik malignitelerin risk stratifikasyonu ve kişiselleştirilmiş tedavi planlaması için güçlü bir temel oluşturur (Cossarizza et al., 2021).

Flow sitometri, hem tanı hem de takip süreçlerinde altın standart olarak kabul edilen bir yöntem olup, modern hematoloji laboratuvarlarında vazgeçilmez bir araçtır (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

**Lösemi ve Lenfoma İmmünofenotipleme**

Flow sitometri, lösemi ve lenfomaların immüfenotipik tanısında altın standart yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu teknoloji, yüzey ve sitoplazmik antijenlerin tespit edilmesine olanak tanıyarak, malign hücreleri normal hematopoietik hücrelerden ayırmayı mümkün kılar (Brown & Wittwer, 2000; Ortolani, 2021). İmmüfenotipleme sayesinde hem tanısal doğruluk artar hem de tedaviye yanıt ve hastalığın seyrine dair klinik bilgiler elde edilebilir.

**Akut Lösemilerde Kullanımı:** Akut lösemilerde (AML ve ALL), flow sitometri, T hücreli ve B hücreli alt tiplerin belirlenmesinde etkin bir yöntemdir. Kullanılan başlıca markerler şunlardır (Kruse et al., 2020):

- **AML:** CD34, CD117, CD13, CD33 ve myeloperoksidaz (MPO) gibi myeloid belirteçler ile blast hücreler tanımlanır.
- **B-ALL:** CD19, CD10, CD20 ve CD22 ekspresyonları ile B hücre kökenli lenfoblastlar belirlenir.
- **T-ALL:** CD3, CD7, CD2 ve CD5 markerleri ile T hücre kökenli lenfoblastlar ayrılır.

Bu immüfenotipik profiller, hastalığın alt tipinin saptanması, risk sınıflandırması ve uygun tedavi protokolünün seçilmesi için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, minimal rezidüel hastalık (MRD) takibi sırasında blast hücrelerin saptanması da flow sitometri ile mümkündür (Kruse et al., 2020).

**Kronik Lösemilerde Kullanımı:** Kronik lösemilerde (CLL, CML), flow sitometri spesifik antijen paternlerini kullanarak malign hücreleri tanımlar:

- **CLL:** CD5+, CD19+, CD23+ B hücreleri tanımlanır ve kappa/lambda hafif zincirleri ile klonalite doğrulanır.

- **CML:** CD34, CD13 ve CD33 gibi myeloid markerler blast hücre popülasyonlarının saptanmasında kullanılır (Ortolani, 2021).

Bu profillemeye, hastalığın evresini belirleme, prognoz değerlendirmesi ve tedavi yanıtının izlenmesi açısından klinik kararları destekler.

**Lenfomaların İmmünofenotiplenmesi:** Non-Hodgkin lenfoma (NHL) ve Hodgkin dışı lenfomaların alt tiplerinin ayrımı da flow sitometri ile gerçekleştirilebilir. Bu yöntem sayesinde, malign lenfositlerin B veya T hücre kökenli olup olmadığı, alt tipler arasındaki farklılıklar ve klonalite belirlenebilir (Gajzer & Fromm, 2025; Tembhare et al., 2022). Örneğin:

- **B hücreli lenfomalar:** CD19, CD20 ve hafif zincir ekspresyonları ile karakterize edilir.
- **T hücreli lenfomalar:** CD3, CD4, CD8 ve diğer T hücre markerleri ile ayrılır.

Flow sitometri ile yapılan immünofenotiplenme, yalnızca tanısal doğruluğu artırmakla kalmaz, aynı zamanda tedavi yanıtının izlenmesi, hastalığın progresyonunun takip edilmesi ve prognoz değerlendirmesi için de kritik veriler sağlar. Bu teknoloji, hematolojik malignitelerin multidisipliner yönetiminde vazgeçilmez bir araçtır (Chianese et al., 2002; Holl et al., 2025).

### **Minimal Rezidüel Hastalık (MRD) Değerlendirmesi**

Minimal rezidüel hastalık (MRD), tedavi sonrası hastalık hücrelerinin mikroskobik düzeyde, standart morfolojik yöntemlerle saptanamayacak şekilde kalması durumunu ifade eder ve hematolojik malignitelerde relaps riskinin öngörülmesi, tedavi yanıtının değerlendirilmesi ve ek tedavi stratejilerinin planlanması açısından kritik öneme sahiptir (Health Quality, 2016; Kruse et al.,

2020). MRD'nin belirlenmesi, özellikle akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut miyeloid lösemi (AML) gibi hızlı ilerleyen hastalıklarda klinik karar süreçlerini doğrudan etkiler (Kruse et al., 2020).

Flow sitometri, MRD tespitinde yüksek duyarlılık, çok parametreliliği analiz ve hızlı veri elde etme kapasitesi sayesinde öne çıkar. Bu yöntemde, malign hücreler normal hematopoietik hücrelerden ayırt edilebilecek spesifik antijen kombinasyonları kullanılarak tanımlanır. ALL'de CD19, CD10 ve CD34 markerleri ile B hücre blastları seçilirken, T hücreli ALL'de CD3, CD7 ve CD2 kombinasyonları ile T hücre blastları belirlenir. AML'de ise CD34, CD117 ve myeloid belirteçlerin (CD13, CD33, MPO) kombinasyonu kullanılarak blast hücreler ayrılır. Bu immünofenotipik yaklaşım, düşük düzeydeki hastalık hücrelerinin güvenilir şekilde saptanmasını sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Chatterjee et al., 2016).

Günümüzde kullanılan çok renkli flow sitometri panelleri, aynı örnek üzerinde onlarca belirteci eş zamanlı olarak analiz ederek %0.01 seviyesinde MRD tespitine olanak tanımaktadır. Bu sayede tedavi sonrası remisyon durumunda bile düşük düzeyde kalan hastalık hücreleri doğru şekilde belirlenebilir. MRD analizi, yalnızca hastalığın mevcut durumunu ortaya koymakla kalmaz, aynı zamanda relaps olasılığı, tedavi başarısı ve ek tedavi gereksinimi hakkında da öngörüler sunar. MRD pozitifliği, yoğunlaştırılmış kemoterapi, hedefe yönelik tedavi veya hematopoetik kök hücre transplantasyonu gibi ek müdahalelerin planlanmasına rehberlik ederken, MRD negatifliği tedavi etkinliğinin yüksek olduğunu gösterir ve gereksiz yoğun tedavilerden kaçınılmasını sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Chatterjee et al., 2016).

Flow sitometri ile yapılan MRD değerlendirmesi, klinik laboratuvarlarda hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sunarak

hematolojik malignitelerde tedaviye yanıtın izlenmesi, hastalığın seyrinin belirlenmesi ve klinik kararların optimize edilmesi açısından altın standart bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Bu teknoloji, hem tanısal hem de prognostik olarak modern hematoloji pratiğinde vazgeçilmez bir araçtır (Brown & Wittwer, 2000; Chatterjee et al., 2016).

### **Kemik İliği ve Periferik Kan Analizleri**

Flow sitometri, hematolojik malignitelerin tanısı ve takibinde periferik kanın yanı sıra kemik iliği örneklerinde de kritik bir rol oynamaktadır. Kemik iliği aspiratları, hematopoietik kök ve progenitör hücrelerin detaylı değerlendirilmesi, anormal veya malign hücre popülasyonlarının belirlenmesi ve hastalığın evrelendirilmesi amacıyla analiz edilir. Bu analizler sayesinde blast hücrelerin immünofenotipik profilleri, kök hücre dağılımı ve normal hematopoietik hiyerarşi hakkında ayrıntılı bilgi elde edilir (Ortolani, 2021).

Periferik kan örneklerinde ise flow sitometri, anormal hücre popülasyonlarının tespiti, hastalığın progresyonunun izlenmesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesi için kullanılır. Hücre sayısı ve örnek kalitesi, doğru analiz ve güvenilir sonuçlar için kritik öneme sahiptir. Ayrıca hematopoietik kök hücre sayımı ve mobilizasyon takibi, özellikle allojenik veya otolog kök hücre transplantasyonları öncesinde, hastanın transplantasyona uygunluğunu belirlemek için vazgeçilmezdir. Örneğin, CD34+ hücrelerin sayımı, kök hücre mobilizasyonunun etkinliğini ve transplantasyon için yeterliliğini değerlendirmede standart bir parametre olarak kullanılır (Dar & Seegmiller, 2026; Jelic et al., 2023).

Flow sitometri aynı zamanda MRD takibi ve immünofenotipik değerlendirmelerle entegre edilerek, hem kemik iliği hem de periferik kan örneklerinde hastalığın dinamiklerini anlamaya olanak sağlar. Bu yöntem, yüksek duyarlılık, hızlı analiz kapasitesi ve çok

parametrelili veri toplama yeteneği sayesinde klinik laboratuvarlarda hematolojik malignitelerin tanısında ve tedavi izleminde altın standart bir teknoloji haline gelmiştir (Alvarez Flores et al., 2024; Riva et al., 2021).

Flow sitometri, hematolojik malignitelerin tanısı, lösemi ve lenfomaların immünofenotiplemesi, minimal rezidüel hastalık değerlendirmesi ve kök hücre transplantasyon süreçlerindeki analizler dahil olmak üzere hematoloji ve onkoloji laboratuvarlarının temel araçlarından biri olarak modern klinik pratiğe entegre edilmiştir. Bu çok yönlülüğu ve güvenilirliği, flow sitometrinin klinik karar süreçlerindeki önemini ve modern laboratuvarlardaki vazgeçilmez rolünü pekiştirmektedir (Liu et al., 2026; McKinnon, 2018).

### **İmmünoloji Alanında Flow Sitometri Kullanımı**

Flow sitometri, immünoloji alanında hücresel düzeyde detaylı ve yüksek doğrulukta analiz yapabilen en güçlü laboratuvar tekniklerinden biridir. Hem temel immün sistem araştırmalarında hem de klinik tanı ve izleminde kullanımı giderek artmaktadır. Bu yöntem, lenfosit alt grup profillemesi, primer ve sekonder immün yetmezliklerin değerlendirilmesi ve otoimmün hastalıkların izlenmesi gibi kritik uygulamalarda vazgeçilmez bir araçtır (Cossarizza et al., 2021).

Lenfosit alt grup analizi, T hücreleri (CD3+, CD4+, CD8+), B hücreleri (CD19+, CD20+) ve doğal öldürücü (NK) hücreler (CD16+, CD56+) dahil olmak üzere immün sistemin ana bileşenlerinin sayım ve oranlarının kantitatif olarak belirlenmesini sağlar. Bu analiz, immün sistemin normal işleyişini değerlendirmek, immün yetmezlikleri tanımak ve lenfoproliferatif bozuklukları ayırt etmek için kullanılır (Cossarizza et al., 2021). Flow sitometri ile elde edilen bu veriler, klinik kararları destekler ve hastalığın seyri hakkında güvenilir bilgiler sunar.

Primer ve sekonder immün yetmezliklerin değerlendirilmesinde flow sitometri, yalnızca temel lenfosit alt gruplarının belirlenmesi ile sınırlı değildir; aynı zamanda B hücre alt popülasyonları, T regülatör hücreleri (Treg) ve çeşitli fonksiyonel aktivasyon belirteçlerinin analizine de olanak tanır. Bu yaklaşım, immün sistemdeki niceliksel ve niteliksel bozuklukların ayrıntılı biçimde ortaya konmasını sağlar. Özellikle primer immün yetmezliklerde multiparametre flow sitometrik analizler, T hücre, B hücre ve doğal öldürücü (NK) hücre popülasyonlarının fenotipik ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Cabral-Marques et al., 2019; Ge et al., 2022).

Otoimmün hastalıkların değerlendirilmesinde flow sitometri, hüresel aktivasyon markerları ve subset değişikliklerini inceleyerek hem hastalık patogenezinin anlaşılmasına hem de tedavi yanıtının izlenmesine katkı sağlar. Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve multipl skleroz gibi durumlarda T hücre aktivasyon markerları (CD69, HLA-DR), B hücre aktivitesi ve T regülatör hücre düzeyleri analiz edilebilir (Abraham & Aubert, 2016; Ge et al., 2022). Bu sayede hem araştırma hem de klinik uygulamalarda immün sistemin dinamikleri daha detaylı şekilde ortaya konabilir.

Sonuç olarak, flow sitometri çok parametreliliği, analiz kapasitesi, yüksek duyarlılık ve kantitatif veri sağlama yeteneği ile immünoloji laboratuvarlarının temel araçlarından biri hâline gelmiştir. Lenfosit alt grup analizi, immün yetmezliklerin değerlendirilmesi ve otoimmün hastalıkların izlenmesi gibi uygulamalarda sağladığı güvenilir ve hızlı sonuçlar, klinik karar süreçlerinde ve immünoloji araştırmalarında kritik bir rol oynar (Abraham & Aubert, 2016; Ge et al., 2022).

Otoimmün hastalıkların değerlendirilmesinde flow sitometri, hüresel aktivasyon belirteçleri ve immün hücre alt gruplarındaki değişiklikleri inceleyerek hem hastalık patogenezinin anlaşılmasına

hem de tedavi yanıtının izlenmesine önemli katkı sağlar. Multiparametre flow sitometrik analizler sayesinde T ve B lenfosit alt popülasyonları, aktivasyon markerları ve düzenleyici immün hücreler ayrıntılı şekilde değerlendirilebilir. Bu yaklaşım, otoimmün hastalıklarda immün sistemin fonksiyonel durumunun ortaya konmasına olanak tanır (Orru et al., 2021).

Özellikle sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve multipl skleroz gibi hastalıklarda T hücre aktivasyonunun değerlendirilmesi önemli bir araştırma ve klinik takip aracıdır. Flow sitometri ile CD69 ve HLA-DR gibi erken ve geç aktivasyon belirteçleri incelenerek T hücre aktivasyonu analiz edilebilir. Bunun yanı sıra B hücre aktivitesi, plazmablast düzeyleri ve T regülatör hücre (Treg) popülasyonları da değerlendirilebilir. Bu immünofenotipik analizler, otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynayan immün regülasyon bozukluklarını ortaya koymada değerli bilgiler sağlar (Orru et al., 2021).

Ayrıca flow sitometri ile elde edilen hücresel immün profil verileri, tedaviye verilen immünolojik yanıtın izlenmesine de katkıda bulunur. Örneğin immünsupresif veya biyolojik ajan tedavileri sonrası T hücre aktivasyon markerlarının azalması, B hücre aktivitesindeki değişiklikler veya Treg hücre düzeylerindeki artış gibi parametreler tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılabilir. Bu nedenle flow sitometri, hem araştırma ortamında hem de klinik uygulamalarda otoimmün hastalıklarda immün sistem dinamiklerinin ayrıntılı şekilde incelenmesini sağlayan önemli bir laboratuvar yöntemidir (Gao et al., 2023; Vitales-Noyola et al., 2017).

### **Lenfosit Alt Grup Analizi**

Lenfosit alt grup analizi, bağışıklık sisteminin hücresel bileşenlerinin ayrıntılı olarak değerlendirilmesini sağlayan önemli bir laboratuvar uygulamasıdır. Flow sitometri yöntemi sayesinde

lenfosit popülasyonları yüzeylerinde bulunan spesifik antijenler aracılığıyla tanımlanabilir ve kantitatif olarak ölçülebilir. Bu analiz, immün sistemin fonksiyonel durumunu ortaya koyarak enfeksiyonlar, immün yetmezlikler, otoimmün hastalıklar ve bazı hematolojik malignitelerin değerlendirilmesinde önemli bilgiler sağlar. Çok parametrelili analiz kapasitesi sayesinde aynı anda birden fazla hücresel belirteç değerlendirilebilir ve böylece bağışıklık sisteminin farklı bileşenleri detaylı biçimde incelenebilir (Herzenberg et al., 2006; Maecker et al., 2012).

Flow sitometri ile yapılan lenfosit alt grup analizinde temel olarak üç ana lenfosit popülasyonu değerlendirilir: T lenfositleri, B lenfositleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler. Bu hücreler yüzeylerinde bulunan özgül CD (cluster of differentiation) markerları aracılığıyla ayırt edilir. Analiz genellikle periferik kan örnekleri kullanılarak gerçekleştirilir ve hücreler floresanla işaretlenmiş monoklonal antikorlarla boyanarak cihazda incelenir. Bu yöntem sayesinde binlerce hücre kısa sürede analiz edilerek güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilir (Chattopadhyay & Roederer, 2012; Herzenberg et al., 2006).

T lenfositleri, hücresel bağışıklığın temel bileşenlerini oluşturur ve CD3 yüzey antijeni ile tanımlanır. Flow sitometri analizinde CD3 pozitif hücreler genel T hücre popülasyonunu temsil eder. Bu hücreler fonksiyonel özelliklerine göre alt gruplara ayrılır. CD4 pozitif T hücreleri yardımcı T hücreleri olarak adlandırılır ve immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Antijen sunan hücrelerden gelen sinyalleri algılayarak diğer immün hücrelerin aktivasyonunu sağlarlar ve sitokin üretimi yoluyla bağışıklık yanıtını yönlendirirler. CD8 pozitif T hücreleri ise sitotoksik T hücreleri olarak bilinir ve özellikle virüsle enfekte hücrelerin ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında görev alırlar (Chattopadhyay & Roederer, 2012; McBride & Striker, 2017).

CD4 ve CD8 hücreleri arasındaki oran, bağışıklık sisteminin dengesini gösteren önemli bir klinik parametredir. CD4/CD8 oranındaki değişiklikler özellikle viral enfeksiyonlarda, kronik inflamatuvar hastalıklarda ve immün yetmezlik durumlarında gözlemlenebilir. Bu oran, bağışıklık sisteminin fonksiyonel durumunun değerlendirilmesinde ve bazı hastalıkların takibinde önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (McBride & Striker, 2017; Wehr et al., 2008).

B lenfositleri humoral bağışıklığın temel hücreleridir ve antikor üretiminden sorumludur. Flow sitometri analizinde B hücreleri genellikle CD19 ve CD20 yüzey antijenleri aracılığıyla tanımlanır. Bu hücreler antijenle karşılaştıklarında plazma hücrelerine farklılaşarak spesifik antikor üretirler ve böylece enfeksiyonlara karşı koruyucu bağışıklık yanıtı oluştururlar. Ayrıca hafıza B hücreleri aracılığıyla uzun süreli bağışıklık yanıtı sağlanır. B hücre popülasyonunun değerlendirilmesi özellikle primer immün yetmezliklerin tanısında, otoimmün hastalıkların incelenmesinde ve bazı lenfoproliferatif hastalıkların değerlendirilmesinde önemli bilgiler sağlar (Herzenberg et al., 2006; Wehr et al., 2008).

Doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri), doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçasını oluşturur. Bu hücreler virüsle enfekte olmuş hücreleri ve bazı tümör hücrelerini önceden duyarlanma gerektirmeden tanıyıp ortadan kaldırma kapasitesine sahiptir. Flow sitometri analizinde NK hücreleri genellikle CD16 ve CD56 yüzey markerları ile tanımlanır ve CD3 negatif özellik gösterirler. NK hücrelerinin sayısal ve fonksiyonel değerlendirilmesi özellikle viral enfeksiyonların kontrolü, tümör immünolojisi ve bazı immün yetmezlik sendromlarının araştırılması açısından önem taşır (Chattopadhyay & Roederer, 2012).

Lenfosit alt grup analizi klinik uygulamalarda oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bağışıklık sisteminin genel durumunun

değerlendirilmesinde, kronik enfeksiyonların izlenmesinde, immün yetmezlik sendromlarının tanısında ve bazı hematolojik hastalıkların takibinde rutin olarak kullanılır. Ayrıca organ nakli yapılan hastalarda immün baskılayıcı tedavinin etkilerinin izlenmesinde ve hastaların enfeksiyon riskinin değerlendirilmesinde de önemli bir parametre olarak değerlendirilir (Maecker et al., 2012; Vivier et al., 2011).

Bu analizde doğru sonuçlar elde edilebilmesi için örnek hazırlama süreci büyük önem taşır. Kan örneklerinin uygun antikoagülan içeren tüplerde alınması, hücrelerin canlılığının korunması ve antikor boyama işlemlerinin standart protokollere uygun şekilde yapılması gerekir. Flow sitometrik analiz sırasında hücrelerin ışık saçılım özellikleri ve floresan sinyalleri değerlendirilerek farklı hücre popülasyonları ayırt edilir ve sonuçlar sayısal olarak raporlanır (Chattopadhyay & Roederer, 2012; Herzenberg et al., 2006).

Lenfosit alt grup analizi, bağışıklık sisteminin hücresel bileşenlerini ayrıntılı şekilde değerlendirmeye olanak sağlayan temel bir immünolojik testtir. Flow sitometri teknolojisinin yüksek hassasiyet ve çok parametreliliği analiz kapasitesi sayesinde lenfosit popülasyonları güvenilir biçimde tanımlanabilir ve bağışıklık sisteminin fonksiyonel durumu hakkında kapsamlı bilgiler elde edilebilir. Bu özellikleri nedeniyle lenfosit alt grup analizi, modern immünoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez tanınmış araçlarından biri olarak kabul edilmektedir (Herzenberg et al., 2006; Maecker et al., 2012; Vivier et al., 2011).

### **Primer ve Sekonder İmmün Yetmezliklerin Değerlendirilmesi**

Flow sitometri, immün sistem hücrelerinin sayısal ve fonksiyonel özelliklerini ayrıntılı şekilde analiz edebilme kapasitesi sayesinde hem primer hem de sekonder immün yetmezliklerin tanı ve izleminde önemli bir laboratuvar yöntemi olarak kullanılmaktadır. İmmün yetmezlik durumlarında bağışıklık sisteminin farklı hücresel

bileşenlerinde ortaya çıkan niceliksel veya fonksiyonel değişiklikler, flow sitometri ile hızlı ve güvenilir biçimde saptanabilir. Bu yöntem, özellikle lenfosit alt gruplarının değerlendirilmesi, hücre yüzey belirteçlerinin analizi ve aktivasyon markerlarının incelenmesi yoluyla immün sistemin genel fonksiyonel durumunun ortaya konmasına yardımcı olur (Cossarizza et al., 2021; Kanegane et al., 2018).

Primer immün yetmezlikler, genetik veya konjenital kökenli bağışıklık sistemi bozukluklarıdır ve genellikle çocukluk çağında tekrarlayan enfeksiyonlarla kendini gösterir. Bu hastalıklarda belirli lenfosit alt gruplarında sayısal eksiklikler veya fonksiyonel bozukluklar görülebilir. Flow sitometri analizi sayesinde T hücreleri, B hücreleri ve NK hücreleri gibi temel lenfosit popülasyonlarının dağılımı ve sayıları ayrıntılı olarak belirlenebilir. Örneğin, X'e bağlı agammaglobulinemi olgularında periferik kanda B hücrelerinin belirgin şekilde azaldığı veya tamamen yok olduğu gözlenebilir. Benzer şekilde şiddetli kombine immün yetmezlik (SCID) gibi hastalıklarda T hücre popülasyonlarında ciddi azalma veya fonksiyonel yetersizlik saptanabilir. Bu tür immünfenotipik değişiklikler flow sitometri ile erken dönemde belirlenerek hastalığın tanısına önemli katkı sağlar (Kanegane et al., 2018; Picard et al., 2015).

Flow sitometri aynı zamanda primer immün yetmezliklerde B hücre alt popülasyonlarının değerlendirilmesine de olanak tanır. Naif B hücreleri, hafıza B hücreleri ve plazma hücreleri gibi farklı alt grupların analiz edilmesi, bağışıklık sisteminin gelişimsel ve fonksiyonel durumunun anlaşılmasına yardımcı olur. Bu analizler özellikle ortak değişken immün yetmezlik (CVID) gibi hastalıkların sınıflandırılmasında ve hastalığın klinik seyri hakkında öngörude bulunulmasında önemli rol oynar (Chapel et al., 2008).

Sekonder immün yetmezlikler ise genetik olmayan, sonradan gelişen bağışıklık sistemi bozukluklarıdır. Bu durumlar genellikle kemoterapi, immünosupresif tedavi, kronik enfeksiyonlar veya sistemik hastalıklar sonucunda ortaya çıkar. Flow sitometri, bu hastalarda immün sistem hücrelerindeki değişiklikleri değerlendirmek ve bağışıklık fonksiyonlarının izlenmesini sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kemoterapi veya biyolojik ajan tedavisi alan hastalarda T ve B hücre popülasyonlarının azalması veya fonksiyonel değişiklikleri bu yöntemle izlenebilir (Cossarizza et al., 2021).

HIV enfeksiyonu, sekonder immün yetmezliğin en iyi bilinen örneklerinden biridir. Bu hastalıkta CD4 pozitif T hücrelerinin sayısında progresif bir azalma meydana gelir. Flow sitometri ile CD4 ve CD8 T hücrelerinin kantitatif analizi yapılabilir ve CD4/CD8 oranı belirlenerek hastalığın ilerleme durumu ve tedaviye yanıt değerlendirilir. Antiretroviral tedavi alan hastalarda CD4 hücre sayısındaki artış, immün sistemin yeniden yapılanmasının önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Cossarizza et al., 2021; Kestens & Mandy, 2017).

Bunun yanı sıra kronik böbrek yetmezliği, malign hastalıklar, uzun süreli kortikosteroid kullanımı ve organ transplantasyonu sonrası uygulanan immünosupresif tedaviler de sekonder immün yetmezliğe yol açabilir. Bu durumlarda flow sitometri ile lenfosit popülasyonlarının sayısal değişimleri, hücre aktivasyon markerları ve bazı fonksiyonel belirteçler analiz edilerek bağışıklık sisteminin durumu değerlendirilebilir. Bu bilgiler enfeksiyon riskinin belirlenmesi ve tedavi stratejilerinin planlanması açısından klinik açıdan büyük önem taşır (Cossarizza et al., 2021; Kanegane et al., 2018).

Sonuç olarak flow sitometri, hem primer hem de sekonder immün yetmezliklerin tanı ve izleminde kritik bir rol oynayan ileri bir

laboratuvar yöntemidir. Lenfosit popülasyonlarının sayısal dağılımı, aktivasyon durumları ve fonksiyonel özellikleri hakkında sağladığı ayrıntılı bilgiler sayesinde immün sistem bozukluklarının daha doğru şekilde sınıflandırılmasına ve hastaların klinik yönetiminin optimize edilmesine katkı sağlar. Bu özellikleri nedeniyle flow sitometri, modern klinik immünoloji laboratuvarlarının temel tanısal araçlarından biri olarak kabul edilmektedir (Cossarizza et al., 2021; Kanegane et al., 2018).

### **Otoimmün Hastalıklarda Hücresel Analiz**

Otoimmün hastalıklarda bağışıklık sistemi, vücudun kendi dokularına karşı anormal bir yanıt geliştirir ve bu durum kronik inflamasyon ile doku hasarına yol açar. Flow sitometri, bu hastalıklarda immün hücre alt gruplarının sayısal dağılımını, aktivasyon durumunu ve fonksiyonel özelliklerini ayrıntılı biçimde değerlendirme imkânı sağlar. Çok parametrelili analizi kapasitesi sayesinde T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin hem kantitatif hem de fonksiyonel özellikleri güvenilir bir şekilde incelenebilir (Grammer et al., 2004; Kanegane et al., 2018).

T hücre aktivasyonu, otoimmün hastalıkların patogenezinin anlaşılmasında kritik bir parametredir. Flow sitometri ile CD25 (IL-2 reseptörü  $\alpha$  zinciri), HLA-DR ve CD69 gibi aktivasyon markerları kullanılarak T hücrelerinin uyarılmış durumu tespit edilebilir. Bu markerların ekspresyon düzeyi, hastalık aktivitesi ve inflamatuvar yanıtın şiddeti hakkında önemli bilgiler verir. Örneğin sistemik lupus eritematozus (SLE) veya romatoid artrit (RA) olgularında uyarılmış T hücrelerinin artışı, aktif inflamasyonun göstergesi olarak yorumlanabilir (Kanegane et al., 2018; Sumida et al., 2024).

B hücreleri, otoantikor üretiminden sorumlu hücreler olarak otoimmün patolojide kritik rol oynar. Flow sitometri sayesinde naif B hücreler, memory B hücreler ve plazma hücreleri gibi alt popülasyonlar ayrıntılı şekilde incelenebilir. Memory B hücrelerin

artışı veya spesifik alt gruplardaki değişiklikler, hem hastalığın seyrine ilişkin bilgi verir hem de tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde yardımcı olur. Bu yaklaşım, SLE, multipl skleroz (MS) ve bazı otoimmün hepatit olgularında B hücre dinamiklerinin izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Grammer et al., 2004; McWilliam et al., 2018).

NK hücreleri, doğal bağışıklığın önemli bir parçası olup otoimmün hastalıklarda sayı ve fonksiyonel değişiklik gösterebilir. Flow sitometri, CD16 ve CD56 markerları aracılığıyla NK hücre popülasyonlarını değerlendirir ve aktivasyon durumu veya sitotoksik kapasite hakkında bilgi sağlar. Örneğin MS ve SLE hastalarında NK hücre fonksiyonunda gözlenen değişiklikler, hastalık aktivitesi ve tedavi yanıtı ile korelasyon gösterebilir (McWilliam et al., 2018; Sumida et al., 2024).

Bu analizler, otoimmün hastalıklarda hem tanısal hem de tedavi yanıtının izlenmesinde yol gösterici bilgiler sağlar. Flow sitometri, T ve B hücre alt gruplarının dağılımını, aktivasyon durumunu ve NK hücre fonksiyonunu aynı anda değerlendirebilme kapasitesi sayesinde klinik immünoloji laboratuvarlarında vazgeçilmez bir araçtır. Elde edilen veriler, hastalık evresinin belirlenmesi, tedavi etkinliğinin izlenmesi ve potansiyel relaps riskinin değerlendirilmesi açısından doğrudan klinik karar süreçlerine katkıda bulunur (Grammer et al., 2004; Sumida et al., 2024)

### **Transplantasyon ve Hematopoetik Kök Hücre Analizleri**

Flow sitometri, hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT) süreçlerinde hem tanısal hem de izlem amaçlı vazgeçilmez bir laboratuvar yöntemidir. Hematopoetik kök hücrelerin (HSC) sayısal ve fonksiyonel olarak değerlendirilmesi, transplantasyon öncesi hazırlık, kök hücre mobilizasyonunun takibi ve transplant sonrası immün sistemin yeniden yapılandırılmasının izlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu yöntem, özellikle klinik laboratuvarlarda

hızlı, güvenilir ve çok parametrelili veri elde edilmesini sağlayarak transplantasyon sürecinin etkin yönetimine katkıda bulunur (Nery et al., 2013; Voltarelli, 2000).

Transplantasyon öncesi dönemde HSC sayımı ve kalitesinin belirlenmesi, greft hazırlığında kritik bir adımdır. Flow sitometri ile CD34<sup>+</sup> hücreler kantitatif olarak belirlenebilir ve bu hücrelerin yaşam yeteneği, maturasyon düzeyi ve alt grupları incelenebilir [3]. Bu analiz, periferik kan ve kemik iliği örneklerinde uygulanabilir ve optimal greft hacmi ve kalite değerlendirmesi için temel veri sağlar. Mobilizasyon protokollerinde, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) veya diğer mobilizasyon ajanları ile periferik kanda CD34<sup>+</sup> hücre sayısının izlenmesi, toplama zamanlamasının ve verimliliğin belirlenmesinde önemli rol oynar (Talekar & Olson, 2017).

Transplant sonrası dönemde immün re-konstrüksiyonun izlenmesi, enfeksiyon riskinin değerlendirilmesi ve hastalık relapsının erken tespit edilmesi açısından hayati önem taşır. Flow sitometri ile T, B ve NK hücre alt gruplarının sayısal ve fonksiyonel analizi yapılabilir. CD4/CD8 T hücre oranları, memory B hücreler, naif ve uyarılmış T hücreler gibi parametreler, transplant sonrası immün sistemin toparlanma sürecini gösteren kritik biyobelirteçlerdir (Nery et al., 2013). Ayrıca allojenik transplantasyon sonrası graft-versus-host hastalığı (GVHD) riskini değerlendirmede ve tedavi yanıtını izlemekte de flow sitometrinin rolü büyüktür (Nery et al., 2013).

Flow sitometri ayrıca kök hücre alt popülasyonlarının fonksiyonel durumunu değerlendirmede de kullanılabilir. Multipotent progenitör hücrelerin varlığı, farklılaşma kapasiteleri ve aktivasyon durumu, transplant sonrası hematopoietik reenkarnasyon ve klinik iyileşme ile ilişkilidir. Bu değerlendirme, özellikle yüksek riskli hastalarda ve yoğun immünosupresyon uygulanan olgularda transplant başarısının öngörülmesi açısından kritik bir bilgi sağlar (Nery et al., 2013; Voltarelli, 2000).

Flow sitometri, hematopoetik kök hücre transplantasyonunda hem pre-transplant hem de post-transplant süreçlerde temel bir rol oynayan güçlü bir analiz yöntemidir. Hem kantitatif hem de fonksiyonel bilgiler sunabilmesi, klinik kararların optimize edilmesine, transplantasyon sürecinin güvenli ve etkin bir şekilde yürütülmesine katkıda bulunur ve modern transplantasyon laboratuvarlarının vazgeçilmez bir aracı olarak kabul edilir (Nery et al., 2013; Talekar & Olson, 2017; Voltarelli, 2000).

### **6.1. CD34+ Hücre Sayımı**

CD34<sup>+</sup> hücreler, hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin en önemli yüzey markerıdır ve transplantasyon öncesi CD34<sup>+</sup> hücre sayımı, greft kalitesinin belirlenmesi ve transplantasyon başarısının öngörülmesi açısından standart bir parametredir (Voltarelli, 2000).

Flow sitometri ile CD34<sup>+</sup> hücrelerin sayımı hem kemik iliği hem de periferik kan örneklerinde gerçekleştirilebilir (Talekar & Olson, 2017; Voltarelli, 2000). Özellikle periferik kan kök hücre toplama prosedürlerinde, yeterli CD34<sup>+</sup> hücre sayısının elde edildiği doğrulanmadan aferez işlemi başlatılmaz. CD34<sup>+</sup> hücre sayısı, genellikle mililitre başına hücre sayısı (cells/ $\mu$ L) veya toplam aferez hacmindeki CD34<sup>+</sup> hücre sayısı olarak raporlanır (Talekar & Olson, 2017; Voltarelli, 2000).

CD34<sup>+</sup> hücrelerin doğru ve güvenilir şekilde sayılması, mobilizasyon protokollerinin etkinliğini değerlendirmek, transplantasyon zamanlamasını optimize etmek ve olası greft yetersizliği riskini önceden tespit etmek açısından kritik bir laboratuvar parametresidir (Voltarelli, 2000). Flow sitometri, yüksek hassasiyet ve çok parametreliliği sayesinde, CD34<sup>+</sup> hücrelerin sayısal ve fonksiyonel özelliklerini aynı anda değerlendirme avantajı sunar (Talekar & Olson, 2017).

### **Kök Hücre Mobilizasyonu ve Greft Değerlendirmesi**

Hematopoetik kök hücre mobilizasyonu, genellikle granülosit koloni uyarıcı faktörler (G-CSF) veya kemoterapi kombinasyonları ile periferik kana kök hücrelerin yönlendirilmesini içerir (Voltarelli, 2000). Mobilizasyon protokolleri, hastanın klinik durumu, temel hastalığı ve önceki tedavi öyküsüne göre planlanır. Flow sitometri, mobilizasyon etkinliğinin izlenmesi, CD34<sup>+</sup> hücrelerin optimal seviyeye ulaşım ulaşmadığının belirlenmesi ve aferez işlemi için uygun zamanın tespit edilmesi amacıyla kritik bir laboratuvar aracı olarak kullanılır (Pei & Huang, 2024; Voltarelli, 2000).

Mobilizasyon takibinde sadece CD34<sup>+</sup> hücre sayısı değil, aynı zamanda T, B ve NK hücre alt grupları da analiz edilerek greftin immün profili hakkında bilgi elde edilir [3]. Bu değerlendirme, transplant sonrası olası immün komplikasyonların önceden öngörülmesine ve greft-versus-host hastalığı (GVHD) riskinin tahmin edilmesine olanak tanır. Ayrıca hücrelerin viabilitesi, proliferatif kapasitesi ve alt popülasyon dağılımı, greftin kalitesini belirleyen önemli parametreler arasında yer alır (Voltarelli, 2000).

Flow sitometri, çok parametrelili analiz yeteneği sayesinde hem kantitatif hem de fonksiyonel bilgiler sağlar. Örneğin, mobilize edilen CD34<sup>+</sup> hücrelerin maturasyon durumu ve progenitör alt grupları incelenerek greftin hem hematopoietik reenkarnasyon hem de immün rekonstitüsyon kapasitesi hakkında ön bilgi elde edilir (Pei & Huang, 2024; Voltarelli, 2000). Bu veriler, transplantasyon ekibi için aferez işleminin zamanlamasını ve toplama hedeflerini optimize etmede doğrudan rehberlik eder.

Flow sitometri sadece CD34<sup>+</sup> hücre sayımını değil, aynı zamanda greftin immün ve fonksiyonel özelliklerini de değerlendiren çok yönlü bir yöntemdir. Mobilizasyon ve greft kalite değerlendirmesi, modern hematopoietik kök hücre transplantasyon laboratuvarlarının standart protokollerinde merkezi bir role sahiptir ve klinik kararların

doğruluğunu önemli ölçüde artırır (Pei & Huang, 2024; Voltarelli, 2000).

### **Transplant Sonrası İmmün Re-konstrüksiyon Takibi**

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu sonrası immün sistemin yeniden yapılandırılması, transplantasyonun başarısı, enfeksiyon riski ve hastalık relapsının öngörülmesi açısından kritik bir süreçtir (Voltarelli, 2000). Flow sitometri, bu süreçte immün re-konstrüksiyonun hem kantitatif hem de fonksiyonel olarak izlenmesinde en güvenilir ve hızlı yöntemlerden biridir (Voltarelli, 2000).

T hücre re-konstrüksiyonu, transplant sonrası immün sistemin toparlanmasının temel göstergelerindedir. CD3<sup>+</sup> total T hücre sayısı, CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücreleri, CD8<sup>+</sup> sitotoksik T hücreleri ve CD4/CD8 oranı düzenli olarak takip edilir (Voltarelli, 2000). Bu parametreler, bağışıklık yanıtının etkinliğini ve olası enfeksiyon risklerini değerlendirmek açısından hayati öneme sahiptir. Ayrıca T hücre alt gruplarının maturasyon durumu ve memory T hücre oranları, immün sistemin fonksiyonel kapasitesine dair ayrıntılı bilgi sağlar (Voltarelli, 2000).

B hücre ve NK hücre takibi, transplant sonrası adaptif ve doğal bağışıklık yanıtının yeniden kazanılmasını değerlendirmede kritik bir rol oynar. CD19<sup>+</sup> B hücreleri, antikor yanıtının yeniden oluşumunu gösterirken, CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK hücreleri, hücrel bağışıklık ve enfeksiyon kontrol kapasitesini yansıtır (Voltarelli, 2000). Bu hücre popülasyonlarının sayısal ve fonksiyonel analizi, immün replasman tedavilerinin planlanması ve olası immün komplikasyonların erken tespitinde yol gösterici olur.

Fonksiyonel değerlendirme, aktivasyon markerları (CD25, HLA-DR) ve proliferasyon testleri ile desteklenir. Bu sayede immün yanıt kapasitesi, T ve B hücre aktivasyonu, cytokine yanıt potansiyeli ve

NK hücre fonksiyonu aynı anda incelenebilir (Voltarelli, 2000). Flow sitometri ile elde edilen bu çok parametrelili veriler, minimal rezidüel hastalık (MRD) takibi ile entegre edilerek, transplant sonrası relaps riskinin belirlenmesine katkı sağlar (Voltarelli, 2000).

Flow sitometri transplant sonrası immün re-konstrüksiyonun izlenmesinde altın standart bir yöntemdir. Hem kantitatif hem de fonksiyonel bilgiler sunması, immün yetmezliklerin erken tespiti, uygun tedavi stratejilerinin planlanması ve transplant sonrası hasta yönetiminin optimize edilmesi açısından kritik bir laboratuvar aracıdır (Voltarelli, 2000).

### **Onkoloji ve Tümör Biyolojisinde Flow Sitometri**

Flow sitometri, tümör biyolojisinin anlaşılmasında ve malign hücre popülasyonlarının karakterizasyonunda önemli bir laboratuvar yöntemidir. Hücresel düzeyde çok parametrelili analiz yapılabilmesi, hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerinin aynı anda değerlendirilmesine olanak tanır. Bu özellikleri sayesinde flow sitometri, kanser hücrelerinin heterojenitesinin ortaya konulması, tümör hücre alt popülasyonlarının tanımlanması ve tümör progresyonunun moleküler düzeyde incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bonilla et al., 2020; Wulff et al., 2006).

Kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri kontrolsüz proliferasyon kapasitesidir. Flow sitometri, hücre döngüsünün farklı fazlarında bulunan hücrelerin DNA içeriklerinin ölçülmesi yoluyla proliferasyon dinamiklerini değerlendirebilir. DNA bağlayıcı floresan boyalar kullanılarak yapılan analizlerde G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücre popülasyonları belirlenebilir. Bu sayede tümör hücrelerinin proliferatif aktivitesi ve hücre döngüsü dağılımı hakkında ayrıntılı bilgi elde edilir (Brown & Wittwer, 2000; Wulff et al., 2006). Hücre döngüsü analizi, özellikle kemoterapi veya hedefe yönelik tedavilerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde önemli bir araştırma aracıdır.

