



Viral Enfeksiyonlarda T Hücre Yanıtını Belirlemede Kullanılan Bazı Flow Sitometrik Yöntemler

Remziye ÖZBEK^{1, a}
Kezban ŞAHNA^{2, b}

¹ Sivas Cumhuriyet
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Ana Bilim Dalı,
Sivas, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0001-9831-7193

^b ORCID: 0000-0001-9211-5419

Geliş Tarihi : 18.03.2022
Kabul Tarihi : 01.06.2022

Yazışma Adresi Correspondence

Remziye ÖZBEK
Sivas Cumhuriyet
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji
Ana Bilim Dalı
Elazığ – TÜRKİYE

remziyeozbek@cumhuriyet.edu.tr

İmmün Sistem, patojen mikroorganizmaya karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirirken, viral bir enfeksiyonda immün yanıtın esas hedefi hem virüsü hem de virüs ile enfekte konak hücreleri humoral ve hücreyel immün yolaklar ile yok etmektir. Virüslerin sadece hücre içinde (endojen) çoğalabilmeleri ve antikorların da yalnızca hücre dışı (eksojen) viral antijenlere karşı etkili olması viral enfeksiyonlarda humoral immün yanıtın tek başına yetersiz kalmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla viral enfeksiyonlarla mücadelede enfekte hücrelerin yok edilmesi, virüs reaktivasyonun engellenmesi gibi önemli roller alan CD8+ T (Cytotoxic) ve CD4+ T (T helper) hücrelerin önemi bir kere daha ortaya çıkmaktadır.

T hücrelerinin geçmişte antijen ile karşılaşmış (antijen-deneyimli T hücre) hem pre-klinik hem de klinik çalışmalarda ilgi duyulan ve merak uyandıran konulardan birisidir. T hücre yanıtını değerlendirmek için uygulanabilecek farklı flow sitometrik analiz yöntemleri bulunmaktadır. Bu teknikler sayesinde immün sistemin yapı ve işleyişi, virüse ve virüs kaynaklı enfeksiyona karşı vücut tepkimesi ayrıntılı biçimde analiz edilebilmiş ve konağa yabancı protein-peptid üzerindeki immün-epitopların da belirlenebilmesi ile etkin aşı çalışmalarının yapılmasına olanak sağlamıştır.

Bu derlemede, viral enfeksiyonlarda önemli rol alan CD8+ ve CD4+ T hücre yanıtının immün-fenotipini, fonksiyonunu ve antijen-spesifik miktarını değerlendirmek için kullanılan bazı flow sitometri tabanlı analiz yöntemleri hakkında bilgi verme amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Flow Sitometri, CD4+ T hücresi, CD8+ T hücresi, viral enfeksiyon

Some Flow Cytometric Methods used in Determining T Cell Response in Viral Infections

The immune system develops various defence mechanisms against pathogenic microorganisms and the main goal of these mechanisms is to eliminate the virus and the virus-infected host cells by humoral and cellular immune system components. The fact that viruses can only reproduce inside the cell (endogenous) and antibodies are only effective against extracellular (exogenous) viral antigens leads to insufficient humoral immune response alone in viral infections. Therefore, CD8+ T (Cytotoxic) and CD4+ T (T helper) cells play crucial roles in the combat against viral infections, such as the destruction of infected cells and the prevention of virus reactivation.

The detection of T cells whether stimulated previously or not (antigen-experienced T cell) is one of the trend topics in both pre-clinical and clinical studies. There are different flow cytometric analysis methods that have been developed to observe T cell responses. Owing to these techniques, the structure and functioning of the immune system, the reaction of organisms to the virus and virus-borne infections have been comprehensively evaluated. Moreover, the determination of the immune-epitopes on the protein-peptide foreign to the host has enabled effective vaccine studies to be conducted.

This review dedicated to summarising main flow cytometry-based analysis methods used to evaluate the immune-phenotype, function, and the measurement of antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell response levels that play an important role in viral infections.

Key Words: Flow cytometry, CD4+ T cell, CD8+ T cell, viral infection

1.Giriş

Virüslere karşı hücreyel immün yanıtta en etkili hücreler CD8+ T hücreleridir. Bu hücreler yalnızca tüm çekirdekli hücrelerde yerleşim gösteren major histocompatibility complex- I (MHC-I)'in sunduğu antijenleri tanıma özelliğine sahiptir, dolayısıyla virüsle enfekte olan ve bunları sunabilen tüm hücreler sitotoksik T lenfositlerin hedefi olabilirler. Sitotoksik T lenfositleri, antijen-spesifik T hücre reseptörü (TCR) ile enfekte hücrelere bağlanır ve sitotoksik maddelerini hücre membranına boşaltırlar. Bu maddeler, enfekte hücrelerin apoptozisini harekete geçirerek ölümüne neden olurlar. Apoptozis sırasında aktive olan nükleazlar, hücreyi enfekte eden viral ajanların nükleik asitlerini parçalar. Bunların yanı sıra, uyarılan sitotoksik T hücreleri, salgıladıkları IFN- γ ile makrofajların virüsleri fagosite etme gücünü de arttırlar. CD8+ sitotoksik T hücreleri bir kez etkinleştikten sonra virüslerin çoğaldıkları hücreleri lize eder ve tüm vücutta enfekte hücreleri tanıma, bağlama ve öldürmeyi sürdürürler (1, 2). Enfeksiyonun kontrolünde CD4+ T hücrelerinin rolleri de geniştir. CD4+ T hücre fonksiyonu genel olarak; CD8+ T hücre yanıtının geliştirilmesi, CD8+ T hücre belleğinin geliştirilmesi, miyeloid hücrelerin

fagositik veya oksidatif patlama aktivitelerinin artırılması ve B hücre-aracılı yanıtı yardımcı olma şeklinde ifade edilebilir. Bu fonksiyonlar, T helper tip 1 (Th1) hücreleri, T helper tip 2 (Th2) hücreleri, T helper tip 17 (Th17) hücreleri, regülatör T (Treg) hücreleri, T foliküler helper (Tfh) hücreleri ve sitotoksik CD4+ T hücreleri gibi alt sınıflara geniş bir şekilde gruplandırılabilen CD4+ T hücreleri tarafından sağlanır (3). Akut viral enfeksiyon sonrası virüse karşı gelişen spesifik T hücre yanıtında bu hücreler tarafından salgılanan sitokin profillerinde enfeksiyon süresi boyunca önemli değişiklikler meydana gelir (4). Bu profil değişikliğinin hücre düzeyinde ölçülmesi, sitokin üreten hücrelerin fenotiplendirilmesine önemli katkı sağlayabilmektedir. Ayrıca viral vektörler ve DNA aşılı gibi T hücre yanıtını indükleyen aşılarda immünojenite, çoğu zaman sitokin bazlı yaklaşımlarla değerlendirilmektedir (5, 6).

İmmün yanıtın niteliksel ve niceliksel durumu hakkında veri elde edilmesinde çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bu metotlar, immünitinin altında yatan temel mekanizmaları ve klinik teşhislerin tasarımı ile uygulanacak tedavinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Standart metotlar heterojen hücre popülasyonlardaki ortalama cevabı ölçmektedir. Hücre proliferasyonu, sitolitik aktivite ve sitokin ekspresyonunu saptayan yaygın deneyler; virüsler, tümör hücreleri ve çeşitli mikroorganizmalara karşı hastalık patogenezi ve bağışıklığı hakkında önemli bilgiler vermektedir (7). T hücre belleğinin devamlılığı viral enfeksiyonlarda önem arz etmektedir. Bu amaçla, vaccinia virüs (VV), measles virüs (MV) ve yellow fever virüs (YFV) dahil olmak üzere çeşitli akut viral enfeksiyonlarda T hücre belleği araştırılmıştır (4).

Akım (Flow) Sitometri / Hücre Fenotiplemesine Dayalı Testler

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel yada kimyasal özelliklerinin ölçülmesidir. Flow sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesidir. Flow sitometrinin temel prensibi; hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüleri açısından değerlendirilmesidir. Flow sitometrinin çalışma prensipleri 1870'li yıllara kadar gitse de 1969 yılında argon lazerinin kullanılmaya başlanması ve 1980'li yıllarda ayırma işleminin bulunması ile önemli bir ivme kazanmış ve daha sonra sürekli olarak meydana gelen gelişmelerle günümüze kadar gelmiştir (8).

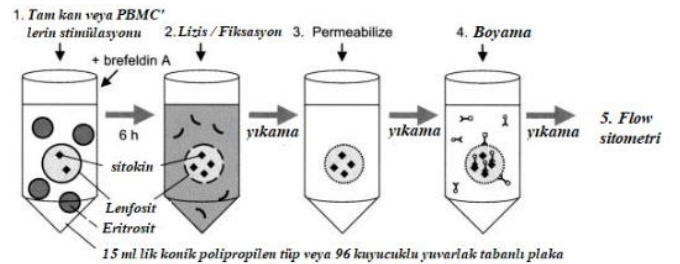
Flow sitometri ışık mikroskopuna göre çok daha fazla hücreyi daha kısa bir süre içerisinde inceleme imkanı sağlar. Bu teknik ile 1 saniyede 500 hücre sayılır ve ortalama 10000 hücre 20 saniyede analiz edilebilir (9). Floresansla aktive edilen flow sitometri, immünolojide rutin olarak kullanılan en güçlü teknolojilerden biridir. Tek hücre bazında, hücrelerin hem hızlı ve çok parametreliliği için hem de yüksek oranda saflaştırılmış hücre popülasyonlarının ayırımında olanak sağlar. Bu hücre tipleri arasında ayırma yapma yeteneği, hücresel bağışıklık ve hastalık patogenezi anlamamız açısından çok önemlidir (10).