Flow sitometri ayrıca tümör hücrelerinde meydana gelen apoptozis mekanizmalarının analizinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Apoptozis, hücrelerin programlanmış ölüm sürecidir ve kanser gelişiminde bu mekanizmanın bozulması önemli bir rol oynar. Annexin V ve propidyum iyodür gibi boyalar kullanılarak yapılan analizler, erken ve geç apoptozis evrelerinin ayrıntılı şekilde belirlenmesine olanak sağlar. Bu yöntem sayesinde antikanser ilaçların hücre ölümünü indükleme kapasitesi ve tedaviye verilen biyolojik yanıt değerlendirilebilir (Brown & Wittwer, 2000; Rieger, 2022).

Bunun yanı sıra flow sitometri, tümör hücrelerinin immünofenotipik özelliklerinin belirlenmesinde de önemli bir rol oynar. Yüzey ve sitoplazmik antijenlerin analiz edilmesi, tümör hücrelerinin kökeninin belirlenmesine ve farklı tümör alt tiplerinin ayırt edilmesine yardımcı olur. Bu analizler özellikle hematolojik malignitelerde tanısal sınıflandırmanın yapılmasında ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (Bonilla et al., 2020; Brown & Wittwer, 2000). Ayrıca bazı solid tümörlerde tümör mikroçevresindeki immün hücre popülasyonlarının değerlendirilmesi, tümörün immünojenik özellikleri ve immünoterapiye yanıt potansiyeli hakkında önemli bilgiler sunabilir (Rieger, 2022).

Flow sitometri aynı zamanda tümör hücrelerinin ilaç direnci mekanizmalarının araştırılmasında da kullanılmaktadır. Çoklu ilaç direnç proteinleri (örneğin P-gp) veya hücresel transport sistemleri gibi moleküler belirteçlerin analizi, kemoterapiye direnç gelişiminin anlaşılmasına katkı sağlar. Bu tür analizler, kişiselleştirilmiş kanser tedavilerinin planlanmasında ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır (Rieger, 2022; Wulff et al., 2006).

Sonuç olarak flow sitometri, tümör biyolojisinin hücresel ve moleküler düzeyde incelenmesine olanak sağlayan güçlü bir analiz yöntemidir. Hücre döngüsü analizi, apoptozis değerlendirmesi, immünofenotipleme ve ilaç direnç mekanizmalarının araştırılması gibi çok sayıda uygulama alanı sayesinde hem temel kanser araştırmalarında hem de klinik onkoloji pratiğinde önemli bir yer tutmaktadır (Bonilla et al., 2020; Brown & Wittwer, 2000; Rieger, 2022; Wulff et al., 2006).

### **DNA Ploidisi ve Hücre Döngüsü Analizi**

Flow sitometri, hücrelerin DNA içeriğinin kantitatif olarak ölçülmesine olanak tanıyarak DNA ploidi ve hücre döngüsü fazlarının değerlendirilmesini mümkün kılan önemli bir analiz yöntemidir. DNA ploidi, bir hücrenin içerdiği toplam DNA miktarının normal diploid hücrelerle karşılaştırılması esasına dayanır. Normal somatik hücreler diploid DNA içeriğine sahipken, birçok malign tümörde aneuploidi veya DNA içeriğinde artış gibi kromozomal düzensizlikler gözlenebilir. Bu tür ploidy değişiklikleri tümör hücrelerinin genetik instabilitesini yansıtır ve tümörün biyolojik davranışı, proliferasyon potansiyeli ve klinik prognozu hakkında önemli bilgiler sağlayabilir (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Flow sitometri ile DNA içeriğinin ölçülmesi genellikle DNA'ya bağlanabilen floresan boyalar kullanılarak gerçekleştirilir. Bu amaçla en sık kullanılan boyalar arasında propidyum iyodür, DAPI ve 7-aminoaktinomisin D gibi nükleik asit bağlayıcı floresan maddeler yer alır. Bu boyalar DNA ile stoikiometrik olarak bağlanır ve floresan sinyal yoğunluğu hücrede bulunan DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Flow sitometri analizinde her bir hücrenin floresan sinyali ölçülerek DNA içeriğine göre dağılımı belirlenir ve bu veriler histogram şeklinde görselleştirilir (Brown & Wittwer, 2000; Rieger, 2022).

Elde edilen DNA histogramları, hücre popülasyonunun hücre döngüsü fazlarına göre dağılımını ortaya koyar. Hücre döngüsü temel olarak üç ana fazdan oluşur: G0/G1, S ve G2/M fazları. G0/G1 fazı, hücrelerin büyüme, metabolik aktivite ve DNA sentezi öncesi hazırlık dönemini temsil eder ve diploid DNA içeriğine sahip hücreleri içerir. S fazı, DNA replikasyonunun gerçekleştiği evredir ve bu fazda hücrelerin DNA miktarı giderek artar. G2/M fazı ise hücrelerin mitoz bölünmesine hazırlandığı ve gerçekleştiği aşamayı ifade eder; bu fazdaki hücreler diploid hücrelerin yaklaşık iki katı DNA içeriğine sahiptir (Rieger, 2022).

Hücre döngüsü analizi, özellikle tümör hücrelerinin proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır. S fazındaki hücre oranının yüksek olması genellikle tümör hücrelerinin hızlı proliferasyon gösterdiğini ve daha agresif biyolojik davranış sergileyebileceğini düşündürür. Benzer şekilde anöplid hücre popülasyonlarının varlığı, genomik instabilite ve tümör progresyonu ile ilişkilendirilmektedir (Darzynkiewicz et al., 2010; Shapiro, 2005). Bu nedenle DNA ploidi ve hücre döngüsü analizi, birçok malignitede prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.

Flow sitometri ile yapılan DNA analizleri aynı zamanda antikanser tedavilerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde de önemli bir rol oynar. Kemoterapötik ajanlar veya hedefe yönelik tedaviler, hücre döngüsünün belirli fazlarında hücreleri durdurabilir veya apoptozisi indükleyebilir. Bu tür değişiklikler, tedavi öncesi ve sonrası yapılan hücre döngüsü analizleri ile kantitatif olarak değerlendirilebilir. Böylece tedaviye verilen hücresel yanıtın erken dönemde belirlenmesi mümkün olabilir (Brown & Wittwer, 2000; Darzynkiewicz et al., 2010).

Flow sitometri, DNA ploidi ve hücre döngüsü analizleri aracılığıyla tümör hücrelerinin proliferatif özelliklerini ve genetik instabilitesini ortaya koyan güçlü bir laboratuvar yöntemidir. Bu

analizler, tümör biyolojisinin anlaşılması, hastalığın agresifliğinin değerlendirilmesi ve tedavi stratejilerinin planlanması açısından hem araştırma hem de klinik onkoloji alanında önemli katkılar sağlamaktadır (Brown & Wittwer, 2000; Darzynkiewicz et al., 2010; Rieger, 2022; Shapiro, 2005).

### **Apoptozis ve Proliferasyon Belirteçleri**

Apoptozis, hücrelerin genetik olarak programlanmış kontrollü ölüm sürecini ifade eder ve doku homeostazisinin korunmasında temel bir biyolojik mekanizmadır. Kanser gelişiminde apoptozisin baskılanması veya bozulması, malign hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve tümör progresyonuna katkıda bulunan önemli patofizyolojik süreçlerden biridir. Bu nedenle tümör hücrelerinde apoptozis mekanizmalarının değerlendirilmesi hem tümör biyolojisinin anlaşılmasında hem de antikanser tedavilerin etkinliğinin analiz edilmesinde büyük önem taşır. Flow sitometri, hücre bazında çok parametrelili ölçüm yapabilme kapasitesi sayesinde apoptozis süreçlerinin erken ve geç evrelerinin hassas biçimde analiz edilmesine olanak sağlayan güçlü bir yöntemdir (Obeng, 2021; Vermes et al., 1995).

Flow sitometrik apoptozis analizlerinde en sık kullanılan yöntemlerden biri Annexin V bağlanma testidir. Annexin V, hücre membranının iç yüzeyinde bulunan ve apoptozis sırasında hücre zarının dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserin molekülüne yüksek afinite ile bağlanır. Bu özellik sayesinde erken apoptozis aşamasındaki hücreler Annexin V ile işaretlenerek tespit edilebilir. Propidyum iyodür (PI) gibi DNA bağlayıcı boyalar ise hücre zarının bütünlüğü bozulmuş olan geç apoptoz veya nekroz evresindeki hücreleri belirlemek amacıyla kullanılır. Annexin V ve PI kombinasyonu, canlı hücreler, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre popülasyonlarının ayrıntılı olarak ayırt edilmesini sağlar (Darzynkiewicz et al., 2001; Vermes et al., 1995).

Apoptozis değerlendirmesinde kullanılan bir diğer yaklaşım ise kaspaz aktivitesinin ölçülmesidir. Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünde görev alan proteolitik enzimlerdir ve özellikle kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesi apoptozisin önemli biyokimyasal göstergeleri arasında yer alır. Flow sitometri ile kaspaz aktivitesine duyarlı floresan substratlar kullanılarak hücrelerde apoptozis sinyallerinin başlatılıp başlatılmadığı belirlenebilir. Bu analizler, özellikle hedefe yönelik kanser tedavilerinin hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Darzynkiewicz et al., 2001; Schluter et al., 1993).

Tümör biyolojisinin değerlendirilmesinde yalnızca hücre ölümü değil, aynı zamanda hücre proliferasyonunun ölçülmesi de büyük önem taşır. Proliferasyon analizi, tümör hücrelerinin bölünme hızını ve büyüme potansiyelini ortaya koyan önemli bir parametredir. Flow sitometri ile proliferasyon değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan belirteçlerden biri Ki-67 antijenidir. Ki-67, hücre döngüsünün aktif fazlarında (G1, S, G2 ve M fazları) ekspresyon gösteren ancak dinlenme fazındaki (G0) hücrelerde bulunmayan bir nükleer proteindir. Bu nedenle Ki-67 ekspresyon düzeyi, hücre popülasyonunun proliferatif aktivitesini yansıtan güvenilir bir biyolojik göstergedir (Gratzner, 1982; Schluter et al., 1993).

Proliferasyon analizinde kullanılan bir diğer yöntem ise DNA sentezinin doğrudan ölçülmesidir. Bu amaçla bromodeoksiuridin (BrdU) veya benzeri nükleotid analogları hücrelere inkorpore edilerek DNA replikasyonu sırasında sentezlenen yeni DNA zincirlerine dahil edilir. Daha sonra floresan işaretli antikorlar kullanılarak BrdU içeren hücreler flow sitometri ile tespit edilir ve böylece aktif DNA sentezi gerçekleştiren hücre popülasyonları belirlenebilir. Günümüzde BrdU analizine alternatif olarak EdU gibi daha hızlı ve yüksek hassasiyetli nükleotid analogları da kullanılmaktadır (Darzynkiewicz et al., 2001; Gratzner, 1982).

Apoptozis ve proliferasyon analizlerinin birlikte değerlendirilmesi, tümör hücrelerinin biyolojik davranışı hakkında kapsamlı bilgiler sağlar. Örneğin proliferasyon hızının artması ve apoptozisin baskılanması, birçok malign tümörde gözlenen tipik özellikler arasındadır. Bu parametrelerin flow sitometri ile kantitatif olarak ölçülmesi, tümör agresifliğinin belirlenmesine, prognozun değerlendirilmesine ve tedaviye verilen yanıtın izlenmesine katkıda bulunur. Ayrıca kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik tedavilerin hücre döngüsü, proliferasyon ve apoptozis üzerindeki etkileri bu analizler aracılığıyla ayrıntılı biçimde incelenebilir (Gratzner, 1982; Obeng, 2021; Schluter et al., 1993).

Sonuç olarak flow sitometri, apoptozis ve proliferasyon belirteçlerinin değerlendirilmesinde yüksek duyarlılık ve çok parametrelili analiz kapasitesi sunan önemli bir laboratuvar yöntemidir. Hücresel düzeyde gerçekleştirilen bu analizler, kanser biyolojisinin anlaşılması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve mevcut tedavilerin etkinliğinin izlenmesi açısından onkoloji araştırmalarında ve klinik uygulamalarda önemli katkılar sağlamaktadır (Darzynkiewicz et al., 2001; Gratzner, 1982; Obeng, 2021; Schluter et al., 1993; Vermes et al., 1995).

### **Tümör Hücre Karakterizasyonu**

Flow sitometri, tümör hücrelerinin immünofenotipik özelliklerinin ayrıntılı biçimde analiz edilmesini sağlayan ve tümör biyolojisinin anlaşılmasına önemli katkılar sunan ileri bir hücresel analiz yöntemidir. Bu teknik, aynı örnek içerisinde yer alan farklı hücre popülasyonlarını çok parametrelili olarak değerlendirebilme kapasitesi sayesinde tümör hücrelerinin heterojenitesini ortaya koyabilmektedir. Özellikle yüzey ve sitoplazmik antijenlerin floresan işaretli monoklonal antikolar kullanılarak analiz edilmesi, malign hücre popülasyonlarının normal hücrelerden ayırt edilmesini ve farklı tümör alt gruplarının belirlenmesini mümkün kılar. Bu

nedence flow sitometri, hem araştırma ortamında tümör biyolojisinin incelenmesinde hem de klinik onkolojide tanı, prognoz ve tedavi takibinde önemli bir araç olarak kullanılmaktadır (Bajgelman, 2019; Shapiro, 2005).

Tümör hücre karakterizasyonunda en önemli parametrelerden biri hücre yüzey antijen ekspresyonunun değerlendirilmesidir. Flow sitometri ile analiz edilen yüzey markerları, hücrelerin kökenini, farklılaşma düzeyini ve biyolojik özelliklerini belirlemeye yardımcı olur. Örneğin hematolojik malignitelerde CD antijenleri kullanılarak tümör hücrelerinin B hücre, T hücre veya miyeloid kökenli olup olmadığı belirlenebilir. Solid tümörlerde ise EpCAM, HER2 veya çeşitli adezyon molekülleri gibi yüzey proteinlerinin ekspresyonu analiz edilerek tümör hücrelerinin fenotipik özellikleri hakkında bilgi elde edilebilir. Bu tür immünfenotipik analizler, tümörlerin sınıflandırılması ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından önemli klinik bilgiler sağlayabilir (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Flow sitometri ayrıca tümör kök hücrelerinin tanımlanmasında da yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Tümör kök hücreleri, kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özelliklerine sahip küçük bir hücre alt popülasyonunu temsil eder ve tümör gelişimi, metastaz ve tedavi direnci ile ilişkilendirilmektedir. Bu hücreler genellikle CD133, CD44, CD24 veya ALDH gibi belirteçlerin kombinasyonu kullanılarak tanımlanabilir. Flow sitometrik analizler sayesinde tümör dokusu içerisinde bulunan kök hücre benzeri popülasyonların oranı belirlenebilir ve bu popülasyonların biyolojik özellikleri incelenebilir. Bu bilgiler, kanser progresyonunun anlaşılması ve yeni tedavi hedeflerinin geliştirilmesi açısından önemli katkılar sunmaktadır (Al-Hajj et al., 2003; Bajgelman, 2019).

Tümör hücre karakterizasyonunda değerlendirilen bir diğer önemli parametre hücresel farklılaşma markerleridir. Tümör hücreleri çoğu

zaman normal hücrelerin farklılaşma programını kısmen kaybeder veya anormal farklılaşma paternleri gösterir. Flow sitometri ile bu farklılaşma markerlerinin analizi, tümör hücrelerinin maturasyon düzeyini ortaya koyabilir. Özellikle hematolojik malignitelere blast hücrelerinin farklılaşma basamaklarının belirlenmesi, hastalığın sınıflandırılması ve prognoz değerlendirmesi açısından kritik öneme sahiptir (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Son yıllarda immünoterapilerin onkoloji pratiğinde giderek yaygınlaşmasıyla birlikte immün kontrol noktası moleküllerinin analizi de önem kazanmıştır. Programlanmış hücre ölümü reseptörü-1 (PD-1), programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) ve sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4) gibi immün kontrol noktası proteinleri, tümör hücreleri ile bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimde önemli rol oynar. Flow sitometri ile bu moleküllerin tümör hücrelerinde veya immün hücre popülasyonlarında ekspresyon düzeyi değerlendirilebilir. Bu analizler, immünoterapiye aday hastaların belirlenmesi ve tedavi yanıtının izlenmesi açısından giderek daha fazla klinik önem kazanmaktadır (Bajgelman, 2019; Pardoll, 2012).

Flow sitometri ayrıca tümör mikroçevresinin değerlendirilmesine de katkı sağlayabilir. Tümör dokusunda bulunan T lenfositleri, düzenleyici T hücreleri, makrofajlar ve diğer immün hücre popülasyonları analiz edilerek tümörün immünolojik yapısı hakkında bilgi elde edilebilir. Bu yaklaşım, tümörün immün kaçış mekanizmalarının anlaşılmasına ve immün temelli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (Brown & Wittwer, 2000; Pardoll, 2012).

DNA ploidi ve hücre döngüsü analizi, apoptozis ve proliferasyon değerlendirmeleri ile birlikte tümör hücrelerinin ayrıntılı immünofenotipik karakterizasyonunu sağlayan güçlü bir analitik yöntemdir. Hücresel heterojenitenin ortaya konulması, tümör kök

hücre popülasyonlarının belirlenmesi ve immün kontrol noktası moleküllerinin analiz edilmesi gibi çok sayıda parametrenin aynı anda değerlendirilebilmesi, bu tekniğin modern onkoloji araştırmalarında ve klinik uygulamalarda önemli bir yer edinmesini sağlamıştır. Bu özellikler, kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkıda bulunan önemli bilimsel ve klinik avantajlar sunmaktadır (Al-Hajj et al., 2003; Bajgelman, 2019; Brown & Wittwer, 2000; Pardoll, 2012; Shapiro, 2005).

### **Flow Sitometri Veri Analizi ve Yorumlama**

Flow sitometri analizinde elde edilen veriler, aynı anda çok sayıda hücresel parametrenin ölçülmesi nedeniyle oldukça büyük ve karmaşık veri setleri oluşturur. Bu nedenle analiz sürecinde elde edilen verilerin doğru şekilde işlenmesi, uygun istatistiksel ve grafiksel yöntemlerle değerlendirilmesi ve klinik bağlam içerisinde yorumlanması güvenilir sonuçların elde edilmesi açısından büyük önem taşır. Flow sitometri veri analizi genellikle özel yazılımlar aracılığıyla gerçekeştirilir ve bu süreçte hücre popülasyonlarının tanımlanması, floresan sinyal yoğunluklarının karşılaştırılması ve farklı parametreler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi temel aşamaları oluşturur. Günümüzde gelişmiş veri analiz algoritmaları ve çok parametrelili analiz teknikleri, flow sitometriden elde edilen verilerin daha ayrıntılı ve güvenilir şekilde yorumlanmasını mümkün hale getirmiştir (Herzenberg et al., 2006; Shapiro, 2005).

Flow sitometri verilerinin analizinde en yaygın kullanılan görselleştirme yöntemlerinden biri histogramlardır. Histogramlar, tek bir parametrenin hücre popülasyonu içerisindeki dağılımını gösteren grafiklerdir ve genellikle floresan yoğunluğu veya ışık saçılımı gibi ölçümlerin değerlendirilmesinde kullanılır. Bu grafiklerde yatay eksen ölçülen parametrenin yoğunluğunu, dikey eksen ise o değere sahip hücre sayısını temsil eder. Histogramlar

özellikle DNA içeriği analizi, proliferasyon belirteçleri ve yüzey antijen ekspresyonunun değerlendirilmesi gibi uygulamalarda hücre popülasyonlarının dağılımını hızlı bir şekilde görselleştirmeye olanak tanır (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

İki boyutlu dağılım grafikleri (dot plot) ise flow sitometri veri analizinde en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Dot plot grafiklerinde her bir nokta tek bir hücreyi temsil eder ve iki farklı parametrenin aynı anda değerlendirilmesine olanak sağlar. Örneğin ileri saçılım (forward scatter) ve yan saçılım (side scatter) parametrelerinin birlikte analiz edilmesi, hücrelerin büyüklük ve granülerlik özelliklerine göre farklı popülasyonlara ayrılmasını sağlar. Benzer şekilde iki farklı floresan markerın aynı anda değerlendirilmesi ile hücrelerin belirli antijen kombinasyonlarına göre alt gruplara ayrılması mümkün olur. Bu yaklaşım, özellikle immünofenotipleme analizlerinde ve kompleks hücre popülasyonlarının tanımlanmasında büyük avantaj sağlamaktadır (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Yoğunluk grafikleri (density plot) ve kontur grafikleri ise yüksek hücre sayısına sahip veri setlerinin daha net görselleştirilmesini sağlar. Bu grafikler, belirli hücre bölgelerinde yoğunlaşan popülasyonları daha belirgin hale getirerek analiz sürecini kolaylaştırır. Özellikle multiparametrik analizlerde farklı hücre alt popülasyonlarının dağılımının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olur. Günümüzde bazı analiz yazılımları üç boyutlu görselleştirme ve çok boyutlu veri indirgeme yöntemleri kullanarak hücre popülasyonlarının daha ayrıntılı analiz edilmesine olanak tanımaktadır (Herzenberg et al., 2006).

Flow sitometri veri yorumlamasında en kritik aşamalardan biri gating stratejisinin belirlenmesidir. Gating, belirli kriterlere göre hücre popülasyonlarının seçilmesi ve analiz edilmesi sürecini ifade eder. Bu işlem sırasında öncelikle debris ve ölü hücreler analiz

dışında bırakılır, ardından ileri ve yan saçılım parametreleri kullanılarak temel hücre popülasyonları tanımlanır. Daha sonra floresan markerların ekspresyonuna göre daha spesifik hücre alt grupları belirlenir. Doğru gating stratejileri uygulanmadığında yanlış popülasyonların analiz edilmesi veya önemli hücre alt gruplarının gözden kaçması gibi hatalar ortaya çıkabilir. Bu nedenle gating işlemi, deneysel tasarım ve biyolojik bilgi ile uyumlu şekilde dikkatli biçimde planlanmalıdır (Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

Multiparametrik analiz teknikleri, modern flow sitometri uygulamalarının en önemli özelliklerinden biridir. Günümüzde çok renkli flow sitometri sistemleri aynı anda 10'dan fazla floresan markerın analiz edilmesine olanak tanıyabilmektedir. Bu sayede hücrelerin yüzey antijenleri, aktivasyon markerları, proliferasyon belirteçleri ve fonksiyonel özellikleri tek bir analiz içerisinde değerlendirilebilir. Bu tür çok boyutlu veri setlerinin yorumlanmasında principal component analizi (PCA), t-SNE veya UMAP gibi ileri biyoinformatik yöntemler de giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu yöntemler, yüksek boyutlu veri setlerinde yer alan karmaşık hücresel ilişkilerin daha anlaşılır biçimde görselleştirilmesine katkı sağlamaktadır (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Flow sitometri verilerinin yorumlanmasında elde edilen sonuçların klinik bulgularla ilişkilendirilmesi de büyük önem taşır. Laboratuvar sonuçlarının hastanın klinik durumu, laboratuvar değerleri ve diğer tanısal testlerle birlikte değerlendirilmesi, doğru tanı ve tedavi kararlarının verilmesine yardımcı olur. Özellikle hematolojik maligniteler, immün yetmezlikler ve transplantasyon sonrası immün izlem gibi alanlarda flow sitometri verilerinin klinik bağlam içerisinde yorumlanması, hastalığın seyri ve tedavi yanıtı hakkında önemli bilgiler sağlayabilir (Brown & Wittwer, 2000; Perfetto et al., 2004).

Flow sitometri veri analizi ve yorumlama süreci; grafiksel görselleştirme teknikleri, gating stratejileri, multiparametrik analiz yöntemleri ve klinik korelasyonun birlikte değerlendirilmesini gerektiren kapsamlı bir süreçtir. Bu aşamaların doğru şekilde uygulanması, flow sitometriden elde edilen verilerin güvenilir ve klinik açıdan anlamlı sonuçlara dönüştürülmesini sağlar. Bu nedenle veri analizi süreci, flow sitometri çalışmalarının en kritik aşamalarından biri olarak kabul edilmektedir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

### **Gating Stratejileri**

Gating, flow sitometri veri analizinin en temel ve kritik aşamalarından biridir ve belirli özelliklere sahip hücre popülasyonlarının seçilerek diğer hücrelerden ayrılması işlemi ifade eder. Bu süreç, analiz edilen örnek içerisinde bulunan farklı hücre gruplarının tanımlanmasını, hedef hücre popülasyonlarının belirlenmesini ve daha ayrıntılı analizlerin bu popülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmesini sağlar. Flow sitometri sistemleri her bir hücre için çok sayıda fiziksel ve floresan parametre ölçtüğünden, elde edilen veri setlerinin doğru şekilde yorumlanabilmesi için uygun gating stratejilerinin uygulanması büyük önem taşır. Yanlış veya yetersiz gating uygulamaları, hedef hücre popülasyonlarının yanlış tanımlanmasına ve sonuçların hatalı yorumlanmasına yol açabilir (Herzenberg et al., 2006; Shapiro, 2005).

Gating işlemi genellikle hücrelerin fiziksel özelliklerine dayalı olarak başlatılır. İlk aşamada forward scatter (FSC) ve side scatter (SSC) parametreleri kullanılarak hücre popülasyonları boyut ve granülerlik özelliklerine göre ayrıştırılır. FSC sinyali hücre büyüklüğü ile ilişkili olup hücre çapını yaklaşık olarak yansıtırken, SSC sinyali hücre içi granüllerin ve yapısal kompleksitenin göstergesi olarak kabul edilir. Bu iki parametrenin birlikte değerlendirilmesi ile lenfositler, monositler ve granülositler gibi

temel hücre popülasyonları dot plot grafikleri üzerinde belirgin bölgeler oluşturur. Böylece analiz sürecinin ilk aşamasında hedef hücre popülasyonu kaba hatlarıyla tanımlanmış olur (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Temel hücre popülasyonlarının belirlenmesinden sonra ikinci aşamada daha spesifik gating işlemleri gerçekleştirilir. Bu aşamada floresan işaretli monoklonal antikolar aracılığıyla hücre yüzeyinde veya sitoplazmasında bulunan belirli antijenlerin ekspresyonu analiz edilir. Örneğin immünolojik analizlerde CD3, CD4, CD8, CD19 veya CD56 gibi markerlar kullanılarak T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücreler birbirinden ayrılabilir. Hematolojik malignitelerin değerlendirilmesinde ise blast hücre popülasyonlarının belirlenmesi, farklılaşma markerlarının incelenmesi ve anormal immünofenotiplerin saptanması için çoklu antijen kombinasyonlarına dayalı gating stratejileri uygulanır. Bu aşamalı yaklaşım, kompleks hücre popülasyonlarının doğru şekilde sınıflandırılmasını sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Flow sitometri analizlerinde doğru gating stratejilerinin oluşturulabilmesi için bazı teknik kontrol yöntemlerinin kullanılması da önemlidir. İzotip kontrolleri, floresan eşliğinin belirlenmesinde ve non-spesifik antikor bağlanmasının değerlendirilmesinde yardımcı olurken, floresan minus one (FMO) kontrolleri özellikle çok renkli flow sitometri analizlerinde doğru pozitif sınırların belirlenmesini sağlar. Ayrıca kompanzasyon kontrolleri, farklı floresan boyalar arasında meydana gelebilen spektral örtüşmenin düzeltilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu kontrol yöntemleri sayesinde yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçların ortaya çıkma riski azaltılabilir (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Gating stratejilerinin uygulanmasında bir diğere önemli aşama ise debris, hücre parçaları ve ölü hücrelerin analiz dışında bırakılmasıdır. Örnek hazırlama sürecinde ortaya çıkabilen bu yapılar, analiz sonuçlarını olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle viability boyaları kullanılarak canlı hücrelerin seçilmesi ve ölü hücrelerin analizden çıkarılması önerilmektedir. Ayrıca çift hücrelerin veya hücre agregatlarının ayıklanması için singlet gating olarak adlandırılan ek analiz adımları uygulanabilir. Bu yaklaşımlar, analiz edilen hücre popülasyonlarının daha homojen ve güvenilir olmasını sağlar (Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

Klinik uygulamalarda doğru gating stratejisinin belirlenmesi özellikle hematolojik maligniteler, immün yetmezlikler ve transplantasyon sonrası immün izlem gibi alanlarda büyük önem taşır. Örneğin minimal rezidüel hastalık analizlerinde çok küçük oranlarda bulunan malign hücre popülasyonlarının doğru şekilde tespit edilmesi için oldukça hassas ve iyi tanımlanmış gating stratejileri gereklidir. Benzer şekilde lenfosit alt grup analizlerinde CD markerlarının doğru kombinasyonlarla değerlendirilmesi, bağışıklık sisteminin fonksiyonel durumunun doğru şekilde yorumlanmasına yardımcı olur (Brown & Wittwer, 2000; Perfetto et al., 2004).

Gating stratejileri, flow sitometri veri analizinin doğruluğunu doğrudan etkileyen kritik bir aşamadır. Hücre popülasyonlarının doğru şekilde tanımlanması, uygun kontrol yöntemlerinin kullanılması ve deneyimli uzmanlar tarafından gerçekleştirilen dikkatli analiz süreçleri, güvenilir ve klinik açıdan anlamlı sonuçların elde edilmesini sağlar. Bu nedenle modern flow sitometri çalışmalarında gating stratejilerinin standartlaştırılması ve analiz protokollerinin titizlikle uygulanması büyük önem taşımaktadır (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

## **Multiparametrik Analiz**

Flow sitometrinin en önemli avantajlarından biri, tek bir hücre üzerinde birden fazla biyolojik parametrenin eş zamanlı olarak analiz edilebilmesidir. Bu özellik, hücresel fenotipin daha ayrıntılı ve kapsamlı şekilde değerlendirilmesine olanak tanır. Modern flow sitometri cihazları birden fazla lazer kaynağı ve çok sayıda floresan dedeksiyon kanalı kullanarak aynı hücrede çok sayıda yüzey antijeni, sitoplazmik protein ve fonksiyonel belirteci aynı anda ölçebilmektedir. Bu teknoloji sayesinde hücre popülasyonlarının yalnızca tek bir marker üzerinden değil, çok sayıda biyolojik özelliğin birlikte değerlendirilmesi ile karakterize edilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu yaklaşım, özellikle kompleks hücresel sistemlerin incelenmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır (Herzenberg et al., 2006; Shapiro, 2005).

Multiparametrik analiz, farklı floresan işaretli antikorların aynı örnekte kullanılması prensibine dayanır. Her bir floresan boya belirli bir dalga boyunda uyarılır ve farklı bir emisyon spektrumu oluşturur. Bu sayede aynı hücre üzerinde birden fazla antijenin ekspresyonu eş zamanlı olarak ölçülebilir. Günümüzde gelişmiş flow sitometri sistemleri 10'dan fazla hatta bazı platformlarda 20'den fazla parametrenin aynı anda analiz edilmesine olanak tanımaktadır. Bu gelişmeler, özellikle immünoloji ve hematoloji alanlarında hücresel heterojenitenin daha ayrıntılı biçimde ortaya konulmasına katkı sağlamıştır (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Multiparametrik analizlerin en önemli klinik uygulamalarından biri hematolojik malignitelerin immünofenotipik sınıflandırılmasıdır. Lösemi ve lenfoma gibi hastalıklarda malign hücreler çoğu zaman kendilerine özgü antijen kombinasyonları gösterir. Bu antijen profillerinin çoklu marker panelleri kullanılarak değerlendirilmesi, malign hücrelerin normal hematopoietik hücrelerden ayırt edilmesini mümkün kılar. Örneğin akut lösemilerde CD34, CD117,

CD13, CD33, CD19 veya CD3 gibi markerların birlikte değerlendirilmesi ile hücrelerin miyeloid veya lenfoid kökenli olduğu belirlenebilir. Bu tür multiparametrik analizler, hastalığın doğru sınıflandırılması ve uygun tedavi stratejisinin belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Minimal rezidüel hastalık (MRD) analizleri de multiparametrik flow sitometrinin önemli kullanım alanlarından biridir. MRD değerlendirmesinde, tedavi sonrası çok düşük oranlarda kalan malign hücrelerin tespit edilmesi hedeflenir. Bu amaçla normal hematopoietik hücrelerden farklı antijen kombinasyonlarına sahip olan malign hücre popülasyonları multiparametrik paneller kullanılarak belirlenir. Çok sayıda markerın aynı anda analiz edilmesi sayesinde, milyonlarca hücre arasında çok küçük oranlarda bulunan anormal hücre popülasyonları yüksek duyarlılıkla tespit edilebilir. Bu yaklaşım, hastalığın prognozunun değerlendirilmesi ve relaps riskinin belirlenmesi açısından önemli klinik bilgiler sunmaktadır (Brown & Wittwer, 2000; Perfetto et al., 2004).

Multiparametrik flow sitometri analizlerinde karşılaşılan en önemli teknik sorunlardan biri floresan spektrumlarının birbirleriyle örtüşmesidir. Bir floresan boyanın emisyon spektrumu çoğu zaman yalnızca tek bir dedeksiyon kanalında değil, komşu kanallarda da kısmen algılanabilir. Bu durum sinyal karışmasına neden olarak yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasına yol açabilir. Bu sorunun giderilmesi için kompanzasyon (compensation) adı verilen matematiksel düzeltme işlemi uygulanır. Kompanzasyon işlemi sırasında her floresan boyanın diğer kanallara yaptığı katkı hesaplanarak sinyalden çıkarılır ve böylece gerçek floresan yoğunluğu belirlenir (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Doğru kompanzasyonun uygulanabilmesi için tek renkli kontrol örneklerinin kullanılması gereklidir. Bu kontroller sayesinde her bir

floresan boyanın spektral özellikleri belirlenir ve uygun kompanzasyon matrisi oluşturulur. Yanlış kompanzasyon uygulanması durumunda hücre popülasyonları yanlış konumlanabilir ve multiparametrik analizlerin doğruluğu ciddi şekilde etkilenebilir. Bu nedenle çok renkli flow sitometri çalışmalarında kompanzasyon işlemi dikkatli bir şekilde planlanmalı ve standart analiz protokollerine uygun biçimde gerçekleştirilmelidir (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Son yıllarda multiparametrik flow sitometri verilerinin analizinde gelişmiş biyoinformatik yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. t-SNE, UMAP ve principal component analizi gibi çok boyutlu veri indirgeme teknikleri, yüksek parametrelili veri setlerinin daha anlaşılır biçimde görselleştirilmesine ve hücre popülasyonları arasındaki ilişkilerin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Bu tür yaklaşımlar özellikle immün sistem hücrelerinin kompleks alt gruplarının tanımlanmasında ve tümör mikroçevresinin analizinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (Perfetto et al., 2004).

Multiparametrik analiz, flow sitometrinin sağladığı en önemli teknolojik avantajlardan biridir. Aynı hücre üzerinde çok sayıda biyolojik parametrenin eş zamanlı olarak değerlendirilmesi, hücre popülasyonlarının ayrıntılı şekilde karakterize edilmesini ve kompleks biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasını sağlar. Bu özellik, özellikle hematolojik malignitelerin tanısı, minimal rezidüel hastalık tespiti, immün sistem analizleri ve translasyonel kanser araştırmaları gibi birçok alanda flow sitometrinin vazgeçilmez bir yöntem haline gelmesine katkıda bulunmuştur (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

## **Sonuçların Klinik Korelasyonu**

Flow sitometri analizlerinden elde edilen verilerin doğru şekilde yorumlanabilmesi için laboratuvar bulgularının mutlaka klinik bilgiler ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Flow sitometri,

hücrelerin fiziksel özellikleri, yüzey ve sitoplazmik antijen ekspresyonları ile fonksiyonel parametreleri hakkında ayrıntılı bilgiler sağlayan güçlü bir laboratuvar yöntemidir. Ancak bu veriler tek başına değerlendirildiğinde tanısal açıdan sınırlı kalabilir. Bu nedenle flow sitometri sonuçları hastanın klinik öyküsü, fizik muayene bulguları, diğer laboratuvar testleri, morfolojik incelemeler, sitogenetik analizler ve moleküler tanı yöntemleri ile birlikte yorumlanmalıdır. Klinik korelasyonun sağlanması, doğru tanı konulması ve uygun tedavi stratejisinin belirlenmesi açısından büyük önem taşır (Herzenberg et al., 2006; Shapiro, 2005).

Hematolojik malignitelerin tanısında flow sitometri verilerinin klinik korelasyonu özellikle kritik bir rol oynamaktadır. Lösemi ve lenfoma gibi hastalıklarda immünofenotipik analizler, blast hücrelerinin kökenini belirlemek ve hastalığın alt tipini sınıflandırmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu immünofenotipik bulguların doğru şekilde yorumlanabilmesi için periferik yayma veya kemik iliği aspirasyonunda yapılan morfolojik değerlendirmeler ile birlikte analiz edilmesi gerekir. Ayrıca sitogenetik ve moleküler genetik incelemeler, bazı hematolojik malignitelerin tanısında ve prognostik değerlendirmesinde tamamlayıcı bilgiler sağlamaktadır. Bu multidisipliner yaklaşım sayesinde akut lösemiler, kronik lösemiler ve lenfoproliferatif hastalıklar daha doğru şekilde sınıflandırılabilir ve hastaya özgü tedavi planları oluşturulabilir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Flow sitometri analizlerinin klinik korelasyonu yalnızca malign hastalıklarla sınırlı değildir. İmmünoloji alanında da bu yöntem önemli tanısal bilgiler sunmaktadır. Örneğin primer veya sekonder immün yetmezliklerin değerlendirilmesinde lenfosit alt grup analizleri sıklıkla kullanılmaktadır. T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücre popülasyonlarının sayısal dağılımı, bağışıklık sisteminin fonksiyonel durumunun değerlendirilmesine yardımcı

olur. Ancak bu verilerin klinik olarak anlamlı olabilmesi için hastanın enfeksiyon öyküsü, aile öyküsü, immünooglobulin düzeyleri ve diğer immünolojik test sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi gereklidir. Bu tür kapsamlı bir analiz yaklaşımı, immün yetmezlik sendromlarının doğru tanınmasına ve uygun tedavi stratejilerinin planlanmasına katkı sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Klinik korelasyonun önemli olduğu bir diğer alan ise minimal rezidüel hastalık (MRD) analizleridir. Flow sitometri ile tedavi sonrası kemik iliği veya periferik kanda çok düşük oranlarda bulunan malign hücre popülasyonları tespit edilebilmektedir. MRD düzeyleri, hastalığın tedaviye verdiği yanıtı değerlendirmede ve relaps riskini öngörmeye önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle MRD sonuçları klinik tedavi protokolleri ile birlikte değerlendirilerek hastanın tedavi planında değişiklik yapılmasına veya ek tedavi stratejilerinin uygulanmasına karar verilebilir (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Flow sitometri ayrıca hematopoietik kök hücre nakli sonrası hastaların izleminde de önemli bir rol oynamaktadır. Transplantasyon sonrasında bağışıklık sisteminin yeniden yapılanma süreci olan immün re-konstrüksiyonun değerlendirilmesi, enfeksiyon riskinin belirlenmesi ve graft-versus-host hastalığı gibi komplikasyonların erken tespiti açısından kritik öneme sahiptir. Bu süreçte lenfosit alt grup analizleri, T hücre fonksiyon testleri ve diğer immün fenotipik değerlendirmeler hastanın immünolojik durumunun izlenmesine yardımcı olur. Bu veriler klinik bulgular ve diğer laboratuvar testleri ile birlikte değerlendirilerek hasta yönetimi daha etkin şekilde gerçekleştirilebilir (Brown & Wittwer, 2000; Perfetto et al., 2004).

Bunun yanı sıra son yıllarda geliştirilen immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının etkinliğinin değerlendirilmesinde de

flow sitometri verilerinin klinik korelasyonu büyük önem taşımaktadır. T hücre aktivasyon markerları, düzenleyici T hücre popülasyonları veya immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu gibi parametreler tedaviye verilen immün yanıt hakkında değerli bilgiler sağlayabilir. Bu tür analizler, özellikle kanser immünoterapileri alanında tedavi yanıtının izlenmesi ve potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi açısından önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Flow sitometri verilerinin klinik korelasyonu, laboratuvar bulgularının doğru şekilde yorumlanması ve klinik karar süreçlerine entegre edilmesi açısından kritik bir aşamadır. Elde edilen immünofenotipik verilerin klinik bulgular, morfolojik incelemeler, sitogenetik ve moleküler analizler ile birlikte değerlendirilmesi, tanısal doğruluğu artırmakta ve hastaya özgü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle modern klinik laboratuvar uygulamalarında flow sitometri sonuçlarının multidisipliner bir yaklaşım çerçevesinde yorumlanması büyük önem taşımaktadır (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

### **Kalite Kontrol ve Standardizasyon**

Flow sitometri analizlerinin klinik laboratuvarlarda güvenilir, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlayabilmesi için kalite kontrol ve standardizasyon süreçlerinin sistematik bir şekilde uygulanması gerekmektedir. Flow sitometri, aynı anda çok sayıda hücresel parametrenin ölçülmesine olanak tanıyan ileri düzey bir analiz yöntemi olduğundan, teknik değişkenlere oldukça duyarlıdır. Bu nedenle örnek toplama ve hazırlama aşamasından cihaz kalibrasyonuna, veri analizinden sonuç raporlamaya kadar tüm süreçlerin belirli standartlara uygun şekilde yürütülmesi büyük önem taşımaktadır. Kalite kontrol uygulamaları sayesinde analiz sürecinde

ortaya çıkabilecek teknik hatalar erken aşamada tespit edilebilir ve elde edilen sonuçların doğruluğu ile güvenilirliği artırılabilir (Herzenberg et al., 2006; Shapiro, 2005).