Tüm hücrelerin yüzeyinde veya hücre içerisinde hücreye spesifik antijenler mevcuttur. Flow sitometride hücrenin büyüklüğü, hücrenin iç yapısı (granüleriyesi), ve hücrede incelenmek istenilen antijene ait monoklonal antikorun floresansı ölçülmektedir. Hücreler öncelikle monoklonal antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC (Fluorescein isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin chlorophyll protein complex) gibi floresan boya ile işaretlendiği için belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştırıldığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirilerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilmektedir (11). Flow sitometri analizleri için hücrelerin sıvı içinde süspansiyon halinde bulunması gerekir. Bu amaçla kan hücreleri flow sitometride en çok incelenen hücreler olmuşlardır. Solid dokular için ise hücreler ayrıştırılıp hücre süspansiyonu haline getirilerek analizde kullanılmaktadır. Flow sitometri tekniği ile daha çok rutin laboratuvarlarda lökosit süspansiyonlarında analizler yapılmaktadır. Lökositlerin ayrılması ise hücre büyüklüğü ve granül yapısına göre yapılmaktadır (9, 11).

Aşağıda flow sitometri yöntemleri kullanılarak CD4+ ve CD8+ T hücre analizlerine yönelik yapılan bazı tekniklerden bahsedilmiştir.

1. Sitokin Akım Sitometrisi (Cytokine Flow Cytometry-CFC)/ İntrasellüler Sitokin Boyama (Intracellular Cytokine Staining-ICS)/ Yöntemi

Kan veya periferik kan mononükleer hücrelerin (Peripheral blood mononuclear cells-PBMC) antijen spesifik stimülasyonunun ardından protein salgılanmasının inhibisyonu ve birikmiş hücre içi sitokinlerin çok renkli akım sitometrisi ile ölçülmesi, sitokin flow sitometrisi (CFC) veya intrasellüler sitokin boyama (ICS) olarak adlandırılır. Uygulanan stimülasyona bağlı olarak, CD4+ veya CD8+ T hücre cevaplarını tespit etmek için kullanılabilen ve iyi çalışan yöntemlerden birisidir. ICS tekniği ile çoklu sitokinler (veya kemokinler) ölçülebilir. IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17 ve TNF- α yaygın olarak ölçülen sitokinler arasındadır (12,13) (Şekil 1).



Şekil 1. Sitokin flow sitometri deneylerinin metodolojik şeması (14)

CFC gibi teknikler kullanılarak kronik viral enfeksiyonların (HIV, HCV ve CMV gibi) akut enfeksiyon sırasında CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtlarının indüklediği açıkça görülmüştür. Fonksiyonel antijen-spesifik T hücrelerinin frekanslarının belirlenmesi, birçok hastalık modelinde araştırmacıların CD4+ ve CD8+ T hücre

yanıtlarının gücü ile immün koruma arasındaki ilişkiyi değerlendirmesine olanak sağlamıştır. Örneğin, farelerin LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) enfeksiyonuna karşı güçlü immün yanıtı uzun süreli hafıza ile ilişkili olan güçlü CD4+ T hücre sitokin yanıtları ile ilişkilidir (15).

Günümüzde ICS tekniği aşılama denemeleri sırasında immünojenite ölçüsü olarak T hücre reaktivitesini ölçmede en sık kullanılan yöntemlerden biridir. ICS'nin en büyük avantajı hücrelerin tekli olarak çeşitli özelliklerinin tespit edilebilmesidir. Yöntem hücre popülasyonlarının önceden zenginleştirilmesine gerek kalmaksızın tam kan veya PBMC'ler üzerinde gerçekleştirilir. Ayrıca yöntem hızlı ve az maliyetlidir. Kan alımından sonra yaklaşık 8 saat gibi kısa sürede sonuç verebilir. ICS, HIV aşı klinik çalışmalarında hem CD4+ hem de CD8+ T hücresi yanıtlarını izlemek için kullanılmıştır (16). Sirivichayakul ve ark. (17) Tayland'da yaptıkları bir faz I çalışmasında anti-HIV aşısının değerlendirilmesinde ICS testinin HIV aşısı immünojenitesini araştırmak için sınırlı kaynaklara sahip ülkelerde güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

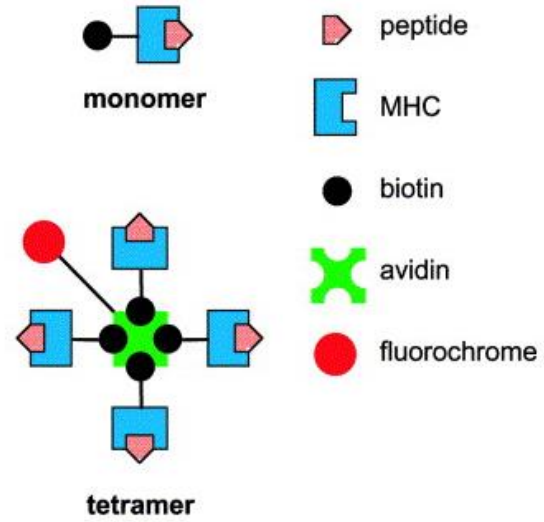
2. Tetramer Boyama (Tetramer Staining)

Antijen-spesifik T hücrelerinin kantitatifasyonu için kullanılan bir yöntem de tetramer boyamadır. "MHC tetramer boyama" olarak bilinen bu teknik, MHC-peptid komplekslerinin floresan oligomerleri kullanılarak flow sitometri ile antijen-spesifik T hücrelerinin analizine dayanmaktadır. İlk olarak 1996 yılında Altman ve ark. tarafından kullanılmıştır. Tetramerler T-hücre reseptörlerini güçlü bir avidite ile bağlayarak, yapısına konjuge edilmiş floresan molekülleri aracılığıyla etiketli hücrelerin tespit edilmesini sağlar (18, 19).

2.1. MHC Sınıf I Tetramerleri

MHC moleküllerinin tetramerik kompleksleri, özellikle viral enfeksiyonlarda ve aşılama sonrası in vitro olarak antijene spesifik T hücrelerinin belirlenmesinde önemli bir araç olarak ortaya çıkmıştır. T hücre fenotiplemesi, önceden toplam CD8 + T hücre havuzuna göre gerçekleştirilebilmiş bir metot iken daha sonraları MHC sınıf I tetramerlerinin geliştirilmesiyle birlikte rutin olarak antijen-spesifik T hücrelerin durumunu incelemek için kullanılmıştır. Bu tekniğin dayandığı temel prensip, antijen-spesifik T hücrelerin, MHC-peptid kompleksi içeren tetramerik molekül ile direkt olarak boyanmasıdır (20, 21).

Sınıf I moleküllerinin ağır ve hafif zincirlerini oluşturan proteinler, peptid-MHC kompleksi oluşturmak üzere epitop peptitlerle kaynaştırılır, ardından oluşan kompleks saflaştırılarak bir enzim ile biyotinleme yapılır. Biotin ile işaretlenen peptid-MHC kompleksi 4:1 oranında avidin ile karıştırılarak tetramerik yapı elde edilir. Avidin molekülü bir florokrom ile konjuge edilir, böylece tetramerler ile etiketlenmiş spesifik T hücreleri flow sitometri ile kolayca tespit edilebilir (22) (Şekil 2).



Şekil 2: Peptid-MHC tetramerlerinin yapısı (22)

2.2. MHC Sınıf II Tetramerleri

Antijen-spesifik CD4 hücrelerini tanımlamak için MHC-II tetramerlerinin sentezi ve kullanımı ile ilgili ilk rapor 1999'da Novak ve ark. (4) tarafından verilmiştir. Sınıf II tetramerlerin geliştirilmesi, çözünür sınıf II-peptid komplekslerinin hazırlanmasındaki zorluklar, antijen-spesifik CD4+ T hücrelerinin düşük frekansta olması ve MHC-peptid kompleks molekülleri arasındaki düşük afinite nedeniyle sınıf I tetramerlerden daha zor olmuştur, bu nedenle problemlerin üstesinden gelmek için farklı stratejiler kullanılmıştır. Birçok MHC sınıf II multimeri, insekt hücrelerinde üretilen rekombinant proteinler kullanılarak yapılmıştır. Bazı araştırmacılar biotin-avidin bağlanmasına dayanan tetramerlere ek olarak, dimerler oluşturmak için sınıf II moleküllerini immünooglobulin ağır zincirine veya Fc kısmına bağlamışlardır. Bazı araştırmacılar ise peptid-MHC kompleksi oluşturmak için α ve β zincirlerinin kombinasyonunda lösin fermuarı kullanmışlardır. Bu stratejiler, antijene spesifik CD4+ T hücrelerini tespit etmek için kullanılan sınıf II tetramerlerinin başarılı bir şekilde üretilmesine yol açmıştır (4, 22).