Flow sitometri laboratuvarlarında kalite yönetimi süreci genellikle üç temel bileşenden oluşur: iç kalite kontrol uygulamaları, dış kalite değerlendirme programları ve laboratuvar prosedürlerinin standardizasyonu. İç kalite kontrol uygulamaları, günlük analiz süreçlerinin doğruluğunu ve cihaz performansını izlemeyi amaçlar. Bu kapsamda cihazın lazer stabilitesi, floresan dedektörlerin hassasiyeti ve sıvı akış sisteminin düzgün çalışıp çalışmadığı düzenli olarak kontrol edilir. Kalibrasyon boncukları veya standart referans materyalleri kullanılarak yapılan bu kontroller, cihazın ölçüm hassasiyetinin zaman içinde değişip değişmediğinin değerlendirilmesine yardımcı olur. Böylece cihaz performansındaki olası sapmalar erken dönemde tespit edilerek gerekli düzeltici işlemler uygulanabilir (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Örnek hazırlama sürecinin standardizasyonu da flow sitometri analizlerinde kalite kontrolün önemli bir parçasıdır. Numune toplama koşulları, kullanılan antikor panelleri, inkübasyon süreleri, lizis işlemleri ve yıkama adımları gibi birçok faktör analiz sonuçlarını doğrudan etkileyebilir. Bu nedenle laboratuvarlarda tüm örnek hazırlama aşamalarını kapsayan ayrıntılı standart çalışma prosedürleri (standard operating procedures, SOP) oluşturulmalıdır. Bu prosedürlerin düzenli olarak güncellenmesi ve laboratuvar personelinin bu protokollere uygun şekilde çalışması, analizler arasındaki değişkenliğin azaltılmasına katkı sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Flow sitometri analizlerinde kalite güvencesinin sağlanması açısından dış kalite değerlendirme programlarına katılım da büyük önem taşımaktadır. Dış kalite değerlendirme programları, farklı laboratuvarların aynı örnek üzerinde gerçekleştirdiği analiz

sonuçlarının karşılaştırılmasını sağlar. Bu programlar aracılığıyla laboratuvarların analitik performansı objektif olarak değerlendirilebilir ve olası metodolojik farklılıklar ortaya konulabilir. Uluslararası kalite kontrol organizasyonları tarafından yürütülen bu programlar, laboratuvarların uluslararası standartlara uygun şekilde çalışmasını teşvik eder ve sonuçların laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilirliğini artırır (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Cihaz kalibrasyonu ve bakım işlemleri de flow sitometri kalite kontrol sürecinin önemli bir parçasıdır. Flow sitometri cihazları lazer sistemleri, optik filtreler, dedektörler ve akış sistemleri gibi çok sayıda hassas bileşenden oluşmaktadır. Bu nedenle cihazların düzenli olarak kalibre edilmesi, optik hizalamalarının kontrol edilmesi ve teknik bakım işlemlerinin gerçekleştirilmesi gereklidir. Günlük, haftalık ve aylık bakım programlarının uygulanması, cihaz performansının stabil kalmasına ve ölçüm doğruluğunun korunmasına yardımcı olur (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Veri analizi ve raporlama süreçlerinin standardizasyonu da kalite yönetiminin önemli bileşenlerinden biridir. Flow sitometri analizlerinde kullanılan gating stratejileri, kompanzasyon ayarları ve analiz algoritmaları sonuçların yorumlanmasını doğrudan etkileyebilir. Bu nedenle laboratuvarlar, veri analiz süreçlerini belirli standartlara göre yürütmeli ve kullanılan analiz stratejilerini ayrıntılı şekilde dokümanete etmelidir. Ayrıca raporlanan sonuçların klinisyenler tarafından kolay anlaşılabilir ve klinik karar süreçlerinde kullanılabilir şekilde hazırlanması da önemlidir. Standart raporlama formatlarının kullanılması, laboratuvar verilerinin klinik uygulamalara entegrasyonunu kolaylaştırır (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Flow sitometri laboratuvarlarında kalite yönetimi yalnızca teknik süreçlerle sınırlı değildir; aynı zamanda personel eğitimi ve yeterlilik değerlendirmeleri de kalite sisteminin önemli bir parçasını oluşturur. Laboratuvar personelinin flow sitometri prensipleri, cihaz kullanımı, veri analizi ve kalite kontrol prosedürleri konusunda düzenli eğitimler alması gereklidir. Personel yeterliliğinin düzenli olarak değerlendirilmesi, analiz süreçlerinin doğru şekilde yürütülmesini ve olası insan kaynaklı hataların azaltılmasını sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Perfetto et al., 2004).

Kalite kontrol ve standardizasyon uygulamaları, flow sitometri analizlerinin güvenilirliğini ve klinik geçerliliğini doğrudan etkileyen temel unsurlardır. Örnek hazırlama süreçlerinin standartlaştırılması, cihaz performansının düzenli olarak izlenmesi, dış kalite değerlendirme programlarına katılım ve veri analiz yöntemlerinin standardizasyonu sayesinde laboratuvarlar arasında sonuçların karşılaştırılabilirliği artırılabilir. Bu kapsamlı kalite yönetim yaklaşımı, flow sitometrinin klinik tanı ve araştırma alanlarında güvenilir bir yöntem olarak kullanılmasını desteklemektedir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

### **İç Kalite Kontrol Süreçleri**

İç kalite kontrol (internal quality control, IQC), flow sitometri analizlerinin günlük laboratuvar uygulamalarında doğruluğunu, tutarlılığını ve tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla gerçekleştirilen rutin izleme ve doğrulama işlemlerini kapsar. Flow sitometri çok parametrelili ve teknik olarak hassas bir analiz yöntemi olduğundan, cihaz performansının ve analitik süreçlerin sürekli olarak izlenmesi büyük önem taşır. İç kalite kontrol uygulamaları, analiz sürecinin farklı aşamalarında ortaya çıkabilecek teknik hataların erken dönemde tespit edilmesine olanak tanıyarak elde edilen verilerin güvenilirliğini artırır. Bu süreçler aynı zamanda

laboratuvarın analitik performansının sürekliliğini sağlamaya ve uzun dönemli veri stabilitesini korumaya yardımcı olur (Herzenberg et al., 2006; Shapiro, 2005).

Flow sitometri laboratuvarlarında iç kalite kontrol uygulamalarının önemli bir bileşeni cihaz performansının düzenli olarak değerlendirilmesidir. Flow sitometri cihazları lazer sistemleri, optik filtreler, fotodedektörler ve akışkanik sistemlerden oluşan kompleks analiz platformlarıdır. Bu bileşenlerde meydana gelebilecek küçük değişiklikler bile ölçülen floresan sinyallerinin doğruluğunu etkileyebilir. Bu nedenle cihazın lazer stabilitesi, optik hizalaması, dedektör hassasiyeti ve akış hızının doğruluğu düzenli aralıklarla kontrol edilmelidir. Günlük kalite kontrol testleri sayesinde cihaz performansındaki olası sapmalar erken aşamada belirlenebilir ve gerekli teknik müdahaleler zamanında gerçekleştirilebilir (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

İç kalite kontrol uygulamalarında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri standart partiküller veya floresan kalibrasyon boncukları ile yapılan ölçümlerdir. Bu materyaller, belirli ve sabit floresan özelliklerine sahip referans partiküllerden oluşur ve cihazın ölçüm performansını değerlendirmek amacıyla kullanılır. Kalibrasyon boncukları aracılığıyla lazer uyarımının stabilitesi, floresan dedeksiyon kanallarının hassasiyeti ve sinyal yoğunluğunun zaman içerisindeki değişimi izlenebilir. Bu analizler sayesinde cihazın farklı günlerde gerçekleştirdiği ölçümler arasında oluşabilecek varyasyonlar tespit edilebilir ve ölçüm sonuçlarının standardizasyonu sağlanabilir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

İç kalite kontrol süreçlerinde yalnızca cihaz performansı değil, aynı zamanda örnek hazırlama ve boyama prosedürlerinin doğruluğu da değerlendirilmelidir. Flow sitometri analizlerinde kullanılan monoklonal antikor panellerinin doğru hazırlanması, uygun

konsantrasyonlarda kullanılması ve belirlenen inkübasyon sürelerine uyulması analiz sonuçlarını doğrudan etkileyen faktörler arasındadır. Antikorların yanlış konsantrasyonlarda kullanılması, yetersiz boyama veya aşırı floresan sinyal oluşumu gibi problemlere yol açabilir. Bu nedenle laboratuvarlarda kullanılan antikor panelleri düzenli olarak doğrulanmalı ve boyama protokolleri standart hale getirilmelidir (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Numune toplama ve örnek hazırlama koşulları da iç kalite kontrolün önemli bileşenleri arasında yer almaktadır. Örneklerin uygun antikoagülan içeren tüplerde toplanması, analiz öncesinde belirli sıcaklık koşullarında saklanması ve belirli süreler içinde çalışılması gerekmektedir. Hücrelerin canlılığını koruyacak uygun koşulların sağlanamaması durumunda hücre membran bütünlüğü bozulabilir ve bu durum flow sitometri analizlerinde hatalı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu nedenle örneklerin kabul kriterleri, saklama koşulları ve analiz süreleri laboratuvar prosedürleri içerisinde açık şekilde tanımlanmalıdır (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

İç kalite kontrol uygulamalarının bir diğer önemli yönü veri analiz süreçlerinin izlenmesidir. Flow sitometri verilerinin yorumlanması sırasında kullanılan gating stratejileri, kompanzasyon ayarları ve analiz algoritmaları sonuçların doğruluğunu doğrudan etkileyebilir. Bu nedenle veri analiz süreçlerinin standart protokollere uygun şekilde yürütülmesi ve kullanılan analiz stratejilerinin dokümanite edilmesi gereklidir. Ayrıca belirli aralıklarla gerçekleştirilen iç denetimler ve yeniden analiz çalışmaları, veri analiz sürecinde oluşabilecek hataların tespit edilmesine yardımcı olur (Brown & Wittwer, 2000; Perfetto et al., 2004).

Flow sitometri laboratuvarlarında iç kalite kontrolün sürdürülebilir olması için kalite kontrol verilerinin düzenli olarak kayıt altına alınması ve izlenmesi gerekmektedir. Günlük kalite kontrol

ölçümleri, cihaz performans parametreleri ve analiz sonuçları kalite kontrol kayıt sistemlerinde saklanmalıdır. Bu kayıtlar, uzun dönemli performans değerlendirmesi yapılmasına ve cihazın zaman içindeki stabilitesinin izlenmesine olanak tanır. Ayrıca kalite kontrol verilerinin periyodik olarak değerlendirilmesi, laboratuvarın kalite yönetim sisteminin etkinliğinin artırılmasına katkı sağlar (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Sonuç olarak iç kalite kontrol süreçleri, flow sitometri laboratuvarlarında güvenilir ve standartlaştırılmış analiz sonuçlarının elde edilmesini sağlayan temel uygulamalardır. Cihaz performansının düzenli olarak izlenmesi, kalibrasyon materyallerinin kullanılması, örnek hazırlama protokollerinin standardizasyonu ve veri analiz süreçlerinin denetlenmesi sayesinde analiz sonuçlarının doğruluğu artırılabilir. Bu kapsamlı kalite kontrol yaklaşımı, flow sitometrinin klinik tanı ve araştırma alanlarında güvenilir bir laboratuvar yöntemi olarak kullanılmasını desteklemektedir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

### **Dış Kalite Değerlendirme Programları**

Dış kalite değerlendirme programları (external quality assessment, EQA), klinik laboratuvarların analitik performansını bağımsız kuruluşlar tarafından objektif şekilde değerlendirmek amacıyla yürütülen kalite güvence sistemleridir. Flow sitometri gibi çok parametrelili ve teknik açıdan karmaşık analiz yöntemlerinde, yalnızca laboratuvar içi kalite kontrol uygulamaları yeterli olmayabilir. Bu nedenle laboratuvarların performanslarının bağımsız kuruluşlar tarafından düzenli olarak değerlendirilmesi, elde edilen sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini doğrulamak açısından büyük önem taşımaktadır. Dış kalite değerlendirme programları sayesinde laboratuvarlar, kendi analiz sonuçlarını diğer laboratuvarların sonuçlarıyla karşılaştırma fırsatı bulur ve analitik

performanslarını uluslararası standartlara göre değerlendirebilir (Herzenberg et al., 2006; Shapiro, 2005).

Dış kalite değerlendirme programları genellikle belirli aralıklarla laboratuvarlara gönderilen standart örnekler aracılığıyla yürütülür. Bu rnekler çoğunlukla stabilize edilmiş hücre süspansiyonları, referans materyaller veya önceden karakterize edilmiş biyolojik örneklerden oluşur. Laboratuvarlar bu örnekleri rutin analiz protokollerini kullanarak çalışır ve elde ettikleri sonuçları programı yürüten kalite kontrol kuruluşuna bildirirler. Daha sonra bu sonuçlar referans değerler veya katılımcı laboratuvarların ortalama sonuçları ile karşılaştırılarak her laboratuvarın analitik performansı değerlendirilir. Bu karşılaştırma sayesinde ölçüm doğruluğu, metodolojik tutarlılık ve laboratuvarlar arası varyasyon gibi parametreler analiz edilebilir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Flow sitometri laboratuvarları için dış kalite değerlendirme programları özellikle immünfenotipleme analizleri, lenfosit alt grup sayımları ve hematolojik malignitelerin immünolojik değerlendirilmesi gibi alanlarda büyük önem taşımaktadır. Örneğin T, B ve doğal öldürücü hücre alt popülasyonlarının sayısal analizinde kullanılan yöntemlerin farklı laboratuvarlarda tutarlı sonuçlar vermesi klinik karar süreçleri açısından kritik öneme sahiptir. Dış kalite değerlendirme programları sayesinde kullanılan antikor panelleri, cihaz ayarları ve veri analiz stratejilerinden kaynaklanabilecek farklılıklar belirlenebilir ve gerekli metodolojik düzeltmeler yapılabilir (Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

Bu programların bir diğer önemli amacı laboratuvarlar arasında yöntemsel farklılıkların ortaya konulmasıdır. Flow sitometri analizlerinde kullanılan cihazların teknik özellikleri, lazer konfigürasyonları, floresan dedektörleri ve analiz yazılımları laboratuvardan laboratuvara farklılık gösterebilir. Ayrıca rnek

hazırlama yöntemleri, antikor panelleri ve gating stratejileri gibi analitik süreçlerdeki değişkenlikler de sonuçlar üzerinde etkili olabilir. Dış kalite değerlendirme programları, bu tür farklılıkların analiz edilmesine ve laboratuvarların kendi yöntemlerini optimize etmesine olanak tanır. Bu sayede analiz süreçlerinde standardizasyon sağlanarak sonuçların karşılaştırılabilirliği artırılabilir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Dış kalite değerlendirme sonuçları aynı zamanda laboratuvarların kalite yönetim sistemlerinin etkinliğini değerlendirmede önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Uluslararası laboratuvar akreditasyon standartları kapsamında, klinik laboratuvarların düzenli olarak dış kalite değerlendirme programlarına katılması önerilmektedir. Bu programlara katılım, laboratuvarın analitik performansını sürekli olarak izlediğini ve kalite iyileştirme süreçlerini aktif şekilde uyguladığını gösteren önemli bir göstergedir. Özellikle akreditasyon süreçlerinde dış kalite değerlendirme sonuçları laboratuvar performansının objektif bir kanıtı olarak değerlendirilmektedir (Brown & Wittwer, 2000; Perfetto et al., 2004).

Dış kalite değerlendirme programları yalnızca performans değerlendirmesi sağlamakla kalmaz, aynı zamanda eğitim ve kalite geliştirme açısından da önemli katkılar sunar. Program sonuçlarının analiz edilmesi, laboratuvarların güçlü ve geliştirilmesi gereken yönlerini belirlemelerine yardımcı olur. Performans değerlendirme raporları sayesinde laboratuvarlar analiz süreçlerinde ortaya çıkabilecek sistematik hataları tespit edebilir ve gerekli düzeltici önlemleri planlayabilir. Bu süreç, laboratuvarlarda sürekli kalite iyileştirme kültürünün gelişmesine katkı sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Sonuç olarak dış kalite değerlendirme programları, flow sitometri laboratuvarlarının analitik performansını bağımsız ve objektif şekilde değerlendiren önemli kalite güvence araçlarıdır. Standart

örnekler aracılığıyla gerçekleştirilen karşılaştırmalı analizler, laboratuvarlar arası uyumun artırılmasına ve analiz süreçlerinin standardizasyonuna katkı sağlamaktadır. Ayrıca bu programlara düzenli katılım, laboratuvar akreditasyonu, kalite yönetim sistemlerinin sürdürülebilirliği ve klinik karar süreçlerinde güvenilir veri elde edilmesi açısından kritik bir rol oynamaktadır (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

### **Laboratuvar Standardizasyonu ve Validasyon**

Flow sitometri analizlerinin klinik laboratuvarlarda güvenilir biçimde kullanılabilmesi için standardizasyon ve validasyon süreçlerinin sistematik olarak uygulanması gerekmektedir. Flow sitometri, çok sayıda teknik parametre içeren ve analiz sonuçlarının cihaz özellikleri, kullanılan antikor panelleri, örnek hazırlama yöntemleri ve veri analiz stratejileri gibi birçok faktörden etkilenmediği karmaşık bir laboratuvar yöntemidir. Bu nedenle analizlerin farklı zamanlarda ve farklı laboratuvarlarda benzer sonuçlar verebilmesi için tüm analitik süreçlerin belirli standartlara göre düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır. Standardizasyon ve validasyon uygulamaları, elde edilen verilerin güvenilirliğini artırırken aynı zamanda klinik karar süreçlerinde kullanılan laboratuvar sonuçlarının doğruluğunu destekler (Herzenberg et al., 2006; Shapiro, 2005).

Laboratuvar standardizasyonu, flow sitometri analizlerinde kullanılan yöntemlerin belirli protokollere ve uluslararası kabul görmüş uygulama standartlarına uygun hale getirilmesini ifade eder. Bu süreçte örnek toplama koşulları, örnek hazırlama protokolleri, kullanılan antikor panelleri, boyama yöntemleri, inkübasyon süreleri ve lizis işlemleri gibi tüm pre-analitik ve analitik aşamalar standart hale getirilmelidir. Ayrıca cihaz ayarlarının, lazer konfigürasyonlarının ve floresan dedeksiyon kanallarının da belirli

kriterlere göre optimize edilmesi gerekmektedir. Bu tür standartlaştırılmış prosedürler, analizler arasındaki teknik varyasyonu azaltarak sonuçların tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini artırır (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Flow sitometri laboratuvarlarında standardizasyonun önemli bir bileşeni veri analiz süreçlerinin uyumlaştırılmasıdır. Gating stratejileri, kompanzasyon ayarları ve analiz algoritmaları laboratuvardan laboratuvara farklılık gösterebilir ve bu durum sonuçların yorumlanmasını etkileyebilir. Bu nedenle veri analiz süreçlerinin belirli protokoller doğrultusunda yürütülmesi ve kullanılan analiz yöntemlerinin ayrıntılı şekilde dokümanite edilmesi gereklidir. Standart analiz şablonlarının kullanılması ve analiz sonuçlarının belirli raporlama formatları ile sunulması, klinisyenlerin laboratuvar sonuçlarını daha kolay yorumlamasına yardımcı olur (Brown & Wittwer, 2000; Shapiro, 2005).

Validasyon süreci ise bir analiz yönteminin klinik kullanım için uygunluğunu değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen sistematik testleri kapsar. Bir flow sitometri testinin validasyonu sırasında analiz yönteminin doğruluğu (accuracy), hassasiyeti (precision), tekrarlanabilirliği (reproducibility), analitik duyarlılığı (sensitivity) ve ölçüm sınırları (limit of detection ve limit of quantification) gibi performans parametreleri değerlendirilir. Bu süreç, testin klinik tanı ve hasta izleminde güvenilir şekilde kullanılabileceğini göstermek açısından kritik öneme sahiptir. Validasyon çalışmaları genellikle referans materyaller, bilinen kontrol örnekleri veya daha önce doğrulanmış analiz yöntemleri ile karşılaştırmalı çalışmalar kullanılarak gerçekleştirilir (Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004).

Flow sitometri testlerinin validasyonu özellikle yeni analiz yöntemlerinin laboratuvar uygulamalarına dahil edilmesi sırasında

önem kazanır. Örneğin yeni geliştirilen bir antikor panelinin klinik tanı amacıyla kullanılabilmesi için bu panelin hedef hücre popülasyonlarını doğru şekilde tanımlayabildiğinin gösterilmesi gerekir. Benzer şekilde yeni bir flow sitometri cihazının laboratuvara kurulması durumunda cihazın ölçüm performansı mevcut analiz yöntemleri ile karşılaştırılarak doğrulanmalıdır. Bu tür validasyon çalışmaları, yeni teknolojilerin laboratuvar ortamına güvenli ve doğru şekilde entegre edilmesini sağlar (Brown & Wittwer, 2000; Perfetto et al., 2004).

Uluslararası standartlar ve rehber dokümanlar, flow sitometri laboratuvarlarında kalite yönetimi ve standardizasyon süreçlerinin uygulanması için önemli referanslar sunmaktadır. Klinik laboratuvarlarda kalite yönetim sistemlerinin uygulanması, analiz süreçlerinin izlenebilirliğini ve şeffaflığını artırmaktadır. Ayrıca uluslararası standartlara uyum, farklı laboratuvarlar arasında gerçekleştirilen analizlerin karşılaştırılabilirliğini güçlendirir ve çok merkezli klinik çalışmaların güvenilirliğini destekler (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006).

Laboratuvar standardizasyonu ve validasyon uygulamaları aynı zamanda klinik araştırmalar ve translasyonel tıp alanında da önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle immünoloji ve onkoloji alanında gerçekleştirilen çok merkezli araştırmalarda kullanılan flow sitometri analizlerinin standardize edilmesi, farklı merkezlerden elde edilen verilerin karşılaştırılabilir olmasını sağlar. Bu durum, biyobelirteç keşfi, tedavi yanıtının değerlendirilmesi ve hastalık mekanizmalarının anlaşılması gibi araştırma alanlarında elde edilen verilerin bilimsel güvenilirliğini artırmaktadır (Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

Sonuç olarak laboratuvar standardizasyonu ve validasyon süreçleri, flow sitometri analizlerinin klinik tanı ve araştırma uygulamalarında güvenilir şekilde kullanılabilmesi için temel gerekliliklerdir. Örnek

hazırlama protokollerinin standartlaştırılması, cihaz performansının doğrulanması, veri analiz süreçlerinin uyumlaştırılması ve yeni testlerin sistematik olarak valide edilmesi sayesinde laboratuvar sonuçlarının doğruluğu ve tekrarlanabilirliği artırılabilir. Bu kapsamlı kalite yönetim yaklaşımı, flow sitometrinin modern klinik laboratuvarlarda güvenilir bir tanı ve araştırma yöntemi olarak kullanılmasını desteklemektedir (Brown & Wittwer, 2000; Herzenberg et al., 2006; Perfetto et al., 2004; Shapiro, 2005).

### **Flow Sitometrinin Avantajları ve Sınırlılıkları**

Flow sitometri, hücresel analizlerin hızlı, hassas ve çok parametreliliği biçimde gerçekleştirilebilmesine olanak sağlayan ileri düzey bir laboratuvar teknolojisidir. Bu yöntem sayesinde hücrelerin boyut, granülarite, yüzey ve sitoplazmik antijen ekspresyonu gibi fiziksel ve biyokimyasal özellikleri aynı anda değerlendirilebilir. Tek bir analizde çok sayıda parametrenin ölçülebilmesi, hücre popülasyonlarının ayrıntılı şekilde karakterize edilmesine olanak tanımaktadır. Bu nedenle flow sitometri özellikle hematoloji, immünoloji, onkoloji, transplantasyon tıbbı ve enfeksiyon hastalıkları gibi alanlarda önemli tanısal ve araştırma aracı haline gelmiştir (Kalina et al., 2012; Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Klinik uygulamalarda flow sitometri, hematolojik malignitelerin tanı ve sınıflandırılmasında, immün yetmezliklerin değerlendirilmesinde, minimal rezidüel hastalık analizlerinde ve transplantasyon sonrası immün izlemde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte yöntemin uygulanması teknik uzmanlık, yüksek maliyetli cihazlar ve karmaşık veri analiz süreçleri gerektirdiğinden bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Bu nedenle flow sitometrinin avantajlarının ve sınırlılıklarının doğru şekilde değerlendirilmesi, yöntemin klinik uygulamalarda uygun biçimde

kullanılabilmesi açısından önemlidir (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

### **Flow Sitometrinin Avantajları**

Flow sitometrinin klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedenlerinden biri, aynı hücre üzerinde çok sayıda biyolojik parametrenin eş zamanlı olarak analiz edilebilmesidir. Modern flow sitometri sistemleri birden fazla lazer kaynağı ve çok sayıda floresan dedeksiyon kanalı kullanarak onlarca farklı antijenin aynı anda ölçülmesine olanak tanımaktadır. Bu çok parametrelili analiz kapasitesi, hücresel heterojenitenin ayrıntılı biçimde ortaya konulmasını sağlar ve özellikle kompleks hücre popülasyonlarının incelenmesinde önemli avantajlar sunar. Hematolojik malignitelerin immünofenotipik sınıflandırılması ve minimal rezidüel hastalık analizleri bu teknolojinin klinik açıdan en önemli kullanım alanları arasında yer almaktadır (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Flow sitometrinin bir diğer önemli avantajı analizlerin çok yüksek hızda gerçekleştirilebilmesidir. Flow sitometri cihazları saniyede binlerce hücreyi analiz edebilme kapasitesine sahiptir ve bu sayede kısa sürede geniş hücre popülasyonları değerlendirilebilir. Bu özellik, özellikle klinik tanı süreçlerinde hızlı sonuç elde edilmesini sağlayarak hasta yönetiminde önemli katkılar sunmaktadır. Büyük hücre popülasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde analiz edilebilmesi de yöntemin güvenilirliğini artıran önemli faktörlerden biridir (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Yöntemin yüksek duyarlılığa sahip olması da önemli avantajlarından biridir. Flow sitometri, çok düşük oranlarda bulunan nadir hücre popülasyonlarının tespit edilmesine olanak tanır. Bu özellik özellikle minimal rezidüel hastalık analizlerinde büyük klinik önem taşımaktadır. Tedavi sonrası kemik iliği veya periferik kanda çok düşük sayıda bulunan malign hücrelerin tespit edilmesi, hastalığın

prognozunun değerlendirilmesine ve tedavi stratejilerinin planlanmasına yardımcı olmaktadır (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Flow sitometri ayrıca hücre fonksiyonlarının değerlendirilmesine de olanak sağlayan bir yöntemdir. Hücre yüzey antijenlerinin yanı sıra sitoplazmik proteinler, sitokinler ve hücre içi sinyal molekülleri de analiz edilebilir. Bu sayede hücre aktivasyonu, apoptozis, proliferasyon ve sitokin üretimi gibi birçok biyolojik süreç ayrıntılı şekilde incelenebilir. Bu özellikler flow sitometrinin yalnızca tanısal bir araç değil aynı zamanda güçlü bir araştırma yöntemi olmasını sağlamaktadır (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Bunun yanında flow sitometri hücrelerin canlı olarak analiz edilmesine olanak tanıyan bir yöntemdir. Bu durum, hücre popülasyonlarının fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesine ve canlı hücrelerin belirli özelliklere göre ayrıştırılmasına imkân verir. Özellikle hücre ayırma (cell sorting) teknolojisi ile belirli hücre popülasyonlarının izole edilmesi, immünoloji ve kanser biyolojisi araştırmalarında önemli uygulama alanları bulmuştur (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

### **Flow Sitometrinin Sınırlılıkları**

Flow sitometrinin çok sayıda avantajına rağmen bazı önemli sınırlılıkları da bulunmaktadır. Bu sınırlılıkların başında cihazların yüksek maliyeti ve analizlerde kullanılan reaktiflerin pahalı olması gelmektedir. Flow sitometri cihazları gelişmiş optik sistemler, lazer kaynakları ve hassas dedektörler içeren kompleks teknolojik platformlardır. Ayrıca çok parametrelili analizlerde kullanılan floresan işaretli monoklonal antikor panelleri ve diğer reaktifler de önemli maliyet oluşturabilmektedir. Bu durum, özellikle kaynakları sınırlı olan laboratuvarlarda yöntemin uygulanmasını zorlaştırabilir (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Bir diğerk önemli sınırlılık yöntemin teknik açıdan yüksek düzeyde uzmanlık gerektirmesidir. Flow sitometri analizlerinin doğru şekilde gerçekleştirilebilmesi için örnek hazırlama süreçleri, antikor boyama protokolleri, cihaz ayarları, kompanzasyon işlemleri ve veri analiz stratejilerinin dikkatli şekilde uygulanması gerekir. Bu süreçlerin deneyimsiz personel tarafından yürütülmesi hatalı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir. Özellikle gating stratejilerinin yanlış uygulanması veya kompanzasyon hataları analiz sonuçlarını ciddi şekilde etkileyebilir (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Flow sitometrinin bir diğerk sınırlılığı hücre morfolojisi hakkında doğrudan bilgi sağlamamasıdır. Bu yöntem hücrelerin fiziksel özellikleri ve immüfenotipik özellikleri hakkında ayrıntılı veriler sunabilse de mikroskobik morfoloji hakkında doğrudan bilgi vermez. Bu nedenle hematolojik hastalıkların tanısında flow sitometri bulguları mutlaka periferik yayma veya kemik iliğı aspirasyonunda yapılan morfolojik incelemeler ile birlikte değerlendirilmelidir. Ayrıca sitogenetik ve moleküler analizler de tanısal sürecin tamamlayıcı bileşenleri arasında yer almaktadır (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Çok parametrelili analizlerde karşılaşılan teknik zorluklardan biri de floresan spektrumlarının birbiriyle örtüşmesidir. Birden fazla floresan boyanın aynı analizde kullanılması durumunda spektral örtüşme nedeniyle sinyal karışmaları ortaya çıkabilir. Bu durum kompanzasyon adı verilen matematiksel düzeltme işlemleri ile giderilmeye çalışılır. Ancak kompanzasyon işleminin doğru şekilde uygulanmaması analiz sonuçlarının hatalı yorumlanmasına yol açabilir ve veri analiz sürecinin karmaşıklığını artırabilir (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Flow sitometrinin bir diğerk sınırlılığı örnek kalitesine oldukça duyarlı olmasıdır. Hücre canlılığının düşük olduğu veya örnek hazırlama sürecinde hücre bütünlüğünün bozulduğu durumlarda

analiz sonuçları güvenilir olmayabilir. Ayrıca bazı dokulardan elde edilen hücre süspansiyonlarının hazırlanması teknik açıdan zor olabilir. Bu nedenle uygun örnek toplama, saklama ve hazırlama koşullarının sağlanması büyük önem taşır (Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

Flow sitometri, yüksek hızda ve çok parametrelili hücre analizi imkânı sunan güçlü bir laboratuvar yöntemidir. Hücre fenotipini ayrıntılı biçimde değerlendirilmesine olanak sağlama, nadir hücre popülasyonlarının tespit edilebilmesi ve hücre fonksiyonlarının analiz edilebilmesi gibi özellikleri sayesinde modern klinik laboratuvarlarda önemli bir yer edinmiştir. Bununla birlikte yüksek maliyet, teknik uzmanlık gereksinimi ve veri analizindeki karmaşıklık gibi sınırlılıkları da bulunmaktadır. Bu nedenle flow sitometri sonuçlarının diğer laboratuvar yöntemleri ile birlikte değerlendirilmesi, klinik tanı ve araştırma süreçlerinde daha kapsamlı ve güvenilir sonuçların elde edilmesine katkı sağlamaktadır (Kalina et al., 2012; Robinson et al., 2026; Robinson et al., 2023).

### **Gelecekte Flow Sitometri ve Yeni Teknolojik Gelişmeler**

Flow sitometri teknolojisi son yıllarda önemli teknik ilerlemeler kaydetmiş ve hücre analizi kapasitesini belirgin şekilde artırmıştır. Lazer sistemlerindeki gelişmeler, daha geniş spektrumlu ve yüksek parlaklığa sahip yeni nesil floresan boyaların geliştirilmesi ve gelişmiş veri analiz algoritmalarının kullanılması sayesinde flow sitometri cihazları çok daha fazla sayıda parametreyi aynı hücre üzerinde eş zamanlı olarak ölçebilmektedir. Günümüzde gelişmiş sistemlerde 30'dan fazla parametrenin aynı anda analiz edilebilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu durum, özellikle immün sistem hücrelerinin fonksiyonel heterojenitesinin incelenmesi, nadir hücre popülasyonlarının belirlenmesi ve kompleks hücresel ağların analiz

edilmesi açısından önemli avantajlar sağlamaktadır (Chattopadhyay & Roederer, 2012).

Son yıllarda öne çıkan en önemli yeniliklerden biri spektral flow sitometri teknolojisidir. Geleneksel flow sitometri sistemlerinde her floresan boya belirli bir filtre aracılığıyla ölçülürken, spektral flow sitometri tüm floresan spektrumunu analiz ederek floresan sinyallerinin ayrıştırılmasını sağlar. Bu yaklaşım, floresan spektrumlarının örtüşmesinden kaynaklanan sinyal karışmalarının daha etkin biçimde çözülmesine olanak tanımakta ve daha fazla floresan belirtecin aynı anda kullanılabilmesini mümkün kılmaktadır (Paul Robinson & Rajwa, 2024). Böylece hücresel fenotiplerin daha ayrıntılı şekilde tanımlanması sağlanmaktadır.

Bir diğer önemli gelişme ise kütle sitometrisi (CyTOF – Cytometry by Time of Flight) teknolojisidir. Bu yöntemde floresan boyalar yerine ağır metal izotopları ile işaretlenmiş antikolar kullanılır ve hücreler kütle spektrometrisi prensibi ile analiz edilir. Bu teknik, floresan spektrumlarının çakışması gibi sınırlılıkları ortadan kaldırarak çok daha yüksek parametrelili analizlerin gerçekleştirilmesine olanak tanımaktadır. Kütle sitometrisi özellikle kompleks immün hücre popülasyonlarının analizinde, tümör mikroçevresinin incelenmesinde ve sistem biyolojisi çalışmalarında önemli bir araştırma aracı haline gelmiştir (Spitzer & Nolan, 2016).

Flow sitometri alanındaki bir diğer önemli gelişme yüksek boyutlu veri analizi ve biyoinformatik yöntemlerinin kullanımınıdır. Çok parametrelili analizlerde elde edilen büyük veri setlerinin yorumlanması giderek daha karmaşık hale geldiğinden, gelişmiş istatistiksel algoritmalar ve makine öğrenmesi tabanlı yöntemler veri analizinde önemli rol oynamaktadır. t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding), UMAP (uniform manifold approximation and projection) ve FlowSOM gibi algoritmalar, yüksek boyutlu verilerin görselleştirilmesini ve hücresel alt popülasyonların daha doğru

şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır (Van Gassen et al., 2015). Bu yaklaşımlar, özellikle immün hücre alt gruplarının keşfi ve hastalıkla ilişkili biyobelirteçlerin belirlenmesinde önemli katkılar sunmaktadır.

Gelecekte yapay zekâ ve otomatik veri analiz sistemlerinin flow sitometriye entegrasyonu, analiz süreçlerinin standardizasyonunu ve hızını artıracaktır. Yapay zekâ tabanlı algoritmalar, gating stratejilerinin otomatikleştirilmesi, anormal hücre popülasyonlarının tanımlanması ve klinik karar destek sistemlerinin geliştirilmesi açısından önemli potansiyele sahiptir. Bu tür sistemler, operatör bağımlılığını azaltarak analizlerin daha objektif ve tekrarlanabilir olmasını sağlayabilir (Aghaeepour et al., 2013).

Flow sitometri teknolojisinin gelişimi aynı zamanda tek hücre analiz yöntemleri ile de yakın ilişki içerisinde. Tek hücre genomik ve transkriptomik teknikleri ile flow sitometri verilerinin entegrasyonu, hücresel fonksiyonların daha kapsamlı biçimde anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Bu çoklu omik yaklaşımlar, özellikle tümör biyolojisi, immün yanıt mekanizmaları ve hücresel farklılaşma süreçlerinin araştırılmasında yeni perspektifler sunmaktadır.

Flow sitometri, teknolojik gelişmeler sayesinde giderek daha yüksek çözünürlükte ve daha geniş parametrelili analiz imkânı sunan güçlü bir hücresel analiz platformu haline gelmektedir. Spektral sitometri, kütle sitometrisi, gelişmiş biyoinformatik analiz yöntemleri ve yapay zekâ destekli veri yorumlama sistemleri, bu teknolojinin hem araştırma hem de klinik uygulamalardaki önemini artırmaktadır. Bu gelişmeler doğrultusunda flow sitometri, özellikle hematolojik maligniteler, immünolojik hastalıklar, transplantasyon izlem süreçleri ve kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında gelecekte daha da merkezi bir rol üstlenecektir.

## **Yüksek Parametrelili Flow Sitometri**

Yüksek parametrelili flow sitometri, son yıllarda gelişen optik sistemler, lazer teknolojileri ve yeni nesil floresan boya kullanımı sayesinde önemli ölçüde ilerleme göstermiştir. Geleneksel flow sitometri sistemlerinde genellikle 4–8 floresan parametresi aynı anda analiz edilebilirken, günümüzde geliştirilen modern cihazlar çok daha fazla sayıda parametrenin eş zamanlı olarak ölçülmesine olanak tanımaktadır. Güncel çok lazerli sistemlerde 20’den fazla parametre rutin olarak analiz edilebilmekte, bazı ileri araştırma platformlarında ise 40’ın üzerinde belirtecin aynı hücre üzerinde değerlendirilmesi mümkün hale gelmiştir (Maecker et al., 2012; Perfetto et al., 2004).

Yüksek parametrelili analizlerin temel avantajı, hücre popülasyonlarının fenotipik ve fonksiyonel özelliklerinin çok daha ayrıntılı şekilde ortaya konulabilmesidir. Çok sayıda yüzey ve sitoplazmik belirtecin aynı anda analiz edilmesi sayesinde hücre alt popülasyonları daha hassas biçimde tanımlanabilmekte ve hücre heterojenite daha kapsamlı şekilde incelenebilmektedir. Bu durum özellikle bağışıklık sisteminin karmaşık yapısının anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. İmmünoloji alanında yapılan çalışmalarda T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve dendritik hücreler gibi ana hücre gruplarının yanı sıra bu hücrelerin çok sayıda fonksiyonel alt grubunun da ayrıntılı biçimde analiz edilmesi mümkün hale gelmiştir (Chattopadhyay et al., 2014; Maecker et al., 2012).

Yüksek parametrelili flow sitometri, özellikle nadir hücre popülasyonlarının tanımlanmasında önemli avantajlar sağlamaktadır. Geleneksel analiz yöntemlerinde tespit edilmesi güç olan düşük frekanslı hücre alt grupları, çok sayıda belirtecin birlikte değerlendirilmesi sayesinde daha güvenilir biçimde belirlenebilmektedir. Bu durum, immün sistemin fizyolojik düzenlenmesinin anlaşılması kadar patolojik süreçlerin

incelenmesinde de büyük önem taşımaktadır (Chattopadhyay et al., 2014).

Hematolojik malignitelerde yüksek parametrelili flow sitometri kullanımı, hastalıkların immünofenotipik sınıflandırılmasında önemli katkılar sağlamaktadır. Akut lösemiler, kronik lenfoproliferatif hastalıklar ve plazma hücre hastalıkları gibi malignitelerde çok sayıda immünofenotipik belirtecin aynı anda değerlendirilmesi sayesinde malign hücre popülasyonları daha doğru şekilde tanımlanabilmektedir. Ayrıca bu yaklaşım, normal ve malign hücre popülasyonlarının ayrımını kolaylaştırarak tanısal doğruluğu artırmaktadır (van Dongen et al., 2012).

Minimal rezidüel hastalık (MRD) analizleri de yüksek parametrelili flow sitometrinin önemli kullanım alanlarından biridir. Çok sayıda belirtecin aynı anda değerlendirilmesi, tedavi sonrası çok düşük düzeylerde bulunan rezidüel malign hücrelerin saptanmasını mümkün kılmaktadır. Günümüzde gelişmiş çok parametrelili flow sitometri yöntemleri ile  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  düzeyinde hücre popülasyonlarının tespit edilebildiği bildirilmektedir. Bu yüksek duyarlılık, özellikle akut lösemiler ve multipl miyelom gibi hastalıklarda tedavi yanıtının değerlendirilmesi ve prognozun belirlenmesi açısından önemli klinik bilgiler sağlamaktadır (Wood, 2016).

Yüksek parametrelili analizlerin yaygınlaşmasıyla birlikte veri analizi süreçleri de daha karmaşık hale gelmiştir. Çok sayıda parametrenin değerlendirilmesi sonucunda yüksek boyutlu veri setleri oluşmakta ve bu verilerin doğru şekilde yorumlanabilmesi için gelişmiş biyoinformatik yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle t-SNE, UMAP ve FlowSOM gibi gelişmiş veri analiz algoritmaları, yüksek parametrelili flow sitometri verilerinin görselleştirilmesi ve hücresel alt popülasyonların tanımlanmasında giderek daha yaygın biçimde kullanılmaktadır (Van Gassen et al., 2015).

Yüksek parametrelili flow sitometri, hüresel fenotiplerin daha ayrıntılı şekilde incelenmesini sağlayan ileri bir analiz yaklaşımdır. Bu teknoloji sayesinde immün sistem hücrelerinin fonksiyonel çeşitliliği daha kapsamlı biçimde ortaya konulabilmekte, hematolojik malignitelerin daha hassas sınıflandırılması mümkün olmakta ve minimal rezidüel hastalık analizlerinde daha yüksek duyarlılık elde edilmektedir. Bu özellikler, yüksek parametrelili flow sitometrinin hem temel araştırmalarda hem de klinik uygulamalarda giderek daha önemli bir rol üstlenmesini sağlamaktadır.

### **Spektral Flow Sitometri**

Spektral flow sitometri, floresan sinyallerin yalnızca belirli dalga boyu aralıklarında ölçülmesi yerine tüm emisyon spektrumunun analiz edilmesine dayanan gelişmiş bir sitometrik teknolojidir. Geleneksel flow sitometri sistemlerinde her floresan boya belirli optik filtreler aracılığıyla ölçülür ve farklı floresan boyalar arasındaki spektral örtüşme kompanzasyon işlemleri ile düzeltilir. Buna karşılık spektral flow sitometri, floresan boyaların tüm spektral imzasını kaydederek bu sinyalleri matematiksel ayrıştırma algoritmaları ile analiz eder. Bu yaklaşım, farklı floresan boyalar arasındaki spektral örtüşmenin daha doğru şekilde çözülmesine olanak tanımaktadır (Paul Robinson & Rajwa, 2024).

Spektral flow sitometri sistemlerinde, floresan sinyaller çok sayıda dedektör tarafından geniş bir dalga boyu aralığında ölçülür ve her floresan boya kendine özgü spektral bir “parmak izi” ile tanımlanır. Analiz sırasında elde edilen toplam spektral sinyal, referans spektrumlar kullanılarak ayrıştırılır ve böylece her floresan boyanın katkısı matematiksel olarak belirlenir. Bu süreç spektral ayrıştırma (spectral unmixing) olarak adlandırılmaktadır ve geleneksel kompanzasyon yöntemlerine göre daha hassas sonuçlar sağlayabilmektedir (Astakhova et al., 2025).

Bu teknolojinin en önemli avantajlarından biri, çok sayıda floresan boyanın aynı anda kullanılmasına olanak tanınmasıdır. Geleneksel sistemlerde floresan spektrumlarının örtüşmesi analiz kapasitesini sınırlayabilmektedir. Spektral flow sitometri ise spektral ayrıştırma algoritmaları sayesinde birbirine oldukça yakın spektral özelliklere sahip floresan boya bile ayırt edebilme kapasitesine sahiptir. Bu durum, çok renkli antikör panellerinin daha etkin şekilde kullanılmasını ve çok parametrelili analizlerin genişletilmesini mümkün kılmaktadır (Perfetto et al., 2004).

Spektral flow sitometri özellikle yüksek parametrelili immünofenotipler çalışmaları önemli avantajlar sunmaktadır. Bu yöntem sayesinde bağışıklık sistemi hücrelerinin çok sayıda yüzey ve sitoplazmik belirteci aynı anda analiz edilebilmekte ve hücre heterojenite daha ayrıntılı şekilde ortaya konulabilmektedir. İmmünojenetik araştırmalarında T hücre alt popülasyonlarının fonksiyonel farklılıklarının belirlenmesi, dendritik hücre alt gruplarının tanımlanması ve doğal öldürücü hücrelerin fenotipik çeşitliliğinin incelenmesi gibi birçok çalışmada spektral flow sitometri etkin şekilde kullanılmaktadır (Maecker et al., 2012).

Klinik uygulamalarda da spektral flow sitometri giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Özellikle hematolojik malignitelerin immünofenotipik sınıflandırılmasında çok sayıda belirtecin aynı anda değerlendirilmesi tanısal doğruluğu artırmaktadır. Bunun yanı sıra minimal rezidüel hastalık analizlerinde daha hassas tespit sınırlarına ulaşılmasına katkı sağlayabilmektedir. Çok parametrelili veri elde edilmesi, malign hücre popülasyonlarının normal hücrelerden daha güvenilir şekilde ayrılmasını mümkün kılmaktadır (Wood, 2016).

Spektral flow sitometri aynı zamanda oto-flöresansın ayrıştırılabilmesi açısından da önemli avantajlar sunmaktadır. Bazı hücre tiplerinde veya biyolojik örneklerde yüksek oto-flöresans bulunması analiz doğruluğunu olumsuz etkileyebilmektedir.

Spektral analiz yöntemleri, oto-flöresansın spektral özelliklerini tanımlayarak bu sinyalin diğer floresan sinyallerden ayrıştırılmasını sağlayabilmektedir. Bu özellik özellikle doku örnekleri veya kompleks biyolojik materyaller üzerinde yapılan analizlerde önemli bir avantaj sağlamaktadır (Astakhova et al., 2025; Perfetto et al., 2004).

Bununla birlikte spektral flow sitometri teknolojisinin uygulanması bazı teknik gereksinimler de içermektedir. Geniş spektral veri setlerinin elde edilmesi, gelişmiş veri analiz yazılımlarının kullanılmasını gerektirir. Ayrıca spektral referans kütüphanelerinin doğru şekilde oluşturulması ve antikör panellerinin dikkatli biçimde tasarlanması analiz doğruluğu açısından kritik öneme sahiptir (Maecker et al., 2012).

Spektral flow sitometri, çok parametrelili hücre analizi kapasitesini önemli ölçüde artıran yenilikçi bir teknolojidir. Floresan sinyallerin tüm spektrumunun analizi sayesinde daha fazla floresan belirtecin aynı anda kullanılabilmesi mümkün olmakta ve hücre fenotipleri daha ayrıntılı düzeyde gerçekleştirilebilmektedir. Bu özellikler spektral flow sitometrinin özellikle immünoloji araştırmaları, hematolojik malignitelerin tanısı ve minimal rezidüel hastalık analizleri gibi alanlarda giderek daha geniş kullanım bulmasını sağlamaktadır.

### **Klinik Laboratuvarlarda Yapay Zekâ Destekli Analizler**

Flow sitometri analizlerinde elde edilen veri miktarı oldukça yüksek olup, özellikle çok parametrelili analizlerde ortaya çıkan yüksek boyutlu veri setlerinin yorumlanması zaman alıcı ve karmaşık bir süreç haline gelebilmektedir. Modern flow sitometri sistemleri aynı hücre üzerinde onlarca parametreyi eş zamanlı olarak ölçebildiğinden, elde edilen veri setleri milyonlarca hücreye ait çok sayıda değişken içerebilmektedir. Bu nedenle son yıllarda yapay zekâ ve makine öğrenmesi tabanlı analiz yöntemleri, flow sitometri

verilerinin değerlendirilmesinde giderek daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Aghaeepour et al., 2013).

Yapay zekâ algoritmaları, büyük ve karmaşık veri setlerini hızlı şekilde analiz edebilme kapasitesine sahiptir. Bu algoritmalar hücre popülasyonlarının dağılımını istatistiksel ve matematiksel modeller kullanarak inceleyebilir ve farklı hücre alt gruplarını otomatik olarak tanımlayabilir. Özellikle çok parametrelili analizlerde ortaya çıkan yüksek boyutlu veri yapılarının görselleştirilmesi ve sınıflandırılması açısından makine öğrenmesi teknikleri önemli avantajlar sağlamaktadır (Van Gassen et al., 2015).

Flow sitometri veri analizinde kullanılan yapay zekâ tabanlı yaklaşımlar arasında denetimli (supervised) ve denetimsiz (unsupervised) öğrenme algoritmaları yer almaktadır. Denetimli öğrenme yöntemlerinde algoritma, önceden etiketlenmiş veri setleri kullanılarak eğitilir ve belirli hücre popülasyonlarını tanımlamak üzere optimize edilir. Denetimsiz öğrenme yöntemlerinde ise algoritma, veri seti içerisindeki doğal örüntüleri ve benzerlikleri analiz ederek hücre popülasyonlarını otomatik olarak sınıflandırır. Bu yaklaşımlar özellikle daha önce tanımlanmamış hücresel alt popülasyonların keşfedilmesinde önemli katkılar sağlamaktadır (Saeys et al., 2016).

Yapay zekâ destekli sistemlerin en önemli kullanım alanlarından biri gating stratejilerinin otomatikleştirilmesidir. Geleneksel flow sitometri analizlerinde gating işlemi çoğunlukla deneyimli laboratuvar uzmanları tarafından manuel olarak gerçekleştirilmektedir. Ancak manuel gating işlemleri operatöre bağlı farklılıklar gösterebilir ve büyük veri setlerinin analizinde zaman alıcı olabilir. Yapay zekâ tabanlı algoritmalar ise gating süreçlerini otomatik hale getirerek analiz süresini kısaltabilir ve operatör bağımlılığını azaltabilir (Qian et al., 2010).

Bunun yanı sıra yapay zekâ algoritmaları nadir hücre popülasyonlarının tespiti açısından da önemli avantajlar sunmaktadır. Minimal rezidüel hastalık analizleri gibi durumlarda çok düşük frekansta bulunan hücre popülasyonlarının doğru şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Makine öğrenmesi algoritmaları, yüksek boyutlu veri setlerinde nadir hücre popülasyonlarını daha hassas biçimde tespit edebilmekte ve bu sayede tanısallık duyarlılığı artırabilmektedir (Diggins et al., 2015; Van Gassen et al., 2015).

Yapay zekâ destekli analiz yöntemleri ayrıca hastalıkla ilişkili hücre patenlerinin belirlenmesi açısından da önemli bir potansiyele sahiptir. Büyük veri setlerinin analiz edilmesi sayesinde belirli hastalıklarla ilişkili immünotipik imzalar tanımlanabilir. Bu yaklaşım, özellikle hematolojik malignitelerin tanısında, immünojenik hastalıkların sınıflandırılmasında ve tedaviye verilen yanıtın değerlendirilmesinde klinik karar destek sistemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir (Aghaeepour et al., 2013; Saeys et al., 2016).

Klinik laboratuvar uygulamalarında yapay zekâ tabanlı analiz sistemleri, veri yorumlama süreçlerinin standardizasyonuna da önemli katkılar sunabilir. Farklı laboratuvarlar arasında kullanılan analiz stratejileri ve yorumlama yöntemleri zaman zaman değişkenlik gösterebilmektedir. Yapay zekâ destekli analiz platformlarının kullanılması, veri analiz süreçlerinin daha objektif ve tekrarlanabilir şekilde gerçekleştirilmesini sağlayarak sonuçların laboratuvarlar arasında daha karşılaştırılabilir hale gelmesine yardımcı olabilir (Qian et al., 2010).

Bununla birlikte yapay zekâ sistemlerinin klinik laboratuvarlarda rutin kullanımına geçiş sürecinde bazı zorluklar da bulunmaktadır. Bu sistemlerin güvenilir şekilde kullanılabilmesi için geniş ve iyi tanımlanmış veri setleri ile eğitilmeleri gerekmektedir. Ayrıca

algoritmaların klinik doğruluğunun ve güvenilirliğinin bağımsız çalışmalarla doğrulanması büyük önem taşımaktadır. Veri güvenliği, etik konular ve düzenleyici gereklilikler de bu teknolojilerin klinik uygulamalara entegrasyonunda dikkate alınması gereken önemli faktörler arasında yer almaktadır (Diggins et al., 2015).

Yapay zekâ ve makine öğrenmesi tabanlı analiz yöntemleri, flow sitometri verilerinin değerlendirilmesinde giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Otomatik gating sistemleri, yüksek boyutlu veri analiz algoritmaları ve klinik karar destek sistemleri sayesinde analiz süreçlerinin hızlandırılması, standardizasyonunun sağlanması ve tanısal doğruluğun artırılması mümkün hale gelmektedir. Gelecekte yapay zekâ tabanlı sistemlerin flow sitometri laboratuvarlarında daha yaygın şekilde kullanılacağı ve klinik tanı süreçlerinde önemli katkılar sağlayacağı öngörülmektedir.

## **Sonuç**

Flow sitometri, hücresel analizlerin gerçekleştirilmesinde yüksek duyarlılık, hız ve çok parametreliliğiyle değerlendirme imkânı sunan güçlü bir laboratuvar teknolojisidir. Hücrelerin fiziksel özelliklerinin yanı sıra yüzey ve sitoplazmik antijen ekspresyonlarının aynı anda analiz edilebilmesi, bu yöntemin klinik tanı ve biyomedikal araştırmalarda geniş kullanım alanı bulmasını sağlamıştır. Günümüzde flow sitometri; hematolojik malignitelerin tanısı ve sınıflandırılması, immün yetmezliklerin değerlendirilmesi, transplantasyon sonrası immün yeniden yapılanmanın izlenmesi ve immün yanıt mekanizmalarının araştırılması gibi birçok klinik ve araştırma alanında vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir.

Modern flow sitometri teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte analiz kapasitesi önemli ölçüde artmış ve aynı hücre üzerinde çok sayıda biyolojik parametrenin eş zamanlı olarak değerlendirilmesi mümkün hale gelmiştir. Çok lazerli sistemler, gelişmiş floresan boyalar ve yüksek parametreliliğiyle analiz platformları sayesinde hücresel

heterojenite çok daha ayrıntılı şekilde incelenebilmektedir. Bu gelişmeler özellikle immünofenotipleme çalışmalarında, nadir hücre popülasyonlarının tanımlanmasında ve kompleks immün hücre ağlarının analizinde önemli avantajlar sağlamaktadır.

Flow sitometri aynı zamanda minimal rezidüel hastalık (MRD) analizlerinde yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem olarak klinik uygulamalarda önemli yer tutmaktadır. Özellikle akut lösemiler ve diğer hematolojik malignitelere tedavi sonrası çok düşük düzeylerde bulunan rezidüel malign hücrelerin tespit edilmesi, hastalık prognozunun belirlenmesi ve tedavi stratejilerinin planlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Çok parametrelili immünofenotipleme yaklaşımları sayesinde malign hücre popülasyonlarının normal hematopoietik hücrelerden daha hassas şekilde ayrılması mümkün hale gelmiştir.

Bununla birlikte flow sitometri analizlerinin güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar verebilmesi için laboratuvar süreçlerinin dikkatli şekilde yönetilmesi gerekmektedir. Örnek toplama ve hazırlama aşamalarının uygun şekilde gerçekleştirilmesi, antikor panellerinin doğru biçimde tasarlanması, cihaz kalibrasyonunun düzenli olarak yapılması ve kalite kontrol süreçlerinin titizlikle uygulanması analiz doğruluğu açısından kritik öneme sahiptir. Ayrıca veri yorumlama sürecinin deneyimli laboratuvar uzmanları tarafından gerçekleştirilmesi, elde edilen sonuçların klinik bilgilerle doğru şekilde ilişkilendirilmesini sağlar.

Flow sitometri alanındaki teknolojik gelişmeler bu yöntemin gelecekteki potansiyelini daha da artırmaktadır. Yüksek parametrelili analiz sistemleri, spektral flow sitometri platformları ve kütle sitometrisi gibi yeni teknolojiler, hücresel analiz kapasitesini önemli ölçüde genişletmektedir. Bunun yanı sıra yapay zekâ ve makine öğrenmesi tabanlı veri analiz yöntemlerinin geliştirilmesi, çok boyutlu veri setlerinin daha hızlı ve doğru şekilde yorumlanmasına

olanak sağlamaktadır. Bu gelişmeler, özellikle kompleks immünojenik süreçlerin anlaşılması ve hastalıkla ilişkili hücresele biyobelirteçlerin tanımlanması açısından yeni fırsatlar sunmaktadır.

Gelecekte flow sitometri teknolojisinin genomik, transkriptomik ve proteomik gibi diğer tek hücre analiz yöntemleri ile entegrasyonu, hücresele biyolojinin daha kapsamlı biçimde anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu çok disiplinli yaklaşımlar sayesinde hastalıkların moleküler mekanizmaları daha ayrıntılı şekilde ortaya konulabilecek ve kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarının geliştirilmesinde yeni stratejiler oluşturulabilecektir.

Sonuç olarak flow sitometri, hücresele analizlerde yüksek doğruluk ve çok parametrelili değerlendirme kapasitesi sunan ileri bir laboratuvar yöntemidir. Teknolojik gelişmeler ve gelişmiş veri analiz yaklaşımlarının entegrasyonu ile birlikte bu yöntemin klinik tanı, tedavi takibi ve biyomedikal araştırmalardaki önemi giderek artmaktadır. Flow sitometri, modern tıpta hücresele düzeyde tanısal ve araştırma odaklı çalışmaların temel araçlarından biri olmaya devam edecektir.

## **Kaynaklar**

- Abraham, R. S., & Aubert, G. (2016). Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies. *Clin Vaccine Immunol*, 23(4), 254-271. <https://doi.org/10.1128/CVI.00001-16>
- Aghaeepour, N., Finak, G., Flow, C. A. P. C., Consortium, D., Hoos, H., Mosmann, T. R.,...Scheuermann, R. H. (2013). Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat Methods*, 10(3), 228-238. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2365>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of

- tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Alvarez Flores, M. B., Sopena Corvinos, M., Guillen Santos, R., & Cava Valenciano, F. (2024). High-Sensitivity Flow Cytometry for the Reliable Detection of Measurable Residual Disease in Hematological Malignancies in Clinical Laboratories. *Diseases*, 12(12).  
<https://doi.org/10.3390/diseases12120338>
- Astakhova, E. A., Gubaeva, A. S., Naumova, D. A., Egorova, A. E., Maznina, A. A., Rybkina, I. G.,...Volchkov, P. Y. (2025). Spectral Flow Cytometry: The Current State and Future of the Technology. *Int J Mol Sci*, 26(12).  
<https://doi.org/10.3390/ijms26125911>
- Bajgelman, M. C. (2019). Principles and applications of flow cytometry. In *Data processing handbook for complex biological data sources* (pp. 119-124). Elsevier.
- Bonilla, D. L., Reinin, G., & Chua, E. (2020). Full Spectrum Flow Cytometry as a Powerful Technology for Cancer Immunotherapy Research. *Front Mol Biosci*, 7, 612801.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.612801>
- Brestoff, J. R. (2023). Full spectrum flow cytometry in the clinical laboratory. *International journal of laboratory hematology*, 45, 44-49.
- Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*, 46(8 Pt 2), 1221-1229.
- Cabral-Marques, O., Schimke, L. F., de Oliveira, E. B., Jr., El Khawanky, N., Ramos, R. N., Al-Ramadi, B. K.,...Condino-Neto, A. (2019). Flow Cytometry Contributions for the Diagnosis and Immunopathological Characterization of Primary Immunodeficiency Diseases With Immune

- Dysregulation. *Front Immunol*, 10, 2742.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02742>
- Chapel, H., Lucas, M., Lee, M., Bjorkander, J., Webster, D., Grimbacher, B.,...Hammarstrom, L. (2008). Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*, 112(2), 277-286.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-124545>
- Chatterjee, T., Mallhi, R. S., & Venkatesan, S. (2016). Minimal residual disease detection using flow cytometry: Applications in acute leukemia. *Med J Armed Forces India*, 72(2), 152-156. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2016.02.002>
- Chattopadhyay, P. K., Gierahn, T. M., Roederer, M., & Love, J. C. (2014). Single-cell technologies for monitoring immune systems. *Nat Immunol*, 15(2), 128-135.  
<https://doi.org/10.1038/ni.2796>
- Chattopadhyay, P. K., & Roederer, M. (2012). Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods*, 57(3), 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.02.009>
- Chianese, R., Brando, B., Gratama, J. W., & European Working Group on Clinical Cell, A. (2002). Diagnostic and prognostic value of flow cytometric immunophenotyping in malignant hematological diseases. *J Biol Regul Homeost Agents*, 16(4), 259-269.
- Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Abrignani, S., Addo, R., Akdis, M.,...Yang, J. (2021). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol*, 51(12), 2708-3145.  
<https://doi.org/10.1002/eji.202170126>
- Czechowska, K., Bonilla, D. L., Cotty, A., Dankar, A., Mead, P. E., & Nash, V. (2025). Beyond the Limits: How Is Spectral Flow Cytometry Reshaping the Clinical Landscape and What Is Coming Next? *Cells*, 14(13).  
<https://doi.org/10.3390/cells14130997>

- Dar, A., & Seegmiller, A. C. (2026). An evidence-based ordering algorithm for appropriate utilization of peripheral blood flow cytometry for hematologic neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 165(2). <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaf152>
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., & Smolewski, P. (2001). Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*, 38(2), 179-193. [https://doi.org/10.1016/s0037-1963\(01\)90051-4](https://doi.org/10.1016/s0037-1963(01)90051-4)
- Darzynkiewicz, Z., Halicka, H. D., & Zhao, H. (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Adv Exp Med Biol*, 676, 137-147. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6199-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6199-0_9)
- Diggins, K. E., Ferrell, P. B., Jr., & Irish, J. M. (2015). Methods for discovery and characterization of cell subsets in high dimensional mass cytometry data. *Methods*, 82, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.008>
- Drouet, M., & Lees, O. (1993). Clinical applications of flow cytometry in hematology and immunology. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 73-78.
- Gajzer, D. C., & Fromm, J. R. (2025). Flow Cytometry for B-Cell Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphomas. *Cancers (Basel)*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/cancers17050814>
- Gao, J., Luo, Y., Li, H., Zhao, Y., Zhao, J., Han, X.,...Qian, F. (2023). Deep Immunophenotyping of Human Whole Blood by Standardized Multi-parametric Flow Cytometry Analyses. *Phenomics*, 3(3), 309-328. <https://doi.org/10.1007/s43657-022-00092-9>
- Ge, P., Liu, C., Chan, L., Pang, Y., Li, H., Zhang, Q.,...Zhao, J. (2022). High-Dimensional Immune Profiling by Mass Cytometry Revealed the Circulating Immune Cell Landscape in Patients With Intracranial Aneurysm. *Front Immunol*, 13, 922000. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.922000>

- Grammer, A. C., Fischer, R., Lee, O., Zhang, X., & Lipsky, P. E. (2004). Flow cytometric assessment of the signaling status of human B lymphocytes from normal and autoimmune individuals. *Arthritis Res Ther*, 6(1), 28-38. <https://doi.org/10.1186/ar1155>
- Gratzner, H. G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218(4571), 474-475. <https://doi.org/10.1126/science.7123245>
- Health Quality, O. (2016). Minimal Residual Disease Evaluation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Clinical Evidence Review. *Ont Health Technol Assess Ser*, 16(7), 1-52.
- Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., & Parks, D. R. (2006). Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol*, 7(7), 681-685. <https://doi.org/10.1038/ni0706-681>
- Holl, E., Kapinsky, M., & Larbi, A. (2025). An Update on Flow Cytometry Analysis of Hematological Malignancies: Focus on Standardization. *Cancers (Basel)*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/cancers17122045>
- Jelic, T. M., Estalilla, O. C., Vos, J. A., Harvey, G., Stricker, C. J., Adelanwa, A. O.,...Plata, M. J. (2023). Flow Cytometric Enumeration of Peripheral Blood CD34(+) Cells Predicts Bone Marrow Pathology in Patients with Less Than 1% Blasts by Manual Count. *J Blood Med*, 14, 519-535. <https://doi.org/10.2147/JBM.S417432>
- Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V. H., Martin-Ayuso, M., Bottcher, S., Ritgen, M.,...EuroFlow, C. (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26(9), 1986-2010. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>

- Kanegane, H., Hoshino, A., Okano, T., Yasumi, T., Wada, T., Takada, H.,...Morio, T. (2018). Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergol Int*, 67(1), 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.06.003>
- Kestens, L., & Mandy, F. (2017). Thirty-five years of CD4 T-cell counting in HIV infection: From flow cytometry in the lab to point-of-care testing in the field. *Cytometry B Clin Cytom*, 92(6), 437-444. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21400>
- Kruse, A., Abdel-Azim, N., Kim, H. N., Ruan, Y., Phan, V., Ogana, H.,...Kim, Y. M. (2020). Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031054>
- Lachowicz, C. A., Heiblig, M., Aspas Requena, G., Tavernier-Tardy, E., Dai, F., Ashango, A. B.,...Pollyea, D. A. (2025). Genetic and Phenotypic Correlates of Clinical Outcomes with Venetoclax in Acute Myeloid Leukemia: The GEN-PHEN-VEN Study. *Blood Cancer Discov*, 6(5), 437-449. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-24-0256>
- Liu, X., Wang, C., & Guan, X. (2026). Technologic advances in flow cytometry. *Clin Chim Acta*, 578, 120567. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120567>
- Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*, 12(3), 191-200. <https://doi.org/10.1038/nri3158>
- McBride, J. A., & Striker, R. (2017). Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLoS Pathog*, 13(11), e1006624. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006624>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5 1 1-5 1 11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>

- McWilliam, O., Sellebjerg, F., Marquart, H. V., & von Essen, M. R. (2018). B cells from patients with multiple sclerosis have a pathogenic phenotype and increased LTalpha and TGFbeta1 response. *J Neuroimmunol*, 324, 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.09.001>
- Nery, A. A., Nascimento, I. C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J. E., & Ulrich, H. (2013). Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A*, 83(1), 48-61. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22205>
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*, 81(4), 1133-1143. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- Orru, V., Steri, M., Cucca, F., & Fiorillo, E. (2021). Application of Genetic Studies to Flow Cytometry Data and Its Impact on Therapeutic Intervention for Autoimmune Disease. *Front Immunol*, 12, 714461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.714461>
- Ortolani, C. (2021). *Flow cytometry of hematological malignancies*. John Wiley & Sons.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252-264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Paul Robinson, J., & Rajwa, B. (2024). Spectral flow cytometry: Fundamentals and future impact. *Methods Cell Biol*, 186, 311-332. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2024.02.022>
- Pei, X. Y., & Huang, X. J. (2024). The role of immune reconstitution in relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Clin Immunol*, 20(5), 513-524. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2023.2299728>
- Perfetto, S. P., Chattopadhyay, P. K., & Roederer, M. (2004). Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune

- system. *Nat Rev Immunol*, 4(8), 648-655.  
<https://doi.org/10.1038/nri1416>
- Picard, C., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J. L., Chatila, T., Conley, M. E.,...Gaspar, H. B. (2015). Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*, 35(8), 696-726.  
<https://doi.org/10.1007/s10875-015-0201-1>
- Promsuwicha, O., Owattanapanich, W., Kankhaw, S., Ruchutrakool, T., & Kungwankiattichai, S. (2025). Can Flow Cytometry Immunophenotyping Predict Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia? A Focus on Myelodysplasia-Related Cytogenetic Abnormalities. *Int J Lab Hematol*, 47(6), 1099-1106. <https://doi.org/10.1111/ijlh.14546>
- Qian, Y., Wei, C., Eun-Hyung Lee, F., Campbell, J., Halliley, J., Lee, J. A.,...Scheuermann, R. H. (2010). Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry B Clin Cytom*, 78 Suppl 1(Suppl 1), S69-82.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.b.20554>
- Rieger, A. M. (2022). Flow Cytometry and Cell Cycle Analysis: An Overview. *Methods Mol Biol*, 2579, 47-57.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_4)
- Riva, G., Nasillo, V., Ottomano, A. M., Bergonzini, G., Paolini, A., Forghieri, F.,...Luppi, M. (2021). Multiparametric Flow Cytometry for MRD Monitoring in Hematologic Malignancies: Clinical Applications and New Challenges. *Cancers (Basel)*, 13(18).  
<https://doi.org/10.3390/cancers13184582>

- Robinson, J. P., Gmyrek, G. B., & Rajwa, B. (2026). Flow Cytometry: Advances, Challenges and Trends. *BioEssays*, *48*(1), e70091.
- Robinson, J. P., Ostafe, R., Iyengar, S. N., Rajwa, B., & Fischer, R. (2023). Flow cytometry: the next revolution. *Cells*, *12*(14), 1875.
- Saeys, Y., Van Gassen, S., & Lambrecht, B. N. (2016). Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat Rev Immunol*, *16*(7), 449-462. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.56>
- Schluter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M. H., Key, G., Flad, H. D., & Gerdes, J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*, *123*(3), 513-522. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.3.513>
- Shapiro, H. M. (2005). *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons.
- Spitzer, M. H., & Nolan, G. P. (2016). Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell*, *165*(4), 780-791. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019>
- Sumida, T. S., Cheru, N. T., & Hafler, D. A. (2024). The regulation and differentiation of regulatory T cells and their dysfunction in autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*, *24*(7), 503-517. <https://doi.org/10.1038/s41577-024-00994-x>
- Talekar, M. K., & Olson, T. (2017). Immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. In *Hematopoietic stem cell transplantation for the pediatric hematologist/oncologist* (pp. 371-383). Springer.
- Tembhare, P. R., Chatterjee, G., Chaturvedi, A., Dasgupta, N., Khanka, T., Verma, S.,...Gujral, S. (2022). Critical Role of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis, Subtyping, and Staging of T-Cell/NK-Cell Non-Hodgkin's

- Lymphoma in Real-World Practice: A Study of 232 Cases From a Tertiary Cancer Center in India. *Front Oncol*, 12, 779230. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.779230>
- van Dongen, J. J., Lhermitte, L., Bottcher, S., Almeida, J., van der Velden, V. H., Flores-Montero, J.,...EuroFlow, C. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), 1908-1975. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>
- Van Gassen, S., Callebaut, B., Van Helden, M. J., Lambrecht, B. N., Demeester, P., Dhaene, T., & Saeys, Y. (2015). FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A*, 87(7), 636-645. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22625>
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184(1), 39-51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i)
- Vitales-Noyola, M., Ocegüera-Maldonado, B., Nino-Moreno, P., Baltazar-Benitez, N., Baranda, L., Layseca-Espinosa, E.,...Gonzalez-Amaro, R. (2017). Patients with Systemic Lupus Erythematosus Show Increased Levels and Defective Function of CD69(+) T Regulatory Cells. *Mediators Inflamm*, 2017, 2513829. <https://doi.org/10.1155/2017/2513829>
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L.,...Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44-49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
- Voltarelli, J. C. (2000). Applications of flow cytometry to hematopoietic stem cell transplantation. *Mem Inst Oswaldo*

- Cruz*, 95(3), 403-414. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000300018>
- Wehr, C., Kivioja, T., Schmitt, C., Ferry, B., Witte, T., Eren, E.,...Bos, P. R. (2008). The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(1), 77-85.
- Wood, B. L. (2016). Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 90(1), 47-53. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21239>
- Wulff, S., Martin, K., Vandergaw, A., Boenisch, T., Brotherick, I., Hoy, T.,...Orfao, A. (2006). *Guide to flow cytometry*. Dako Cytomation.
- Yadav, R. M., Desai, S. S., Gupta, M., Dalvi, A., Bargir, U. A., Jodhawat, N.,...Madkaikar, M. (2024). Clinical Utility of Flow-Cytometry for Diagnosis and Genotype Phenotype Correlation in a Cohort of X-linked Agammaglobulinemia Patients. *Indian J Pediatr*, 91(6), 638. <https://doi.org/10.1007/s12098-024-05127-9>

## BÖLÜM 2

### ANTI-MÜLLERIAN HORMON

NURULLAH AY<sup>1</sup>

EMİNE EMSAL DURUSOY<sup>2</sup>

#### Giriş

Anti-Müllerian hormon (AMH), TGF- $\beta$  süper ailesinin bir üyesi olup embriyonik dönemde cinsiyet belirlenmesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde temel bir rol oynar. Cinsiyet farklılaşması, embriyonun erkek veya dişi yönünde gelişebilmesi için genomik ve hormonal sinyaller tarafından yönlendirilen çok aşamalı bir süreçtir. Varsayılan gelişim hattı dişi yönde ilerler; yalnızca Y kromozomunun varlığında erkek gelişim programı aktive olur (Rey, 2000).

XY kromozom takımında bulunan SRY geni, erkek fenotipinin ortaya çıkmasını sağlayan genetik zinciri başlatır. SRY, SOX9'un aktivasyonunu artırarak testis gelişim yolunu başlatır ve aynı

---

<sup>1</sup>Dr.Öğr.Üyesi, Mudanya Üniversitesi,Sağlık Bilimleri Fakültesi,Medicalpark Hastanesi Bursa ,Tıbbi Biyokimya, Orcid: 0000-0002-0122-5725

<sup>2</sup>Op.Dr, Mudanya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi,Medicalpark Hastanesi Bursa, Kadın Doğum ve Hastalıkları,Orcid: 0009-0003-9077-4906

zamanda ovarium gelişim yolunun baskılanmasına aracılık eder. SOX9'un etkinleşmesiyle birlikte Sertoli hücreleri farklılaşır ve AMH ekspresyonu belirgin şekilde artar. Bu hücreler fetal dönemin ilerleyen aşamalarından puberteye kadar yüksek düzeyde AMH üretir; puberte sonrası ise üretimde belirgin bir azalma gerçekleşir (Rey, 2000).

AMH'nin erkek gelişimindeki en erken etkilerinden biri, Müller kanalının gerilemesine aracılık eden apoptozis dalgasının tetiklenmesidir. Bu süreç insan embriyolarında yaklaşık 55–60. günlerde gözlenir. Yeterli AMH bulunmadığında, erkek fetüste hem erkek hem dişi iç ve dış genital yapılar birlikte gelişebilir (Zhang, 2019).

Kadınlarda ise AMH üretimi fetal yaşamın ikinci yarısında, yaklaşık 23. haftada granüloza hücrelerinde başlar ve yetişkinlik boyunca devam eder. Üreme dönemi boyunca kademeli bir azalma gösteren AMH düzeyleri, menopoz döneminde belirgin şekilde düşer ve zamanla saptanamaz hâle gelir (Russell, 2022). AMH, primordial foliküller dışında primer, preantral ve küçük antral foliküller tarafından üretilir. Bu yönüyle foliküler gelişimin otokrin-parakrin düzenlenmesinde önemli bir düzenleyici olup, FSH'ye bağımlı folikül seçimi gerçekleştikten sonra ekspresyonu belirgin şekilde azalır. Bu özelliklerinden dolayı AMH, büyümekte olan foliküllerin sayısını ve over fonksiyonunu yansıtan başlıca biyobelirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir. (Hager, 2023).

## **Over Rezervi**

Kadınlar, doğdukları anda sahip oldukları oosit sayısı ile yaşamlarına başlarlar; bu sayı genellikle 1–2 milyon arasında olup, yaşam boyu azalarak devam eder. AMH, over farklılaşması için kritik bir hormon olmamakla birlikte Leydig hücrelerinin baskılanmasında ve folikül olgunlaşmasının ilerlemesinde rol oynamaktadır. Folikülogenez sürecinde primordial foliküllerin

kontrollü biçimde aktifleşmesi büyük ölçüde AMH aracılığıyla düzenlenir (Rey, 2000).

Serum AMH düzeyleri, büyümekte olan folikül popülasyonunu yansıttığı için kadınlarda over rezervinin miktarı ile güçlü bir korelasyon gösterir ve ovulatuvar kapasite hakkında önemli bilgiler sağlar. Over rezervi, primordial foliküllerin sayısı ve kalitesiyle tanımlanırken, buna ek olarak fonksiyonel over rezervi (FOR) kavramı da kullanılmaktadır. FOR, çapı 2–5 mm arasında değişen ve FSH tarafından seçilerek büyüme evresine girecek olan gelişen folikül havuzunu ifade eder. Bu foliküller AMH üreten foliküllerdir ve serum AMH düzeyi esas olarak FOR'u yansıtır (Hager, 2023).

Genç kadınlarda AMH düzeylerinin primordial folikül sayısı ile birebir uyum göstermemesinin nedeni, AMH'nin yalnızca gelişmekte olan belirli bir folikül grubunda eksprese edilmesidir. Dolayısıyla AMH, direkt bir primordial folikül belirteci olmaktan çok, primordial havuzdan büyümekte olan foliküllere geçişin dolaylı bir göstergesi olarak değerlendirilir (Hager, 2023).

Son 20 yıl içinde yapılan çok sayıda çalışma, serum AMH düzeylerinin büyüyen folikül sayısı ile yüksek korelasyon gösterdiğini, her iki parametrenin de yaklaşık 25 yaşından sonra yaşa bağlı olarak azaldığını ortaya koymuştur. AMH düzeyleri genç erişkinlik döneminde zirveye ulaşır, 25 yaş civarında plato yapar ve sonraki yıllarda düzenli bir düşüş gösterir (Hager, 2023). PKOS'u olmayan kadınlarda yüksek AMH seviyeleri genellikle yüksek doğurganlık kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir (Abbott, 2024).

AMH düzeyini etkileyen çeşitli dış faktörler de mevcuttur. Hormonal kontrasepsiyon, serum AMH düzeylerinde %14–55 arasında değişen oranlarda azalmaya yol açabilir (Rudnicka, 2022). Gebelikte ise AMH düzeyleri ikinci ve üçüncü trimesterlerde over inaktivitesine bağlı olarak azalır; birinci trimesterdeki değerler gebelik öncesi seviyelere daha yakındır ve doğumdan sonra normale

döner (Van der ham,2024). Son araştırmalar, serum D vitamininin yüksek olduğu durumlarda AMH düzeylerinin de daha yüksek olabildiğini ve her iki parametrenin mevsimsel değişkenlik gösterebildiğini bildirmektedir (Abbott, 2024). Bunun nedeni, AMH geninin promotör bölgesinde D vitamini yanıt elemanının bulunmasıdır; bu da D vitamini durumunun AMH ekspresyonunu modüle etmesine olanak tanır (Kılıç, 2025).

### **Polikistik Over Sendromu (PCOS)**

PCOS, üreme çağındaki kadınların yaklaşık %15–20'sinde görölen ve kronik anovulasyon ile anovulatuvar infertilitenin en yaygın nedenini oluşturan bir over fonksiyon bozukluğudur (Bülow, 2023). Klinik tablo hastadan hastaya değişiklik göstermekle birlikte; kronik ovulasyon bozuklukları, hiperandrojenizm, hiperinsülinemi ve ultrasonografide polikistik ovarium görünümu başlıca bulgular arasındadır. Bu sendrom ayrıca çeşitli üreme, endokrin ve metabolik belirti ve bulgularla birlikte seyredebilir (Rudnicka, 2022).

Tanı için en sık kullanılan Rotterdam kriterlerine göre, diğer ilgili hastalıklar dışlandıktan sonra aşağdaki üç kriterden en az ikisinin bulunması gerekmektedir: oligo/anovulasyon, klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm, ultrasonografide polikistik over morfolojisi Polikistik over yapısı, her biri 2–9 mm çapında 12 veya daha fazla folikül bulunması ve/veya over hacminin 10 mL'den büyük olması ile tanımlanır (Abbott, 2024).

PCOS'lu kadınlarda dolaşımdaki AMH düzeylerinin, aynı yaş grubundaki sağlıklı kadınlara göre iki ila üç kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu artış, preantral ve küçük antral foliküllerin sayısındaki belirgin yükselme ve foliküler kitlenin genişlemesiyle ilişkilidir. Bu nedenle AMH'nin, hem PCOS tanısında kullanılabilircek bir biyobelirteç hem de sendromun patofizyolojisinde rol oynayan bir faktör olabileceği düşünölmektedir (Ford, 2025).

Araştırmalar, AMH düzeylerinin PCOS'nin şiddeti ile de pozitif yönde ilişkili olduğunu göstermektedir. Amenoreik PCOS'lu kadınlarda AMH değerlerinin oligomenoreik kadınlara kıyasla daha yüksek bulunması, ağır foliküler gelişim bozukluğu ve granüloza hücre fonksiyonundaki daha belirgin yetersizliği düşündürmektedir (Nelson, 2024).

PCOS patogenezi açısından ne sürülen mekanizmalardan biri, AMH'nin primordial foliküllerin dinlenme havuzundan çıkışını baskılaması ve gelişmekte olan foliküllerin FSH'ye yanıtını azaltarak anovulasyona yol açmasıdır (Zhang, 2019). Buna ek olarak AMH'nin, hipotalamusta GnRH'ye bağlı LH pulslarını artırarak folikül gelişiminin düzenini bozduğu gösterilmiştir (Arnanz, 2023). Hem insan hem de kemirgen çalışmalarında GnRH nöronlarında AMH reseptörü (AMHR2) tespit edilmiş olması, AMH'nin PCOS'deki nöroendokrin düzensizlikte doğrudan rol oynadığı görüşünü desteklemektedir (Rudnicka, 2022).

Androjen düzeyleri ile AMH arasında pozitif ilişki bulunması, AMH'nin aromataz aktivitesini baskılamasıyla açıklanmaktadır [4]. Ayrıca obezite, hiperinsülinemi ve hiperandrojenizm, PCOS'lu kadınlarda artmış AMH düzeylerine katkıda bulunan temel faktörlerdir (Zhang, 2019).

Ultrason kullanımına dayalı antral folikül sayımı (AFC), mevcut tanı kriterlerinde yer alsada; virginal veya obez kadınlarda transabdominal değerlendirme güçleştiği için PCOS morfolojisinin yorumlanması oldukça değişkenlik gösterebilir (Rudnicka, 2022). Bu nedenle küçük foliküllerin artışını daha nesnel şekilde yansıttığı için serum AMH lmnn tanıda alternatif bir kriter olarak kullanılabilceği önerilmektedir. AMH'nin tüm menstrual döngü boyunca stabil olması ve hipotalamus–hipofiz aksından bağımsız çalışması, onu diğer over rezervi belirteçlerine göre daha kullanışlı hâle getirmektedir (Bülow, 2023).

Semptomatik kadınlarda 4.7 ng/mL eşik değeri için AMH'nin PCOS tanısında %82.8 duyarlılık ve %79.4 özgüllüğe sahip olduğunu gösterilmiştir (Ban, 2022). Çinli kadınlarda yapılan çalışmada, tanı için 20–29 yaş arası için 8.16 ng/mL, 30–39 yaş grubu için ise 5.89 ng/mL eşik değerler önerilmiştir (Abbott, 2024).

Güncel çalışmalar, AMH'nin yalnızca tanıda değil tedavi planlamasında da önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. PCOS'lu kadınlarda serum AMH düzeyleri, klomifen sitrat veya gonadotropin tedavilerine verilecek over yanıtını öngörebilmekte; yüksek AMH düzeyleri daha yüksek gonadotropin dozlarına ve daha uzun tedavi sürelerine gereksinim olduğunu göstermektedir (Rudnicka, 2022).