İnsan tetramerleri, çeşitli hastalık modellerinde hem CD8+ hem de CD4+ antijene spesifik T hücrelerini tanımlamak için başarıyla kullanılmıştır. İnfluenza aşısı ile ilgili yapılan bir çalışmada aşılama öncesi ve sonrasında spesifik CD8+ T hücreleri ölçmek için M1 peptidi ile HLA-A2 tetramerini kullanılmıştır. Yine kronik olarak Hepatit C virüsü (HCV) ile enfekte olmuş ve iyileşmiş hasta bireylerde HCV'ye özgü CD8+ T hücrelerinin tek hücre seviyesindeki efektör fonksiyonu ve fenotipini araştırmak için HCV NS3 epitopuna özgü HLA-A2 tetramerini kullanılmıştır (18, 23).

Antijen-spesifik CD8+ T hücrelerinin tetramer boyaması, ICS'ye kıyasla hassasiyet açısından daha fazla avantaj sağlamıştır. Tetramer kullanımının dezavantajı, sadece spesifik bir MHC-peptid çiftini tanıyan T hücrelerinin, tek bir tetramer tarafından tespit

edilebilmesi ve dolayısıyla antijen epitopa spesifik olmasıdır (18).

3. Aktivasyonla İndüklenmiş Markır Testi (Activation-Induced Marker Assay-AIM)

Sınıf II multimerlerinin sentezi ve kullanımı ile ilgili zorluklara ve dolayısıyla epitopa özel CD4+ T hücrelerini tanımlama ve izole etme zorluğuna bağlı olarak, CD4+ T hücre fonksiyonunun moleküler temelini anlaşılması CD8+ T hücrelerinin gerisinde kalmıştır. Dolayısıyla antijene spesifik T hücrelerinin canlı izolasyonuna izin veren bu yöntem gerekli görülmüştür (7).

Bu teknik, ICS'ye benzer bir şekilde uygulanabilir fakat, hücre içi sitokinleri boyamadan ziyade, PDL1, CD25 ve OX40 dahil olmak üzere T hücre reseptörüyle indüklenen hücre yüzeyi markırları için boyama yapılır. Bu markırların farklı kombinasyonları AIM+ T hücre popülasyonlarını tanımlamada kullanılmıştır. Bu yöntemin avantajı, tüm Th1, Th2, Th17, Tfh ve Treg gibi belirli bir sitokin veya efektör molekülleri saptaması ve daha geniş antijen-spesifik hücre popülasyonunu tespit edebilmesidir. Deneysel başlangıçta ICS ile saptanması zor olan T-foliküler helper hücrelerini saptamak için geliştirilmiştir, daha sonra ise aşılama ile veya enfeksiyonla antijene maruz bırakıldıktan sonra CD4+ T hücre değerlendirmesi için de kullanılmıştır. Yöntem ICS'den daha yüksek antijen-spesifik T hücre seviyelerini göstermiştir (7, 24, 25). Yapılan bir çalışmada (6), AIM analizlerinin hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerini tespit etmek için kullanılabileceği gösterilmiştir. Çalışmada CD8+ AIM yanıtları ICS'ye benzer sonuç verirken, CD4+ AIM yanıtları ise saptanmamıştır. Bu durumun nedeni, ICS ile karşılaştırıldığında AIM deneylerinin daha fazla CD4+ alt popülasyonu saptaması olarak düşünülmüştür. Yapılan bu çalışma AIM deneylerinin, tek başına ICS ile tespit edilmesi zor olan yeni bellek T hücre yanıtlarını saptamak için aşı çalışmalarında da kullanılabileceğini göstermiştir (24). Zaunders ve ark. (26) tarafından geliştirilen başka bir flow sitometri çalışmasında ise antijen-spesifik CD4+ T hücrelerini analiz etmek için CD25 (IL-2Ra) ve CD134/OX40 (bir TNF reseptörü aile üyesi) reseptörlerinin ortak ekspresyonu uygulanmıştır. COVID-19 enfeksiyonu geçirmiş hastalarda SARS-CoV-2'ye spesifik CD8+ T hücrelerini ölçmek için AIM ve ICS metodolojileri kullanılmıştır. CD8+ T hücre yanıtları AIM tarafından vakaların %70'inde saptanmıştır (27).