### **Yardımcı Üreme Teknikleri**

Kadınlarda fertilité problemi söz konusu olduğunda, over yanıtının düzenlenmesi çoğunlukla dışarıdan uygulanan FSH ile sağlanmaktadır. Kontrollü over stimülasyonuna başlamadan önce over yanıtının öngörülebilmesi hem doğru hasta bilgilendirmesi yapılabilmesi hem de kişiye özgü gonadotropin dozunun belirlenebilmesi açısından son derece önemlidir. Yardımcı üreme tekniklerinin başarısı, uygulanan stimülasyonun ardından elde edilen oositlerin sayısı ve kalitesiyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle over yanıtı, dolaylı olarak over rezervinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Cobo, 2021).

AMH ölçümü, günümüzde birçok yardımcı üreme merkezinde standart bir değerlendirme yöntemi hâline gelmiş olup, özellikle gün siklusunun üçüncü gününde ölçülen FSH gibi geleneksel belirteçlerden daha duyarlı bulunmuştur. Çalışmalar, düşük AMH düzeylerinin gonadotropin uyarısına zayıf yanıt ve dolayısıyla daha düşük gebelik oranları ile ilişkilendirildiğini göstermektedir. Kontrollü over hiperstimülasyonunda (COH) zayıf yanıt genellikle beş veya daha az oosit elde edilmesi ya da siklusun iptal edilmesiyle

tanımlanır (Hager,2023). En ideal oosit sayısının yaklaşık 10–12 olduğu kabul edilmektedir (Kostrzewa, 2020). Ulusal kılavuzlar, başlangıç FSH dozunun kişisel over rezerv göstergelerine göre AMH dahil özelleştirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (Wang,2022). Bu kapsamda, AMH düzeyi, COH sırasında kullanılacak FSH dozunun belirlenmesine yönelik algoritmaların temel bileşenlerinden birini oluşturmaktadır. Aşırı veya yetersiz stimülasyon hem siklus iptali riskini artırmakta hem de ovarian hiperstimülasyon sendromu gelişme olasılığını yükseltmektedir. Bu nedenle FSH dozunun doğru şekilde ayarlanması klinik başarı için kritik önemdedir (Hager,2023).

Kişiyeye özgü doz ayarlaması yapılan protokollerin geleneksel yöntemlere kıyasla daha fazla sayıda kadında 8–14 oosit elde edilmesini sağladığını, aşırı ya da yetersiz yanıt oranlarının daha düşük olduğunu ve ovarian hiperstimülasyon profilaksisine daha az ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymuştur (Dhanushi, 2023). Özellikle ileri yaştaki kadınlarda serum AMH düzeyinin canlı doğum olasılığını öngörmede etkili olduğunu göstermiştir; 21 pmol/L üzerindeki AMH düzeyleri daha yüksek canlı doğum oranlarıyla ilişkilendirilmiştir (Turkyilmaz, 2022).

AMH düzeyinin 1.43 pmol/L'nin altında olduğu hastalarda, blastosist dondurma olasılığının belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bu durumun hasta yaşından bağımsız olduğu vurgulanmıştır (Gatta, 2024). Yapılan çalışmada  $\geq 2.7$  ng/mL AMH düzeylerinin daha yüksek implantasyon oranları ile ilişkili olduğunu desteklemekte, böylece AMH'nin embriyo kalitesi için önemli bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir (Rudnicka, 2021).

İnfertil kadınlarda endometriozis sıklığının oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. İnfertil kadınların %20–50'sinde endometriozis mevcuttur (Tang, 2020). Endometriozisin neden olduğu infertilitenin mekanizması tam olarak açıklanamamış olsa da; kronik inflamasyon, oksidatif stres artışı, hücre döngüsünde

bozulma ve yetersiz anjiyogenez yoluyla over rezervinin olumsuz etkilendiği düşünölmektedir (Kim, 2024). Endometriozisli kadınların peritoneal sıvılarında AMH düzeylerinin hastalığı olmayan kadınlara göre daha düşük olduğunu göstermiştir (Victoria, 2019).

Endometriozis tedavisinde cerrahi girişimler ve medikal tedaviler kullanılmaktadır; ancak ağrı kesiciler ve hormonal tedaviler hastalığı tamamen ortadan kaldırmamakta ve yüksek nüks oranlarına yol açmaktadır (McGrath, 2021). Cerrahi tedavi ise, özellikle laparoskopik girişimler, over rezervini azaltarak AMH düzeylerinde düşüőe neden olabilir. Laparoskopi uzun süre birinci basamak tedavi olarak önerilmiş olsa da, Yardımcı Üreme Teknikleri nin ikinci basamak olarak uygulanması yaygın bir yaklaşımdır. Bununla birlikte laparoskopik cerrahi ve Yardımcı Üreme Teknikleri nin birlikte uygulanması bazı olgularda gebelik şansını artırırsa da, over dokusunda iyatrojenik hasar ve skar oluşumu riskini yükselterek rezerv kaybına yol açabilir (Tang, 2020).

Over cerrahisinin AMH düzeylerini ve antral folikül sayısını azalttığı, dolayısıyla fertilitiyi olumsuz etkilediği bilinmektedir (Li, 2023). Bu kaybı önlemek amacıyla, endometriozisli kadınlara ameliyat öncesi fertilité korunması yöntemi olarak oosit kriyoprezervasyonu önerilmektedir (Kim, 2024).

### **Prematür Over Yetmezliği**

Prematür over yetmezliği (POI) ya da prematür over yetmezliği/fonksiyon kaybı (POF), overlerin 40 yaşından önce işlevini kaybetmesiyle karakterize edilen bir durumdur. Bu erken menopoz tablosunda overler yeterli düzeyde östrojen üretmez; ortaya çıkan hipoöstrojenizm nedeniyle oosit gelişimi düzenli olarak sürdürülemez (Mitchell, 2018). Sonuç olarak gonadlarda kalan foliküller hızla tükenir ve infertilite gelişir (Ramezani, 2020). POI'nin prevalansı 40 yaş altındaki kadınlarda yaklaşık %1'dir. Risk

yaşla birlikte belirgin şekilde yükselir: 18–25 yaş arasında 1/10.000, 25–30 yaş arasında 1/1000, 35–40 yaş aralığında ise 1/100'e kadar çıkar (Grynnerup, 2012).

Tanısal açıdan POI; 40 yaşından küçük bir kadında en az dört ay süreyle oligomenore ya da amenore görülmesi ve bir ay arayla ölçülen iki farklı FSH düzeyinin 40 IU/L'nin üzerinde olması ile birlikte östradiol düzeyinin 50 mol/L'nin altında saptanması ile tanımlanır (Khan, 2019).

POI, iki temel mekanizma ile ortaya çıkabilir: folikül fonksiyon bozukluğu ve folikül sayısında azalma (foliküler deplezyon). Bu mekanizmalardan her biri çok çeşitli nedenlerle tetiklenebilir. Örneğin folikül fonksiyon bozukluğu; FSH/LH reseptörlerindeki sinyal kusurlarından, G protein mutasyonlarından, enzim eksikliklerinden veya otoimmün süreçlerden kaynaklanabilir. Folikül kaybı ise yetersiz başlangıç folikül sayısı, hızlanmış spontan folikül kaybı ya da çevresel faktörlere bağlı folikül hasarı sonucu gelişebilir (Khan, 2019).

POI'nin kesin nedeninin çoğu vakada açıklanamamasına rağmen, genetik faktörlerin önemli rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ramezani, 2020). POI olgularının yaklaşık %15'inin aile öyküsü pozitif olduğunu bildirilmiş ve genetik etiolojinin güçlü olasılığına dikkat çekilmiştir (Grynnerup, 2012). Genetik temelli POI; X kromozomundaki monosomi, trisomi, translokasyon gibi bozukluklardan veya otozomal mutasyonlardan kaynaklanabilir. Günümüzde kadınların annelik yaşının gecikmesi nedeniyle POI'nin küresel bir sağlık sorunu hâline geldiğini, özellikle DNA onarımı, mayoz ve mitokondriyal fonksiyonlarla ilişkili genlerdeki mutasyonların POI gelişiminde etkili olabileceğini gösterilmiştir (Tanaka,2024). Ayrıca sitokinlerin POI için yeni biyobelirteçler olarak kullanılabileceği yönünde güncel kanıtlar da mevcuttur (von Wolff, 2020). Buna karşın POI vakalarının yaklaşık

%90'ının hâlâ açıklanamayan nedenlere bağlı olduğunu belirtilmektedir (Khan, 2019).

AMH düzeyi, POI/POF değerlendirmesinde önemli bir biyobelirteç olarak öne çıkmaktadır. POI/POF olan kadınlarda AMH düzeylerinin sağlıklı kadınlara kıyasla belirgin şekilde düşük olduğunu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, üreme çağındaki sağlıklı kadınlarda ortalama AMH düzeyi  $16.97 \pm 5.80$  pmol/L iken, POF'li kadınlarda bu değer  $0.65 \pm 1.81$  pmol/L olarak bulunmuştur (Nelson, 2023). 125 hastada yapılan değerlendirmede POF grubunda ortalama AMH'nin  $0.04 \pm 0.10$  ng/mL, POI grubunda ise  $0.69 \pm 1.46$  ng/mL olduğunu saptamıştır [30]. 601 hastayı kapsayan çalışmada, erken POI/POF olgularının %75.04'ünde (451/601) AMH düzeyinin ölçülemez kadar düşük olduğu bildirilmiştir (Kim, 2024).

İlaçla indüklenmiş prematür over yetmezliği modeli oluşturulan farelerde insan plasenta mezenkimal kök hücre naklinin etkileri incelenmiştir (Tanaka, 2024). Kök hücre tedavisi, overlerde AMH düzeylerinin yükselmesini sağlayarak gonadotropin ve östrojen düzeylerini iyileştirmiş, folikül gelişimini artırmış ve granüloza hücre apoptozunu azaltmıştır. Çalışma, yalnızca AMH ekspresyonundaki artış sayesinde kök hücrelerin over fonksiyonunda belirgin iyileşme sağladığını göstermiştir (McGrath, 2021).

## **Menopoz**

AMH, menopoz zamanlamasını öngörmede günümüzde en güçlü biyobelirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir. Menopoz, bir kadının yaşamındaki son adet kanamasını ifade eder ve ortalama olarak 51 yaş civarında görülür (Tang, 2020). Bununla birlikte menopoz yaşı geniş bir aralıkta değişebilir ve 40 ile 60 yaş arasında gerçekleşebilir. Doğurganlık kapasitesi ise menopozdan yaklaşık 10–13 yıl önce belirgin biçimde azalmaya başlar (Nelson, 2023).

Menopoz yaşının belirlenmesinde genetik faktörlerin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir; annenin menopoz yaşı çoğu zaman kızının menopoz yaşına dair fikir verebilir. Genetik varyasyonların menopoz yaşındaki değişkenliğin yaklaşık %50'sini açıkladığı bildirilmektedir (Visser, 2020). Büyük ölçekli popülasyon çalışmaları, menopoz yaşının öngörülmesinde AMH'nin annesel genetik faktörlerden daha güçlü bir belirleyici olduğunu göstermiştir (Galczyńska, 2025).

Tek bir AMH ölçümü, genç bir kadının menopoz zamanını yıllar öncesinden tahmin etmede kullanılabilir. Hem hasta yaşı hem de tek ölçümden elde edilen AMH değeri ile oluşturulan matematiksel modeller, menopoz yaşını yüksek doğrulukla tahmin edebilmektedir (Van der Ham, 2024). 1265 uygun aday arasından rastgele seçilen 266 kadın üzerinde yaptığı uzun süreli çalışmada, katılımcıların AMH seviyeleri üç yılda bir olmak üzere üç kez ölçülmüş ve altı yıllık süreçte tüm yaş gruplarında AMH düzeylerinde belirgin düşüş gözlenmiştir. Araştırmacılar başlangıçtaki AMH değerlerini kullanarak bireysel menopoz yaşını tahmin eden hızlandırılmış yaşam modeli geliştirmiş ve bu model 20–49 yaş arası kadınlarda menopoz yaşını başarılı biçimde öngörmüştür. Birçok çalışma, menopozun öngörülmesinde AMH'nin estradiol, FSH ve inhibin B gibi diğer belirteçlerden daha güvenilir olduğunu göstermiştir. (Dykgraaf, 2023).

AMH düzeyi kadın yaşamı boyunca karakteristik bir değişim gösterir: doğumdan itibaren yükselerek yaklaşık 25 yaş civarında en yüksek düzeye ulaşır, ardından yıllar içinde kademeli olarak azalır ve postmenopozal dönemde neredeyse saptanamaz seviyelere iner (Nelson, 2023). AMH, özellikle döngüsel olmayan over aktivitesinin bir göstergesidir. Luteal fazda, ovulasyonu takiben AMH seviyelerinin en düşük düzeylerde olduğunu bildirilmiştir. Ancak postmenopozal kadınlarda döngüsel değişim neredeyse tamamen kaybolur (Moridi, 2020).

Menopozdan yaklaşık beş yıl önce AMH düzeylerinin ölçülemeyecek kadar düştüğünü gösterilmiştir (Petrillo, 2022). Bu durum, primordial folikül havuzunun tükenmekte olduğunun güçlü bir biyolojik işaretidir. AMH, antral folikül havuzunun boyutunu doğru bir biçimde yansıtır ve over hacmi ile antral folikül sayısı gibi parametreler de AMH düzeyleriyle olan ilişkileri nedeniyle menopoz zamanına dolaylı işaretler sağlar (Rosario, 2024).

Buna rağmen bazı araştırmacılar AMH'nin her yönüyle bireysel over yaşlanmasını tam olarak açıklayamayabileceğini savunmaktadır. AMH ve diğer over rezerv belirteçlerinin menopoz yaşıyla ilişkili olduğunu ancak bireyin over yaşlanma sürecinin ayrıntılı seyrini kesin olarak yansıtmadığını bildirilmiştir (Moolhuijsen, 2020). AMH'nin menopoz başlangıcına kadar geçen süreyi tahmin etmede anlamlı bir belirleyici olduğunu bulmakla birlikte, kişiye özel menopoz yaşının tam olarak hesaplanmasında belirgin hata payı bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca yaş ilerledikçe AMH'nin menopozu öngörme gücünün azaldığı bilinmektedir. AMH, özellikle genç yaşlardaki kadınlarda erken menopoz riskini değerlendirmede değerli bir biyobelirteç olarak görülse de, menopozun kesin yaşını tahmin etmede tek başına mutlak doğruluk sağlamamaktadır. (Lin, 2021).

## **Sonuç**

AMH, büyüme süreçleri, cinsel farklılaşma ve folikülogenezde kritik rol oynayan bir TGF- $\beta$  ailesi üyesidir. Kadınlarda fetal dönemden itibaren granüloza hücreleri tarafından üretilen AMH, yaşam boyunca kademeli olarak azalır ve menopoz döneminde neredeyse tamamen kaybolur. AMH düzeyleri ile ovulasyon kapasitesi ve over rezervi arasında güçlü bir ilişki bulunması, bu hormonu over fonksiyonunun güvenilir bir biyobelirteci hâline getirmektedir.

Serum AMH ölçümleri PCOS, yardımcı üreme teknikleri, prematür over yetmezliği (POF/POI) riski ve menopoz yaşının öngörülmesi gibi birçok klinik tabloya önemli katkılar sunmaktadır. Bu kapsamda AMH, hem üreme sağlığının değerlendirilmesinde hem de bireyin üreme yaşam süresinin tahmin edilmesinde klinisyenlere değerli bilgiler sağlar.

Sonuç olarak AMH; over fonksiyonunun izlenmesi, üreme potansiyelinin belirlenmesi ve çeşitli jinekolojik durumların yönetilmesinde temel bir araç olup, farklı klinik senaryolarda tedavi yaklaşımının kişiselleştirilmesine önemli ölçüde yardımcı olmaktadır.

## Kaynakça

- Abbott DH, Hutcherson BA, Dumesic DA. Anti-Müllerian hormone: a molecular key to unlocking polycystic ovary syndrome? *Semin Reprod Med.* 2024;42(1):41-48. doi:10.1055/s-0044-1787525.
- Arnanz A, Bayram A, Elkhatib I, Abdala A, El-Damen A, Patel R, et al. Antimüllerian hormone (AMH) and age as predictors of preimplantation genetic testing for aneuploidies cycle outcomes and blastocyst quality in women undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet.* 2023;40(6):1467-1477. doi:10.1007/s10815-023-02805-z.
- Ban Frangež H, Vrtacnik Bokal E, Štimpfel M, Divjak Budihna T, Gulino FA, Garzon S, Ghezzi F, Alkatout I, Gitas G, Laganà AS. Reproductive outcomes after laparoscopic surgery in infertile women affected by ovarian endometriomas, with or without in vitro fertilisation: results from the SAFE (surgery and ART for endometriomas) trial. *J Obstet Gynaecol .* 2022 Jul;42(5):1293-1300. doi: 10.1080/01443615.2021.1959536.
- Bülow NS, Warzecha AK, Nielsen MV, Andersen CY, Holt MD, Petersen MR, et al. Impact of letrozole co-treatment during ovarian stimulation on oocyte yield, embryo development and live birth rate. *Hum Reprod.* 2023;38(11):2154-2165. doi:10.1093/humrep/dead182.
- Cobo A, García-Velasco JA, Remohí J, Pellicer A. Oocyte vitrification for fertility preservation for both medical and nonmedical reasons. *Fertil Steril.* 2021;115(5):1091-1101. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.02.006.

- Dykgraaf RHM, Schalekamp-Timmermans S, Adank MC, van den Berg SAA, van de Lang-Born BMN, Korevaar TIM, et al. Reference ranges of anti-Müllerian hormone and interaction with placental biomarkers in early pregnancy. *Endocr Connect.* 2023;12(3):e220320. doi:10.1530/EC-22-0320.
- Fernando WD, Vincent A, Magraith K. Premature ovarian insufficiency and infertility. *Aust J Gen Pract.* 2023;52(1-2):32-38. doi:10.31128/AJGP-08-22-6531.
- Ford ML, Choh AC, Gonzalez B, Lindheim SR, Stanczyk FZ, McGinnis LK, et al. Anti-Müllerian hormone levels are associated with skeletal maturity in adolescent girls: a longitudinal study. *Health Sci Rep.* 2025;8:e71209. doi:10.1002/hsr2.71209.
- Gałczyńska D, Daniluk J, Buczek-Kutermak A, Prus P, Pluta D. Decoding the relationship between polycystic ovary syndrome and hormonal dependencies of anti-Müllerian hormone. *Biomedicines.* 2025;13(6):1341. doi:10.3390/biomedicines13061341.
- Gatta E, Maltese V, Cimino E, Cavadini M, Anelli V, Di Lodovico E, et al. Evaluation of patients with autoimmune polyglandular syndrome from a single reference centre. *J Endocrinol Invest.* 2024;47(4):857-864. doi:10.1007/s40618-023-02200-6.
- Grynnerup AG, Lindhard A, Sørensen S. The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012;91(11):1252-1260. doi:10.1111/j.1600-0412.2012.01471.x.

- Hager M, Dewailly D, Marculescu R, Ghobrial S, Parry JP, Ott J. Stress and polycystic ovarian morphology in functional hypothalamic amenorrhea. *Reprod Biol Endocrinol.* 2023;21(1):42. doi:10.1186/s12958-023-01095-5.
- Khan HL, Bhatti S, Suhail S, Gul R, Awais A, Hamayun H, et al. Antral follicle count and serum anti-Müllerian hormone as predictors of natural fecundability. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019;17(1):20. doi:10.1186/s12958-019-0464-0
- Kim HK, Kim TJ. Current status and future prospects of stem cell therapy for infertile patients with premature ovarian insufficiency. *Biomolecules.* 2024;14(2):242. doi:10.3390/biom14020242.
- Kılıç Hamzaoğlu F, Dilbaz S, Özelçi R, Kaya O, Utlu Özen E. AMH as a predictor of follicle turnover, embryo quality and pregnancy outcomes. *Biomedicines.* 2025;13(12):2875. doi:10.3390/biomedicines13122875.
- Lin C, Jing M, Zhu W, Tu X, Chen Q, Wang X, et al. The value of anti-Müllerian hormone in prediction of spontaneous pregnancy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:695157. doi:10.3389/fendo.2021.695157.
- Li HJ, Seifer DB, Tal R. AMH independently predicts aneuploidy but not live birth per transfer in IVF PGT-A cycles. *Reprod Biol Endocrinol.* 2023;21(1):19. doi:10.1186/s12958-023-01066-w.
- McGrath IM, Mortlock S, Montgomery GW. Genetic regulation of physiological reproductive lifespan and female fertility. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2556. doi:10.3390/ijms22052556.

- Mitchell CM, Waetjen LE. Genitourinary changes with aging. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(4):737-750. doi:10.1016/j.ogc.2018.07.010.
- Moridi I, Chen A, Tal O, Tal R. The association between vitamin D and anti-Müllerian hormone: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2020;12(6):1567. doi:10.3390/nu12061567.
- Nelson SM, Davis SR, Kalantaridou S, Lumsden MA, Panay N, Anderson RA. Anti-Müllerian hormone for diagnosis and prediction of menopause. *Hum Reprod Update.* 2023;29(3):327-346. doi:10.1093/humupd/dmac045.
- Nelson SM, Shaw M, Alrashid K, Anderson RA. Individualized dosing of follitropin delta affects live birth and safety in IVF. *Fertil Steril.* 2024;122(3):445-454. doi:10.1016/j.fertnstert.2024.05.143.
- Petrillo T, Semprini E, Tomatis V, Arnesano M, Ambrosetti F, Battipaglia C, et al. Complementary compounds to counteract insulin resistance in PCOS patients. *Biomedicines.* 2022;10(8):1924. doi:10.3390/biomedicines10081924.
- Ramezani Tehrani F, Bidhendi Yarandi R, Solaymani-Dodaran M, Tohidi M, Firouzi F, Azizi F. Improving prediction of age at menopause using multiple AMH measurements. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(5):dgaa083. doi:10.1210/clinem/dgaa083.
- Rey R, Josso N, Racine C. Sexual differentiation. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

- Rosario R, Stewart HL, Spears N, Telfer EE, Anderson RA. Anti-Müllerian hormone attenuates cyclophosphamide-induced ovarian damage. *Hum Reprod.* 2024;39(2):382-392. doi:10.1093/humrep/dead255.
- Rudnicka E, Kunicki M, Calik-Ksepka A, Suchta K, Duszewska A, Smolarczyk K, et al. Anti-Müllerian hormone in pathogenesis, diagnosis and treatment of PCOS. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12507. doi:10.3390/ijms222212507.
- Russell N, Gilmore A, Roudebush WE. Clinical utilities of anti-Müllerian hormone. *J Clin Med.* 2022;11(23):7209. doi:10.3390/jcm11237209.
- Tang R, Yu Q. Novel variants in women with premature ovarian function decline identified via whole-exome sequencing. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(10):2487-2502. doi:10.1007/s10815-020-01919-y.
- Tanaka Y, Amano T, Nakamura A, Yoshino F, Takebayashi A, Takahashi A, et al. Rapamycin prevents cyclophosphamide-induced ovarian follicular loss. *Hum Reprod.* 2024;39(7):1519-1532. doi:10.1093/humrep/deae085.
- Turkyilmaz A, Alavanda C, Ates EA, Geckinli BB, Polat H, Gokcu M, et al. Whole-exome sequencing reveals potential genes in premature ovarian insufficiency. *J Assist Reprod Genet.* 2022;39(3):695-710. doi:10.1007/s10815-022-02408-0.
- van der Ham K, Laven JSE, Tay CT, Mousa A, Teede H, Louwers YV. Anti-Müllerian hormone as a diagnostic biomarker for polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2024;122(4):727-739. doi:10.1016/j.fertnstert.2024.05.163.

- Victoria M, Labrosse J, Krief F, Cédric-Durnerin I, Comtet M, Grynberg M. Anti-Müllerian hormone: more than a biomarker of female reproductive function. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2019;48(1):19-24. doi:10.1016/j.jogoh.2018.10.015.
- Visser JA, Laven JSE. Anti-Müllerian hormone and ovarian reserve: update on assessing ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105:3361-3373.
- von Wolff M, Roumet M, Stute P, Liebenthron J. Serum anti-Müllerian hormone concentration has limited prognostic value for primordial follicles. *Maturitas.* 2020;134:34-40. doi:10.1016/j.maturitas.2020.02.001.
- Wang MY, Wang YX, Li-Ling J, Xie HQ. Adult stem cell therapy for premature ovarian failure: from bench to bedside. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022;28(1):63-78. doi:10.1089/ten.TEB.2020.0205
- Zhang B, Meng Y, Jiang X, Liu C, Zhang H, Cui L, Chen ZJ. IVF outcomes of women with discrepancies between age and serum anti-Müllerian hormone levels. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019 Jul 16;17(1):58. doi: 10.1186/s12958-019-0498-3.

## BÖLÜM 3

### POSTMENAPOZDA OMENTİN 1'İN ROLÜ

NAZİFE DOĞAN<sup>1</sup>

#### Giriş

Kemik mineral yoğunluğunun azaldığı ve birçok kırık türünün görülme sıklığının arttığı osteoporozda kemiğin mikro yapısı değişmektedir. Osteoporozda kemiğin rezorpsiyonu ve yeniden yapılanması (bone remodeling) arasındaki denge bozulur ve mineral yoğunluğunun azaldığı kırıklar sık saptanmaktadır. Post menapozda gözlenen osteoporozda ise azalan östrojen etkisiyle hem osteoblast apoptozundaki artışa hem de osteoklastik aktiviteyi uyaran sitokinlerdeki artışa bağlı gözlenen inflamasyon ile kalça ve omurga kırıklarının gözlenmesi önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu halk sağlığı sorununun tanısında, tedavisinde ve takibinde en yaygın kemik mineral yoğunluğu gösteren t skoru kullanılmaktadır. Beyaz yağ dokusundan salınan mediyatörler olan adipokinler başlangıçta obeziteyle ilgili araştırılırken günümüzde inflamatuvar cevap ve immün sistem gibi farklı patofizyolojik süreçlerdeki rolleri de önem kazanmaktadır. Kronik inflamasyonla osteoporozda pro-inflamatuvar sitokinlerdeki artışlar nedeniyle kemik kayıplar

---

<sup>1</sup> Uzman Doktor, Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Orcid: 0009-0008-6737-0416

oluşabilmektedir. Postmenapozal osteoporozda antiinflamatuvar etkili bir adipokin olan omentin-1 farklı patofizyolojik süreçlerde antiinflamatuvar makrofajları artırarak kemik kaybını engelleyebilmektedir. Bu süreçlerde fizyolojik kompensasyon ve adaptasyon mekanizmaları ile osteoblast sentezini uyarırken osteoklastları baskılayarak omentin 1 postmenapozal osteoporozun erken tanısı ve tedavisi ile ilgili yapılacak araştırmalarda önemli katkılar sağlayabileceği öngörülebilmektedir.

## **Osteoporoz**

### **Kemik Dokusu**

Dinamik bir bağ dokusu olan kemik mineralize kollejen bir çatıdan oluşmaktadır. Bu dokunun organların korunması (spinal kord, beyin v.b), hareketlerin sağlanması (bedensel, postür) ve bazı mineraller için (fosfor, kalsiyum v.b) depo işlevi görmesi gibi farklı görevleri bulunmaktadır. Kemik dokusunda kemik rezorpsiyonu ve yeniden yapılanması (bone remodeling) immün sistem ve hematopez dahil birçok farklı süreçte rol almaktadır (Garnero, 2015). Kemiklerin %70'ini organik maddeler, %5-8'ini su ve kalanını ise ekstrasellüler ve organik matriks oluşturmaktadır. Bu yapıda Tip 1 başta olmak üzere kollajenler, non-kollajenöz proteinler ve kemik hücreleri organik matriksi oluştururken hidroksiapatit kristalleri de inorganik matriksi oluşturmaktadır (Garnero, 2015; Tzelepi et al., 2009).

### **Kemik Yapım ve Yıkımının Düzenlenmesi**

Osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler başlıca kemik dokusu hücreleridir. Osteokalsin, Tip 1 kollajen, osteopontin, kemik sialoproteini, sitokinler, proteoglikanlar, alkalin fosfataz ve büyüme faktörleri osteoblastlarda sentezlenmektedir. Osteoblastlar glukokortikoidler, parathormon, seks steroidleri, insülin benzeri büyüme faktörü 1,25-dihidroksivitamin D3 gibi kemik metabolizmasında rol alan mediatörler için reseptörlere sahip

olduğundan kemik metabolizmasındaki önemli bir hücredir (Tzelepi et al., 2009; Han et al., 2018). Kemik rezorpsiyonunda rol oynayan kollajenaz, katepsinler ve tartarata dirençli asit fosfataz gibi lizozomal enzimlerin sentezlediği osteoklastlar ise kemik matriksinde rezorpsiyon yapmaktadır.

Osteositler mekanik uyarı sonucu nitrik oksit, glukoz 6-fosfat dehidrojenaz, insülin benzeri büyüme faktörü ve prostaglandinler gibi kimyasal haberciler vasıtasıyla aktifleşerek kemikte yeniden yapılanmaya yol açmaktadır. Bu hücreler arası ilişkiler kemikte matriksinde bulunan osteositlerin uzantıları ile sağlanmaktadır (Han et al., 2018; Tzelepi et al., 2009). Yaşam boyu gözlenebilen mekanik ihtiyaçlar ve mikrokırıklar nedeniyle rezorpsiyon ve onu takip eden formasyon süreçleri kemikte yeniden yapılanma (remodeling) ile sağlanmaktadır. Remodeling; istirahat, aktivasyon, rezorpsiyon, sürecin tersine dönüşü ve formasyon basamaklarından oluşmaktadır (Tzelepi et al., 2009; Rowe et al., 2025).

### **Doruk Kemik Kütlesi**

İnsan yaşamında kemiklerin büyümesi ve mineral birikiminin tamamlanması ile kemik stabil hale gelerek maksimum kemik kütlesine ulaşılmaktadır. Bu maksimum kütle "Doruk Kemik Kütlesi (BMD)" olarak tanımlanmaktadır. Kadınlarda kemik kütlesi kaybı menopoz öncesi dönemde yılda %0,25-1 iken perimenopozal-postmenopozal dönemde yılda %2-5 olarak gözlenmektedir. Özellikle postmenopozal kadınlarda ilk 10 yılda kemik kütlesi kaybı yaklaşık %15 olarak raporlanmaktadır. Kemik dokusundaki her %10'luk azalma kemik kırılma riskini %10 kadar yükseltmektedir (Han et al., 2018; Seifert-Klauss et al., 2012).

### **Osteoporozun Tanımı ve Sınıflandırılması**

Osteoporoz, kemik dokusunun mikro yapısının bozulması sonucunda kemik kırılabilirliğinde ve kırık riskinde artış ile karakterize, sistemik bir iskelet hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Osteoporozun tanımı Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometresi (DEXA) kullanılarak kemik mineral yoğunluğu (BMD) ifadesi

kullanılarak yeniden düzenlendiğinde (Huang et al., 2024; Lorentzon & Cummings, 2015);

1. Normal: Genç erişkine göre kemik mineral yoğunluğunun ve kemik mineral içeriğinin 1 standart sapmanın (SD) altında bulunması
2. Osteopeni: BMD'nin genç erişkine göre -1,0 ile -2,5 SD arasında bulunması
3. Osteoporoz: BMD'nin genç erişkine göre -2,5 SD'dan fazla bulunması
4. Yerleşmiş Osteoporoz: BMD'nin genç erişkine göre -2,5 SD'dan fazla bulunması ve ek olarak bir veya daha fazla kırık bulunması olarak değerlendirilmektedir.

### **Osteoporozun Sınıflandırılması**

En sık gözlenen metabolik kemik hastalığı olan Osteoporozu etyolojisine göre primer (idiyopatik ve İnvölüsyonel) ve sekonder osteoporoz olarak sınıflandırılmaktadır. İdiyopatik osteoporoz (Juvenil ve adult) ve involüsyonel osteoporoz (postmenopozal osteoporoz (tip 1) ve senil osteoporoz (tip 2) alt gruplara ayrılmaktadır (Tzelepi et al., 2009; Lorentzon & Cummings, 2015).

### **Postmenopozal Osteoporoz**

Postmenopozal osteoporozda ortalama yaşam süresindeki uzamaya bağlı olarak kemik kırıklarında ki artışa bağlı olarak küresel bir halk sağlığı sorunudur. Bu sorun 50 ile 75 yaş arasındaki kadınlarda östrojen eksikliği ile karakterize olmaktadır. Kemik kaybı trabeküler kemikte kortikal kemiğe göre daha belirgin gözlenmektedir (Pizzato et al., 2018) Bu kemik kaybı düşük östrojen düzeylerine bağlı olarak osteoblast apoptozunda artışa ve osteoklastik aktiviteyi uyaran sitokinlerde artışa yol açmaktadır. Bu

kadınlarda en tipik klinik bulgu olarak küçük travmalardan sonra vertebra ve distal radius kırıklarının daha sık oluşmaktadır (Pizzato et al., 2018; Lorentzon & Cummings, 2015).

### **Osteoporozda Epidemiyoloji**

Osteoporoz Dünya’da 80 yaşın üzerindeki kadınların %70’inde gözlenmektedir. Bu yaş grubunda osteoporozla bağlı olarak kalça ve omurga kırıkları daha sık gözleendiğinden halk sağlığı sorunu olarak erken tanı, tedavi ve takibi yapılmaktadır. Özellikle osteoporozla bağlı vertebra kırığı gözlenen kadınların %20 kadarında da 1 yıl içinde yeni bir vertebra kırığı gözlenmektedir. Literatürde bu kadınlarda oluşan her vertebra kırığı kalça kırığı riskini her 3 yıl içinde 4,5 kat kadar arttırabildiği raporlanmaktadır (Pizzato et al., 2018; Lorentzon & Cummings, 2015; Melton & Cooper, 2001).

### **Osteoporozda Risk Faktörleri**

Osteoporozda risk faktörleri başlıca hem düşme sıklığını artmasına hem de kemik mineral yoğunluğunu azaltarak kemik kırıklarının daha kolay oluşmasına yol açmaktadır. Sigara ve alkol kullanımı, genetik, durağan yaşam, östrojen eksikliği, travma ve beslenme osteoporozda sık gözlenen risk faktörleridir (Pizzato et al., 2018; Lorentzon & Cummings, 2015; Melton & Cooper, 2001). Osteoporozda’ki hormonal risk faktörleri 6 aydan daha uzun süreli amenore varlığı, geç menarş dönemi, erken menopoz oluşumu, ooferektomi ve kısa doğurganlık süresidir (Pizzato et al., 2018; Lorentzon & Cummings, 2015; Melton & Cooper, 2001; Johnell & Kanis, 2006).

### **Osteoporoz Patogenezi**

Normal pubertal gelişim, fiziksel aktivite ve yeterli kalsiyum alımı BMD’ni belirlemektedir. Yaşam boyu kemiklerde ki yapım ve yıkım süreci bir denge oluşturmaktadır. Bu dengede östrojen osteoklast oluşumunu ve aktivitesini baskılayarak kemik

turnoverini sınırlamaktadır. Postmenapozal osteoporozda gözlenen östrojen eksikliğinde makrofajlardan, monositlerden, ve osteoblastlardan başlıca interlekin 6 (IL-6), IL-1, Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kappa- B Ligandı (RANKL) ve Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (M-CSF) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salındığı gösterilmektedir. Bu proinflamatuvar sitokinler hem apoptozu hem de osteositlerin ve osteoblastların yaşam sürelerini azaltabilmektedir (Melton & Cooper, 2001; Johnell & Kanis, 2006).

Postmenopozal osteoporozda östrojen eksikliğine bağlı olarak osteoprotegerin (OPG) sentezi ve osteoblastogenez de olumsuz etkilenmektedir (Mezquita-Raya et al., 2005; Stuss et al., 2016; Ji YF et al.). Osteoklast farklılaşma faktörü ya da OPG ligandı olarak da adlandırılan RANKL osteoklastların farklılaşmasında etkin görev almaktadır. RANKL hem kemik turn over'ında hem de patolojik kemik kırıklarının gözlenebildiği hastalıklarda (malignite, osteoporoz, romatoid artrit v.b) aktif rol almaktadır. Osteoblastlardan RANKL salınımı TGF- $\beta$  tarafından inhibe edilirken IL-11, IL 1 $\beta$ , prostoglandin-E2, Tümör Nekroz Faktörü (TNF- $\alpha$ ), Parathormon (PTH) ve 1,25- dihidroksivitamin D3 ile stimüle edilmektedir (Amarasekara et al.). M-CSF varlığında RANKL osteoklastların aktivasyonunu ve farklılaşmasını sağlayarak apoptozunu baskılamaktadır. (Amarasekara et al; Kışlak & Genç, 2019).

## **Osteoporozda Klinik**

Osteoporozu ilerlemiş vakalarda boy kısalması, spinal deformite, sırt ağrısı ve kırıklar gibi semptomlar görülebilse de sıklıkla ağrısız seyretmektedir. Trabeküler kemik kaybının daha fazla olduğu postmenopozal osteoporozda femur boynu, distal radius ve vertebra, kırıkları daha sık görülmektedir. Bu kırıklardan vertebra kırıklar radyografilerde raslantısal olarak raporlansa da çoğunlukla günlük yaşam aktiviteleri sırasında ve/veya spontan

olarak oluşabilmektedir. Osteoporozun en ciddi komplikasyonu mortalite ve morbidite oranı oldukça yüksek olan kalça kırıklarıdır (Pizzato et al., 2018).

### **Osteoporozda Tanı Yöntemleri**

Osteoporozun tanısında, tedavisinde ve takibinde geçmişten günümüze birçok biyokimyasal tetkikler, görüntüleme yöntemleri ve kemik biyopsisi kullanılmaktadır (Tella & Gallagher,2014).

### **Osteoporozda Biyokimyasal Tanı Yöntemleri**

Çoğu biyokimyasal belirteç primer osteoporozda tanımlanan referans aralıklarının içinde saptansa da bu testler osteoporozun ayırıcı tanısında kullanılmaktadır. Kemik yapım biyobelirteçleri osteoblastlardan sentezlenen osteokalsin, prokollajen tip I propeptidleri , kemiğe spesifik ALP ve total ALP iken osteoklastik aktivitede ki yıkım biyobelirteçleri hidrokspirolin, tip I kollajen telopeptidleri, tartarat rezistan asit fosfataz, deokspiridinolin ve piridinolindir (17). Osteoporozda kemik mineral yoğunluğu ile bu biyokimyasal belirteçlerin birlikte yorumlanmaktadır (Tella & Gallagher,2014; Szulc P et al., 1993).

### **Osteoporozda Görüntüleme Yöntemleri**

Osteoporozda radyolojik, dansitometrik foton absorbsiyometri ve diğer görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Radyolojik Yöntemler başlıca standart radyografi (Meunier, Spinal fraktur, Vertebral deformite, Kleerekoper, Vertebral korpus ve Singh indeksi), radyometri, kantitatif bilgisayarlı tomografi, dijital resim işleme ve radyolojik fotodansitometri olarak sınıflandırılmaktadır. Dansitometrik Foton Absorbsiyometrilere başlıca Tek Foton, Dual Foton, Tek-enerji X-ray ve Dual-enerji X-ray (Dual-energy X-ray absorptiometry-DEXA) olarak sınıflandırılmaktadır. Kantitatif Ultrasonografi ve Magnetik Rezonans diğer görüntüleme yöntemleridir ( Carey & Buehring, 2018).

Post menopozda vertebra kırıklarını ve BMD'nu raporlamakta Nielsen, Singh, Mc Closkey, Genant, Riggs, pinal fraktur, Vertebral korpus ve Meunier indeksleri kullanılmaktadır (Carey & Buehring, 2018; Clynes, 2020). Osteoporozun klinik değerlendirilmesinde DEXA altın standarttır. Kemik mineral yoğunluğu DEXA'da  $\text{gr/cm}^2$  olarak femur, ön kol, vertebra ve tüm vücut kemiklerinde ölçülmektedir. Kısa sürede ölçüm yapılması, düşük doz X-ışını kullanılması ve doğruluk oranının yüksek olması DEXA'nın avantajları iken dezavantajları ise yaşlılarda lomber omurga ölçümünün zorlukları ile trabeküler ve kortikal kemik ayrımını saptayamamasıdır (Carlson et al., 2018).

### **Osteoporozda Kemik Biyopsisi**

Kemik biyopsisi osteoporozda trabeküler kemiği histomorfometrik olarak kemik kalitesini değerlendirmektedir. Osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçların uzun dönemdeki güvenilirliğini ve etkinliğini takibinde de kullanılmaktadır (Compston et al., 2023).

### **Osteoporozda Medikal Tedavi**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre DEXA'da yapılan BMD'nun değerlendirilmesinde kullanılan t skoru "kemik kütlelerinin genç erişkin referans popülasyonunun ortalama doruk kemik kütleleri ile karşılaştırılmasının standart sapması olarak" tanımlanmaktadır. 65 yaş üzeri tüm kadınlar, malabsorpsiyon, aydan uzun süreli kortikosteroid kullanımı, nedeni açıklanmamış kırıklar, östrojen eksikliği olan premenopozal kadınlar, inflamatuvar barsak hastalığı, cerrahi menopoz, hipogonadizm, primer hiperparatiroidi ve tedavinin etkinliğini değerlendirmek gibi farklı endikasyonların değerlendirilmesinde t skoru kullanılmaktadır (Clynes, 2020; Carlson et al., 2018; Compston et al., 2023). T skorunun menopoz dışında bir veya daha fazla risk faktörü (boyda 2,5 cm' den fazla kısalma olması, radyolojide osteopeni saptanması, annede

ostoporotik kırık öyküsü varlığı, kırık öyküsü varlığı, kalsiyumdan fakir diyet, sigara, alkol ve kahve tüketimi) olan 65 yaş altında tüm postmenopozal kadınlarda ve kırık ile başvuran postmenopozal kadınlarda kullanılması önerilmektedir. Postmenopozda tedaviye t skoru  $< -2,0$  olan ve risk faktörü olmayan kadınlarda başlanmaktadır. 70 yaş üzerinde ve multiple kırıkları olan kadınlarda ise DEXA ile BMD ölçümü yapılmaksızın direkt osteoporoz tedavisi başlatılmaktadır (Carlson et al., 2018; Compston et al., 2023; Lewiecki et al.,2016) (19–22).