4. Boncuk Temelli Akım Sitometri Yöntemi (Bead-Based Flow Cytometric Assay-Luminex ve LegendPlex™)

Yöntem yüksek doğruluk oranı, sensitivite, tekrarlanabilirlik, yüksek verim ve az miktarda numune (25-50µL gibi) kullanarak birden fazla analiti ölçme yeteneği nedeniyle sitokin testlerinde en çok kullanılan analiz yöntemlerinden biri olmuştur. Bu tür çalışmalar, mikrobeadlar üzerinde hareketsiz hale getirilen yakalama antikorlarını kullandığından sandviç ELISA prensibi üzerine inşa edilmiştir (28).

Luminex deneyleri, farklı floresan (kırmızı ve kıvılcık) boyalarla boyanmış mikrometre ölçekli

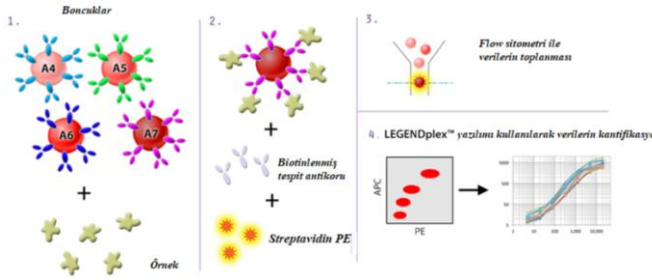
boncuklar (mikrosfer) kullanılarak çoklu sitokin analizlerinin yapılmasına yöneliktir. Boncuklar polistiren veya manyetik yapıda olabilir. Flow sitometride bu mikrosferlerin her birinin bir lazerle uyarılması sonucu farklı dalga boylarında ışık yayılmaktadır. Öncelikle her bir boncuk, yüzeyi bir yakalama antikorunu (sitokin, kemokin veya bir enfeksiyon biyo-markırına spesifik) ile konjuge edilir. Daha sonra ilgilenilen biyolojik numune (serum veya hücre süpernatantı) her biri farklı bir sitokin için spesifik olan mikrosfer karışımı ile birleştirilir ve 96 kuyucuklu bir plaka içerisinde inkübe edilir. Biyolojik numune-mikrosfer karışımı daha sonra yıkanır ve istenen sitokine özgü bir tespit antikorunu ilave edilir. Bu tespit antikorları ayrıca farklı floresan özellikteki bir raportör boya ile konjuge edilir. Bir kez daha yıkandıktan sonra mikrosfer-sitokin-raportör karışımı bir akış haznesinden geçirilerek tekli boncuklar bir süspansiyon halinde analiz edilir. Çeşitli mikrosfer setleri kullanarak 96 kuyucuklu bir plakanın bir kuyucuğunda aynı anda 100'e kadar analit ölçülebilmektedir (24, 28, 29).

Luminex, fizyolojik ve patolojik hastalık süreçlerinde sitokinlerin değerlendirilmesi ve analiz edilmesinde önemli bir araçtır (29). Altheel ve ark. (30) luminex yardımıyla MERS-CoV ile enfekte 49 hastada Th1/Th2 düzeylerini ortaya koymak için IFN-γ, IL-12, IL-2, IL-10, IL-13, IL-4 ve IL-5 plazma sitokin seviyelerini ölçmüştür. Hepatit B ile kronik olarak enfekte hastalarda serum HBV pregenomik RNA'nın Th1 ve Th2 ile korelasyonunu araştıran bir çalışmada (31) sitokin analizlerinin yapılmasında, Rubbo ve ark. (32) tarafından yapılan bir çalışmada HIV-1 ve HSV (Herpes Simplex Virus) ile ko-enfekte bireyler ile HIV-1 ile enfekte olmayıp HSV ile enfekte bireyler arasındaki T hücre yanıtlarının karşılaştırılmasında, Ebola virüs enfeksiyonunun (EBOV) patofizyolojisini anlamak ve hastalık mekanizması hakkında önemli biyobelirteçleri (T hücre, sitokin vb.) ortaya koymak için yapılan başka bir çalışmada (33) luminex metodu kullanılmıştır.

Luminex teknolojisi, klinik öncesi ve klinik çalışmalarında aşılama ile indüklenen sitokin proteinlerinin araştırılmasında da kullanılmıştır. Groot ve ark. (34) VZV aşılama sonrası Th1, Th2, Th17, Treg ve sitotoksik T hücre yanıtları (IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNFα, IP-10, Granzyme B) için kullanmıştır. H5N1 (5), HIV-1 (35), EBOV (36) gibi viral aşı çalışmalarında da kullanılmıştır.

BioLegend'in LegendPlex™ testi (37), iki temel antikor arasında bir analitin yakalandığı sandviç temelli immunoassay ile aynı temel prensipleri kullanan boncuk temelli bir immüno-assay yöntemidir.