Osteoporozda kemiğin kalitesini ve gücünü arttırmak için medikal tedavide antikatabolik anabolik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu tedavi ile osteoporozda periferik ve vertebra kemik kırık riski azaltılmaktadır. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda Risedronat ve Alendronat kullanımı kalça ve omurga BMD'sini arttırmaktadır. Zolendronat ve İbandronat günümüzde BMD'yi arttırmak için osteoporoz tedavisinde kullanılmaktadır ( Eastell et al., 2019). Osteoporozun medikal tedavisinde ilk adım olarak D3 vitamini ve kalsiyumun birlikte kullanılması önerilmektedir. Ayrıca kalsitonin de osteoklast oluşumunu baskılayarak kemik rezorpsiyonunu azaltmaktadır ( Eastell et al., 2019; Ensrud & Crandall, 2018).

## **Omentin 1**

### **Omentin 1'in Patofizyolojisi**

Beyaz yağ dokusundan salgılanan aktif mediyatörler olan adipokinler obeziteyle ve obezite ile ilgili patolojik süreçlerde aktif rol almaktadır. Adipokinlerin immun sistem ve inflamatuvar cevap gibi birçok farklı patolojik süreçlerde de rolleri araştırılmaktadır. Peptid yapıdaki bu adipokinlerden başlıcaları IL-6, TNF-alfa, leptin, adiponektin, resistin, visfatin omentin ve vaspindir (Yoo & Choi, 2014). Adipokinlerin insan vücudunda iştah, beslenme, enerji dengesi, glukoz metabolizması ve insülin, lipid metabolizması, kan basıncının düzenlenmesi, koagülasyon, vasküler remodeling ve

inflamasyon gibi görevleri bulunmaktadır (Yoo & Choi, 2014; Ferroni et al., 2004)

İlk olarak intestinal paneth hücrelerinden izole edilen omentin ardından akciğerde, kalpte, plasentada, ovaryumda ve yağ dokusunda da tespit edildi (Barker et al., 2004). Tespit edildiği dokuya göre bu mediyatör intestinal laktoferrin reseptör, intellektin ve endotelyal lektin olarak da adlandırılmaktadır (Akiyama et al., 2013; Chen et al., 2020). Omentin 1 insan vücudunda bulunan majör form olsa da omentin 1 ile %83 kadar homoloji gösteren omentin 2 formu da mevcuttur. 1. kromozomun uzun kolunda omentin 1 ve/veya omentin 2 kodlayan genler ile vücut yağlanmasından ve/veya tip 2 Diabetes Mellitus (DM)'ten sorumlu olan genler yakın lokuslarda bulunmaktadır (Schäffler et al., 2007).

Antiinflamatuvar etki gösteren 313 aminoasitten oluşan omentin-1 visceral adipoz dokuda salınan bir proteindir. Rekombinant omentin-1'in *in vitro* koşullarda üretilmesiyle hem omental adipositlerde hemde subkutanda insülin aracılı glukoz alımının arttığı gözlenmektedir. Bu artışta Akt/protein kinaz B yolağında ki Omentin-1 aktif rol almaktadır (Schäffler et al., 2007; Zhao et al., 2022; Dec et al., 2023). Bir serin / treonin protein kinazı olan Akt hücresel olaylardan glukoz metabolizmasında, apoptozda ve hücre çoğalmasında ikinci haberci olarak görev almaktadır. Akt/protein kinaz B'yi aktive etmesiyle Omentin-1 adipositlere glikoz transportunu ve insülin sinyal iletisini artmaktadır. Obezlerde omentin-1' in gen ekspresyonunda azalma gözlenmektedir. Bu nedenle metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarda gözlenen obezitede omentin 1'in olumlu etkileri saptanmaktadır. Adiponektin ve HDL ile pozitif ilişkili kuran omentin 1; bel çevresi, BMI, insülin direnci, trigliserit ve leptin düzeyleri ile negatif ilişki kurmaktadır (Zhao et al., 2022; Dec et al., 2023; Bogucka-Kocka et al., 2023; Kadium et al., 2023).

TNF- $\alpha$  ile uyarılan omentin 1 AMPK/eNOS/NO yolağını inhibe ederek siklooksijenaz-2'nin ekspresyonunu baskılamaktadır. Omentin-1 hem osteoblastlarda RANKL üretimini baskılayarak proosteoklastik aktivitelerini azaltmakta hem de aktif makrofajların osteogenezde ki negatif etkisini önleyebilmektedir. Lipopolisakkaritler (LPS) nedeniyle oluşan akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS)'da omentin 1'in endotel hasarını ve akciğer iltihabını baskılayabildiği raporlanmaktadır (Qi et al., 2016; Rao et al., 2018). Literatürde AMP-aktive protein kinaz/Akt/nükleer faktör- $\kappa$ B/mitojen-aktive protein kinaz (ERK, JNK ve p38) gibi sinyal yollarında rol alan omentin 1 iskemik kalp hastalığı, metabolik sendrom, kanser, psikiyatrik ve nörolojik hastalıklar gibi bir çok farklı hastalık ile ilgili yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Dec et al., 2023; Yang & Gao2020; Ji, et al., 2023; Askin et al., 2020; Guo et al., 2013). Akt sinyal yolağında ki omentin nitrik oksit sentetaz enzimi vasıtasıyla anjiogenezi ve endotel hücrelerinin migrasyonunu invitro olarak azalttığından aterosklerozun patofizyolojisinde rol alabilmektedir. Yağ dokusu kökenli bu adipokinleri hedef alan ilaçların gelecekte geliştirilmesi ile hem ateroskleroza karşı koruyucu etki hem de insülin duyarlılığını artırılmasına olanak sağlanabilecektir. ( De Jager & Pasterkamp, 2016).

Literatürdeki bazı çalışmalarda vücut kitle indeksi (BMI), bel çevresi ve leptin seviyeleri gibi parametreler omentinle ters orantılı olduğu gösterilmektedir. Patofizyolojisinde obezite bulunabilen bozulmuş glukoz toleransı, tip 2 DM ve/veya polikistik over sendromu gibi hastalıklarda omentin sentezi azalmaktadır (Yoo & Choi, 2014; Ferroni et al., 2004; ( Barker et al., 2004). Literatürde kronik inflamasyon gözlenen romatoid artrit ve inflamatuvar barsak hastalığında omentin düzeylerinde azalma saptanmaktadır (Schäffler et al., 2007; Yang & Gao2020; Šenolt et al., 2009).

## **Postmenapozda Omentin 1'in rolü**

Adipositokinler (adiponektin, leptin v.b) ve omentin 1 birlikte kemik metabolizmasının düzenlenmesinde aktif rol almaktadır. Osteoporozda bu mediyatörler osteoblast sentezini uyarırken osteoklastları da baskılayabilmektedir ( Yang et al., 2016; Dikker et al., 2018; Anatolia, 2015). Literatürde postmenapozdaki kadınlarda serum omentin-1 düzeyinin sol kalça BMD'sinin güçlü bir belirleyicisi olduğu da raporlanlanmaktadır (Dikker et al., 2018; Anatolia, 2015; Wu et al., 2013). Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme sürecinin ve BMD'nin korunmasında omentin 1 aktif rol almaktadır (Anatolia, 2015; Wu et al., 2013; Kanaya & Chen, 2010; Menzel et al., 2016).

Osteoklast ve osteoblast prekürsörlerinin olduğu kökültürlerde fosfotidil inositol-3 kinaz - akt sinyal vasıtasıyla hem RANKL sentezini inhibe ederek osteoklastların olgunlaşmasını engellemekte hem de osteoblastlarda OPG sentezini arttırmaktadır (Mezquita-Raya et al., 2005; Stuss et al., 2016;. Menzel et al., 2016). Postmenopozal osteoporozda östrojen eksikliği osteoblastlarda RANKL üretiminde artışa yol açarken OPG üretiminde azalmaya Östrojen eksikliği osteoblastlarda RANKL üretiminde artışa, buna karşılık OPG üretimi azalmaktadır (Huang et al., 2024; Lorentzon & Cummings, 2015; Pizzato et al., 2018; Mezquita-Raya et al., 2005). Literatürde farklı hasta gruplarında BMD ile omentin-1 düzeylerinin ilişkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Schäffler et al., 2007; Yang & Gao2020; Šenolt et al., 2009; Tohidi et al., 2012, Wang et al., 2013; Assadi et al., 2011; Yin et al., 2015). Bu çalışmalardan bazılarında omentin1 düzeyi postmenopozal daha kadınlarda düşükken ( Wang et al., 2013), bazılarında çalışmalarda postmenopozal kadınlarda daha yüksek saptanmaktadır (Anatolia, 2015; Wu et al., 2013; Kanaya & Chen, 2010).

Literatürde in vivo ve in vitro olarak omentin-1' in kemik dokusu üzerine olumlu etkilerinin gözlemlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda omentin 1'in PI3K/Akt sinyal

yolunda osteoblast çoğalmasının arttığı ve farelerde osteoprotegerin sentezini arttırarak osteoklast oluşumunu azalttığı gösterilmektedir (Wu et al., 2013). Farelerde oluşturulan inflamatuvar osteoporoz modellerinde omentin 1'in antiinflamatuvar makrofajları arttırarak kemik kaybını engelleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmektedir. Bu yetenekle omentin 1 postmenapozal osteoporozda hem osteoklasın aşırı üretimi baskılanabilmekte hem de osteojenik potansiyel iyileştirilebilmektedir (Qi et al., 2016; Rao et al., 2018; Wu et al., 2013). OPG ve omentin 1 yeni adipokinlerin osteoanabolik ve kemik koruyucu özellikleri osteoporoz tedavisinde ki terapötik hedeflere olumlu katkılar sağlayabilmektedir ( Deepika et al., 2023). Omentin 1 düzeyindeki artış ile postmenapozda ki kadınlarda fizyolojik kompensasyon ve adaptasyon mekanizmalarının etkisiyle kemik kaybı önlenebilmektedir. (Yang et al., 2016)

## KAYNAKLAR

Akiyama, Y., Oshima, K., Kuhara, T., Shin, K., Abe, F., Iwatsuki, K., & vd. (2013). A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *Journal of Biochemistry*, 154(5), 437-448. . <https://doi.org/10.1093/jb/mvt073>

Amarasekara, D. S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., & Rho, J. (2018). Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Network*, 18(1), e8. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e8>

Anatolia, A. M. (2015). The association of omentin levels in non-diabetic postmenopausal women with bone mineral density and total body composition. *Acta Medica Anatolica*, 3(2), 51-57. <https://doi.org/10.15824/actamedica.00049>

Askin, L., Duman, H., Ozyıldız, A., Tanriverdi, O., & Turkmen, S. (2020). Association between omentin-1 and coronary artery disease: Pathogenesis and clinical research. *Current Cardiology Reviews*, 16(3), 198-201. <https://doi.org/10.2174/1573403X16666200511085304>.

Assadi M, Salimipour H, Akbarzadeh S, Nemati R, Jafari SM, Bargahi A, vd. Correlation of circulating omentin-1 with bone mineral density in multiple sclerosis: the crosstalk between bone and adipose tissue. *PloS One*.2011;6(9):e24240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024240>

Barker, G., Lim, R., Georgiou, H. M., & Lappas, M. (2004). Omentin-1 is decreased in maternal plasma, placenta and adipose tissue of women with pre-existing obesity. *Current Atherosclerosis Reports*, 6(6), 424-431. <https://doi.org/10.1007/s11883-004-0082-x>.

Bogucka-Kocka, Dec, M., A., Kocki, T., & Rogalska, A. (2023). Intestinal intelectin-1 (omentin): Distribution and physiological functions. *Cancers*, 15(15), 3797. <https://doi.org/10.3390/cancers15153797>

Carey JJ, & Buehring B. Current imaging techniques in osteoporosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2018 Sep-Oct;36 Suppl 114(5):115-126.

Carlson, B., Robinson, W., Wanderman, N., Nassr, A., Huddleston III, P., Yaszemski, M., & vd. (2018). The American Orthopaedic Association's Own the Bone® database: A national quality improvement project for the treatment of bone health in fragility fracture patients. *Osteoporosis International*, 29(9), 2101-2109. <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4585-7>.

Chen, L., Li, J., & Yang, G. (2020). A comparative review of intelectins. *Scandinavian Journal of Immunology*, 92(1), e12882. <https://doi.org/10.1111/sji.12882>.

Clynes MA, Westbury LD, Dennison EM, Kanis JA, Javaid MK, Harvey NC, & vd. Bone densitometry worldwide: a global survey by the ISCD and IOF. *Osteoporos Int*. 2020 May 6;31(9):1779–1786. <https://doi.org/10.1007/s00198-020-05435-8>

Compston, J., Skingle, L., & Dempster, D. W. (2003). Bone histomorphometry. *Methods in Molecular Medicine*, 80, 283-298. <https://doi.org/10.1385/1-59259-366-6:283>.

Dec, P., Poniewierska-Baran, A., Modrzejewski, A., & Pawlik, A. (2023). The role of omentin-1 in cancers development and progression. *Cancers*, 15(15), 3797. <https://doi.org/10.3390/cancers15153797>.

Deepika, F., Bathina, S., & Armamento-Villareal, R. (2023). Novel adipokines and their role in bone metabolism: A narrative review. *Biomedicines*, 11(2),644. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020644>.

De Jager SC, & Pasterkamp G. Atheroprotective properties of human Omentin-1 in experimental atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2016 May 1;110(1):1-3. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw040>.

Dikker, O., Bekpınar, S., Ozdemirler, G., Uysal, M., Vardar, M., Atar, S., & vd. (2018). Evaluation of the relation between omentin-1 and vitamin D in postmenopausal women with or without osteoporosis. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 126(5), 316-320. <https://doi.org/10.1055/s-0043-120110>.

Eastell R, Rosen CJ, Black DM, Cheung AM, Murad MH, Shoback D. Pharmacological management of osteoporosis in postmenopausal women: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 May 1;104(5):1595-1622. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00221>.

Ensrud KE, & Crandall CJ. Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *JAMA*. 2019 Nov 26;322(20):2017-2018. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.15781>.

Ferroni P, Basili S, Falco A, Davì G. Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Current atherosclerosis reports*. 2004;6(6):424-31.

Garnero, P. (2015). The role of collagen organization on the properties of bone. *Calcified Tissue International*, 97(3), 229-240. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9996-2>

Guo LJ, Jiang TJ, Liao L, Liu H, He HB. Relationship between serum omentin-1 level and bone mineral density in girls with anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest*. 2013 Mar;36(3):190-4. <https://doi.org/10.3275/8458>.

Han, Y., You, X., Xing, W., Zhang, Z., & Zou, W. (2018). Paracrine and endocrine actions of bone—the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Research*, 6, 16. [doi: 10.1038/s41413-018-0019-6](https://doi.org/10.1038/s41413-018-0019-6).

Huang, X., Ni, B., Li, Q., Liu, M., Zhao, M., Zhang, Y., & vd. (2024). Association between postmenopausal osteoporosis and IL-6, TNF- $\alpha$ : A systematic review and a meta-analysis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 27(15), 2260-2266. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.09.002>.

Ji YF, Jiang X, Li W, Ge X. Impact of interleukin-6 gene polymorphisms and its interaction with obesity on osteoporosis risk in Chinese postmenopausal women. *Environ Health Prev Med*. 2019 Jul 13;24(1):48. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0803-y>

Ji, L., Zhang, L., Liang, Z., Zhong, S., Liu, X., Liu, Z., & vd. (2023). Role of omentin-1 in susceptibility to anxiety and depression like behaviors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 574, 111990. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111990>.

Johnell, O., & Kanis, J. (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*, 17(12), 1726-1733. <https://doi.org/10.1007/s00198-006-0172-4>

Kadium, T. E., Alrubaie, A., & Ghanim, S. A. (2023). The link between serum omentin level and insulin resistance biomarkers, lipid profile, and atherogenic indices in Iraqi obese patients. *Baghdad Science Journal*, 20(1), 5. <https://doi.org/10.21123/bsj.2022.6535>

Kanaya N, & Chen S. Conjugated linoleic acid reduces body weight gain in ovariectomized female C57BL/6J mice. *Nutr Res* . 2010 Oct;30(10):714-21. [doi: 10.1016/j.nutres.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.09.001).

Kıslak P, & Genç F. Osteoporoz ve Tedavisi. *Lectio Scientific Journal of Health and Natural Sciences*, July 2019, Volume 3, Issue 1, 1—18.

Lewiecki EM, Binkley N, Morgan SL, Shuhart CR, Camargos BM, Carey JJ, & vd. Best practices for dual-energy X-ray absorptiometry measurement and reporting: *International Society for Clinical Densitometry Guidance J Clin Densitom*. 2016 Apr-Jun;19(2):127-40. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2016.03.003>

Lorentzon, M., & Cummings, S. R. (2015). Osteoporosis: The evolution of a diagnosis. *Journal of Internal Medicine*, 277(6), 650-661. <https://doi.org/10.1111/joim.12369>.

Menzel, J., Di Giuseppe, R., Biemann, R., Aleksandrova, K., Kuxhaus, O., Wittenbecher, C., & vd. (2016). Association between omentin-1, adiponectin and bone health under consideration of osteoprotegerin as possible mediator. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(11), 1347-1355. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0544-3>

Mezquita-Raya, P., de la Higuera, M., Garcia, D. F., Alonso, G., Ruiz-Requena, M. E., de Dios Luna, J., & vd. (2005). The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporosis International*, 16(11), 1368-1374. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-1844-1>

Qi, D., Tang, X., He, J., Wang, D., Zhao, Y., Deng, W., & vd. (2016). Omentin protects against LPS-induced ARDS through suppressing pulmonary inflammation and promoting endothelial barrier via an Akt/eNOS-dependent mechanism. *Cell Death & Disease*, 7(9), e2360. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.265>.

Rao, S. S., Hu, Y., Xie, P. L., Cao, J., Wang, Z. X., Liu, J. H., & vd. (2018). Omentin-1 prevents inflammation-induced osteoporosis by downregulating the pro-inflammatory cytokines. *Bone Research*, 6, 9. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0012-0>

Rowe, P., Koller, A., & Sharma, S. (2025). *Physiology, Bone Remodeling*. StatPearls Publishing. 2025 Jan. 2023 Mar 17. PMID: 29763038. Bookshelf ID: NBK499863

Schäffler A, Zeitoun M, Wobser H, Buechler C, Aslanidis C, Herfarth H. Frequency and significance of the novel single nucleotide missense polymorphism Val109Asp in the human gene encoding omentin in Caucasian patients with type 2 diabetes mellitus or chronic inflammatory bowel diseases. *Cardiovasc Diabetol*. 2007 Feb 13;6:3. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-6-3>

Seifert-Klauss, V., Fillenber, S., Schneider, H., Lupp, P., Mueller, D., & Kiechle, M. (2012). Bone loss in premenopausal, perimenopausal and postmenopausal women: Results of a prospective observational study over 9 years. *Climacteric*, 15(5), 433-440. <https://doi.org/10.3109/13697137.2012.658110>

Šenolt L, Polanská M, Filková M, Cerezo LA, Pavelka K, & Gay S,. Vaspin and omentin: new adipokines differentially regulated at the site of inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*2010Jul;69(7):14101. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.119735>

Stuss, M., Sewerynek, E., Król, I., Kłos, W. S., & Jędrzejczyk, S. (2016). Assessment of OPG, RANKL, bone turnover markers serum levels and BMD after treatment with strontium ranelate and ibandronate in patients with postmenopausal osteoporosis. *Endokrynologia Polska*, 67(2), 174-184. <https://doi.org/10.5603/EP.a2016.0014>.

Szulc P, Bauer DC, Eastell R. Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1993 Dec;8 Suppl 2:S549-55. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650081323>.

Tella SH, & Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Jul;142:155-70. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.008>.

Tohidi M, Akbarzadeh S, Larijani B, Kalantarhormozi M, Ostovar A, Assadi M, vd. Omentin-1, visfatin and adiponectin levels in relation to bone mineral density in Iranian postmenopausal women. *Bone.* 2012 Nov;51(5):876-81. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.08.117>. Epub 2012 Aug 19.

Tzelepi, V., Tsamandas, A. C., Zolota, V., & Scopa, C. D. (2009). Bone anatomy, physiology and function. In *Bone Metastases: A Translational and Clinical Approach* (pp. 3-30). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9819-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9819-2_1)

Wang D, Jiang TJ, Liao L, Huang J. Relationships between serum omentin-1 concentration and bone mineral density, and bone biochemical markers in Chinese women. *Clin Chim Acta.* 2013 Nov 15;426:64-7. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.09.002>. Epub 2013 Sep 12.

Wu, S. S., Liang, Q. H., Liu, Y., Cui, R. R., Yuan, L. Q., & Liao, E. Y. (2013). Omentin-1 stimulates human osteoblast proliferation through PI3K/Akt signal pathway. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 368970. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111990>

Yang, J., & Gao, Y. (2020). Clinical relevance of serum omentin-1 levels as a biomarker of prognosis in patients with acute cerebral infarction. *Brain and Behavior*, 10(7), e01678. <https://doi.org/10.1002/brb3.1678>

Yang, L., Zhao, X. L., Liao, B., & Qin, A. P. (2016). Relationships between serum Omentin-1 levels and bone mineral density in older men with osteoporosis. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 2(1), 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2016.02.003>

Yin J, Hou P, Wu Z, Nie Y. Decreased levels of serum omentin-1 in patients with inflammatory bowel disease. *Med Sci Monit*. 2015 Jan 10;21:118-22. <https://doi.org/10.12659/MSM.892081>

Yoo HJ, & Choi KM. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J Diabetes*. 2014 Jun 15;5(3):357-63. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i3.357>

Zhao, A., Xiao, H., Zhu, Y., Liu, S., Zhang, S., Yang, Z., & vd. (2022). Omentin-1: A newly discovered warrior against metabolic related diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 26(3), 275-289. <https://doi.org/10.1080/14728222.2022.203755>

# MODERN TOKSİKOLOJİK ANALİZDE LC-MS/MS: TARAMA, DOĞRULAMA VE KLİNİK UYGULAMALAR

UĞUR FAHRİ YÜREKLİ<sup>1</sup>

## 1. GİRİŞ

Klinik toksikoloji, ilaçlar, kimyasallar ve biyolojik ajanlara bağlı zehirlenmelerin tanı, izlem ve tedavisini kapsayan disiplinler arası bir alandır. Günümüzde hem akut zehirlenme olgularının artışı hem de yeni psikoaktif maddelerin hızla piyasaya girmesi, klinik ve adli laboratuvarlarda hızlı, güvenilir ve geniş kapsamlı analitik yöntemlere olan gereksinimi artırmıştır. Bu bağlamda sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS), biyolojik örneklerde ilaç, metabolit ve toksinlerin yüksek duyarlılık ve özgüllükle saptanabilmesi nedeniyle klinik ve adli toksikolojinin temel analitik araçlarından biri haline gelmiştir (Maurer, 1998).

LC-MS/MS teknolojisi, kan, plazma, idrar ve diğer biyolojik örneklerde çok sayıda analitin eş zamanlı tespiti ve kantifikasyonu için kullanılabilir. Bu yöntem, hem terapötik ilaç düzeyi izleminde hem de zehirlenme olgularında tanısal doğrulama amacıyla yaygın şekilde uygulanmaktadır. Klinik laboratuvarlarda immünoassay temelli tarama testlerine kıyasla daha yüksek analitik özgüllük sunması, LC-MS/MS'nin doğrulama testi olarak "altın standart" konumuna yerleşmesine katkı sağlamıştır (Wu & French, 2013).

---

<sup>1</sup> Doç. Dr, S.B.Ü. Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya, Orcid: 0000-0002-7969-5196

Toksikolojik analizlerin klinik değeri yalnızca analitik doğrulukla sınırlı değildir; sonuçların hızlı ve doğru yorumlanması, hasta yönetimini doğrudan etkileyebilir. Özellikle acil servis ve yoğun bakım ortamlarında bilinmeyen madde maruziyetlerinin aydınlatılması, uygun antidot tedavisi ve destekleyici bakımın planlanması açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle modern klinik toksikoloji, tarama ve doğrulama testlerini birlikte kullanan çok aşamalı bir yaklaşımı benimsemektedir (Wu et al., 2012).

## **Klinik Toksikolojiye Genel Bakış**

### **Klinik toksikolojinin tanımı ve kapsamı**

Klinik toksikoloji; terapötik ilaçlar, suistimal edilen maddeler, çevresel toksinler ve kimyasal ajanlara bağlı maruziyetlerin biyolojik örneklerde saptanması ve klinik sonuçlarının değerlendirilmesini kapsar. Bu disiplin, hem akut zehirlenme olgularının yönetiminde hem de kronik maruziyetlerin izlenmesinde analitik toksikoloji ile yakın ilişki içindedir. Modern klinik toksikoloji uygulamaları, biyolojik örneklerde ilaç ve toksinlerin identifikasyonu ve kantifikasyonu için LC-MS ve LC-MS/MS gibi gelişmiş analitik yöntemlere dayanmaktadır (Maurer, 1998).

Klinik toksikolojinin kapsamı; acil zehirlenme olguları, terapötik ilaç düzeyi izlem programları, bağımlılık ve suistimal maddelerinin saptanması, çevresel ve mesleki maruziyetlerin değerlendirilmesi ile adli toksikolojik incelemeleri içerir. Bu geniş kapsam, farklı örnek türlerinin (kan, idrar, saç, doku vb.) analizini ve farklı analitik stratejilerin entegrasyonunu gerektirir (Maurer, 1998).

### **Toksikolojik tarama ve doğrulama kavramları**

Toksikolojik analizlerde genellikle iki aşamalı bir yaklaşım uygulanır: tarama ve doğrulama. Tarama testleri, geniş bir analit panelini hızlı şekilde değerlendirmek için kullanılır ve çoğunlukla immünoassay temelli yöntemlere dayanır. Ancak bu testler çapraz

reaksiyonlara bağlı yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuçlar verebilir. Bu nedenle pozitif tarama sonuçlarının daha özgül yöntemlerle doğrulanması gerekir (Wu & French, 2013).

LC-MS/MS ve GC-MS gibi kütle spektrometrik yöntemler, doğrulama aşamasında yüksek seçicilik ve duyarlılık sağlayarak hedef analitin kesin tanımlanmasına olanak tanır. Tandem kütle spektrometrisi, belirli iyon geçişlerinin izlenmesi sayesinde kompleks biyolojik matrislerde düşük konsantrasyonlardaki bileşiklerin güvenilir biçimde saptanmasını mümkün kılar. Bu nedenle LC-MS/MS, klinik toksikolojide doğrulama testlerinin temelini oluşturur (Lynch et al., 2010).

### **Acil servis, yoğun bakım ve adli tıpta toksikolojik analizlerin rolü**

Acil servis ve yoğun bakım ünitelerinde bilinmeyen madde maruziyeti ile başvuran hastalarda hızlı ve doğru toksikolojik analizler, tanı ve tedavi süreçlerini yönlendiren kritik bir faktördür. LC-MS/MS ve benzeri yöntemler, hedefli analizlerde yüksek duyarlılık sunarak zehirlenmeye neden olan ajanın saptanmasına yardımcı olur. Bununla birlikte, sonuçların elde edilme süresi ve analiz kapsamı klinik karar süreçlerini etkileyebileceğinden laboratuvar-klinik iş birliği büyük önem taşır (Wu et al., 2012).

Adli toksikoloji alanında ise biyolojik örneklerde ilaç ve toksinlerin saptanması, ölüm nedeninin belirlenmesi, madde suistimali ve zehirlenme vakalarının aydınlatılması açısından temel rol oynar. LC-MS/MS, çoklu analit analizi ve düşük konsantrasyonlardaki bileşiklerin saptanabilmesi sayesinde hem klinik hem de adli ortamlarda geniş uygulama alanına sahiptir (Maurer, 1998).

### **Tarama ve doğrulama testlerinin klinik karar süreçlerindeki önemi**

Toksikolojik test sonuçları, klinik yönetim kararlarını doğrudan etkileyebilir. Örneğin belirli bir ilacın veya toksinin saptanması, antidot uygulaması, diyaliz endikasyonu veya destek tedavisinin planlanması açısından belirleyici olabilir. Bununla birlikte, yalnızca tarama testlerine dayanmak hatalı klinik kararlara yol açabileceğinden, doğrulama testleri klinik güvenilirlik açısından kritik öneme sahiptir (Wu & French, 2013).

LC-MS/MS teknolojisinin klinik karar süreçlerindeki katkısı, yüksek özgüllük ve duyarlılığa dayalı doğru tanımlama sağlamasıdır. Tandem kütle spektrometrik yöntemlerin kullanılması, yanlış pozitif sonuçların azaltılmasına ve klinik yorumlamanın daha güvenilir yapılmasına olanak tanır. Bu nedenle modern klinik toksikoloji uygulamalarında tarama ve doğrulama testleri birbirini tamamlayan süreçler olarak değerlendirilmekte ve LC-MS/MS bu entegrasyonun merkezinde yer almaktadır (Lynch et al., 2010).

## **Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Yöntemler**

### **İmmünoassay temelli tarama yöntemleri**

Toksikolojik taramada immünoassay yöntemleri uzun yıllardır ilk basamak tarama testi olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler, antijen-antikor etkileşimine dayalı olup genellikle idrar veya serum gibi biyolojik örneklerde belirli ilaç sınıflarının hızlı ve düşük maliyetli şekilde saptanmasını sağlar. Klinik ve adli toksikoloji laboratuvarlarında immünoassay testlerinin temel rolü, geniş örnek hacimlerinde hızlı ön tarama yaparak doğrulama testlerine yön vermektir (Kahl et al., 2019).

Bununla birlikte immünoassay yöntemlerinin bazı önemli sınırlılıkları vardır. Yapısal olarak benzer moleküller arasında çapraz reaksiyonlar görülebilmekte ve bu durum yalancı pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Ayrıca test panellerine yeni ilaç veya metabolitlerin eklenmesi çoğu zaman sınırlıdır ve düşük konsantrasyondaki maddeler saptanamayabilir. Bu nedenle

immünoassay sonuçlarının klinik veya adli karar süreçlerinde doğrudan doğrulayıcı test olarak kullanılması uygun değildir; genellikle daha özgül ve duyarlı yöntemlerle doğrulama gereklidir (Kahl et al., 2019).

Günümüzde birçok laboratuvar, immünoassay temelli tarama testlerini kütle spektrometrisi tabanlı doğrulama yöntemleri ile birlikte kullanmaktadır. Bu yaklaşım, hem hızlı ön tarama yapılmasını hem de doğrulama aşamasında yüksek özgüllük sağlanmasını mümkün kılar (Kahl et al., 2019).

### **Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS)**

Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), klinik ve adli toksikolojide uzun yıllar “altın standart” doğrulama yöntemi olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem, uçucu veya türevlendirilebilir bileşiklerin yüksek özgüllükle ayrılması ve kütle spektrumları aracılığıyla tanımlanmasını sağlar. GC-MS, özellikle ilaçlar, toksinler ve metabolitlerin nitel ve nicel analizinde yüksek doğruluk sunar ve geniş spektral kütüphaneler sayesinde tanımlama gücü yüksektir (Wu et al., 2012).

GC-MS'nin en önemli avantajları arasında iyi karakterize edilmiş kütüphane verileri, yüksek doğruluk ve standardize edilmiş yöntemlerin bulunması yer alır. Bununla birlikte, uçucu olmayan veya termal olarak kararsız bileşiklerin analizinde türevlendirme gereksinimi önemli bir dezavantajdır. Ayrıca örnek hazırlama süreçleri LC-MS/MS'ye göre daha uzun ve karmaşık olabilir (Wu et al., 2012).

GC-MS, günümüzde hâlâ doğrulama testlerinde önemli bir rol oynamakla birlikte, daha geniş ilaç panellerinin analizine olan ihtiyaç ve daha hızlı sonuç gereksinimi nedeniyle LC-MS/MS gibi alternatif teknolojilerle birlikte kullanılmaktadır (Lynch et al., 2010).

### **Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)**

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), toksikolojik analizlerde özellikle kütle spektrometrisi ile kombine edilmeden önce yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. HPLC, sıvı fazda ayırım prensibine dayanır ve ultraviyole (UV), floresans veya elektrokimyasal dedektörlerle birlikte kullanılabilir. Bu yöntem, özellikle termal olarak kararsız veya polar bileşiklerin analizinde avantaj sağlar (Lynch et al., 2010).

Ancak tek başına HPLC'nin özgüllüğü ve duyarlılığı, kompleks biyolojik örneklerde çok sayıda ilacın eşzamanlı analizinde sınırlı kalabilmektedir. Bu nedenle HPLC-UV gibi yöntemler günümüzde daha çok ön tarama veya belirli hedef bileşiklerin nicel analizinde kullanılmakta; kapsamlı toksikolojik taramada ise LC-MS/MS gibi daha özgül tekniklere yerini bırakmaktadır (Lynch et al., 2010).

### **LC-MS/MS teknolojisinin gelişimi ve diğer yöntemlerle karşılaştırılması**

Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS), son yirmi yılda klinik toksikoloji laboratuvarlarında en hızlı gelişen ve en yaygın kullanılan teknolojilerden biri haline gelmiştir. LC-MS/MS, sıvı kromatografinin ayırma gücünü, tandem kütle spektrometrisinin yüksek özgüllük ve duyarlılığı ile birleştirerek çok sayıda ilacın ve metabolitin aynı analizde saptanmasını mümkün kılar. Bu teknoloji, hem tarama hem doğrulama amacıyla kullanılabilir (Viette et al., 2012).

LC-MS/MS'nin en önemli avantajları arasında düşük tespit limitleri, yüksek özgüllük, geniş analiz paneli ve minimal örnek hazırlama gereksinimi yer alır. Ayrıca otomasyon olanakları ve hızlı analiz süreleri, özellikle acil klinik durumlarda önemli bir avantaj sağlar. LC-MS/MS yöntemlerinin, GC-MS veya LC-UV gibi yöntemlere kıyasla daha fazla sayıda ilacı ve metaboliti saptayabildiği gösterilmiştir (Lynch et al., 2010).

GC-MS ile karşılaştırıldığında LC-MS/MS'nin örnek hazırlama sürecinin daha kolay olduğu ve otomasyona daha uygun olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, her iki yöntemin de birbirini tamamlayıcı özellikleri vardır; bazı uçucu bileşikler için GC-MS hâlâ üstün olabilirken, polar ve termal olarak kararsız bileşiklerde LC-MS/MS daha avantajlıdır (Wu et al., 2012).

İmmünoassay yöntemleriyle karşılaştırıldığında ise LC-MS/MS, daha düşük yalancı pozitif oranı ve genişletilebilir analiz panelleri sayesinde daha güvenilir sonuçlar sağlar. Bu nedenle modern toksikoloji laboratuvarlarında LC-MS/MS giderek tarama ve doğrulama süreçlerinin merkezine yerleşmektedir (Swanson et al., 2022).

Sonuç olarak, günümüzde klinik ve adli toksikolojik analizlerde etkili yaklaşım; immünoassay temelli hızlı tarama testlerinin, LC-MS/MS ve gerektiğinde GC-MS gibi yüksek özgüllük sağlayan doğrulama yöntemleri ile birlikte kullanılmasıdır. Bu çok katmanlı yaklaşım, hem hızlı klinik karar verme süreçlerini desteklemekte hem de analitik doğruluğu artırmaktadır (Lynch et al., 2010).

### **LC-MS/MS Teknolojisinin Temel Prensipleri**

LC-MS/MS (sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi), sıvı kromatografik ayırım ile kütle spektrometrik tanımlama ve kantifikasyonu birleştiren güçlü bir analitik platformdur. Klinik ve adli toksikolojide geniş analit panellerinin yüksek duyarlılık ve özgüllükle analiz edilmesini mümkün kılan bu teknoloji, özellikle kompleks biyolojik matrikslerde düşük konsantrasyonlardaki ilaç ve metabolitlerin saptanmasında önemli avantajlar sunar. LC-MS/MS sistemleri temel olarak üç ana bileşenden oluşur: kromatografik ayırma sistemi, iyonizasyon kaynağı ve kütle analizörleri (Viette et al., 2012).

### **Sıvı kromatografisinin temel bileşenleri**

Sıvı kromatografisi, analitlerin mobil ve sabit faz arasındaki dağılım farklarına dayanarak ayrılmasını sağlar. LC-MS/MS sistemlerinde kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC veya UHPLC), kompleks biyolojik örneklerdeki bileşiklerin ayrımını sağlayarak kütle spektrometresine giren matriks bileşenlerini azaltır ve analitik özgüllüğü artırır. LC sisteminin temel bileşenleri mobil faz rezervuarları, pompa sistemi, örnek enjeksiyon ünitesi, kromatografik kolon ve dedektör arayüzünden oluşur (Lynch et al., 2010).

Kolon seçimi (ters faz, iyon değişim vb.), mobil faz bileşimi ve gradient programı, analitlerin ayırım verimliliğini doğrudan etkiler. Klinik toksikolojide genellikle ters faz C18 kolonlar tercih edilir ve organik çözücüler (metanol veya asetonitril) ile tampon sistemleri birlikte kullanılır. Bu ayırma süreci, aynı anda çok sayıda ilacın analiz edilmesine olanak tanır ve kütle spektrometresinin seçiciliğini artırır (Lynch et al., 2010).

### **Kütle spektrometrisinin çalışma prensibi**

Kütle spektrometrisi, moleküllerin iyonize edilmesi, kütle-yük oranlarına ( $m/z$ ) göre ayrılması ve deteksiyonuna dayanan bir analiz tekniğidir. LC-MS/MS sistemlerinde kromatografiden çıkan analitler önce iyonizasyon kaynağında iyonlaştırılır, ardından kütle analizörüne yönlendirilir. Kütle analizörü, iyonları  $m/z$  değerlerine göre ayırarak detektöre iletir ve her bileşik için karakteristik bir kütle spektrumu elde edilir (Maurer, 1998).

Klinik toksikolojide kullanılan kütle analizörleri arasında üçlü kuadrupol, iyon tuzağı ve yüksek çözünürlüklü analizörler yer alır. Üçlü kuadrupol sistemler, özellikle kantitatif analizlerde yüksek duyarlılık ve tekrarlanabilirlik sağlaması nedeniyle en yaygın kullanılan platformdur. Bu sistemlerde ilk kuadrupol hedef iyonu seçer, ikinci kuadrupol çarpışma hücresi olarak görev yapar ve üçüncü kuadrupol fragment iyonları analiz eder (Viette et al., 2012).

## **Tandem kütle spektrometrisi (MS/MS)**

Tandem kütle spektrometrisi, seçilen bir öncü iyonun parçalanması ve ortaya çıkan ürün iyonlarının analiz edilmesi prensibine dayanır. Bu yaklaşım, kompleks biyolojik matrislerde analitlerin daha yüksek özgüllükle tanımlanmasını sağlar. MS/MS analizinde ilk kütle analizörü hedef iyonu seçer, çarpışma hücrelerinde bu iyon parçalanır ve ikinci analizör oluşan fragmentleri ölçer (Viette et al., 2012).

Bu süreç, yalnızca belirli iyon geçişlerinin izlenmesine olanak tanıdığı için yanlış pozitif sonuçların azaltılmasına katkı sağlar. Özellikle klinik toksikolojide çok sayıda analitin eş zamanlı analizinde MS/MS teknolojisi yüksek seçicilik ve doğruluk sunar. Bu nedenle LC-MS/MS, hem doğrulama hem de kantitatif analizlerde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Lynch et al., 2010).

## **İyonizasyon teknikleri (ESI, APCI vb.)**

LC-MS/MS sistemlerinde en yaygın kullanılan iyonizasyon teknikleri elektrospay iyonizasyonu (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonudur (APCI). ESI, özellikle polar ve termal olarak kararsız moleküllerin analizinde tercih edilir ve biyolojik örneklerdeki ilaçların büyük bölümünün iyonizasyonu için uygundur. Bu teknikte analitler çözüldükten gaz fazına geçirilerek yüklü damlacıklar oluşturulur ve iyonlar elde edilir (Viette et al., 2012).

APCI ise daha az polar ve uçucu bileşiklerin iyonizasyonunda avantaj sağlar. Bu yöntemde mobil faz buharlaştırılır ve analitler iyonlaştırıcı reaktif iyonlar aracılığıyla iyonize edilir. ESI ve APCI teknikleri, farklı kimyasal özelliklere sahip bileşiklerin analizine olanak tanıyarak LC-MS/MS sistemlerinin kapsamını genişletir (Viette et al., 2012).

## **Dedektör sistemleri ve analiz modları**

Kütle spektrometresinde dedektör, ayrılan iyonların sinyalinini ölçerek analitik veriyi oluşturur. Üçlü kuadrupol sistemlerde dedeksiyon genellikle elektron çarpan tüpleri veya benzeri yüksek duyarlılıklı detektörlerle gerçekleştirilir. Analiz modları arasında tam tarama (full scan), seçilmiş iyon izleme (SIM) ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) bulunur (Lynch et al., 2010).

Tam tarama modunda geniş bir m/z aralığı analiz edilerek bilinmeyen bileşiklerin saptanması mümkün olurken, hedefli analizlerde MRM modu tercih edilir. Klinik toksikolojide genellikle hedefli analizler ön planda olduğundan, MRM modu yüksek duyarlılık ve özgüllük nedeniyle en yaygın kullanılan analiz modudur (Lynch et al., 2010).

### **Çoklu reaksiyon izleme (MRM) ve seçicilik**

Çoklu reaksiyon izleme (MRM), LC-MS/MS sistemlerinde belirli bir öncü iyon ile buna karşılık gelen ürün iyonunun eş zamanlı izlenmesine dayanan bir analiz modudur. Bu yaklaşım, hem analitin doğrulanmasını hem de kantitatif ölçümünü yüksek doğrulukla gerçekleştirmeye olanak tanır. Her analit için karakteristik iyon geçişlerinin seçilmesi, kompleks biyolojik matrikslerde yüksek seçicilik sağlar (Viette et al., 2012).

MRM modunun en önemli avantajı, aynı analizde çok sayıda analitin eş zamanlı olarak izlenebilmesidir. Bu özellik, klinik ve adli toksikoloji laboratuvarlarında geniş ilaç panellerinin hızlı ve güvenilir şekilde analiz edilmesini mümkün kılar. MRM, düşük tespit limitleri ve yüksek doğruluk sağlaması nedeniyle LC-MS/MS tabanlı toksikolojik analizlerin temelini oluşturmaktadır (Lynch et al., 2010).

### **Klinik Toksikolojide LC-MS/MS Uygulamaları**

LC-MS/MS teknolojisi, klinik ve adli toksikolojide hem hedefli hem de geniş kapsamlı analizlerde giderek artan şekilde kullanılmaktadır.

Yüksek duyarlılık, özgüllük ve çoklu analit analizi yapabilme kapasitesi sayesinde bu teknoloji; ilaç ve metabolitlerinin kantifikasyonu, madde suistimali taraması, terapötik ilaç izlem programları ve zehirlenme olgularının değerlendirilmesinde temel analitik araçlardan biri haline gelmiştir. Özellikle kompleks biyolojik matrislerde düşük konsantrasyonlardaki analitlerin güvenilir biçimde saptanabilmesi, LC-MS/MS'yi modern klinik toksikolojinin merkezine yerleştirmiştir (Viette et al., 2012).

### **İlaç ve metabolitlerinin kantitatif analizi**

LC-MS/MS'nin klinik toksikolojide en önemli kullanım alanlarından biri ilaç ve metabolitlerinin kantitatif analizidir. Bu teknoloji, geniş bir ilaç yelpazesinde düşük tespit limitleri ile güvenilir ölçüm yapılmasına olanak tanır. Analitlerin özgül iyon geçişleri üzerinden kantifikasyon yapılabilmesi, biyolojik örneklerdeki matris etkisinin azaltılmasını ve yüksek doğruluk elde edilmesini sağlar.

Günümüzde antiepileptikler, antidepresanlar, benzodiazepinler, opioidler ve kardiyovasküler ilaçlar gibi birçok farmakolojik ajan LC-MS/MS ile kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Ayrıca metabolitlerin de eş zamanlı saptanabilmesi, ilaç alımının doğrulanması ve metabolik yolların değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bu özellikler, özellikle çoklu ilaç kullanımının yaygın olduğu klinik ortamlarda LC-MS/MS'yi vazgeçilmez kılmaktadır (Lynch et al., 2010).

### **İlaç suistimali ve bağımlılık taraması**

Madde suistimali ve bağımlılık değerlendirmesinde LC-MS/MS geniş bir analit panelinin aynı analizde saptanmasına olanak tanır. İmmünoassay tarama testleri hızlı sonuç vermekle birlikte sınırlı özgüllüğe sahiptir; bu nedenle pozitif sonuçların doğrulanması ve genişletilmiş panel analizleri için LC-MS/MS tercih edilmektedir.

Opioidler, amfetaminler, kokain metabolitleri, sentetik kannabinoidler ve yeni psikoaktif maddeler gibi birçok suistimal edilen madde LC-MS/MS ile yüksek duyarlılıkla saptanabilir. Bu yöntem, hem klinik bağımlılık izlem programlarında hem de işyeri taramalarında güvenilir sonuçlar sağlar. Ayrıca yeni ortaya çıkan psikoaktif maddelerin analitik olarak tanımlanabilmesi, LC-MS/MS'nin esnek ve genişletilebilir yapısının önemli bir avantajıdır (Kahl et al., 2019).

### **Terapötik ilaç düzeyi izlemi**

Terapötik ilaç düzeyi izlemi (TDM), dar terapötik aralığa sahip ilaçların güvenli ve etkili kullanımını sağlamak amacıyla yapılır. LC-MS/MS, yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlaması nedeniyle TDM uygulamalarında giderek daha fazla tercih edilmektedir. Özellikle immünoassay yöntemlerinin çapraz reaksiyon riskine sahip olduğu durumlarda LC-MS/MS daha güvenilir sonuçlar sunar (Chiurchiu et al., 2015).

Antiepileptikler, immünsüpresif ilaçlar, antipsikotikler ve bazı antibiyotiklerin izlenmesinde LC-MS/MS yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı analizde birden fazla ilacın ölçülebilmesi, polifarmasi durumlarında klinik yönetimi kolaylaştırır. Bu teknoloji, bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının gelişmesine de katkı sağlamaktadır (Wu & French, 2013).

### **Zehirlenme olgularında hızlı tanı**

Acil servis ve yoğun bakım ortamlarında bilinmeyen madde maruziyetine bağlı zehirlenmelerin hızlı şekilde aydınlatılması klinik açıdan kritik öneme sahiptir. LC-MS/MS, hedefli analizlerde yüksek duyarlılık sağlayarak zehirlenmeye neden olan ajanın kısa sürede saptanmasına yardımcı olur. Bu durum, uygun antidot tedavisinin planlanması ve hasta yönetiminin yönlendirilmesi açısından önemlidir (Wu et al., 2012; Yu et al., 2024).

Geniş spektrumlu LC-MS/MS tarama panelleri, çoklu ilaç alımı veya yeni psikoaktif madde maruziyeti gibi karmaşık olgularda tanısal belirsizliği azaltır. Bu yöntemler, farklı ilaç ve toksin sınıflarının aynı anda saptanmasına ve geniş analit panellerinin güvenilir şekilde taranmasına olanak tanıyarak klinik ve adli toksikolojide önemli avantaj sağlar (Florou et al., 2024). Ayrıca toksik ve terapötik düzeylerin kantitatif olarak belirlenebilmesi, tedavi sürecinin izlenmesi ve klinik prognozun değerlendirilmesinde kritik rol oynar; LC-MS/MS temelli çoklu ilaç analizleri klinik örneklerde eşzamanlı kantifikasyon ve yüksek duyarlılık ile bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (Gqamana & Zhang, 2024). Yeni psikoaktif maddelerin hızla değişen yapısal çeşitliliği de geniş spektrumlu LC-MS/MS ve benzeri ileri analitik yöntemlerin kullanımını zorunlu kılmakta ve bu tekniklerin klinik-toksikolojik tanıda önemini artırmaktadır (Marandiuc et al., 2025).

### **Pediyatrik ve neonatal toksikoloji uygulamaları**

Pediyatrik ve neonatal hasta grubunda düşük örnek hacmi ile yüksek duyarlılık sağlayan analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. LC-MS/MS, minimal örnek hacmi ile çoklu analit analizi yapabilmesi sayesinde bu hasta grubunda önemli avantaj sağlar ve özellikle terapötik ilaç izlemi ile klinik toksikoloji uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Apostol et al., 2022). Yenidoğanlarda intrauterin ilaç maruziyetinin saptanması amacıyla mekonyum, umbilikal kord ve diğer neonatal örneklerde LC-MS/MS temelli yöntemlerin kullanımı, prenatal maruziyetin duyarlı ve özgül biçimde belirlenmesini sağlayarak klinik yönetimde önemli katkı sunmaktadır (Jensen et al., 2019). Ayrıca yenidoğan örneklerinde yüksek duyarlılıklı LC-MS/MS tabanlı toksikolojik analizlerin, intrauterin ilaç maruziyetinin saptanmasında mekonyum testlerine benzer tanısal performans sağlayabildiği gösterilmiştir (Moncef et al., 2026; Yu et al., 2024).

Çocuklarda farmakokinetik farklılıklar ve metabolizma hızındaki değişkenlikler nedeniyle doğru ilaç düzeyi ölçümü klinik açıdan önemlidir. Pediatrik hastalarda ilaç maruziyetinde belirgin bireysel değişkenlik bulunması, terapötik ilaç izlemine tedavi etkinliği ve güvenliği açısından vazgeçilmez kılmaktadır (Alomari et al., 2025). LC-MS/MS'nin yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü, düşük konsantrasyonlardaki ilaç ve metabolitlerin güvenilir biçimde saptanmasını mümkün kılarak pediatrik terapötik ilaç izlemi ve klinik karar süreçlerine önemli katkı sağlar; bu yöntem, çocuklarda çoklu ilaçların düşük hacimli örneklerde eşzamanlı ve hassas kantifikasyonuna olanak tanıyan temel analitik yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Zhang et al., 2022).

### **Adli toksikoloji uygulamaları**

Adli toksikolojide ilaçlar, toksinler ve yeni psikoaktif maddelerin postmortem örneklerde güvenilir şekilde saptanması, ölüm nedeninin belirlenmesi ve olası madde suistimali vakalarının aydınlatılması açısından kritik öneme sahiptir. Günümüzde sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS), yüksek duyarlılık, özgüllük ve çoklu analit analizine olanak sağlaması nedeniyle postmortem toksikolojik incelemelerde temel analitik yöntemlerden biri haline gelmiştir. LC-MS/MS, kompleks biyolojik matrikslerde düşük konsantrasyonlardaki ilaç ve metabolitlerin güvenilir biçimde belirlenmesine olanak tanıyarak adli yorumlamada analitik doğruluğu artırır ve özellikle çoklu ilaç alımı, polifarmasi ve yeni psikoaktif madde maruziyeti gibi karmaşık olgularda tanısal belirsizliği azaltır (Al-Asmari, 2019).

Postmortem toksikolojide geniş spektrumlu tarama ve doğrulama stratejileri giderek LC-MS/MS ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi yöntemlerine dayanmaktadır. Bu teknikler, hedefe yönelik analizlerin yanı sıra geniş analit panellerinin aynı anda taranmasına olanak tanıyarak bilinmeyen veya beklenmeyen maddelerin saptanmasını mümkün kılar. Özellikle yeni psikoaktif

maddelerin hızla değişen kimyasal yapıları ve düşük konsantrasyonlarda bulunmaları, yüksek duyarlılığa sahip LC-MS/MS temelli yöntemlerin önemini artırmıştır. Postmortem kan, idrar, vitreus sıvısı ve çeşitli doku örneklerinde çok sayıda ilacın ve metabolitin eşzamanlı olarak kantitatif analizinin yapılabilmesi, ölüm nedeninin belirlenmesi ve toksikolojik yorumlamanın doğruluğu açısından önemli avantajlar sağlamaktadır (Yamagishi et al., 2023; Yu et al., 2024).

LC-MS/MS, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile birlikte adli toksikoloji laboratuvarlarında doğrulama yöntemi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. İmmünoassay tabanlı tarama testleri ile elde edilen ön bulguların doğrulanmasında LC-MS/MS'nin yüksek özgülüğü ve yanlış pozitif sonuçları azaltma kapasitesi, bu yöntemi modern adli toksikoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez bileşenlerinden biri haline getirmiştir (Kahl et al., 2019). Ayrıca geniş analit panellerinin farklı biyolojik örneklerde analiz edilebilmesi, LC-MS/MS'nin postmortem toksikolojide standart yöntemler arasında yer almasını sağlamış ve özellikle karmaşık toksikolojik olguların aydınlatılmasında önemli katkı sunmuştur (Yamagishi et al., 2023; Yu et al., 2024).

### **Biyolojik Örnekler ve Preanalitik Süreçler**

Klinik ve adli toksikolojik analizlerin doğruluğu yalnızca kullanılan analitik yöntemle değil, aynı zamanda biyolojik örneklerin doğru şekilde alınması, saklanması ve işlenmesine de bağlıdır. LC-MS/MS gibi yüksek duyarlılığa sahip tekniklerde preanalitik değişkenler, sonuçların güvenilirliği üzerinde belirleyici rol oynar. Yanlış örnek alma, uygun olmayan saklama koşulları veya kontaminasyon, analitik hatalara ve klinik yorumlama güçlüklerine yol açabilir. Bu nedenle preanalitik süreçlerin standardizasyonu, modern toksikoloji laboratuvarlarının temel gerekliliklerinden biridir (Lynch et al., 2010).

## **Kan, plazma ve serum**

Kan, plazma ve serum, klinik toksikolojide en sık kullanılan biyolojik örneklerdir ve özellikle akut zehirlenme olgularında ilaç ve toksin düzeylerinin değerlendirilmesinde temel örnek türleri arasında yer alır. LC-MS/MS, bu örneklerde çok düşük konsantrasyonlardaki ilaç ve metabolitlerin yüksek duyarlılık ve özgüllükle ölçülmesine olanak sağlayarak terapötik ilaç düzeyi izleminde ve klinik toksikoloji uygulamalarında giderek artan şekilde kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Özellikle kromoforu olmayan veya immünoassay ile güvenilir ölçülemeyen ilaçların kantitatif analizinde LC-MS/MS çoğu zaman en uygun veya tek güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir (Adaway & Keevil, 2012).

Plazma ve serum örnekleri terapötik ilaç izlemi ve farmakokinetik değerlendirmelerde standart referans matrisler olarak kabul edilir. LC-MS/MS tabanlı yöntemler, bu örneklerde geniş analit panellerinin eşzamanlı kantitatif analizine olanak tanıyarak klinik doz ayarlaması, ilaç uyumsuzluğunun saptanması ve metabolit düzeylerinin değerlendirilmesinde yüksek analitik güvenilirlik sağlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, plazma ve serumun LC-MS/MS analizleri için yüksek geri kazanım ve düşük matris etkisi nedeniyle en güvenilir biyolojik matrisler arasında olduğunu göstermektedir (Bacila et al., 2025).

Kan örneklerinde antikoagülan seçimi, hemoliz, lipemi ve örnek saklama koşulları gibi preanalitik faktörler LC-MS/MS sonuçlarını etkileyebilir. Özellikle postmortem örneklerde görülen dağılım değişiklikleri ve postmortem redistribüsyon, ölçülen ilaç konsantrasyonlarının yorumlanmasını güçleştirebilir. Postmortem interval boyunca bazı ilaçların konsantrasyonlarında anlamlı artış veya azalışlar görülebileceği ve bu durumun toksikolojik yorumlamada dikkate alınması gerektiği gösterilmiştir (Gerostamoulos et al., 2012).

Bu nedenle biyolojik örnek türü, örnekleme zamanı ve preanalitik koşullar hem klinik hem adli toksikolojik yorumlama sürecinde kritik öneme sahiptir ve ölçülen konsantrasyonların klinik veya adli bağlamda değerlendirilmesi bu değişkenler göz önünde bulundurulurken yapılmalıdır.

### **İdrar örnekleri**

İdrar, toksikolojik tarama ve madde suistimali değerlendirmesinde en yaygın kullanılan biyolojik örneklerden biridir. İlaç ve metabolitlerin idrarda genellikle kana kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunması ve daha uzun süre saptanabilmesi, geniş kapsamlı tarama testleri için önemli avantaj sağlar. LC-MS/MS yöntemleri ile idrar örneklerinde çok sayıda ilacın ve metabolitin eş zamanlı ve yüksek duyarlılıkla analiz edilebildiği gösterilmiş olup, bu yaklaşım klinik ve adli toksikoloji laboratuvarlarında rutin uygulamaların temel bileşenlerinden biri haline gelmişti (Kahl et al., 2019).

Bununla birlikte idrar örneklerinin yorumlanması farmakokinetik değişkenlik, uygulanan doz, örnekleme zamanı ve bireysel hidrasyon durumu gibi faktörlerden etkilenebilir (Moeller et al., 2017). İdrarın seyreltilmesi veya çeşitli yöntemlerle manipüle edilebilmesi, özellikle madde suistimali taramalarında önemli bir sınırlılık oluşturmaktadır (Mahajan, 2017). Bu nedenle kreatinin konsantrasyonu, özgül ağırlık ve pH gibi parametrelerin ölçülmesi, örnek bütünlüğünün ve olası dilüsyonun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Van Wijk et al., 2019).

### **Tükürük, saç ve diğer alternatif örnekler**

Tükürük, saç, ter ve kurutulmuş kan lekesi (dried blood spot) gibi alternatif biyolojik örnekler, son yıllarda toksikolojik analizlerde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Tükürük örnekleri non-invaziv olmaları, kolay toplanabilmeleri ve plazmadaki serbest ilaç fraksiyonunu yansıtabilmeleri nedeniyle özellikle madde suistimali

taramalarında ve yol kenarı testlerinde tercih edilmektedir (Bosker & Huestis, 2009). MS/MS tabanlı yöntemler, oral sıvıda çok sayıda ilacın ve yeni psikoaktif maddenin düşük konsantrasyonlarda güvenilir biçimde saptanmasına olanak tanımaktadır (Maurer, 2005).

Saç örnekleri ise uzun dönemli madde maruziyetinin değerlendirilmesinde önemli avantaj sağlar. Saçta ilaç ve metabolitlerin haftalar-aylar boyunca kalıcı olarak saptanabilmesi, kronik kullanımın ve geriye dönük maruziyetin değerlendirilmesine olanak tanır (Pragst & Balikova, 2006). LC-MS/MS yöntemleri ile saç örneklerinde çok sayıda ilaç ve metabolitin eş zamanlı analizi yapılabilmekte ve bu yaklaşım özellikle adli toksikoloji, çocuk istismarı şüphesi ve kronik madde kullanımı değerlendirmelerinde klinik açıdan değer taşımaktadır (Maurer, 2005).

### **Örnek alma, saklama ve taşıma koşulları**

Biyolojik örneklerin doğru şekilde alınması ve uygun koşullarda saklanması, LC-MS/MS analizlerinin doğruluğu açısından kritik öneme sahiptir. Uygun tüplerin kullanılması, örneklerin ışık, sıcaklık ve mikrobiyal kontaminasyon gibi çevresel faktörlerden korunması ve analiz öncesinde uygun sıcaklıklarda saklanması analit stabilitesinin korunması için gereklidir. Birçok ilaç ve metabolitin oda sıcaklığında veya uygunsuz saklama koşullarında degradasyona uğrayabildiği ve bunun kantitatif sonuçları etkileyebileceği gösterilmiştir (Dinis-Oliveira et al., 2010).

Taşıma sürecinde sıcaklık kontrolünün sağlanması, uygun etiketleme ve zincirleme teslim (chain-of-custody) uygulamaları, örnek bütünlüğünün korunması açısından önem taşır. Ayrıca tekrar eden dondurma-çözme döngülerinin bazı ilaç ve metabolitlerin stabilitesini etkileyebileceği ve ölçülen konsantrasyonlarda değişikliklere yol açabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle örneklerin mümkünse tek seferde analiz edilmesi veya analiz öncesinde uygun şekilde aliquotlanması önerilmektedir (Ferrara et al., 1998).

## **Matriks etkisi ve kontaminasyon**

LC-MS/MS analizlerinde matriks etkisi, biyolojik örneklerde bulunan endojen bileşiklerin iyonizasyon sürecini etkilemesi sonucunda analitik sinyalde baskılanma veya artış meydana gelmesi olarak tanımlanır. Elektrospray iyonizasyon (ESI) kullanılan LC-MS/MS yöntemlerinde matriks kaynaklı iyon baskılanması veya güçlenmesi, kantitatif analiz doğruluğunu etkileyebilecek önemli bir analitik sorundur (King et al., 2000). Uygun örnek hazırlama yöntemleri, kromatografik ayırımın optimize edilmesi ve izotop işaretli iç standartların kullanımı, matriks etkisinin değerlendirilmesi ve azaltılmasında temel stratejiler arasında yer almaktadır (Ferrara et al., 1998).

Kontaminasyon, özellikle çok düşük konsantrasyonlardaki analitlerin analizinde yanlış pozitif sonuçlara yol açabilen önemli bir preanalitik ve analitik sorundur. Laboratuvar ortamında çapraz kontaminasyonun önlenmesi için uygun temizlik prosedürlerinin uygulanması, örnek hazırlama ve analiz aşamalarının ayrılması, blank örneklerin ve kalite kontrol materyallerinin kullanılması önerilmektedir (Chung & Choe, 2017; Ferrara et al., 1998).

## **Numune Hazırlama Teknikleri**

### **Protein çöktürme**

Protein çöktürme, LC-MS/MS analizleri öncesinde plazma ve serum gibi biyolojik örneklerden proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan en basit, hızlı ve maliyet-etkin numune hazırlama yöntemlerinden biridir. Asetonitril veya metanol gibi organik çözücülerin eklenmesiyle proteinlerin denatüre edilerek çöktürülmesi sağlanır ve üst fazda hedef analitlerin bulunduğu süpernatant elde edilir. Uygulama kolaylığı ve kısa işlem süresi nedeniyle, özellikle yüksek örnek throughput'u gerektiren klinik ve adli toksikoloji laboratuvarlarında yaygın olarak tercih edilmektedir (Chambers et al., 2007; Jemal, 2000).

Bununla birlikte, protein çöktürme yöntemi lipidler, fosfolipitler ve diğer endojen matriks bileşenlerini tamamen uzaklaştıramayabilir. Bu durum, LC-MS/MS analizlerinde iyon baskılanması veya iyon artışı şeklinde ortaya çıkan matriks etkilerine yol açarak kantitatif doğruluğu sınırlayabilir. Dolayısıyla protein çöktürme, hız ve pratiklik açısından avantajlı olsa da, örnek temizliği bakımından sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) veya katı faz ekstraksiyonu (SPE) gibi daha seçici yöntemlere kıyasla daha sınırlı bir arındırma sağlar ve analit-spesifik validasyon gerektirir (Jemal, 2000).

### **Sıvı-sıvı ekstraksiyon**

Sıvı-sıvı ekstraksiyon (liquid-liquid extraction, LLE), analitlerin birbiriyle karışmayan iki faz (genellikle sulu ve organik faz) arasındaki dağılımına dayanan klasik ve seçici bir numune hazırlama yöntemidir. Bu teknik, özellikle lipofilik ilaçlar, toksinler ve bazı metabolitlerin zenginleştirilmesinde yüksek geri kazanım sağlayarak biyolojik matriks bileşenlerinin önemli bir kısmının uzaklaştırılmasına olanak tanır. Böylece LC-MS/MS analizleri için daha temiz ekstraktlar elde edilir ve matriks etkilerinin azaltılmasına katkı sağlanır (Rygaard et al., 2023).

Bununla birlikte, LLE yönteminde organik çözücü kullanımı, faz ayrımı, buharlaştırma ve yeniden çözme gibi çok sayıda manuel işlem basamağı bulunması; yöntemin zaman alıcı olmasına ve operatöre bağımlı değişkenlikler içerebilmesine yol açabilir. Bu nedenle, yüksek örnek hacmine sahip rutin klinik ve adli toksikoloji laboratuvarlarında otomasyona uyarlanabilirliği, katı faz ekstraksiyonu (SPE) veya protein çöktürme gibi daha pratik yöntemlere kıyasla sınırlı kalabilmektedir (Remane et al., 2016).

### **Katı faz ekstraksiyonu (SPE)**

Katı faz ekstraksiyonu (solid-phase extraction, SPE), seçici adsorpsiyon ve kontrollü elüsyon prensibine dayanan, yüksek düzeyde temizlik ve zenginleştirme sağlayan gelişmiş bir numune

hazırlama yöntemidir. SPE kartuşları veya 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak analitlerin biyolojik matriksten ayrılması, interferan bileşenlerin büyük ölçüde uzaklaştırılmasına olanak tanır. Bu durum, LC-MS/MS analizlerinde matriks etkisinin azaltılmasına, sinyal-gürültü oranının iyileştirilmesine ve analitik duyarlılığın artırılmasına katkı sağlar (Kataoka, 2015; Remane et al., 2016).

SPE yöntemi; yüksek seçicilik, tekrarlanabilirlik ve otomasyona uygunluk avantajları nedeniyle hem klinik hem de adli toksikoloji laboratuvarlarında çoklu ilaç ve metabolit analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle düşük konsantrasyonlardaki analitlerin kantitatif tayininde, matriks bileşenlerinin etkin biçimde uzaklaştırılması sayesinde daha güvenilir ve doğru sonuçlar elde edilmesini mümkün kılar (Remane et al., 2016). Bununla birlikte, kartuş tipi seçimi, pH optimizasyonu ve yıkama/elüsyon basamaklarının dikkatle planlanması, yöntemin performansını belirleyen kritik parametrelerdir.

### **Otomasyon ve yüksek verimli hazırlama yöntemleri**

Artan örnek hacmi ve genişleyen analit panelleri, modern LC-MS/MS laboratuvarlarında numune hazırlama süreçlerinde otomasyonun önemini belirgin biçimde artırmıştır. Otomatik sıvı işleme platformları, robotik pipetleme sistemleri ve 96 kuyucuklu plakalarla uyumlu ekstraksiyon yaklaşımları; yüksek örnek işleme kapasitesi (high-throughput), tekrarlanabilirlik ve operatöre bağlı değişkenliğin azaltılması açısından önemli avantajlar sunmaktadır (Remane et al., 2016; Wille et al., 2017). Bu sistemler, özellikle çoklu ilaç ve metabolit taramalarında kısa sürede yüksek sayıda örneğin işlenmesine olanak tanırken, analitik süreçlerin standardizasyonunu ve laboratuvarlar arası karşılaştırılabilirliği de artırmaktadır.

Yüksek verimli numune hazırlama stratejileri, klinik ve adli toksikoloji laboratuvarlarında rutin analizlerin sürekliliğini ve kalite

kontrolünü destekleyerek, sonuçların güvenilirliğini ve izlenebilirliğini güçlendirmektedir. Ayrıca otomasyona uyumlu protein çöktürme, SPE ve hibrit ekstraksiyon tekniklerinin entegrasyonu; matriks etkilerinin azaltılması, analiz sürelerinin kısaltılması ve iş akışlarının optimize edilmesi açısından önemli katkılar sağlamaktadır (Remane et al., 2016). Bu nedenle, modern toksikoloji laboratuvarlarında otomasyon temelli numune hazırlama yaklaşımları, yüksek örnek hacmi ile çalışan merkezler için temel bir gereklilik haline gelmiştir.

### **İç standart kullanımı**

LC-MS/MS analizlerinde iç standart kullanımı, kantitatif doğruluğun ve ölçüm tekrarlanabilirliğinin sağlanmasında temel bir bileşendir. Özellikle stabil izotopla işaretlenmiş (örn. deuterium,  $^{13}\text{C}$  veya  $^{15}\text{N}$ ) iç standartlar, örnek hazırlama sürecinde oluşabilecek analit kayıplarını, matriks kaynaklı iyon baskılanması veya iyon artışı gibi etkileri ve enstrümantal dalgalanmaları kompanse ederek ölçümlerin doğruluğunu artırır (Heudi et al., 2020). Bu yaklaşım, ekstraksiyon verimliliğindeki farklılıkların ve iyonizasyon etkinliğindeki değişkenliğin normalize edilmesini sağlayarak, biyolojik matrikslerde düşük konsantrasyonlardaki analitlerin güvenilir biçimde kantifiye edilmesine olanak tanır.

Klinik ve adli toksikoloji uygulamalarında, çoklu analit içeren panellerde her analit için yapısal olarak benzer veya ideal olarak izotop işaretli iç standart kullanılması analitik performansın belirleyici unsurlarından biridir. Uygun iç standart seçimi; doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), geri kazanım (recovery) ve matriks etkisinin kontrolü açısından kritik olup, validasyon parametrelerinin kabul edilebilir sınırlar içinde kalmasına katkı sağlar (Heudi et al., 2020). Bu nedenle modern LC-MS/MS yöntem geliştirme ve validasyon süreçlerinde iç standart stratejisinin doğru planlanması, güvenilir ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmesi için vazgeçilmez bir gereklilik olarak kabul edilmektedir.

## **Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon**

### **Kalibrasyon ve doğruluk**

LC-MS/MS yöntemlerinde kalibrasyon eğrileri, analit konsantrasyonu ile ölçülen sinyal arasındaki ilişkiyi tanımlayarak kantitatif analizlerin temelini oluşturur. Uygun kalibrasyon aralığının belirlenmesi ve matriks uyumlu kalibratörlerin kullanılması, ölçüm doğruluğunu artırır. Analitik doğruluk (accuracy), ölçülen değerlerin gerçek değere yakınlığını ifade eder ve validasyon sürecinde kalite kontrol örnekleri ile değerlendirilir (Wille et al., 2017).

### **Duyarlılık ve özgüllük**

Duyarlılık, yöntemin düşük konsantrasyonlardaki analitleri saptayabilme kapasitesini ifade ederken; özgüllük, analitin diğer bileşenlerden ayırt edilebilmesini tanımlar. Tandem kütle spektrometrisi, seçilmiş reaksiyon izleme (SRM/MRM) modunda yüksek özgüllük sağlayarak yanlış pozitif sonuçları azaltır ve kompleks biyolojik matrikslerde güvenilir tanımlama yapılmasına olanak tanır (Wille et al., 2017).

### **Alt tespit ve kantifikasyon sınırları**

Alt tespit sınırı (limit of detection, LOD), bir analitin varlığının güvenilir biçimde ayırt edilebildiği en düşük konsantrasyonu; alt kantifikasyon sınırı (lower limit of quantification, LLOQ) ise analitin kabul edilebilir doğruluk (accuracy) ve kesinlik (precision) değerleri ile kantitatif olarak ölçülebildiği en düşük düzeyi ifade eder. LC-MS/MS yöntemlerinde LOD ve LLOQ değerlerinin doğru biçimde belirlenmesi, yöntemin analitik duyarlılığını ve klinik uygulanabilirliğini ortaya koyan temel validasyon parametreleri arasında yer alır. Özellikle toksikolojik taramalar, terapötik ilaç izlem programları ve düşük konsantrasyonlu biyobelirteç ölçümlerinde, bu sınırların yeterince düşük olması klinik karar

verme sürecinin güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir (Kaza et al., 2019).

Yöntem validasyonu sırasında LOD ve LLOQ değerleri genellikle sinyal-gürültü oranı, kalibrasyon eğrisi doğruluğu ve tekrarlanabilirlik ölçütleri dikkate alınarak belirlenir. Uluslararası kılavuzlar, LLOQ düzeyinde ölçümlerin belirli doğruluk ve kesinlik kriterlerini karşılamasını ve matriks etkilerinin kontrol edilmesini önermektedir. Bu nedenle, LC-MS/MS yöntem geliştirme sürecinde uygun numune hazırlama, iç standart kullanımı ve enstrümental optimizasyon ile düşük LOD ve LLOQ değerlerine ulaşılması, özellikle klinik ve adli toksikoloji uygulamalarında güvenilir ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmesi için vazgeçilmezdir (Kaza et al., 2019).

### **Tekrarlanabilirlik ve kesinlik**

Tekrarlanabilirlik (intra-day precision) ve ara gün kesinliği (inter-day precision), geliştirilen LC-MS/MS yönteminin aynı koşullar altında ve farklı günlerde benzer sonuçlar üretme yeteneğini değerlendiren temel validasyon parametreleridir. Tekrarlanabilirlik, aynı gün içerisinde ve aynı analitik koşullar altında yapılan çoklu ölçümlerin varyasyonunu yansıtırken; ara gün kesinliği, farklı günlerde, farklı analistler veya farklı cihaz koşulları altında elde edilen ölçümlerin tutarlılığını gösterir. Bu parametreler genellikle düşük, orta ve yüksek konsantrasyon seviyelerini temsil eden kalite kontrol (QC) örnekleri ile belirlenir ve sonuçlar bağıl standart sapma (RSD, %) veya varyasyon katsayısı (CV, %) olarak ifade edilir. Uluslararası validasyon kılavuzları, hem intra-day hem inter-day kesinlik değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olmasını yöntemin güvenilirliği açısından zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle tekrarlanabilirlik ve kesinlik değerlendirmeleri, yöntemin klinik ve adli toksikoloji uygulamalarında rutin kullanıma uygunluğunu gösteren temel göstergeler arasında yer alır (Kaza et al., 2019).

## **Matriks etkisi ve geri kazanım**

Matriks etkisi, biyolojik örneklerde bulunan endojen bileşenlerin iyonizasyon sürecini etkileyerek analitik sinyalde baskılanma veya artışa yol açması olarak tanımlanır. Özellikle LC-MS/MS analizlerinde elektrospray iyonizasyon (ESI) kaynaklı iyon baskılanması, kantitatif sonuçların doğruluğunu ve duyarlılığını etkileyebileceğinden dikkatle değerlendirilmelidir. Matriks etkisinin belirlenmesi genellikle post-ekstraksiyon ekleme yöntemleri veya farklı biyolojik matrikslerden elde edilen örneklerin karşılaştırılması ile yapılır.

Geri kazanım (recovery) ise analitin numune hazırlama sürecinde ne kadarının kayıpsız şekilde elde edilebildiğini gösterir ve ekstraksiyon verimliliğinin bir göstergesidir. Yüksek ve tutarlı geri kazanım oranları, yöntemin duyarlılığı ve doğruluğu açısından önem taşır. İzotop işaretli iç standartların kullanımı, hem matriks etkilerinin kompanse edilmesinde hem de örnek hazırlama sırasında oluşabilecek kayıpların düzeltilmesinde kritik rol oynar. Uygun ekstraksiyon tekniklerinin (protein çöktürme, LLE, SPE vb.) seçimi ve validasyonu, matriks etkisinin azaltılmasına ve geri kazanımın optimize edilmesine katkı sağlayarak LC-MS/MS yönteminin analitik performansını artırır (Heudi et al., 2020).

## **Uluslararası validasyon kılavuzları**

LC-MS/MS yöntem validasyonu, uluslararası düzenleyici kurumların ve bilimsel kuruluşların yayımladığı kılavuzlara uygun olarak planlanmalı ve yürütülmelidir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency, EMA) tarafından yayımlanan biyoyöntem validasyon rehberleri ile adli toksikoloji alanında çalışan mesleki derneklerin önerileri, biyolojik örneklerde kantitatif analizlerin güvenilirliğini sağlamak için gerekli temel parametreleri tanımlamaktadır. Bu kılavuzlarda doğruluk (accuracy), kesinlik

(precision), seçicilik (selectivity), duyarlılık, kalibrasyon aralığı ve doğrusal yanıt, stabilite, geri kazanım ve matriks etkisi gibi parametrelerin nasıl değerlendirileceği ayrıntılı biçimde açıklanmakta; ayrıca kalite kontrol örneklerinin kullanımı, kabul edilebilir sapma sınırları ve raporlama standartları da belirlenmektedir. Bu standartlaştırılmış yaklaşım, farklı laboratuvarlar arasında sonuçların karşılaştırılabilirliğini artırmakta ve LC-MS/MS yöntemlerinin klinik, farmakokinetik ve adli toksikoloji uygulamalarında güvenle kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Kaza et al., 2019; Wille et al., 2017).

## **Tarama ve Doğrulama Stratejileri**

### **Tarama testlerinin planlanması**

Toksikolojik analizlerde tarama testleri, biyolojik örneklerde bilinmeyen ya da beklenen ilaç ve toksik maddelerin hızlı biçimde saptanması amacıyla ilk basamak olarak uygulanır. İmmünoassay tabanlı yöntemler, geniş analit kapsamı, kısa analiz süresi ve yüksek örnek throughput'u sağlamaları nedeniyle klinik ve adli toksikoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, çapraz reaksiyonlar ve sınırlı analit özgüllüğü gibi nedenlerle yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuçlar oluşabileceğinden, immünoassay sonuçlarının doğrulayıcı yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir. Bu doğrulama aşamasında özellikle LC-MS/MS tabanlı yöntemler altın standart olarak kabul edilmekte ve yüksek özgüllük ile duyarlılık sağlamaktadır (Kale, 2019).

Son yıllarda LC-MS/MS ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HRMS) temelli geniş spektrumlu tarama yaklaşımları, aynı analizde yüzlerce ilacın, metabolitin ve yeni psikoaktif maddelerin (NPS) saptanabilmesine olanak tanıyarak modern toksikoloji laboratuvarlarında önemli bir yer edinmiştir. Bu teknikler, hedefe yönelik (targeted) ve hedef dışı (untargeted) analiz stratejilerinin birlikte kullanılmasına imkân sağlayarak özellikle

bilinmeyen madde maruziyetlerinde ve karmaşık zehirlenme vakalarında tanısal değeri artırmaktadır. Gelişmiş kütle doğruluğu, yüksek çözünürlük ve geniş veri tabanları ile desteklenen HRMS sistemleri, yeni ortaya çıkan maddelerin retrospektif veri analizi ile yeniden taranabilmesine de olanak sağlayarak toksikolojik tarama süreçlerinde önemli avantajlar sunmaktadır (Viette et al., 2012).

### **Pozitif sonuçların doğrulanması**

Tarama testlerinde elde edilen pozitif sonuçların doğrulanması, yalancı pozitifliklerin önlenmesi ve klinik/adli karar süreçlerinin güvenilirliğinin sağlanması açısından zorunlu bir aşamadır. İmmünoassay gibi tarama yöntemleri yüksek duyarlılık sunmakla birlikte sınırlı özgüllükleri nedeniyle çapraz reaksiyonlara açık olabilir; bu nedenle pozitif tarama sonuçlarının kütle spektrometrisi temelli doğrulama yöntemleri ile teyit edilmesi gerekmektedir. LC-MS/MS ve GC-MS sistemleri, yüksek özgüllük, seçicilik ve düşük tespit sınırları sağlamaları nedeniyle toksikolojik doğrulama analizlerinde altın standart olarak kabul edilmektedir ve hem klinik hem de adli toksikoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmaktadır (Wille et al., 2017).

Doğrulama aşamasında analitin özgül iyon geçişlerinin (örneğin MRM geçişleri) izlenmesi, uygun kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması ve kalite kontrol örneklerinin analiz sürecine dâhil edilmesi analitik doğruluk ve kesinliği artırır. Ayrıca izotop işaretli iç standartların kullanımı, örnek hazırlama ve cihaz kaynaklı varyasyonları kompanse ederek kantitatif güvenilirliği güçlendirir. Validasyon parametrelerine uygun olarak yürütülen doğrulama analizleri, sonuçların tekrarlanabilirliğini ve laboratuvarlar arası karşılaştırılabilirliğini artırarak toksikolojik değerlendirmelerin bilimsel geçerliliğini destekler (Wille et al., 2017).

### **Yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçlar**

Tarama testlerinde yalancı pozitif sonuçlar çoğunlukla immünoassay temelli yöntemlerde görülen çapraz reaksiyonlar, matriks bileşenleri ve yapısal olarak benzer bileşiklerin interferansı nedeniyle ortaya çıkarken; yalancı negatif sonuçlar düşük analit konsantrasyonları, hızlı metabolizma, örnek alma zamanlaması ve tarama panelinin sınırlı analit kapsamı gibi faktörlere bağlı olarak gelişebilir. Bu durum, özellikle klinik ve adli toksikoloji uygulamalarında tarama sonuçlarının tek başına yorumlanmasını kısıtlamakta ve doğrulama analizlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır (Rygaard et al., 2023). LC-MS/MS temelli doğrulama yöntemleri ise çoklu reaksiyon izleme (MRM) yaklaşımı, yüksek seçicilik ve düşük tespit sınırları sayesinde çapraz reaksiyon ve interferans kaynaklı hataları büyük ölçüde azaltarak daha güvenilir ve özgül sonuçlar sağlar. Bu nedenle LC-MS/MS, toksikolojik analizlerde hem klinik hem adli bağlamda doğrulama aşamasının temelini oluşturan yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Maurer, 2005).

### **Klinik yorumlama**

Toksikolojik analiz sonuçlarının klinik veya adli açıdan yorumlanması; ölçülen analit konsantrasyonunun tek başına değerlendirilmesinden ziyade örnek türü, örnekleme zamanı, olası maruziyet yolu, hastanın klinik bulguları ve ilgili maddenin farmakokinetik özellikleri birlikte ele alınarak yapılmalıdır. İlacın dağılım hacmi, yarı ömrü, aktif metabolit oluşumu ve bireysel farklılıklar gibi faktörler, ölçülen konsantrasyon ile klinik etki arasındaki ilişkinin doğru kurulmasında belirleyici rol oynar. Bu nedenle toksikolojik sonuçların yorumlanması, analitik verinin klinik ve olay yeri bilgileriyle bütünleştirilmesini gerektirir (Moeller et al., 2017).

Özellikle postmortem toksikolojide postmortem redistribüsyon, ölüm sonrası metabolik değişiklikler, örnekleme bölgesi ve zamanlaması gibi değişkenler ölçülen konsantrasyonların yorumlanmasını önemli ölçüde etkileyebilir. Santral ve periferik kan

örnekleri arasındaki konsantrasyon farklılıkları, dokular arası difüzyon ve ölümden sonra meydana gelen kimyasal değişimler, yanlış yorumlamalara yol açabilecek potansiyel faktörlerdir. Bu nedenle postmortem toksikolojik bulguların değerlendirilmesinde analitik sonuçların olayın bağlamı, otopsi bulguları ve farmakolojik verilerle birlikte ele alınması zorunludur (Wille et al., 2017).

### **Cut-off değerleri ve referans aralıklar**

Cut-off değerleri, tarama ve doğrulama testlerinde pozitif ve negatif sonuçların ayrımını belirleyen kritik eşik değerlerdir. Bu değerler; analitik yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü, örnek matrisinin özellikleri, klinik karar sınırları ve uluslararası kılavuzların önerileri doğrultusunda belirlenir. Özellikle madde kullanımının değerlendirilmesine yönelik tarama testlerinde cut-off değerlerinin standardize edilmesi, farklı laboratuvarlar arasında sonuçların karşılaştırılabilirliğini artırır ve yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuç olasılığını azaltır (Kale, 2019; Moeller et al., 2017).