LegendPlex testinin prensibi Luminex'e benzerdir. Bir analit-spesifik antikora konjuge edilmiş farklı düzeylerde APC floresan içeren boncuk kullanılır. Aynı zamanda bir numunenin saptanması için biyotin yakalama antikorunu ve streptavidin-PE reaktifi kullanılır. İki farklı büyüklükte boncuk kullanılarak farklı analitler renk ve boyut bazında ayırt edilebilir. Luminex platformuna kıyasla daha az sayıda analit tespit edilebilmektedir (24) (Şekil 3).



Şekil 3. LEGENDplex™ prensibi (37)

Dengue virüs enfeksiyonu sırasında Toll-like receptor 2'nin bir rol oynayıp oynamadığını araştıran bir çalışmada enflamatuar sitokin ekspresyonu LEGENDplex™ ile analiz edilmiştir (38). Farklılaşmış epitel hücrelerinin Respiratory Syncytial Virus enfeksiyonuna karşı antiviral yanıtını değerlendiren bir çalışmada (39), enfeksiyondan sonraki 1, 2 ve 3. günlerde bazı sitokin seviyeleri LegendPlex antivirüs yanıt paneli kullanılarak ölçülmüştür. Başka bir çalışmada (40), Batı Nil Virüsü enfeksiyonunda kapsamlı bir antiviral sitokin panelini (özellikle T lenfosit yanıtı ile ilgili olanlar) oluşturmak için bu yöntem kullanılmıştır.

Kaynaklar

- Diker KS. İmmunoloji. 2. Baskı, Ankara: Medisan, 2005.
- Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. İmmünoloji. Deniz G, Erten G, Camcioğlu Y (Çevirenler). 1. Baskı, İstanbul: Nobel, 2013.
- Vella LA, Herati RS, Wherry EJ. CD4 + T cell differentiation in chronic viral infections: The Tfh perspective. Trends Mol Med 2018; 23: 1072-1087.
- Novak EJ, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. J Clin Invest 1999; 104: 63-67.
- Pedersen GK, Sjursen H, Nostbakken JK, et al. Matrix M (TM) adjuvanted virosomal H5N1 vaccine induces balanced Th1/Th2 CD4+T cell responses in man. Hum Vaccin Immunother 2014;10: 2408-2416.
- Bowyer G, Rampling T, Powlson J, et al. Activation-induced markers detect vaccine-specific CD4⁺ T cell responses not measured by assays conventionally used in clinical trials. Vaccines (Basel) 2018; 6: 50.
- Phetsouphanh C, Zaunders JJ, Kelleher AD. Detecting antigen-specific T cell responses: From bulk populations to single cells. Int J Mol Sci 2015; 16: 18878-18893.
- Brown M, Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and clinical applications in hematology. Clin Chem. 2000; 46: 1221-1229.
- Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2007; 5: 75-82.
- Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: Unravelling the immune system. Nat Rev Immunol 2004; 4: 648-655.
- Dalva K, Gülbaş Z. "Akım sitometri uygulamaları". <https://studylibtr.com/doc/1189994/akim-sitometri-uygulamaları/2006/10.02.2022>.
- Shacklett BL. Beyond 51Cr release: New methods for assessing HIV-1-specific CD8+ T cell responses in peripheral blood and mucosal tissues. Clin Exp Immunol 2002; 130: 172-182.
- De Rosa SC. Vaccine applications of flow cytometry. Methods 2012; 57: 383-391.
- Maecker HT, Maino VC. Analyzing T-cell responses to cytomegalovirus by cytokine flow cytometry. Hum Immunol 2004; 65: 493-499.
- Maino VC, Maecker HT. Cytokine flow cytometry: A multiparametric approach for assessing cellular immune responses to viral antigens. Hum Immunol 2004; 110: 222-231.
- Freer G, Rindi L. Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: Basic principles and recent advances. Methods 2013; 61: 30-38.
- Sirivichayakul S, Thantiworasit P, Chatkulkawin P, et al. Immunogenicity assay validation for an HIV vaccine trial: High IFN γ /IL-2+ CD8+ T cells background in healthy Thais. Vaccine 2011; 29: 6002-6007.
- Saade F, Gorski SA, Petrovsky N. Pushing the frontiers of T-cell vaccines: Accurate measurement of human T-cell responses. Expert Rev Vaccines 2012; 11: 1459-1470.
- Vollers SS, Stern LJ. Class II major histocompatibility complex tetramer staining: Progress, problems, and prospects. Immunology 2008; 123: 305-313.