Referans aralıkların doğru belirlenmesi ve uygun cut-off değerlerinin kullanılması, klinik ve adli toksikoloji laboratuvarlarında sonuçların doğru yorumlanması açısından temel bir gerekliliktir. Yetersiz belirlenmiş eşik değerler, özellikle düşük konsantrasyonlu ilaç ve metabolitlerin değerlendirilmesinde tanısız hatalara yol açabilirken, uygun validasyon ve kalite kontrol süreçleri ile desteklenen cut-off değerleri analitik güvenilirliği artırır ve klinik karar verme sürecine katkı sağlar (Wille et al., 2017).

### **Kalite Kontrol ve Akreditasyon**

#### **İç kalite kontrol süreçleri**

LC-MS/MS temelli toksikolojik analizlerde iç kalite kontrol (IQC), analitik sürecin doğruluğunu, tekrarlanabilirliğini ve uzun dönemli kararlılığını sağlamak için vazgeçilmez bir bileşendir. Farklı konsantrasyon seviyelerinde hazırlanan kalite kontrol örneklerinin

her analitik seriye dahil edilmesi; cihaz performansının izlenmesine, kalibrasyon eğrilerinin doğrulanmasına ve yöntem doğruluğunun sürekliliğinin değerlendirilmesine olanak tanır. Bu yaklaşım, özellikle çoklu analit içeren toksikolojik tarama ve doğrulama yöntemlerinde analitik sapmaların erken dönemde saptanmasını sağlayarak yanlış sonuçların önlenmesine katkıda bulunur (Rygaard et al., 2023; Wille et al., 2017).

İç kalite kontrol uygulamaları yalnızca kontrol örneklerinin analizini değil; aynı zamanda iç standart yanıtlarının izlenmesi, iyon oranlarının kabul kriterleri içinde kalıp kalmadığının değerlendirilmesi ve sistem uygunluk testlerinin düzenli olarak gerçekleştirilmesini de kapsar. LC-MS/MS sistemlerinde iyonizasyon verimindeki değişiklikler, matriks etkileri ve cihaz kaynaklı varyasyonlar, iç kalite kontrol verileri aracılığıyla erken dönemde belirlenebilir. Böylece kalibrasyon kaymaları, iyon baskılanması veya cihaz performansındaki düşüşler gibi sorunlar klinik veya adli raporlamaya yansımadan önce düzeltilebilir (Wille et al., 2017).

Kalite kontrol verilerinin istatistiksel olarak izlenmesi, laboratuvarın analitik performansının sürdürülebilirliği açısından kritik öneme sahiptir. Levey–Jennings grafikleri, Westgard kuralları ve trend analizleri gibi kalite izleme araçları kullanılarak sistematik hatalar ve rastgele varyasyonlar değerlendirilebilir. Bu yöntemler, özellikle düşük konsantrasyonlarda ölçüm yapılan toksikolojik analizlerde güvenilirliğin artırılmasına ve yöntem validasyon parametrelerinin rutin kullanım sürecinde korunmasına yardımcı olur (Wille et al., 2017).

### **Dış kalite değerlendirme programları**

Dış kalite değerlendirme (external quality assessment, EQA) programları, toksikoloji laboratuvarlarının analitik doğruluğunu ve laboratuvarlar arası karşılaştırılabilirliğini değerlendirmek amacıyla

uygulanan temel kalite güvencesi araçlarından biridir. Bu programlar kapsamında laboratuvarlara gönderilen kör örneklerin rutin yöntemlerle analiz edilmesi ve elde edilen sonuçların referans veya hedef değerlerle karşılaştırılması, ölçüm doğruluğu ve yöntem performansı hakkında objektif veri sağlar. EQA sonuçlarının düzenli olarak izlenmesi, sistematik hataların saptanmasına ve analitik süreçlerin uluslararası standartlarla uyumlu hale getirilmesine katkıda bulunur (Wille et al., 2017; Wilson et al., 2001).

Toksikoloji laboratuvarlarında EQA katılımı, yalnızca analitik doğruluğun değerlendirilmesiyle sınırlı olmayıp aynı zamanda yöntemlerin duyarlılık, özgüllük ve raporlama doğruluğunun da izlenmesini sağlar. Özellikle LC-MS/MS tabanlı çoklu analit analizlerinde farklı laboratuvarlar arasında ölçüm farklılıklarının belirlenmesi, kalibrasyon stratejilerinin ve örnek hazırlama protokollerinin optimize edilmesine olanak tanır. Bu süreç, laboratuvarların performanslarını uluslararası referans merkezleriyle karşılaştırarak standardizasyonun sağlanmasına yardımcı olur ve klinik ile adli toksikoloji raporlarının güvenilirliğini artırır (Wille et al., 2017).

EQA programlarından elde edilen geri bildirimler, laboratuvar kalite yönetim sistemlerinin sürekli iyileştirilmesi açısından önemli bir veri kaynağıdır. Performansın hedef değerlerin dışında kaldığı durumlarda kök neden analizi yapılması, yöntem validasyon parametrelerinin gözden geçirilmesi ve gerekli düzeltici faaliyetlerin uygulanması önerilir. Bu yaklaşım, akreditasyon süreçleri kapsamında laboratuvarın kalite güvencesi gerekliliklerini karşıladığını göstermesi açısından da önem taşır ve toksikolojik analiz sonuçlarının ulusal ve uluslararası düzeyde kabul edilebilirliğini destekler (Wille et al., 2017).

### **Laboratuvar akreditasyonu (ISO standartları)**

Toksikoloji laboratuvarlarında kalite yönetim sistemlerinin etkin biçimde uygulanması ve uluslararası standartlara uyum, analitik sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği açısından temel bir gerekliliktir. ISO 15189 (tıbbi laboratuvarlar için kalite ve yeterlilik gereklilikleri) ile ISO/IEC 17025 (deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği) standartları; yöntem validasyonu, kalite kontrol süreçleri, ölçüm belirsizliği, personel yetkinliği ve dokümantasyon yönetimi gibi kritik alanlara ilişkin kapsamlı çerçeve sunar. Bu standartlara uygun olarak yürütülen akreditasyon süreçleri, laboratuvarların analitik performansının uluslararası kabul görmüş kriterlere göre değerlendirildiğini ve sürdürülebilir kalite güvencesi sağlandığını gösterir (Wille et al., 2017).

ISO 15189 standardı, özellikle klinik toksikoloji laboratuvarlarında hasta güvenliği ve sonuçların klinik yorumlanabilirliği açısından önemli gereklilikler içerir. Preanalitik, analitik ve postanalitik süreçlerin tamamının kalite yönetim sistemi kapsamında izlenmesi; numune kabul kriterleri, izlenebilirlik, raporlama standartları ve hata yönetimi gibi unsurların sistematik olarak kontrol edilmesini sağlar. ISO/IEC 17025 ise ölçüm doğruluğu, metot validasyonu ve ölçüm belirsizliğinin değerlendirilmesi konularında daha teknik gereklilikler tanımlayarak, özellikle adli toksikoloji ve araştırma laboratuvarlarında analitik yeterliliğin uluslararası düzeyde tanınmasına katkıda bulunur (Plebani et al., 2014).

Akreditasyon süreci; iç ve dış kalite kontrol uygulamalarının etkinliğinin gösterilmesi, dokümente edilmiş standart çalışma prosedürlerinin (SOP) oluşturulması, personel eğitim ve yetkinliğinin düzenli olarak değerlendirilmesi ve cihaz bakım–kalibrasyon kayıtlarının izlenmesini kapsar. Bu gerekliliklerin sistematik biçimde uygulanması, laboratuvarlar arası uyumu artırarak raporlanan toksikolojik sonuçların hem klinik hem de hukuki açıdan kabul edilebilirliğini güçlendirir. Özellikle adli toksikoloji uygulamalarında akredite laboratuvarlardan elde edilen

verilerin mahkemeler ve resmi kurumlar tarafından daha yüksek güvenilirlikle kabul edildiği bildirilmektedir (Wille et al., 2017).

### **Veri yönetimi ve raporlama**

LC-MS/MS analizlerinde veri yönetimi ve raporlama süreçleri, analitik sonuçların izlenebilirliği, doğruluğu ve bütünlüğünün sağlanması açısından kalite yönetim sisteminin temel bileşenlerinden biridir. Modern toksikoloji laboratuvarlarında laboratuvar bilgi yönetim sistemleri (LIMS) ve üretici yazılımları aracılığıyla ham verilerin saklanması, kromatogramların ve spektral verilerin arşivlenmesi, kalite kontrol sonuçlarının izlenmesi ve raporların standart formatta oluşturulması mümkündür. Bu sistemler, veri kaybı veya yetkisiz değişiklik riskini azaltarak analitik sürecin geriye dönük olarak denetlenebilmesine olanak tanır ve özellikle akreditasyon gerekliliklerinin karşılanmasına katkı sağlar (Wille et al., 2017; Wu et al., 2012).

Veri yönetiminde izlenebilirlik, her analiz için numune kabulünden raporlamaya kadar tüm aşamaların kayıt altına alınmasını gerektirir. Kalibrasyon eğrileri, iç kalite kontrol sonuçları, cihaz performans parametreleri ve analitik ham veriler, gerektiğinde yeniden değerlendirilebilecek şekilde güvenli biçimde saklanmalıdır. Bu yaklaşım, özellikle adli toksikoloji uygulamalarında sonuçların hukuki geçerliliği açısından kritik olup, analizlerin bağımsız olarak doğrulanabilmesine olanak tanır. Ayrıca veri bütünlüğünü sağlamak amacıyla kullanıcı yetkilendirmesi, elektronik imza uygulamaları ve denetim izleri gibi bilgi güvenliği önlemlerinin uygulanması önerilmektedir (Wille et al., 2017).

Toksikolojik sonuçların raporlanması, yalnızca ölçülen konsantrasyonların verilmesinden ibaret olmayıp sonuçların klinik veya adli bağlamda yorumlanabilir şekilde sunulmasını da kapsar. Raporlarda kullanılan yöntem, ölçüm aralığı, cut-off değerleri, ölçüm belirsizliği ve analitik sınırlamalar gibi bilgilerin açıkça belirtilmesi,

sonuçların doğru yorumlanmasına yardımcı olur. Özellikle düşük konsantrasyonlu maddelerin saptandığı durumlarda analitik duyarlılık ve özgüllük sınırlarının rapora eklenmesi, klinik karar verme sürecini destekler ve yanlış yorumlamaların önlenmesine katkıda bulunur (Wu et al., 2012).

## **Klinik ve Adli Yorumlama**

### **Farmakokinetik ve metabolizma**

Toksikolojik analiz sonuçlarının klinik ve adli açıdan yorumlanmasında farmakokinetik parametreler; absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon süreçleri temel belirleyicilerdir. Ölçülen kan veya biyolojik örnek konsantrasyonlarının klinik etki ile ilişkilendirilmesi, yalnızca sayısal değerin değerlendirilmesiyle değil, ilacın uygulama yolu, alım zamanı ve bireysel metabolik farklılıkların göz önünde bulundurulmasıyla mümkündür. Karaciğer enzim aktivitesindeki genetik polimorfizmler, eş zamanlı ilaç kullanımı ve organ fonksiyon bozuklukları gibi faktörler, ilaç ve metabolit düzeylerini önemli ölçüde etkileyebilir ve klinik tablo ile analitik sonuçlar arasındaki ilişkinin doğru kurulmasını gerektirir (Moeller et al., 2017; Viette et al., 2012; Wu et al., 2012).

Birçok toksik ajan için aktif veya toksik metabolitlerin varlığı, ölçülen ana bileşik konsantrasyonunun tek başına yorumlanmasını yetersiz kılabilir. Bazı ilaçlarda farmakolojik etkinin büyük kısmı metabolitler aracılığıyla ortaya çıkarken, bazı durumlarda metabolit/ana bileşik oranı alım zamanı hakkında bilgi sağlayabilir. Bu nedenle toksikolojik değerlendirmede metabolit profili ve metabolik dönüşüm hızının dikkate alınması, özellikle akut zehirlenme ve madde suistimali vakalarında klinik yorumun doğruluğunu artırır (Moeller et al., 2017).

LC-MS/MS teknolojisi, yüksek duyarlılık ve seçicilik özellikleri sayesinde ana bileşiklerin ve metabolitlerin eş zamanlı olarak

ölçülmesine olanak tanır. Bu durum, farmakokinetik profilin daha kapsamlı biçimde değerlendirilmesini sağlayarak maruziyet zamanının tahmini, metabolik yolların anlaşılması ve toksik etkilerin öngörülmesi açısından önemli avantajlar sunar. Özellikle çoklu analit ölçüm kapasitesi, klinik ve adli toksikoloji uygulamalarında farmakokinetik verilerin yorumlanmasını güçlendirir ve analitik sonuçların bağlamsal değerlendirilmesine katkıda bulunur (Viette et al., 2012; Wu et al., 2012).

### **Toksik ve terapötik düzeyler**

Bir ilacın terapötik, toksik ve letal konsantrasyon aralıklarının belirlenmesi, klinik ve adli toksikolojik yorumlamanın temelini oluşturur. Terapötik ilaç izleminde belirlenen hedef konsantrasyon aralıkları, ilacın etkinliğinin sağlanması ve advers etkilerin önlenmesi açısından yol gösterici olmakla birlikte, bu sınırlar her hasta için mutlak bir eşik değeri temsil etmez. Ölçülen konsantrasyonun klinik etki ile ilişkisi; alınan doz, uygulama yolu, örnekleme zamanı ve bireysel farmakokinetik özellikler gibi değişkenlerden etkilenir. Ayrıca tolerans gelişimi, kronik kullanım ve eşlik eden hastalıklar da aynı konsantrasyonun farklı klinik sonuçlara yol açmasına neden olabilir (Viette et al., 2012; Wu et al., 2012).

Toksik ve letal düzeylerin yorumlanmasında, referans konsantrasyon aralıklarının bağlamsal olarak değerlendirilmesi önemlidir. Akut zehirlenmelerde yüksek konsantrasyonlar belirgin klinik bulgularla ilişkili olabilirken, kronik kullanım durumlarında daha yüksek konsantrasyonlar tolere edilebilir. Benzer şekilde, örnekleme zamanının ilacın emilim ve eliminasyon fazlarına denk gelmesi ölçülen değeri doğrudan etkileyebilir. Bu nedenle tek bir ölçüm sonucuna dayanarak klinik karar verilmesi yerine, seri ölçümler, klinik tablo ve farmakokinetik veriler birlikte değerlendirilmelidir (Moeller et al., 2017).

LC-MS/MS tabanlı analizler, düşük konsantrasyon aralıklarında bile yüksek doğruluk ve özgüllükle ölçüm yapılmasına olanak tanıyarak terapötik ve toksik düzeylerin güvenilir şekilde belirlenmesini sağlar. Özellikle çoklu ilaç kullanımının söz konusu olduğu hastalarda veya karmaşık zehirlenme vakalarında birden fazla analitin eş zamanlı ölçülmesi, klinik ve adli yorumlamanın doğruluğunu artırır. Bununla birlikte, raporlanan konsantrasyonların klinik bağlam içinde değerlendirilmesi ve referans aralıkların yöntem ve matris özelliklerine göre değişebileceğinin göz önünde bulundurulması gereklidir (Viette et al., 2012; Wu et al., 2012).

### **İlaç etkileşimleri**

Çoklu ilaç kullanımı (polifarmasi), klinik ve adli toksikolojik yorumlamada sonuçların doğru değerlendirilmesini güçleştiren önemli bir değişkendir. Birden fazla ilacın eş zamanlı kullanımı, analitlerin biyolojik örneklerde ölçülen konsantrasyonlarını ve ortaya çıkan klinik etkileri önemli ölçüde değiştirebilir. İlaç-ilaç etkileşimleri farmakokinetik mekanizmalar (absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon) veya farmakodinamik mekanizmalar yoluyla gerçekleşebilir ve toksikolojik sonuçların klinik tablo ile ilişkilendirilmesini doğrudan etkiler (Blinder, 2010).

Farmakokinetik etkileşimler, özellikle sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi üzerinden gerçekleştiğinde klinik açıdan belirgin sonuçlar doğurabilir. CYP enzimlerinin inhibisyonu, bazı ilaçların veya metabolitlerinin plazma konsantrasyonlarının artmasına ve toksik düzeylere ulaşmasına yol açarken; enzim indüksiyonu ise terapötik etkinin azalmasına veya yalancı düşük ölçümlere neden olabilir. Bu durum, LC-MS/MS analizlerinde ölçülen konsantrasyonların tek başına değerlendirilmesinin yetersiz kalabileceğini ve etkileşim potansiyelinin mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir (Viette et al., 2012; Wu et al., 2012).

Farmakodinamik etkileşimlerde ise ilaçların benzer veya zıt etki mekanizmaları üzerinden sinerjistik ya da antagonistik etkiler ortaya çıkabilir. Özellikle santral sinir sistemi depresanlarının birlikte kullanımı, ölçülen konsantrasyonlar terapötik aralıkta olsa dahi ciddi klinik tablolara yol açabilir. Bu nedenle toksikolojik analiz sonuçlarının yorumlanmasında, hastanın kullandığı tüm ilaçların, olası etkileşimlerin ve klinik bulguların birlikte değerlendirilmesi gereklidir. LC-MS/MS tabanlı çoklu analit analizleri, polifarmasi durumlarında eş zamanlı ilaç ve metabolit saptamasına olanak tanıyarak ilaç etkileşimlerinin daha kapsamlı biçimde değerlendirilmesini destekler (Viette et al., 2012; Wu et al., 2012).

### **Postmortem toksikoloji**

Postmortem toksikolojide ölçülen ilaç ve toksik madde konsantrasyonlarının yorumlanması, ölüm sonrası meydana gelen biyokimyasal ve fiziksel değişiklikler nedeniyle klinik toksikolojiye kıyasla daha karmaşıktır. Postmortem redistribüsyon, örnekleme yeri (santral veya periferik kan), ölüm ile örnekleme arasındaki süre ve çevresel koşullar gibi faktörler ölçülen konsantrasyonları önemli ölçüde etkileyebilir. Ölümden sonra bazı ilaçların kan ve dokular arasında pasif difüzyon göstermesi veya hücresel yıkım sonucu dolaşıma geçmesi, özellikle santral kan örneklerinde konsantrasyon artışına yol açabilir ve bu durum analitik sonuçların klinik anlamını değiştirebilir (Drummer & Gerostamoulos, 2002).

Postmortem redistribüsyonun derecesi, ilacın lipofilitesi, dağılım hacmi ve dokulara bağlanma özellikleri ile yakından ilişkilidir. Yüksek dağılım hacmine sahip ve lipofilik ilaçlar ölüm sonrası dokulardan kana geçiş gösterebilirken, bazı maddelerde ise metabolik yıkım ve çevresel koşullar nedeniyle konsantrasyon azalması görülebilir. Bu değişkenlik, aynı bireyden farklı örnekleme bölgelerinden alınan kan örnekleri arasında anlamlı konsantrasyon farklarına neden olabilir. Bu nedenle postmortem toksikolojik değerlendirmede örnekleme yerinin belirtilmesi ve mümkünse

periferik kan örneklerinin tercih edilmesi önerilmektedir (Drummer & Gerostamoulos, 2002).

Postmortem örneklerde elde edilen konsantrasyonların doğrudan terapötik veya toksik aralıklarla karşılaştırılması çoğu zaman yanıltıcı olabilir. Ölüm öncesi maruziyetin zamanı, resüsitasyon girişimleri, metabolik durum ve ölüm mekanizması gibi faktörler analitik sonuçların yorumlanmasını etkiler. Bu nedenle postmortem toksikolojik bulguların, otopsi verileri, olay yeri bilgileri ve klinik öykü ile birlikte bağlamsal olarak değerlendirilmesi gereklidir. Bu bütüncül yaklaşım, toksikolojik sonuçların ölüm nedeni ve katkıda bulunan faktörler açısından daha doğru yorumlanmasını sağlar (Wille et al., 2017).

### **Sonuçların klinik karar süreçlerine entegrasyonu**

Toksikolojik analiz sonuçlarının klinik karar süreçlerine entegrasyonu, yalnızca ölçülen konsantrasyon değerlerinin değerlendirilmesine değil; hastanın klinik durumu, semptomları, tedavi öyküsü ve maruziyet zamanına ilişkin bilgilerin birlikte yorumlanmasına dayanmalıdır. Analitik veriler, özellikle akut zehirlenme, terapötik ilaç izlem ve yoğun bakım hastalarında tedavi stratejisinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Bununla birlikte aynı konsantrasyon düzeylerinin farklı klinik tablolarla ilişkili olabileceği göz önünde bulundurulmalı ve laboratuvar sonuçları klinik bağlamdan bağımsız değerlendirilmemelidir (Viette et al., 2012; Wu & French, 2013; Wu et al., 2012).

LC-MS/MS teknolojisi ile elde edilen yüksek doğruluk ve özgüllüğe sahip kantitatif veriler; doz ayarlaması, tedavi yanıtının izlenmesi, ilaç toksisitesinin erken saptanması ve antidot tedavisinin yönlendirilmesi gibi klinik karar süreçlerinde önemli katkılar sağlar. Özellikle dar terapötik aralığa sahip ilaçların izlenmesinde ve çoklu ilaç kullanımının söz konusu olduğu durumlarda, aynı anda birden fazla analitin ölçülebilmesi klinik değerlendirmeyi güçlendirir ve

tedavi planlamasının bireyselleştirilmesine olanak tanır (Viette et al., 2012; Wu & French, 2013; Wu et al., 2012).

Adli toksikoloji bağlamında ise analitik sonuçların yorumlanması, olay yeri bulguları, otopsi verileri ve tıbbi öykü ile birlikte yapılmalıdır. Ölçülen konsantrasyonların ölüm nedeni ile ilişkisi, postmortem değişiklikler ve maruziyet koşulları dikkate alınarak değerlendirilmelidir. Bu bütüncül yaklaşım, toksikolojik verilerin hukuki süreçlerde doğru ve güvenilir biçimde kullanılmasını sağlar ve laboratuvar sonuçlarının bilimsel geçerliliğini destekler (Wille et al., 2017).

## **LC-MS/MS Teknolojisinin Avantajları ve Sınırlılıkları**

### **Yüksek duyarlılık ve özgüllük**

LC-MS/MS teknolojisi, analitlerin hem kromatografik ayırım hem de tandem kütle spektrometrik parçalanma paternleri üzerinden tanımlanmasına olanak sağlayarak klinik ve adli toksikolojide yüksek analitik özgüllük sunar. Özellikle seçilmiş reaksiyon izleme (SRM/MRM) modunda çalışıldığında hedef bileşiklerin karakteristik öncül-ürün iyon geçişlerinin izlenmesi, kompleks biyolojik matrislerde interferansların azaltılmasına ve düşük konsantrasyonlardaki analitlerin güvenilir şekilde saptanmasına olanak verir. Bu özellik, immünoassay yöntemlerinde sık görülen çapraz reaksiyon ve yalancı pozitif sonuçların önüne geçilmesini sağlayarak doğruluk ve analitik güvenilirliği artırır (Visconti et al., 2023). LC-MS/MS'in pikogram/mL düzeyine kadar inebilen tespit sınırları, özellikle terapötik ilaç izlemi, doping kontrolü ve postmortem toksikoloji gibi alanlarda düşük konsantrasyonların saptanmasını mümkün kılar ve klinik karar süreçlerinde kritik rol oynar (Viette et al., 2012).

Bununla birlikte yüksek duyarlılık, kontaminasyon ve carry-over gibi preanalitik ve analitik sorunlara karşı hassasiyetin artmasına da yol açabilir. Çok düşük konsantrasyonların saptanabilmesi, çevresel

kontaminasyon veya örnek hazırlama hatalarının klinik açıdan anlamlı olmayan sonuçlar üretmesine neden olabilir. Bu nedenle LC-MS/MS yöntemlerinin validasyonu sırasında analitik özgüllük, seçicilik ve interferans değerlendirmeleri titizlikle yapılmalıdır (Chace, 2001).

### **Çoklu analit analizi**

LC-MS/MS'in en önemli avantajlarından biri, tek bir analizde çok sayıda analitin eş zamanlı olarak ölçülebilmesidir. Multi-analit paneller, özellikle acil toksikoloji, terapötik ilaç izlem programları ve adli toksikolojik taramalarda zaman ve örnek hacmi açısından önemli avantajlar sağlar. Aynı enjeksiyon içinde farklı kimyasal özelliklere sahip ilaçların ve metabolitlerin analiz edilebilmesi, laboratuvar verimliliğini artırırken klinik açıdan daha kapsamlı bir değerlendirme yapılmasına olanak tanır (Viette et al., 2012).

Çoklu analit analizinin bir diğer avantajı, farmakokinetik çalışmalar ve ilaç etkileşimlerinin değerlendirilmesinde aynı anda birden fazla bileşiğin kantitatif olarak izlenebilmesidir. Özellikle yoğun bakım ve transplant hastalarında çoklu ilaç kullanımının yaygın olması, bu yaklaşımı klinik açıdan değerli kılar. Ancak çok sayıda analitin aynı yöntem içinde analiz edilmesi, matriks etkisi, iyon baskılanması ve kromatografik ayırım sorunlarını artırabilir. Bu nedenle yöntem geliştirme aşamasında her analit için uygun iç standart seçimi ve kapsamlı validasyon çalışmaları yapılmalıdır (Marquet & Lachatre, 1999).

### **Maliyet ve altyapı gereksinimleri**

LC-MS/MS sistemleri yüksek başlangıç maliyetine sahip olup cihaz temini, bakım ve sarf malzemeleri açısından önemli finansal kaynak gerektirir. Kütle spektrometresi, sıvı kromatografi sistemi, vakum pompası ve veri işleme yazılımları gibi bileşenlerin düzenli bakım ve kalibrasyonu zorunludur. Bu durum özellikle küçük ölçekli

laboratuvarlar için ekonomik sınırlılık oluşturabilir (Matuszewski et al., 1998).

Altyapı gereksinimleri yalnızca cihaz maliyetiyle sınırlı değildir. Uygun laboratuvar ortamı, stabil elektrik ve gaz sistemleri, sıcaklık kontrolü ve kalite yönetim süreçleri LC-MS/MS laboratuvarlarının sürdürülebilir çalışması için gereklidir. Ayrıca validasyon, kalite kontrol ve akreditasyon süreçleri de ek maliyet ve iş gücü gerektirir. Bu nedenle LC-MS/MS teknolojisinin klinik laboratuvarlara entegrasyonu planlanırken maliyet-etkinlik analizlerinin yapılması önemlidir (Kintz, 2019).

### **Uzmanlık ve eğitim gereksinimi**

LC-MS/MS yöntemlerinin geliştirilmesi, validasyonu ve rutin kullanımı yüksek düzeyde teknik bilgi ve deneyim gerektirir. Kromatografik ayırım optimizasyonu, iyonizasyon parametrelerinin ayarlanması, matriks etkisinin değerlendirilmesi ve veri yorumlama süreçleri uzmanlık gerektiren aşamalardır. Bu nedenle LC-MS/MS laboratuvarlarında çalışan personelin analitik kimya, farmakoloji ve laboratuvar kalite yönetimi konularında eğitilmiş olması önemlidir (Langman, 2007).

Ayrıca elde edilen sonuçların klinik veya adli bağlamda yorumlanması da ileri düzey bilgi gerektirir. Metabolit paternlerinin değerlendirilmesi, farmakokinetik özelliklerin dikkate alınması ve postmortem redistribüsyon gibi faktörlerin analiz edilmesi, yalnızca teknik değil aynı zamanda klinik ve toksikolojik uzmanlık gerektirir. Bu nedenle LC-MS/MS teknolojisinin etkin kullanımı için multidisipliner ekip çalışması ve sürekli eğitim programları kritik öneme sahiptir (Kang, 2012).

### **Sonuç**

LC-MS/MS, son yıllarda klinik ve adli toksikoloji alanında analitik performansı belirgin biçimde artıran en önemli teknolojilerden biri

haline gelmiştir. Yüksek duyarlılık ve özgüllük, geniş analit yelpazesinin eş zamanlı analizine olanak tanınması ve düşük konsantrasyonlardaki ilaç ve toksinlerin güvenilir biçimde saptanabilmesi, bu yöntemi hem tarama hem de doğrulama aşamalarında temel bir referans yöntem konumuna getirmiştir. İmmünoassay tabanlı ön tarama testlerinin ardından LC-MS/MS ile yapılan doğrulama analizleri, yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların azaltılmasına katkı sağlamakta ve klinik ya da adli karar süreçlerinde güvenilir veri sunmaktadır. Bu özellikler, özellikle akut zehirlenmelerin değerlendirilmesi, terapötik ilaç düzeyi izlem programları, madde suistimali araştırmaları ve postmortem toksikolojik incelemelerde yöntemin vazgeçilmezliğini pekiştirmektedir.

Bununla birlikte LC-MS/MS analizlerinin doğruluğu yalnızca cihaz performansına değil; uygun örnek seçimi, preanalitik süreçlerin standardizasyonu ve doğru numune hazırlama tekniklerinin uygulanmasına da bağlıdır. Kan, plazma, serum ve idrar gibi klasik biyolojik örneklerin yanı sıra tükürük, saç ve kurutulmuş kan lekesi gibi alternatif örneklerin kullanımı, toksikolojik değerlendirmelerin kapsamını genişletmektedir. Ancak matriks etkisi, kontaminasyon, postmortem redistribüsyon ve farmakokinetik değişkenlik gibi faktörler sonuçların yorumlanmasında dikkatle ele alınmalıdır. Bu nedenle analitik validasyon, iç ve dış kalite kontrol süreçleri ile uluslararası kılavuzlara uygun yöntem geliştirme yaklaşımları, güvenilir ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

Teknolojik gelişmeler, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi, otomasyon ve yüksek verimli numune hazırlama sistemlerinin entegrasyonu ile LC-MS/MS tabanlı analizlerin daha hızlı, hassas ve kapsamlı hale gelmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte cihaz maliyeti, altyapı gereksinimleri ve uzman personel ihtiyacı, yöntemin yaygın kullanımında göz önünde bulundurulması gereken

sınırlılıklar arasında yer almaktadır. Gelecekte standardizasyonun artırılması, veri paylaşımının güçlendirilmesi ve çok merkezli kalite güvence programlarının yaygınlaştırılması ile LC-MS/MS'nin klinik ve adli toksikoloji uygulamalarındaki rolünün daha da güçleneceği öngörülmektedir.

Sonuç olarak LC-MS/MS, modern toksikoloji laboratuvarlarının analitik temelini oluşturan, güvenilirlik ve doğruluk açısından altın standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. Uygun örnek yönetimi, validasyon ve kalite güvencesi ile desteklendiğinde bu teknoloji; tanısal doğruluğun artırılması, adli süreçlerin güvenilir şekilde yürütülmesi ve hasta yönetiminin iyileştirilmesi açısından vazgeçilmez bir araç olarak önemini sürdürmeye devam edecektir.

## Kaynaklar

Adaway, J. E., & Keevil, B. G. (2012). Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 883-884, 33-49.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.041>

Al-Asmari, A. I. (2019). Method for Postmortem Quantification of Delta9-Tetrahydrocannabinol and Metabolites Using LC-MS-MS. *J Anal Toxicol*, 43(9), 703-719.  
<https://doi.org/10.1093/jat/bkz065>

Alomari, N., Kurdi, A., Alghamdi, M., Alhussaini, W., Ezzeldeen, G., Alharbi, E.,...Essa, M. (2025). Therapeutic drug monitoring of busulfan in pediatric patients: a 5-year observational study. *BMC Pharmacol Toxicol*, 26(1), 175.  
<https://doi.org/10.1186/s40360-025-01015-w>

Apostol, C. R., Bernard, K., Tanguturi, P., Molnar, G., Bartlett, M. J., Szabo, L.,...Polt, R. (2022). Design and Synthesis of Brain Penetrant Glycopeptide Analogues of PACAP With Neuroprotective Potential for Traumatic Brain Injury and Parkinsonism. *Front Drug Discov (Lausanne)*, 1.  
<https://doi.org/10.3389/fddsv.2021.818003>

Bacila, C. I., Macavei, B. M., Cornea, M., Vintila, B. I., Lomnasan, A., Anghel, C. E.,...Cioca, G. (2025). UHPLC-MS/MS for Antipsychotic Drug Monitoring: A Systematic Review of Clinical and Analytical Performance. *J Clin Med*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/jcm14217544>

Blinder, M. A. (2010). Commentary. *Clin Chem*, 56(1), 19-20. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.137091>

Bosker, W. M., & Huestis, M. A. (2009). Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem*, 55(11), 1910-1931. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108670>

Chace, D. H. (2001). Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chemical reviews*, 101(2), 445-478.

Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D. M., Lu, Z., & Mazzeo, J. R. (2007). Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 852(1-2), 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.030>

Chiurchiu, V., Lanuti, M., De Bardi, M., Battistini, L., & Maccarrone, M. (2015). The differential characterization of GPR55 receptor in human peripheral blood reveals a distinctive expression in monocytes and NK cells and a proinflammatory role in these innate cells. *Int Immunol*, 27(3), 153-160. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu097>

Chung, H., & Choe, S. (2017). Overview of Forensic Toxicology, Yesterday, Today and in the Future. *Curr Pharm Des*, 23(36), 5429-5436. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622101633>

Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., Remiao, F., Marques, A., Santos, A., & Magalhaes, T. (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicol Mech Methods*, 20(7), 363-414. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.497976>

Drummer, O. H., & Gerostamoulos, J. (2002). Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. *Ther Drug Monit*,

24(2), 199-209. <https://doi.org/10.1097/00007691-200204000-00002>

Ferrara, D. S., Tedeschi, L., Frison, G., & Brusini, G. (1998). Quality control in toxicological analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 713(1), 227-243. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(98\)00010-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(98)00010-3)

Florou, D., Di Rago, M., Orfanidis, A., Gerostamoulos, D., & Boumba, V. A. (2024). A broad-spectrum LC-MS/MS method for screening and quantification of 100 analytes in clinical and autopsy blood samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1247, 124323. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124323>

Gerostamoulos, D., Beyer, J., Staikos, V., Tayler, P., Woodford, N., & Drummer, O. H. (2012). The effect of the postmortem interval on the redistribution of drugs: a comparison of mortuary admission and autopsy blood specimens. *Forensic Sci Med Pathol*, 8(4), 373-379. <https://doi.org/10.1007/s12024-012-9341-2>

Gqamana, P. P., & Zhang, Y. V. (2024). High-Throughput Comprehensive Quantitative LC-MS/MS Analysis of Common Drugs and Metabolites (62 Compounds) in Human Urine. *Methods Mol Biol*, 2737, 215-227. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3541-4\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3541-4_20)

Heudi, O., Winter, S., & Picard, F. (2020). Matrix matching in quantitative bioanalysis by LC-MS/MS a dream or a reality? *Bioanalysis*, 12(2), 67-69. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0273>

Jemal, M. (2000). High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr*, 14(6), 422-429. [https://doi.org/10.1002/1099-0801\(200010\)14:6<422::AID-BMC25>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1099-0801(200010)14:6<422::AID-BMC25>3.0.CO;2-I)

Jensen, T. L., Wu, F., & McMillin, G. A. (2019). Detection of in utero Exposure to Cannabis in Paired Umbilical Cord Tissue and Meconium by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clin Mass Spectrom*, 14 Pt B, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2019.01.002>

Kahl, K. W., Seither, J. Z., & Reidy, L. J. (2019). LC-MS-MS vs ELISA: Validation of a Comprehensive Urine Toxicology Screen by LC-MS-MS and a Comparison of 100 Forensic Specimens. *J Anal Toxicol*, 43(9), 734-745. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz066>

Kale, N. (2019). Urine Drug Tests: Ordering and Interpreting Results. *Am Fam Physician*, 99(1), 33-39.

Kang, J.-S. (2012). Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples. *Tandem Mass Spectrometry—Applications Principles*, 29, 441-492.

Kataoka, H. (2015). SPME techniques for biomedical analysis. *Bioanalysis*, 7(17), 2135-2144. <https://doi.org/10.4155/bio.15.145>

Kaza, M., Karazniewicz-Lada, M., Kosicka, K., Siemiatkowska, A., & Rudzki, P. J. (2019). Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *J Pharm Biomed Anal*, 165, 381-385. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.030>

King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., & Olah, T. (2000). Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*, 11(11), 942-950. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(00\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(00)00163-X)

Kintz, P. (2019). Hair analysis in forensic toxicology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, 1(1), e1196.

Langman, L. J. (2007). The use of oral fluid for therapeutic drug management: clinical and forensic toxicology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098(1), 145-166.

Lynch, K. L., Breaud, A. R., Vandenberghe, H., Wu, A. H., & Clarke, W. (2010). Performance evaluation of three liquid chromatography mass spectrometry methods for broad spectrum drug screening. *Clin Chim Acta*, 411(19-20), 1474-1481. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.05.046>

Mahajan, G. (2017). Role of Urine Drug Testing in the Current Opioid Epidemic. *Anesth Analg*, 125(6), 2094-2104. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002565>

Marandiuc, I. M., Docea, A. O., Hirjau, A. C., Avram, O. R., Matei, C. S., Tsatsakis, A., & Arsene, A. L. (2025). New psychoactive substances: a multidisciplinary review of challenges and their diverse character. *Daru*, 33(2), 29. <https://doi.org/10.1007/s40199-025-00572-z>

Marquet, P., & Lachatre, G. (1999). Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 733(1-2), 93-118. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(99\)00147-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(99)00147-4)

Matuszewski, B., Constanzer, M., & Chavez-Eng, C. (1998). Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Analytical chemistry*, 70(5), 882-889.

Maurer, H. H. (1998). Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 713(1), 3-25. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(97\)00514-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00514-8)

Maurer, H. H. (2005). Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem*, 38(4), 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.01.014>

Moeller, K. E., Kissack, J. C., Atayee, R. S., & Lee, K. C. (2017). Clinical Interpretation of Urine Drug Tests: What Clinicians Need to Know About Urine Drug Screens. *Mayo Clin Proc*, 92(5), 774-796. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.12.007>

Moncef, B., Imane, K., Lyna, R., Ettaieb Errahmani, S., & Salma, K. (2026). In Utero Exposure to Pregabalin: Interest of

Meconium Analysis - A Case Report. *Fetal Pediatr Pathol*, 45(1), 28-37. <https://doi.org/10.1080/15513815.2025.2610269>

Plebani, M., Astion, M. L., Barth, J. H., Chen, W., de Oliveira Galoro, C. A., Escuer, M. I.,... Sumarac, Z. (2014). Harmonization of quality indicators in laboratory medicine. A preliminary consensus. *Clin Chem Lab Med*, 52(7), 951-958. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0142>

Pragst, F., & Balikova, M. A. (2006). State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta*, 370(1-2), 17-49. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.019>

Remane, D., Wissenbach, D. K., & Peters, F. T. (2016). Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology - An update. *Clin Biochem*, 49(13-14), 1051-1071. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.010>

Rygaard, K., Pan, M., Nielsen, M. K. K., Dalsgaard, P. W., Rasmussen, B. S., & Linnet, K. (2023). Overview of systematic toxicological analysis strategies and their coverage of substances in forensic toxicology. *Anal Sci Adv*, 4(3-4), 96-103. <https://doi.org/10.1002/ansa.202200062>

Swanson, D. M., Pearson, J. M., & Evans-Nguyen, T. (2022). Comparing ELISA and LC-MS-MS: A Simple, Targeted Postmortem Blood Screen. *J Anal Toxicol*, 46(7), 797-802. <https://doi.org/10.1093/jat/bkab104>

Van Wijk, X. M. R., Goodnough, R., & Colby, J. M. (2019). Mass spectrometry in emergency toxicology: Current state and future applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 56(4), 225-238. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1585415>

Viette, V., Hochstrasser, D., & Fathi, M. (2012). LC-MS (/MS) in clinical toxicology screening methods. *Chimia (Aarau)*, 66(5), 339-342. <https://doi.org/10.2533/chimia.2012.339>

Visconti, G., de Figueiredo, M., Salamin, O., Boccard, J., Vuilleumier, N., Nicoli, R.,... Rudaz, S. (2023). Straightforward

quantification of endogenous steroids with liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Comparing calibration approaches. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1226, 123778. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123778>

Wille, S. M. R., Coucke, W., De Baere, T., & Peters, F. T. (2017). Update of Standard Practices for New Method Validation in Forensic Toxicology. *Curr Pharm Des*, 23(36), 5442-5454. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170714154444>

Wilson, J. F., Toseland, P. A., Capps, N. E., Sandle, L. N., Smith, B. L., Sweeney, G.,...Williams, J. (2001). External quality assessment of laboratory performance in analysis of toxicological cases. *Forensic Sci Int*, 121(1-2), 27-32. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00449-2](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00449-2)

Wu, A. H., & French, D. (2013). Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*, 420, 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.10.026>

Wu, A. H., Gerona, R., Armenian, P., French, D., Petrie, M., & Lynch, K. L. (2012). Role of liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology. *Clin Toxicol (Phila)*, 50(8), 733-742. <https://doi.org/10.3109/15563650.2012.713108>

Yamagishi, Y., Inokuchi, G., Hoshioka, Y., Nagasawa, S., Iwase, H., & Ogra, Y. (2023). Identification of postmortem paliperidone metabolite in human blood by LC-Q-Orbitrap-MS. *J Anal Toxicol*, 47(6), 517-522. <https://doi.org/10.1093/jat/bkad033>

Yu, S., Zou, Y., Ma, X., Wang, D., Luo, W., Tang, Y.,...Qiu, L. (2024). Evolution of LC-MS/MS in clinical laboratories. *Clin Chim Acta*, 555, 117797. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.117797>

Zhang, Y. Y., Xia, Y., Guo, H. L., Hu, Y. H., Wen, X. Y., Chen, J.,...Chen, F. (2022). An LC-ESI-MS/MS assay for the therapeutic drug monitoring of 15 antiseizure medications in plasma of children with epilepsy. *Biomed Chromatogr*, 36(12), e5484. <https://doi.org/10.1002/bmc.5484>