Sonuç

CD4+ T ve CD8+ T hücre yanıtları, viral enfeksiyon sırasında bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Antijen-spesifik T hücre yanıtının belirlenmesi; kronik enfeksiyonlarda patolojik seyri etkileyen T hücre cevabının enfeksiyon sürecindeki durumunu ortaya koymak, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda aşılama yönelik T hücre yanıtlarını değerlendirmek ve özellikle de viral aşı teknolojilerindeki esas hedef olarak immün yanıtın düzenlenmesi ile elde edilecek sonuçların ışığında yeni immünolojik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla, CD4+ T ve CD8+ T hücrelerindeki farklı temel süreçleri ve kritik yolları ortaya koymak için bazı yöntemler geliştirilmiştir. Birçok çalışmada CD4+ ve CD8+ T lenfosit yanıtı birlikte araştırılmıştır. Çalışmalarda genel olarak; total T hücrelerinin sayısı, fenotiplendirilmesi ve proliferasyonu ile sitokin analizine yönelik metodolojiler kullanılmıştır. Flow sitometri ise süspansiyon halindeki hücrelerin detaylı olarak incelenmesine imkan veren bir yöntemdir. Bu derlemede, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin belirlenmesi, ölçülmesi, immünofenotiplendirmesi gibi amaçlar için kullanılan flow sitometri temelli bazı immünolojik yöntemlere değinilmiştir.

20. Gillespie GMA, Appay V, Rowland-Jones SL, McMichael AJ. The use of tetramers in the quantitative analysis of T-cell responses. *Methods in Microbiology* 2002; 125-156.
21. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt IM. *İmmünoloji. İmir T (Çeviri Editörü). 7. Baskı, Ankara: Palme, 2008.*
22. Kita H, He XS, Gershwin ME. Application of tetramer technology in studies on autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 43-49.
23. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447-3458.
24. Flaxman A, Ewer K. Methods for measuring T-Cell memory to vaccination: From mouse to man. *vaccines* 2018; 6: 43.
25. Reiss S, Baxter AE, Cirelli KM, et al. Comparative analysis of activation induced marker (AIM) assays for sensitive identification of antigen-specific CD4 T cells. *PLoS One* 2017; 12: e0186998.
26. Zaunders JJ, Munier ML, Seddiki N, et al. High levels of human antigen-specific CD4+ T cells in peripheral blood revealed by stimulated coexpression of CD25 and CD134 (OX40). *J Immunol* 2009 ; 183: 2827-2836.
27. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* 2020; 181: 1489-1501.
28. Kupcova-Skalnikova H, Cizkova J, Cervenka J, Vodicka P. Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *Int J Mol Sci* 2017;18: 2697.
29. Khalifian S, Raimondi G, Brandacher G. The use of luminex assays to measure cytokines. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 1-5.
30. Alhethel A, Albarrag A, Shakoob Z, et al. Assessment of Th1/Th2 cytokines among patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Int Immunol* 2020; 32: 799-804.
31. Gu Y, Chen L, Lian Y, et al. Serum HBV pregenomic RNA is correlated with Th1/Th2 immunity in treatment-naive chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 2020; 92: 317-328.
32. Rubbo PA, Tuailleon E, Nagot N, et al. HIV-1 infection impairs HSV-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell response by reducing Th1 cytokines and CCR5 ligand secretion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; 58: 9-17.
33. Kerber R, Krumkamp R, Korva M, et al. Kinetics of soluble mediators of the host response in ebola virus Disease. *J Infect Dis* 2018; 218: 496-503.
34. Groot N, Pileggi G, Sandoval CB, et al. Varicella vaccination elicits a humoral and cellular response in children with rheumatic diseases using immune suppressive treatment. *Vaccine.* 2017; 35: 2818-2822.
35. Moyo N, Borthwick NJ, Wee EG, et al. Long-term follow up of human T-cell responses to conserved HIV-1 regions elicited by DNA/simian adenovirus/MVA vaccine regimens. *PLoS One* 2017; 12: e0181382.
36. Dahlke C, Kasonta R, Lunemann S, et al. Dose-dependent T-cell dynamics and cytokine cascade following rVSV-ZEBOV immunization. *Ebio Medicine* 2017; 19: 107-118.
37. Anonymous. "Legendplex". <https://www.biolegend.com/legendplex/14.06.2018>.
38. Aguilar-Briseño JA, Upasani V, Ellen BMT, et al. TLR2 on blood monocytes senses dengue virus infection and its expression correlates with disease pathogenesis. *Nat Commun* 2020; 11: 3177.
39. Rijsbergen LC, Lamers MM, Comvalius AD, et al. Human respiratory syncytial virus subgroup A and B infections in nasal, bronchial, small-airway, and organoid-derived respiratory cultures. *mSphere* 2021; 6: e00237-21.
40. Zidovec-Lepej S, Vilibic-Cavlek T, Barbic L, et al. Antiviral cytokine response in neuroinvasive and non-neuroinvasive west nile virus infection. *Viruses* 2021; 13: 342.